



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas



GRACIANA DE AZAMBUJA

A prevenção da dor muscular crônica pelo exercício físico:
o papel de células não-neuronais no processo anti-inflamatório

LIMEIRA - 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas

GRACIANA DE AZAMBUJA

A prevenção da dor muscular crônica pelo exercício físico:
o papel de células não-neuronais no processo anti-inflamatório

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas
da Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e
Metabolismo, na Área de Ciências do Esporte.

Orientadora: Professora Dr^a. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA GRACIANA DE
AZAMBUJA, E ORIENTADA PELA PROF. DRA. MARIA
CLÁUDIA GONÇALVES DE OLIVEIRA.

LIMEIRA - 2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

Az13p Azambuja, Graciana de, 1993-
A prevenção da dor muscular crônica pelo exercício físico : o papel de células não-neuronais no processo anti-inflamatório / Graciana de Azambuja. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Mialgia. 2. Citocinas. 3. Prevenção. 4. Exercícios físicos. 5. Macrófagos.
I. Oliveira, Maria Cláudia Gonçalves de, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: The chronic muscle pain prevention by physical exercise : the role of non-neuronal cells in the anti-inflammatory process

Palavras-chave em inglês:

Myalgia

Cytokines

Prevention

Exercise

Macrophages

Área de concentração: Ciências do Esporte

Titulação: Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira [Orientador]

Dioneia Araldi

Waldiceu Aparecido Verri Júnior

Adriana Souza Torsoni

Hosana Gomes Rodrigues

Data de defesa: 07-10-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3898-6736>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7385565811614770>

Folha de Aprovação

Autor(a): Graciana de Azambuja

Título: A prevenção da dor muscular crônica pelo exercício físico: o papel de células não-neuronais no processo anti-inflamatório

Natureza: Tese

Área de Concentração: Ciências do Esporte - AA

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira - SP, 07 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira (Universidade Estadual de Campinas) - presidente

Dioneia Araldi (University of California, San Francisco) – titular externo

Waldiceu Aparecido Verri Júnior (Universidade Estadual de Londrina) – titular externo

Adriana Souza Torsoni (Universidade Estadual de Campinas) – titular interno

Hosana Gomes Rodrigues (Universidade Estadual de Campinas) – titular interno

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

♦ Aos meus pais, meus irmãos e minha namorada,
com todo amor que houver nessa vida.

◆ “Menos certeza, mais indagação. [...] Deixe a certeza na porta.”

— Maria Konnikova



The Biggest Bluff: How I Learned to Pay Attention, Master Myself, and Win

◆ Agradecimentos

Para se fazer um bom chimarrão, é necessário uma porção de erva mate (*ilex paraguariensis*) bem verde (moída fina ou grossa, vai de sua preferência), uma cuia de porongo (para manter o gostinho amadeirado, nada de inox!) não muito grande e nem com o bocal muito largo, uma bomba de prata, e tempo, pois um bom chimarrão não se faz e nem se toma com pressa. Tendo todos os utensílios, o “modo de fazer” é simples e deixo detalhado aqui:

1. Coloque a erva mate até a altura do pescoço da cuia. Comece a aquecer uma chaleira com água (pelo menos 1 litro).
2. Usando a mão ou algum objeto “gauchesco” (pergunte para o gaúcho/a mais próximo), tampe um lado da cuia e incline-a na horizontal. Agite levemente para fazer a erva mate se concentrar toda em um dos lados.
3. Com cuidado, retire a mão/objeto “gauchesco” e adicione água morna no espaço não ocupado pela erva, até encher o buraco.
4. Mantenha a cuia inclinada por alguns segundos, para cevar a erva e manter a parede firme.
5. Segure a cuia na posição de sorver o chimarrão e acrescente mais água quente até chegar na borda.
6. Para colocar a bomba dentro da cuia, tampe a extremidade superior da bomba com o polegar (para evitar que entre erva e entupa) e insira a bomba no buraco com água.
7. Sugue a água com a boca e descarte (ou engula). Tempere com o chá de sua preferência (indico erva-doce, camomila ou hortelã).
8. Quando a chaleira chiar (sem ferver!), a água está na temperatura certa (em torno de 60 °C).
9. Sirva a água em uma garrafa térmica e agora é só aproveitar seu chimarrão!

Harmoniza bem com: bolachas caseiras, bolos diversos, cucas, pipoca com melado e uma boa conversa.

Em 2011, quando decidi sair da pequena cidade de Ijuí no Rio Grande do Sul, para Limeira em São Paulo, não imaginava que permaneceria todos esses anos cevando chimarrão em terras paulistas. O tanto de tempo e a quantidade de vezes, aperfeiçoaram a técnica de uma das poucas tradições da minha terra natal, que amo cultivar. Por isso achei pertinente incluir aqui o protocolo que desenvolvi nos últimos anos, para àqueles que um dia quiserem testar.

Tomar chimarrão é algo que tem um significado enorme para mim e para a minha família, que quando juntos, apreciamos iniciar as manhãs e terminar as tardes compartilhando um chimarrão bem cevado e muita conversa. São nesses momentos que resolvemos problemas importantes como a política econômica-social do Brasil e o almoço do próximo dia. Em Limeira, na falta de companhia para conversas em alguns momentos, o chimarrão fez a companhia por si só. Em momentos de descanso e, principalmente, em momentos de estudo e trabalho, mantive a tradição e o gosto pelo chá amargo. Hoje, cultivo muito o prazer de tomar chimarrão com o estudo, a leitura e a escrita. Uma vez que, assim como tomar chimarrão, essas três coisas se fazem com tempo e “bunda na cadeira”.

Podemos dizer então que esta tese que vocês irão ler (eu espero), foi feita regada a chimarrão. Não somente no momento da escrita que se deu nos últimos 6 meses, mas em todos os anos que se desenvolveu o que está aqui apresentado. Também não pense somente nos últimos quatro ou cinco anos de doutorado, indicados no meu histórico escolar, pois considero que essa tese é um processo de formação que levou 11 anos. Mais de uma década para que eu pudesse, enfim, escrever um material que agrega quase tudo que aprendi. A construção teórica-prática-científica das ideias discutidas nesses estudos foram uma formação gradual que tive a oportunidade de ter dentro do ambiente que escolhi ficar durante esse período. E penso que quando um indivíduo atinge o diploma de um doutorado, é importante que essa reflexão seja feita: um olhar para o início, apreciar sua trajetória e reconhecer que um (bom) doutorado não se faz em quatro anos. Então, será tudo que você aprendeu antes do doutorado, não é o que te faz o doutor/doutora de hoje? Um dia minha orientadora me disse: a base de formação tem que ter estrutura sólida, se não quando construir em cima, pode desmoronar. Pois bem, da maneira que foi, formou-se uma base bem sólida, com os conhecimentos formados durante a graduação, iniciações científicas, mestrados, congressos, palestras, aulas, mentorias, apresentações, reuniões, intercâmbios e mais. A formação de um doutor/doutora (um/a cientista!), se dá por um processo gradual de adquirir, agregar, expandir, analisar e criar conhecimento, e ironicamente hoje, ver o quanto eu aprendi, me faz ver tudo que ainda não sei. Ufa! Fico feliz em saber que o conhecimento do mundo é infinito (vida longa a ciência!).

Porém, eu disse que “quase tudo” que aprendi está escrito nesta tese. Há coisas que aprendemos, que são resultantes do processo, mas não podemos colocar em gráficos, em tabelas, ou nem se quer descrever nos materiais e métodos. Arrisco em dizer que esses são os resultados mais importantes desse longo processo (sem menosprezar os que estão aqui descritos no capítulo V e VI). Anos que me proporcionaram um autoconhecimento que ainda está em desenvolvimento. Porém hoje olho para dentro de mim e vejo o que me compõem, o que me tornei, que faz de mim mais do que um acúmulo de fatos, gráficos, técnicas e alguns artigos. Aprendi a me aplaudir, a me questionar, a ter orgulho, a celebrar, a impulsionar, a me retrair, a falar, a me calar, a ser estratégica, a sentir dor, a sentir prazer, a ajudar, a ser ética e a dar, e receber amor. Concluí com isso que: na vida, quando nos colocamos em uma posição de aprendizagem, levamos ela com mais leveza. Se permitir questionar, ter dúvida, dizer que não sabe, mas buscar sempre tentar entender. Será que isso é ser cientista afinal? Não sei, talvez. De qualquer modo, pretendo levar essa minha vida de cientista com essa ideia de “leveza”, numa posição constante de aprendiz.

Obviamente essa sessão da tese não deve ser voltada somente para mim. Nada nessa vida se constrói sozinho e quando temos pessoas, a trajetória fica muito mais enriquecedora. Com isso, existe sim uma lista de agradecimentos para essa sessão, onde a ordem não necessariamente condiz com a importância. Saibam sempre, que todos tiveram um impacto positivo na minha vida (que continuem tendo, por favor) e eu espero que eu tenha deixado um impacto positivo na vida de vocês também.

Sem mais delongas, gostaria de deixar o meu “**muito obrigada**”:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número: 2017/17919-8; 2018/13599-1 e 20220/10585-0), responsável pelo financiamento e bolsas de pesquisa, na maior parte da minha formação científica, desde a iniciação, estágios no exterior, mestrado, até essa tese de doutorado. Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 001). À instituição Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), à Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) e ao programa de pós-graduação em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo (CNEM), os quais levarei os nomes, com carinho.

Aos meus pais, Bernadete e Leonardo, por serem a base sólida e por ajudarem a construir a minha. Sempre um grande incentivo, sempre com bons conselhos, sempre com bom suporte e sempre ensinando com muito amor. Sempre serão meus maiores e melhores professores. Aos meus irmãos, Manuela e Francisco, por essa relação de amor, parceria e companheirismo. Que possamos sempre nos guiar, nos ajudar e compartilhar de umas cervejas ao longo da vida. Ao Tiago, Lindi e Alícia, família tão próxima que acompanharam, deram apoio e torceram nesse processo. Um grande beijo!

À minha namorada, Thayla, que veio inteira e se somou a mim. É o abraço, é o beijo, o carinho, a risada, a razão e principalmente é o meu amor maior do dia a dia, que quero ter para o resto da vida. Aprendeu sobre *western blotting* e imunofluorescência, e se pudesse, seria coautora desta tese, por todo o apoio e direções que me deu nesse processo. Não tenho como te agradecer o suficiente. Vivemos muito nos últimos anos e vamos viver muito mais. Te amo!

À minha orientadora e amiga, Maria Cláudia, por ser uma mentora excepcional, aquela que todos querem ter, mas poucos tem o privilégio. Abriu portas, incentivou, cobrou, ensinou, abraçou e deu o suporte para minha formação profissional. E depois de tantos anos, se tornou uma grande amiga, compartilhamos da confiança e do carinho uma com a outra. Ficarei distante, mas presente sempre que precisar.

Aos meus queridos amigos e amigas que fiz durante o período no Laboratório de Estudos da Dor e Inflamação (LABEDI). Aos que estava desde o início e hoje já estão em outros cantos: Bruna, Diogo e Carol, pelos momentos vividos com muitas risadas, comidas boas, música e aprendizagens. Ajudamos a construir um laboratório, que hoje é lindo. E as pessoas que hoje formam esse grupo: Bia e Hayla, por fazerem os dias no laboratório com mais risadas e por toparem os desafios dos últimos anos. Espero que vocês possam crescer e brilhar nesses próximos. Thamires, Emanuele e Zé, por mais curto que tenha sido o tempo, agradeço por toda a ajuda, convívio e risadas.

Não posso deixar de mencionar aqui o grupo que convivi durante um ano no Instituto Karolinska. Ao Jorge Ruas, por ter se interessado pela minha proposta e me aceitado para o estágio em pesquisa, pela brilhante e divertida mentoria e pelas oportunidades dadas dentro do seu laboratório. Ao Paulo pela amizade, pelas conversas e por me ensinar muito durante esse período. Ao Jorge Correia pelas grandes orientações, pelas discussões e por me ensinar, mesmo que indiretamente. Aprendi muito neste período e isso teve um impacto muito grande

nos meus próximos passos. A todo o ‘‘Ruas’ Lab’’: Margareta, Duarte, Paula, Shamim, Igor, Serge, Michelle, Stine, Kyle, Paulo e Jorge, obrigada por fazer do meu ano em Estocolmo, muito mais divertido e agradável. Espero que a gente se encontre na vida, novamente.

Agradeço, pela fantástica ajuda e colaboração, o Prof. Dr. Fernando Simabuco, em parte dos experimentos aqui apresentados e por disponibilizar seu espaço para que fosse executado. Também pelo apoio da Dr^a. Catarine Massucato Nishijima (IB/UNICAMP) e dos Professores Dr. Carlos Parada, Dr^a Cláudia Herrera Tambeli e Dr. Cesar Sartori, por disponibilizarem o espaço do seu laboratório (LeD, IB/UNICAMP).

À banca examinadora dessa tese, deixo minha gratidão pelo tempo disponibilizado para leitura, avaliação e discussão desse trabalho.

A todos os amigos e amigas que foram agregando ao longo dos anos. Em especial, Amanda, Livia, Anna, Camila, Valéria, Iara por estarem aqui e ali todos esses anos. E ao Matheus por todo o carinho, ajuda e as gargalhadas. Mesmo em lugares diferentes, que possamos manter o contato e não nos tornarmos estranhos.

Ainda, obrigada a todos e todas que direta e indiretamente estiveram sempre presentes no conviver da universidade, ajudando de alguma forma para que o trabalho fosse feito: professores, funcionários da limpeza, do restaurante, segurança, biotério, laboratórios e administração.

Desejo uma boa leitura, a quem for se aventurar por essas páginas.

De novo, muito obrigada a todos vocês!

Com amor,

Gra

◆ Resumo

Exercício físico é uma estratégia estabelecida para controlar inflamação relacionado ao desenvolvimento de doenças crônicas, como a dor crônica. Nesse trabalho, através da realização de dois estudos, hipotetizou-se que: 1) o fenótipo de macrófagos pró-inflamatórios periféricos, bem como a ativação do receptor P2X4 nessas células, contribui com o aumento da inflamação e predisposição do músculo esquelético à dor crônica; a ativação de receptores PPAR γ por meio de exercício físico, altera a modulação de fenótipos de macrófagos, o perfil de citocinas no tecido e diminui a ativação de receptores P2X4, prevenindo a dor muscular persistente; 2) sob exercício físico, o músculo esquelético por si só, possui papel anti-inflamatório através da ação do co-ativador PGC-1 α 1 sobre a via do NF- κ B. Testou-se essas hipóteses usando: 1) exercício físico, técnicas farmacológicas, análise de expressão de proteínas e imagens imunohistoquímicas em um modelo roedor de inflamação que gera hiperalgesia muscular persistente. 2) modelos transgênicos *in vitro* e *in vivo* com alta expressão de PGC-1 α músculo-específica, estímulos inflamatórios e análises de expressão gênica e proteicas em um modelo de degeneração muscular. Resultados no estudo 1 demonstraram que: o exercício preveniu a hiperalgesia muscular persistente, por meio da ativação dos receptores PPAR γ . A ativação dos receptores PPAR γ pela 15d-PGJ₂ e a depleção de macrófagos musculares em animais sedentários, também previne a hiperalgesia persistente. O período agudo e persistente da hiperalgesia muscular, foram caracterizados por um aumento de macrófagos inflamatórios e pela ativação de P2X4, onde o exercício exerceu um papel preventivo, bem como aumentou o fenótipo de macrófagos anti-inflamatórios. O exercício também induz a diminuição da via dos receptores P2X4, presentes nos macrófagos, envolvidos no processo inflamatório e da dor aguda, através da ativação do PPAR γ . Por fim, a concentração de IL-1 β no músculo se encontra elevada na fase aguda, o que também foi prevenido pelo exercício através da ativação dos receptores PPAR γ . O exercício aumentou a concentração de IL-10 nas fases aguda e persistente, mas apenas na fase persistente por meio dos receptores PPAR γ . Resultados no estudo 2 demonstraram que: a célula muscular com alta expressão de PGC-1 α 1 possui alta expressão de I κ B α e, sob inflamação, há uma baixa expressão de IKK β e p65. Tanto em modelo inflamatório *in vitro* quanto *in vivo* o aumento da expressão de genes inflamatórios relacionados ao fator de transcrição NF- κ B é prevenido, quando PGC-1 α 1 é super-expressa. Nossos achados sugerem que o exercício físico ativa os receptores PPAR γ e aumenta as respostas anti-inflamatórias no tecido muscular por meio da modulação de fenótipos de macrófagos e citocinas, evitando assim o estabelecimento da dor

muscular persistente, demonstrando a importância da modulação de células macrófagos. Além disso, sugere-se que a ação do exercício físico no músculo envolve a ativação do co-ativador PGC-1 α 1, exercendo um grande papel anti-inflamatório, local e sistêmico. Esses resultados destacam ainda mais o potencial do exercício físico e elucidam novos mecanismos moleculares capazes de prevenir situações inflamatórias e a dor muscular persistente relacionada.

Palavras-chave: mialgia; citocinas; prevenção; exercícios físicos; macrófagos;

◆ Abstract

Physical exercise is an established strategy to control inflammation related to the development of chronic diseases, such as chronic muscle pain. In this thesis, through two studies, it was hypothesized that: 1) the phenotype of peripheral pro-inflammatory macrophages, as well as the activation of the P2X4 receptor in these cells, contributes to the increase in inflammation and predisposition of skeletal muscle to chronic pain; the activation of PPAR γ receptors through physical exercise, alters the modulation of macrophage phenotypes, the profile of cytokines in the tissue and decreases the activation of P2X4 receptors, preventing chronic muscle pain; 2) under physical exercise, skeletal muscle itself has an anti-inflammatory role through the action of the co-activator PGC-1 α 1 on the NF- κ B pathway. These hypotheses were tested using: 1) physical exercise, pharmacological techniques, protein expression analysis and immunohistochemical imaging in a rodent model of inflammation that generates chronic muscular hyperalgesia. 2) in vitro and in vivo transgenic models with high muscle-specific PGC-1 α expression, inflammatory stimuli and gene and protein expression analysis in a model of muscle inflammation and degeneration. Results in study 1 demonstrated that: exercise prevented chronic muscle hyperalgesia, through the activation of PPAR γ receptors. Activation of PPAR γ receptors by 15d-PGJ₂ and depletion of muscle macrophages in sedentary animals also prevents chronic hyperalgesia. The acute and chronic period of muscle hyperalgesia were characterized by an increase in inflammatory macrophages and activation of P2X4, where exercise had a preventive role, as well as increased the phenotype of anti-inflammatory macrophages. Also exercise through PPAR γ activation induces a decrease in the P2X4 pathway in macrophages, related to the inflammatory process and acute pain. Finally, the concentration of IL-1 β in the muscle is elevated in the acute phase, which was also prevented by exercise through the activation of PPAR γ receptors. Exercise increased the concentration of IL-10 in the acute and chronic phases, but only in the chronic phase through PPAR γ receptors. Results in study 2 demonstrated that: the muscle cell with high expression of PGC-1 α 1 has high expression of I κ B α and, under inflammation, there is a low expression of IKK β and p65. In both in vitro and in vivo inflammatory models, increased expression of inflammatory genes related to the transcription factor NF- κ B, is prevented when PGC-1 α 1 is overexpressed. Our findings suggest that physical exercise activates PPAR γ receptors and increases anti-inflammatory responses in muscle tissue through the modulation of macrophage phenotype and pathway, and cytokine profile, thus preventing the establishment of chronic muscle pain, demonstrating the importance of macrophage cell modulation.

Furthermore, it is suggested that the action of physical exercise on muscle involves the activation of the co-activator PGC-1 α 1, exerting a great anti-inflammatory role, local and systemic. These results further highlight the potential of physical exercise, and new molecular mechanisms to modulate inflammatory conditions and the related chronic muscle pain.

Key words: myalgia; cytokines; prevention; physical exercise; macrophages;

◆ Lista de figuras

	Título	Página
Figura 1	Livro de René Descartes “ <i>Traité de l’homme</i> ”, que traz a figura “ <i>The Path of Burning Pain</i> ”, publicado em 1664.	23
Figura 2	Resumo da ação fisiológica dos nociceptores descobertos e amplamente estudados por David Julius e Ardem Patapoutian.	24
Figura 3	Etapas envolvidas no processo de sinalização do estímulo sensorial.	27
Figura 4	Representação de três tipos de neurônios sensoriais primários que compõem o nervo aferente.	28
Figura 5	Representação das fases induzidas pelo modelo de hiperalgesia.	36
Figura 6	Organização experimental.	52
Figura 7	Equipamento analgesímetro	54
Figura 8	Clodronato encapsulado induz a depleção de macrófagos no tecido muscular.	58
Figura 9	Controle dos efeitos da injeção de macrófagos peritoneais na hiperalgesia mecânica aguda e persistente.	60
Figura 10	O exercício físico regular previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente.	74
Figura 11	O exercício de natação previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente através dos receptores PPAR γ .	76
Figura 12	Agonista do receptor PPAR γ , 15d-PGJ ₂ , previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente.	78
Figura 13	O clodronato encapsulado previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente.	80
Figura 14	O envolvimento de receptores P2X ₄ na indução da hiperalgesia muscular aguda e persistente.	82
Figura 15	Macrófagos peritoneais tratados com agonista PPAR γ , 15d-PGJ ₂ previnem a hiperalgesia mecânica aguda e persistente.	84
Figura 16	Macrófagos peritoneais estimulados com carragenina adquirem um fenótipo inflamatório, prevenido pelo bloqueio de P2X ₄ .	86
Figura 17	Polarização de macrófagos envolve a ativação de receptores P2X ₄ .	87
Figura 18	Efeitos do exercício físico sobre os macrófagos musculares no dia 2 da hiperalgesia muscular aguda.	90
Figura 19	Efeitos do exercício físico nos macrófagos musculares da hiperalgesia muscular aguda e persistente.	92
Figura 20	Efeitos de 15d-PGJ ₂ em macrófagos musculares no dia 1 da hiperalgesia muscular aguda.	94
Figura 21	Efeitos da injeção de 15d-PGJ ₂ nos macrófagos musculares no dia 1 e no dia 2 da hiperalgesia muscular aguda.	96
Figura 22	Efeitos do exercício físico na expressão de p-p38 MAPK no músculo esquelético no dia 0, via PPAR γ .	98
Figura 23	Efeitos do exercício físico na expressão de p-p38 MAPK no músculo esquelético no dia 1, via PPAR γ .	99
Figura 24	Efeitos do exercício físico na expressão de p-p38 MAPK no músculo esquelético no dia 2, via PPAR γ .	100
Figura 25	Concentrações de IL-1 β , IL-10 e TNF- α no tecido muscular e os efeitos do exercício de natação.	103
Figura 26	Receptores PPAR γ no tecido muscular no dia 1 da hiperalgesia muscular aguda.	105
Figura 27	Teste da degradação da proteína I κ B α em miotubos primários.	107
Figura 28	Expressão de PGC-1 α 1 e os efeitos na expressão gênica em miotubos.	109
Figura 29	Expressão de PGC-1 α 1 e os efeitos na expressão gênica em miotubos.	110
Figura 30	Confirmação de fenótipo nos animais da linhagem MCK-PGC-1 α 1.	111
Figura 31	Análise de força e coordenação motora em animais controles e MCK-PGC-1 α 1.	112
Figura 32	Análise de parâmetros de caminhada em animais controles e MCK-PGC-1 α 1.	114
Figura 33	Efeitos anti-inflamatórios no músculo de animais MCK-PGC-1 α 1.	116
Figura 34	Expressão de PGC-1 α 1 e os efeitos anti-inflamatórios no músculo esquelético.	117
Figura 35	Resumo gráfico da conclusão da tese.	130

♦ Sumário

1. Capítulo I	19
1.1 Introdução	19
2. Capítulo II	22
2.1 A dor	22
2.1.1 Neurofisiologia do sistema sensorial periférico	23
2.1.2 Classificação dos neurônios sensoriais	27
2.1.3 Conceitos relacionados ao sistema sensorial periférico	31
2.1.4 O desenvolvimento da patologia: quando a dor perde seu caráter de proteção ..	32
2.1.5 Modelo experimental para estudos de dores crônicas	33
2.2 A inflamação	37
2.2.1 A inflamação como fator associado a dor muscular crônica: papel dos macrófagos e miócitos	37
2.2.2 O P2X4 no macrófago e o NF-κB no miócito	39
2.3 O exercício físico	41
2.3.1 O exercício físico no controle de condições dolorosas	41
2.3.2 O efeito anti-inflamatório do exercício físico.....	43
2.3.3. Os receptores PPARγ e seus efeitos anti-inflamatórios	44
2.3.4 O importante papel do co-ativador PGC-1α no tecido muscular esquelético	47
3. Capítulo III	49
3.1 Estudo 1	49
3.1.1 Hipótese do Estudo 1	49
3.1.2 Objetivos do Estudo 1	49
3.2 Estudo 2	50
3.2.1 Hipótese do Estudo 2	50
3.2.2 Objetivos do Estudo 2	50
4. Capítulo IV	50
4.1 Materiais e métodos do Estudo 1	51
4.1.1 Cuidado com animais	51
4.1.2 O modelo de hiperalgesia muscular mecânica aguda e persistente	53

4.1.3 Teste mecânico do limiar nociceptivo muscular e avaliação da hiperalgesia muscular	53
4.1.4 Injeções intramusculares, drogas e doses	54
4.1.5 Protocolo de exercícios físico regular de natação.....	55
4.1.6 Análise dos níveis séricos de corticosterona como medida de estresse	57
4.1.7 Depleção de macrófagos com clodronato encapsulado em lipossomas	57
4.1.8 Procedimento com cultura primária de macrófagos peritoneais	58
4.1.9 Procedimentos com cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7	61
4.1.10 Imunofluorescência do tecido muscular	62
4.1.11 Análise da expressão de citocinas do tecido muscular	64
4.1.12 Análise da expressão de proteínas do tecido muscular.....	64
4.2 Materiais e métodos do Estudo 2	65
4.2.1 Cuidado com animais	65
4.2.2 Drogas, injeções e extração de amostras para análises biomoleculares.....	66
4.2.3 Testes de força e resistência muscular	66
4.2.4 Teste de coordenação motora	67
4.2.5 Análise da marcha de caminhada forçada em esteira	67
4.2.6 Cultura de células e tratamentos	68
4.2.7 Expressão mediada por adenovírus.....	69
4.2.8 Análise da expressão gênica	70
4.2.9 Análise de proteína por western blotting	71
4.3 Análise estatística do Estudo 1 e Estudo 2	71
5. Capítulo V: Resultados do Estudo 1	72
5.1 Avaliação comportamental da hiperalgesia muscular aguda e persistente: envolvimento de macrófagos e receptores P2X4 na indução, e os efeitos preventivos do exercício físico via receptores PPARγ	72
5.1.1 O exercício físico regular previne o desenvolvimento da hiperalgesia muscular aguda e consequente hiperalgesia muscular persistente	72
5.1.2 Exercício físico regular previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente, através dos receptores PPAR γ no tecido muscular	74
5.1.3 Administração do ligante endógeno de PPAR γ previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente de maneira semelhante ao exercício físico regular	77
5.1.4 Macrófagos no tecido muscular estão envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia muscular aguda e persistente	79
5.1.5 Receptores P2X4 presentes no macrófago do tecido muscular, estão envolvidos com a geração da hiperalgesia muscular persistente	81

5.1.6 <i>Macrófagos ativados pelo ligante endógeno dos receptores PPARγ modulam a hiperalgesia muscular aguda e persistente</i>	83
5.2 <i>Avaliação de mecanismos da hiperalgesia muscular aguda e persistente: expressão de macrófagos e a ativação receptores P2X4 na indução, e os efeitos preventivos do exercício físico via receptores PPARγ</i>	85
5.2.1 <i>Estímulos inflamatórios induzem a polarização de macrófagos, via ativação dos receptores P2X4</i>	85
5.2.2 <i>O exercício físico regular modula o fenótipo dos macrófagos no tecido muscular, envolvidos na hiperalgesia muscular aguda e persistente</i>	88
5.2.3 <i>A administração do ligante de receptores PPARγ, 15d-PGJ2, modula o fenótipo de macrófagos locais, envolvidos na hiperalgesia muscular aguda e persistente</i>	93
5.2.4 <i>Exercício físico previne a fosforilação de p38 MAPK via receptores PPARγ, no ambiente do músculo esquelético, em períodos relacionados à hiperalgesia muscular aguda</i>	96
5.2.5 <i>Exercício físico regular modula citocinas pró- e anti-inflamatórias através da ativação de receptores PPARγ no tecido muscular</i>	100
5.2.6 <i>Expressão de PPARγ no tecido muscular gastrocnêmio</i>	104
6. Capítulo VI: Resultados Estudo 2	106
6.1 O papel anti-inflamatório da proteína PGC-1 α 1 em cultura celular de miotubos primários	106
6.1.1 <i>A super-expressão de PGC-1α1 previne a expressão de genes inflamatórios relacionados ao NF-κB, em miotubos primários</i>	107
6.1.2 <i>A super-expressão de PGC-1α1 modula a expressão de proteínas relacionadas a NF-κB, em miotubos primários</i>	109
6.1.3 <i>Confirmação do fenótipo de endurance em animais com alta expressão de PGC-1α1 em tecido muscular esquelético (MCK- PGC-1α1)</i>	111
6.1.4 <i>A super-expressão musculoesquelética de PGC-1α1 protege contra inflamação no tecido e mantém a qualidade funcional</i>	112
6.1.5 <i>MCK-PGC-1α1 apresentam expressão aumentada de IκBα no músculo esquelético e prevenção a inflamação</i>	115
7. Capítulo VII	117
7.1 Discussão do Estudo 1	117
7.2 Discussão do Estudo 2	124
8. Capítulo VIII	128
8.1 Conclusão	128
9. Referências bibliográficas	131

1. Capítulo I

1.1 Introdução

A dor crônica é fonte de grande sofrimento para muitas pessoas e tem alto impacto socioeconômico em todo o mundo (AZIZ et al., 2019; RICE; SMITH; BLYTH, 2016). Dentre os tipos de dores, a dor muscular crônica pode resultar de situações danosas inadequadamente prevenidas ou tratadas, que podem ser geradas por esforços repetitivos, oscilação postural inadequada, trauma muscular e outras lesões (SCHOMACHER et al., 2012; VAN OOSTROM et al., 2012). Embora os sintomas agudos de dor muscular possam melhorar ao longo do tempo, novos e repetidos esforços ou situações danosas, mesmo que leves e anos após, podem desencadear dores musculares mais intensas e duradouras (CIMMINO; FERRONE; CUTOLO, 2011). Apesar de os mecanismos desse processo de transição não serem completamente elucidados, sabe-se que repetidos estímulos, associados também à fatores de risco e atingindo diferentes células no ambiente, podem acarretar a sensibilização do neurônio aferente e na cronificação da dor, uma vez que alterações nas vias imuno-inflamatórias do tecido desencadeiam e modulam a transdução, e transmissão da sinalização dolorosa da periferia para o sistema nervoso central (DINA; GREEN; LEVINE, 2008; HOHEISEL; ROSNER; MENSE, 2015; ZHANG et al., 2017).

Em um tecido muscular lesado, um processo inflamatório é induzido e muitas são as células envolvidas neste processo. Os macrófagos ativados por estímulos nocivos, são uma das principais fontes de mediadores inflamatórios (MURRAY et al., 2015; VIOLA et al., 2019). Após insulto tecidual, os macrófagos são polarizados para fenótipos pró-inflamatórios, que produzem citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MURRAY et al., 2015; VIOLA et al., 2019). Por outro lado, um fenótipo de macrófago anti-inflamatório é induzido para resolver o estado inflamatório, produzindo principalmente interleucina-10 (IL-10) (DA SILVA et al., 2014; LEUNG et al., 2015). Além disso, a produção de citocinas pelos macrófagos tem sido associada com o desenvolvimento de dores crônicas, a partir do envolvimento dos receptores purinérgicos 4 (receptores P2X4), sendo esse um canal iônico de membrana, permeável à cálcio quando ativado pela ligação de adenosina trifosfato (ATP) (ZUMERLE et al., 2019). Curiosamente, apesar dessas evidências sugerirem que a modulação dos macrófagos é um mecanismo chave para o surgimento da dor muscular, ainda não está claro se os macrófagos, via P2X4, contribuem para a transição da dor muscular inflamatória aguda para a crônica.

Além dos macrófagos, o miócito é uma das células ativamente envolvida na indução e resolução do processo inflamatório (KELLEY et al., 2002; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012). Quando o miócito é atingido por um estímulo nocivo, esse também passa a produzir citocinas (comumente chamadas de miocinas), como IL-1 β , TNF- α , interleucina-6 (IL-6), que podem exacerbar o processo inflamatório, inclusive aumentando a ativação de células do sistema imune, facilitando a sinalização na fibra do neurônio sensorial aferente (DINA; GREEN; LEVINE, 2008; REN; TORRES, 2009). Dessa forma, compreender a resposta inflamatória a partir de diferentes células que compõem o tecido muscular esquelético, é de extrema importância para a prevenção e tratamento das condições dolorosas crônicas.

Esses mediadores inflamatórios produzidos a partir de uma lesão ou infecção, estão envolvidos na fase inicial da dor muscular, aumentando o risco de estabelecimento da dor muscular crônica (BASBAUM et al., 2009; FERRARI; BOGEN; LEVINE, 2010; JULIUS; BASBAUM, 2001; REICHLING; LEVINE, 2009). Dentre as vias inflamatórias de uma célula, a ativação da sinalização do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) é amplamente estudada com muito interesse, uma vez que é associada ao desenvolvimento de diversas patologias (HIRAOKA et al., 2001; SCHULIGA, 2015; SOUZA et al., 2015), incluindo dores crônicas (CASTRILLO et al., 2000; HUSSEIN et al., 2013). A ativação de NF- κ B leva ao aumento da produção e liberação de citocinas como TNF- α , *chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL2), IL-6 e IL-1 β (LIU et al., 2017), tanto em células imunes (SCHULIGA, 2015; ZHOU et al., 2014), quanto em miócitos (NISIR et al., 2019). Sendo assim, torna-se interessante investigar a via de sinalização do NF- κ B no ambiente do tecido muscular esquelético, associado a estímulos inflamatórios e os efeitos de estratégias de prevenção da dor muscular crônica.

O exercício físico regular é uma estratégia que há anos vem sendo estabelecida para o controle de doenças inflamatórias (IKEDA et al., 2013; YOON et al., 2015). Além dos efeitos sistêmicos da atividade física regular, como controle de glicemia, lipidemia e induzir benefícios cardiovasculares (BALDUCCI et al., 2010; MENDES et al., 2016; TUNSTALL et al., 2002) estudos longitudinais epidemiológicos têm indicado que indivíduos fisicamente mais ativos são menos propensos a desenvolver quadros de dor crônica ao longo da vida (LANDMARK et al., 2011, 2013). Ainda, protocolos de exercício físico têm sido eficazes na redução e prevenção da dor em diferentes modelos experimentais (BOBINSKI et al., 2011;

DE AZAMBUJA et al., 2020; GALDINO et al., 2014; LEUNG et al., 2015; SLUKA et al., 2013). Dentre os efeitos gerados pelo exercício físico, os mecanismos pelo qual a prática de exercício físico induz a prevenção do estabelecimento da dor muscular crônica, vêm sendo cada vez mais aprofundados.

Dentre as ações, a função metabólica do tecido musculoesquelético possui um potente efeito na saúde, onde a adaptação dos miócitos aos esforços físicos exigidos em um programa de exercício físico, induz a produção de miocinas e outros fatores, capazes de modular a função de outras células (DELEZIE; HANDSCHIN, 2018; LEGÅRD; PEDERSEN, 2019). Pensando nesse efeito metabólico, em estudo recente demonstramos em modelo animal, que o exercício físico regular previne o desenvolvimento da hiperalgesia muscular inflamatória aguda por um mecanismo dependente de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) (DE AZAMBUJA et al., 2020). Uma vez ativados os receptores PPAR γ , desenvolvem uma série de efeitos metabólicos relacionados à vias oxidativas de ácidos graxos e diferenciação de adipócitos (ROSEN et al., 1999; ROSEN; SPIEGELMAN, 2001), porém existe uma potente ação anti-inflamatória na ativação desses receptores (KIM et al., 2017), incluindo a modulação da polarização de macrófagos (BOUHLEL et al., 2007a; RUFFINO et al., 2016). Além disso, há estudos que apresentam a ativação farmacológica dos receptores PPAR γ gerando efeitos analgésicos (CLEMENTE-NAPIMOGA et al., 2012; SANTOS et al., 2020), porém não há estudos relacionando a ativação desses receptores pelo exercício físico com os efeitos no tecido muscular esquelético, se há envolvimento com a prevenção da inflamação e da transição da dor aguda para a dor crônica.

Além dos receptores PPAR γ , muitos estudos têm abordado a investigação da ação de co-ativadores de fatores de transcrição nos efeitos gerados pelo exercício físico. Muitos dos efeitos gerados no músculo esquelético pelo exercício físico são dependentes dos co-ativadores *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1* (PGC-1s) (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003). Dentre eles a isoforma canônica PGC-1 α ¹ (expressa a partir do promotor proximal e seu gene iniciando no exon 1b; como revisado em: MARTÍNEZ-REDONDO; PETTERSSON; RUAS, 2015) no músculo esquelético é responsável por orquestrar o suprimento da demanda metabólica principalmente melhorando a função mitocondrial e o induzindo um fenótipo oxidativo do tecido muscular (LIN et al.,

¹ Para esclarecimento, nesta tese, a nomenclatura de PGC-1 α 1 será sempre referente à isoforma canônica da proteína PGC-1 α . Outras isoformas não foram abordadas nesse estudo.

2002). Para além da bioenergética, a PGC-1 α 1 tem sido associada com mecanismos que mantêm e/ou restauram a saúde muscular (CANNAVINO et al., 2014; revisado em: CORREIA; FERREIRA; RUAS, 2015). A PGC-1 α 1 muscular é conhecida por induzir um estado protetivo anti-inflamatório e anti-estresse através de comunicação entre órgãos, sendo capaz de modular fadiga tecidual (AGUDELO et al., 2019), manutenção de junções neuromusculares (CORREIA et al., 2021; MILLS et al., 2018), neurotoxicidade (AGUDELO et al., 2014) e células imunes (FURRER et al., 2017). Portanto, a PGC-1 α 1 possui um importante papel em gerar um tecido muscular saudável.

Essas evidências em relação ao desenvolvimento da inflamação e mecanismos ativados pelo exercício físico, aumentam o interesse em investigar de que forma o exercício físico modula o fenótipo do miócito e macrófago, e manipula estados inflamatórios no tecido muscular esquelético associados ao desenvolvimento da dor crônica. Portanto, com o objetivo de melhor compreender processos inflamatórios possivelmente envolvidos na cronificação da dor muscular, investigamos dois modelos de inflamação no tecido muscular esquelético: 1) de baixo grau, associado ao desenvolvimento de dor muscular aguda e persistente (modelo de hiperalgesia muscular induzido por injeção de carragenina e prostaglandina E₂); 2) de alto grau, induzido pela degeneração do tecido e associado à diminuição da mobilidade motora (modelo de lesão muscular induzido por cardiotoxina). Em ambos os casos foi investigado a capacidade anti-inflamatória do exercício físico, sendo que no primeiro modelo foi aplicado um protocolo de exercício físico e no segundo, foram utilizados animais transgênicos de fenótipo exercitado. Portanto, essa tese é composta por dois estudos:

- 1) **Estudo 1:** A investigação de processos imuno-inflamatórios associados ao desenvolvimento da dor muscular persistente e se sua prevenção pelo exercício físico envolve a ativação de receptores PPAR γ , modulações imuno-inflamatórias e/ou diminuição da ativação de receptores P2X₄.
- 2) **Estudo 2:** A investigação da ação anti-inflamatória do co-ativador PGC-1 α 1 na saúde do músculo e seus efeitos sobre a via de sinalização do NF- κ B, com especificidade no papel anti-inflamatório da célula muscular esquelética.

2. Capítulo II: Revisão da literatura e apresentação de conceitos

2.1 A dor

2.1.1 Neurofisiologia do sistema nervoso sensorial periférico

Como percebemos o mundo e o ambiente ao nosso redor? Como os sentidos e sensações são processados pelo nosso corpo? Como podemos saber a diferença entre calor e frio, carinho e dor? De que forma percebemos o vento no rosto, a água gelada nas mãos, a areia quente da praia nos pés e um abraço apertado? Os mecanismos envolvidos na percepção sensorial tem sido alvo de perguntas há muitos anos. No século 17, o filósofo René Descartes fez os primeiros registros de hipóteses sobre como estímulos na pele estariam conectados com o nosso cérebro (figura 1). No ano de 1944, os pesquisadores Joseph Erlanger e Herbert Gasser foram laureados com o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina por sua descoberta de neurônios sensoriais que respondiam diferente à estímulos dolorosos e não-dolorosos (ERLANGER, 1947; GASSER, 1945) e a partir disso, a ciência tem aprofundado cada vez mais a compreensão sobre as células nervosas responsáveis pela interação do nosso corpo com o mundo.

Figura 1

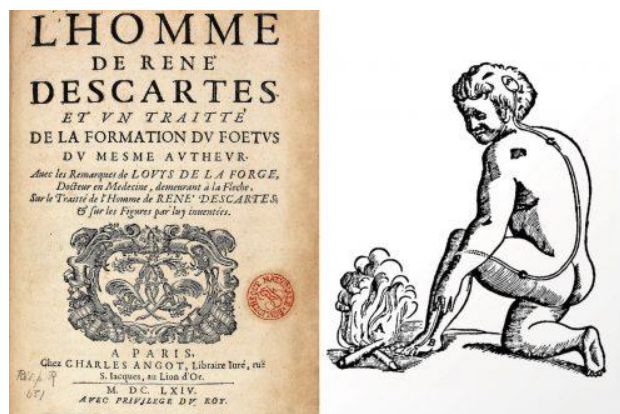


Figura 1 – Livro de René Descartes “*Traité de l’homme*”, que traz a figura “*The Path of Burning Pain*”, publicado em 1664. O filósofo explica a dor como um processo em que “as partículas” de fogo sobem uma fibra nervosa do pé em direção ao cérebro, ativando uma sensação ruim e uma reação de “espíritos animais” que então viajam de volta para os músculos, fazendo com que o pé se afaste da chama.

Em outubro de 2021, a Assembleia do Nobel do Instituto Karolinska (Estocolmo, Suécia) decidiu conceder o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2021 em conjunto a David Julius (UCSF, Estados Unidos) e Ardem Patapoutian (HHMI, Estados Unidos) por suas

descobertas relacionadas a receptores de temperatura (*Transient Receptor Potential Vanilloid type-1*, TRPV1 e *Transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8*, TRPM8) (figura 2B) e de toque/pressão (PIEZO1 e PIEZO2, do Grego ‘‘pressão’’ [í; píesi]) (figura 2B; THE NOBEL PRIZE, 2021). Suas pesquisas levaram à compreensão sobre mecanismos que levam estímulos mecânicos ou de temperatura a serem convertidos em impulsos elétricos no neurônio sensorial, ampliando o conhecimento sobre o sistema que é “a porta de entrada” do mundo no corpo humano: o sistema nervoso sensorial periférico.

Figura 2

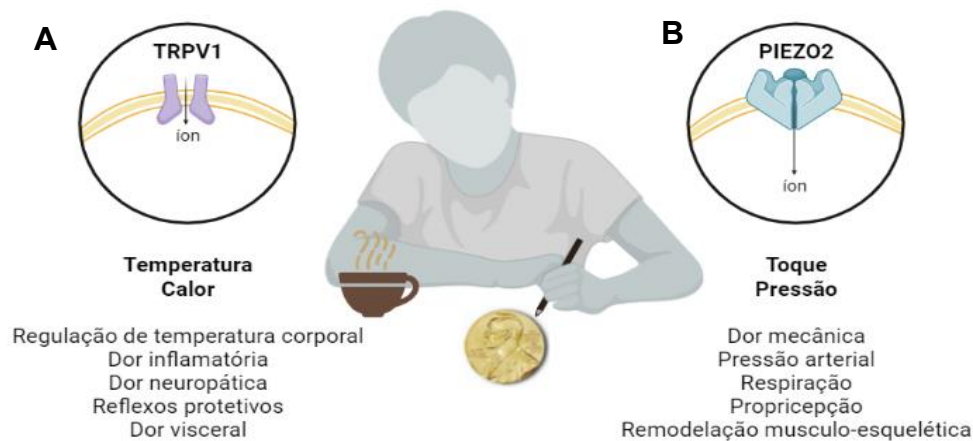


Figura 2 – Resumo da ação fisiológica dos nociceptores descobertos e amplamente estudados por David Julius e Ardem Patapoutian. Aqui, exemplificam-se o envolvimento dos receptores TRPV1 (A), nos processos envolvendo a percepção de calor e a regulação de temperatura corporal, além do envolvimento em processos dolorosos; E o envolvimento dos receptores PIEZO2 (B) na percepção de estímulos mecânicos de pressão, e hoje sabe-se do envolvimento desses receptores na manutenção da homeostasia do corpo através da regulação de pressão arterial, respiração e percepção dolorosa, entre outros. Figura: autoria própria, feita com biorender.com.

Mais especificamente, a inervação aferente dos tecidos é feita pelo neurônio sensorial primário, sendo esse responsável por captar estímulos do ambiente que inerva e transmitir essas informações para o sistema nervoso central, onde uma resposta motora somática será induzida para a periferia (MENSE, 2009). Dessa forma, a comunicação entre o neurônio sensorial primário e o tecido o qual ele inerva, é um processo fundamental para a manutenção da homeostase e saúde do organismo (ABRAIRA; GINTY, 2013).

Anatomicamente, o neurônio sensorial primário é classificado como pseudounipolar, onde a partir do corpo celular (soma) há uma ramificação do axônio que posteriormente diverge em duas, sendo uma ramificação direcionada para o órgão e outra para o corno dorsal da medula (ABRAIRA; GINTY, 2013). Uma particularidade importante dos neurônios sensoriais periféricos é que o soma dos neurônios estão localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD) e no gânglio trigeminal (TG), fora da barreira hematoencefálica (HANDLER; GINTY, 2021). Isso faz com que o neurônio sensorial seja uma importante ponte de comunicação entre o tecido periférico e o sistema nervoso central, ao passo que é extremamente vulnerável à sinalização molecular presente nos tecidos o qual inerva (MELTZER et al., 2021). Dessa forma, compreender de que forma essas células nervosas são estimuladas, os efeitos que isso causa a curto e longo prazo e a relação com o estabelecimento de doenças crônicas, é de extrema importância para o entendimento da saúde do corpo humano e para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento de doenças crônicas, como por exemplo as dores crônicas.

De maneira geral, a sinalização sensorial ocorre quando, na membrana das ramificações do neurônio sensorial primário um estímulo suficientemente intenso ativa receptores e induz alterações de voltagem na membrana até que o limiar de despolarização do neurônio seja atingido, levando à transmissão de potenciais de ação ao longo do axônio (MENSE, 2009; MENSE; GERWIN, 2010). A intensidade da despolarização da membrana é determinada pela quantidade de receptores ativados no estímulo (LI et al., 2011). Dentre os muitos tipos de receptores presentes, há os receptores ionotrópicos, que são canais permeáveis a íons como cálcio e sódio (por exemplo, TRPV1, TRPA1, Nav. 1.9, P2X3 etc.), e geram um influxo e efluxo de íons, alterando a voltagem da membrana, aumentando o desencadeamento de potenciais de ação (CAVANAUGH et al., 2009). Esses receptores são geralmente ativados por ligantes, como ATP e prótons H^+ , temperatura e movimentos mecânicos da membrana. Alternativamente, receptores metabotrópicos também são ativados de maneira direta por ligantes específicos, como por exemplo, prostaglandina E_2 , (receptor EP1-EP4), IL-1 β (receptor IL-1R), TNF- α (receptor TNFR), entre outros. A ativação dessas proteínas, levam à processos de sinalização intracelular, como a fosforilação de proteínas quinases MAPK, ERK e JNK e/ou a ativação de segundos mensageiros como diferentes isoformas das proteínas quinase PKC e PKA (JORGE et al., 2020; PARADA et al., 2003a; PARADA; REICHLING; LEVINE, 2005). Por consequência, esse processo gera o aumento da abertura de canais iônicos, modula a excitabilidade neuronal e facilita o processo de sinalização sensorial

(FERRARI; BOGEN; LEVINE, 2013; MELTZER et al., 2021; MENSE, 2009; MENSE; GERWIN, 2010) (figura 3A). Portanto, o neurônio sensorial primário é preparado para responder à diferentes estímulos moleculares do ambiente, de uma maneira rápida, eficiente e com ativação integrada dos receptores a partir de vias de sinalização internas (figura 3A).

Quando suficientemente intensos, os potenciais de ação percorrem o axônio de maneira retrógrada chegando na região do corpo celular (soma) no GRD, e rapidamente induzem vias de sinalização que leva à ativação de fatores de transcrição (por exemplo, CREB e NF- κ B), responsáveis pela regulação de diferentes genes, de acordo com a natureza do estímulo, podendo gerar proteínas como fatores de crescimento neuronal (NGF, GDNF, BDNF etc.), citocinas e quimiocinas (CCL2, CXCL1, TNF- α , IL-1 β), neuropeptídeos (CGRP, substância P), fatores de sobrevivência e morte celular (caspases, c-JUN, ATF3), entre outros (figura 3B) (GUERRERO et al., 2016; GUO et al., 2007; LI, Yunze et al., 2020; REED et al., 2005; RICCIO et al., 1997; SAFIEH-GARABEDIAN, et al., 1995). A partir daí, a anatomia do neurônio sensorial faz com que as alterações produzidas no GRD sejam bidirecionais, podendo seguir para a direção anterógrada e retornar à ramificação aferente ou ser direcionada para o corno dorsal da medula espinhal, onde ocorrem sinapses com neurônios de segunda ordem, interneurônios e neurônios motores, em diferentes lâminas do corno, induzindo respostas motoras reflexas que retornam ao órgão inervado (GEBHART, 2004) (figura 3C). A percepção sensorial de todo esse processo irá ocorrer nas estruturas superiores do sistema nervoso central, com a integração de diferentes córtices (BJÖRNSDOTTER et al., 2009; MITSI; ZACHARIOU, 2016) (figura 3D).

Figura 3

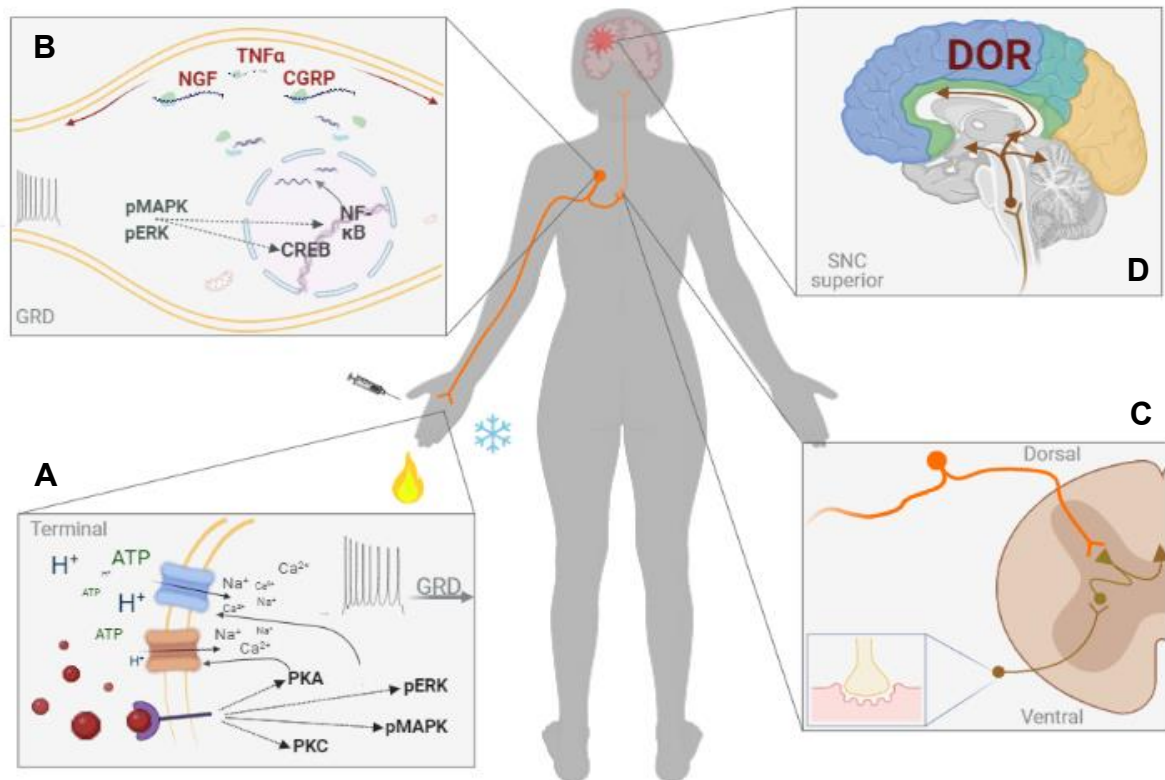


Figura 3 – Etapas envolvidas no processo de sinalização do estímulo sensorial. A) Estímulos periféricos encontram receptores específicos na membrana terminal do neurônio sensorial, desencadeando sinalização celular e potenciais de ação. B) Essa sinalização atinge o núcleo do neurônio localizado no gânglio da raiz dorsal (GRD) induzindo a ação de fatores de transcrição gênica. C) A sinapse com o neurônio secundário ocorre no corno dorsal da medula espinhal. D) E a percepção do estímulo, junto com o processamento da resposta eferente voluntária, ocorre no sistema nervoso central superior. Figura: autoria própria, feita com biorender.com.

2.1.2 Classificação dos neurônios sensoriais

Dentre os tipos de estímulos capazes de ativar esse processo, de uma maneira bem simples, neurônios sensoriais primários são responsáveis por captar informações do ambiente, sendo responsivos à estímulos inócuos ou nocivos, de natureza térmicas, químicas e mecânicas. Essa compreensão leva à classificação dos tipos de neurônios sensoriais presentes no sistema nervoso periférico a partir da sua anatomia e resposta eletrofisiológica à um estímulo. De maneira básica e historicamente, os neurônios sensoriais podem ser classificados a partir de sua morfologia de diâmetro do axônio (HORCH; TUCKETT; BURGESS, 1977;

MENSE; GERWIN, 2010) como: 1) Fibras A beta ($A\beta$), altamente mielinizadas e com alta capacidade de condutividade de potenciais de ação (em torno de 30–90 m/s); 2) Fibras A delta ($A\delta$), parcialmente mielinizadas com menor capacidade de condução (em torno de 5–30 m/s); 3) Fibras tipo C, com pouca mielinização e capacidade condutiva entre 0,2-2 m/s; (BESSOU; PERL, 1969; LAICHE; LAWSON, 2004). Dessa forma, a velocidade de condução está diretamente relacionada com o nível de mielinização e o diâmetro dos axônios dos neurônios sensoriais (figura 4).

Figura 4

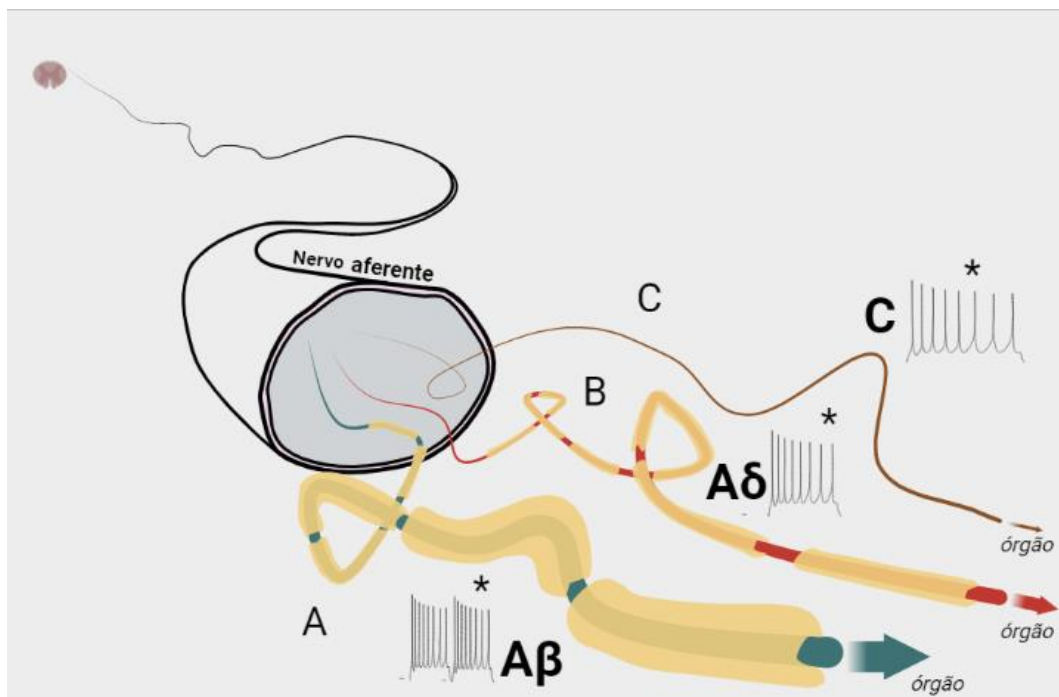


Figura 4 – Representação de três tipos de neurônios sensoriais primários que compõem o nervo aferente. Fibras primárias podem ser classificadas de acordo com o nível de mielinização e diâmetro do axônio. **A)** Fibras $A\delta$ (delta) com maior isolamento de mielina, produzem mais potenciais de ação, e a sinalização ocorre de maneira mais rápida. Enquanto fibras com menos quantidade de mielina, como fibras $A\beta$ (**B)** e fibras C (**C**), possuem menor velocidade de disparo de potenciais de ação. “*” indica representações gráficas da atividade eletrofisiológica de potenciais de ação produzidos pelas diferentes fibras sensoriais. Figura: autoria própria, feita com biorender.com.

Em condições fisiológicas, as fibras $A\beta$ possuem limiares baixos responsivos à estímulos mecânicos, sendo considerados primariamente como receptores de toques leves

(HANDLER; GINTY, 2021). Enquanto isso, as fibras sensoriais menos mielinizadas como A δ e fibras do tipo C são consideradas nociceptivas, respondendo em maior proporção a estímulos nocivos (BASBAUM et al., 2009). Muitas dessas fibras são ainda classificadas como polimodais, ou seja, possuem a capacidade de serem ativadas por mais de um tipo de estímulo, por exemplo, fibras do tipo C possuem a capacidade de responder a estímulos nocivos térmicos e mecânicos (ABRAIRA; GINTY, 2013; BASBAUM et al., 2009). Porém, para prevenir que diferentes estímulos ativem muitas ou poucas células ao mesmo tempo, um fator importante de controle do sistema sensorial são os limiares de estimulação, ou seja a intensidade do estímulo para ativar um potencial de ação se diferem entre os tipos celulares (ABRAIRA; GINTY, 2013; HOHEISEL et al., 2015; MENSE, 1993). Por exemplo, um neurônio sensorial tipo A β , é comumente ativado por estímulos mecânicos inócuos de baixo limiar, como o toque leve na pele, e por temperaturas amenas entre 20°C e 37°C, mas em condições fisiológicas, esse neurônio não será ativado por estímulos nocivos, como pressão intensa ou temperaturas acima de 40-45°C (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Portanto, além de suas características morfológicas, os neurônios sensoriais podem ser agrupados a partir dos seus limiares de ativação, sendo eles neurônios de baixo limiar e neurônios de alto limiar (DONNELLY; CHEN; JI, 2020; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009). Essa habilidade de perceber e discriminar diversos tipos de estímulos, reflete a impressionante especialização funcional das células nervosas sensoriais periféricas.

A resposta sensorial exige uma integração de múltiplas células nervosas e sua complexidade permanece incerta, levando à necessidade de aprofundar a classificação dos tipos celulares envolvidos nesse processo. Nesse sentido, classificações dos neurônios sensoriais a partir das características moleculares das células neuronais, têm surgido no meio científico, ampliando a compreensão sobre suas funções múltiplas e integradas. Molecularmente, neurônios sensoriais são classificados a partir da predominância dos tipos de receptores na sua membrana, que se relacionam com sua funcionalidade. Por exemplo, neurônios com membranas predominantemente compostas por receptores responsivos a estímulos nocivos, como os nociceptores (JULIUS; BASBAUM, 2001; LEWIS et al., 1995) são classificados como neurônios nociceptivos não-peptidérgicos, responsivos exclusivamente a estímulos nocivos e altamente ligantes à proteína *isolectin-B4* (IB4) (FERRARI; BOGEN; LEVINE, 2010; PERRY; LAWSON, 1998). Enquanto neurônios com maior proporção de receptores tirosina quinase, TrkA (marcador não exclusivo de fibras tipo C), TrkB (comumente usados como marcador de fibras A δ /A β), ou TrkC (mais presente em fibras tipo

A β) (MA et al., 1999), são classificados como peptidérgicos e conhecidos por liberar peptídeos CGRP e substância P, como uma resposta reflexa (FERRARI; BOGEN; LEVINE, 2010; PERRY; LAWSON, 1998; RIBEIRO-DA-SILVA; TAGARI; CUELLO, 1989; TESARZ et al., 2011).

Mais recentemente, estudos envolvendo análises transcriptômicas do genoma de modelos animais como roedores (SHARMA et al., 2020) e primatas não-humanos (KUPARI et al., 2021), tem buscado compreender as diferenças de marcadores genéticos na população de células sensoriais presentes no gânglio dorsal da medula. Principalmente a partir de análises de sequenciamento genômico de células únicas (*single-cell RNA sequencing*) das células do GRD, muito tem sido esclarecido sobre a composição molecular dos neurônios sensoriais, como isso reflete na sua função fisiológica (FAURE et al., 2020; USOSKIN et al., 2015) de que forma essas células adquirem suas características durante os estágios de desenvolvimento (SHARMA et al., 2020) e ainda, investigam modificações genéticas que ocorrem nos diferentes subtipos de nociceptores em situações de injúria (HU et al., 2016). Em suma, Usoskin e colaboradores (USOSKIN et al., 2015) classificam as células presentes no gânglio da raiz dorsal a partir de marcadores genéticos, agrupando-as em *clusters*, corroborando com classificações moleculares prévias, porém ampliando os subtipos: 1) NF: neurônios expressando o gene da cadeia pesada de neurofilamento (*Nefh*) e parvalbumina (*Pvalb*), comumente associados a fibras mielinizadas. Subdivisões: NF1, NF2/3 e NF4/5; 2) PEP: neurônios com maior expressão de genes substância P (*Tac1*), CGRP (*Calca*) e TRKA (*Ntrk1*), os quais são associados com neurônios peptidérgicos. Subdivisões: PEP1 e PEP2; 3) NP: neurônios com predominância dos genes *Mrgprd* e *P2rx3*, previamente associados à neurônios não-peptidérgicos do tipo nociceptores. Subdivisões: NP1 e NP2/3; 4) TH: neurônios expressando tirosina hidroxilase (*Th*), comumente associados à neurônios de baixa mielinização, do sistema nervoso simpático; 5) Células não-neuronais: células sem marcadores neuronais, expressando genes como *B2m*, *Vim* e marcadores de colágenos.

Portanto, a compreensão dos neurônios sensoriais sobre sua composição, função individual e integrada, desenvolvimento e modificações, continuam sendo desvendadas e cada vez mais é possível observar a complexidade desse sistema, o que reflete tamanha importância para o organismo humano.

2.1.3 Conceitos relacionados ao sistema sensorial periférico

Dentre os estímulos captados pelos neurônios sensoriais, os estímulos nocivos são extremamente importantes para a manutenção e proteção do organismo. Estímulos nocivos são estímulos associados a um evento que gera ou potencialmente pode gerar um dano tecidual, podendo ser de natureza mecânica, química ou térmica (RAJA et al., 2020), por exemplo, a resposta inflamatória de tecidos lesados ou potencialmente lesados, é um tipo de estímulo químico, uma vez que mediadores inflamatórios ativam receptores na membrana do neurônio sensorial (MENSE, 2009). O processo de codificação de um estímulo nocivo pelo neurônio sensorial primário, até a sinapse no corno da raiz dorsal, é denominado **nocicepção** (IASP, 2020).

Para detectar esses estímulos o neurônio sensorial do tipo nociceptivo, denominados **nociceptores** (IASP, 2020), é composto por receptores de membrana especializados em reconhecer moléculas, temperatura ou movimentos mecânicos associados a um padrão nocivo (MENSE; GERWIN, 2010). Como mencionado diferentes neurônios são compostos por diferentes receptores, gerando um grupo heterogêneo de nociceptores no GRD, especializados em suas funções (DONNELLY; CHEN; JI, 2020). O processo de nocicepção se inicia quando estímulos nos receptores atingem o limiar nociceptivo, desencadeando potenciais de ação e a sinalização até o soma, onde irão ocorrer sinalizações proteicas e a regulação de diversos genes, dentre eles, proteínas responsáveis pela comunicação com o neurônio de segunda ordem localizado no corno dorsal da medula espinhal. A partir da medula espinhal, respostas motoras reflexas podem ocorrer, e estruturas superiores do sistema nervoso central, como o tronco cerebral e o córtex, são responsáveis pela percepção do estímulo como doloroso (BASBAUM et al., 2009; DONNELLY; CHEN; JI, 2020).

Dor é definida pela Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP, 2020) como sendo: “uma experiência sensorial ou emocional desagradável associada ou semelhante à um dano tecidual real ou potencial.” Ainda, considera-se a dor como uma experiência individual e subjetiva, que é influenciada por diversos fatores sociais, culturais, econômicos, biológicos e fisiológicos (IASP, 2020). Do ponto de vista fisiológico, o fenômeno da dor é essencial para o desenvolvimento do ser humano, como mecanismo de proteção e sobrevivência (IASP, 2020). Nesse sentido, um processo doloroso evocado por uma situação inflamatória, tem a função de proteger o local de novas lesões e induzir a recuperação, e regeneração do tecido, objetivando a recuperação de sua funcionalidade (DONNELLY;

CHEN; JI, 2020). Assim, proteínas de um processo inflamatório atingem nociceptores, mantendo canais iônicos em um estado pré-ativado e mais propenso a disparar potenciais de ação, ou seja, a inflamação induz uma resposta aumentada de um nociceptor à estímulos nocivos, ou até mesmo à estímulos inócuos (HOHEISEL et al., 2013), resultante de uma queda do limiar nociceptivo e/ou aumento de estímulos nocivos (IASP, 2020). Esse fenômeno chamado é de sensibilização de nociceptores periféricos (IASP, 2020). Clinicamente essa sensibilização é denominada **alodinia**, quando a dor é provocada por estímulos normalmente não-dolorosos, ou **hiperalgesia** quando a dor é evocada por estímulos normalmente dolorosos e percebida mais intensa (IASP, 2020).

2.1.4 O desenvolvimento da patologia: quando a dor perde seu caráter de proteção

Dentre os sintomas que levam os seres humanos a buscar atendimento médico, dor é uma das causas mais frequentes (MÄNTYSELKÄ et al., 2001). Apesar de não ser diretamente uma ameaça à vida, , conviver com a dor pode gerar momentos de sofrimento e frequente incapacidade de executar atividades diárias (BREIVIK et al., 2006). Quando a convivência com a dor vai além do período de cura, a dor perde sua função fisiológica (BONICA, 1991) e seu impacto na qualidade de vida é tão grande que em 2019 o conceito e o processo de diagnóstico da dor crônica foram revisados e incluídos na Classificação Internacional de Doenças (CID-11). Dessa forma, quando a dor persiste ou reaparece por mais de três meses, é classificada como dor crônica (TREEDE et al., 2019b). Quando a dor crônica é associada a doenças pré-existentes (por exemplo, câncer), ela é denominada dor crônica secundária (SCHWARTZ; GEBHART, 2014). Porém, Nicholas e colaboradores (2019) (NICHOLAS et al., 2019) , definiram recentemente dor crônica como doença primária, onde:

A dor crônica primária é definida como dor em uma ou mais regiões anatômicas que persiste ou recorre por mais de três meses e está associada a sofrimento emocional significativo ou incapacidade funcional (interferência nas atividades da vida diária e participação em papéis sociais) e que não pode ser explicada por outra condição de dor crônica.

Dor crônica é uma patologia complexa. Mesmo com o enorme avanço da ciência na área da saúde, as dores agudas e crônicas ainda representam um importante problema de

saúde mundial (MURRAY et al., 2013; TREEDE et al., 2019a). De todas as dores que acometem o ser humano ao longo da sua existência, as dores musculares são uma das mais prevalentes e duradouras. Esse cenário representa um grande prejuízo social e econômico (GASKIN; RICHARD, 2012). Acometem mais de 40% da população, dificultam a movimentação funcional para as atividades de vida diárias, em 80% dos casos podem durar a vida toda, e são responsáveis por 29% das faltas ao trabalho (ASHINA et al., 2021; DUREJA et al., 2013; MANCHIKANTI et al., 2009). Estudo epidemiológico no Brasil, demonstrou que a prevalência da dor crônica em uma população foi de 39%, com maior incidência em mulheres (56%), em uma faixa etária economicamente ativa de média de 41 anos (SOUZA et al., 2017; VASCONCELOS; CARVALHO DE ARAÚJO, 2018). Ainda, a insatisfação com o manejo da dor crônica foi relatada por 49% dos indivíduos (SOUZA *et al.*, 2017). Apesar da sua alta prevalência não só no Brasil, mas no mundo, as dores crônicas não são tratadas adequadamente. Estima-se uma melhora em torno de apenas 30% dos casos (BORSOOK; BECERRA; HARGREAVES, 2011). Com isso, é cada vez mais importante a compreensão de mecanismos envolvidos no processo de transição da dor aguda para a dor crônica, bem com investigar estratégias de prevenção de tratamento para essas condições.

2.1.5 Modelo experimental para estudos de dores crônicas

Modelos experimentais foram desenvolvidos ao longo dos anos, buscando tanto testar vias analgésicas em animais *naïve* submetidos à estímulos nocivos (REN; DUBNER, 1999; ROSLAND, 1991), quanto compreender mecanismos moleculares envolvidos no processo da dor e a resposta comportamental, em animais injetados com um agente nocivo (por exemplo, carragenina ou formalina) ou submetido à uma lesão cirúrgica (ligação ou rompimento do nervo ciático) (DECOSTERD; WOOLF, 2000; HONORE et al., 2006; PARADA; REICHLING; LEVINE, 2005; ROSLAND, 1991). Esses modelos animais mimetizam mecanismos da dor relacionados a patologias comuns em seres humanos, como artrite reumatoide (GUERRERO et al., 2016), dor inflamatória (CUNHA et al., 2008), dor neuropática, entre outros (TEIXEIRA et al., 2019). Em modelos experimentais, a dor é medida de maneira indireta, através de sinais comportamentais relacionados à dor, por exemplo: 1) testes de movimentos reflexos, como movimento de retirada do membro sob estímulo nocivo ou inócuo; (Randall Selito [figura 7], filamentos de Von Frey etc.); 2) testes de movimentos não-reflexos, como elevação ou lambida da pata (por exemplo, teste de

formalina); 3) avaliação de comportamentos diversos, como evitar estímulos evocados ou qualidade de vida e função (IHNE et al., 2012; JORGE et al., 2020; PENA-DOS-SANTOS et al., 2009; SLUKA; AUDETTE, 2006). Dessa forma, o tipo de avaliação do comportamento doloroso depende do tipo do modelo estudado.

Dentre os diversos modelos, o uso de agentes irritantes é capaz de mimetizar dores inflamatórias. Injeções desses agentes via intramuscular, cutânea, visceral ou nas articulações, induz um processo inflamatório associado a comportamentos dolorosos, que é resolvido normalmente em um curto período (GREGORY et al., 2013). A carragenina (do tipo lambda) é um tipo de indutor inflamatório, que quando injetado gera uma inflamação aguda, associada a hiperalgesia mecânica e sensibilização térmica (RADHAKRISHNAN; MOORE; SLUKA, 2003) no local da injeção. Em dosagens maiores, a inflamação pode persistir por aproximadamente duas semanas (RADHAKRISHNAN et al., 2004). Esse modelo é eficiente em mimetizar condições dolorosas associadas a lesões de tecidos e infecções (GREGORY et al., 2013) e vem sendo usado para induzir modelos experimentais de dor crônica. Muitos são os modelos de dores crônicas, que buscam investigar mecanismos envolvidos no processo de transição de um estado agudo para o crônico. A dor aguda não é uma dor crônica que persiste por mais tempo, um quadro agudo pode se estender e não sofrer o processo de “cronificação” (FRANSEN et al., 2002) de seus mecanismos subjacentes. Dessa forma, investigar e compreender mecanismos celulares do processo de cronificação da dor, é de extrema importância para o direcionamento de tratamentos e prevenções.

Com isso, estudar de maneira separada os mecanismos envolvidos na dor aguda e na dor crônica em modelos animais levou à compreensão do conceito de “*priming* hiperalgésico” pelo grupo do Dr. Jon Levine, passando a elucidar mecanismos de plasticidade neuronal a partir de insultos inflamatórios em tecidos periféricos. Especificamente, em estudo desenvolvido por Aley e colaboradores (ALEY et al., 2000), uma inflamação de curta duração, associada à uma hiperalgesia inflamatória aguda, foi induzida no tecido cutâneo da pata de ratos, através da injeção intradérmica de carragenina, durando em torno de 3 a 4 dias (figura 5B). Quando a mesma pata, mesmo dias após, é submetida à um novo estímulo sensibilizador induzido pela injeção de prostaglandina E₂ (1 µg, figura 5B), uma nova resposta hiperalgésica é desencadeada, de maneira mais intensa e duradoura. Vale ressaltar que, a hiperalgesia persistente é dependente do primeiro insulto inflamatório induzido pela carragenina, uma vez que a administração de PGE₂ uma única vez, não é capaz de

desencadear o mesmo processo (figura 5A) (ALEY et al., 2000), dessa forma, o insulto inflamatório transitório da carragenina, induz alterações celulares significativas para o desenvolvimento do *priming* hiperalgésico, que pode ser associado ao estabelecimento de dores persistentes (figura 5B). No tecido cutâneo, sabe-se que o insulto inflamatório induz alterações na via de sinalização intracelular de adenilato ciclase, AMP cíclico o que leva à ativação da isoforma épsilon da proteína quinase C (PKC ϵ) (PARADA et al., 2003b; PARADA; REICHLING; LEVINE, 2005) e envolve a ativação da proteína alfa quinase dependente de calmodulina II (α CaMKII), no GRD (FERRARI; BOGEN; LEVINE, 2013).

Esse modelo foi estudado também em tecido músculo esquelético de ratos (DINA; LEVINE; GREEN, 2008) e recentemente padronizado em camundongos Swiss (JORGE et al., 2020) para mimetizar o desenvolvimento da dor muscular crônica advinda de insultos inflamatórios recorrentes, por exemplo, em lesões musculares induzidas por esforço repetitivo ou tensão muscular excessiva (ASHINA et al., 2021; STEEL; ROBERTSON; WHEALY, 2021). O modelo em camundongos Swiss, estabelecido por Jorge et al., consiste na administração de uma baixa dose de carragenina no músculo gastrocnêmio (100 μ g), induzindo um período inflamatório associado a um *priming*, responsável por gerar hiperalgesia muscular aguda, que persiste por 3 dias (figura 5B). Alguns dias depois do limiar nociceptivo ter retornado ao normal (10 dias após a carragenina), a administração de PGE₂, no mesmo local, desencadeia uma hiperalgesia muscular ainda mais intensa e de maior duração do que a inicial, a partir de 1 e 4 horas após a injeção de PGE₂ (figura 5B). Neste estudo, denominamos essa hiperalgesia como “persistente”. Esse processo envolve os receptores P2X3, e há a fosforilação de PKC ϵ , 2 dias após a injeção de carragenina, em células do GRD (JORGE et al., 2020).

Figura 5

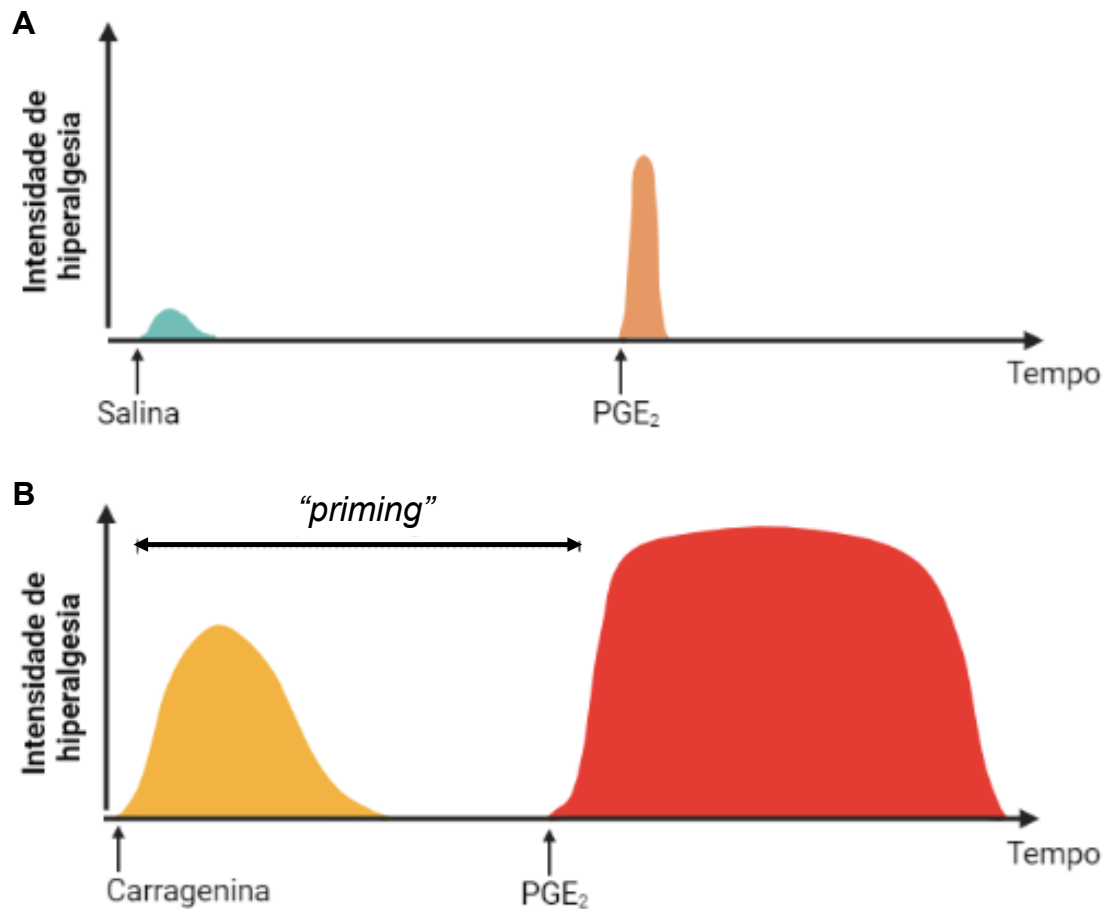


Figura 5 – Representação das fases induzidas pelo modelo de hiperalgesia. A) Representação gráfica da intensidade de hiperalgesia. Injeções de veículo Salina não induzem aumento da hiperalgesia e dessa forma, subsequente injeção de PGE₂ no mesmo membro, gera um aumento agudo e transitório na intensidade da hiperalgesia. B) Representa o processo de cronificação da hiperalgesia, induzida a partir da injeção inicial da Carragenina, que gera o “*priming*” celular, fazendo com que a subsequente injeção de PGE₂ no mesmo membro, desenvolva uma hiperalgesia mais intensa e duradoura. Figura: adaptado de Reichling e Levine, 2009. **Trends in neurosciences.** Feita com biorender.com.

Dessa forma, o processo inflamatório da carragenina induzindo o *priming* no tecido injetado, mesmo com baixa dose, possui papel fundamental nas alterações celulares do GRD, relacionados ao processo de transição da hiperalgesia aguda para a hiperalgesia persistente. Torna-se extremamente necessário compreender de maneira aprofundada os processos inflamatórios subjacentes à essa transição, investigar o envolvimento de

mecanismos na indução do *priming* e na manutenção do período persistente, bem como explorar estratégias de prevenção, capazes de modular a expressão dessas proteínas.

2.2 A inflamação

2.2.1 A inflamação como fator associado a dor muscular crônica: papel dos macrófagos e miócitos

A inflamação pode ter diversas origens e é caracterizada principalmente pelo influxo de células do sistema imune, onde molecularmente irá haver o aumento da concentração de citocinas, prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), entre outros fatores (CUNHA et al., 1991; FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; FERREIRA; MONCADA; VANE, 1973; PARADA et al., 2001; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011), que irão estimular a atividade do sistema imune e vias de sobrevivência celular para restaurar a homeostase (BISWAS; MANTOVANI, 2012; BODE; EHLTING; HÄUSSINGER, 2012; MORALES; ALLENDE, 2019). O principal papel da inflamação é atuar como um sinal de proteção, por exemplo, contra lesões teciduais, infecção por patógenos e toxicidade celular, induzindo um processo de sobrevivência, regeneração e cicatrização tecidual (MORALES; ALLENDE, 2019; SACLIER et al., 2013; ZIEMKIEWICZ et al., 2021).

No entanto, a chamada “inflamação de baixo grau” persistente é comumente associada ao desenvolvimento de doenças. Um estado inflamatório crônico no ambiente pode se tornar prejudicial, diminuindo a capacidade do tecido de induzir vias anti-inflamatórias, o que leva a um estado de estresse celular constante, alterando o funcionamento padrão das células (BLUM et al., 2014; HIRAOKA et al., 2001; ZHANG et al., 2016). Portanto, o estímulo inflamatório crônico e/ou exacerbado é considerado um fator de risco para doenças crônicas, como diabetes, miopatias, dores crônicas, doenças cardiovasculares, entre outras (ANDERSEN; HAAHR; FROST, 2007; MATHUR; PEDERSEN, 2008; MURRAY; AUWERX; HUSS, 2013; WIJNDAELE et al., 2009). Com isso, torna-se interessante investigar de que forma essa inflamação pode ser prevenida ou controlada nos tecidos periféricos.

Como mencionado, sugere-se que a fase aguda da dor muscular seja modulada por mediadores inflamatórios clássicos. A origem desses mediadores inflamatórios se dá principalmente pela ação de células do sistema imune (MARTINEZ et al., 2008; MOORE et al., 2015), sendo os macrófagos uma célula-chave para a indução, manutenção e resolução da inflamação. Essas células são extremamente plásticas, tem a capacidade de migração e infiltração, e células residentes possuem características tecido-específica (HUMA et al., 2017; MURRAY et al., 2014), o que as torna complexas de serem estudadas. Como qualquer outro tecido, o músculo esquelético possui macrófagos residentes e essas são originárias de monócitos advindos da medula óssea (ORECCHIONI et al., 2019; PAREDES; OLSEN SARAIVA CAMARA; BRAGA, 2019), os quais sofrem alterações de fenótipo, de acordo com estímulos no ambiente do tecido (BISWAS; MANTOVANI, 2012; VIOLA et al., 2019). Ainda, células adicionais podem infiltrar, dependente da extensão da lesão (MORALES; ALLENDE, 2019; REDD et al., 2006).

De maneira simplificada, os macrófagos realizam suas funções através de dois tipos distintos de polarização a partir da célula inativa ("M0"): 1) a clássica, onde são gerados macrófagos com fenótipo tipo "M1" de caráter inflamatório, ou 2) a alternativa, resultando em macrófagos com fenótipo tipo "M2" anti-inflamatórios (FRANCO; FERNANDEZ-SUAREZ, 2015; ZHOU et al., 2014). De maneira geral, sabe-se que estímulos inflamatórios e lesivos podem inicialmente induzir ativação de receptores de membrana nos macrófagos, que reconhecem moléculas associadas à patógenos ou danos, levando à um processo de sinalização interna, induzindo a célula para um fenótipo pró-inflamatório para a produção de citocinas, liberação de ATP extracelular e outros mediadores, os quais serão responsáveis por exacerbar a inflamação tecidual (MOSSER; EDWARDS, 2008; SILVEIRA et al., 2016; ZHANG et al., 2015). Esse processo contribui com a resposta hiperalgésica aguda no músculo (GONG et al., 2016), porém não se sabe a importância para o desenvolvimento da dor muscular crônica.

Além de células do sistema imune, o tecido muscular esquelético possui a capacidade de produzir e secretar citocinas. O músculo esquelético é o maior órgão endócrino do corpo humano e sua principal função é o controle de locomoção e postura (WARREN et al., 2001). Por causa da diferença de composição de miosina de cadeia pesada, o músculo esquelético possui dois tipos de fibras musculares, que se diferenciam metabolicamente e na velocidade de contração (WARREN et al., 2001). Fibras musculares do tipo I contraem de

maneira mais lenta, exercendo menor força máxima, porém são mais resistentes à fadiga, uma vez que utilizam predominantemente metabolismo oxidativo. Já as fibras do tipo II são de contração rápida e executoras de maior força máxima, fadigam mais rapidamente e são predominantemente glicolíticas (CHAKKALAKAL et al., 2010; KANNING; KAPLAN; HENDERSON, 2010). No músculo esquelético, a inflamação está associada com o declínio do fenótipo oxidativo do tecido (REMELS et al., 2014), bem como um músculo com característica predominantemente oxidativa, desenvolve menos inflamação (BOTTA et al., 2013). Portanto, a característica metabólica do tecido muscular é um importante fator na modulação de processos inflamatórios.

Cada vez mais a célula do tecido muscular, o miócito, tem sido apontada como um importante produtor de proteínas capazes de modular o ambiente do tecido e outros órgãos (CHARLOTTE; SEVERINSEN; PEDERSEN, 2020). As chamadas “miocinas” são citocinas e peptídeos produzidas pelo miócito, capazes de exercer função autócrina, endócrina e parácrina em tecido adiposo, nervoso, ósseo, hepático e células imunes, modulando processos metabólicos, cognitivos e funcionais (LEUCHTMANN et al., 2021). Além disso, a inatividade física é associada com um processo de inflamação crônica de baixo grau, que pode ser relacionado com uma célula muscular mais vulnerável à estímulos nocivos e lesivos (BROHOLM et al., 2011; HOLLINGER et al., 2013; PEDERSEN, 2017; SHI et al., 2011). O oposto também é observado, onde um músculo esquelético exercitado é associado com menor desenvolvimento de um cenário inflamatório (PEDERSEN; SALTIN, 2006; STARKIE et al., 2003; STEENBERG et al., 2003).

Dessa forma, tanto o macrófago quanto o miócito possuem papéis fundamentais no desenvolvimento de processos inflamatórios, os quais podem ser associados com a o estabelecimento de dores musculares crônicas, tornando essas duas células, alvos de interesse nesse estudo.

2.2.2 O P2X4 no macrófago e o NF-κB no miócito

Tem sido demonstrado que o envolvimento dos macrófagos na indução da inflamação e da hiperalgesia é modulado, pelo menos em parte, por receptores ionotrópicos do tipo purinérgicos P2X4, que estão presentes na membrana de células do sistema imune, tanto centrais (BERNIER; ASE; SÉGUÉLA, 2017; TSUDA et al., 2003) quanto periféricas

(LEDDEROSE et al., 2018; OLIVEIRA-FUSARO et al., 2020; ULMANN; HIRBEC; RASSENDREN, 2010). Estudos demonstraram que a ativação de receptores P2X4 em macrófagos está relacionada com o desenvolvimento de respostas hiperalgésicas (TSUDA et al., 2009; ULMANN; HIRBEC; RASSENDREN, 2010), onde há a produção de IL-1 β , envolvida no desenvolvimento da hiperalgesia muscular (OLIVEIRA-FUSARO et al., 2020). Os receptores P2X4 são expressos em células macrófagos, micróglias, fibroblastos e hepatócitos (BERNIER; ASE; SÉGUÉLA, 2017; ZUMERLE et al., 2019). São ativados por ATP extracelular, gerando um influxo de cálcio para o interior do macrófago (LAYHADI; FOUNTAIN, 2017). O aumento de íons cálcio leva à ativação da proteína p38-MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) por fosforilação, o que desencadeia a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) via ação das enzimas fosfolipase citosólicas A₂ (cPLA₂) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (TRANG; SALTER, 2012; ULMANN; HIRBEC; RASSENDREN, 2010). Ainda, sabe-se que a ativação da p38-MAPK está relacionada com o aumento de proteínas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (BODE; EHLTING; HÄUSSINGER, 2012). Portanto, há o envolvimento dos receptores P2X4 presentes nas células macrófagos no desenvolvimento da dor muscular. Torna-se interessante investigar a via de sinalização sobre o processo da dor muscular crônica.

Além dos receptores P2X4 presentes no macrófago, a sinalização de vias inflamatórias no miócito também é um processo que contribui para o estabelecimento da inflamação no tecido. Sabe-se que células musculares estimuladas com fatores nocivos, passam a produzir citocinas inflamatórias que exacerbam a toxicidade no tecido e o dano celular (ACHARYYA et al., 2007; KOROTKOVA; LUNDBERG, 2014). Dentre as vias inflamatórias envolvidas nesse processo no miócito estão vias de estresse celular como ativação de c-Jun N-terminal quinases (JNK), p38-MAPK e o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (ACHARYYA et al., 2007; EVANS et al., 2002). Nesta tese, o estudo de vias inflamatórias a partir do miócito se deu pela investigação da via canônica do NF- κ B.

Em suma, o NF- κ B é um fator de transcrição formado por um dímero proteico, onde o mais comum envolve as isoformas p65/p50, que está ancorada no citosol das células pelo inibidor do fator nuclear kappa-B alfa (I κ B α) (RIEDLINGER et al., 2019). A sinalização canônica de NF- κ B é induzida por uma gama de ativadores, principalmente através de ligação em receptores de membrana, incluindo os receptores do tipo *Toll* (TLRs), metabólitos, e receptores de citocinas, como o receptor de TNF- α , TNFR (GHOSH; DASS, 2016; NISR et al., 2019). A partir da ligação do receptor, ocorre uma cascata de ativação proteica, até a

formação do complexo quinase, onde principalmente a atividade da subunidade beta da quinase do fator nuclear Kappa-B (IKK β) (HÄCKER; KARIN, 2006), é responsável por induzir a fosforilação de I κ B α , que é então marcado para degradação por ubiquitinação (LIU et al., 2017). Isso libera p65/p50 para translocação do citosol para o núcleo para iniciar a transcrição de genes inflamatórios, levando ao aumento de citocinas circulantes como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), quimiocina (motivo C-C) ligante 2 (CCL2), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 beta (IL-1 β) (LIU et al., 2017). Assim, a modulação da ativação p65/p50, através do controle de I κ B α ou IKK β parece ser uma abordagem interessante para o controle de situações inflamatórias no tecido muscular, relacionadas ao estabelecimento da dor muscular crônica.

2.3 O exercício físico

2.3.1 O exercício físico no controle de condições dolorosas

Cada vez mais a prática de exercício físico vem sendo reforçada como elemento importante para a manutenção da qualidade de vida. Em relação a condições dolorosas, práticas de exercício físico têm sido cada vez mais descritas como um método eficiente no controle de patologias de dor, tanto em modelos experimentais (BEMENT; SLUKA, 2005; GALDINO et al., 2014; SHEN; FOX; CHENG, 2013) quanto em estudos com humanos (JONES et al., 2014; NAUGLE et al., 2014c; TESARZ et al., 2013). A capacidade do exercício físico em reduzir uma condição dolorosa é denominada hipoalgesia induzida pelo exercício (HIE), podendo ser caracterizado tanto pela elevação do limiar nociceptivo ou pela redução na ativação de vias de nocicepção e percepção da dor (KOLTYN et al., 2014; NAUGLE; FILLINGIM; RILEY, 2012). Interessantemente, além de reduzir a dor já estabelecida, a prática de exercício físico é capaz de evitar que ela se desenvolva de maneira mais intensa (DE AZAMBUJA et al., 2020; LESNAK et al., 2022), ou seja, estabelecendo um estado de prevenção contra dores de maneira geral. Sabe-se que indivíduos mais ativos fisicamente ao longo da vida, são menos pré-dispostos a desenvolver condições dolorosas crônicas (LANDMARK et al., 2011, 2013). Importante ressaltar que, indivíduos com patologias dolorosas já estabelecidas, podem ter percepções dolorosas diferenciadas em resposta ao exercício físico, em relação a indivíduos saudáveis que então sofrem algum estímulo nocivo (BEMENT et al., 2008; LEMLEY; HUNTER; BEMENT, 2015;

WHITESIDE; HANSEN; CHAUDHURI, 2004). Por exemplo, Naugle e colaboradores, demonstraram que indivíduos com síndrome da fibromialgia apresentam aumento da percepção de dor generalizada após exercícios físicos extenuantes (NAUGLE et al., 2014a). Em contrapartida, exercícios físicos de baixa intensidade têm a capacidade de reduzir a percepção de dor no tratamento de pacientes com condições dolorosas musculoesqueléticas crônicas (BEMENT; SLUKA, 2005; SHARMA et al., 2010). Portanto, a associação do conhecimento sobre a prática de exercício físico com a compreensão sobre condições patológicas de dor, pode ser mais eficiente em elevar à manutenção da saúde e a qualidade de vida de pacientes e ajudar na prevenção de doenças em indivíduos saudáveis.

Dentre os tipos de exercício físico que podem induzir a hipoalgesia, tanto exercícios isométricos (KOLTYN et al., 2014; NAUGLE; NAUGLE; RILEY, 2016) quanto com movimentos dinâmicos (HOOTEN et al., 2012; JONES et al., 2014; SHARMA et al., 2010) são capazes de diminuir a resposta dolorosa, porém para indivíduos saudáveis, mais importante que o tipo de exercício físico, é o aumento da quantidade de volume da prática por dia, para ser capaz de causar modificações significativas em relação ao estabelecimento da dor crônica (LANDMARK et al., 2013), sendo a regularidade da prática um fator importante para a prevenção, além de um volume mínimo necessário (DE AZAMBUJA et al., 2020; HOFFMAN et al., 2004; WONDERS; DRURY, 2011). Considerando dores musculares, tanto exercícios físicos resistidos² (LESNAK et al., 2022), quanto exercícios físicos de *endurance*³ (DE AZAMBUJA et al., 2020), são capazes de prevenir o desenvolvimento da dor.

Os mecanismos de ação do exercício físico têm sido extensivamente estudados nos últimos anos, considerando as diferenças entre os tipos de prática e o impacto que podem gerar nos tecidos alvos. De maneira geral, sabe-se que a prática de exercício físico induz a ativação do sistema opioide que é capaz de diminuir condições dolorosas pré-estabelecidas (KARLSSON et al., 2015; MAZZARDO-MARTINS et al., 2010; SHANKARAPPA; PIEDRAS-RENTERÍA; STUBBS, 2011). Outros estudos já demonstraram que a ativação de vias envolvendo receptores canabinóides também são eficientes em reduzir condições dolorosas (GALDINO et al., 2014; KING-HIMMELREICH et al., 2017), bem como o

² Exercício físico resistido é baseado em enfatizar o trabalho de grupos musculares isolados no movimento de um membro induzindo contrações concêntricas, excêntricas ou isométricas (tanto multi-articulados quando de articulação única). Os exercícios propostos são pautados na capacidade de vencer a resistência de cargas pré-estabelecidas, sendo por equipamentos ou não. Prioritariamente, utiliza metabolismo anaeróbico, podendo variar de acordo com a intensidade proposta e induz a hipertrofia muscular (GARBER et al., 2011b).

³ Exercício físico de *endurance* são baseados em movimentos contínuos de longa duração (30 minutos ou mais), com carga moderada ou baixa, capazes de induzir o aumento na frequência cardíaca e ventilação por período prolongado. Os exercícios propostos utilizam prioritariamente o metabolismo aeróbio a partir da disponibilidade de oxigênio no organismo (GARBER et al., 2011b).

circuito serotoninérgico do sistema nervoso central (BOBINSKI et al., 2011, 2016; KORB et al., 2010). Recentemente, demonstrou-se que o exercício físico resistido previne o estabelecimento da hiperalgesia muscular através da modulação do sistema endócrino, uma vez que há o envolvimento de receptores androgênicos no processo de prevenção (LESNAK et al., 2022). Também já foi demonstrado que o exercício físico modula a atividade das fibras nociceptivas, que está anormalmente aumentada em algumas condições dolorosas (DE AZAMBUJA et al., 2018; SHANKARAPPA; PIEDRAS-RENTERÍA; STUBBS, 2011; SHARMA et al., 2010). Ainda, como já mencionado, exercício físico aeróbio parece ter um efeito de prevenção da dor, a partir da geração de um tecido muscular de caráter anti-inflamatório e com produção de IL-10 (LEUNG et al., 2015).

Apesar de diversas evidências, a pesquisa por outros possíveis mecanismos ainda é extensa. Consideramos importante investigar tanto os mecanismos envolvidos no processo de cronificação da dor muscular, quanto os efeitos da prática do exercício no tecido musculoesquelético, a fim de aprofundar a forma que as alterações geradas na periferia podem ser relacionadas com a prevenção de dores musculares crônicas. Muitos efeitos anti-inflamatórios são induzidos por vias aeróbias do exercício físico, como por exemplo a produção de IL-4 e IL-13 (GLEESON et al., 2011; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012), que induzem ativação de proteínas diversas e consequente controle de situações inflamatórias (CHAWLA, 2010; ODEGAARD et al., 2007). Dessa forma, se torna interessante aprofundar a compreensão sobre os efeitos anti-inflamatórios do exercício físico no tecido músculo esquelético e a relação desse processo com a prevenção de dor crônica.

2.3.2 O efeito anti-inflamatório do exercício físico

O exercício físico é importante para a saúde do organismo humano. Muitos são os benefícios gerados pelos efeitos da prática de exercício físico, como controle de glicemia e dislipidemia, adaptações cardiovasculares e adaptações metabólicas em geral (GARBER et al., 2011a; PEDERSEN; SALTIN, 2006). Muito dos benefícios gerados pelo exercício físico se dá pelas adaptações metabólicas geradas no músculo esquelético, a partir da demanda energética exigida pela prática, o qual promove a homeostasia sistêmica saudável do tecido (AGUDELO et al., 2014; CORREIA; FERREIRA; RUAS, 2015). Nesse mesmo sentido, indivíduos mais fisicamente ativos tem a menor tendência em desenvolver condições dolorosas crônicas ao longo da vida (LANDMARK et al., 2013) e apresentam menores níveis

de inflamação sistêmica (PEDERSEN, 2017). Inversamente, sabe-se que indivíduos sedentários são mais suscetíveis a doenças metabólicas e inflamatórias, como obesidade e diabetes (BOOTH et al., 2017), e estão mais pré-dispostos a desenvolver doenças neurodegenerativas (WESTENENG et al., 2021), por exemplo, demonstrando uma relação entre o proteoma e secretoma do músculo esquelético, com sua inervação nervosa. Com isso, cada vez mais tem sido explorado a partir do músculo esquelético, de que forma o exercício físico, é capaz de modular a produção e liberação de moléculas no macro e microambiente, envolvidas na promoção de um tecido e organismo saudável.

Sendo o músculo esquelético um potente órgão endócrino onde o miócito é altamente ativado em diversos tipos de exercício físico, a modulação de miocinas pela prática de exercício físico é bastante comum. A partir desses fatores, o músculo esquelético impacta na ativação de células do sistema imune, como linfócitos, macrófagos e neutrófilos (MINARI; OYAMA; DOS SANTOS, 2014; NIELSEN; PEDERSEN, 2008; SCHNYDER; HANDSCHIN, 2015), tanto mobilizando e induzindo migração celular para a região do músculo, quanto modulando sua ativação (LEUNG et al., 2016; WILLIS et al., 2021). Esse processo é responsável pelo reparo e regeneração do tecido muscular, e induz a adaptação plástica da célula muscular ao esforço físico e metabólico exigido (DENG et al., 2012; PILLON et al., 2013; ZIEMKIEWICZ et al., 2021). Para isso, eventos inflamatórios transientes finamente orquestrados, são induzidos no ambiente do músculo esquelético, onde macrófagos são polarizados para um fenótipo inflamatório induzindo a limpeza do local (ARNOLD et al., 2007; PILLON et al., 2013), seguido da importante atividade de macrófagos anti-inflamatórios responsáveis por induzir vias de sinalização de reparo celular (ARNOLD et al., 2007; SIQUEIRA MIETTO et al., 2015). Além disso, sabe-se que a prática de exercício físico pode induzir um efeito anti-inflamatório, que é apresentado tanto pela redução de citocinas inflamatórias, como TNF- α (STARKIE et al., 2003), e aumento de anti-inflamatórias, por exemplo IL-10 e IL-1ra (JANKORD; JEMIOLO, 2004; STEENSBERG et al., 2003), quanto pela ativação de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório (OLIVEIRA et al., 2013; YAKEU et al., 2010). Dessa forma, durante o exercício físico e as adaptações geradas no tecido, o músculo atua como um órgão imuno-regulatório impactando a ativação de macrófagos e do estado inflamatório. Sabe-se que em modelo experimental não-inflamatório, o exercício físico é capaz de prevenir a hiperalgesia muscular persistente, aumenta a proporção de macrófagos anti-inflamatórios, diminui macrófagos inflamatórios e induz a produção de IL-10, que está envolvida no processo de controle da hiperalgesia

(LEUNG et al., 2015). Porém, não é sabido se esse efeito anti-inflamatório pode ser uma via de controle de dores musculares inflamatórias crônicas e de que forma um músculo esquelético exercitado se torna imunologicamente mais preparado para resolver situações inflamatórias relacionadas às dores crônicas.

2.3.3. Os receptores PPAR γ e seus efeitos anti-inflamatórios

Os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma isoforma gama (PPAR γ) são fatores de transcrição membros da superfamília de receptores nucleares dependentes de ligantes (ROSEN; SPIEGELMAN, 2001). As isoformas desse receptor (beta, gama e alfa/delta) se diferenciam a respeito de distribuição nos tecidos e tipos de ligantes, porém seus mecanismos de ação são similares: é necessário a heterodimerização com o receptor retinoide X (RXR) para a ligação nas regiões reguladoras do DNA (elementos responsivos específicos, PPREs) e recrutar co-ativadores para regular a expressão gênica (ROSEN; BENINGHOF; KOENIG, 1993; ROSEN; O'DONNELL; KOENIG, 1992). Apesar disso, mesmo na ausência de ligantes, o receptor PPAR γ pode agir como um repressor da transcrição gênica, tanto fazendo a transrepressão de outros fatores de transcrição, quanto modificando a abertura da cromatina, a partir de alterações nas histonas através da ação em enzimas, como as histona acetiltransferases e acetilases (CANTINI et al., 2010; GRIGGS et al., 2015; HOU; MOREAU; CHADEE, 2012; PASCUAL et al., 2005).

Os receptores PPAR γ podem ser ativados por ligantes sintéticos, onde os mais conhecidos são as tiazolidinediona/glitazonas (TZDs), como a rosiglitazona e pioglitazona (SPIEGELMAN, 1998). Esses compostos são hoje utilizados como medicamentos antidiabéticos, onde os mecanismos de ação baseiam-se na ativação do receptor PPAR γ para agir como fator de transcrição, induzindo a alteração de genes relacionados ao metabolismo de glicose e lipídios (SPIEGELMAN, 1998). A prostaglandina 15-*Deoxy*- Δ -12,14-*Prostaglandin* J₂ (15d-PGJ₂), bem como outros ácidos graxos e eicosanoides (STRAUS; GLASS, 2001; TSUBOUCHI et al., 2001), tem sido apresentada como um ligante endógeno do receptor PPAR γ , mesmo tendo sua biossíntese reduzida (BELL-PARIKH et al., 2003). A 15d-PGJ₂ é produzida durante a inflamação e possui ação anti-inflamatória em células do sistema imune, como macrófagos (revisado em: WILLOUGHBY; MOORE; COLVILLE-NASH, 2000) e suprime a migração de neutrófilos (NAPIMOGA et al., 2008). Além do ligante natural, a modulação endógena da atividade dos receptores PPAR γ pode ser regulada

em diferentes níveis por modificações pós-traducional, como fosforilação e ubiquitinação (BEEKUM; FLESKENS; KALKHOVEN, 2009; LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010), e há indicações de que o exercício físico é capaz de ativar o PPAR γ através da demanda metabólica e estresse oxidativo (DAVIES et al., 2015; SHIRVANI et al., 2021; THOMAS et al., 2012), ampliando os mecanismos de ação e possibilitando uma variedade de vias de ativação. Dessa forma, o uso da 15d-PGJ₂ e a ativação do receptor PPAR γ possuem efeitos anti-inflamatórios importantes nos mais diversos tecidos. Nesta tese, com o objetivo de manter a modulação do receptor PPAR γ mais próximo de estímulos naturais ao corpo, optamos por analisar os efeitos do receptor através do ligante 15d-PGJ₂.

Há um enorme envolvimento dos receptores PPAR γ na regulação do metabolismo de glicose e lipídeos. Especificamente, PPAR γ expresso em músculo esquelético é responsável pelo controle da adiposidade e ação da insulina (HEVENER et al., 2003; NORRIS et al., 2003) e no tecido adiposo é responsável por controle da adipogênese e fenótipo do tecido adiposo (ROSEN et al., 1999). Nos últimos anos, os receptores PPAR γ estão sendo cada vez mais investigados como reguladores-chave de proliferação, diferenciação e controle de respostas imunes e inflamatórias (MOORE et al., 2001). Nesse contexto, em suma, ações genômicas do receptor podem envolver a transcrição de genes-alvo (ROSEN; SPIEGELMAN, 2001), a repressão de fatores de transcrição pela competição de co-ativadores e sítios de início de transcrição em comuns, ou ainda a repressão por interação física direta (SAUER, 2015). Já as ações não-genômicas não envolvem a transcrição de genes-alvo do PPAR γ , mas sim rápidas modificações intracelulares de fatores de transcrição ou de segundos mensageiros, ou seja, englobam interações com proteínas-proteínas no citosol ou núcleo, trans reprimindo as ações de fatores de transcrição no núcleo, ou ainda induzindo a degradação proteica (BUENO JÚNIOR et al., 2012; HOU; MOREAU; CHADEE, 2012). Dentre os fatores de transcrição modulados pelo PPAR γ , sabe-se que o NF- κ B é um deles. Por exemplo, o receptor PPAR γ pode agir como uma E3 ligase, induzindo a degradação da isoforma p65 do NF κ B (HOU; MOREAU; CHADEE, 2012). Ainda, o PPAR γ pode reprimir efeitos inflamatórios de maneira rápida a partir das modificações pós-traducional (PASCUAL et al., 2005). Além disso, por mecanismos não completamente elucidados, a ativação do PPAR γ induz a diferenciação de macrófagos para fenótipos anti-inflamatórios (ABDALLA et al., 2020). Portanto, existe um papel importante dos receptores PPAR γ na prevenção e/ou resolução de processos inflamatórios.

Em processos dolorosos, o receptor PPAR γ vem sendo estudado no contexto da dor neuropática e dor inflamatória. Considerando a ativação farmacológica do PPAR γ , já se demonstrou que a administração sistêmica de pioglitazona é capaz de reduzir a nocicepção mecânica e térmica em modelos de dor neuropática induzida a partir da lesão/constricção do nervo ciático, bem como reduzir a expressão de marcadores de astrócitos (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP) e a fosforilação da via de sinalização ERK/p38 MAPK, no corno dorsal da medula espinhal (MORGENWECK et al., 2013). Além disso, a ativação de PPAR γ no cérebro com rosiglitazona previne a expressão de c-fos⁴ no corno dorsal da medula espinhal de animais submetidos à modelo experimental de dor inflamatória cutânea (MORGENWECK et al., 2010). Ainda, a administração sistêmica de rosiglitazona reduz a infiltração de macrófagos, produção de mediadores inflamatórios e atenua o período agudo de alodinia em modelo de neuropatia (TAKAHASHI et al., 2011). E em modelos de dor inflamatória, administração local de rosiglitazona é capaz de modular a polarização de macrófagos para fenótipos anti-inflamatórios, bem como reduzir a fosforilação de NF- κ B e produção de mediadores inflamatórios, e por consequência há a diminuição de alodinia mecânica e térmica (HASEGAWA-MORIYAMA et al., 2012, 2013). Considerando o ligante endógeno, 15d-PGJ₂, sabe-se que a administração do ligante induz a anti-nocicepção em modelo de dor temporomandibular (CLEMENTE-NAPIMOGA et al., 2012; PENA-DOS-SANTOS et al., 2009) e diminui a hiperalgesia muscular inflamatória (SANTOS et al., 2020), ambos envolvendo a ativação de vias opioides.

Em estudo prévio, nosso grupo de pesquisa demonstrou que exercício físico regular previne o estabelecimento da hiperalgesia muscular aguda através da ativação de receptores PPAR γ , usando modelo aplicado em ratos (DE AZAMBUJA et al., 2020). Agora, apresentamos a ampliação da pesquisa sobre o receptor PPAR γ e efeitos anti-inflamatórios do exercício físico, uma vez que, até o momento não há estudos que tragam a associação entre o exercício físico, sua ação anti-inflamatória e a ativação de receptores PPAR γ , com o processo de prevenção da cronificação da dor muscular inflamatória.

⁴ C-fos é uma proteína associada a vias oncogênicas. Comumente utilizada como marcador de ativação neuronal, uma vez que sua expressão é aumentada após a despolarização. É facilmente identificada por imunofluorescência, dessa forma a c-fos é um indicador de estímulo nocivo e vias de nocicepção no sistema nervoso central (BULLITT, 1990; GAO; JI, 2009).

2.3.4 O importante papel do co-ativador PGC-1 α no tecido muscular esquelético

A transcrição gênica é um processo finamente regulado. Além de fatores de transcrição e receptores nucleares, como o PPAR γ , co-ativadores de fatores de transcrição são amplamente investigados como importantes reguladores da função celular. Uma proteína co-ativadora é um tipo de regulador de transcrição gênica, que é capaz de se ligar à fatores de transcrição e aumentar sua atividade, recrutando a maquinaria de transcrição e aumentando a expressão gênica (SPIEGELMAN; HEINRICH, 2004). A família de co-ativadores PGC-1 consiste em três isoformas: alfa, beta e co-ativador relacionado à PGC-1 (PRC) (MARTÍNEZ-REDONDO et al., 2016). Como outros co-ativadores, os PGC-1s não se ligam diretamente ao DNA, mas interagem diretamente com fatores de transcrição e receptores nucleares (PUIGSERVER et al., 1998a). A proteína PGC-1 α leva essa nomenclatura, pois originalmente foi descoberta como um cofator do receptor PPAR γ no tecido adiposo marrom (PUIGSERVER et al., 1998a), porém hoje sabe-se que a proteína está presente em tecidos metabolicamente oxidativos, incluindo músculo esquelético (UGUCCIONI; D'SOUZA; HOOD, 2010). Estudos subsequentes identificaram mais proteínas nucleares que a PGC-1 α teria ação reguladora, incluindo as outras isoformas PPAR α e PPAR β/δ , o receptor de fígado X, receptor de vitamina D (VDR), receptor de estrogênio α (ER α), receptor retinoide X (RXR), receptor relacionado ao estrogênio α (ERR α) e ERR γ , receptores glicocorticoides (GR), entre outros (DELERIVE et al., 2002; HUSS; KOPP; KELLY, 2002; ROSEN; BENINGHOF; KOENIG, 1993; WANG et al., 2014). Após a ligação da PGC-1 α aos receptores ou fatores de transcrição, a proteína funciona como um recrutador para complexos proteicos relacionados ao aumento da transcrição gênica (PUIGSERVER et al., 1999).

Dentre as conhecidas isoformas de PGC-1s, a PGC-1 α possui variantes que são produzidas a partir de dois promotores (um alternativo e outro proximal), além de *splicing* alternativos sob o gene *PPARGC1A* que faz gerar mais de dez isoformas proteicas que variam na sua distribuição tecidual e/ou função (revisado em: (MARTÍNEZ-REDONDO; PETTERSSON; RUAS, 2015). A isoformas PGC-1 α 1 é considerada a proteína canônica (também escrita PGC-1 α), com efeitos relacionados ao metabolismo oxidativo e de resistência oxidativa (RUAS et al., 2012). Modelos transgênicos foram desenvolvidos para estudar em foco a PGC-1 α 1 em tecido musculo esquelético. No *background* C57BL/6J, alta expressão de PGC-1 α específica no músculo esquelético foi induzida a partir de um promotor de creatina

quinase (MCK), gerando um fenótipo muscular mais oxidativo, ou seja, os animais apresentam mais genes oxidativos nas fibras musculares tipo II, com coloração avermelhada, aumento de mioglobina e troponina I, tornando-se fibras de contração lenta (LIN et al., 2002). Com isso, sem contato prévio com protocolos de exercício físico, animais transgênicos MCK-PGC-1 α 1 possuem um fenótipo de treinamento de *endurance*.

Quando ativado por exercício físico (a partir de sinalização de cálcio, vias metabólicas, entre outros), a PGC-1 α 1 é responsável por orquestrar a adaptação do músculo esquelético ao esforço físico, alterando o programa genético para induzir biogênese mitocondrial, angiogênese, e alteração na composição da fibra muscular (revisado em: (ARANY, 2008). Para além da bioenergética, a ativação da PGC-1 α 1 pelo exercício físico tem sido amplamente investigada devido aos seus efeitos sistêmicos, que englobam a capacidade de produzir miocinas e metabólitos com efeitos em outros tecidos e órgão. A PGC-1 α 1 possui efeitos benéficos em junções neuromusculares (ARNOLD et al., 2014; HANDSCHIN et al., 2007; MILLS et al., 2018), metabolismo do triptofano associado ao estresse do sistema nervoso central e sintomas de depressão/ansiedade (AGUDELO et al., 2014) e a produção de fatores de regeneração neuronal, como *Brain Derived Neuronal Factor* (BDNF) em modelos associados à doença de Alzheimer (WRANN et al., 2013). Dessa forma, considerando o envolvimento da PGC-1 α 1 em diversas vias fisiológicas e patofisiológicas, é interessante aprofundar os conhecimentos sobre como a ativação dessa proteína é capaz de modular situações inflamatórias no músculo esquelético e manipular a comunicação entre tecidos.

3. Capítulo III

3.1 Estudo 1

3.1.1 Hipótese do Estudo 1

Considerando o importante papel dos macrófagos no processo inflamatório, uma das hipóteses levantadas nesta tese foi de que macrófagos periféricos com fenótipo pró-inflamatório e citocinas inflamatórias, contribuem para aumentar a predisposição do sistema musculoesquelético a desenvolver dor muscular crônica. Além disso, que a ativação dos

receptores P2X4, presentes nos macrófagos do tecido, é um dos fatores que leva à polarização pró-inflamatória das células, estando também envolvido no processo de cronificação da dor muscular. Além disso, também hipotetizou-se que exercício físico regular é capaz de prevenir o desenvolvimento da dor muscular crônica, induzindo um processo anti-inflamatório, com o envolvimento de receptores PPAR γ no tecido, modulando os fenótipos dos macrófagos, a ativação dos receptores P2X4, bem como as citocinas produzidas nesse ambiente.

3.1.2 Objetivo do Estudo 1

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi de investigar no tecido muscular mecanismos inflamatórios subjacentes à cronificação da dor muscular e se o exercício físico regular previne esse processo através da modulação desses mesmos mecanismos. Objetivou-se investigar a capacidade do exercício físico de regular fenótipo de macrófagos e citocinas teciduais, além de avaliar o envolvimento e da ativação dos receptores PPAR γ e P2X4, na prevenção e indução da dor muscular crônica, respectivamente.

3.2 Estudo 2

3.2.1 Hipótese do Estudo 2

Neste Estudo, hipotetizou-se que a célula do tecido muscular esquelético tem um papel importante na modulação de processos inflamatórios, a partir da atividade do co-ativador PGC-1 α 1. Esse papel envolve a diminuição da ativação da via de sinalização canônica do fator de transcrição NF- κ B, tanto induzindo o aumento do inibidor I κ B α , quanto reduzindo a atividade da enzima IKK β , prevenindo a degradação de I κ B α e consequentemente diminuindo a expressão de genes inflamatórios relacionados ao fator de transcrição.

3.2.2 Objetivos do Estudo 2

Considerando a importância do tecido muscular esquelético para processos metabólicos e inflamatórios, e sendo esse o principal tecido modulado pelo exercício físico regular a partir do co-ativador PGC-1 α 1, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da

alta expressão músculo-específica de PGC-1 α 1 em modular proteínas sinalizadoras da ativação canônica do fator de transcrição NF- κ B. Objetivou-se investigar se a alta expressão de PGC-1 α 1 poderia induzir o aumento do inibidor de NF- κ B, I κ B α e/ou a diminuição da quinase IKK β , e consequentemente prevenir a expressão de genes inflamatórios no tecido muscular.

4. Capítulo IV

4.1 Materiais e métodos do Estudo 1

4.1.1 Cuidado com animais

Para esses experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos (*Mus Musculus*) pesando 25-35g no início dos experimentos, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de pesquisa do Instituto de Biologia (CEMIB/UNICAMP). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética institucional local para uso de animais (CEUA-UNICAMP, número de protocolo: 4883-1/2018 e 5244-1/2018), e foram realizados de acordo com as diretrizes do comitê de pesquisa e ética da Associação Internacional para Estudos da Dor em Animais Conscientes (ZIMMERMANN, 1983) e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brasil). Todos os animais foram mantidos em gaiolas plásticas enriquecidas (cinco animais por gaiola) contendo maravalha e tubos plásticos, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (luz acesa às 07h00). Comida e água foram disponibilizadas *ad libitum*, exceto durante procedimentos de exercícios físicos, injeções musculares e testes de hiperalgesia muscular mecânica. As sessões experimentais foram realizadas durante a fase clara, das 9h00 às 17h00, com preferência para o período da tarde, sempre em uma sala silenciosa e com temperatura controlada ($\pm 23^{\circ}$ C). Os pesquisadores foram cegados para os grupos experimentais em todos os experimentos comportamentais e contagem de células em imunofluorescência.

Os animais foram distribuídos randomicamente em grupos experimentais (figura 6A). Primeiramente, dois grandes grupos foram formados, direcionando os animais para serem sedentários ou submetidos ao exercício físico (Sedentário e Exercício, respectivamente. Figura 6A). Após o protocolo de exercício físico ser executado, os animais foram randomicamente divididos em diferentes grupos que receberiam injeções de carragenina (Cg)

ou salina (Sal, grupos controles), seguida de injeções de PGE₂. Em seguida, subgrupos foram formados, dividindo os animais em grupos experimentais propostos para análises comportamentais de mecanismos de interesse (demais retângulos vermelhos. Figura 6A).

Figura 6

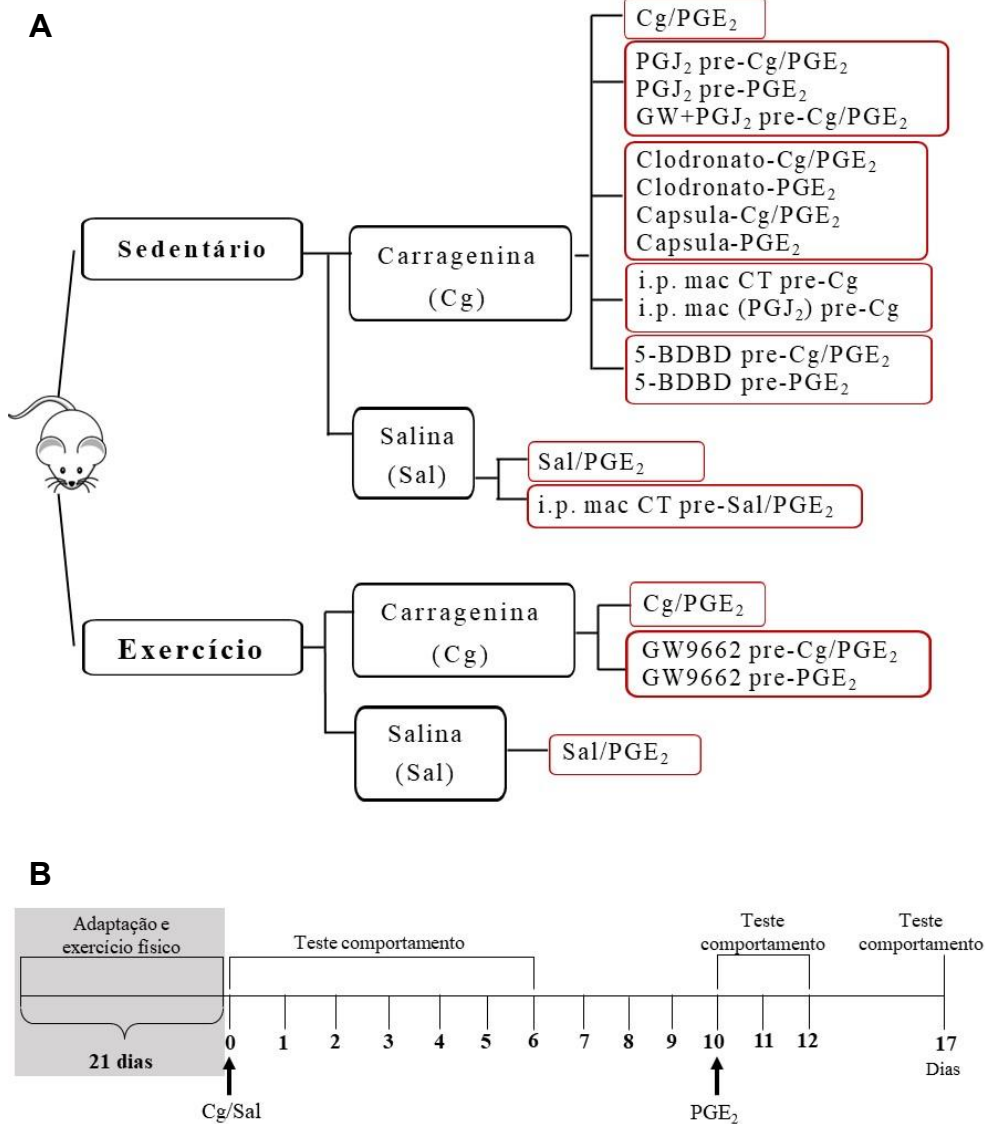


Figura 6 – Organização experimental. **A)** Fluxograma dos procedimentos e grupos experimentais comportamentais. Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos Sedentário e Exercitado, depois em dois subgrupos com injeções intramusculares de carragenina (Cg) ou salina (Sal) (caixas de linha preta). A partir disso, subgrupos foram submetidos à injeção intramuscular de prostaglandina E₂ (PGE₂) (Sal Sedentário, Cg Sedentário, Sal Exercitado e Cg Exercitado) ou a estratégias farmacológicas adicionais que foram administradas previamente a Cg/Sal ou PGE₂, (caixas de linha vermelha). Grupos experimentais finais são representados em caixas de linha vermelha. i.p. - intraperitoneal. **B)** Procedimentos experimentais no modelo de hiperalgesia muscular persistente. Carragenina (Cg) ou solução salina (Sal) foram administradas no músculo gastrocnêmio. O

teste comportamental foi aplicado do dia 0 ao 6 após a injeção. No 10º dia, PGE₂ foi administrado e o teste comportamental foi aplicado nos dias 10, 11, 12 e 17. Os procedimentos de exercício de natação (quadrado cinza) foram realizados antes das injeções de Cg/Sal, com intervalo de 48 horas antes do teste comportamental basal em dia 0. Figura: autoria própria.

4.1.2 O modelo de hiperalgesia muscular mecânica aguda e persistente

Neste estudo, usamos um modelo experimental de hiperalgesia muscular mecânica crônica (DINA; LEVINE; GREEN, 2008) padronizado em camundongos (JORGE et al., 2020). A hiperalgesia muscular aguda foi induzida por um processo inflamatório transiente através da injeção intramuscular de carragenina (100 µg/músculo) no ventre do músculo gastrocnêmio e 10 dias depois, quando o limiar nociceptivo retornou aos níveis basais, foi injetado o segundo estímulo inflamatório através da injeção de PGE₂ (1 µg/músculo) no mesmo local para desencadear uma hiperalgesia muscular de longa duração e mais intensa, referida como hiperalgesia muscular persistente. O limiar hiperalgésico muscular mecânico foi avaliado nos seguintes momentos: 1) antes da injeção muscular (basal); 2) após 1, 3 e 6 horas da injeção no dia 0; 3) diariamente até o 10º dia; 4) imediatamente antes da injeção de PGE₂ (10º dia); 5) após 1 e 4 horas da injeção de PGE₂ (10º dia); 6) nos dias 11, 12 e 17 (figura 6B).

Quando aplicável, o protocolo de exercício físico de natação foi realizado antes da primeira injeção e as estratégias farmacológicas referentes aos grupos de exercício foram realizadas antes da carragenina ou PGE₂ (figura 6B). Para investigar o mecanismo subjacente à indução de hiperalgesia muscular aguda e consequente hiperalgesia persistente, estratégias farmacológicas intramusculares foram administradas antes da carragenina. Para investigar se os mecanismos estavam apoiando a hiperalgesia muscular persistente, estratégias farmacológicas foram administradas antes da PGE₂. Nos grupos controle, foi administrado soro fisiológico isotônico (0,9% NaCl) em vez de carragenina.

4.1.3 Teste mecânico do limiar nociceptivo muscular e avaliação da hiperalgesia muscular

Para acessar a hiperalgesia muscular induzida por estímulos inflamatórios, avaliamos a mudança no limiar nociceptivo através da pressão mecânica, medida pelo analgesímetro Randall-Selitto (Insight, Brasil), o qual aplica uma pressão mecânica linear sobre músculo gastrocnêmio (figura 7). A ponta arredondada com 2 mm de diâmetro evoca o

limiar nociceptivo dos tecidos profundos (TAKAHASHI et al., 2005). O limiar nociceptivo expressa a média de três medidas realizadas em intervalos de 5 minutos (SANTOS et al., 2017). Os níveis basais foram medidos dois dias após o término do período de exercício físico ou equivalente ao grupo sedentário. A hiperalgesia muscular mecânica foi definida subtraindo a medida basal da medida realizada em cada tempo de interesse após as injeções de carragenina (ou solução salina) e PGE_2 , sendo apresentadas como a diferença entre esses valores (delta, em gramas). A hiperalgesia muscular mecânica é representada no eixo y por valores crescentes (SANTOS et al., 2017).

Figura 7

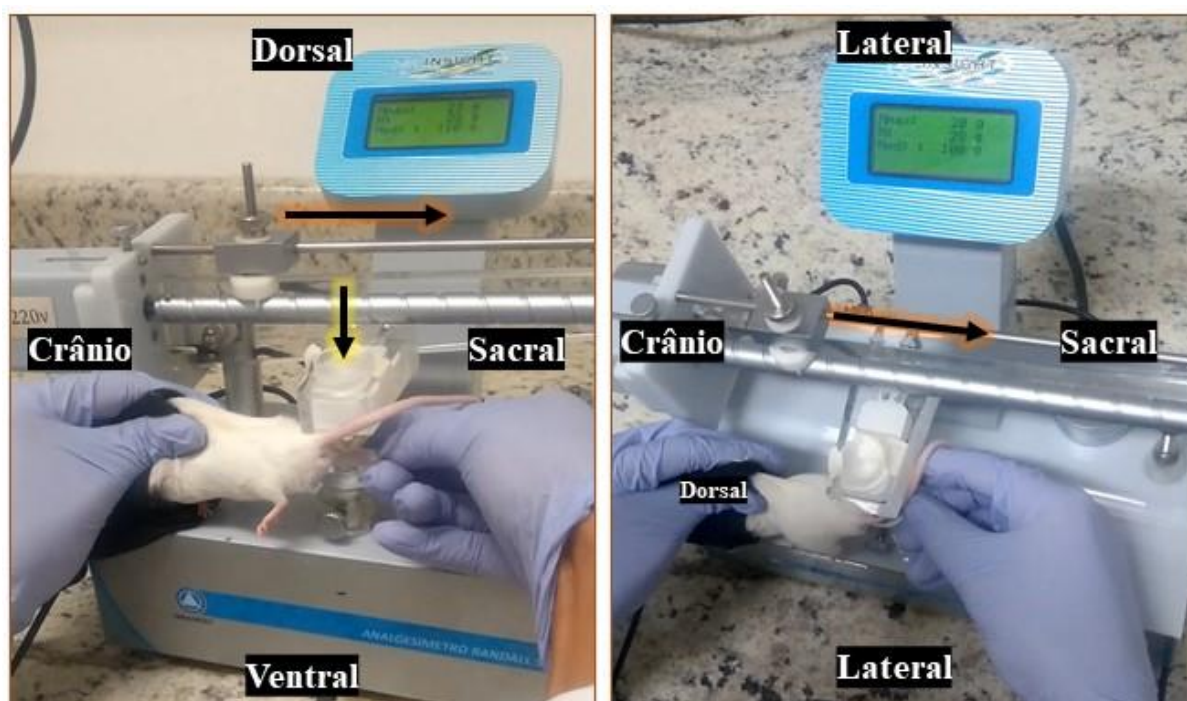


Figura 7 – Equipamento analgesímetro. Representação de posicionamento do animal durante o teste. A flecha destacada em laranja, indica a direção em que o peso movimenta no equipamento, aumentando a pressão sobre o músculo do animal (indicado pela flecha destacada em amarelo). Foto: acervo do grupo.

4.1.4 Injeções intramusculares, drogas e doses

As injeções intramusculares foram administradas no ventre do músculo gastrocnêmio direito com uma seringa Hamilton de 50 μL conectada a uma agulha de calibre 30. O volume final das injeções foi de 20 μL /músculo. As seguintes drogas foram usadas: λ -carragenina (100 μg /músculo; (DINA; LEVINE; GREEN, 2008)), prostaglandina E_2 (PGE_2 , 1

$\mu\text{g}/\text{músculo}$, (DINA; LEVINE; GREEN, 2008)), antagonista do receptor de $\text{PPAR}\gamma$, GW9662 (*2-cloro-5-nitro-N-fenilbenzamida*, 9 $\text{ng}/\text{músculo}$, (DE AZAMBUJA et al., 2020)), ligante endógeno de $\text{PPAR}\gamma$, 15d-PGJ2 (*15-Desoxi-delta(12,14)-prostaglandina J(2)*, 100 $\text{ng}/\text{músculo}$, (SANTOS et al., 2020)) e o antagonista seletivo de receptores P2X4, 5-BDBD (*5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-Benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-one*, 50 $\mu\text{M}/\text{músculo}$, (OLIVEIRA-FUSARO et al., 2020)) . Todas as drogas foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e dissolvidas em solução salina isotônica (0,9 %) para obter a solução de trabalho. A solução estoque de GW9662 e 5-BDBD foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO), e da PGE_2 em 10 % de etanol, de acordo com instruções do fabricante, depois ressuspensas em solução salina para reduzir a concentração de DMSO (máximo de 0,05%) e etanol (máximo de 1 %).

4.1.5 Protocolo de exercícios físico regular de natação

O exercício físico regular de natação foi realizado por 15 dias antes da injeção de carragenina, divididos em três blocos de 5 dias. Todos os procedimentos relacionados ao ambiente aquático foram realizados em tanques cilíndricos individuais com superfície lisa e 30 cm de profundidade (SCARIOT et al., 2016). A temperatura da água foi mantida a $31 \pm 1^\circ\text{C}$ (KREGEL et al., 2007). Para minimizar o estresse, 6 dias antes de iniciar o período de exercício de natação, os animais foram submetidos a um período de adaptação hídrica, com aumento progressivo da profundidade da água (KREGEL et al., 2007). Os animais permaneceram em repouso por 24 horas, antes do início do protocolo de exercício físico (figura 6B).

Tabela 1 – Protocolo de adaptação ao meio líquido

Dias	Nível água	Tempo
1	1 cm	5 minutos
2	1 cm	10 minutos
3	30 cm	5 minutos
4	30 cm	10 minutos
5	30 cm	15 minutos
6	30 cm	20 minutos

Os 15 dias dos programas de exercícios físicos foram divididos em três períodos de 5 dias consecutivos com dois dias de intervalo entre cada período. Dentro de um período de 5 dias, o exercício foi realizado em seções de 50 minutos por dia. Nos primeiros cinco dias, os animais realizaram sessões de natação com pausas passivas de 4 minutos. No segundo período de 5 dias foram utilizadas sessões de intervalo de 3 minutos de pausa, e no último período de 5 dias os animais nadaram 50 minutos sem pausas. Quando o comportamento de nado do animal se mostrou drasticamente alterado de um movimento contínuo para um movimento inadequado, como flutuar, “escalada”, mergulhar e nado sem direcionamento, o animal foi retirado da água.

Tabela 2 – Protocolo de exercício físico de natação em camundongos Swiss

	Dias	Sessão diária	Pausas (passivas; minutos)	Séries	Volume treino (minutos)	Total (minutos)
Etapas 1	1	5 x 10	10	5	50	90
	2	5 x 10	10	5	50	90
	3	3 x 10 / 1 x 20	10	4	50	80
	4	2 x 15 / 2 x 10	10	4	50	80
	5	2 x 15 / 2 x 10	10	4	50	80
Etapas 2	6	1 x 20 / 1 x 20 / 1 x 10	7	3	50	70
	7	1 x 20 / 1 x 20 / 1 x 10	7	3	50	70
	8	1 x 25 / 1 x 25	7	2	50	60
	9	1 x 25 / 1 x 25	7	2	50	60
	10	1 x 25 / 1 x 25	7	2	50	60
Etapas 3	11	1 x 30 / 1 x 20	4	2	50	60
	12	1 x 30 / 1 x 20	4	2	50	60
	13	1 x 40 / 1 x 10	4	2	50	60
	14	1 x 40 / 1 x 10	4	2	50	60
	15	1 x 40 / 1 x 10	4	2	50	60
Etapas 4	16	1 x 50	0	1	50	50
	17	1 x 50	0	1	50	50
	18	1 x 50	0	1	50	50
	19	1 x 50	0	1	50	50
	20	1 x 50	0	1	50	50

4.1.6 Análise dos níveis séricos de corticosterona como medida de estresse

O hormônio corticosterona de animais fisicamente exercitados e controles foram quantificados a partir de amostras de soro sanguíneo. Os animais foram aclimatados em uma sala silenciosa por uma hora antes da coleta de sangue e não foram anestesiados ou contidos durante a coleta de sangue. Um pequeno furo foi feito na veia caudal do animal e aproximadamente 25 μ L de sangue foram coletados utilizando capilares de vidro sem heparina e alocados em um tubo tipo Eppendorf. Após 30 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C até a análise. As coletas de sangue foram realizadas em cinco períodos distintos: basal (24 horas antes do início do protocolo de adaptação), 24 horas após o término do período de adaptação hídrica e 24 horas após o término de cada um dos três períodos de 5 dias de exercício. Os níveis de corticosterona foram medidos pelo teste *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) usando um kit DetectX (Arbor Assays) de acordo com as instruções do fabricante.

4.1.7 Depleção de macrófagos com clodronato encapsulado em lipossomas

Para determinar se os macrófagos contribuem para o desenvolvimento de hiperalgesia muscular aguda e persistente, depletamos os macrófagos locais aplicando clodronato encapsulado por lipossoma no músculo gastrocnêmio (duas injeções de 5 mg/mL; Clodrosome[®], Encapsula Nano Sciences LLC, EUA) conforme previamente estabelecido por (GONG et al., 2016). Para avaliar o envolvimento de macrófagos locais na hiperalgesia muscular aguda, foi realizada uma primeira injeção 48 horas antes da carragenina e uma segunda 24 horas depois. Para avaliar o envolvimento de macrófagos locais na hiperalgesia muscular persistente, uma primeira injeção foi realizada 48 horas antes da PGE₂ e uma segunda 24 horas depois. Para os grupos controle, foram utilizadas injeções com lipossomas inativos contendo PBS (*Liposome* – Encapsome da Encapsula Nano Sciences LLC, EUA).

Para confirmar a depleção de macrófagos locais, os tecidos musculares foram coletados no dia 2 do modelo de hiperalgesia muscular persistente e analisados por imunofluorescência após marcação da proteína F4/80 (figura 8A). A análise de imunofluorescência confirmou que o grupo Clodronato Cg reduziu as células com expressão do marcador de macrófagos, F4/80, quando comparado ao grupo Sedentário Cg (figura 8A e 8B, $p = 0,0459$).

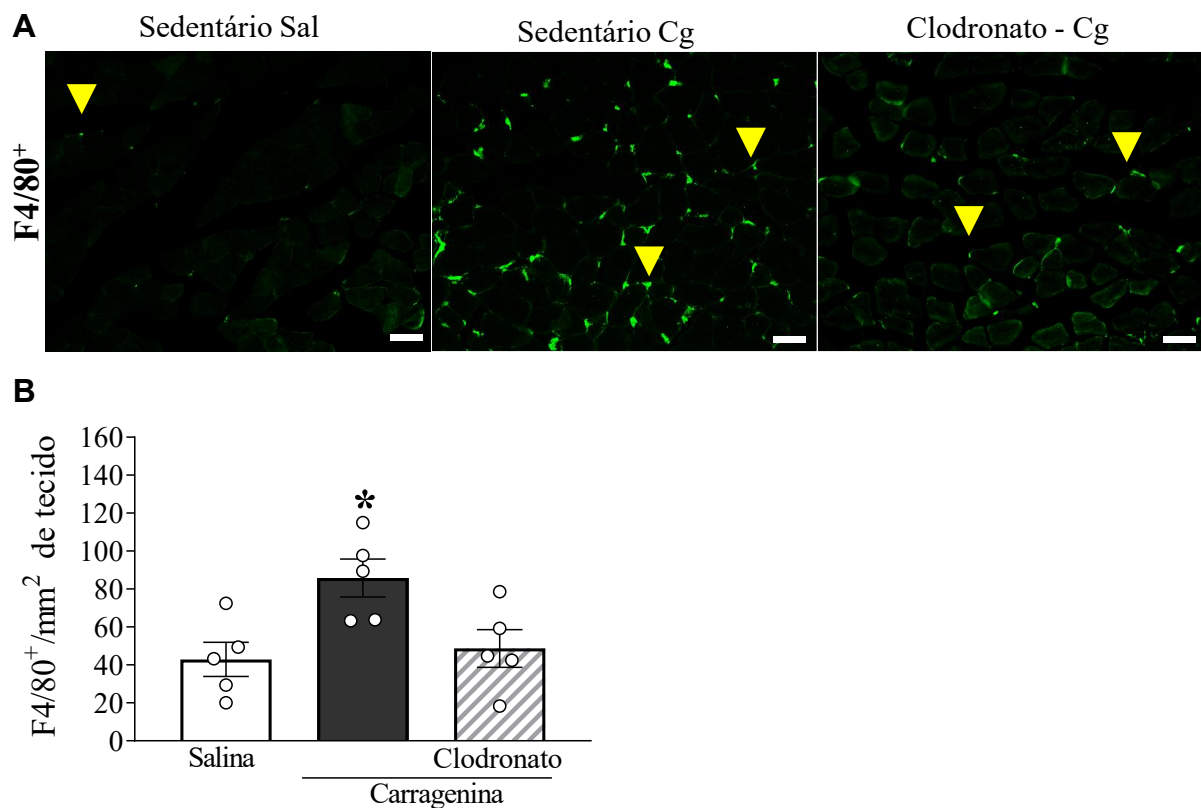
Figura 8

Figura 8 – Clodronato encapsulado induz a depleção de macrófagos no tecido muscular. **A)** Imunofluorescência da depleção do macrófago com tratamento com Clodronato encapsulado. **A)** Imagens representativas do marcador F4/80 (F4/80⁺, verde) indicando macrófagos no músculo gastrocnêmio, 48h após a injeção de soro fisiológico (Sedentário Sal), carragenina (Sedentário Cg) ou Clodronato – Cg. As setas amarelas destacam as células F4/80⁺. Barra de escala = 100 μ m. **B)** Gráficos de barras mostrando a análise das células F4/80⁺ indicam que o Cg Sedentário possui o maior número de células quando comparado aos grupos Sal Sedentário e Clodronato – Cg (símbolo “*”; ANOVA *One-way*, Tukey *post-hoc*, $F(2, 12) = 5.809$). $N = 5$ /grupo.

4.1.8 Procedimento com cultura primária de macrófagos peritoneais

Macrófagos intraperitoneais foram utilizados para investigar o envolvimento de células polarizadas para um fenótipo anti-inflamatório, na prevenção da hiperalgesia muscular (células tratadas, ressuspensas e injetadas no músculo de camundongos), ou também para avaliar o envolvimento dos receptores P2X4 na indução de fenótipo inflamatório (células tratadas e lisadas para análise proteica). Tanto para injeções intramusculares, quanto para análises proteicas por imunofluorescência, a cultura primária de macrófagos peritoneais foi realizada utilizando camundongos Swiss machos.

Os animais foram anestesiados com isoflurano 5% e, em seguida, eutanasiados com sobredosagem do mesmo. Em seguida, 5 mL de PBS-EDTA (5 mM) foram injetados na cavidade peritoneal e o abdome foi massageado por um minuto. A solução de PBS-EDTA contendo células foi coletada da cavidade peritoneal com a mesma seringa e transferida para um tubo estéril que foi centrifugado ($300 \times g/3$ minutos/ 4°C). O sobrenadante foi removido e as células restantes foram lavadas com PBS novamente por ressuspensão em PBS (5 mL) seguida de centrifugação. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de cRPMI (RPMI-1640 com L-glutamina 0,3 g/L, 100 U/mL de penicilina e estreptomicina, aminoácido [100 $\times$], 1 U/mL de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino [SFB]; Merck, Darmstadt, Alemanha). As células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços (1×10^6 células/poço) e incubadas por 24 horas (37°C , 5% CO_2). Depois, as células não aderentes foram lavadas com PBS. Os macrófagos que seriam utilizados para injeção intramuscular, foram tratados com 15d-PGJ₂ (1 μM) por 24 horas (PBS foi usado para poços com células controle). Após, as células foram ressuspensas usando PBS-EDTA (10 mM) e força mecânica, colocadas em tubos e centrifugadas ($600 \times g$ por 5 minutos).

Em diferentes animais, a injeção de $1,5 \times 10^4$ e 3×10^4 células/mL antes da carragenina não alterou a hiperalgesia muscular mecânica aguda e persistente no grupo Sedentário Cg (figura 9, $p = 0,5250$). A injeção de 6×10^4 células/mL antes da carragenina, induziu hiperalgesia muscular aguda mais longa (de 1 hora no dia 1, até o dia 5) em comparação com o grupo Sedentário Cg (figura 9, $p < 0,0001$). Também testamos duas doses de 15d-PGJ₂ *in vitro* (1 e 10 μM). A concentração de 10 μM , mas não de 1 μM , foi tóxica para macrófagos em cultura (dados não mostrados). As células foram ressuspensas novamente em PBS a uma concentração de 3×10^4 (concentração previamente padronizada, figura 9). Células tratadas e controles foram injetadas no músculo gastrocnêmio (20 μL /músculo) 15 minutos antes da injeção de carragenina (100 μg /músculo) e a hiperalgesia mecânica do músculo quantificada conforme descrito anteriormente.

Figura 9

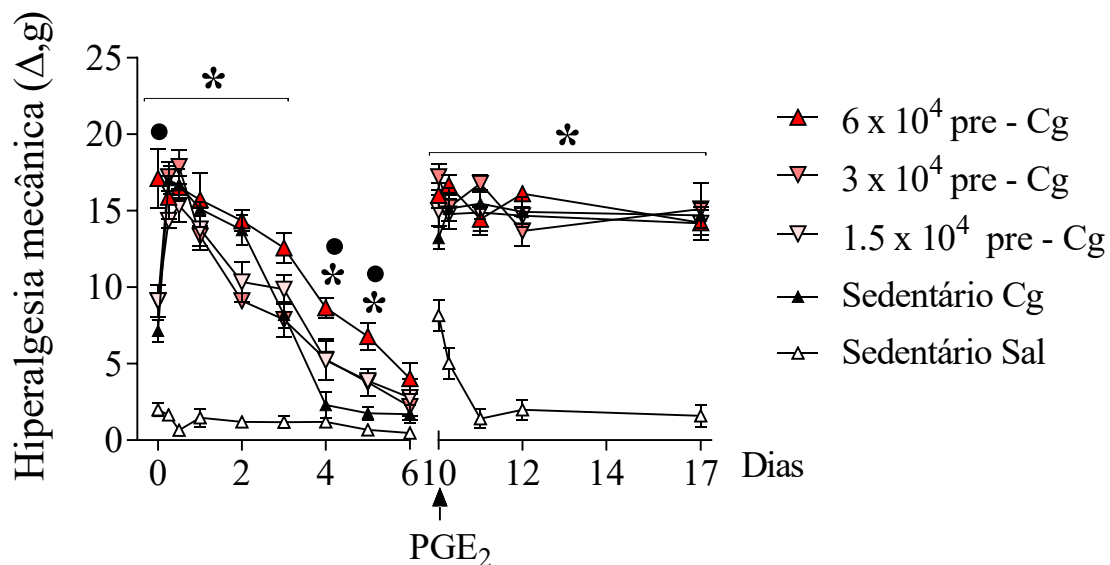


Figura 9 - Controle dos efeitos da injeção de macrófagos peritoneais na hiperalgesia mecânica aguda e persistente. Gráfico de linha do tempo mostrando o desenvolvimento da hiperalgesia muscular aguda após carragenina (Cg) e hiperalgesia muscular persistente após PGE_2 em solução salina (Sedentário Sal), sedentário (Sedentário Cg), macrófagos peritoneais controle injetados na concentração de $1,5 \times 10^4$, 3×10^4 e 6×10^4 antes do Cg. 6×10^4 pré - Cg aumentou significativamente a hiperalgesia muscular em mais pontos de tempo (ANOVA de duas vias, Tukey post hoc, $F(39, 196) = 2.195$). O símbolo “*” indica diferença para o grupo Sedentário Sal e “●” indica diferença para o grupo Sedentário Cg. $N = 5$ para cada grupo - i.p. grupos Mac e Sal Sedentário; $N = 9$ para grupos sedentários.

Além da injeção de intramuscular, as células também foram utilizadas para verificar expressão de proteínas de interesse. Macrófagos peritoneais foram tratados e analisados por imunofluorescência qualitativa e quantitativa para avaliar se a 15d-PGJ₂ ou o 5-BDBD, respectivamente, induziram a polarização nos macrófagos peritoneais. Para isso, as células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços com uma lamínula de vidro e tratadas com 15d-PGJ₂ (1 μ M) por 24 horas ou 5-BDBD (2 μ M) por 6 horas. As células controles foram incubadas ao mesmo tempo apenas com cRPMI e PBS. Os poços foram lavados com PBS e as células fixadas com paraformaldeído a 4% (4% PFA), bloqueadas com albumina de soro bovino a 3% (3% BSA) e incubadas durante a noite com anticorpos primários: *rat anti-mouse* F4/80 (1:1000; BioRad) e *mouse anti-mouse* CD206 (1:50; Abcam). Os anticorpos secundários foram *donkey Alexa Fluor 488 anti-rat* (1:250, Jackson ImmunoResearch) e *goat*

Dylight 405 *anti-mouse* (1:250, Jackson ImmunoResearch). As lâminas negativas foram incubadas apenas com anticorpos secundários, permitindo a detecção de fluorescência inespecífica. As imagens foram obtidas através de um microscópio de fluorescência (Leica, MDI6000b) com uma lente objetiva $\times 40$ e processadas com ImageJ (NIH). Na análise quantitativa de células tratadas com 5-BDBD, as células co-marcadas foram contadas manualmente por mais de um pesquisador, todos cegos para os grupos experimentais.

4.1.9 Procedimentos com cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7

Para investigar o envolvimento dos receptores P2X4 na ativação inflamatória de macrófagos, nós testamos a ativação da via de sinalização do receptor, a fosforilação de p38 MAPK. Nesse caso, a linhagem de macrófagos murino RAW 264.7, foram cultivados em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com 10% de SFB inativado por calor e 100 U/mL de penicilina e estreptomicina (Gibco). Em todos os experimentos envolvendo linhagem, o *n* amostral representado nos grupos de análise, são compostos por, pelo menos, três passagens (repiques) diferentes das células.

A fim de verificar a relação entre polarização de macrófago e expressão de P2X4, as células RAW 264.7 foram submetidas à tratamentos em placas de 12 poços e usadas para análise de genes marcadores de polarização e P2X4. O RNA total foi isolado de cultura de células usando TRI *reagent*[®] (Sigma-Aldrich) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e a concentração do RNA foram quantificadas por NanoDrop (Thermo Scientific). Um total de 1 mg de RNA foi considerado para tratamento com *Amplification Grade DNase I* (Thermo Scientific). Foi usado 500 ng de RNA tratado com DNase para a preparação de fitas de DNA complementar (cDNA) com o Kit de transcrição reversa de cDNA *High capacity* (Applied Biosystems). A reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real foi realizada com a Master Mix para PCR, SYBR[®] Green (Applied Biosystems), e a expressão gênica relativa foi calculada usando o método delta-delta Ct, normalizado para a expressão gênica de *TATA-binding protein (Tbp)* (CORREIA et al., 2021). O ensaio foi realizado nos sistemas de PCR em tempo real ViiA7 e Quant Studio 6 (Applied Biosystems). A expressão gênica representada nos gráficos é o aumento em relação à amostra controle do experimento. As sequências das sequências-guia utilizados estão descritas na tabela 3.

Table 3 – Sequências-guia utilizadas para a análise de expressão gênica por PCR quantitativa

Proteína	Gene	Sequência 5'	Sequência 3'
CD86	<i>Cd86</i>	AACTTACGGAAGCACCCACG	CGTCTCCACGGAAACAGCAT
Argenina 1	<i>Arg1</i>	CTTGCGAGACGTAGACCCTG	TCCATCACCTTGCCAATCCC
IL-1 β	<i>Il1b</i>	GAA ATG CCA CCT TTT GAC AGT G	TGG ATG CTC TCA TCA GGA CAG
P2X4	<i>P2rx4</i>	TCATCCGCAGCCGTAAAGTG	ACACGAACACCCACCCAATG
TATA <i>Binding protein</i>	<i>Tbp</i>	ACC CTT CAC CAA TGA CTC CTA TG	TGA CTG CAG CAA ATC GCT TGG

Para análise de proteínas, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços e após 24 horas, tratadas com carragenina (100 μ g/mL) por 30 minutos (tempo previamente padronizado). Para investigar o envolvimento dos receptores P2X4, o antagonista 5-BDBD foi adicionado na cultura 30 minutos antes da carragenina. As células foram lisadas e a proteína extraída com o uso de um tampão de lise (2% SDS, 10% glicerol, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 $\times$ inibidor de protease e fosfatase). Os lisados foram cuidadosamente transferidos para um tubo e homogeneizados por sonicator. A proteína total foi quantificada usando o kit Pierce BCA *protein Assay* (Thermo Fisher) seguindo as instruções do fabricante, em diluições iniciais de 1:5.

Os lisados de proteína foram separados em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%) e transferidos por 1 hora para uma membrana de nitrocelulose em um tampão gelado de metanol a 20%. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado, ou 5% de albumina bovina (BSA) para proteínas fosforiladas, em solução salina tamponada com Tris e 0,1% de Tween-20[®], e incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpos contra p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling), p-p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling), e beta tubulina (1:1000, Cell Signaling). Após a lavagem, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora com seus respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (HRP) e os *blots* foram visualizados por quimiluminescência aprimorada em um ChemiDoc *Imaging System* (Bio-Rad).

4.1.10 Imunofluorescência do tecido muscular

Nos dias 1, 2, 3 e 11 os camundongos de diferentes grupos foram profundamente anestesiados e perfundidos com PBS (pH 7,4; 50 mL), 4% de paraformaldeído (4% PFA; 100-150 mL) e 10% de sacarose (100-150 mL). Os músculos gastrocnêmios injetados (direitos) foram removidos, alocados em microtubos para procedimento de desidratação, envolvidos em meio de inclusão para tecidos congelados (O.C.T., Tissue Tek) e posteriormente congelados por 15 segundos com metilbutano gelado em nitrogênio líquido. Usando um criostato da marca Leica *Cryocut* 1800, a -20 °C, as lâminas de microscópio foram preparadas com três corte de músculo de 12 µm, separadas por 300 µm. A cada animal do grupo, um total de nove cortes de tecido muscular foram fixadas com 4% de PFA, lavadas com PBS-TG (0,05% Tween-20® e 0,1 µM de glicina), incubadas com 5% de soro de cabra (5% NGS) por 1 hora, anticorpos primários durante a noite e anticorpos secundários por 1 hora (LEUNG et al., 2015). *ProLong™ Gold Antifade Mountant* sem marcador nuclear (Invitrogen, P36930) ou *VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium* com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) foram usados para vedar as lâminas com lamínulas de vidro com espessura de 0,13-0,16 mm e foram armazenadas a 4 °C até a análise em microscópio.

Os macrófagos foram marcados no tecido muscular pelo anticorpo primário de *rat anti-mouse* F4/80 (1:1000; BioRad) e anticorpo secundário de *donkey anti-rat* Alexa Fluor® 488 (1:250, Jackson ImmunoResearch). Para diferenciar os fenótipos de macrófagos inflamatórios e anti-inflamatórios, as proteínas integrinas CD11c e CD206, respectivamente, foram co-marcadas com F4/80. Para a marcação de CD11c, o anticorpo primário de *Armenian hamster anti-mouse* CD11c (1:50; Biolegend) e o anticorpo secundário de *goat anti-armenian hamster* Alexa Fluor® 594 (1:250, Jackson ImmunoResearch) foram usados. Para a marcação de CD206, foram utilizados anticorpo primário *mouse anti-mouse* CD206 (1:50; Abcam) e anticorpo secundário de *goat anti-mouse* Dylight® 405 (1:250, Jackson ImmunoResearch). A co-marcação dessas proteínas é apresentada no texto como fenótipo “M1” (F4/80⁺-CD11c⁺) e fenótipo “M2” (F4/80⁺-CD206⁺). Para identificar a localização do PPARγ no ambiente do tecido muscular, anticorpo primário de *rabbit anti-mouse* PPARγ (1:400, Cell Signaling) e anticorpo secundário *goat anti-rabbit* Alexa Fluor® 594 (1:250; Jackson ImmunoResearch) foram co-marcados com a proteína F4/80. Para identificar a localização dos receptores P2X4 no ambiente do tecido muscular, o anticorpo *rabbit anti-mouse* P2X4 (1:100; Alomone) e o anticorpo secundário *goat anti-rabbit* Alexa Fluor® 594 (1:250; Jackson ImmunoResearch) foram co-marcados com a proteína F4/80. Os núcleos foram corados com DAPI de fluorescência azul. No total, 36 imagens foram obtidas de maneira randômica de cada amostra

de um animal, para análises quantitativas. As imagens foram capturadas usando um microscópio de fluorescência (Leica, MDI6000b) com uma lente objetiva $\times 20$ e processadas com ImageJ (NIH). As células foram contadas manualmente por mais de um pesquisador, todos cegos para os grupos experimentais.

4.1.11 Análise da expressão de citocinas do tecido muscular

Nos dias 1, 2, 3 e 11 os camundongos foram eutanasiados, o músculo gastrocnêmio injetado (direito) foi extraído e alocado em microtubos, e imerso em nitrogênio líquido até o armazenamento a -80°C . O peso do músculo foi ajustado para ser semelhante entre todas as amostras. As amostras foram homogeneizadas com duas rodadas de impacto mecânico utilizando um *beadruptor* (7 esferas/tubo, 40 segundos, alta intensidade) e depois duas rodadas com um homogeneizador ultrassônico (amplitude de 10%, 10 segundos). Para tanto, cada amostra recebeu 750 μL de tampão de lise contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS), 0,05% Tween-20[®] e coquetel de inibidor de protease (1 $\times$; Roche, Suíça, número de catálogo: 11697498001). Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 min a 4°C (DE MELO AQUINO et al., 2019). O sobrenadante com a diluição de 1:20 foi usado para medir a concentração de proteína total por Bradford (Sigma-Aldrich, número de catálogo: B6916).

As citocinas interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 10 (IL-10) foram quantificadas por kits ELISA (números de catálogos: 431414/430904/432604, respectivamente, Biolegend) de acordo com as instruções do fabricante. Para medições ótimas de citocinas, diferentes diluições de amostra foram testadas para cada citocina em cada grupo, antes de realizar o ensaio final. Os ensaios foram separados pelo tempo de extração (1, 2, 3 e 11 dias), com amostras duplicadas e realizados com todos os grupos comparáveis ao mesmo tempo para garantir a comparação nas mesmas condições de teste. A concentração final de citocina é apresentada como pg/mg de proteína total.

4.1.12 Análise da expressão de proteínas do tecido muscular

Nos dias 0 (6h), 1 e os camundongos foram eutanasiados, o músculo gastrocnêmio injetado (direito) foi extraído e alocado em microtubos, e imerso em nitrogênio líquido até o armazenamento a -80°C . O peso do músculo foi ajustado para ser semelhante entre todas as amostras. As amostras foram homogeneizadas com o *beadruptor* e sonificador como descrito anteriormente, com 1mL de tampão de lise gelado (JORGE et al., 2020). A proteína total foi

quantificada usando o kit Pierce BCA *protein Assay* (Thermo Fisher) seguindo as instruções do fabricante, em diluições iniciais de 1:20.

Em gel de SDS-poliacrilamida (12%), os lisados de proteína foram separados por eletroforese e transferidos para uma membrana de nitrocelulose em um tampão gelado de metanol a 20%, por 1 hora. O bloqueio foi feito com 5% de leite desnatado ou 5% de albumina bovina (BSA) para proteínas fosforiladas, em solução salina tamponada com Tris e 0,1% de Tween-20®, e incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpos contra p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling) e p-p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling). Após a lavagem, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora com seus respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (HRP) e os *blots* foram visualizados por quimiluminescência aprimorada em um ChemiDoc *Imaging System* (Bio-Rad).

4.2 Materiais e métodos do Estudo 2

4.2.1 Cuidado com animais

Os camundongos os camundongos transgênicos MCK-PGC-1 α 1 e selvagens da mesma prole (*background* C57bl/6J) foram alojados aleatoriamente em grupos (3-5 camundongos por gaiola) em um ciclo claro/escuro de 12h, a 22 $\pm$ 1 °C, com livre acesso à água e dieta padrão para roedores. Camundongos machos com 8 a 10 semanas de idade foram utilizados em todos os experimentos. O estado de saúde dos animais foi monitorado seguindo as diretrizes internas, que incluíam pesagem antes e depois de cada procedimento experimental. Todos os camundongos transgênicos MCK - PGC-1 α 1 e selvagens foram gerados a partir de acasalamento no biotério do Instituto Karolinska (*Comparative Medicine Biomedicum* - KM-B). Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê regional de ética animal do norte de Estocolmo, Suécia (4359-2020). Camundongos transgênicos e de tipo selvagem foram divididos aleatoriamente nos grupos de injeção. Grupos experimentais foram acessados ao mesmo tempo, e testes de comportamento foram realizados com o experimentador cego ao genótipo.

Para confirmar o fenótipo dos camundongos transgênicos, foi realizado um teste de esteira de “corrida até a exaustão”. Para este fim, camundongos MCK-PGC-1 α 1 de 8 semanas de idade e selvagens da mesma prole na mesma idade foram gradualmente aclimatados à esteira (Columbus Instruments, OH, EUA) por quatro dias consecutivos antes

do teste de desempenho. Para a avaliação do desempenho de corrida, os camundongos foram aquecidos por 5 min a 10 m/min. Em seguida, a velocidade da esteira foi aumentada em 3 m/min a cada 1,5 minutos até a exaustão. Os camundongos foram encorajados a continuar correndo por toques suaves e foram considerados exaustos quando não conseguiam mais continuar correndo, mesmo com estímulo (CALVO et al., 2008). A inclinação da esteira foi ajustada em 15 graus para as sessões de aclimação e teste. Foi dada uma semana de descanso para que os animais pudessem se recuperar antes de novos experimentos.

4.2.2 Drogas, injeções e extração de amostras para análises biomoleculares

Vinte a 30 minutos antes do procedimento, os camundongos receberam uma injeção subcutânea de buprenorfina (0,05 – 0,1 mg/kg). Após isso, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de oxigênio e isoflurano (5% de indução e 3% para manutenção) e mantidos sobre placa aquecida a 37 °C. Ambas as patas esquerda e direita foram tricotomizadas e limpas com etanol 70%. Utilizando uma agulha de calibre 30, foi feita uma única injeção intramuscular no músculo gastrocnêmio, paralelamente à orientação das fibras. No músculo direito (ipsilateral) foi realizada uma injeção de 50 µL de cardiotoxina (CTX, 10 µM, diluída em PBS estéril, (DINULOVIC et al., 2016)), enquanto no esquerdo (contralateral) o mesmo camundongo recebeu injeção do veículo-controle (PBS) no mesmo volume.

Grupos de camundongos transgênicos e selvagens da mesma prole foram acompanhados com testes de comportamento até o dia 12 após a injeção. Grupos específicos foram sacrificados no dia 1, 3, 7 e 14 após as injeções. O músculo gastrocnêmio ipsilateral e contralateral foram extraídos assepticamente, colocados em um tubo de micro centrífuga e congelado em nitrogênio líquido para a subsequente extração de RNA e proteína.

4.2.3 Testes de força e resistência muscular

A força muscular foi avaliada com um medidor de força de preensão (Bioseb) nos períodos: basal (dia 0), e dias 1, 5 e 12 após as injeções de CTX e PBS. E com o teste de suspensão por quatro patas na grade, nos dias 0, 5 e 12. Para força de preensão, MCK-PGC-

1 α 1 e selvagens da mesma prole na mesma idade, foram segurados pela cauda e permitidos segurar na grade do aparelho com as patas dianteiras e traseiras, e gentilmente puxados paralelamente à grade até que se soltassem. A força máxima foi medida em triplicata e a média foi considerada (CORREIA et al., 2021).

Para o teste de suspensão por quatro patas na grade, foi utilizado um aparelho de grade, com 30 centímetros de altura. Os animais foram colocados com os quatro membros na grade como a posição inicial. Uma vez que o animal estava confortável, a grade foi gentilmente virada de cabeça para baixo, acima de uma gaiola cheia de maravalha, e um cronômetro foi iniciado. Um mínimo de 10 segundos e um máximo de 10 minutos foi considerado como tempo aceito. O tempo máximo de suspensão foi realizado em triplicata e o maior número foi considerado para análise posterior (GUARDIOLA et al., 2017).

4.2.4 Teste de coordenação motora

O teste Rotarod realizado em uma haste rotativa (Ugo Basile) foi usado para acessar a coordenação motora basal (dia 0), seguido de duas avaliações, primeiro nos dias 2, 3 e 4; e segundo nos dias 9, 10 e 12, após injeção de cardiotoxina em camundongos MCK-PGC-1 α 1 e do tipo selvagem. A rotação da haste foi aumentada em 1 rpm a cada 8,3 segundos, resultando em uma aceleração de 4 a 40 rpm ao longo de 5 minutos, até que o último camundongo caia. Os camundongos foram testados em 3 tentativas (com intervalo de 15 minutos) em um dia, por 3 dias consecutivos, e a maior duração por dia foi considerada para a média de 3 dias, representada no gráfico (CORREIA et al., 2021).

4.2.5 Análise da marcha de caminhada forçada em esteira

Para analisar os parâmetros da marcha forçada, foi utilizada a esteira DigiGait (Mouse Specifics, Inc.). Animais MCK-PGC-1 α 1 e selvagens da mesma prole foram avaliados nos tempos basal e dias 1, 3, 9 e 12 após as injeções, seguindo os protocolos do fabricante. Antes da medida basal, os camundongos foram familiarizados à esteira enquanto o *software* foi configurado e o campo de visão da câmera foi ajustado. Inicialmente, a esteira foi ligada à 10 cm/s até que o animal se ajustasse à essa velocidade. Gradualmente a velocidade da esteira foi aumentada até a velocidade de teste de 20 cm/s, na qual a gravação dos *frames* foi iniciada. Um vídeo de 3 a 5 segundos com passadas constantes foi gravado para análise

posterior. Caso os animais se recusassem a correr, a direção da esteira poderia ser invertida, ou o animal era incentivado com leve toque de pás contidas no equipamento (XU et al., 2019). Todas as avaliações foram feitas por um investigador cego para o grupo.

Os vídeos foram analisados com o software de análise DigiGait® (Mouse Specifics, Inc.), seguindo as orientações do fabricante. Os parâmetros da marcha foram avaliados para todos os quatro membros. Todos os dados registrados para os animais nos períodos avaliados foram compilados em uma única tabela, para facilitar a visualização dos dados brutos e a análise estatística. Os parâmetros de interesse relacionados com o modelo de lesão muscular incluíram: fase de balanço (tempo sem contato da pata com a esteira), duração da passada (tempo de uma passada completa para uma pata), frequência da passada (número de vezes por segundo que uma pata leva para completar uma passada), duração do apoio (tempo de contato da pata na esteira; sendo a soma da duração da frenagem e da propulsão), duração da frenagem (a parte inicial da fase de apoio, relacionada com a desaceleração do movimento), duração da propulsão (a parte final da fase de apoio, relacionada com a aceleração do movimento), ângulo da pata (ângulo que a pata faz em relação ao longo eixo da direção do movimento do animal), entre muitos outros. Os parâmetros de tempo são medidos em segundos e foram normalizados pela frequência de passada (exemplo, % Frenagem/passada). Os parâmetros de dimensão são medidos em centímetros e foram normalizados pelo comprimento do animal.

4.2.6 Cultura de células e tratamentos

Mioblastos primários de camundongo foram isolados do músculo esquelético dos membros posteriores de camundongos C57bl/6J machos com 9-10 dias de idade. Os músculos extraídos foram processados com lâmina e tesoura estéreis e digeridos com 2,4 U/mL de dispase (grau II, Roche), solução de CaCl₂ 2,5 mM e 1% de colagenase B (Roche), a 37 °C por 30 minutos. O homogenato foi pipetado ‘‘up-and-down’’ durante a incubação para facilitar a digestão e, em seguida, filtrado com um filtro de células de 70 µm. O filtrado foi centrifugado e re-suspenso em Ham's F-10 *Nutrient Mix* (Gibco) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich), 2,5 mg/mL de fungizona (Thermo-Fisher Scientific), 5 mg/mL de plasmocina (Invivogen), 2,5 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos básico (Thermo-Fisher Scientific) e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco). A fungizona e a plasmocina foram mantidas nas primeiras duas semanas. Para eliminar a contaminação de

fibroblastos, uma etapa de pré-plaqueamento por 20 minutos foi realizada em cada passagem em placas de cultura de células regulares, depois as células foram transferidas para placas de cultura de células revestidas com colágeno V. Os mioblastos foram expandidos em baixa confluência (máximo de 70%) em meio de crescimento, uma mistura 1:1 de DMEM e Ham's F10 Nutrient Mix, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2,5 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos básico e 100 U/mL penicilina/estreptomicina. Para os experimentos, os mioblastos foram plaqueados em alta confluência (90%) com meio de crescimento, em placas revestidas de colágeno, mantidas por 12 – 24 horas e então o meio foi alterado para meio de diferenciação (DMEM suplementado com 5% de soro de cavalo e 100 U/mL penicilina-estreptomicina) (CORREIA et al., 2021). Os miotubos foram mantidos até no máximo o dia 3 e os tratamentos foram feitos no dia 2.

A solução estoque de TNF- α recombinante (rTNF- α ; R&D Systems) foi diluída a 1 mg/mL em PBS estéril contendo 0,1% de albumina de soro bovino (Sigma Aldrich), dividida em alíquotas e armazenada a -70°C . As diluições de trabalho foram feitas diretamente em meio de cultura (50 e 100 ng/mL). A linhagem de macrófagos murino RAW 264.7, foram usadas como controle para a inflamação, e foram cultivados em DMEM, suplementado com 10% de SFB inativado por calor, e 100 U/mL de penicilina e estreptomicina (Gibco). A linhagem de mioblastos murinos C2C12, foram inicialmente testadas, cultivadas com DMEM de crescimento (20% de SFB e 100 U/mL de penicilina e estreptomicina (Gibco)) e diferenciadas em miotubos usando DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo e 100 U/mL de penicilina e estreptomicina (Gibco). Para experimentos envolvendo análise de proteínas, os tratamentos foram mantidos por um período de 5 a 60 minutos, dependendo do objetivo. Para todos os experimentos envolvendo análise de expressão gênica, os tratamentos foram mantidos no meio de cultura por 3 horas.

4.2.7 Expressão mediada por adenovírus

Para induzir a super-expressão de PGC-1 α 1, mioblastos primários foram incubados durante a noite com adenovírus contendo o gene PGC-1 α 1 ou construtos de do gene repórter GFP, e re-plaqueados em placas experimentais sob 90% de confluência para iniciar a diferenciação após 12 horas. Os adenovírus que expressam PGC-1 α 1 ou GFP foram gerados conforme descrito anteriormente (RUAS et al., 2012). A titulação viral para os

adenovírus PGC-1 α 1 e GFP foram medidos em células HEK-293T como sendo $4,87 \times 10^{10}$ pfu/mL e $1,13 \times 10^{10}$ pfu/mL, respectivamente. Um MOI de 200 foi usado para transduzir mioblastos durante a noite.

4.2.8 Análise da expressão gênica

O RNA total foi isolado de cultura de células e tecido congelado usando TRI reagent[®] (Sigma-Aldrich) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e a concentração do RNA foram quantificadas por NanoDrop (Thermo Scientific). Um total de 1 mg de RNA foi considerado para tratamento com *Amplification Grade DNase I* (Thermo Scientific). 500 ng de RNA tratado com DNase foi usado para a preparação de fitas de DNA complementar (cDNA) com o Kit de transcrição reversa de cDNA *High capacity* (Applied Biosystems). A reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real foi realizada com a Master Mix para PCR, SYBR Green (Applied Biosystems), e a expressão gênica relativa foi calculada usando o método delta-delta Ct, normalizado para a expressão gênica da proteína de ligação TATA (*Tbp*) (CORREIA et al., 2021). O ensaio foi realizado nos sistemas de PCR em tempo real ViiA7 e Quant Studio 6 (Applied Biosystems). As sequências dos guias utilizados estão descritas na tabela 4. O ensaio foi realizado nos sistemas de PCR em tempo real ViiA7 e Quant Studio 6 (Applied Biosystems). A expressão gênica representada nos gráficos é o aumento em relação à amostra controle do experimento.

Table 4 – Sequências-guia utilizadas para a análise de expressão gênica por PCR quantitativa

Proteína	Gene	Sequência 5'	Sequência 3'
TNF- α	<i>Tnf</i>	CAG GCG GTG CCT ATG TCT C	CGA TCA CCC CGA AGT TCA GTA G
IL-6	<i>Il6</i>	TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC	TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC
CCL2	<i>Ccl2</i>	TTA AAA ACC TGG ATC GGA ACC AA	GCA TTA GCT TCA GAT TTA CGG GT
IKK β	<i>Ikkb</i>	AAG TAC ACC GTG ACC GTT GAC	GCT GCC AGT TAG GGA GGA A
PGC-1 α	<i>Ppargc1a</i>	TGA TGT GAA TGA CTT GGA TAC AGA CA	GCT CAT TGT TGT ACT GGT TGG ATA TG
PGC-1 α 1	<i>Ppargc1a1</i>	GGA CAT GTG CAG CCA AGA CTC T	CAC TTC AAT CCA CCC AGA AAG

			CT
ERR α	<i>Err</i>	GGG GAG CAT CGA GTA CAG C	AGA CGC ACA CCC TCC TTG A
Citocromo C	<i>Cycs</i>	ACA AGA AGA CTC AAA TGT GTT TCA GTT T	TGC ACT GTC AAG AAT AGA CAG TTG C
TATA Binding protein	<i>Tbp</i>	ACC CTT CAC CAA TGA CTC CTA TG	TGA CTG CAG CAA ATC GCT TGG

4.2.9 Análise de proteína por western blotting

As culturas celulares foram lavadas com PBS e o tampão de lise (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, coquetéis de inibidores de fosfatase e de protease [Roche]) foi adicionado diretamente na placa (CORREIA et al., 2021). Os lisados foram cuidadosamente transferidos para um tubo e homogeneizados por sonicador Bioruptor (Diagenode). Os tecidos congelados foram pulverizados e homogeneizados com um *beadruptor* (três vezes, 30 segundos a 30 Hz) em um tampão de lise de proteína (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 15% glicerol, com coquetéis de inibidores de fosfatase e de protease [Roche]), e centrifugados a 15.000 $\times$ g/15 minutos a 4 °C (CORREIA et al., 2021).

A proteína total foi quantificada usando o kit Pierce BCA protein Assay (Thermo Fisher) seguindo as instruções do fabricante, em diluições iniciais de 1:5 e 1:20 para células e tecidos, respectivamente. Os lisados de proteína foram separados em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidos para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) em um tampão de metanol a 20% gelado, por 2 horas. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris e 0,1% de Tween-20®, e incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpos contra I κ B α (1:1000, Cell Signaling), IKK β (1:1000, Abcam), p65 (1:1000, Sinalização Celular), p50 (1:2000, Abcam), PGC-1 α (1:300, Calbiochem), GAPDH (1:1000, Sinalização Celular) e alfa-tubulina (1:1000, Cell Signaling). Após a lavagem, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora com seus respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (HRP) e os *blots* foram visualizados por quimiluminescência aprimorada em um ChemiDoc *Imaging System* (Bio-Rad).

4.3 Análise estatística do Estudo 1 e Estudo 2

De acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov, todos os dados seguiram uma distribuição normal de Gauss e permitiram a aplicação de testes paramétricos. Os dados quantitativos foram analisados por ANOVA de uma via (*One-way*), ANOVA de duas vias (*Two-way*) ou teste *t* de *Student* (não pareado ou pareado, quando aplicável). Após ANOVA de uma via e de duas vias, os contrastes *post-hoc* foram realizados usando o teste de Tukey. A análise da área sob a curva ($AUC \pm$ erro padrão (SE)) foi realizada para experimentos comportamentais para avaliar os efeitos gerais das intervenções na hiperalgesia aguda e persistente. A AUC do período agudo foi considerada do dia 0 ao dia 3 após a injeção de carragenina ($AUC \Delta, g \times 3$ dias) e a AUC do período persistente foi considerada do dia 10 ao 17 ($AUC \Delta, g \times 10 - 17$ dias).

O tamanho do grupo amostral para variáveis contínuas foi determinado estimando-se o desvio padrão populacional e a magnitude da diferença entre as médias dos grupos (DELL; HOLLERAN; RAMAKRISHNAN, 2002), e estão descritos nas legendas das figuras. As amostras são compostas por variáveis categóricas (sedentários, exercitados, grupos de tratamento de drogas em geral, genótipo etc.). Os valores de dados quantitativos contínuos são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Todos os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 7.0 e 9.0. A ferramenta de cálculo de *outliers* do site GraphPad foi aplicada a cada grupo. Para todos os testes, a significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

5. CAPÍTULO V: Resultados do Estudo 1

5.1 Avaliação comportamental da hiperalgesia muscular aguda e persistente: envolvimento de macrófagos e receptores P2X4 na indução, e os efeitos preventivos do exercício físico via receptores PPAR γ

5.1.1 O exercício físico regular previne o desenvolvimento da hiperalgesia muscular aguda e consequente hiperalgesia muscular persistente

Em estudos recentes mostrou-se que a administração de carragenina no músculo gastrocnêmio de camundongos induz agudamente uma hiperalgesia muscular evocada por estímulo mecânico (DE AZAMBUJA et al., 2020), bem como um posterior estado persistente de hiperalgesia muscular mecânica (induzido por um segundo estímulo inflamatório advindo da PGE₂), o qual é dependente da indução do estado agudo (JORGE et al., 2020). Dessa forma, no presente estudo analisou-se o envolvimento de células e proteínas no desenvolvimento da hiperalgesia e a capacidade de o exercício físico regular impedir o estado agudo e consequentemente o estado persistente de hiperalgesia muscular sensível à estímulo mecânico.

Demonstrou-se que no grupo exercitado (Exercício Cg), a injeção intramuscular de carragenina desenvolveu uma hiperalgesia muscular mecânica menos intensa no período aguda (entre os dias 0 e 3) e no subsequente período persistente induzido por injeção de PGE₂ (do dia 10 ao 17^o), em comparação com o grupo sedentário com injeções de carragenina e PGE₂ no mesmo músculo (Sedentário Cg; figura 10A, $p = 0,0134$). A análise da AUC dos períodos agudo e persistente confirma que a hiperalgesia muscular gerada no grupo Exercício Cg foi significativamente menor que o grupo Sedentário Cg ($p < 0,0001$). Além disso, não há diferença significativa da AUC aguda e persistente do grupo sedentário injetado com veículos controle Salina isotônica, no lugar da carragenina, e do grupo Exercício Cg (Sedentário Sal, figura 10B e 10C, aguda: $p = 0,1920$; persistente: $p = 0,6007$), demonstrando que o exercício físico proposto é capaz de prevenir a hiperalgesia muscular mecânica aguda e consequente hiperalgesia persistente.

Além disso, a análise de corticosterona demonstrou que o exercício físico regular de natação não induziu um aumento nos níveis séricos de corticosterona em qualquer ponto de tempo medido em comparação com os animais sedentários controle de contato com a água (figura 10D $p = 0,5963$), sugerindo que as respostas hipoalgésicas induzidas pelo exercício não foram relacionadas a um estado de estresse crônico. Dessa forma, tornou-se interessante investigar se os efeitos de prevenção gerados pelo exercício físico regular envolveriam modulações moleculares a nível do tecido muscular esquelético, nos períodos agudo e/ou persistente.

Figura 10

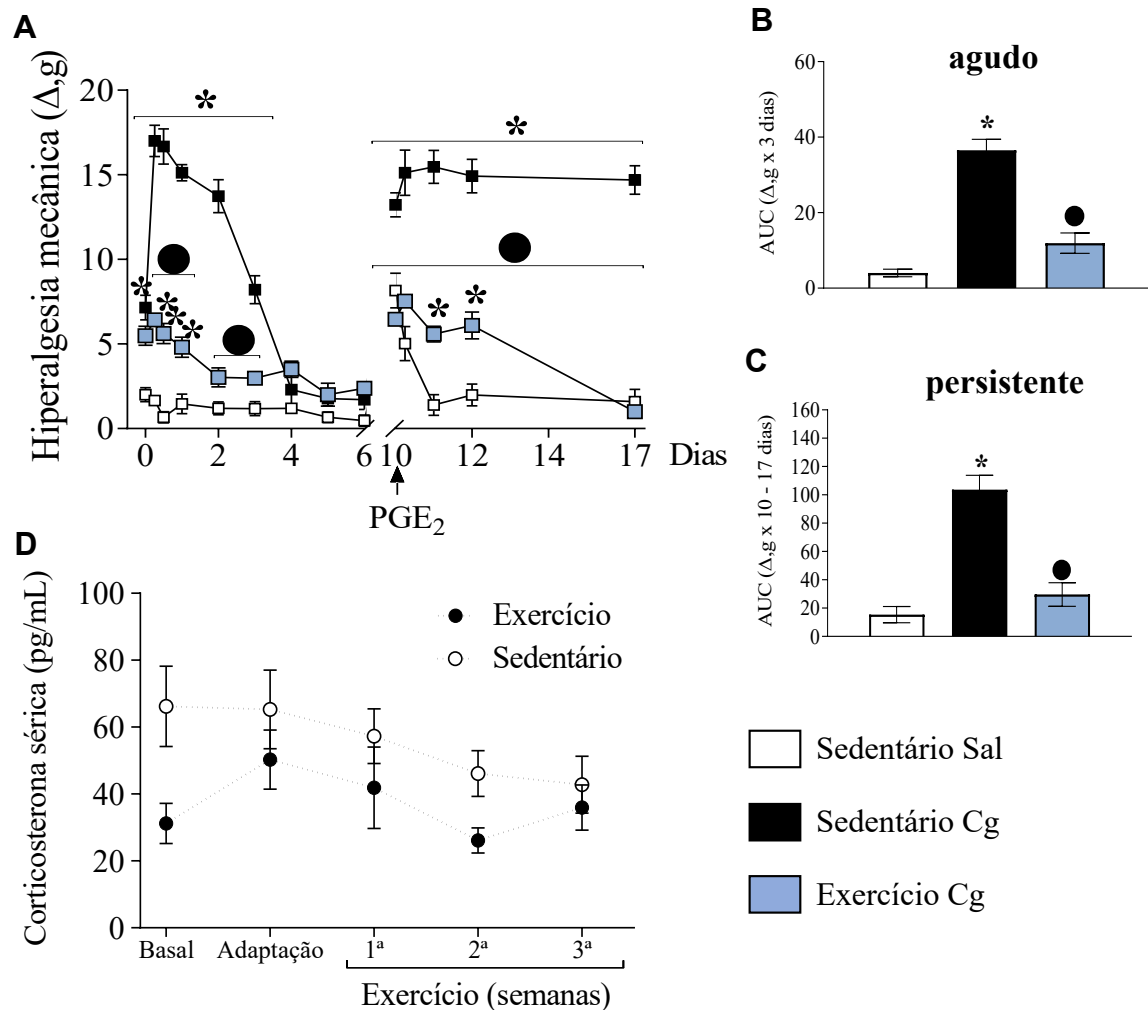


Figura 10 - O exercício físico regular previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente. **A)** Gráfico de linha do tempo mostrando hiperalgesia muscular aguda após carragenina (Cg) e hiperalgesia muscular persistente após PGE₂ nos grupos salina (Sal Sedentário), sedentário (Sedentário Cg) e exercitado (Exercitado Cg) (ANOVA de *Two-way*, post hoc de Tukey; $F(65, 490) = 11,61$). **B, C)** Área sob a curva (AUC) dos períodos agudo (**B**) e persistente (**C**) dos grupos Sedentário Sal, Sedentário Cg e Exercitado Cg (ANOVA *One-way*, post hoc de Tukey; $F(3, 27) = 29, 51$). **D)** Gráfico de linha do tempo da análise de corticosterona sérica nos grupos Sedentário e Exercitado (ANOVA *Two-way*, post hoc de Tukey; $F(4, 33) = 1,69$). Para todos os gráficos, o símbolo "*" indica diferença para o grupo Sedentário Sal e "●" indica diferença para o grupo Sedentário Cg. $N = 5$ para cada grupo - Exercitado Sal e Sedentário Sal; $N = 9$ para o grupo Sedentário Cg.

5.1.2 Exercício físico regular previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente, através dos receptores PPAR γ no tecido muscular

Em estudo prévio mostrou-se que o exercício de natação impede o estabelecimento da hiperalgesia muscular aguda, desenvolvido a partir de 3 horas após a injeção, por uma via dependente da ativação de receptores de PPAR γ (DE AZAMBUJA et al., 2020). Dessa forma, no presente estudo examinamos se a prevenção da hiperalgesia muscular persistente pelo exercício físico regular também seria modulada por receptores PPAR γ . Para isso, combinamos as estratégias farmacológica e comportamentais a fim de avaliar se o bloqueio de receptores PPAR γ em animais exercitados, submetidos ao modelo de hiperalgesia aguda e persistente, reverteria os efeitos de prevenção em ambos os períodos. A administração intramuscular do antagonista seletivo de receptores PPAR γ , GW9662 (9 ng/músculo) previamente à carragenina (grupo GW9662 pré-Cg) reverteu os efeitos preventivos do exercício físico regular, uma vez que o grupo apresenta hiperalgesia muscular aguda e persistente, semelhante a animais sedentários (Sedentário Cg) e há diferença significativa quando comparado ao grupo exercitado (Exercício Cg) (figura 11A, $p < 0,0001$). Esses resultados indicam que o exercício físico proposto é capaz de ativar receptores PPAR γ na região do tecido muscular, os quais previnem o desenvolvimento da hiperalgesia muscular aguda e consequentemente a indução do período persistente. Além disso, investigamos se a ativação dos receptores PPAR γ pelo exercício físico proposto, poderia estar envolvido também na diminuição da hiperalgesia muscular persistente de maneira isolada. Com isso, em grupo exercitado, fizemos a administração intramuscular de GW9662 previamente a PGE2 (GW9662 pré-PGE2), onde em animais exercitados previamente sensibilizados pela carragenina, observou-se a reversão da prevenção da hiperalgesia muscular persistente, quando comparado ao grupo Exercício Cg (figura 11B, $p < 0,0001$).

Figura 11

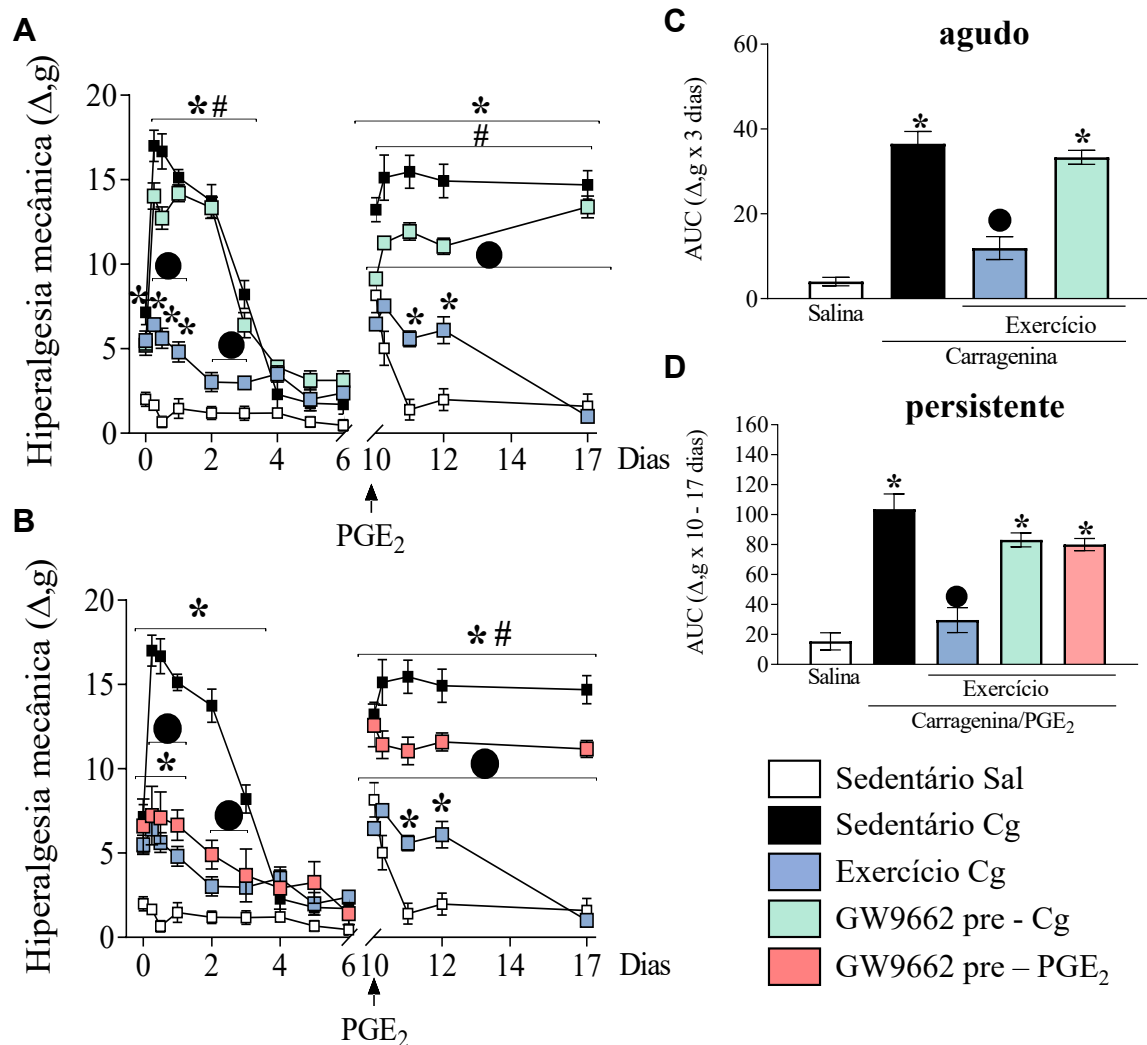


Figura 11 – O exercício de natação previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente através dos receptores PPAR γ . **A, B)** Gráfico de linha do tempo mostrando hiperalgesia muscular aguda após carragenina (Cg) e persistente após hiperalgesia muscular PGE₂ em solução salina (Sedentário Sal), sedentário (Sedentário Cg), exercitado (Exercitado Cg) e Exercitado Cg com GW9662 antes de Cg ou PGE₂ (GW9662 pré – Cg ou pré - PGE₂) (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey; $F(65, 490) = 11,61$; para todos). **C, D)** Área sob a curva (AUC) dos tempos agudo (**C**) e persistente (**D**) dos grupos Sedentário Sal, Sedentário Cg, GW9662 Pré – Cg e GW9662 Pré – PGE₂ (ANOVA *one-way*, Tukey post hoc; (**C**) $F(3, 27) = 29,51$; (**D**) $F(4, 30) = 17,8$). Para todos os gráficos, o símbolo “*” indica diferença para o grupo Sedentário Sal, “●” indica diferença para o grupo Sedentário Cg e “#” indica diferença para Exercitado Cg. $N = 5$ para cada grupo Exercitado e Sedentário Sal; $N = 9$ para o grupo Sedentário Cg.

Em ambas as situações, análises de AUC identificaram o envolvimento claro dos receptores $PPAR\gamma$ na prevenção da hiperalgesia muscular. A análise da AUC em períodos agudo e persistente confirmou a hiperalgesia muscular nos dois períodos, do grupo exercitado que recebeu o antagonista previamente a carragenina, GW9662 pré-Cg (figura 11C e 11D, agudo: $p = 0,0001$; persistente: $p = 0,0028$) e do grupo exercitado que recebeu o antagonista previamente a PGE_2 , GW9662 pré- PGE_2 (figura 11D, Persistente: $p = 0,0118$), onde as áreas das curvas são significativamente maiores que a do o grupo Exercício Cg e estatisticamente similares ao grupo Sedentário Cg (agudo: GW9662 pré-Cg, $p = 0,8803$; persistente: GW9662 pré-Cg, $p = 0,4909$; GW9662 pré- PGE_2 , $p = 0,4430$). Dessa forma, demonstrando que a prevenção da hiperalgesia muscular mecânica aguda e persistente pelo exercício de natação é modulada pelos receptores $PPAR\gamma$, em ambos os períodos e que a ação dos receptores no período agudo tem importante papel preventivo do período persistente, que é interessante de ser aprofundado.

5.1.3 Administração do ligante endógeno de $PPAR\gamma$ previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente de maneira semelhante ao exercício físico regular

A prostaglandina 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 (15d-PGJ₂) endógena é produzida durante estímulos inflamatórios e tem ação em células do sistema imune, onde acredita-se que ela é responsável por regular a inflamação em tecidos. Além disso, tem sido mostrado que a 15d-PGJ₂ possui ações como ligante endógeno do receptor $PPAR\gamma$. Dessa forma, administramos a 15d-PGJ₂ intramuscular em animais sedentários nos períodos prévios à carragenina ou à PGE_2 . Em grupos que receberam a 15d-PGJ₂ (100 ng/músculo) antes da carragenina (PGJ₂ pré-Cg), a hiperalgesia muscular permaneceu reduzida no período agudo (de 3 horas no dia 0 até o dia 3) e impediu o desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente induzida por PGE_2 (de 1 hora no dia 10 ao dia 17) em comparação com o grupo Sedentário Cg (figura 12A, $p < 0,0001$). Essas respostas foram revertidas quando o antagonista, GW9662, foi coadministrado com 15d-PGJ₂ (grupo pré-Cg GW + PGJ₂, figura 12A, $p < 0,0001$), confirmando o envolvimento dos receptores $PPAR\gamma$ na prevenção induzida por 15d-PGJ₂. Ainda, a injeção de 15d-PGJ₂ antes do PGE_2 (PGJ₂ pré- PGE_2), em grupo previamente sensibilizado com carragenina, reduziu a hiperalgesia mecânica persistente

apenas em 1 e 4 h no dia 10 em comparação com o grupo Sedentário Cg (figura 12A, $p < 0,0001$, para ambos os tempos).

Figura 12

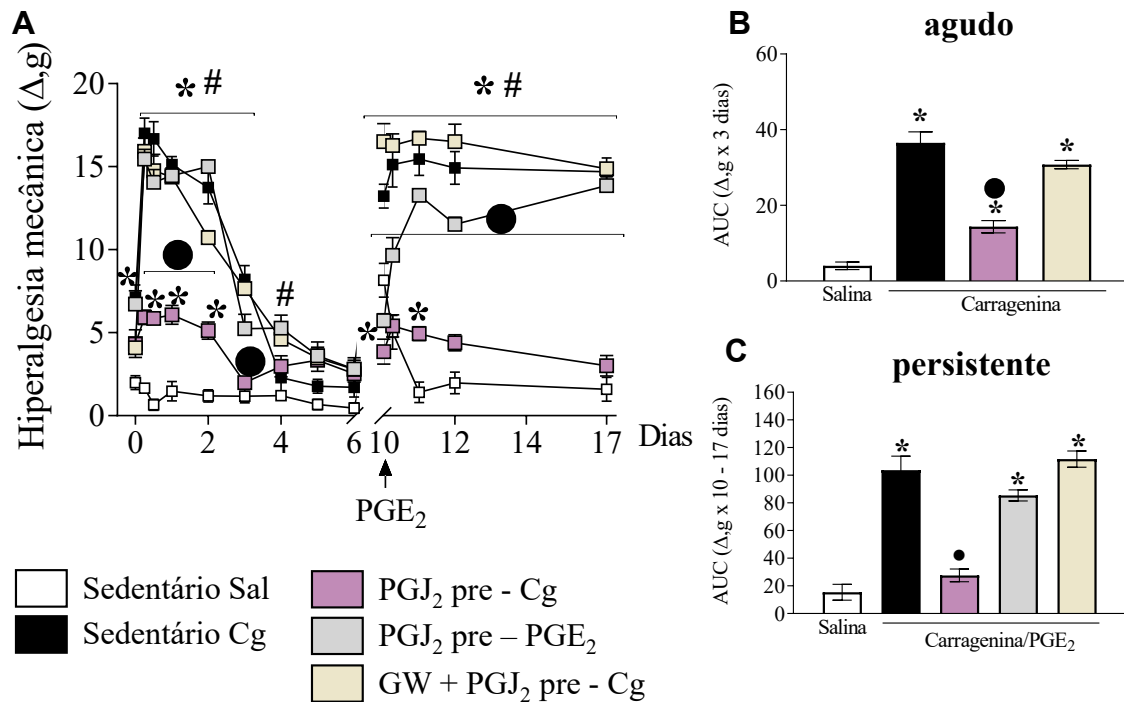


Figura 12 – Agonista do receptor PPAR_γ, 15d-PGJ₂, previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente.

A) Gráfico de linha do tempo mostrando hiperalgesia muscular aguda após carragenina (Cg) e hiperalgesia muscular persistente após PGE₂ em solução salina (Sedentário Sal), sedentário (Sedentário Cg), 15d-PGJ₂ antes de carragenina (PGJ₂ pré - Cg), 15d-PGJ₂ antes de PGE₂ (PGJ₂ pré - PGE₂) e 15d-PGJ₂ + GW9662 antes de Cg (GW + PGJ₂ pré - Cg) (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey; $F(52, 322) = 13,51$). **B, C)** Área sob a curva (AUC) dos tempos agudo (**B**) e persistente (**C**) dos grupos Sedentário Sal, Sedentário Cg, PGJ₂ pré - Cg, PGJ₂ pré - PGE₂ e GW + PGJ₂ pré - Cg (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey, (**B**) $F(3, 19) = 37,91$; (**C**) $F(4, 24) = 27,6$). Para todos os gráficos, o símbolo “*” indica diferença para o grupo Sedentário Sal, “•” indica diferença para o grupo Sedentário Cg e “#” indica diferença para PGJ₂ pré - Cg ou PGJ₂ pré - PGE₂. N = 5 para cada grupo - PGJ₂ pré - Cg, PGJ₂ pré - PGE₂ e Sedentário Sal; N = 9 para o grupo Sedentário Cg.

A análise da AUC do período agudo confirma que as respostas comportamentais do grupo PGJ₂ pré-Cg foram significativamente menores quando comparadas aos grupos Sedentário Cg e GW + PGJ₂ pré-Cg ($p < 0,001$ e $p = 0,0032$, respectivamente), porém ainda permanecem elevados em relação ao grupo controle veículo Sedentário Sal (figura 12B). A

AUC do período persistente confirmou que as respostas comportamentais do grupo PGJ₂ pré-Cg não diferem do grupo Sedentário Sal (figura 12C, $p = 0,8672$) e que as respostas comportamentais dos grupos GW + PGJ₂ pré-Cg e PGJ₂ pré-PGE₂ foram significativamente maiores que o grupo Sedentário Sal (figura 12C, $p < 0,0001$, para ambos). Além disso, as respostas comportamentais do grupo PGJ₂ pré-PGE₂ não diferiram do grupo Sedentário Cg (figura 12C, $p = 0,3505$). Esses resultados suportam os dados do exercício físico regular e indicam fortemente que a ativação dos receptores de PPAR γ antes da inflamação inicial induzida por carragenina, é eficaz na prevenção da hiperalgesia muscular aguda e subsequente hiperalgesia persistente. Dessa forma, torna-se interessante investigar mecanismos moleculares envolvidos no processo de prevenção da hiperalgesia muscular aguda e persistente, pelo exercício físico regular e por ativação dos receptores PPAR γ no tecido muscular esquelético.

5.1.4 Macrófagos no tecido muscular estão envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia muscular aguda e persistente

A fim de investigar possíveis mecanismos periféricos envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia muscular aguda e persistente, hipotetizamos que as células do sistema imune, mais especificamente os macrófagos, estariam envolvidas no processo inflamatório induzido pela carragenina e dessa forma, teriam papel fundamental no processo de transição da hiperalgesia muscular aguda para a persistente. Assim, administramos por via intramuscular, clodronato encapsulado por lipossomos, com o objetivo de diminuir a quantidade de macrófagos no músculo-alvo. O tratamento com duas injeções de clodronato encapsulado no músculo gastrocnêmio, sendo a primeira 48 horas antes da injeção de carragenina, e a segunda 24 horas após (grupo Clodronato Cg), reduziu o quadro agudo de hiperalgesia muscular (de 1 hora no dia 0 até o dia 3), bem como a subsequente hiperalgesia muscular persistente (de 1 hora no dia 10 ao dia 17) em comparação aos grupos Sedentário Cg e Cápsula-Cg (figura 13A, $p < 0,0001$). Da mesma forma, o tratamento com duas injeções de clodronato encapsulado, 48 horas antes da injeção de PGE₂, e 24 horas após (grupo Clodronato-PGE₂), também reduziu a hiperalgesia muscular persistente (de 1 hora no dia 10 ao dia 17) em comparação com os grupos Sedentário Cg e Cápsula-Cg (figura 13B, $p < 0,0001$).

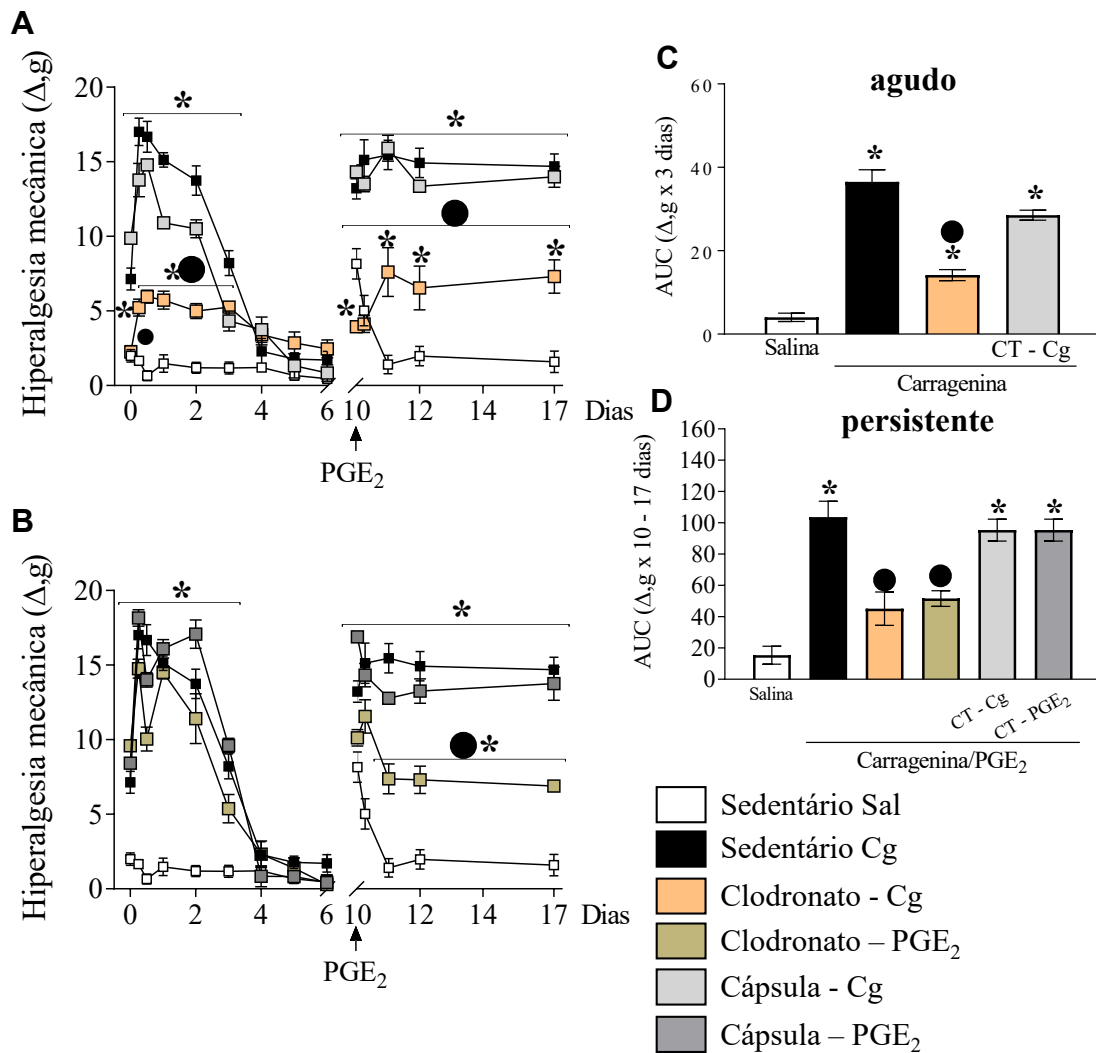
Figura 13

Figura 13 – O clodronato encapsulado previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente. A, B) Gráfico de linha do tempo mostrando hiperalgesia muscular aguda após carragenina (Cg) e hiperalgesia muscular persistente após PGE₂ em grupos que receberam a solução salina (Sedentário Sal), carragenina (Sedentário Cg), controle de clodronato (Cápsula – Cg, Cápsula – PGE₂) e Clodronato antes de carragenina (Clodronato – Cg) ou PGE₂ (Clodronato – PGE₂) (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey; F (65, 338) = 11,83). **C, D)** Área sob a curva (AUC) dos tempos agudo (**B**) e persistente (**C**) de Sedentário Sal, Sedentário Cg, Cápsula – Cg, Cápsula – PGE₂ e Clodronato – Cg ou Clodronato – PGE₂ (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey; F (5, 27) = 11,35). Para todos os gráficos, o símbolo “*” indica diferença para o grupo Sedentário Sal e “●” indica diferença para o grupo Sedentário Cg. N = 5 para grupos clodronato; N = 4 para grupos de cápsulas; N = 9 para o grupo Sedentário Cg; N = 5 Grupo Sedentário Sal.

A análise de AUC dos períodos agudo e persistente confirmam que as respostas comportamentais para os grupos Clodronato Cg e Clodronato-PGE₂ foram menores do que o Sedentário Cg (figura 13C e 13D, agudo: Clodronato Cg, $p < 0,0001$; persistente: Clodronato Cg, $p = 0,0011$; Clodronato-PGE₂, $p = 0,0022$) e grupo Cápsula-Cg (figura 13C e 13D, agudo: Clodronato Cg, $p = 0,0071$; persistente: Clodronato Cg, $p = 0,0228$; Clodronato-PGE₂, $p = 0,0361$). No entanto, os grupos Clodronato Cg ou Clodronato-PGE₂ ainda apresentaram respostas maiores que o grupo Sedentário Sal no período agudo (figura 13C, agudo: Clodronato Cg, $p < 0,01$), embora as mesmas não tenham sido observadas para o período persistente (figura 13D, persistente: Clodronato Cg, $p = 0,2224$; Clodronato-PGE₂, $p = 0,0748$). Esses resultados demonstram que os macrófagos no tecido muscular estão envolvidos no processo hiperalgesia muscular aguda e persistente. Com isso, tornou-se interessante investigar uma possível relação entre os macrófagos e os receptores PPAR γ musculares, no processo de prevenção do estabelecimento da hiperalgesia muscular aguda e persistente.

5.1.5 Receptores P2X4 presentes no macrófago do tecido muscular, estão envolvidos com a geração da hiperalgesia muscular persistente

Para investigar o envolvimento dos receptores P2X4 na indução da hiperalgesia muscular, utilizamos o antagonista seletivo para bloquear o receptor no local. A administração intramuscular do antagonista, 5-BDBD (50 μ M/músculo) previamente à carragenina (grupo 5-BDBD+Cg/PGE₂) reverteu parcialmente a hiperalgesia muscular, uma vez que o grupo apresenta hiperalgesia muscular aguda e persistente menor que o grupo Sedentário Cg, porém ainda com diferença significativa quando comparado ao grupo Sedentário Sal (figura 14A, $p < 0,0001$). Esses resultados indicam que a hiperalgesia aguda induzida pela injeção de carragenina, induz a sensibilização no tecido com mecanismos que envolvem a ativação dos receptores P2X4 na região, e esse efeito é importante para desenvolvimento da hiperalgesia no período persistente. Interessantemente, a administração intramuscular de 5-BDBD previamente a PGE₂ (Cg/5-BDBD+PGE₂), não foi capaz de diminuir a hiperalgesia muscular persistente, não apresentando diferenças significativas ao grupo Sedentário Cg (figura 14A, $p < 0,0001$). Esses resultados indicam uma ação do receptor P2X4 na indução da hiperalgesia aguda que leva à persistente, porém não na manutenção da hiperalgesia persistente.

Figura 14

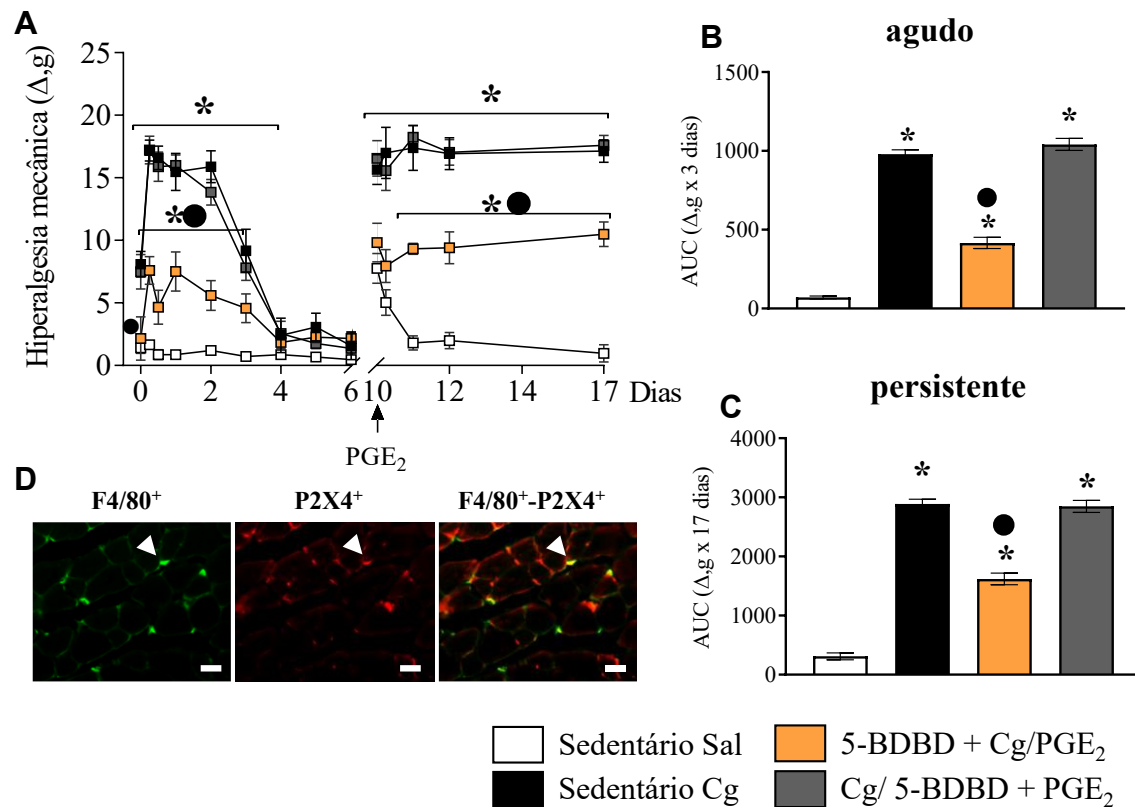


Figura 14 – O envolvimento de receptores P2X4 na indução da hiperalgesia muscular aguda e persistente.

A) Gráfico de linha do tempo mostrando hiperalgesia muscular aguda após carragenina (Cg) e hiperalgesia muscular persistente após PGE₂ nos grupos que receberam solução salina (Sedentário Sal), carragenina (Sedentário Cg), e antagonista 5-BDBD antes de carragenina (5-BDBD+Cg/PGE₂) ou PGE₂ (Cg/5-BDBD+PGE₂) (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey; F (39, 234) = 7,220). B, C) Área sob a curva (AUC) dos tempos agudo (B) e persistente (C) de Sedentário Sal, Sedentário Cg, 5-BDBD+Cg/PGE₂ e Cg/5-BDBD+PGE₂ (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey; F (3, 20) = 54,35, p < 0,0001). Para todos os gráficos, o símbolo “*” indica diferença para o grupo Sedentário Sal e “●” indica diferença para o grupo Sedentário Cg. N = 5 para grupos 5-BDBD; N = 9 para o grupo Sedentário Cg; N = 5 Grupo Sedentário Sal. D) Imunofluorescência com marcação de macrófagos (F4/80⁺, verde), receptores P2X4 (P2X4⁺, vermelho) e a co-marcação das duas proteínas no mesmo tecido (F4/80⁺/P2X4⁺, amarelo). Flechas brancas destacam as marcações de interesse. Barra de escala: 50 μm. Aumento de 40 ×.

Em ambos os períodos, análises de AUC identificaram o envolvimento claro dos receptores P2X4 na indução da hiperalgesia muscular. A análise da AUC em períodos agudo e persistente demonstra a hiperalgesia muscular, do grupo Sedentário Cg e confirma a diminuição da hiperalgesia aguda e persistente do grupo que recebeu o 5-BDBD previamente

a carragenina, 5-BDBD+Cg/PGE₂, porém ainda com diferença significativa com o grupo Sedentário Sal (figura 14B e 14C, agudo: $p < 0,0001$; persistente: $p < 0,0001$). O grupo Cg/5-BDBD+PGE₂ não apresenta redução da hiperalgesia persistente (figura 14C, agudo: $p < 0,0001$; persistente: $p < 0,0001$). Dessa forma, demonstra-se que os receptores P2X4 estão envolvidos na indução hiperalgesia muscular aguda e persistente, relacionados ao processo inflamatório inicial, porém não estão envolvidos na manutenção do período persistente.

Análise qualitativa de marcadores por imunofluorescência do tecido muscular, confirmaram a expressão dos receptores P2X4 na região do tecido (marcação em vermelho, P2X4⁺) e ainda, demonstraram que os receptores estão expressos em células positivas para F4/80 (figura 14D). Ou seja, confirma-se que no tecido muscular esquelético, os receptores P2X4 estão expressos em células macrófagos, possibilitando a investigação de mecanismos de ativação nessa célula.

5.1.6 Macrófagos ativados pelo ligante endógeno dos receptores PPAR γ modulam a hiperalgesia muscular aguda e persistente

A fim de examinar se haveria interação entre os receptores PPAR γ e macrófagos na prevenção da hiperalgesia muscular aguda e persistente, testamos a capacidade de macrófagos tratados com 15d-PGJ₂ *in vitro*, em reduzir a hiperalgesia muscular aguda e persistente, quando injetados no músculo gastrocnêmio previamente a carragenina. Com isso, cultura primária de macrófagos derivados do peritônio de animais *naïve*, foram tratados 15d-PGJ₂. Em análise qualitativa de imunofluorescência, demonstrou-se que os macrófagos cultivados com 15d-PGJ₂ tiveram mais co-marcação entre os marcadores F4/80⁺-CD206⁺ em comparação com as células controle, sugerindo um aumento de macrófagos polarizados para um fenótipo anti-inflamatórios (identificados com o marcador CD206), e ainda maior marcação de receptores PPAR γ (figura 15A). Após isso, determinamos o número de macrófagos que poderiam ser injetados no músculo gastrocnêmio para gerar uma hiperalgesia muscular aguda e persistente semelhante ao grupo Sedentário Cg. Em suma, nos experimentos a seguir, utilizamos 3×10^4 células/mL tratadas com 1 μ M de 15d-PGJ₂.

Figura 15

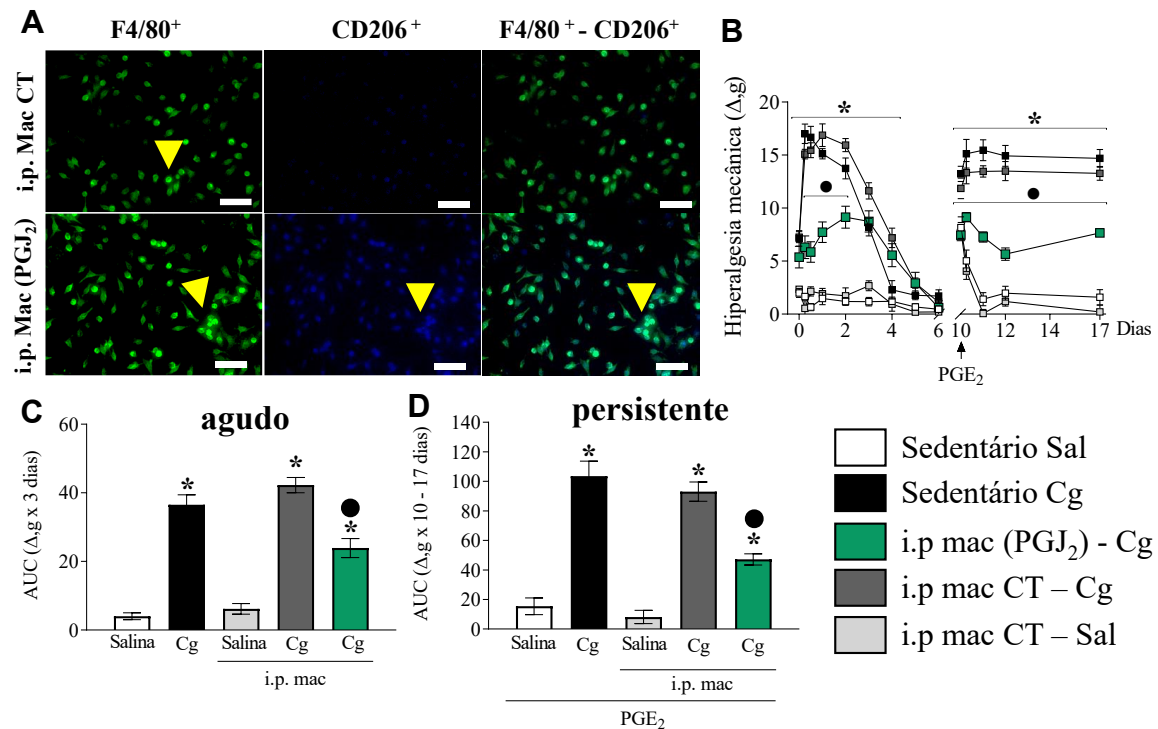


Figura 15 - Macrófagos peritoneais tratados com agonista PPAR γ , 15d-PGJ₂ previnem a hiperalgia mecânica aguda e persistente. **A)** Imagens representativas do marcador F4/80⁺ indicando células de macrófagos (verde, destacado pelas setas amarelas) e marcador CD206⁺ (azul indicado pelas setas amarelas) de controle (i.p. mac CT) e macrófagos peritoneais tratados com 15d-PGJ₂ (i.p. Mac (PGJ₂)). As marcações sobrepostas F4/80⁺-CD206⁺ (setas amarelas) estão mais presentes em i.p. Mac (PGJ₂) quando comparado com i.p. Mac CT. Barra de escala = 50 μ m. Aumento de 40 $\times$. **B)** Gráfico de linha do tempo mostrando hiperalgia muscular aguda após carragenina (Cg) e hiperalgia muscular persistente após PGE₂ em grupos injetados com solução salina (Sedentário Sal), carragenina (Sedentário Cg), macrófagos peritoneais tratados com 15d-PGJ₂ antes de Cg (i.p. Mac. (PGJ₂) pré - Cg), e Controle i.p. Mac CT pré - Cg, injetados antes de Cg (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey, (B) F (39, 196) = 2.195; (C) F (39, 224) = 7.978). **C, D)** Área sob a curva (AUC) dos tempos agudo (**C**) e persistente (**D**) de Sedentário Sal, Sedentário Cg, i.p. Mac (PGJ₂) pré - Cg e i.p. Mac CT pré - Cg (ANOVA one-way, post hoc de Tukey, (D) F (4, 24) = 43,8; (E) F (4, 24) = 29,26). Para todos os gráficos, o símbolo “*” indica diferença para o grupo Sedentário Sal e “●” indica diferença para o grupo Sedentário Cg. N = 5 para cada grupo - i.p. grupos Mac e Sedentário Sal; N = 9 para grupo sedentário Cg.

A injeção de macrófagos peritoneais tratados com 15d-PGJ₂ antes da carragenina (grupo i.p. Mac (PGJ₂) pré-Cg) reduziu a hiperalgia aguda (de 3 horas no dia 0 até o dia 2) e persistente (de 1 hora no dia 10 ao dia 17) em comparação com o Sedentário Cg ou cultura-controle anterior à carragenina (i.p. Mac CT pré-Cg) (figura 15B, $p < 0,0001$). A análise de

AUC do período agudo e persistente confirmou que as respostas comportamentais induzidas pelos macrófagos peritoneais cultivados tratados com 15d-PGJ2 (grupo i.p. Mac (PGJ2) pré-Cg) foram menores do que o Sedentário Cg ou o grupo i.p. Mac CT pré-Cg (figura 15C e 15D, $p = 0,0097$ e $p = 0,0008$, respectivamente). No entanto, as respostas de i.p. Mac (15d) pré-Cg se mostraram maiores que o grupo Sedentário Sal e cultura-controle administrados anteriormente a injeção de salina (i.p. Mac CT pré-Sal) (figura 15C e 15D, $p = 0,0003$ e $p = 0,0011$, respectivamente). Esses dados sugerem que a modulação da hiperalgesia muscular aguda e persistente pode envolver a ativação de receptores $PPAR\gamma$ e seus efeitos sobre macrófagos no tecido muscular. Dessa forma, buscamos investigar os efeitos do exercício físico regular através dos receptores $PPAR\gamma$, nos macrófagos e em vias inflamatórias dos receptores P2X4 no tecido muscular.

5.2 Avaliação de mecanismos da hiperalgesia muscular aguda e persistente: expressão de macrófagos e a ativação receptores P2X4 na indução, e os efeitos preventivos do exercício físico via receptores $PPAR\gamma$

5.2.1 Estímulos inflamatórios induzem a polarização de macrófagos, via ativação dos receptores P2X4

Uma vez que macrófagos e receptores P2X4 do músculo esquelético, estão envolvidos no estabelecimento da hiperalgesia muscular persistente, objetivou-se investigar se a polarização de macrófagos para fenótipos inflamatório poderiam envolver a ativação de receptores P2X4. Para isso, analisamos cultura primária de macrófagos peritoneais e a linhagem de macrófagos murinos, RAW 264.7, de duas forma diferentes e com diferentes estímulos inflamatórios. Macrófagos peritoneais foram analisados por imunofluorescência (figura 16A), onde o estímulo com carragenina foi capaz de induzir uma maior proporção de células $F4/80^+$ com marcação intensa de $CD11c^+$ ($F4/80^+/CD11c^+$) quando comparado as células controles PBS e 5-BDBD sozinho (figura 16B, $p < 0,0001$). Essa proporção aparece diminuída em células que receberam o antagonista de P2X4, 5-BDBD, antes da carragenina (5-BDBD + Cg), porém ainda é significativamente maior do que células controle PBS (figura

16B, $p = 0,0265$). Esses resultados indicam que a carragenina induz o aumento da polarização de macrófagos para um fenótipo inflamatório, por vias que envolvem os receptores P2X4.

Figura 16

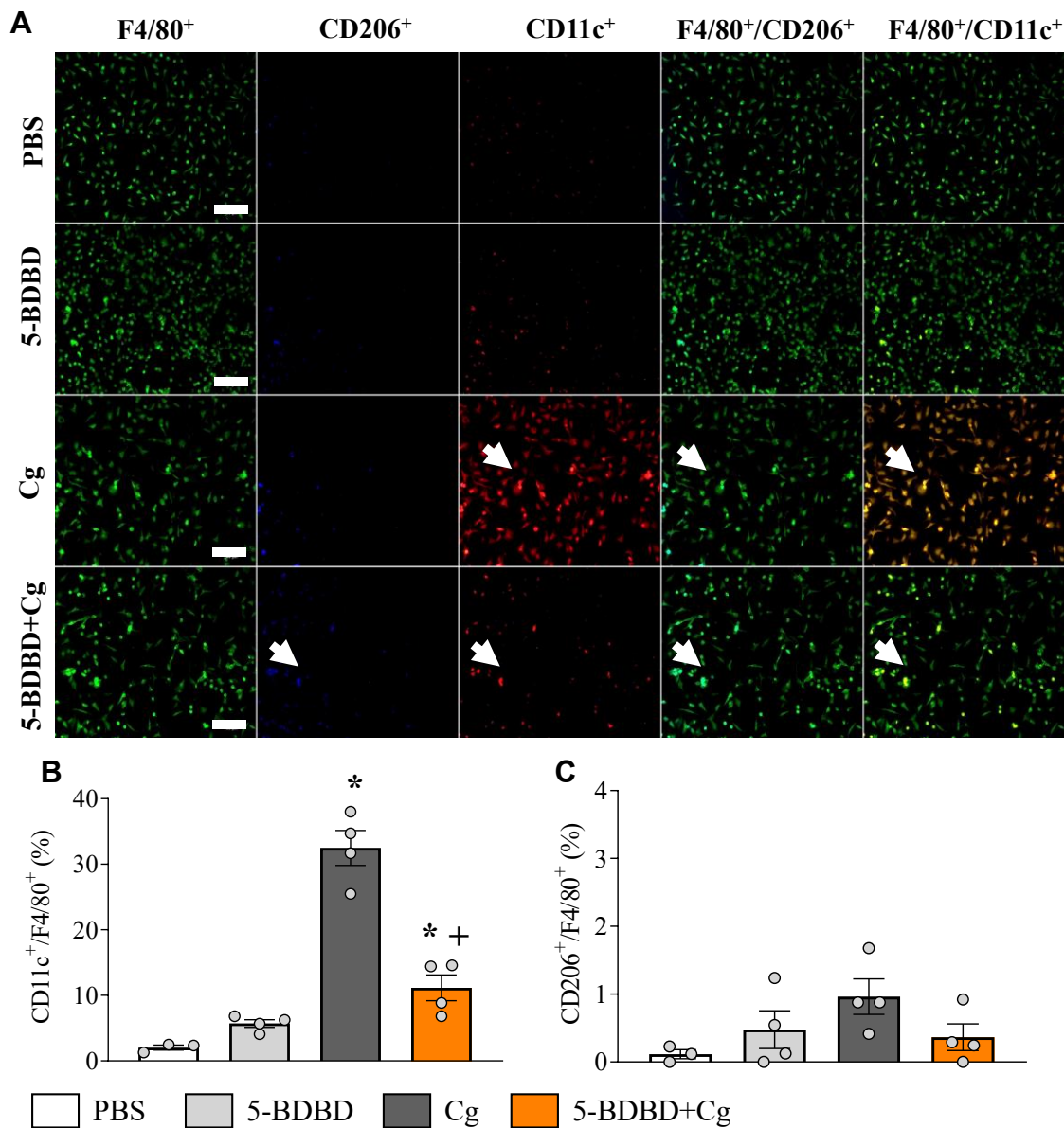


Figura 16 - Macrófagos peritoneais estimulados com carragenina adquirem um fenótipo inflamatório, prevenido pelo bloqueio de P2X4. A) Imagens representativas do marcador F4/80⁺ indicando células de macrófagos (verde), marcador CD11c⁺ (vermelho, indicado pelas setas amarelas) e marcador CD206⁺ (azul, indicado pelas setas amarelas) de células controle PBS e 5-BDBD, e células estimuladas com carragenina (Cg) e com 5-BDBD e Cg (5-BDBD + Cg). Barra de escala = 50 μ m. Aumento de 40 $\times$. **B,C)** Análise da proporção da marcação de CD11c (**B**) e CD206 (**C**) em relação a marcação de F4/80. **B)** Estímulo com carragenina aumenta a

expressão de células F4/80⁺ com CD11c⁺ e o pré-tratamento com 5-BDBD diminui (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey, (B) F (3, 11) = 56,24; (C) F (3, 11) = 2,242). Para todos os gráficos, o símbolo “*” indica diferença para o grupo PBS e “+” indica diferença para o grupo Cg. N = 4 a 5 para cada grupo.

No mesmo sentido, linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimuladas com LPS demonstraram o aumento da expressão de genes *cd86* (marcador de M1), *il1b* (IL-1 β), *tnf* (TNF- α) e *p2rx4* (P2X4), quando comparadas com grupo controle PBS e grupo com estímulo anti-inflamatório de IL-4 (figura 17A, 17C e 17D, p <0,0001). Enquanto o tratamento com IL-4 induz o aumento de *arg1*, marcador de macrófagos M2 (figura 17B, p <0,0001). Esses resultados indicam que estímulos inflamatórios e anti-inflamatórios modulam o fenótipo das células e a expressão de genes relacionados, incluindo o *p2rx4*.

Figura 17

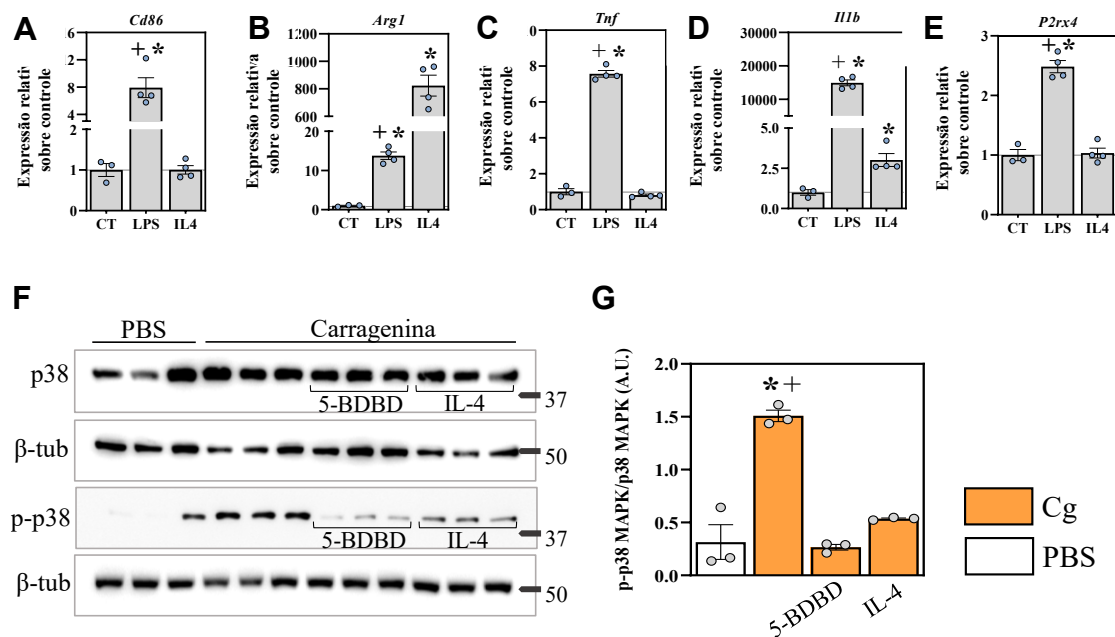


Figura 17 – A polarização dos macrófagos envolve a ativação dos receptores P2X4. A,B,C,D,E) Expressão gênica de *cd86* (A), *arg1* (B), *tnf* (C), *il1b* (D) e *p2rx4* (E) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, IL-4 ou PBS (ANOVA *one way*, post hoc de Tukey; (A) F (2, 8) = 18,80; (B) F (2, 8) = 97,12; (C) F (2, 8) = 251,5; (D) F (2,8) = 84,27). “*” indica diferença para o grupo PBS, “+” indica diferença com o grupo IL-4. **F)** Western blotting demonstrando a expressão de p38 MAPK, p-p38 MAPK e beta tubulina, em RAW 264.7 tratado com PBS, carragenina (Cg), 5-BDBD + Cg ou IL-4 + Cg. A marcação numérica indica a altura do marcador em quilodaltons (kDa). **G)** Análise da expressão de p-p38 MAPK/p38 MAPK (unidades arbitrárias

[A.U.]). As células tratadas com Cg expressam mais p-p38 MAPK em comparação com outros tratamentos (ANOVA unidirecional, post hoc de Tukey, $F(3, 8) = 33,93$. Para todos os gráficos, o símbolo "*" indica diferença para o grupo PBS, "+" indica diferença com os grupos IL-4 + Cg ou 5-BDBD + Cg. $N = 3$ a 4 para cada grupo.

Com isso, a fim de investigar a via de sinalização dos receptores P2X4 em macrófagos com estímulos inflamatórios, avaliamos a expressão da fosforilação da proteína p38 MAPK sem e com a coadministração do antagonista 5-BDBD, ou com o estímulo anti-inflamatório da IL-4. A expressão de p-p38 MAPK em células RAW 264.7 estimuladas apenas com Cg está aumentada, quando comparadas com células PBS, com o antagonista e com IL-4 (figura 17E, 17G e 17H, $p < 0,0001$). O bloqueio dos receptores P2X4 com o antagonista 5-BDBD, bem como o tratamento com IL-4, antes do estímulo inflamatório, previne o aumento da fosforilação de p38 MAPK (figura 17E, 17G e 17H, $p < 0,0001$). Em conjunto, esses resultados indicam que, em macrófagos, estímulos inflamatório induzem a polarização dessas células para um fenótipo inflamatório, o que envolve a ativação de receptores P2X4 e sua via de sinalização intracelular.

5.2.2 O exercício físico regular modula o fenótipo dos macrófagos no tecido muscular, envolvidos na hiperalgesia muscular aguda e persistente

Com o envolvimento dos macrófagos no processo de transição da hiperalgesia muscular aguda para a persistente e o envolvimento da via dos receptores P2X4 na ativação dessas células, objetivou-se avaliar os efeitos da carragenina, do exercício físico e da ativação de receptores PPAR γ no músculo esquelético de animais sedentários e exercitados. Para diferenciar as células F4/80⁺ entre os fenótipos pró ou anti-inflamatórios, foi co-marcado com F4/80⁺, os marcados CD11c⁺ (fenótipo pró-inflamatório, "M1") e CD206⁺ (fenótipo anti-inflamatório, "M2"), conforme demonstrado nas imagens representativas (figura 18). A análise de imunofluorescência do tecido muscular de grupos sedentários e exercitados (figura 18, imagem representativa) mostrou que no dia 1 após a injeção de carragenina, não houve diferença significativa na quantidade de células marcadas com F4/80⁺ (figura 19A). Nos dias 2 (figura 19B) e 3 (figura 19C), o grupo Sedentário Cg apresentou um número maior de células F4/80⁺ em comparação aos grupos Sedentário Sal (dia 2: $p = 0,0119$ e dia 3: $p =$

0,0127) e Exercício Cg (dia 2: $p = 0,0048$ e dia 3: $p = 0,0162$). Após a injeção de PGE_2 (dia 11) o número de células $F4/80^+$ não difere entre os grupos (figura 19D). Sugere-se que o exercício físico regular previne o aumento de células marcadas com $F4/80^+$ no período agudo da hiperalgesia muscular.

Figura 18

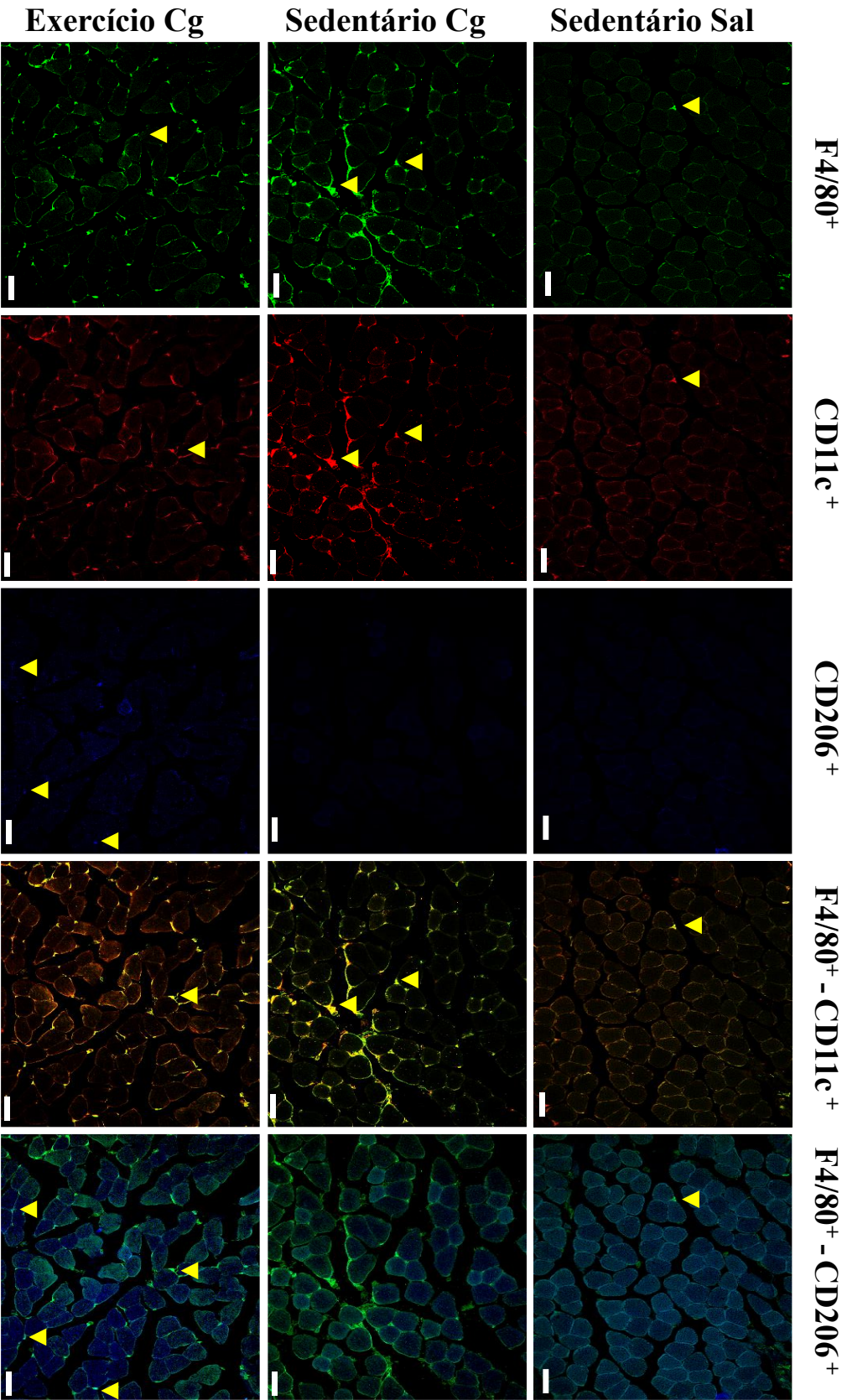


Figura 18 – Efeitos do exercício físico sobre os macrófagos musculares no dia 2 da hiperalgesia muscular aguda. Imagens representativas do gastrocnêmio com marcador F4/80⁺ indicando macrófagos (verde, destacado pela seta amarela), marcador CD11c⁺ (vermelho, destacado pela seta amarela), marcador CD206⁺ (azul, destacado pela seta amarela) e a sobreposição F4/80⁺-CD11c⁺ e F4/80⁺-CD206⁺ destacados por setas amarelas. Barra de escala = 100 µm. Aumento de 20 ×.

Análises de contagem demonstraram que, no dia 1, não houve alteração no número de células ‘‘M1’’ (F4/80⁺-CD11c⁺) na comparação entre todos os grupos (figura 19A, $p > 0,05$). No entanto, o grupo Exercitado Cg apresentou um aumento no número de células ‘‘M2’’ (F4/80⁺-CD206⁺) em relação aos grupos Sedentário Cg ($p = 0,0001$) e Sedentário Sal (figura 19A, $p = 0,0002$). No dia 2, houve aumento do número de ‘‘M1’’ (F4/80⁺-CD11c⁺) no músculo de Sedentário Cg, que não é aparente no grupo Exercício Cg (figura 19B, $p < 0,0001$). Ainda no dia 2, o número de células ‘‘M2’’ (F4/80⁺-CD206⁺) demonstrou-se elevado no grupo Cg-Exercitado quando comparado aos grupos Sedentário Cg e Sedentário Sal (figura 19B, $p = 0,0112$ e $p = 0,0052$, respectivamente). Nos dias 3 e 11, houve aumento de ‘‘M1’’ (F4/80⁺-CD11c⁺) no Sedentário Cg, o qual também não é aparente no grupo Exercício Cg (figura 19C e 19D, dia 3: $p = 0,0122$ e dia 11: $p = 0,0467$). No entanto, o número de células ‘‘M2’’ (F4/80⁺-CD206⁺) não diferiu quando comparados os grupos Cg-Exercitado, Sedentário Cg e Sedentário Sal (figura 19C e 19D, $p > 0,9$, para todos). Para todos os dias avaliados no grupo Sedentário Cg, o número de células ‘‘M1’’ (F4/80⁺-CD11c⁺) foi maior do que células ‘‘M2’’ (F4/80⁺-CD206⁺) (figura 19A, 19B, 19C e 19D, dia 1: $p = 0,0035$; dia 2: $p < 0,0001$; dia 3: $p < 0,0001$ e dia 11: $p = 0,0071$, respectivamente), e houve um número semelhante de células ‘‘M1’’ (F4/80⁺-CD11c⁺) e células ‘‘M2’’ (F4/80⁺-CD206⁺) nos grupos Exercício Cg (figura 19A, 19B, 19C e 19D, $p > 0,9$; para todos os dias). Em suma, esses resultados demonstram que o exercício físico regular é capaz de induzir um efeito anti-inflamatório através da modulação de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório (tipo ‘‘M2’’) no tecido muscular, bem como prevenir o aumento excessivo de macrófagos pró-inflamatórios (tipo ‘‘M1’’).

Figura 19

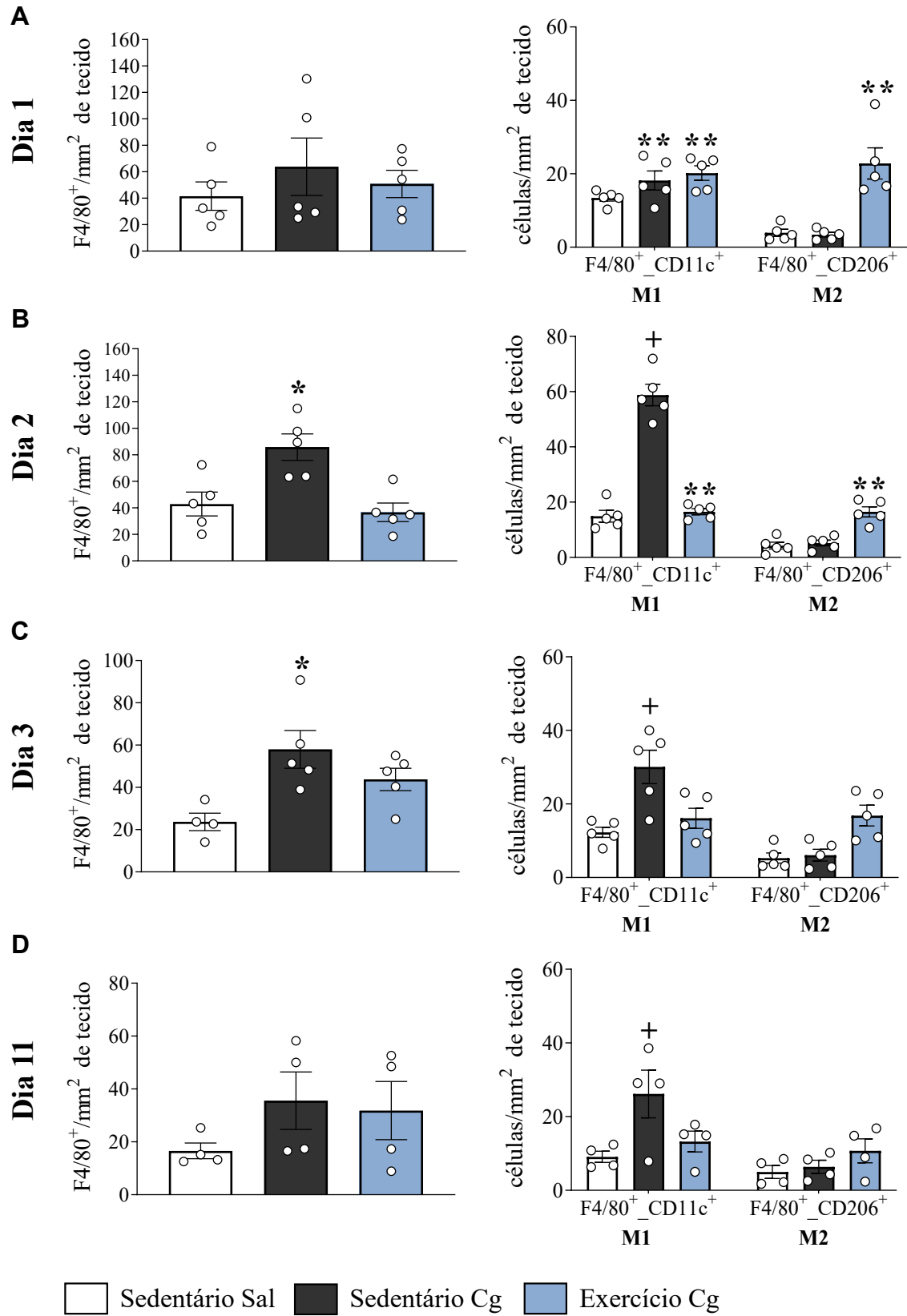


Figura 19 – Efeitos do exercício físico nos macrófagos musculares da hiperalgesia muscular aguda e persistente. A,B,C,D) Análise da quantidade de F4/80⁺ e F4/80⁺-CD11c⁺ e F4/80⁺-CD206⁺ em Sedentário Sal, Sedentário Cg e Exercido Cg no dia 1 (**A**), dia 2 (**B**), dia 3 (**C**) e dia 11 (**D**). **A**) “***” p<0,05 comparado com F4/80⁺-CD206⁺ em Sedentário Sal e Sedentário Cg (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey, F (2, 24) = 7.076; para todos). **B,C**) “***” p <0,05 comparado com F4/80⁺ em Sal Sedentário e Cg Exercitado (ANOVA de uma via, post hoc de Tukey, (B) F (2, 11) = 6.133; (C) (C) F (2, 12) = 9,37). **B,C,D**) “***” p <0,05 comparado com F4/80⁺-CD206⁺ em Sedentário Sal e Sedentário Cg. “+” p <0,05 em comparação com todos os grupos e tipos de células (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey, (B) F (2, 24) = 88,91; (C) F (3, 30) = 5.658; (D) F (3, 15) = 7,38). Para todos os gráficos: N = 4 ou 5/grupo.

5.2.3 A administração do ligante de receptores PPAR γ , 15d-PGJ₂, modula o fenótipo de macrófagos locais, envolvidos na hiperalgesia muscular aguda e persistente

A fim de investigar se a ativação de PPAR γ no tecido muscular poderia induzir a polarização de macrófagos, da mesma forma que o exercício físico regular, utilizamos da estratégia farmacológica administrando via intramuscular, o ligante endógeno de PPAR γ , previamente à injeção de carragenina. Análises de contagem demonstraram que ocorreu o aumento no número de células tipo “M2” (F4/80⁺-CD206⁺) no grupo Cg-Exercitado nos dias 1 e 2 (figura 19A e 19B, respectivamente) nos levou a testar se a ativação de receptores PPAR γ por 15d-PGJ₂ tem ação anti-inflamatória no mesmo período (figura 20, imagem representativa).

Figura 20

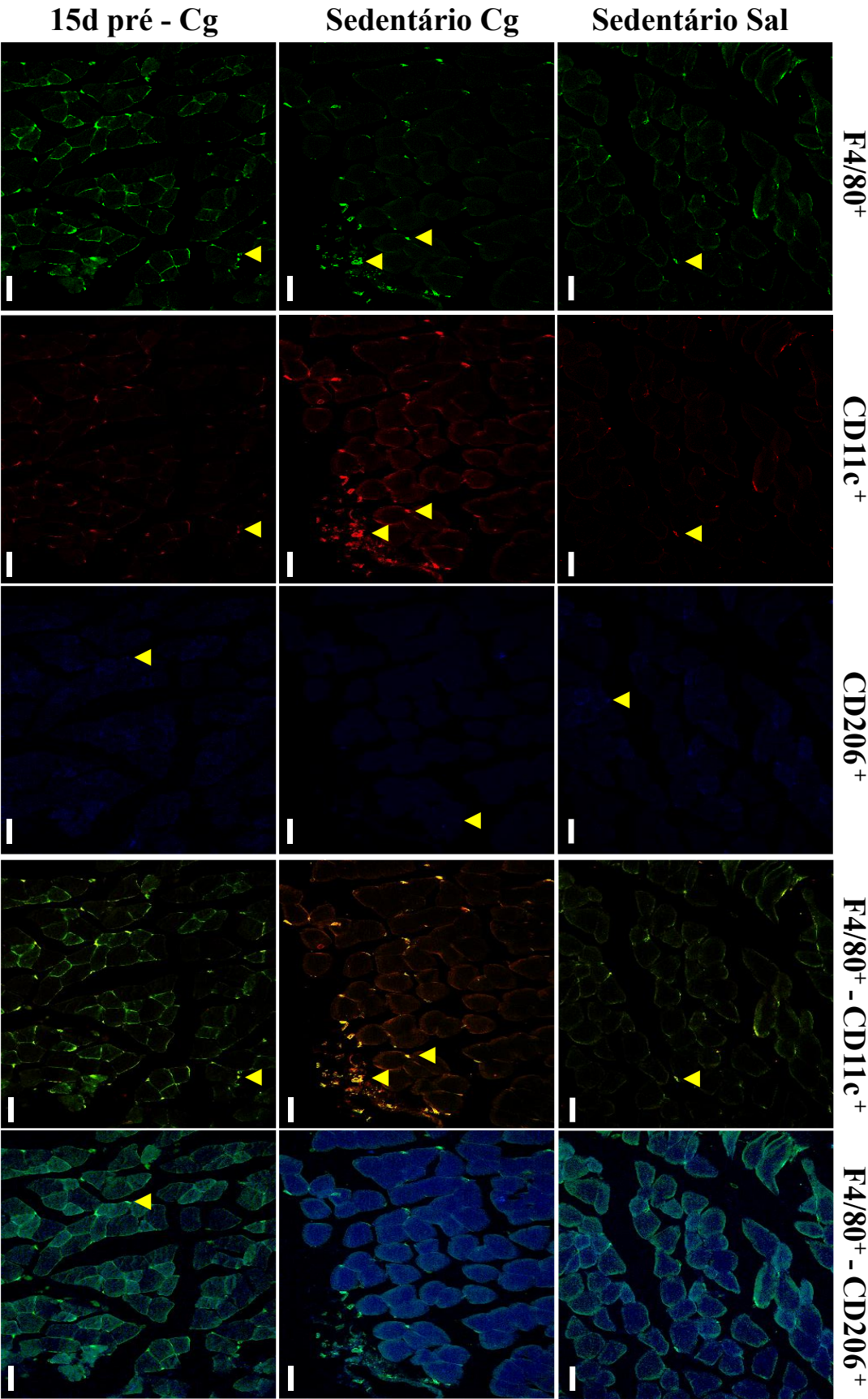


Figura 20 – Efeitos de 15d-PGJ₂ em macrófagos musculares no dia 1 da hiperalgesia muscular aguda. A) Imagens representativas do gastrocnêmio com marcador F4/80⁺ indicando macrófagos (verde, destacado pela seta amarela), marcador CD11c⁺ (vermelho, destacado pela seta amarela), marcador CD206⁺ (azul, destacado pela seta amarela) e a sobreposição F4 /80⁺-CD11c⁺ e F4/80⁺-CD206⁺ destacados por setas amarelas. Barra de escala = 100 µm. Aumento de 20 ×.

No dia 1 após a injeção de carragenina, foi possível observar o aumento do número de macrófagos tipo “M1” (F4/80⁺-CD11c⁺) no grupo Sedentário Cg, o qual não foi prevenido pela injeção de 15d-PGJ₂ (figura 21A, $p = 0,7761$ e Fig. S7). No entanto, 15d-PGJ₂ induziu um aumento no número de células “M2” (F4/80⁺-CD206⁺) quando comparado aos grupos Sedentário Cg e Sedentário Sal (figura 21A, $p = 0,0277$ e $p = 0,0392$, respectivamente). Além disso, não houve diferença entre o número de células “M2” e “M1” (F4/80⁺-CD206⁺ e F4/80⁺-CD11c⁺, respectivamente) induzidas por 15d-PGJ₂ (figura 21A, $p = 0,2575$). As análises do dia 2, demonstraram que houve aumento do número de “M1” (F4/80⁺-CD11c⁺) no grupo Sedentário Cg, que foi prevenido por 15d-PGJ₂ (figura 21B, $p < 0,0001$ e Fig. S8). No entanto, 15d-PGJ₂ não induziu um aumento no número de células “M2” (F4/80⁺-CD206⁺) quando comparados aos grupos Sedentário Cg e Sedentário Sal (figura 21B, $p = 0,3986$ e $p = 0,5829$, respectivamente). Em suma, esses resultados demonstram que a administração de 15d-PGJ₂ induz um efeito anti-inflamatório através da modulação do fenótipo de macrófagos do tecido muscular.

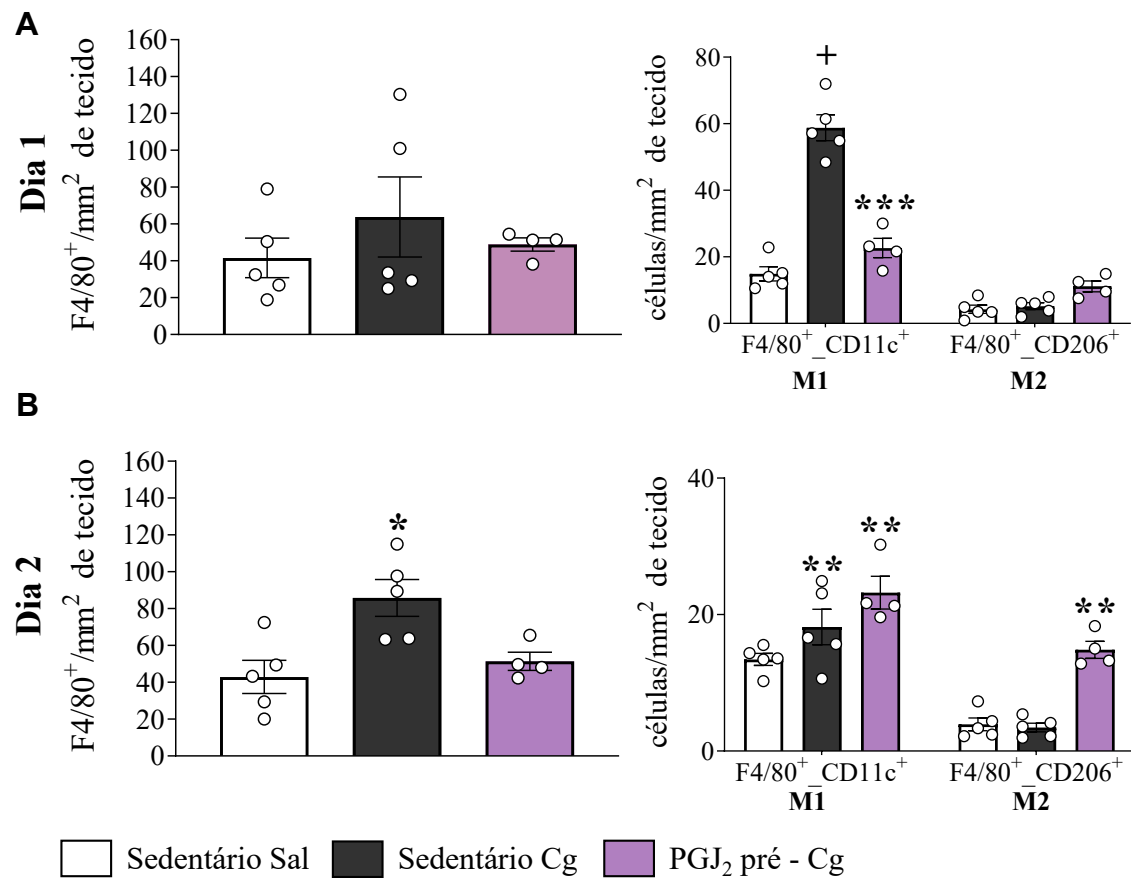
Figura 21

Figura 21 – Efeitos da injeção de 15d-PGJ₂ nos macrófagos musculares no dia 1 e no dia 2 da hiperalgesia muscular aguda. A,B) Análise da quantidade de F4/80⁺ e F4/80⁺-CD11c⁺ e F4/80⁺-CD206⁺ em Sal Sedentário, Cg Sedentário e 15d pré - Cg no dia 1 (**A**) e dia 2 (**B**). **A)** “***” p<0,05 comparado com F4/80⁺-CD206⁺ em Sedentário Sal e Sedentário Cg. “+” p<0,05 em comparação com todos os grupos e tipos de células (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey, F (3, 30) = 5,658; para todos). **B)** “*” p<0,05 comparado com F4/80⁺ em Sal Sedentário e PGJ₂ pré - Cg (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey, F (3, 15) = 0,4576). “****” p<0,05 comparado com F4/80⁺-CD206⁺ em Sedentário Sal, Sedentário Cg e PGJ₂ pré - Cg (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey, F (3, 15) = 7,38; para todos). Para todos os gráficos: N = 4 ou 5/grupo.

5.2.4 Exercício físico previne a fosforilação de p38 MAPK via receptores PPAR γ , no ambiente do músculo esquelético, em períodos relacionados à hiperalgesia muscular aguda

Uma vez que os resultados de imunofluorescência demonstraram a capacidade do exercício físico e da ativação de receptores PPAR γ em modular o fenótipo de macrófagos no tecido muscular, objetivou-se investigar se o exercício físico ativando receptores PPAR γ estaria modulando a via de sinalização dos receptores P2X₄. Para isso, avaliou-se em amostras do tecido muscular, a fosforilação de p38 MAPK. Em grupos sedentários que receberam carragenina (Cg), há um aumento na expressão de p-p38 MAPK no dia 0 (6 horas) e dia 1 após a injeção (figura 22A e 22B [dia 0], e figura 23A e 23B [dia 1]; $p < 0,0001$, para todos). Em grupos exercitados (Ex) que receberam a carragenina, a fosforilação de p38 MAPK foi prevenida em ambos os dias avaliados (figura 22A e 22B [dia 0], e figura 23A e 23B [dia 1]; $p < 0,0001$, para todos). Quando o antagonista de PPAR γ , GW9662 (GW), foi administrado em animais exercitado previamente à carragenina, a expressão de p-p38 MAPK aparece novamente aumentada tanto do dia 0 quanto no dia 1 (figura 22A e 22B [dia 0], e figura 23A e 23B [dia 1]; $p < 0,0001$, para todos).

Em grupos sedentários, a administração do antagonista de P2X₄, 5-BDBD, previamente a carragenina, previne a fosforilação de p38 MAPK no dia 0 e dia 1 (figura 22A e 22B [dia 0], e figura 23A e 23B [dia 1]; $p < 0,0001$, para todos), confirmando o envolvimento dos receptores P2X₄ nesse processo de sinalização. No dia 2, a fosforilação de p-p38 MAPK no grupo Sedentário Cg não atingiu diferença significativa (figura 24A e 22B, $p = 0,2037$).

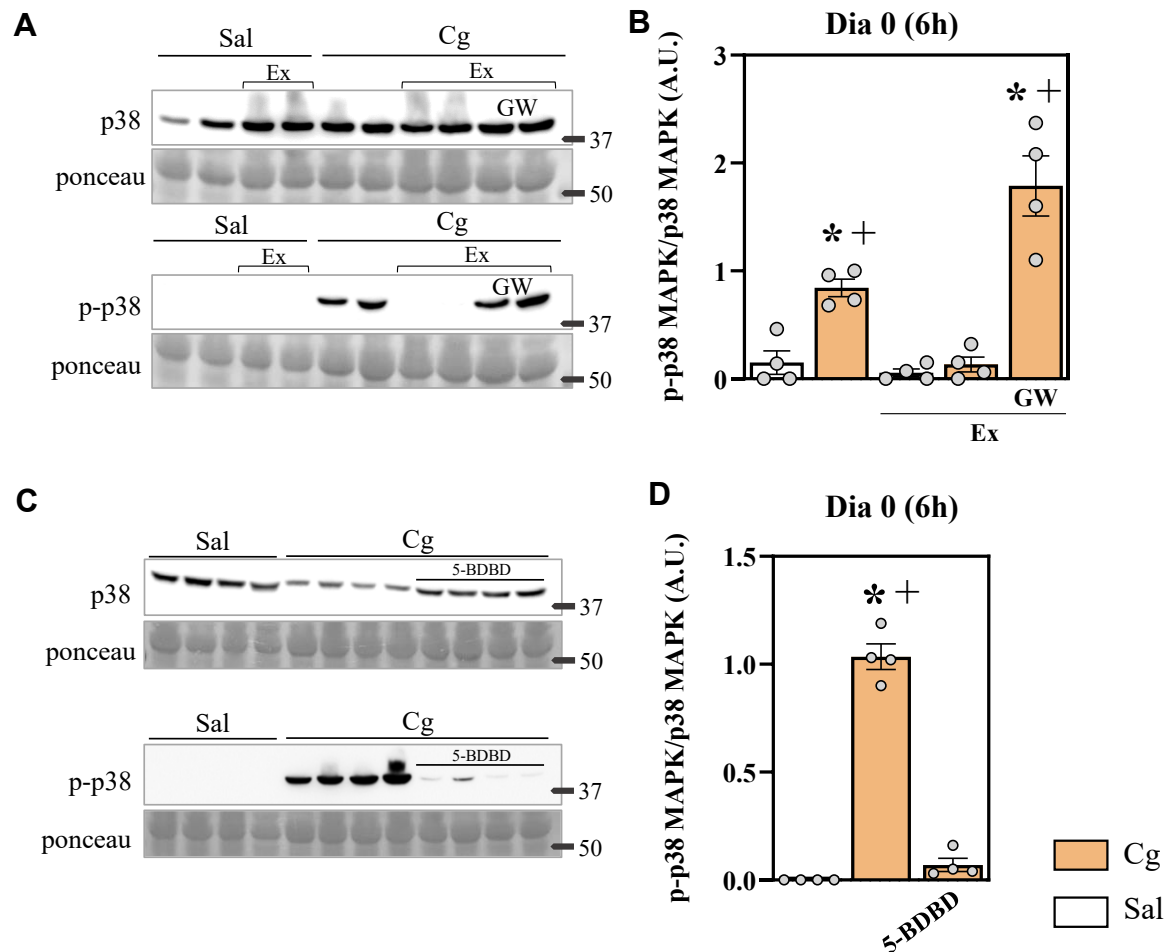
Figura 22

Figura 22 – Efeitos do exercício físico na expressão de p-p38 MAPK no músculo esquelético no dia 0, via PPAR γ . **A)** Imagem representativa de membranas de Western blotting demonstrando expressão de p38 MAPK, p-p38 MAPK e ponceau no dia 0 (6 horas), nos grupos Controle e Exercício injetados com solução salina (Sal) ou carragenina (Cg), ou Exercício Cg injetado com GW9662 (GW). **B)** Expressão de p-p38 MAPK/p38 MAPK (unidades arbitrárias [A.U.]) no dia 0 (6 horas) (ANOVA two-way post hoc de Tukey). “*” indica diferença com os grupos Controle Sal e Exercício Sal, e “+” diferença com o grupo Exercício Cg. N = 4 para cada grupo. **C)** Imagem representativa de membranas de Western blotting demonstrando expressão de p38 MAPK, proteínas p-p38 MAPK e coloração ponceau no dia 0 (6 horas), nos grupos Controle Sal, Cg e 5-BDBD + Cg. **D)** Expressão de p-p38 MAPK/p38 MAPK (unidades arbitrárias [A.U.]) no dia 0 (6 horas) (ANOVA de duas vias, post hoc de Tukey). “*” indica diferença com os grupos Controle Sal e Exercício Sal, e “+” diferença com o grupo Exercício Cg. N = 4 para cada grupo. A marcação numérica indica a altura do marcador em quilodaltons (kDa).

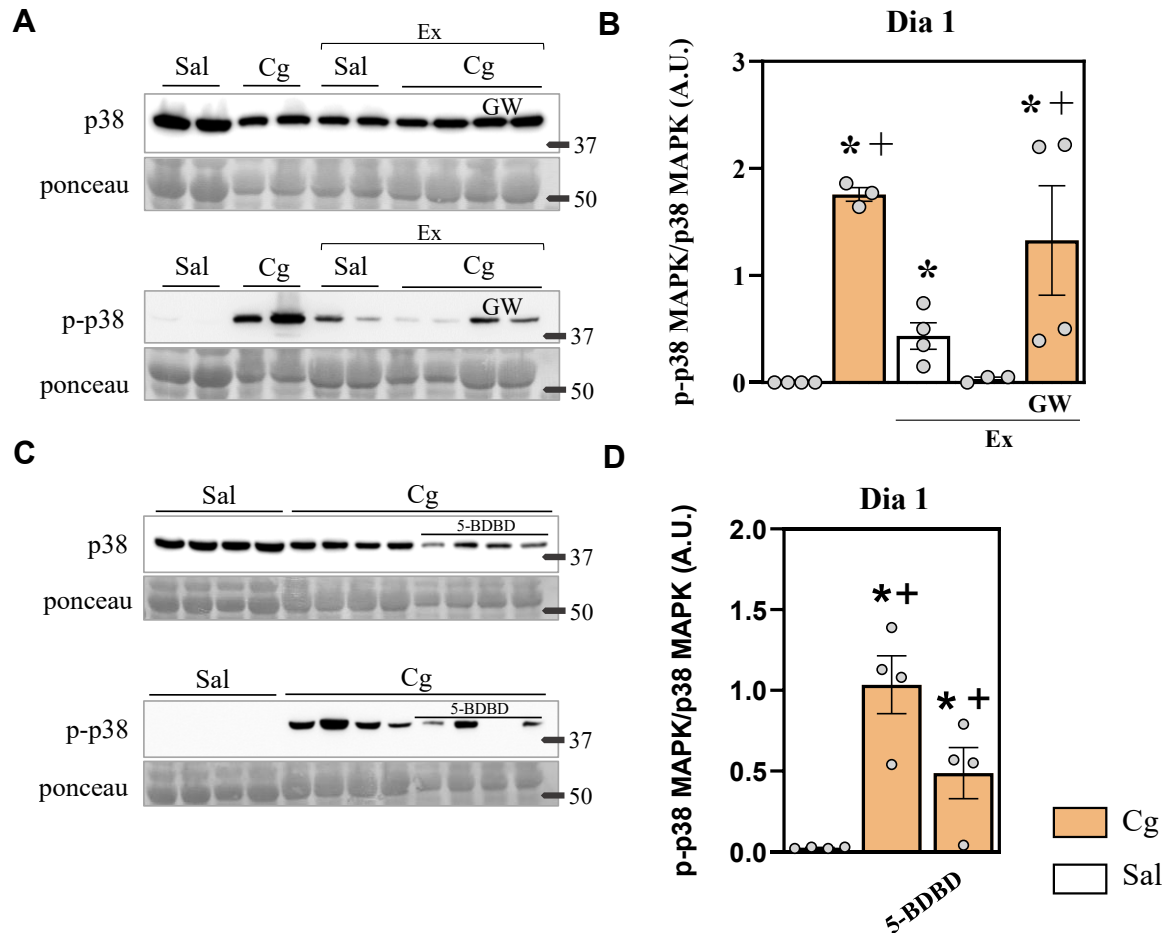
Figura 23

Figura 23 - Efeitos do exercício físico na expressão de p-p38 MAPK no músculo esquelético no dia 1, via PPAR γ . **A)** Imagem representativa de membranas de Western blotting demonstrando a expressão de p38 MAPK, proteínas p-p38 MAPK e coloração ponceau no dia 1, nos grupos Controle e Exercício injetados com solução salina (Sal) ou carragenina (Cg), ou Exercício Cg injetado com GW9662 (GW). **B)** Expressão de p-p38 MAPK/p38 MAPK (unidades arbitrárias [A.U.]) no dia 1 (ANOVA two way, post hoc de Tukey). “*” indica diferença com os grupos Controle Sal e Exercício Sal, e “+” diferença com o grupo Exercício Cg. N = 4 para cada grupo. **C)** Imagem representativa de membranas de Western blotting demonstrando a expressão de p38 MAPK, proteínas p-p38 MAPK e coloração ponceau no dia 1, nos grupos Controle Sal, Cg e 5-BDBD + Cg. **D)** Expressão de p-p38 MAPK/p38 MAPK (unidades arbitrárias [A.U.]) no dia 1 (ANOVA de duas vias, post hoc de Tukey). “*” indica diferença com os grupos Controle Sal e Exercício Sal, e “+” diferença com o grupo Exercício Cg. N = 4 para cada grupo. A marcação numérica indica a altura do marcador em quilodalttons (kDa).

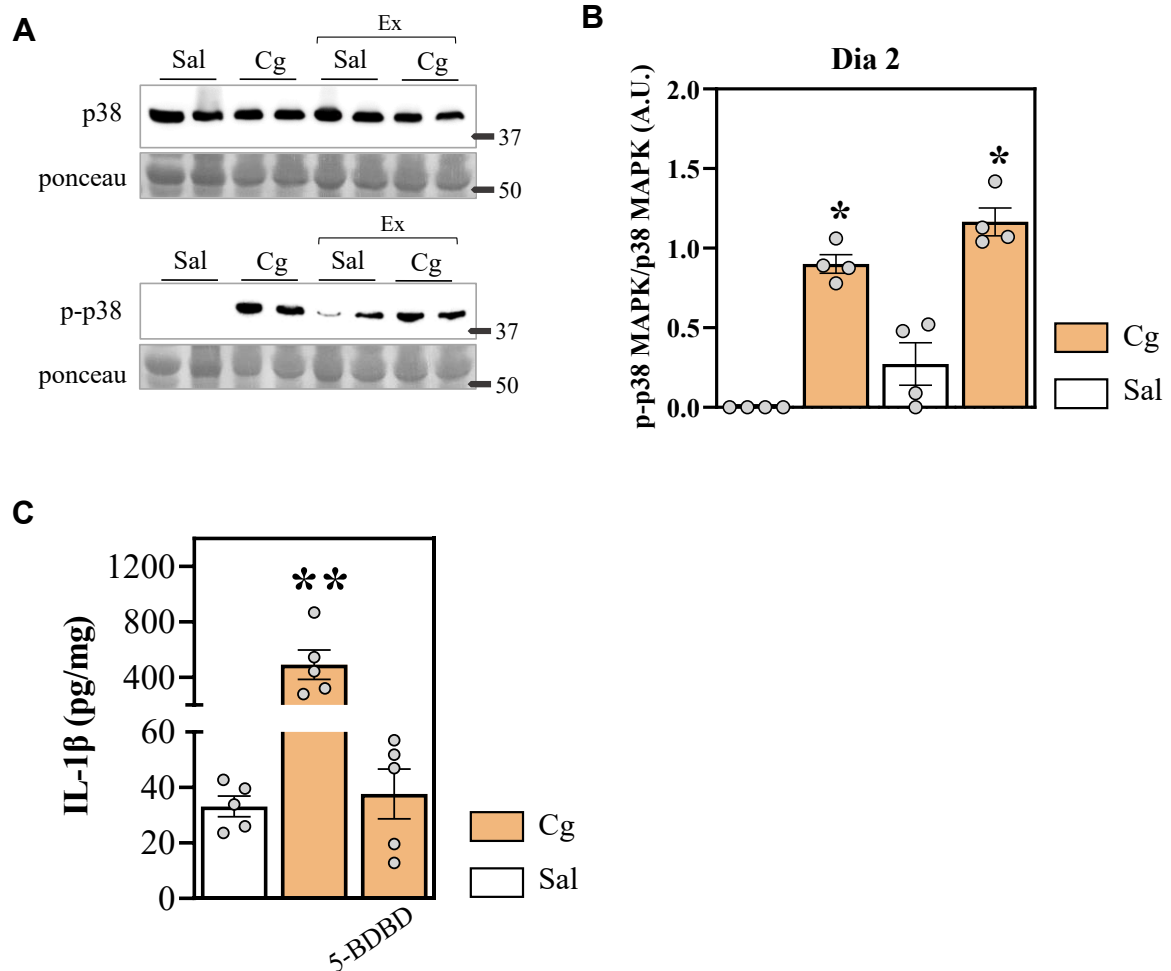
Figura 24

Figura 24 – Efeitos do exercício físico na expressão de p-p38 MAPK no músculo esquelético no dia 2, via PPAR γ . **A)** Imagem representativa das membranas de Western blotting demonstrando a expressão das proteínas p38 MAPK, p-p38 MAPK e coloração ponceau no dia 2, nos grupos Controle e Exercício injetados com solução salina (Sal) ou carragenina (Cg). **B)** Expressão de p-p38 MAPK/p38 MAPK (unidades arbitrárias [A.U.]) no dia 2 (ANOVA *two way*, post hoc de Tukey). “*” indica diferença com os grupos Controle Sal e Exercício Sal, e “+” diferença com o grupo Exercício Cg. N = 4 para cada grupo. A marcação numérica indica a altura do marcador em quilodaltons (kDa). **C)** Expressão da citocina IL-1 β em picogramas/miligramas de proteína total (pg/mg) no tecido muscular no dia 2 após a injeção nos controles salina (Sal) e Carragenina (Cg), e em um grupo que recebeu 5-BDBD anterior ao Cg. O símbolo “**” indica diferença com os grupos Sal e Cg (one-way ANOVA, post hoc de Tukey).

5.2.5 Exercício físico regular modula citocinas pró- e anti-inflamatórias através da ativação de receptores PPAR γ no tecido muscular

Uma vez que macrófagos são células com alto potencial de produção de citocinas, bem como são altamente modulados pela sinalização de PPAR γ e de P2X4, avaliamos o perfil inflamatório no tecido muscular de animais exercitados e sedentários, e se a ativação dos receptores PPAR γ pelo exercício físico, também tem um papel de modulação. Dessa forma, analisamos nos tempos de interesse, o extrato proteico do músculo gastrocnêmio de grupos controles sedentários com salina ou carragenina e os grupos exercitados inflamados e exercitados inflamados com injeção prévia de GW9662.

A análise da concentração muscular de IL-1 β não mostrou diferença significativa entre os grupos no dia 1 (figura 25A, $p > 0,05$) e um aumento para o grupo Sedentário Cg no dia 2 (figura 25A, $p < 0,0001$), o que foi prevenido pelo exercício físico (figura 25A, $p = 0,0054$). Interessantemente, em grupos exercitados, o pré-tratamento com GW9662 antes da carragenina reverteu tal benefício do exercício físico (figura 25A, $p = 0,0279$) e a concentração de IL-1 β não apresenta diferenças significativas com o grupo Sedentário Cg (figura 25A, $p > 0,05$). Além disso, quando o antagonista de 5-BDBD foi injetado antes da carragenina, a expressão de IL-1 β é diminuída quando comparada com o Controle Cg, sem diferença significativa com o grupo Controle Sal (figura 24C). Juntos, esses resultados indicam que o exercício físico ativa os receptores PPAR γ e modula a via P2X4 através da p-p38 MAPK, que gera IL-1 β no tecido muscular.

Nos dias 3 e 11, não houve diferença na concentração muscular de IL-1 β entre os grupos (figura 25A, $p > 0,05$). A análise da concentração muscular de IL-10 demonstrou que o exercício físico regular induziu um aumento na concentração muscular da citocina no grupo Exercício Cg no dia 1 após a injeção de carragenina (figura 25B) em comparação com os grupos Sedentário Sal ($p < 0,05$) e Sedentário Cg ($p = 0,0175$). Nos dias 2 e 3, não houve diferença na concentração muscular de IL-10 entre os grupos (figura 25B, $p = 0,9967$ e $p = 0,2860$, respectivamente). No entanto, no dia 11 a concentração de IL-10 está aumentada no grupo Exercício Cg, quando comparado com Sedentário Sal e Sedentário Cg (figura 25B, $p = 0,02$ e $p = 0,0007$, respectivamente). Enquanto no dia 1 esse aumento de IL-10 não foi revertido pelo pré-tratamento com GW9662 (figura 25B, $p > 0,9$), o oposto foi observado no dia 11 (figura 25B, $p = 0,0001$).

Por fim, quando analisada a concentração muscular de $\text{TNF-}\alpha$ (figura 25C), não houve diferença entre os grupos em nenhum período avaliado, bem como as análises de $\text{IL-1}\beta$ e IL-10 nos tempos de 3 horas e 6 horas após a injeção (figura 25A e 25B, $p > 0,05$). Esses dados demonstram que a ativação do receptor $\text{PPAR}\gamma$ tem importante efeito anti-inflamatório. Ainda, indicamos que o exercício físico regular é capaz de modular as citocinas $\text{IL-1}\beta$ no período agudo e a IL-10 no período persistente da hiperalgesia muscular com o envolvimento dos receptores $\text{PPAR}\gamma$.

Figura 25

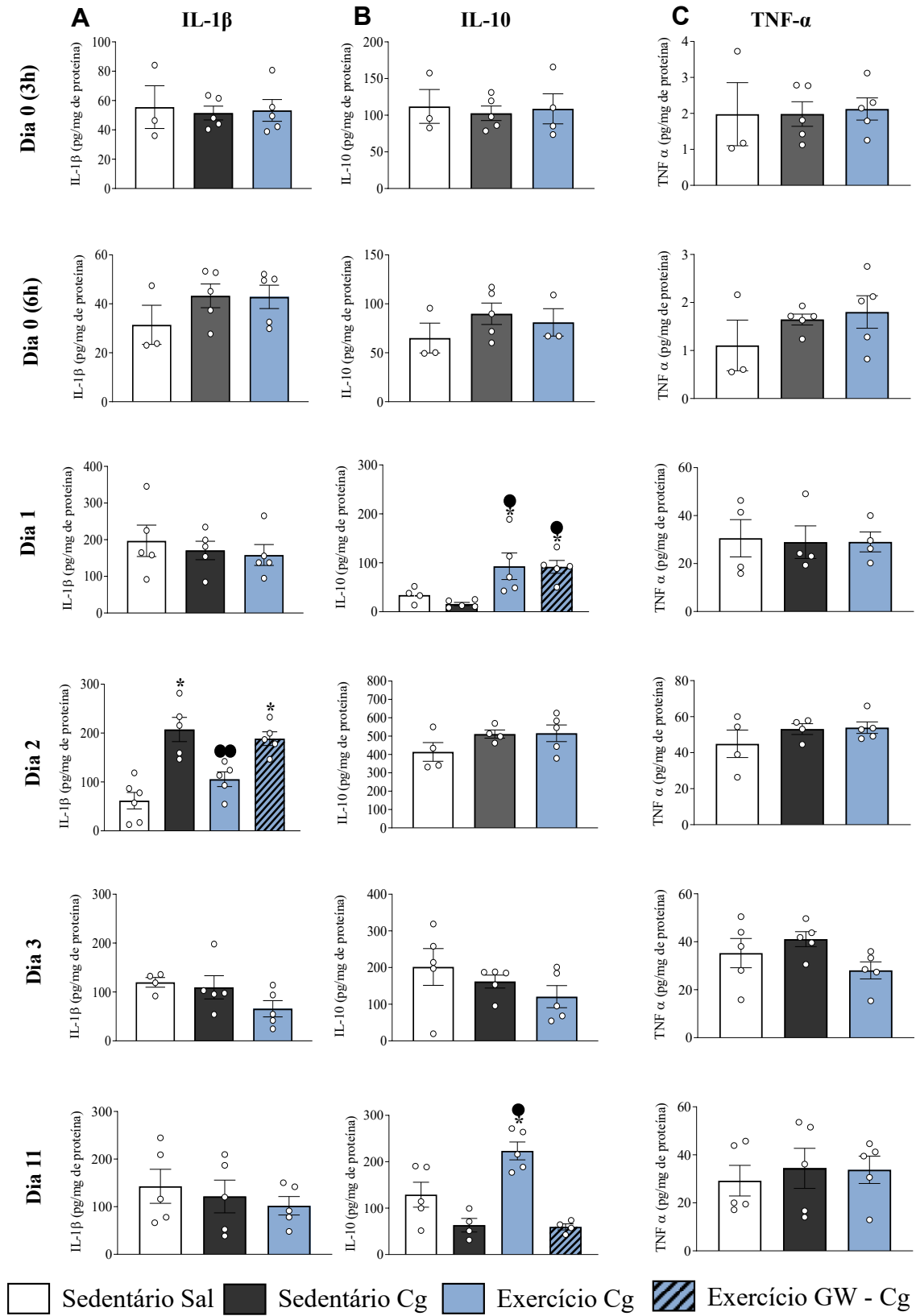


Figura 25 - Concentrações de IL-1 β , IL-10 e TNF- α no tecido muscular e os efeitos do exercício de natação. A) Concentração de IL-1 β no músculo dia 0 (3 e 6 horas), dia 1, dia 2, dia 3 e dia 11. **B)** Concentração de IL-10 no músculo dia 0 (3 e 6 horas), dia 1, dia 2, dia 3 e dia 11. **C)** Concentração de TNF- α no músculo no dia 0 (3 e 6 horas), dia 1, dia 2, dia 3 e dia 11. **A)** O Exercício Cg apresentou diferenças significativas quando comparado com os grupos Sedentário Sal, Sedentário Cg e Exercício GW pré – Cg (símbolo “●●”). Os grupos Sedentário Cg e Exercício GW pré – Cg demonstraram diferenças significativas quando comparados ao grupo Sedentário Sal (símbolo “*”; ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey; F (4, 21) = 12,15). **B)** Os grupos Exercício Cg e Exercício GW pré – Cg demonstraram diferenças significativas quando comparados com Sedentário Sal (símbolo “*”) e Cg Sedentário (símbolo “●”; ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey; F (3, 16) = 15,31; para todos). No dia 11, o grupo Exercício Cg demonstrou diferença significativa quando comparado com os grupos Sedentário Sal, Sedentário Cg (símbolo “*”) e GW exercitado pré – Cg (símbolo “●”; ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey; F (2, 11) = 14,32). Para todos os gráficos: N = 5 ou 6/grupo.

5.2.6 Expressão de PPAR γ no tecido muscular gastrocnêmio

Considerando os efeitos anti-inflamatórios induzidos pelo exercício físico regular e pela administração do ligante 15d-PGJ₂ sobre macrófagos e sobre as citocinas no tecido muscular, buscamos analisar a localização dos receptores PPAR γ no tecido muscular. Surpreendentemente, a análise de imunofluorescência qualitativa de grupos sedentários que receberam injeções de solução salina ou carragenina e grupos exercitados que receberam injeção de carragenina, demonstrou que a marcação de PPAR γ ⁺ não está co-localizada com células F4/80⁺ (figura 26A e 26B). Esses dados sugerem que os receptores PPAR γ estão expressos no tecido muscular gastrocnêmio, mas não nos macrófagos do mesmo tecido. Dessa forma, hipotetizamos que as ações do receptor PPAR γ sobre os macrófagos se dá através de uma comunicação intercelular entre miócito e macrófago.

Figura 26

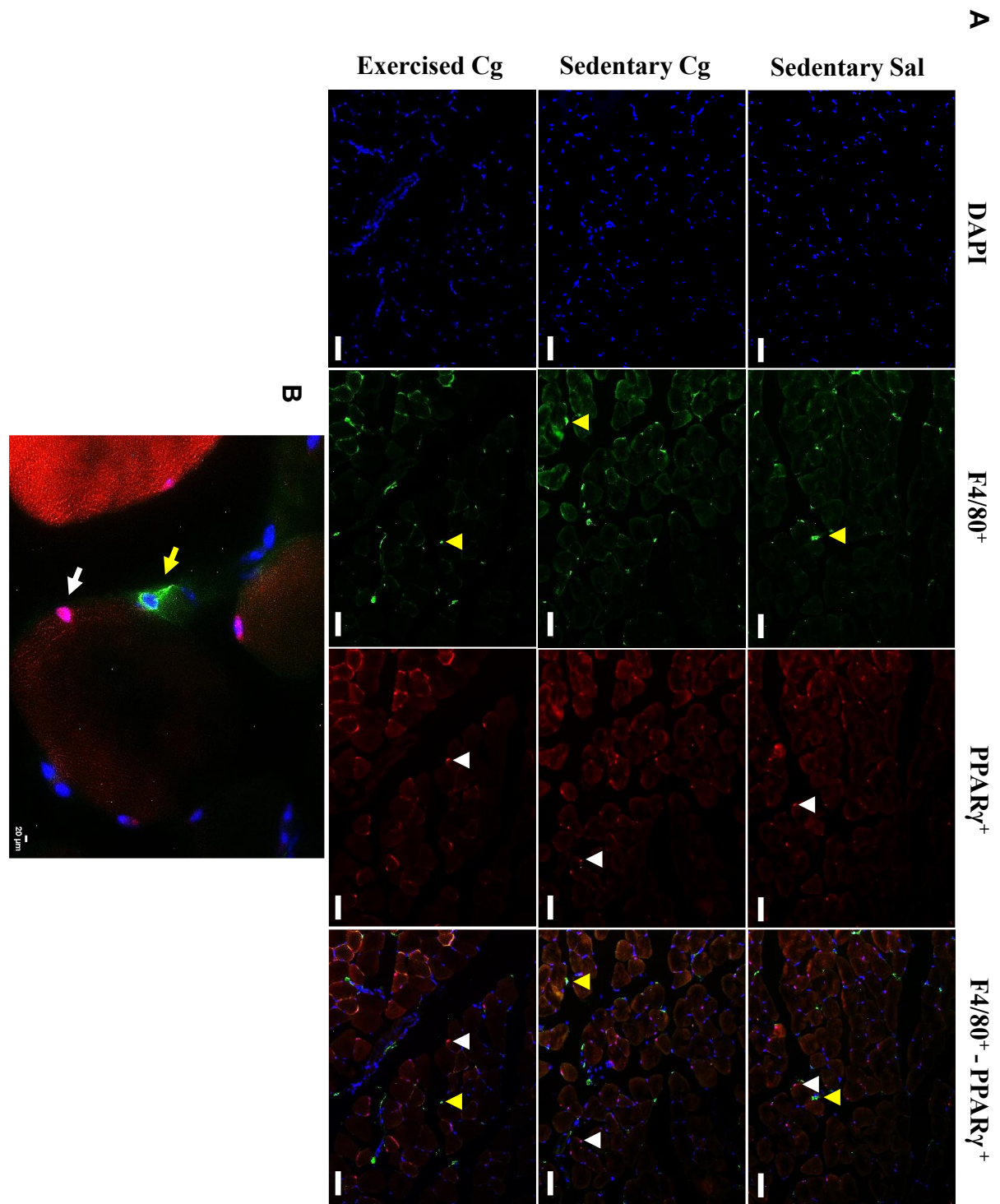


Figura 26 – Receptores PPAR γ no tecido muscular no dia 1 da hiperalgesia muscular aguda. A) Imagens representativas do músculo gastrocnêmio de animais sedentários ou exercitados, no dia 1 após injeção de carragenina (Cg) ou solução salina (Sal), com marcador F4/80⁺ indicando células macrófagos (verde, destacado pela seta amarela) e marcador de receptores PPAR γ ⁺ (vermelho, destacado por seta branca). A sobreposição dessas imagens demonstrou que a coloração F4/80⁺ e PPAR γ ⁺ não são co-localizadas. O marcador do núcleo,

DAPI, é representado em azul. Barra de escala = 100 μm . **B)** Imagem representativa da sobreposição em um aumento de 1000 $\times$ demonstrando as marcações F4/80⁺ e PPAR γ ⁺. Barra de escala = 20 μm .

6. CAPÍTULO VI: Resultados Estudo 2

A comunicação entre células a partir de citocinas produzidas por miócitos já é descrita na literatura, inclusive como um efeito que é potencializado pelo exercício físico (LAURENS; BERGOUIGNAN; MORO, 2020). Ativada por exercício físico, a proteína PGC-1 α 1 tem sido cada vez mais destacada como um fator-chave para induzir efeitos protetores gerados no músculo esquelético, tanto modulando mecanismos *in loco* quanto produzindo fatores que atingem outros órgãos (CORREIA; FERREIRA; RUAS, 2015). Uma vez que se demonstrou que a modulação de macrófagos e citocinas inflamatórias, pode ser um fator importante no processo do estabelecimento da hiperalgesia muscular persistente em um modelo de dor muscular persistente, bem como a ação do exercício físico no processo de prevenção, tornou-se de grande interesse investigar os efeitos protetores do miócito sobre a via de sinalização inflamatória do NF- κ B, sendo essa uma via de alto impacto no processo inflamatório de uma célula. Uma vez que a PGC-1 α 1 é um co-ativador do receptor PPAR γ (PUIGSERVER et al., 1998b), os resultados apresentados anteriormente sobre o receptor PPAR γ , nos levaram a investigar a habilidade anti-inflamatória da proteína PGC-1 α 1 expressa no miócito, com o objetivo de ampliar informações sobre as possibilidades de modulação da inflamação na região do tecido. Para isso, utilizamos de técnicas *in vitro* e animais transgênicos com alta expressão de PGC-1 α 1 no tecido muscular, para isolar efeitos anti-inflamatórios advindos da célula muscular. Para estimular vias inflamatórias relacionadas a proteína de interesse, NF- κ B, padronizamos o uso da proteína recombinante de TNF- α (rTNF- α) no modelo *in vitro* e tomamos vantagem do modelo de degeneração muscular induzido por injeções de cardiotoxina, já padronizado nos animais transgênicos utilizados nesse estudo.

6.1 O papel anti-inflamatório da proteína PGC-1 α 1 em cultura celular de miotubos primários

6.1.1 A super-expressão de PGC-1 α previne a expressão de genes inflamatórios relacionados ao NF- κ B, em miotubos primários

Para investigar os efeitos de PGC-1 α na sinalização de NF- κ B, inicialmente objetivamos estabelecer tempo de degradação da proteína I κ B α . Em miotubos primários, o tratamento com LPS (1 μ g/mL) não foi capaz de induzir a degradação de I κ B α (figura 27A), portanto, alternativamente utilizamos a proteína recombinante TNF- α , testada a 50 ng/mL (figura 27B) e 100 ng/mL (figura 27C) e a lise das células foi realizada aos 5, 10, 15 e 30 minutos de tratamento. A degradação de I κ B α foi visível com 100 ng/mL em 15 minutos e novamente em 60 minutos de tratamento (figura 27C), sendo 15 minutos o tempo utilizado para os experimentos subsequentes, envolvendo análise de proteínas em miotubos.

Figura 27

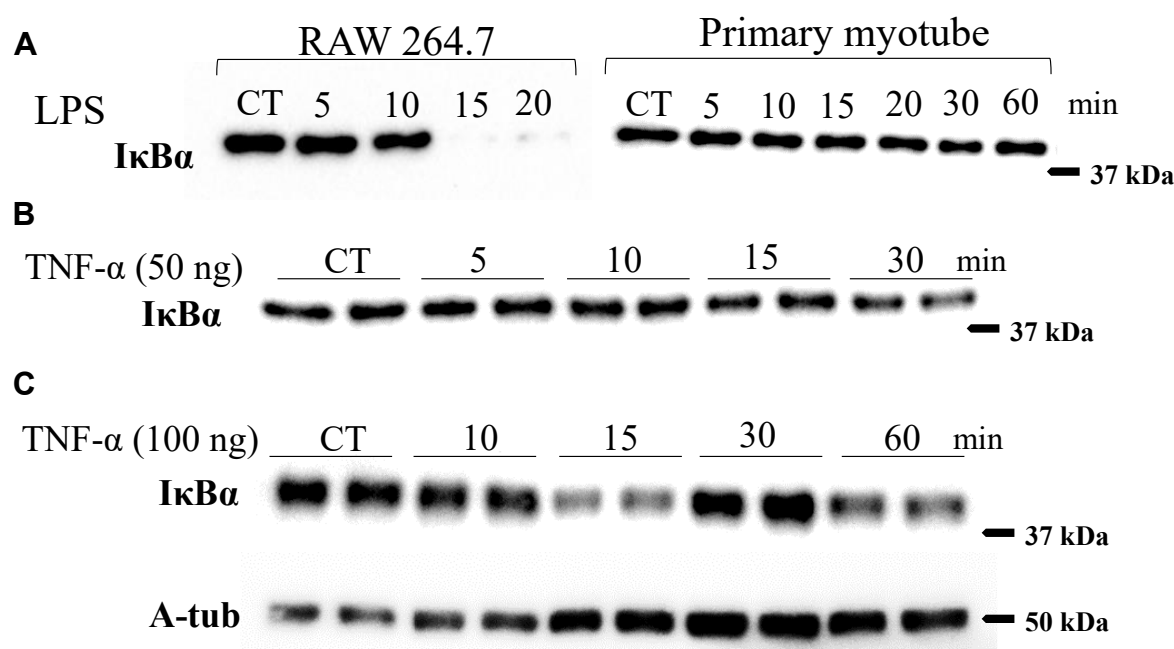


Figura 27 – Teste da degradação da proteína I κ B α em miotubos primários. A) Imagens representativas do *western blotting* da degradação de I κ B α em cultura de macrófagos RAW 264.7 e miotubos primários controles (CT) e estimulados com LPS. B,C) Imagens representativas do *western blotting* da degradação de I κ B α em cultura de macrófagos RAW 264.7 e miotubos primários controles (CT) e estimulados com TNF- α recombinante

em 50 ng/mL (**B**) ou 100 ng/mL (**C**). A marcação com números indica a altura do marcador em *kilodaltons* (kDa). Min = minutos. A-Tub = expressão da proteína endógena para a membrana representada em **C**.

Os miotubos primários diferenciados a partir de mioblastos transduzidos com adenovírus PGC-1 α 1, apresentaram maior expressão funcional da proteína PGC-1 α 1. Os miotubos-PGC-1 α 1 demonstraram tanto o aumento do gene completo *ppargc1a*, da isoforma *ppargc1a1* e os genes-alvo de PGC-1 α 1, *erra* e *cycs* (figura 28A, $p < 0,0001$). Ainda, a proteína PGC-1 α foi detectada por *western blotting*, quando comparado com os miotubos GFP (figura 28B).

Os miotubos com PGC-1 α 1 foram estimulados com rTNF- α , e a análise da expressão gênica inflamatória indicou um estado protetor nos miotubos com níveis mais elevados de PGC-1 α 1. Quando tratados com TNF- α (100 ng/mL), os miotubos PGC-1 α 1 demonstraram menor expressão gênica relativa de genes-alvo do fator de transcrição NF- κ B, *tnf*, *ccl2*, e o gene da IKK β , *ikbkb*, quando comparados com miotubos com GFP (figura 28C, $p < 0,0001$). O gene *il6* não aparece diminuído em miotubos-PGC-1 α 1 após estímulo de TNF- α (figura 28C, $p < 0,05$). Além disso, os genes-alvo da PGC-1 α 1 não são afetados pelo estímulo do TNF- α , indicando que a proteína PGC-1 α 1 permanece estável durante esse processo (figura 28A, $p < 0,0001$). Esses dados indicam que a super-expressão de PGC-1 α 1 é capaz de regular o metabolismo em miotubos primários bem como prevenir a ativação de NF- κ B, mediante à estímulo inflamatório.

Figura 28

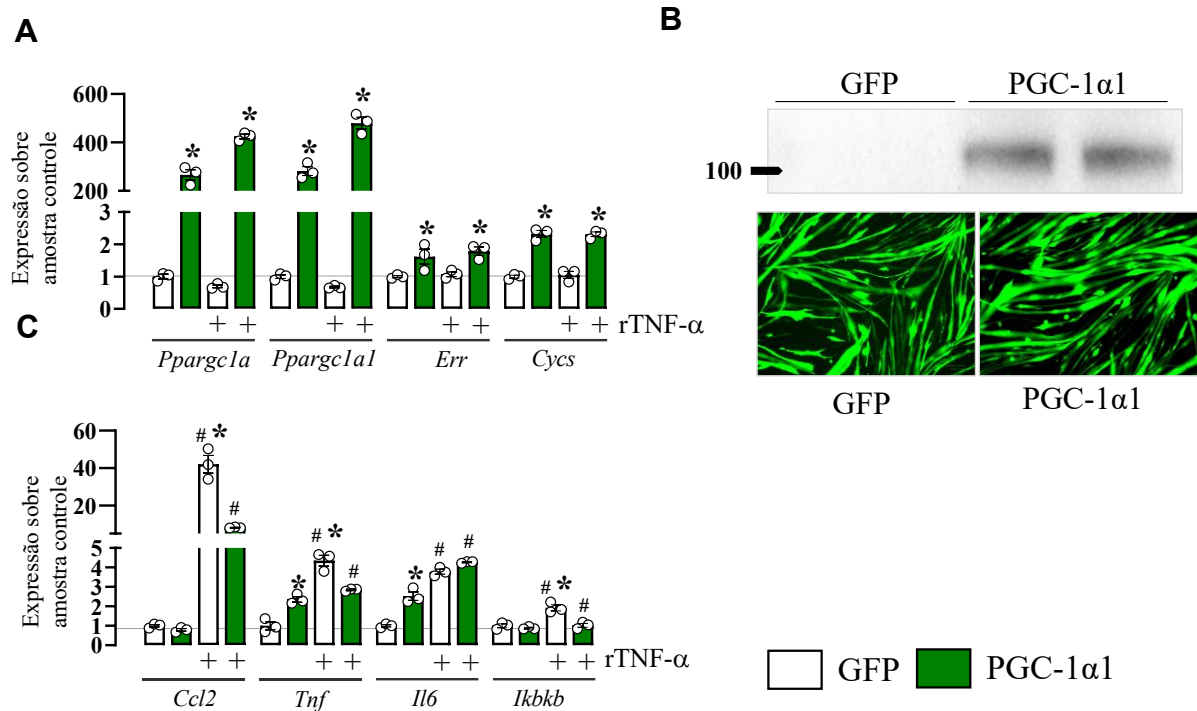


Figura 28 – Expressão de PGC-1α1 e os efeitos na expressão gênica em miotubos. **A)** Expressão de genes controles da proteína PGC-1α1 super-expressa com adenovírus, em condições basais e com estímulo de rTNF-α por 3 horas (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey; F (9, 32) = 179,3). **B)** Expressão da proteína PGC-1α1 em extrato proteico de miotubos transduzidos com adenovírus (100 = 100 *kilodaltons*) e análise de microscopia de fluorescência demonstrando a expressão da proteína-repórter GFP, sozinha ou com o gene de PGC-1α1. **C)** Expressão de genes inflamatórios em miotubos transduzidos com adenovírus para expressar GFP ou PGC-1α1, sem e com o estímulo de rTNF-α por 3 horas (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey; F (9, 32) = 64,05). Para todos os gráficos, símbolo “*” indica diferença com grupo GFP controle e símbolo “#” indica diferença com o mesmo grupo, sem e com rTNF-α.

6.1.2 A super-expressão de PGC-1α1 modula a expressão de proteínas relacionadas a NF-κB, em miotubos primários

No presente estudo, demonstramos a modulação da expressão de IκBα ou IKKβ por PGC-1α1 como uma estratégia anti-inflamatória interessante. Observou-se o aumento dos níveis de PGC-1α1 em miotubos primários o qual modulou a expressão de proteínas relacionadas a via de sinalização do fator NF-κB, tanto em estado basal, quanto após o estímulo inflamatório. Os miotubos-PGC-1α1 expressaram níveis mais elevados da proteína

I κ B α quando comparados aos miotubos-GFP (figura 29A e 29E, $p < 0,05$) e sob o estímulo de rTNF- α não foi possível observar sinais de degradação de I κ B α no tempo de 15 minutos com o estímulo de rTNF- α (Figura 29A e 29E, $p < 0,05$). Porém, após estímulo de rTNF- α , a expressão de IKK β está aumentada em miotubos-GFP, em comparação com miotubos-PGC-1 α 1 (com e sem estímulo de TNF- α , figura 29B e 29E, $p < 0,05$), indicando que a degradação de I κ B α nessas células, poderia acontecer em seguida. Além disso, foi possível observar que, sob rTNF- α , a expressão de p65 aumenta nos miotubos-GFP e permanece inalterada no grupo PGC-1 α 1 (Figura 29C e 29E, $p < 0,05$). A expressão de p50 não foi modificada pelos tratamentos (Figura 29D e 29E). Esses dados indicam que há uma modulação de PGC-1 α 1 sobre as proteínas relacionadas a via de sinalização do fator NF- κ B mesmo em estado basal, através do aumento da expressão de I κ B α , e um efeito de proteção sobre a expressão de IKK β e p65, sob estímulo inflamatório.

Figura 29

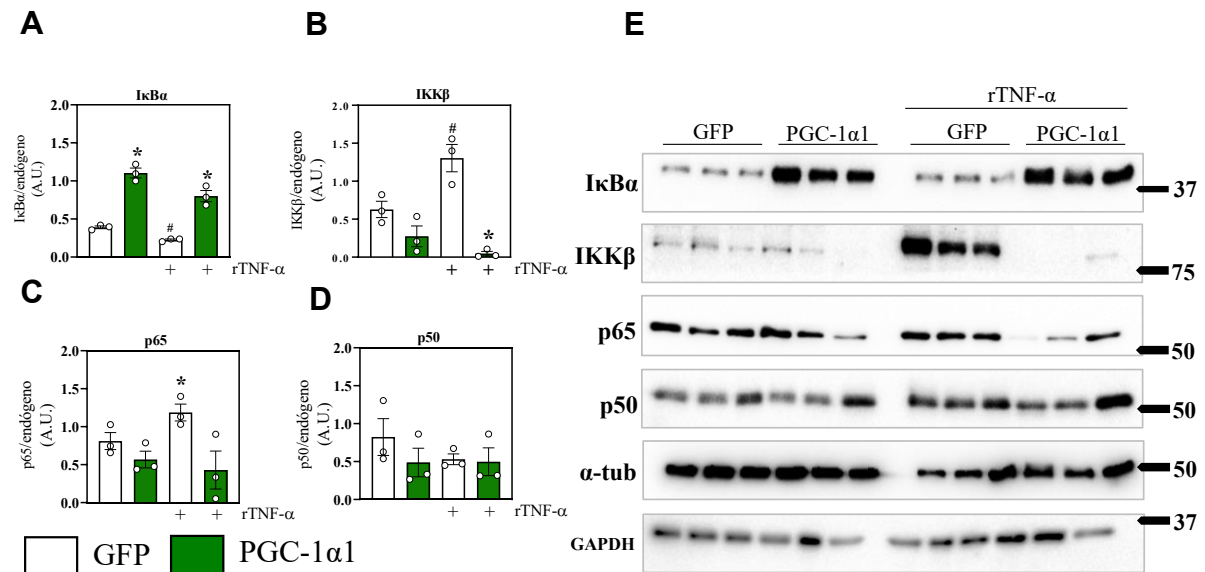


Figura 29 – Expressão de PGC-1 α 1 e os efeitos na expressão gênica em miotubos. A,B,C,D) Análise quantitativa da expressão das proteínas I κ B α (A), IKK β (B), p65 (C) e p50 (D) em miotubos com GFP ou PGC-1 α 1, controles ou estimulados com rTNF- α , por 15 minutos (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey; (A) $F(3, 8) = 19,04$; (B) $F(3, 8) = 64,09$; (C) $F(3, 8) = 4,452$; (D) $F(3, 8) = 0,7731$). E) Expressão das proteínas I κ B α , IKK β , p65 e p50 em extrato proteico de miotubos transduzidos com adenovírus GFP ou PGC-1 α 1, e controles ou estimulados com rTNF- α por 15 minutos. Números indicam altura do marcador proteico, em *kilodaltons*. Para todos os gráficos, símbolo “*” indica diferença com grupo GFP controle e rTNF- α , e símbolo “#” indica diferença com todos os grupos.

6.1.3 Confirmação do fenótipo de endurance em animais com alta expressão de PGC-1 α 1 em tecido muscular esquelético (MCK- PGC-1 α 1)

A linhagem de camundongos MCK-PGC-1 α 1 é conhecida por ter um "fenótipo oxidativo do músculo esquelético", dessa forma, usando o gastrocnêmio contralateral, a expressão de genes-alvo de PGC-1 α 1 foi avaliada, e MCK-PGC-1 α 1 demonstrou maior alteração da expressão gênica de *ppargcla1*, *erra* e *cycs*, quando comparado com animais selvagens da mesma prole (figura 30A, $p < 0,0001$). Além disso, sem nenhum treinamento físico prévio, os animais MCK-PGC-1 α 1 no presente estudo foram capazes de suportar mais tempo e, conseqüentemente, percorrer uma distância maior em teste de corrida exaustiva em esteira, utilizado para confirmar o fenótipo (figura 30B e 30C, $p < 0,05$, para ambos).

Figura 30

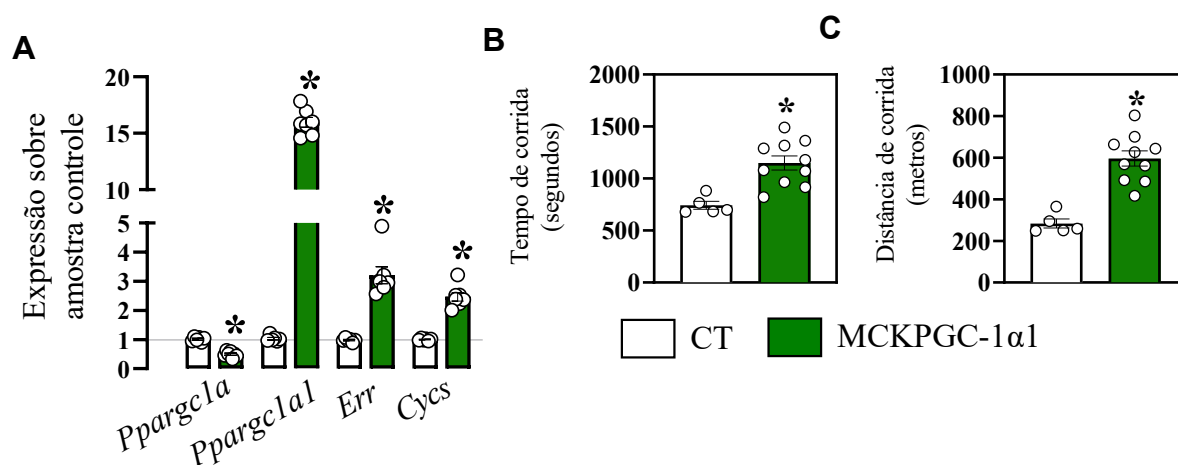


Figura 30 – Confirmação de fenótipo nos animais da linhagem MCK-PGC-1 α 1. **A)** Expressão em tecido muscular confirmam o aumento de genes-alvo da PGC-1 α 1 super-expressa especificamente em tecido muscular esquelético (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey; $F(9, 32) = 179,3$). **B,C)** Resultados extraídos do teste de “corrida até a exaustão”, de tempo de corrida (em segundos (**B**)) e distância de corrida (em metros (**C**)) (teste t de *Student* não pareado, (B) $t=4,008$, $df=13$; (C) $t=5,739$, $df=13$). Para todos os gráficos, símbolo “*” indica diferença com grupo controle, CT.

6.1.4 A super-expressão musculoesquelética de PGC-1 α 1 protege contra inflamação no tecido e mantém a qualidade funcional

Para investigar se a expressão de PGC-1 α 1 especificamente no músculo esquelético poderia modular a via de sinalização do NF- κ B em modelo *in vivo*, submetemos camundongos transgênicos MCK-PGC-1 α 1 a um modelo de dano e inflamação muscular, usando um agente miotóxico, cardiotoxina (CTX, 10 μ M, gastrocnêmio direito; controle PBS, gastrocnêmio esquerdo). A CTX induz ruptura de miofibra, aumento de marcadores inflamatórios, infiltração de células imunes, entre outros efeitos (DALLE et al., 2020).

A força muscular esquelética foi avaliada com teste de força de preensão de quatro membros, teste de suspensão de quatro membros, enquanto as possíveis alterações da coordenação motora foram acessadas usando Rotarod e análise de marcha através de corrida em esteira usando o sistema DigiGait®. Os testes de preensão e suspensão em quatro membros, bem como o teste de Rotarod, não demonstraram diferenças significativas entre os grupos ou ao longo dos tempos avaliados (basal, 2, 5 e 12 dias após a injeção de CTX; figura 31A, 31B e 31C, $p > 0,05$).

Figura 31

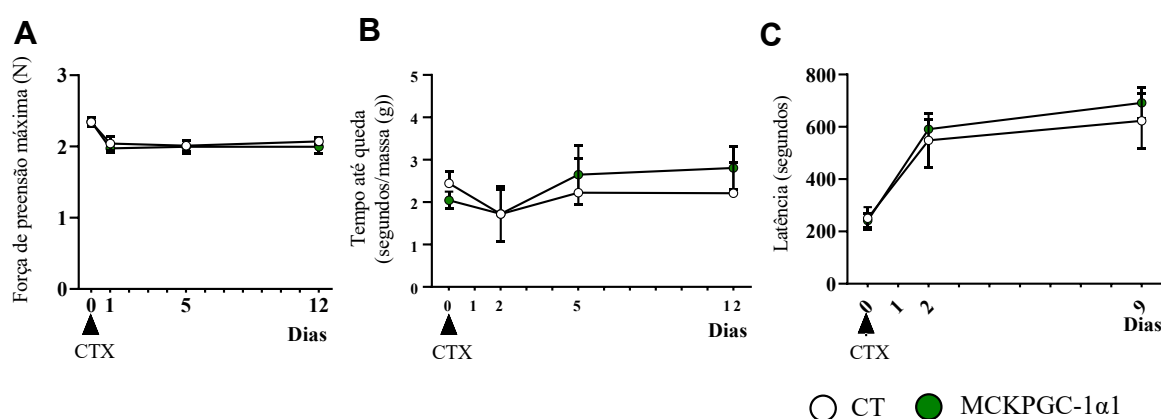
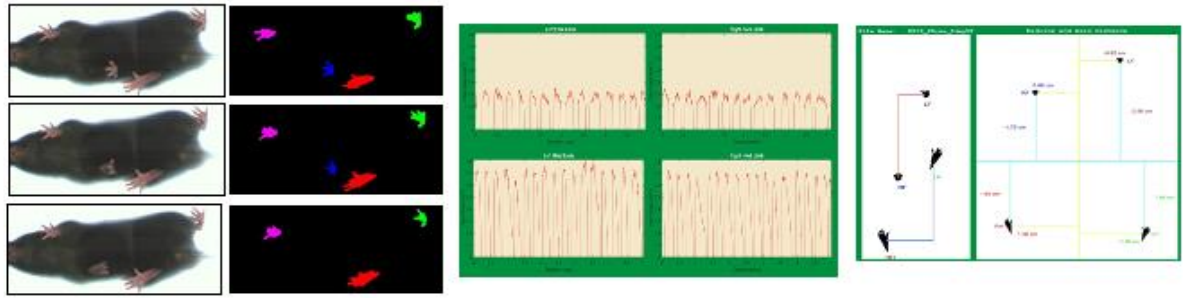


Figura 31 – Análise de força e coordenação motora em animais controles e MCK-PGC-1 α 1. A,B,C) Análise da força muscular feita pelos testes de “força de preensão” (A), “teste de suspensão” (B) e análise de coordenação motora feita com o teste de “Rotarod” (C) ao longo de 12 dias após a injeção de cardiotoxina (CTX) no músculo direito e PBS no músculo esquerdo (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey).

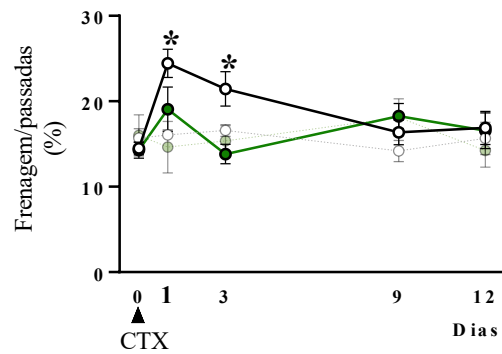
A análise da marcha foi realizada no estado basal antes das injeções (dia 0), 1, 3, 7 e 14 dias após a injeção de CTX, tanto em camundongos de tipo selvagem quanto transgênicos. Foi possível observar uma mudança significativa nos parâmetros de frenagem e propulsão, relacionados com a fase da passada em que a pata se encontra em contato com o solo. Ao normalizar esses dados pela duração total da passada (em segundos), no grupo controle (CT), a fase de frenagem corresponde à uma proporção maior de tempo, enquanto a propulsão corresponde à uma proporção menor do tempo de ciclo da marcha, comparando com sua pata contralateral e com MCK-PGC-1 α 1 grupo nos dias 1 e 3 após a injeção (figura 32B e 32C, $p < 0,05$). Considerando o tempo bruto nos dias 1 e 3, o grupo CT demonstrara um aumento significativo no tempo de frenagem (em segundos) e uma diminuição no tempo de propulsão (em segundos), quando comparados com sua pata contralateral (figura 32D e 32E, $p < 0,05$). Em comparação ao MCK-PGC-1 α 1, há uma diferença significativa do parâmetro de frenagem nos dias 1 e 3, e no parâmetro de propulsão no dia 3 (figura 32D e 32E, $p < 0,05$). Esses dados indicam que, a alta expressão de PGC-1 α 1 no músculo esquelético induz uma prevenção da desqualificação da função mecânica da estrutura muscular.

Figura 32

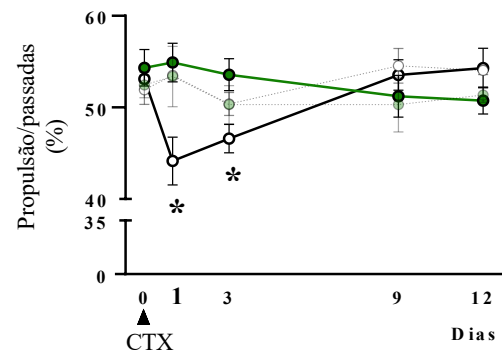
A



B

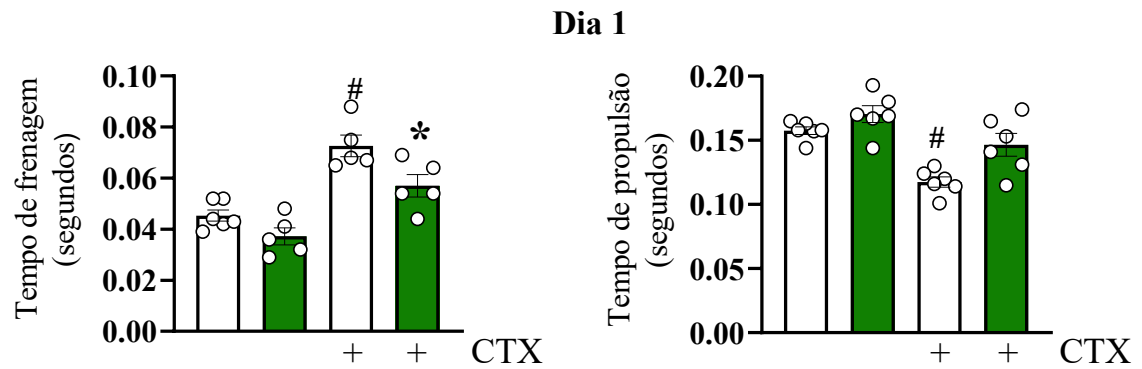


C



D

○ CT - CTX ● MCKPGC-1α1 - CTX ○ CT - PBS ● MCKPGC-1α1 - PBS



E

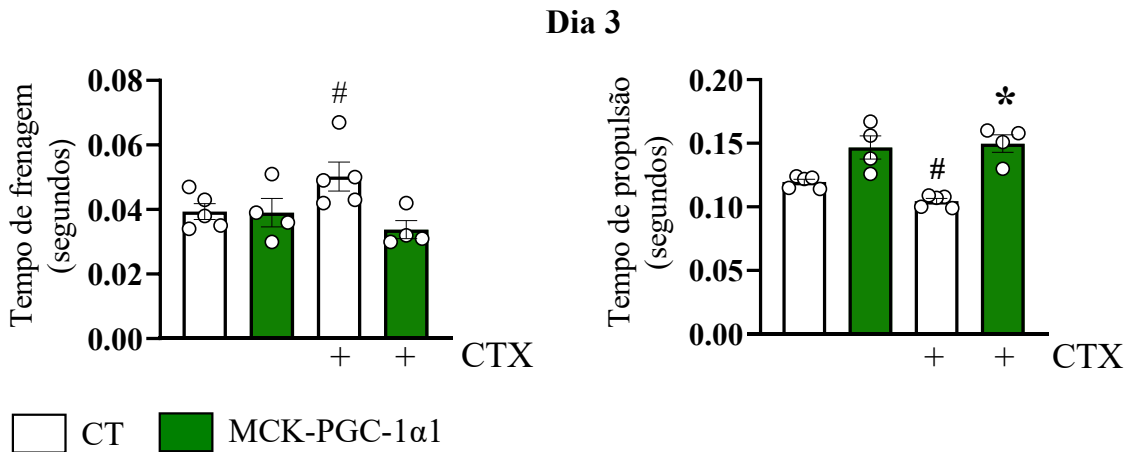


Figura 32 – Análise de parâmetros de caminhada em animais controles e MCK-PGC-1 α 1. **A)** Imagens representativas dos *frames* utilizados para análise de parâmetros de caminhada, e dos dados gerados e analisados pelo software DigiGait®. **B,C)** Curva temporal da análise da proporção de tempo de frenagem normalizado sobre o número total de passadas (frenagem/passadas, %; **(B)**) e do tempo de propulsão sobre o número total de passadas (propulsão/passadas, %; **(C)**) ao longo de 12 dias após as injeções (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey; $F(9, 64) = 57,24$). Símbolo “*” indica diferença significativa do grupo controle CT – CTX com grupo MCK-PGC-1 α 1-CTX. **D,E)** Análise dos resultados brutos para o tempo de frenagem e de propulsão (ambos em segundos) no dia 1 **(D)** e dia 3 **(E)** após as injeções de PBS e CTX (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey). Símbolo “*” indica diferença significativa do grupo MCK-PGC-1 α 1-CTX com CT-CTX. Símbolo “#” indica diferença significativa do grupo CT-CTX com seu músculo PBS.

6.1.5 MCK-PGC-1 α 1 apresentam expressão aumentada de I κ B α no músculo esquelético e prevenção a inflamação

Para acessar a inflamação a partir da atividade do fator de transcrição, os genes-alvo de NF- κ B foram avaliados em músculo gastrocnêmio de MCK-PGC-1 α 1 e animais selvagens da mesma prole, injetados com CTX ou PBS. A expressão gênica foi avaliada nos dias 1, 3, 7 e 14. No dia 3 após a injeção, onde a análise da marcha demonstrou diferenças funcionais significativas entre os grupos, foi possível observar uma melhor recuperação no grupo MCK-PGC-1 α . A análise de expressão gênica demonstrou que *ikbkb*, *ccl2*, *tnf* e *il6* estão elevados no dia 1 tanto no gastrocnêmio ipsilateral do grupo controle CT, quanto do grupo MCK-PGC-1 α 1, sem diferenças significativas entre eles (figura 33A, $p < 0,05$). No entanto, no dia 3 após a injeção de CTX, o grupo MCK-PGC-1 α 1 demonstrou uma menor expressão dos genes inflamatórios, onde curiosamente o *ikbkb* aparece diminuído quando comparado com o grupo controle CT também injetados com CTX (figura 33B, $p < 0,05$). Nos dias 7 e 14 após a injeção, não há diferenças significativas entre os grupos e nem entre os músculos CTX e PBS (não mostrado).

Figura 33

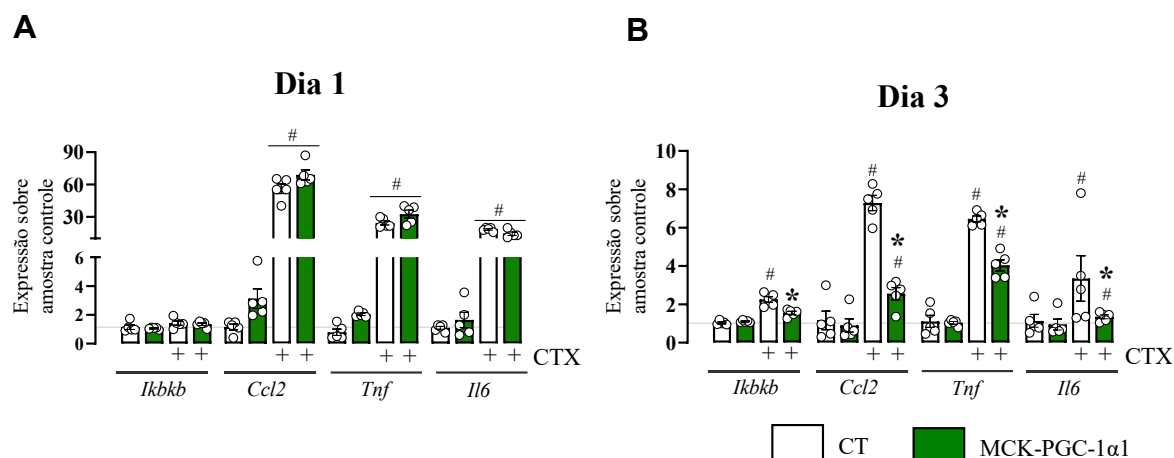


Figura 33 – Efeitos anti-inflamatórios no músculo de animais MCK-PGC-1α1. A,B) Expressão em tecido muscular demonstrando a prevenção em animais MCK-PGC-1α1 do aumento de genes inflamatórios no dia 1 (A) e dia 3 (B) após as injeções de cardiotoxina (CTX) e PBS (músculo esquerdo) (ANOVA *two-way*, post hoc de Tukey; (A) $F(9, 64) = 57,24$; (B) $F(9, 64) = 47,34$). Para todos os gráficos, símbolo “#” indica diferença do músculo injetado com CTX e seu respectivo controle PBS, e símbolo “*” indica diferença entre os grupos CT e MCK-PGC1α1 injetados com CTX.

Com isso, as proteínas relacionadas a via de sinalização do NF-κB foram avaliadas no músculo gastrocnêmio, no dia 3 após a injeção de CTX. Foi observado uma modulação proteica, semelhante aos resultados *in vitro*. No músculo esquelético do grupo MCK-PGC-1α1, a expressão de IκBα está aumentada tanto no gastrocnêmio injetado com CTX quanto no contralateral, em comparação com grupo controle (figura 34A, 34B e 34C, $p < 0,05$). No período avaliado, não foi possível visualizar a degradação de IκBα em nenhum dos grupos (figura 34A, 34B e 34C, $p > 0,05$). Além disso, a expressão de IKKβ está aumentada no músculo de animais controles injetados com CTX, quando comparado com MCK-PGC-1α1 (figura 34B e 34D, $p < 0,05$). Juntos, esses dados indicam que MCK-PGC-1α1 possui um músculo esquelético protegido com maior expressão de IκBα. As isoformas de NF-κB, p65 e p50, demonstram uma tendência a serem diminuídas no gastrocnêmio MCK-PGC1α1 injetado com CTX, porém não demonstram significância estatística (Figura 34B, 34E e 34F, $p > 0,05$).

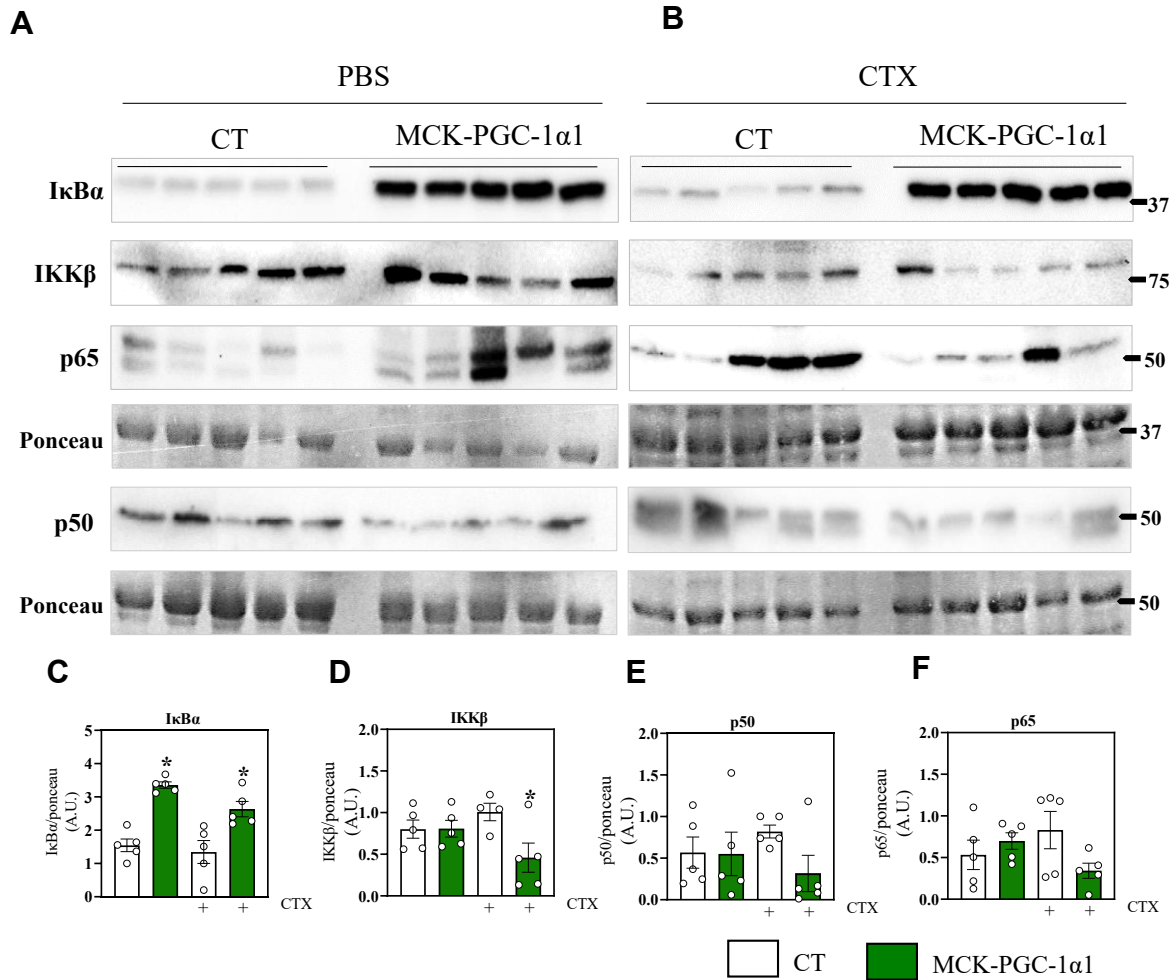
Figura 34

Figura 34 – Expressão de PGC-1α1 e os efeitos anti-inflamatórios no músculo esquelético. **A,B)** Expressão das proteínas IκBα, IKKβ, p65 e p50 em extrato proteico do tecido muscular injetado com veículo controle (PBS, músculo esquerdo **(A)**) ou com cardiotoxina (CTX, músculo direito **(B)**) e extraídos 3 dias após a injeção. Números indicam altura do marcador proteico, em *kilodaltons*. **C,D,E,F)** Análise quantitativa da expressão das proteínas IκBα **(C)**, IKKβ **(D)**, p50 **(E)** e p65 **(F)** em tecido muscular de animais controles (CT) ou MCK-PGC-1α1, 3 dias após a injeção de PBS (músculo esquerdo) ou cardiotoxina (CTX, músculo direito) (ANOVA *one-way*, post hoc de Tukey; (C) $F(3, 16) = 16,51$; (D) $F(3, 15) = 3,031$; (E) $F(3, 16) = 1,075$; (F) $F(3, 16) = 1,797$. Para todos os gráficos, símbolo “*” indica diferença com grupo CT injetados com PBS ou CTX.

7. CAPÍTULO VII

7.1 Discussão do Estudo 1

Neste estudo, demonstramos que o exercício físico regular preveniu a hiperalgesia muscular mecânica aguda e persistente através da modulação de fenótipos de macrófagos, citocinas inflamatórias e da ativação de P2X4, envolvendo a ativação de receptores PPAR γ . Muitos estudos anteriores realizados em humanos e animais experimentais mostraram que rotinas de exercícios induzem hipoalgesia (BOBINSKI et al., 2016, 2018; BRITO; RASMUSSEN; SLUKA, 2017; LANDMARK et al., 2011, 2013; LEUNG et al., 2016; LIMA et al., 2017; NAUGLE et al., 2014b; NAUGLE; NAUGLE; RILEY, 2016). Neste estudo, através de um modelo de hiperalgesia muscular persistente induzida por estímulos inflamatórios leves, também demonstramos claramente que o exercício físico regular previne a transição de estados de dor muscular inflamatória aguda para persistente. O protocolo de exercício de natação utilizado para este estudo consistiu em sessões repetitivas com aumento gradual de volume para permitir uma adaptação muscular fisiológica ao exercício (DE ARAUJO et al., 2015; KUPHAL; FIBUCH; TAYLOR, 2007). Como não foi detectado aumento dos níveis séricos de corticosterona, o efeito hipoalgésico do exercício de natação não foi atribuído à analgesia induzida pelo estresse (HILL et al., 2008). O que permite a investigação de mecanismos relacionados a este efeito do exercício físico no tecido muscular.

Em estudo anterior, demonstramos em modelo de ratos que o exercício regular de natação previne o estabelecimento da hiperalgesia muscular inflamatória aguda por um mecanismo dependente dos receptores PPAR γ locais (DE AZAMBUJA et al., 2020). Agora, nossos resultados demonstram que o exercício físico previne não apenas a hiperalgesia muscular aguda, mas também a fase persistente do modelo, através da ativação dos receptores PPAR γ na região do tecido muscular avaliado. Tal ativação foi confirmada pela reversão dos efeitos preventivos do exercício em ambas as fases, tanto pela administração de antagonista seletivo de PPAR γ antes da injeção de carragenina, bem como o bloqueio dos receptores PPAR γ imediatamente antes da PGE₂ em animais exercitados previamente sensibilizados pela carragenina, mostrando também que reverteu o efeito preventivo do exercício na hiperalgesia muscular persistente. Demonstrando dessa forma, que a modulação dos receptores PPAR γ pelo exercício tem efeitos duradouros. É importante ressaltar que em trabalho anterior mostrou-se que a ativação de receptores PPAR γ em animais sedentários por seu agonista não

seletivo 15d-PGJ₂, antes da administração de carragenina, reduz a hiperalgesia muscular aguda (SANTOS et al., 2020). A mesma tendência foi observada aqui para a prevenção da hiperalgesia muscular persistente. No entanto, quando 15d-PGJ₂ foi administrado antes de PGE₂ em animais sedentários previamente sensibilizados por carragenina, não houve alteração na hiperalgesia muscular persistente. Apesar disso, a ativação de receptores PPAR γ por 15d-PGJ₂ esteja bem documentada para reduzir efetivamente a dor inflamatória (HASEGAWA-MORIYAMA et al., 2013; RUIZ-MIYAZAWA et al., 2018). Juntos, esses dados sugerem que a transição da dor muscular aguda para persistente prevenida pelo exercício físico regular depende de mecanismos desencadeados pelo exercício que podem interagir com a ativação direta de receptores PPAR γ e/ou suas vias relacionadas.

A redução da hiperalgesia muscular mecânica aguda e persistente observada no presente estudo, quando os macrófagos foram depletados antes da administração de carragenina é consistente com estudos que demonstram o papel dos macrófagos no desenvolvimento da dor muscular persistente demonstrada em modelos de fadiga muscular e dor muscular não inflamatória (GONG et al., 2016; GREGORY et al., 2016). Os resultados também demonstram que os macrófagos contribuem para o desenvolvimento da hiperalgesia muscular inflamatória aguda e sua transição para o estado persistente. Curiosamente, a depleção de macrófagos imediatamente antes da PGE₂ em animais previamente sensibilizados por carragenina também reduziu a hiperalgesia muscular persistente, sugerindo que o segundo insulto ao tecido muscular, responsável por induzir a hiperalgesia muscular persistente, também possui envolvimento dos macrófagos. Fica evidente o envolvimento dos macrófagos no processo da hiperalgesia muscular e na cronificação da dor. Com isso, a fim de aprofundar o envolvimento dos macrófagos nessa transição, demonstramos *in vitro* que a ativação dos receptores P2X4 expressos na membrana, está envolvida tanto com a polarização para fenótipos inflamatórios quanto com a ativação de vias de sinalização (fosforilação de p38 MAPK) relacionadas a inflamação (GRACE et al., 2016; ULMANN; HIRBEC; RASSENDREN, 2010). No mesmo sentido, no músculo de animais submetidos ao modelo inflamatório, também observamos um aumento na ativação da via de sinalização de P2X4, uma vez que a ativação de p38 MAPK por fosforilação está aumentada no músculo esquelético na fase aguda da hiperalgesia muscular, indicando que o envolvimento dos macrófagos na indução da fase aguda, inclui a ativação dos receptores P2X4 (OLIVEIRA-FUSARO et al., 2020), sendo esse processo importante para o estabelecimento da fase persistente. Dessa forma, fortalecendo a ideia de que o macrófago do músculo esquelético

possui vias de sinalização, com papéis fundamentais no processo de indução da dor muscular inflamatória, da mesma forma que em outros tipos de dores (BERNIER; ASE; SÉGUÉLA, 2017; TSUDA et al., 2003).

A importância da modulação dos macrófagos para o processo doloroso também pôde ser observada com um papel preventivo, uma vez que observamos que a redução da hiperalgesia muscular mecânica aguda e persistente por injeção intramuscular dos macrófagos peritoneais tratados com o agonista 15d-PGJ₂ *in vitro* mostra que há uma relação entre a ativação de receptores PPAR γ e macrófagos, contribuindo para a redução da hiperalgesia muscular inflamatória aguda e transição para o estado persistente. Nessa cultura, a 15d-PGJ₂ induziu um aumento qualitativo na co-marcação para macrófagos anti-inflamatórios, marcados com F4/80⁺-CD206⁺ (HASEGAWA-MORIYAMA et al., 2012; PENAS et al., 2015), sugerindo que a ativação de receptores PPAR γ polariza os macrófagos a um fenótipo anti-inflamatório e, conseqüentemente, previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente.

Também demonstramos que o exercício físico regular polariza os macrófagos do tecido muscular para um fenótipo anti-inflamatório (IKEDA et al., 2013; LEUNG et al., 2016). Dessa forma, nossos resultados em conjunto com a literatura, suportam a hipótese de que o exercício físico e a ativação de PPAR γ modulam os fenótipos de macrófagos do músculo criando um ambiente anti-inflamatório protetivo, durante a fase aguda da hiperalgesia muscular, cujo principal efeito é a prevenção da persistente. Essa modulação envolveu tanto o aumento de células anti-inflamatórias, marcadas por F4/80⁺-CD206⁺ (fenótipo anti-inflamatório) na fase aguda quanto a prevenção do aumento de células pró-inflamatórias, marcadas por F4/80⁺-CD11c⁺ (fenótipo pró-inflamatório) nas fases aguda e persistente. Enquanto no primeiro dia de hiperalgesia muscular aguda não houve aumento de macrófagos pró-inflamatórios nos animais sedentários, já foi observado aumento de células anti-inflamatórias para os grupos exercitados. No dia 2, o exercício evitou o aumento de células pró-inflamatórias e o número de células anti-inflamatórias permaneceu elevada. No terceiro e 11º dias, o exercício também evitou o aumento de macrófagos pró-inflamatórios e o número de células anti-inflamatórias retornou aos níveis basais. Além disso, em ambas as fases, o grupo sedentário apresentou mais células pró-inflamatórias do que anti-inflamatórias, enquanto o grupo exercitado apresentou número semelhante de ambas as células. Finalmente, 15d-PGJ₂ também aumentou as células anti-inflamatórias na fase aguda, consistente com

outros estudos (BOUHLEL et al., 2007b; PENAS et al., 2015), e preveniu o aumento de células pró-inflamatórias.

Os dados sugerem que os macrófagos pró-inflamatórios são células envolvidas na indução da hiperalgesia muscular aguda, relacionados ao processo de *priming* e indução da hiperalgesia persistente. Porém, uma vez instalado esse processo e induzido a neuroplasticidade, o macrófago parece não ser essencial para a manutenção da hiperalgesia persistente. Além disso, demonstramos que o exercício físico regular modula rapidamente o sistema imunológico para equilibrar a proporção de macrófagos com fenótipo pró e anti-inflamatório e cria um ambiente anti-inflamatório. Esses dados levantam a hipótese de que o ambiente anti-inflamatório desencadeado pelo exercício físico no tecido muscular envolve os receptores PPAR γ e a modulação de fenótipos de macrófagos.

Além da modulação do fenótipo dos macrófagos, vias de sinalização de proteínas especificamente expressas nessas células, podem ter um papel fundamental na modulação da inflamação. Os resultados apresentados confirmam a expressão dos receptores P2X4 em macrófagos no tecido muscular, e a fosforilação da quinase p38 MAPK como uma via de sinalização do receptor (como observado nos resultados *in vitro*, tanto em células primárias, quanto em linhagem). Outros estudos demonstraram a ativação de p38 MAPK por fosforilação, via ação de P2X4, produzindo citocinas a partir de macrófagos (BODE; EHLTING; HÄUSSINGER, 2012; LALISSE et al., 2018; MATSUZAWA et al., 2012; OLIVEIRA-FUSARO et al., 2020; ULMANN; HIRBEC; RASSENDREN, 2010). Além disso, a fosforilação de p38 MAPK tem sido associada com vias de nocicepção (BINSHTOK et al., 2008; DAULHAC et al., 2006; MANJAVACHI et al., 2010). Não havia associação entre a ativação de receptores P2X4, expressão de p-p38 MAPK e a indução da hiperalgesia muscular aguda e persistente.

Aqui nós demonstramos por análises proteicas o aumento da ativação de p38 MAPK por fosforilação, no tecido muscular de animais sedentários injetados com carragenina, logo após a injeção (dia 0, 6h), perdurando no dia 1 e diminuindo a ativação no dia 2, acompanhando a hiperalgesia muscular aguda e o aumento de macrófagos pró-inflamatórios descritos anteriormente. O envolvimento dos receptores P2X4 nesse processo, é confirmado quando o antagonista previne a fosforilação nesses dois períodos, além da polarização de macrófagos poder ser correlacionada com a ativação do P2X4, como descrito *in vitro*. A ativação por fosforilação de p38 MAPK é prevenida em animais exercitados

injetados com carragenina, e de maneira muito interessante, essa prevenção envolve a ativação dos receptores PPAR γ no tecido muscular, uma vez que com o antagonista, os grupos exercitados demonstraram aumento da fosforilação, sugerindo que o receptor PPAR γ possui um efeito sobre a via de sinalização do receptor P2X4. Os mecanismos pelos quais esse processo ocorre precisam ser elucidados, podendo envolver interações proteicas diretas ou indiretas, ou ainda estar relacionada com modulação da proporção de macrófagos pró- ou anti-inflamatório no tecido, que podem expressar mais ou menos o receptor P2X4.

Os fenótipos pró e anti-inflamatórios dos macrófagos estão relacionados à liberação de diferentes citocinas. Ainda, a ativação de receptores P2X4 tem sido associada com o aumento de proliferação de células imunes (LEDDEROSE et al., 2018) e da concentração de citocinas inflamatórias (OLIVEIRA-FUSARO et al., 2020; TU et al., 2017; ULMANN; HIRBEC; RASSENDREN, 2010). Macrófagos com fenótipo pró-inflamatório produzem citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez contribuem para a ativação ou sensibilização dos nociceptores (FERRARI; BOGEN; LEVINE, 2010; MANJAVACHI et al., 2010; PAREDES; OLSEN SARAIVA CAMARA; BRAGA, 2019). Por outro lado, macrófagos polarizados para um fenótipo anti-inflamatório promovem um controle da inflamação e redução da sensibilização nociceptiva através da liberação de citocinas anti-inflamatórias (LEUNG et al., 2016; SANIN; PRENDERGAST; MOUNTFORD, 2015).

Ainda, não podemos excluir a possibilidade da ação primária de neutrófilos no processo inflamatório e sua contribuição para a indução da hiperalgesia aguda e persistente. Estudo anterior do nosso grupo, demonstrou que o aumento da expressão da citocina pró-inflamatória CINC-1 no início da hiperalgesia muscular inflamatória aguda, medida três horas após a injeção intramuscular de carragenina (DE AZAMBUJA et al., 2020). Agora, resultados mostram que também há o envolvimento de interleucinas no período agudo da hiperalgesia muscular (2 dias após a administração de carragenina), onde a concentração muscular de IL-1 β aumentou. Em contrapartida, na fase aguda o TNF- α permaneceu o mesmo (LORAM et al., 2007). Vale considerar que modulações na concentração de TNF- α podem ter acontecido, mas não foram captados pela sensibilidade do *kit* de análise. Ainda, não foi detectado aumento na concentração muscular de TNF α e IL-1 β para o período persistente de hiperalgesia muscular. Indicando que as citocinas inflamatórias são essenciais para a fase de indução da hiperalgesia persistente, porém não estão relacionados a manutenção.

A ação direta (revisada em SCHÄFERS; SORKIN, 2008) e indireta (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; POOLE et al., 1995; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995b) da IL-1 β na hiperalgesia, foram propostas como tendo ações em neurônios nociceptivos, apoiando a hipótese de que a maior concentração de IL-1 β no tecido muscular contribuiu para a manutenção da hiperalgesia muscular inflamatória aguda, mas não persistente. A ligação de IL-1 β em seu receptor IL-1r é capaz de induzir a fosforilação de receptores NMDA no neurônio primário que facilitam a sinalização da dor persistente (GUO et al., 2007; ZHANG et al., 2008). Dessa forma, as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias estão envolvidas no processo de indução da dor e transição para um estado persistente.

Em indivíduos saudáveis, o exercício físico regular diminui as citocinas pró-inflamatórias e aumenta as citocinas anti-inflamatórias (GRACE et al., 2016; JANKORD; JEMIOLO, 2004; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Nosso estudo confirmou esse efeito anti-inflamatório através da modulação das citocinas do exercício e mostrou ainda que esse benefício se aplica tanto à fase aguda quanto à persistente da hiperalgesia muscular, uma vez que a concentração muscular de IL-10 aparece aumentada nas fases aguda e persistente, e também pelo fato de que o exercício preveniu o aumento da concentração muscular de IL-1 β na fase aguda (ROSS et al., 2018). A produção de IL-10, associada ao aumento de macrófagos anti-inflamatórios, parece ser um fator importante para a proteção anti-inflamatória do músculo esquelético.

Também mostramos que os receptores PPAR γ contribuíram para a modulação de ambas as citocinas; porém, para a IL-10, apenas na fase persistente. O mecanismo pelo qual os receptores PPAR γ contribuem seletivamente para a modulação dessas citocinas em animais exercitados ainda precisa ser mais bem compreendido. A ativação dos receptores PPAR γ é capaz de controlar a expressão gênica relacionada a vias anti-inflamatórias (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010) e modulação da polarização de macrófagos anti-inflamatórios (ABDALLA et al., 2020; DANIEL et al., 2018). Além disso, a ativação dos receptores PPAR γ reduz a ativação do fator NF- κ B e a produção de IL-1 β (CANNAVINO et al., 2014; HOU; MOREAU; CHADEE, 2012; KIM et al., 2017; REMELS et al., 2009). Ainda, não podemos excluir a possibilidade da interação direta ou indireta entre os receptores PPAR γ e receptores P2X4, e dessa ser uma via pelo qual o exercício físico induz o controle da produção de citocinas no ambiente do tecido muscular. Porém essa hipótese precisa ser investigada de maneira mais aprofundada.

Em suma, demonstramos a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias, corroborando com o tempo de macrófagos polarizados. Também verificamos que o exercício físico equilibrou a proporção de macrófagos pró- e anti-inflamatórios em ambas as fases da hiperalgesia muscular. Além disso, que o exercício é capaz de prevenir a ativação de vias do receptor P2X4. Dessa forma, sugerimos fortemente que os efeitos preventivos do exercício físico na hiperalgesia muscular aguda e na transição para a persistente envolve, pelo menos em parte, mecanismos de ativação dos receptores PPAR γ e consequente modulação de elementos inflamatórios. É importante ressaltar que nossa análise de imunofluorescência indica que os receptores PPAR γ são expressos no tecido muscular gastrocnêmio, mas não nos macrófagos, suportando a hipótese de um potencial *crosstalk* entre células musculares esqueléticas e macrófagos (PILLON et al., 2013).

Pensando nisso, sabe-se que o músculo esquelético adapta-se ao exercício físico aeróbio e induz mecanismos de comunicação intercelular, principalmente através da ação da proteína co-ativadora de receptor proliferador de peroxissomos gama-1 alfa, a PGC-1 α (CORREIA; FERREIRA; RUAS, 2015). Considerando que os níveis de PGC-1 α aumentam, mesmo que transitoriamente, nas células musculares de animais exercitados (BOTTA et al., 2013; GENG et al., 2010) e podem modular os efeitos anti-inflamatórios induzidos por exercício físico através de uma via parácrina em monócitos/macrófagos (EISELE; HANDSCHIN, 2014; FURRER et al., 2017), a ativação do PGC-1 α parece ser uma importante via relacionada aos efeitos preventivos do exercício físico no controle de vias inflamatórias, potencialmente relacionadas ao processo de cronificação da dor muscular. Com isso, esses resultados levaram ao desenvolvimento do **Estudo 2**.

7.2 Discussão do Estudo 2

Considerando que a ativação da PGC-1 α no tecido muscular parece ser uma importante via de controle da inflamação subjacente aos efeitos preventivos do exercício físico, o **Estudo 2** foi desenvolvido. O metabolismo do músculo esquelético tem sido cada vez mais associado ao seu estado de saúde, à manutenção de uma funcionalidade adequada e à saúde geral do corpo, tornando importante a compreensão sobre a PGC-1 α e suas vias regulatórias. O comprometimento do metabolismo oxidativo do músculo esquelético é

observado em doenças relacionadas à inflamação sistêmica persistente de baixo grau, como obesidade e diabetes (AHMADIAN et al., 2013; KELLEY et al., 2002; MOOTHA et al., 2003). Além disso, a ativação do NF- κ B é capaz de prejudicar a atividade oxidativa do músculo esquelético (REMELS et al., 2014) e está relacionada com a atrofia do músculo esquelético (HUNTER et al., 2002). A relação entre exercício físico e diminuição da inflamação está sendo amplamente estabelecida, não apenas em animais (MINEGISHI et al., 2015), mas também em seres humanos (BALDUCCI et al., 2010; DUNN et al., 2021; PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003; SCHNYDER; HANDSCHIN, 2015). Sendo a PGC-1 α 1 ativado pelo exercício físico (BOTTA et al., 2013; PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003) e um co-ativador chave que regula o programa de transcrição gênica do tecido muscular, para um melhor fenótipo oxidativo (denominado *endurance*) (CALVO et al., 2008; KUPR; HANDSCHIN, 2015; LIN et al., 2002; RUAS et al., 2012), a ativação da PGC-1 α 1 expressa no músculo esquelético, é uma estratégia terapêutica que precisa ser amplamente investigada.

Neste **Estudo 2**, os resultados demonstraram que em miotubos primários a elevada expressão de PGC-1 α 1 induzida por adenovírus (RUAS et al., 2012) e expressão de PGC-1 α 1 condicionada em modelo animal transgênico (LIN et al., 2002), resultou em uma proteína PGC-1 α 1 funcional onde os genes-alvo, regulados pela ação do co-ativador, estão elevados, de acordo com a literatura. Para investigar a via inflamatória, primeiramente tornou-se importante estabelecer um bom sistema experimental *in vitro* para estudar a relação entre PGC-1 α 1 e inflamação decorrente da ativação da sinalização de NF- κ B, o que foi estabelecido por experimentos *in vitro* envolvendo células mioblastos da linhagem C2C12 e mioblastos primários advindos de camundongos selvagens C57BL/6J. Além disso, verificamos que em camundongos transgênicos MCK-PGC-1 α 1, a expressão elevada de PGC-1 α 1 no músculo esquelético induziu um fenótipo de resistência aeróbica (*endurance*), acompanhado pela modulação de genes alvo aumentados, como esperado (LIN et al., 2002). Assim, miotubos derivados de células primárias e músculo esquelético de camundongos transgênicos foram considerados adequados para os desafios deste estudo.

As vias metabólicas e inflamatórias estão intimamente relacionadas. Até onde sabemos, os mecanismos envolvendo NF- κ B, exercício físico e PGC-1 α 1, no músculo esquelético, não foram estabelecidos. No entanto, foi demonstrado que as vias de PGC-1 α 1 e NF- κ B se sobrepõem, onde em diferentes contextos, uma pode modular a outra. Sob níveis

fisiológicos de PGC-1 α 1 no músculo, a ativação de NF- κ B através da estimulação de TNF- α , induz a perda da função oxidativa de PGC-1 α 1 (REMELS et al., 2013, 2014). Já em células cardíacas, a estimulação de TNF- α diminuiu a expressão de PGC-1 α através da ativação de NF- κ B (PALOMER et al., 2009). Apesar disso, tem sido apresentado de maneira consistente que quando em condições prévias à inflamação, o aumento da ativação de PGC-1 α 1 e concomitantemente o desenvolvimento do fenótipo oxidativo em miotubos e em modelos animais, são capazes de proteger contra a resposta inflamatória exacerbada (DINULOVIC et al., 2016; EISELE et al., 2013, 2015; EISELE; HANDSCHIN, 2014; LÉVEILLÉ et al., 2020; YANG et al., 2017). Da mesma forma, os resultados em nosso estudo demonstraram que o aumento da expressão de PGC-1 α 1 em miotubos primários, induz uma proteção ao estímulo de rTNF- α onde os genes inflamatórios *tnf* e *ccl2* aparecem negativamente regulados, quando comparados com miotubos controles GFP também estimulados com rTNF- α . O mesmo efeito protetivo também é observado ao comparar animais transgênicos MCK-PGC-1 α 1 injetados com CTX intramuscular, com camundongos selvagens também injetados, consolidando a potencialidade anti-inflamatória da ativação de PGC-1 α 1 no músculo esquelético.

Em conjunto com os efeitos protetivos sobre a expressão gênica, no presente estudo demonstramos que a alta expressão de PGC-1 α 1 modula esse perfil inflamatório do músculo esquelético induzindo modificações no nível de sinalização da proteína NF- κ B, tanto em miotubos primários quanto no modelo animal de cardiotoxina. Os resultados demonstraram que em miotubos com alta expressão de PGC-1 α 1 e no músculo esquelético dos camundongos MCK-PGC-1 α 1, a expressão de I κ B α é aumentada já em um estado basal, quando comparado com GFP ou camundongos selvagens, respectivamente. Esses dados sugerem que os efeitos anti-inflamatórios no tecido muscular podem advir de efeitos a longo prazo da expressão de PGC-1 α 1, capaz de estabelecer um estado protetor, contra a ativação da sinalização de NF- κ B. Curiosamente, os resultados também demonstram que o aumento *in vitro* e *in vivo* da PGC-1 α 1 previne o aumento do gene *ikbkb* sob estímulo nocivo (rTNF- α ou CTX, respectivamente), indicando que a PGC-1 α 1 pode estar envolvido na regulação do gene de IKK β . O fator de transcrição envolvido nesses processos, tanto o aumento de I κ B α ou regulação de *ikbkb* e IKK β , permanece a ser investigado.

Os co-ativadores de PGC-1s modulam a ação de diversos fatores de transcrição. O receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α) tem sido sugerido como um contribuinte para a redução dependente de PGC-1 na via NF- κ B através da co-ativação de

PGC-1 β (EISELE et al., 2013). Além disso, a deficiência do receptor alfa relacionado ao estrogênio (ERR α) em miotubos, prejudica a capacidade energética e, consequentemente, a regeneração do músculo esquelético (LABARGE et al., 2014), induzindo o estresse oxidativo diminuindo a miogênese (MURRAY; AUWERX; HUSS, 2013). A ativação do PPAR γ demonstrou induzir efeitos anti-inflamatórios em diversos estudos (ABDALLA et al., 2020; DANIEL et al., 2018; KIM et al., 2017) e no **Estudo 1** descrito acima. Sabe-se que o receptor PPAR γ é capaz de suprimir genes relacionados ao fator NF- κ B (REMELS et al., 2009), induzem a degradação da isoforma p65 (HOU; MOREAU; CHADEE, 2012) e podem estar envolvidos na diminuição da fosforilação de I κ B α (HUANG et al., 2011). A capacidade da PGC-1 α 1 em modular as proteínas I κ B α e IKK β ainda não havia sido demonstrada.

A ação regulatória da PGC-1 α 1 na via de sinalização do NF- κ B já foi apresentada na linhagem C2C12. Eisele e colaboradores, (EISELE et al., 2013) demonstraram que miotubos da linhagem celular, submetidos a diversos estímulos inflamatórios, aumentam a expressão gênica de citocinas relacionadas ao NF- κ B, com aumento de IKK α (que é capaz de fosforilar p65 (BUSS et al., 2004) e que PGC-1 α 1 (e também a isoforma PGC-1 β) suprime genes inflamatórios, reduz a fosforilação de IKK α , p65 e consequentemente sua atividade transcricional. No entanto, apenas o PGC-1 β mostrou diminuir a ligação de p65 e p50 ao DNA (EISELE et al., 2013) sugerindo uma via alternativa para o PGC-1 α 1. Portanto, resta investigar como a PGC-1 α 1 é capaz de aumentar a expressão de I κ B α e, modificar a ativação de IKK β . Sugerimos que essa ação pode ser através de uma via citosólica (ligação proteína-proteína ou RNA-proteína (ÁLVAREZ-GUARDIA et al., 2010; TAVARES et al., 2020) ou como co-ativador, em um fator de transcrição alvo, como os descritos acima.

Além disso, em adição a melhor prevenção contra a inflamação, animais MCK-PGC-1 α 1 demonstraram melhor preservação funcional de mobilidade, demonstrado pela menor duração da frenagem durante a passada e maior duração da propulsão da passada, quando comparado com camundongos selvagens. Essas alterações nos parâmetros da marcha podem refletir alterações na função mecânica do músculo, como resultado do estado de degeneração e regeneração comuns ao modelo da cardiotoxina (DINULOVIC et al., 2016).

Considerando a preservação da estrutura tecidual, estudos mostraram que o PGC-1 α tem um papel na prevenção da degradação de proteínas do músculo esquelético e atrofia das fibras, e melhora a regeneração do músculo esquelético, em diferentes modelos animais (BRAULT; JESPERSEN; GOLDBERG, 2010; SANDRI et al., 2006). Em um modelo animal

de degeneração-regeneração do músculo esquelético induzida por injeção de cardiotoxina, Dinulovic e colaboradores, (DINULOVIC et al., 2016), já demonstraram que camundongos MCK-PGC-1 α 1 apresentam melhor resolução da degeneração muscular já no estágio inicial, com aumento de macrófagos anti-inflamatórios, levando à redução do tecido fibrótico e detritos necróticos.

Do ponto de vista do sistema imunológico, sabe-se que a elevada expressão de PGC-1 α 1 no músculo esquelético é capaz de modular a ativação de células imunes, por meio da supressão de genes de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, mas também pela produção de miocinas dependentes de PGC-1 α 1 (EISELE et al., 2015; FURRER et al., 2017), sendo estes fatores importantes para o controle da inflamação, tendo em vista a relevância do sistema imunológico para a indução e resolução do processo inflamatório, como demonstrado no **Estudo 1**.

8. CAPÍTULO VIII

8.1 Conclusão

A partir dos resultados apresentados, conclui-se que vias metabólicas do exercício físico são potentes moduladores da inflamação no tecido muscular, envolvendo a ativação local de PPAR γ e PGC-1 α 1. Além disso, verificou-se que é possível prevenir a transição da dor aguda para a persistente a partir de efeitos anti-inflamatórios do exercício físico, envolvendo a ativação de receptores PPAR γ e a prevenção da ativação de receptores P2X4 (figura 35). Dessa forma, sugere-se que a modulação de mecanismos relacionados ao fenótipo de macrófagos no tecido muscular, é uma estratégia interessante na prevenção da inflamação e do processo de transição para a dor muscular persistente. Além dos macrófagos, os miócitos demonstraram um papel importante no controle da inflamação tecidual, a partir da ativação de PGC-1 α 1 e a modulação de proteínas sinalizadora do NF- κ B (figura 35). Os mecanismos pelo qual isso acontece permanecem em aberto, porém é possível afirmar que o controle de proteínas desse tipo, é importante para a modulação de processos inflamatórios, ampliando a possibilidade de estratégias terapêuticas.

As principais perguntas que permanece em aberto são (figura 35):

- 1) Se PPAR γ e PGC-1 α 1 atuam em conjunto no miócito, com o estímulo do exercício físico;
- 2) se PPAR γ e PGC-1 α 1 atuam em conjunto de maneira genômica, induzindo miocinas e potencializando uma comunicação músculo-macrófago;
- 3) de que forma PPAR γ diminui p-p38MAPK e quais as proteínas subsequentes moduladas nessa sinalização (incluindo um potencial fator de transcrição);
- 4) qual o papel da IL-1 β na indução da hiperalgesia muscular persistente;
- 5) qual o papel da IL-10 na prevenção induzida pelo exercício físico e como o PPAR γ atua;
- 6) como PGC-1 α 1 modula I κ B α e IKK β no músculo esquelético;
- 7) e finalmente, quais são os processos de sinalização intracelular, envolvidos na sensibilização do neurônio aferente primário, prevenidos pelos mecanismos desvendados nos dois estudos apresentados;

Portanto, os resultados dessa tese, além de abrir possibilidades para novas estratégias terapêuticas anti-inflamatórias, reforçam a relevância do exercício físico regular como estratégia eficaz na prevenção de vias inflamatórias, melhora na saúde do músculo esquelético, prevenção de dores musculares persistentes e reforçam os efeitos benéficos do exercício físico para a saúde como um todo.

9. Referências bibliográficas

ABDALLA, H. et al. Activation of PPAR - γ induces macrophage polarization and reduces neutrophil migration mediated by heme oxygenase 1. **International Immunopharmacology**, v. 84, n. May, p. 106565, 2020.

ABRAIRA, V. E.; GINTY, D. D. The Sensory Neurons of Touch. **Neuron**, v. 79, n. 4, p. 618–639, 21 ago. 2013.

ACHARYYA, S. et al. Interplay of IKK/NF- κ B signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, 2007.

AGUDELO, L. Z. et al. Skeletal muscle PGC-1 α 1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 33–45, 25 set. 2014.

AGUDELO, L. Z. et al. Skeletal muscle PGC-1 α 1 reroutes kynurenine metabolism to increase energy efficiency and fatigue-resistance. **Nature Communications**, p. 1–12, 2019.

AHMADIAN, M. et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature medicine**, v. 19, n. 5, p. 557–66, maio 2013.

ALEY, K. O. et al. Chronic Hypersensitivity For Inflammatory Nociceptor Sensitization Mediated by the ϵ Isozyme of Protein Kinase C. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 4680–4685, 15 jun. 2000.

ÁLVAREZ-GUARDIA, D. et al. The p65 subunit of NF- κ B binds to PGC-1 α , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. **Cardiovascular Research**, v. 87, n. 3, p. 449–458, 1 ago. 2010.

ALVAREZ, P.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Role for monocyte chemoattractant protein-1 in the induction of chronic muscle pain in the rat. **Pain**, v. 155, n. 6, p. 1161–7, jun. 2014.

ANDERSEN, J. H.; HAAHR, J. P.; FROST, P. Risk factors for more severe regional musculoskeletal symptoms: a two-year prospective study of a general working population. **Arthritis and rheumatism**, v. 56, n. 4, p. 1355–64, abr. 2007.

ARANY, Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease.

Current opinion in genetics & development, v. 18, n. 5, p. 426–34, out. 2008.

ARNOLD, A.-S. et al. Morphological and functional remodelling of the neuromuscular junction by skeletal muscle PGC-1 α . **Nature communications**, v. 5, p. 3569, 1 abr. 2014.

ARNOLD, L. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 5, p. 1057–69, 14 maio 2007.

ASHINA, S. et al. Tension-type headache. **Nature reviews. Disease primers**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2021.

AZIZ, Q. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic secondary visceral pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 69–76, 2019.

BALDUCCI, S. et al. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 8, p. 608–617, 2010.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–84, 16 out. 2009.

BEEKUM, O. VAN; FLESKENS, V.; KALKHOVEN, E. Posttranslational Modifications of PPAR- γ : Fine-tuning the Metabolic Master Regulator. **Obesity**, v. 17, n. 2, p. 213–219, 1 fev. 2009.

BELL-PARIKH, L. C. et al. Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 6, p. 945–55, set. 2003.

BEMENT, M. K. H. et al. Dose response of isometric contractions on pain perception in healthy adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 11, p. 1880–1889, 2008.

BEMENT, M. K. H.; SLUKA, K. A. Low-intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 86, n. 9, p. 1736–40, set. 2005.

BERNIER, L.-P.; ASE, A. R.; SÉGUÉLA, P. P2X receptor-channels in chronic pain pathways. **British Journal of Pharmacology**, p. 2219–2230, 2017.

BESSOU, P.; PERL, E. R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **J Neurophysiol**, v. 32, n. 6, p. 1025–43, 1969.

BINSHTOK, A. M. et al. Nociceptors Are Interleukin-1 Sensors. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 52, p. 14062–14073, 2008.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Orchestration of metabolism by macrophages. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 432–437, 2012.

BJÖRNSDOTTER, M. et al. Somatotopic organization of gentle touch processing in the posterior insular cortex. **J Neuroscience**, v. 29, n. 29, p. 9314–20, 2009.

BLUM, E. et al. Systemic inflammation alters satellite glial cell function and structure. A possible contribution to pain. **Neuroscience**, v. 274, p. 209–217, 22 ago. 2014.

BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337–48, 27 out. 2011.

BOBINSKI, F. et al. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low- intensity exercise on neuropathic pain following sciatic nerve injury in mice. **Pain**, v. 156, n. 12, p. 2595–2606, 2016.

BOBINSKI, F. et al. Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. **Pain**, v. 159, n. 3, p. 437–450, 1 mar. 2018.

BODE, J. G.; EHLTING, C.; HÄUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK-STAT3 axis. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1185–1194, 2012.

BONICA, J. J. The Management of Pain: The Future. In: **Anesthesiology and Pain Management**. 24. ed. [s.l.] Springer, Dordrecht, 1991. p. 73–92.

BOOTH, F. W. et al. Role of Inactivity in Chronic Diseases: Evolutionary Insight and Pathophysiological Mechanisms. **Physiological reviews**, v. 97, n. 4, p. 1351–1402, 1 out. 2017.

BORSOOK, D.; BECERRA, L.; HARGREAVES, R. Biomarkers for chronic pain and

analgesia. Part 1: the need, reality, challenges, and solutions. **Discov. Med.**, v. 11, n. 58, p. 197–207, 2011.

BOTTA, A. et al. Short Term Exercise Induces PGC-1 alpha, Ameliorates Inflammation and Increases Mitochondrial Membrane Proteins but Fails to Increase Respiratory Enzymes in Aging Diabetic Hearts. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

BOUHLEL, M. A. et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. **Cell metabolism**, v. 6, n. 2, p. 137–43, ago. 2007a.

BOUHLEL, M. A. et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. **Cell metabolism**, v. 6, n. 2, p. 137–43, ago. 2007b.

BRAULT, J. J.; JESPERSEN, J. G.; GOLDBERG, A. L. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator 1 α or 1 β Overexpression Inhibits Muscle Protein Degradation, Induction of Ubiquitin Ligases, and Disuse Atrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19460–19471, 18 jun. 2010.

BREIVIK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **European journal of pain (London, England)**, v. 10, n. 4, p. 287–333, maio 2006.

BRITO, R. G.; RASMUSSEN, L. A.; SLUKA, K. A. Regular physical activity prevents development of chronic muscle pain through modulation of supraspinal opioid and serotonergic mechanisms. **Pain reports**, v. 2, n. 5, p. e618, 24 set. 2017.

BROHOLM, C. et al. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 111, n. 1, p. 251–259, 2011.

BUENO JÚNIOR, C. R. et al. Combined effect of AMPK/PPAR agonists and exercise training in mdx mice functional performance. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45699, jan. 2012.

BULLITT, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 296, n. 4, p. 517–30, 22 jun. 1990.

BUSS, H. et al. Constitutive and Interleukin-1-inducible Phosphorylation of p65 NF- κ B at Serine 536 Is Mediated by Multiple Protein Kinases Including I κ B Kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF Family Member-associated (TANK)-binding Kinase 1 (TBK1), and an Unknown Kinase and Couples p65 to TATA-binding Protein-associated Factor II31-mediated Interleukin-8 Transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55633–55643, 31 dez. 2004.

CALVO, J. A. et al. Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 104, n. 5, p. 1304–1312, 2008.

CANNAVINO, J. et al. PGC1- α over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 20, p. 4575–4589, 15 out. 2014.

CANTINI, G. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is required for modulating endothelial inflammatory response through a nongenomic mechanism. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 9, p. 645–653, set. 2010.

CASTRILLO, A. et al. Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 5, p. 1692–1698, mar. 2000.

CAVANAUGH, D. J. et al. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 22, p. 9075–80, 2009.

CHAKKALAKAL, J. V. et al. Retrograde influence of muscle fibers on their innervation revealed by a novel marker for slow motoneurons. **Development**, v. 137, n. 20, p. 3489–3499, 15 out. 2010.

CHARLOTTE, M.; SEVERINSEN, K.; PEDERSEN, B. K. Muscle-Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. 2020.

CHAWLA, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. **Circulation research**, v. 106, n. 10, p. 1559–69, 28 maio 2010.

CIMMINO, M. A; FERRONE, C.; CUTOLO, M. Epidemiology of chronic musculoskeletal

pain. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 25, n. 2, p. 173–83, abr. 2011.

CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T. et al. 15d-PGJ2-loaded in nanocapsules enhance the antinociceptive properties into rat temporomandibular hypernociception. **Life Sciences**, v. 90, n. 23–24, p. 944–949, 2012.

CORREIA, J. C. et al. Muscle-secreted neurturin couples myofiber oxidative metabolism and slow motor neuron identity. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 11, p. 2215- 2230.e8, 2 nov. 2021.

CORREIA, J. C.; FERREIRA, D. M. S.; RUAS, J. L. Intercellular : local and systemic actions of skeletal muscle PGC-1 α . **Trends in Endocrinology & Metabolism**, p. 1–10, 2015.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 767, p. 765–767, 1991.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 4, p. 824–32, abr. 2008.

DA SILVA, M. D. et al. IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 1, p. 19–31, 25 jun. 2014.

DALLE, S. et al. Cardiotoxin-induced skeletal muscle injury elicits profound changes in anabolic and stress signaling, and muscle fiber type composition. v. 41, p. 375–387, 2020.

DANIEL, B. et al. The Nuclear Receptor PPAR γ Controls Progressive Macrophage Polarization as a Ligand-Insensitive Epigenomic Ratchet of Transcriptional Memory. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 615- 626.e6, out. 2018.

DAULHAC, L. et al. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 1246–1254, 2006.

DAVIES, N. A. et al. The contributions of oxidative stress, oxidised lipoproteins and AMPK towards exercise-associated PPAR γ signalling within human monocytic cells. **Free Radical Research**, v. 49, n. 1, p. 45–56, 2 jan. 2015.

DE ARAUJO, G. G. et al. Interval Versus Continuous Training With Identical Workload:

Physiological and Aerobic Capacity Adaptations. **Physiological Research**, v. 64, n. 2, p. 209–219, 30 abr. 2015.

DE AZAMBUJA, G. et al. Short-term swimming exercise attenuates the sensitization of dorsal horn neurons in rats with NGF-induced low back pain. **European journal of pain**, p. 1–10, 10 abr. 2018.

DE AZAMBUJA, G. et al. Swimming Physical Training Prevented the Onset of Acute Muscle Pain by a Mechanism Dependent of PPAR γ Receptors and CINC-1. **Neuroscience**, v. 427, p. 64–74, fev. 2020.

DE MELO AQUINO, B. et al. P2X3 receptors contribute to muscle pain induced by static contraction by a mechanism dependent on neutrophil migration. **Purinergic Signalling**, v. 15, n. 2, p. 167–175, 21 jun. 2019.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: An animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149–158, 1 ago. 2000.

DELERIVE, P. et al. PGC-1 functions as a transcriptional coactivator for the retinoid X receptors. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 6, p. 3913–7, 8 fev. 2002.

DELEZIE, J.; HANDSCHIN, C. Endocrine Crosstalk Between Skeletal Muscle and the Brain. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. August, 2018.

DELL, R. B.; HOLLERAN, S.; RAMAKRISHNAN, R. Sample size determination. **ILAR journal**, v. 43, n. 4, p. 207–13, 2002.

DENG, B. et al. IL-10 Triggers Changes in Macrophage Phenotype That Promote Muscle Growth and Regeneration. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 7, p. 3669–3680, 2012.

DINA, O. A.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Role of IL-6 in Chronic Muscle Hyperalgesic Priming Olayinka. **Neuroscience**, v. 152, n. 2, p. 521–525, 2008.

DINA, O. A.; LEVINE, J. D.; GREEN, P. G. Muscle inflammation induces a protein kinase Cepsilon-dependent chronic-latent muscle pain. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 9, n. 5, p. 457–62, maio 2008.

DINULOVIC, I. et al. PGC-1 α modulates necrosis, inflammatory response, and fibrotic tissue formation in injured skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, v. 6, n. 1, 8 nov. 2016.

DONNELLY, C. R.; CHEN, O.; JI, R. R. How Do Sensory Neurons Sense Danger Signals? **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 10, p. 822–838, 1 out. 2020.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010.

DUNN, S. L. et al. Relationships between inflammatory and metabolic markers, exercise, and body composition in young individuals. **Journal of clinical and translational research**, v. 7, n. 3, p. 289–296, 26 jun. 2021.

DUREJA, G. P. et al. Prevalence of Chronic Pain , Impact on Daily Life , and Treatment Practices in India. **Pain practice : the official journal of World Institute of Pain**, v. 14, n. 2, p. E51–E62, 2013.

EISELE et al. The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 4, p. 2246–2260, 25 jan. 2013.

EISELE, P. S. et al. The PGC-1 coactivators promote an anti-inflammatory environment in skeletal muscle in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 464, n. 3, p. 692–697, 2015.

EISELE, P. S.; HANDSCHIN, C. Functional crosstalk of PGC-1 coactivators and inflammation in skeletal muscle pathophysiology. **Seminars in Immunopathology**, v. 36, n. 1, p. 27–53, 21 jan. 2014.

ERLANGER, Joseph. Some observations on the responses of single nerve fibers. **Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962**, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1947.

EVANS, J. L. et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 5, p. 599–622, out. 2002.

FAURE, L. et al. Single cell RNA sequencing identifies early diversity of sensory neurons forming via bi-potential intermediates. **Nature cell biology**, v. 11, 2020.

FERRARI, L. F.; ARALDI, D.; LEVINE, J. D. Distinct Terminal and Cell Body Mechanisms in the Nociceptor Mediate Hyperalgesic Priming. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 15, p. 6107–6116, 2015.

FERRARI, L. F.; BOGEN, O.; LEVINE, J. D. Nociceptor subpopulations involved in hyperalgesic priming. **Neuroscience**, v. 165, n. 3, p. 896–901, 3 fev. 2010.

FERRARI, L. F.; BOGEN, O.; LEVINE, J. D. Role of Nociceptor CaMKII in Transition from Acute to Chronic Pain (Hyperalgesic Priming) in Male and Female Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 27, p. 11002–11011, 2013.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1227–1231, nov. 1993.

FERREIRA, S. H.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. **British journal of pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 86–97, set. 1973.

FRANCO, R.; FERNANDEZ-SUAREZ, D. **Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. Progress in Neurobiology**, 2015.

FRANSEN, M. et al. Risk factors associated with the transition from acute to chronic occupational back pain. **Spine**, v. 27, n. 1, p. 92–8, 2002.

FURRER, R. et al. Paracrine cross-talk between skeletal muscle and macrophages in exercise by PGC-1 α -controlled BNP. **Scientific reports**, v. 7, n. 40789, p. 1–12, 2017.

GALDINO, G. et al. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. **Neuropharmacology**, v. 77, p. 313–24, fev. 2014.

GAO, Y.-J.; JI, R.-R. c-Fos or pERK, Which is a Better Marker for Neuronal Activation and Central Sensitization After Noxious Stimulation and Tissue Injury? **The Open Pain Journal**, v. 2, n. 1, p. 11–17, 27 fev. 2009.

GARBER, C. E. et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 7, p. 1334–1359, 2011a.

GARBER, C. E. et al. American College of Sports Medicine position stand: Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults. A guidance for prescribing exercise.

Medicine and science in sports and exercise, v. 43, n. 7, p. 1334–59, jul. 2011b.

GASKIN, D. J.; RICHARD, P. The economic costs of pain in the United States. **Journal of Pain**, v. 13, n. 8, p. 715–724, 2012.

GASSER, Herbert S. Mammalian nerve fibers. **Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962**, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1945.

GEBHART, G. F. Descending modulation of pain. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 27, n. 8, p. 729–37, jan. 2004.

GENG, T. et al. PGC-1 plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. **AJP: Cell Physiology**, v. 298, n. 3, p. C572–C579, 2010.

GHOSH, S.; DASS, J. F. P. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. **Gene**, v. 584, n. 1, p. 97–109, 10 jun. 2016.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 9, p. 607–15, set. 2011.

GONG, W.-Y. et al. Resident Macrophages in Muscle Contribute to Development of Hyperalgesia in a Mouse Model of Noninflammatory Muscle Pain. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 17, n. 10, p. 1081–94, out. 2016.

GRACE, P. M. et al. Prior voluntary wheel running attenuates neuropathic pain. **PAIN**, v. 157, n. 9, p. 2012–2023, set. 2016.

GREGORY, N. S. et al. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 14, n. 11, p. 1255–69, nov. 2013.

GREGORY, N. S. et al. ASIC3 Is Required for Development of Fatigue-Induced Hyperalgesia. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 1020–30, mar. 2016.

GRIGGS, R. B. et al. Pioglitazone rapidly reduces neuropathic pain through astrocyte and nongenomic PPAR γ mechanisms. **Pain**, v. 156, n. 3, p. 469–482, mar. 2015.

GUARDIOLA, O. et al. Induction of Acute Skeletal Muscle Regeneration by Cardiotoxin Injection. **J. Vis. Exp.**, n. 119, p. 54515, 2017.

GUERRERO, A. T. G. et al. Mechanisms underlying the hyperalgesic responses triggered by joint activation of TLR4. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1293–1300, 2016.

GUO, W. et al. Glial-Cytokine-Neuronal Interactions Underlying the Mechanisms of Persistent Pain. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 22, p. 6006–6018, 30 maio 2007.

HÄCKER, H.; KARIN, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2006, n. 357, p. 1–20, 2006.

HANDLER, A.; GINTY, D. D. The mechanosensory neurons of touch and their mechanisms of activation. **Nature Reviews Neuroscience** 2021 22:9, v. 22, n. 9, p. 521–537, 26 jul. 2021.

HANDSCHIN, C. et al. PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. **Genes & development**, v. 21, n. 7, p. 770–83, 1 abr. 2007.

HASEGAWA-MORIYAMA, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 426, n. 1, p. 76–82, 14 set. 2012.

HASEGAWA-MORIYAMA, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates inflammatory pain through the induction of heme oxygenase-1 in macrophages. **Pain**, v. 154, n. 8, p. 1402–12, ago. 2013.

HEVENER, A. L. et al. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. **Nature medicine**, v. 9, n. 12, p. 1491–1497, dez. 2003.

HILL, E. E. et al. Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect. **Journal of endocrinological investigation**, v. 31, n. 7, p. 587–91, jul. 2008.

HIRAOKA, S. et al. Gastrin induces CXC chemokine expression in gastric epithelial cells through activation of NF-kappaB. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 281, n. 3, p. G735-42, set. 2001.

- HOFFMAN, M. D. et al. Intensity and duration threshold for aerobic exercise-induced analgesia to pressure pain. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 85, n. 7, p. 1183–7, jul. 2004.
- HOHEISEL, U. et al. Injection of nerve growth factor into a low back muscle induces long-lasting latent hypersensitivity in rat dorsal horn neurons. **Pain**, v. 154, n. 10, p. 1953–60, out. 2013.
- HOHEISEL, U. et al. Immobilization stress sensitizes rat dorsal horn neurons having input from the low back. **European journal of pain (London, England)**, v. 19, n. 6, p. 861–70, jul. 2015.
- HOHEISEL, U.; ROSNER, J.; MENSE, S. Innervation changes induced by inflammation of the rat thoracolumbar fascia. **Neuroscience**, v. 300, p. 351–9, 6 ago. 2015.
- HOLLINGER, K. et al. Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 α involves restored expression of dystrophin-associated protein complex components and satellite cell signaling. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 305, n. 1, jul. 2013.
- HONORE, P. et al. Interleukin-1 α gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. **Behavioural brain research**, v. 167, n. 2, p. 355–64, 28 fev. 2006.
- HOOTEN, W. M. et al. Effects of strength vs aerobic exercise on pain severity in adults with fibromyalgia: a randomized equivalence trial. **Pain**, v. 153, n. 4, p. 915–23, abr. 2012.
- HORCH, K. W.; TUCKETT, R. P.; BURGESS, P. R. A key to the classification of cutaneous mechanoreceptors. **J Invest Dermatol**, v. 69, n. 1, p. 75–82, 1977.
- HOU, Y.; MOREAU, F.; CHADEE, K. PPAR γ is an E3 ligase that induces the degradation of NF κ B/p65. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, p. 1300, 18 jan. 2012.
- HU, G. et al. Single-cell RNA-seq reveals distinct injury responses in different types of DRG sensory neurons. **Nature Publishing Group**, 2016.
- HUANG, F. et al. EPA inhibits the inhibitor of κ B α (IkB α)/NF- κ B/muscle RING finger 1 pathway in C2C12 myotubes in a PPAR γ -dependent manner. **The British journal of nutrition**, v. 105, n. 3, p. 348–356, 14 fev. 2011.

- HUMA, Z. E. et al. Key determinants of selective binding and activation by the monocyte chemoattractant proteins at the chemokine receptor CCR2. **Science Signaling**, v. 10, n. 480, p. 1–14, 2017.
- HUNTER, R. B. et al. Activation of an alternative NF-KB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 6, p. 529–538, abr. 2002.
- HUSS, J. M.; KOPP, R. P.; KELLY, D. P. Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1 α (PGC-1 α) Coactivates the Cardiac-enriched Nuclear Receptors Estrogen-related Receptor- α and - γ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 43, p. 40265–40274, out. 2002.
- HUSSEIN, S. Z. et al. Gelam honey attenuates carrageenan-induced rat paw inflammation via NF- κ B pathway. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72365, jan. 2013.
- IASP – *International Association for the Studies of Pain*: Terminology. <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>. Acesso em: 25 de julho de 2022.
- IHNE, J. L. et al. **Pharmacological modulation of stress-induced behavioral changes in the light/dark exploration test in male C57BL/6J mice**. *Neuropharmacology*. **Anais...Pergamon**, 1 jan. 2012.
- IKEDA, S. I. et al. Exercise-induced enhancement of insulin sensitivity is associated with accumulation of M2-polarized macrophages in mouse skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 1, p. 36–41, 2013.
- JANKORD, R.; JEMIOLO, B. Influence of Physical Activity on Serum IL-6 and IL-10 Levels in Healthy Older Men. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 36, n. 6, p. 960–964, jun. 2004.
- JONES, M. D. et al. Aerobic training increases pain tolerance in healthy individuals. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 46, n. 8, p. 1640–7, ago. 2014.
- JORGE, C. O. et al. P2X3 receptors contribute to transition from acute to chronic muscle pain. **Purinergic Signalling**, v. 16, n. 3, p. 403–414, 6 set. 2020.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception . **Nature**, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

KANNING, K. C.; KAPLAN, A.; HENDERSON, C. E. **Motor neuron diversity in development and disease. Annual Review of Neuroscience** Annual Reviews , , 23 jun. 2010. Disponível em:
<<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.051508.135722>>. Acesso em: 26 maio. 2021

KARLSSON, L. et al. Intramuscular pain modulatory substances before and after exercise in women with chronic neck pain. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 19, n. 8, p. 1075–1085, 2015.

KELLEY, D. E. et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2944–2950, 1 out. 2002.

KIM, J.-S. et al. PPAR γ regulates inflammatory reaction by inhibiting the MAPK/NF- κ B pathway in C2C12 skeletal muscle cells. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 49–57, fev. 2017.

KING-HIMMELREICH, T. S. et al. AMPK contributes to aerobic exercise-induced antinociception downstream of endocannabinoids. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 134–142, 2017.

KOLTYN, K. F. et al. Mechanisms of Exercise-Induced Hypoalgesia. **The Journal of Pain**, p. 1–11, 2014.

KORB, A. et al. Effect of treadmill exercise on serotonin immunoreactivity in medullary raphe nuclei and spinal cord following sciatic nerve transection in rats. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 3, p. 380–389, 2010.

KOROTKOVA, M.; LUNDBERG, I. E. The skeletal muscle arachidonic acid cascade in health and inflammatory disease. **Nature Reviews Rheumatology** 2014 10:5, v. 10, n. 5, p. 295–303, 28 jan. 2014.

KREGEL, K. C. et al. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 6, p. 583–583, jun. 2007.

KUPARI, J. et al. Single cell transcriptomics of primate sensory neurons identifies cell types associated with chronic pain. **Nature Communications**, v. 12, 2021.

KUPHAL, K. E.; FIBUCH, E. E.; TAYLOR, B. K. Extended swimming exercise reduces

inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 8, n. 12, p. 989–97, dez. 2007.

KUPR, B.; HANDSCHIN, C. Complex coordination of cell plasticity by a PGC-1 α -controlled transcriptional network in skeletal muscle. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. NOV, p. 325, 2015.

LABARGE, S. et al. Estrogen-related receptor- α (ERR α) deficiency in skeletal muscle impairs regeneration in response to injury. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 28, n. 3, p. 1082–1097, 2014.

LAICHE, D.; LAWSON, S. N. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 46, n. 2, p. 131–45, 2004.

LALISSE, S. et al. Sensory neuronal P2RX4 receptors controls BDNF signaling in inflammatory pain. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

LANDMARK, T. et al. Associations between recreational exercise and chronic pain in the general population : Evidence from the HUNT 3 study. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2241–2247, 2011.

LANDMARK, T. et al. Longitudinal associations between exercise and pain in the general population--the HUNT pain study. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e65279, 2013.

LAURENS, C.; BERGOUIGNAN, A.; MORO, C. Exercise-Released Myokines in the Control of Energy Metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 91, 13 fev. 2020.

LAYHADI, J. A.; FOUNTAIN, S. J. P2X4 receptor-dependent Ca²⁺influx in model human monocytes and macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

LEDDEROSE, C. et al. Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 8, p. 3583–3594, 2018.

LEGÅRD, G. E.; PEDERSEN, B. K. Muscle as an Endocrine Organ. **Muscle and Exercise Physiology**, p. 285–307, 1 jan. 2019.

LEMLEY, K. J.; HUNTER, S. K.; BEMENT, M. K. H. Conditioned pain modulation predicts exercise-induced hypoalgesia in healthy adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 47, n. 1, p. 176–184, 2015.

LESNAK, J. B. et al. Resistance training protects against muscle pain through activation of androgen receptors in male and female mice. **Pain**, v. Publish Ah, 24 mar. 2022.

LEUCHTMANN, A. B. et al. The Role of the Skeletal Muscle Secretome in Mediating Endurance and Resistance Training Adaptations. **Frontiers in physiology**, v. 12, 12 ago. 2021.

LEUNG, A. et al. Regular physical activity prevents chronic pain by altering resident muscle macrophage phenotype and increasing IL-10 in mice. **Pain**, v. 157, p. 1, 2015.

LEUNG, A. et al. Regular physical activity prevents chronic pain by altering resident muscle macrophage phenotype and increasing interleukin-10 in mice. **Pain**, v. 157, n. 1, p. 70–9, jan. 2016.

LÉVEILLÉ, M. et al. PGC-1 α isoforms coordinate to balance hepatic metabolism and apoptosis in inflammatory environments. **Molecular metabolism**, v. 34, p. 72–84, 1 abr. 2020.

LEWIS, C. et al. **Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons.** *Nature*, 1995. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/377432a0>>

LI, L. et al. The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. **Cell**, v. 147, n. 7, p. 1615–1627, 23 dez. 2011.

LI, Y. et al. Spinal NF- κ B upregulation contributes to hyperalgesia in a rat model of advanced osteoarthritis. 2020.

LIMA, L. V. et al. Short-duration physical activity prevents the development of activity-induced hyperalgesia through opioid and serotonergic mechanisms. **The Journal of Pain**, v. 158, n. 9, p. 1697–1710, set. 2017.

LIN, J. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 797–801, 15 ago. 2002.

- LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Nature Publishing Group**, v. 2, 2017.
- LORAM, L. C. et al. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 8, n. 2, p. 127–36, fev. 2007.
- LUCONI, M.; CANTINI, G.; SERIO, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma): Is the genomic activity the only answer? **Steroids**, v. 75, n. 8–9, p. 585–594, 2010.
- MA, Q. et al. Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. **Genes Dev**, v. 13, n. 13, p. 1717–1728, 1999.
- MANCHIKANTI, L. et al. Comprehensive review of epidemiology, scope, and impact of spinal pain. **Pain physician**, v. 12, n. 4, p. E35-70, 2009.
- MANJAVACHI, M. N. et al. Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 345–355, 2010.
- MÄNTYSELKÄ, P. et al. Pain as a reason to visit the doctor: a study in Finnish primary health care. **Pain**, v. 89, p. 175–80, 2001.
- MARTÍNEZ-REDONDO, V. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α isoforms selectively regulate multiple splicing events on target genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 29, p. 15169–15184, 2016.
- MARTÍNEZ-REDONDO, V.; PETTERSSON, A. T.; RUAS, J. L. The hitchhiker's guide to PGC-1 α isoform structure and biological functions. **Diabetologia**, v. 58, n. 9, p. 1969–1977, 25 set. 2015.
- MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, n. 4, p. 453–461, 2008.
- MATHUR, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2008, p. 1–6, jan. 2008.
- MATSUZAWA, T. et al. IFN- γ Elicits Macrophage Autophagy via the p38 MAPK Signaling Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 813–818, 2012.
- MAZZARDO-MARTINS, L. et al. High-intensity extended swimming exercise reduces pain-

related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system.

The journal of pain : official journal of the American Pain Society, v. 11, n. 12, p. 1384–93, dez. 2010.

MELTZER, S. et al. The cellular and molecular basis of somatosensory neuron development. **Neuron**, v. 109, n. 23, p. 3736–3757, 1 dez. 2021.

MENDES, R. et al. Exercise prescription for patients with type 2 diabetes - A synthesis of international recommendations: Narrative review. **British Journal of Sports Medicine**, v. 50, n. 22, p. 1379–1381, 2016.

MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. **Pain**, v. 54, n. 3, p. 241–89, set. 1993.

MENSE, S. Algesic agents exciting muscle nociceptors. **Experimental brain research**, v. 196, n. 1, p. 89–100, jun. 2009.

MENSE, S.; GERWIN, R. D. **Muscle Pain: Understanding the Mechanisms**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.

MILLS, R. et al. Neurturin is a PGC-1 α -controlled myokine that promotes motor neuron recruitment and neuromuscular junction formation. **Molecular Metabolism**, v. 7, p. 12–22, 1 jan. 2018.

MINARI, A. L. A.; OYAMA, L. M.; DOS SANTOS, R. V. T. Downhill Exercise-Induced Changes in Gene Expression Related with Macrophage Polarization and Myogenic Cells in the Triceps Long Head of Rats. **Inflammation**, v. 38, n. 1, p. 209–217, 2014.

MINEGISHI, Y. et al. Deletion of nuclear factor- κ B p50 upregulates fatty acid utilization and contributes to an anti-obesity and high-endurance phenotype in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 6, p. E523–E533, 15 set. 2015.

MITSI, V.; ZACHARIOU, V. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. **Neuroscience**, v. 338, p. 81–92, 3 dez. 2016.

MOORE, K. J. et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. **Nature medicine**, v. 7, n. 1, p. 41–7, jan. 2001.

MOORE, L. B. et al. Loss of monocyte chemoattractant protein-1 alters macrophage

polarization and reduces NF κ B activation in the foreign body response. **Acta Biomaterialia**, v. 11, n. 1, p. 37–47, 2015.

MOOTHA, V. K. et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature Genetics**, v. 34, n. 3, p. 267–273, 15 jul. 2003.

MORALES, R. A.; ALLENDE, M. L. Peripheral macrophages promote tissue regeneration in zebrafish by fine-tuning the inflammatory response. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. FEB, 2019.

MORGENWECK, J. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in brain inhibits inflammatory pain, dorsal horn expression of Fos, and local edema. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 2, p. 337–345, fev. 2010.

MORGENWECK, J. et al. PPAR γ activation blocks development and reduces established neuropathic pain in rats. **Neuropharmacology**, v. 70, p. 236–246, jul. 2013.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MURRAY, C. J. L. et al. The state of US health, 1990-2010: burden of diseases, injuries, and risk factors. **JAMA**, v. 310, n. 6, p. 591–608, 14 ago. 2013.

MURRAY, J.; AUWERX, J.; HUSS, J. M. Impaired myogenesis in estrogen-related receptor γ (ERR γ)-deficient skeletal myocytes due to oxidative stress. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 1, p. 135–150, jan. 2013.

MURRAY, M. et al. Specific exercise training for reducing neck and shoulder pain among military helicopter pilots and crew members: a randomized controlled trial protocol. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 16, n. 1, p. 198, jan. 2015.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.

NAPIMOGA, M. H. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 1, p. 609–17, 1 jan. 2008.

NAUGLE, K. M. et al. Isometric Exercise as a Test of Pain Modulation: Effects of Experimental Pain Test, Psychological Variables, and Sex. **Pain Medicine**, v. 15, n. 4, p. 692–701, 2014a.

NAUGLE, K. M. et al. Intensity thresholds for aerobic exercise-induced hypoalgesia. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 46, n. 4, p. 817–25, abr. 2014b.

NAUGLE, K. M.; FILLINGIM, R. B.; RILEY, J. L. A meta-analytic review of the hypoalgesic effects of exercise. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 13, n. 12, p. 1139–50, dez. 2012.

NAUGLE, K. M. K. E. et al. Intensity thresholds for aerobic exercise-induced hypoalgesia. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 46, n. 4, p. 817–25, abr. 2014c.

NAUGLE, K. M.; NAUGLE, K. E.; RILEY, J. L. Reduced Modulation of Pain in Older Adults After Isometric and Aerobic Exercise. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 17, n. 6, p. 719–28, jun. 2016.

NICHOLAS, M. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11 : chronic primary pain. **Pain**, v. 160, p. 28–37, 2019.

NIELSEN, S.; PEDERSEN, B. K. Skeletal muscle as an immunogenic organ. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, p. 346–351, 2008.

NISR, R. B. et al. Proinflammatory NFkB signalling promotes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle in response to cellular fuel overloading. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 24, p. 4887–4904, 1 dez. 2019.

NORRIS, A. W. et al. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 4, p. 608–618, 2003.

ODEGAARD, J. I. et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116–20, 28 jun. 2007.

OLIVEIRA-FUSARO, M. C. et al. P2X4 Receptors on Muscle Macrophages Are Required for Development of Hyperalgesia in an Animal Model of Activity-Induced Muscle Pain. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 4, p. 1917–1929, 2 abr. 2020.

OLIVEIRA, A. G. et al. Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats. **Obesity**, v. 21, n. 12, p. 2545–2556, 2013.

ORECCHIONI, M. et al. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–14, 2019.

PALOMER, X. et al. TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. **Cardiovascular research**, v. 81, n. 4, p. 703–712, mar. 2009.

PARADA, C. A. et al. THE MAJOR ROLE OF PERIPHERAL RELEASE OF HISTAMINE AND 5-HYDROXYTRYPTAMINE IN FORMALIN-INDUCED NOCICEPTION. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p. 937–944, 2001.

PARADA, C. A. et al. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of $\text{in } \bar{\text{a}}$ mmatory hyperalgesia in rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 1–6, 2003a.

PARADA, C. A. et al. TRANSIENT ATTENUATION OF PROTEIN KINASE C $\square$ TERMINATE A CHRONIC HYPERALGESIC STATE IN THE RAT. **Neuroscience**, v. 120, n. 8, p. 219–226, 2003b.

PARADA, C. A.; REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. **Pain**, v. 113, n. 1–2, p. 185–90, jan. 2005.

PAREDES, L. C.; OLSEN SARAIVA CAMARA, N.; BRAGA, T. T. Understanding the Metabolic Profile of Macrophages During the Regenerative Process in Zebrafish. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. May, p. 1–19, 24 maio 2019.

PASCUAL, G. et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 759–763, 28 set. 2005.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery** 2009 8:1, v. 8, n. 1, p. 55–68, 2009.

PEDERSEN, B. K. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. **European journal of clinical investigation**, 2017.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457–65, ago. 2012.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 16 Suppl 1, p. 3–63, fev. 2006.

PENA-DOS-SANTOS, D. R. et al. Activation of peripheral kappa/delta opioid receptors mediates 15-deoxy-(Delta12,14)-prostaglandin J2 induced-antinociception in rat temporomandibular joint. **Neuroscience**, v. 163, n. 4, p. 1211–9, 10 nov. 2009.

PENAS, F. et al. Treatment in vitro with PPAR α and PPAR γ ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 5, p. 893–904, maio 2015.

PERRY, M. J.; LAWSON, S. N. Differences in expression of oligosaccharides, neuropeptides, carbonic anhydrase and neurofilament in rat primary afferent neurons retrogradely labelled via skin, muscle or visceral nerves. **Neuroscience**, v. 85, n. 1, p. 293–310, 1998.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154–62, abr. 2005.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 546, n. Pt 3, p. 851–8, 1 fev. 2003.

PILLON, N. J. et al. Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 304, n. 5, 2013.

POOLE, S. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 4, p. 684–688, jun. 1995.

PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829–839, 20 mar. 1998a.

PUIGSERVER, P. et al. A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829–839, 20 mar. 1998b.

PUIGSERVER, P. et al. Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. **Science (New York, N.Y.)**, v. 286, n. 5443, p. 1368–1371, 12 nov. 1999.

RADHAKRISHNAN, R. et al. Models of Muscle Pain : Carrageenan Model and Acidic Saline Model Models of Muscle Pain : Carrageenan. n. August 2018, 2004.

RADHAKRISHNAN, R.; MOORE, S. A.; SLUKA, K. A. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. **Pain**, v. 104, n. 3, p. 567–577, 2003.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain : concepts , challenges , and compromises. **Pain**, v. 00, n. 00, 2020.

REDD, M. J. et al. Imaging macrophage chemotaxis in vivo: Studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 63, n. 7, p. 415–422, 2006.

REED, K. L. et al. NF-kappaB activation precedes increases in mRNA encoding neurokinin-1 receptor, proinflammatory cytokines, and adhesion molecules in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 50, n. 12, p. 2366–78, dez. 2005.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 12, p. 611–8, dez. 2009.

REMELS, A. H. V. et al. PPAR inhibits NF- B-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 1, p. E174–E183, 2009.

REMELS, A H. V et al. Regulation of skeletal muscle oxidative phenotype by classical NF- κ B signalling. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1832, n. 8, p. 1313–25, ago. 2013.

REMELS, A H. V et al. Classical NF- κ B activation impairs skeletal muscle oxidative phenotype by reducing IKK- α expression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1842, n. 2, p. 175–85, fev. 2014.

REN, K.; DUBNER, R. Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia. **ILAR journal**, v. 40, n. 3, p. 111–118, 1999.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. 2009.

RIBEIRO-DA-SILVA, A.; TAGARI, P.; CUELLO, A. C. Morphological characterization of substance P-like immunoreactive glomeruli in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord and trigeminal subnucleus caudalis: a quantitative study. **J Comp Neurol**, v. 281, n. 4, p. 497–15, 1989.

RICCIO, A. et al. An NGF-TrkA-Mediated Retrograde Signal to Transcription Factor CREB in Sympathetic Neurons. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1097–1100, 22 ago. 1997.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.

RICE, A. S. C.; SMITH, B. H.; BLYTH, F. M. Pain and the global burden of disease. **PAIN**, v. 157, n. 4, p. 791–796, abr. 2016.

RIEDLINGER, T. et al. NF- κ B p65 dimerization and DNA-binding is important for inflammatory gene expression. **FASEB Journal**, v. 33, n. 3, p. 4188–4202, 2019.

ROSEN, E. D. et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Molecular cell**, v. 4, n. 4, p. 611–617, 1999.

ROSEN, E. D.; BENINGHOF, E. G.; KOENIG, R. J. Dimerization interfaces of thyroid hormone, retinoic acid, vitamin D, and retinoid X receptors. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 16, p. 11534–11541, 1993.

ROSEN, E. D.; O'DONNELL, A. L.; KOENIG, R. J. Ligand-dependent synergy of thyroid hormone and retinoid X receptors. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 31, p. 22010–22013, 1992.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 41, p. 37731–37734, 12 out. 2001.

ROSLAND, J. H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, v. 45, n. 2, p. 211–6, maio 1991.

ROSS, J. L. et al. Interleukin 1 β inhibition contributes to the antinociceptive effects of voluntary exercise on ischemia/reperfusion-induced hypersensitivity. **PAIN**, v. 159, n. 2, p.

380–392, fev. 2018.

RUAS, J. L. et al. A PGC-1 α Isoform Induced by Resistance Training Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy. **Cell**, v. 151, n. 6, p. 1319–1331, 2012.

RUFFINO, J. S. et al. Moderate-intensity exercise alters markers of alternative activation in circulating monocytes in females: a putative role for PPAR γ . **European Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 9, p. 1671–1682, 23 set. 2016.

RUIZ-MIYAZAWA, K. W. et al. 15d-PGJ2-loaded nanocapsules ameliorate experimental gout arthritis by reducing pain and inflammation in a PPAR-gamma- sensitive manner in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. January, p. 1–13, 2018.

SACLIER, M. et al. **Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. FEBS Journal**, set. 2013.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. Contribution of interleukin-1 β to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 7, p. 1265–1275, ago. 1995a.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, v. 115, n. 7, p. 1265–75, ago. 1995b.

SANDRI, M. et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 44, p. 16260–16265, 31 out. 2006.

SANIN, D. E.; PRENDERGAST, C. T.; MOUNTFORD, A. P. IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 3, p. 1218–1232, 2015.

SANTOS, D. et al. Muscle pain induced by static contraction in rats is modulated by peripheral inflammatory mechanisms. **Neuroscience**, v. 358, p. 58–69, 1 set. 2017.

SANTOS, D. F. S. et al. Prostaglandin 15d-PGJ2 targets PPAR and opioid receptors to prevent muscle hyperalgesia in rats. **Neuro Reports**, v. in press, 2020.

SAUER, S. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 10, p. 688–704, 1 out. 2015.

SCARIOT, P. P. M. et al. Continuous Aerobic Training in Individualized Intensity Avoids Spontaneous Physical Activity Decline and Improves MCT1 Expression in Oxidative Muscle of Swimming Rats. **Frontiers in physiology**, v. 7, n. April, p. 132, jan. 2016.

SCHÄFERS, M.; SORKIN, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neuroscience Letters**, v. 437, n. 3, p. 188–193, jun. 2008.

SCHNYDER, S.; HANDSCHIN, C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. **Bone**, v. 80, p. 115–125, 1 nov. 2015.

SCHOMACHER, J. et al. Chronic trauma-induced neck pain impairs the neural control of the deep semispinalis cervicis muscle. **Clinical Neurophysiology**, v. 123, n. 7, p. 1403–1408, 2012.

SCHULIGA, M. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1266–83, jan. 2015.

SCHWARTZ, E. S.; GEBHART, G. S. **Visceral pain. In: Behavioral neurobiology of chronic pain.** Heidelberg: Springer, 2014.

SHANKARAPPA, S. A.; PIEDRAS-RENTERÍA, E. S.; STUBBS, E. B. Forced-exercise delays neuropathic pain in experimental diabetes: Effects on voltage-activated calcium channels. **Journal of Neurochemistry**, v. 118, n. 2, p. 224–236, 2011.

SHARMA, N. et al. The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. **Nature**, v. 577, 2020.

SHARMA, N. K. et al. Aerobic exercise alters analgesia and neurotrophin-3 synthesis in an animal model of chronic widespread pain. **Physical therapy**, v. 90, n. 5, p. 714–25, maio 2010.

SHEN, J.; FOX, L. E.; CHENG, J. Swim Therapy Reduces Mechanical Allodynia and Thermal Hyperalgesia Induced by Chronic Constriction Nerve Injury in Rats. **Pain Medicine**, v. 14, n. 4, p. 516–525, 2013.

SHI, L. et al. Healthy lifestyle factors associated with reduced cardiometabolic risk. **British**

Journal of Nutrition, v. 105, p. 747–754, 2011.

SHIRVANI, H. et al. Swimming exercise improves gene expression of PPAR- γ and downregulates the overexpression of TLR4, MyD88, IL-6, and TNF- α after high-fat diet in rat skeletal muscle cells. **Gene**, v. 775, p. 145441, 5 abr. 2021.

SILVEIRA, L. S. et al. Macrophage Polarization: Implications on Metabolic Diseases and the Role of Exercise. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 26, n. 2, p. 115–32, 2016.

SIQUEIRA MIETTO, B. et al. Role of IL-10 in Resolution of Inflammation and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 50, p. 16431–42, 16 dez. 2015.

SLUKA, K. A et al. Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 114, n. 6, p. 725–33, 15 mar. 2013.

SLUKA, K. A; AUDETTE, K. M. Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia. **Molecular pain**, v. 2, p. 13, jan. 2006.

SOUZA, J. B. DE et al. Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. **Pain Research and Management**, v. 2017, 2017.

SOUZA, G. R. et al. Involvement of nuclear factor kappa B in the maintenance of persistent inflammatory hypernociception. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 134, p. 49–56, 2015.

SPIEGELMAN, B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**, v. 47, n. 4, p. 507–514, 1 abr. 1998.

SPIEGELMAN, B. M.; HEINRICH, R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. **Cell**, v. 119, n. 2, p. 157–167, 15 out. 2004.

STARKIE, R. et al. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 8, p. 884–6, maio 2003.

STEEL, S. J.; ROBERTSON, C. E.; WHEALY, M. A. Current Understanding of the Pathophysiology and Approach to Tension-Type Headache. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 21, n. 10, 1 out. 2021.

STEENSBURG, A. et al. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 285, n. 2, p. E433-7, ago. 2003.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Cyclopentenone Prostaglandins : New Insights on Biological Activities and CellularTargets. **Medical Research Reviews**, v. 21, n. 3, p. 185–210, 2001.

TAKAHASHI, K. et al. Influence of surface anesthesia on the pressure pain threshold measured with different-sized probes. **Somatosensory & motor research**, v. 22, n. 4, p. 299–305, dez. 2005.

TAKAHASHI, Y. et al. The macrophage-mediated effects of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuate tactile allodynia in the early phase of neuropathic pain development. **Anesthesia and analgesia**, v. 113, n. 2, p. 398–404, ago. 2011.

TAVARES, C. D. J. et al. Transcriptome-wide analysis of PGC-1 α -binding RNAs identifies genes linked to glucagon metabolic action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 36, p. 22204–22213, 8 set. 2020.

TEIXEIRA, J. M. et al. Diabetes-induced Neuropathic Mechanical Hyperalgesia Depends on P2X4 Receptor Activation in Dorsal Root Ganglia. **Neuroscience**, v. 398, p. 158–170, 2019.

TESARZ, J. et al. Sensory innervation of the thoracolumbar fascia in rats and humans. **Neuroscience**, v. 194, p. 302–8, 27 out. 2011.

TESARZ, J. et al. Alterations in endogenous pain modulation in endurance athletes: an experimental study using quantitative sensory testing and the cold-pressor task. **Pain**, v. 154, n. 7, p. 1022–9, jul. 2013.

THE NOBEL PRIZE in Physiology or Medicine 2021. **NobelPrize.org**. Nobel Prize Outreach AB 2022. Thu. 16 Jun 2022. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2021/press-release/> Acesso em: 10 de julho de 2022.

THOMAS, A. W. et al. Exercise-associated generation of PPAR γ ligands activates PPAR γ

signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 5, p. 806–815, mar. 2012.

TRANG, T.; SALTER, M. W. P2X4 purinoceptor signaling in chronic pain. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 621–628, 2012.

TREEDE, R. et al. Chronic pain as a symptom or a disease : the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **Pain**, v. 160, n. 1, 2019a.

TREEDE, R. et al. Chronic pain as a symptom or a disease. **PAIN**, v. 160, n. 1, p. 19–27, jan. 2019b.

TSUBOUCHI, Y. et al. Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, n. 4, p. 750–755, 2001.

TSUDA, M. et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature**, v. 424, n. 6950, p. 778–783, 14 ago. 2003.

TSUDA, M. et al. Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4receptors in acute and chronic pain assays. **Molecular Pain**, v. 5, p. 1–7, 2009.

TU, Y. M. et al. A high concentration of fatty acids induces TNF- α as well as NO release mediated by the P2X4 receptor, and the protective effects of puerarin in RAW264.7 cells. **Food & Function**, v. 8, n. 12, p. 4336–4346, 13 dez. 2017.

TUNSTALL, R. J. et al. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 1 46-1, 2002.

UGUCCIONI, G.; D'SOUZA, D.; HOOD, D. A. Regulation of PPAR γ Coactivator-1 α Function and Expression in Muscle: Effect of Exercise. **PPAR research**, v. 2010, p. 1–7, jan. 2010.

ULMANN, L.; HIRBEC, H.; RASSENDREN, F. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. **EMBO Journal**, v. 29, n. 14, p. 2290–2300, 2010.

- USOSKIN, D. et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 145–153, 1 jan. 2015.
- VAN OOSTROM, S. H. et al. Longitudinal Associations Between Physical Load and Chronic Low Back Pain in the General Population. **Spine**, v. 37, n. 9, p. 788–796, abr. 2012.
- VASCONCELOS, F.; CARVALHO DE ARAÚJO, G. Prevalência de dor crônica no Brasil: estudo descritivo. **Scielo - BrJP**, v. 1, n. 2, 2018.
- VIOLA, A. et al. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JULY, p. 1–16, 3 jul. 2019.
- WANG, L. et al. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. **Biochemical pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 73–89, 1 nov. 2014.
- WARREN, G. L. et al. Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 29, n. 2, p. 82–7, abr. 2001.
- WESTENENG, H. J. et al. Associations between lifestyle and amyotrophic lateral sclerosis stratified by C9orf72 genotype: a longitudinal, population-based, case-control study. **The Lancet. Neurology**, v. 20, n. 5, p. 373–384, 1 maio 2021.
- WHITESIDE, A.; HANSEN, S.; CHAUDHURI, A. Exercise lowers pain threshold in chronic fatigue syndrome. **Pain**, v. 109, n. 3, p. 497–9, jun. 2004.
- WIJNDAELE, K. et al. Sedentary behaviour , physical activity and a continuous metabolic syndrome risk score in adults. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 421–429, 2009.
- WILLIS, C. R. G. et al. Transcriptomic adaptation during skeletal muscle habituation to eccentric or concentric exercise training. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.
- WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. Cyclopentenone prostaglandins-new allies in the war on inflammation. **Nature medicine**, v. 6, n. 2, p. 137–8, fev. 2000.
- WONDERS, K. Y.; DRURY, D. G. Exercise Intensity as a Determinant of Exercise Induced Hypoalgesia Exercise Intensity as a Determinant of Exercise Induced Hypoalgesia. **Journal of Exercise Physiology online**, v. 14, n. August, p. 134–144, 2011.

WRANN, C. D. et al. Exercise Induces Hippocampal BDNF through a PGC-1 α / FNDC5 Pathway. **Cell metabolism**, p. 649–659, 2013.

XU, Y. et al. Gait Assessment of Pain and Analgesics: Comparison of the DigiGait™ and CatWalk™ Gait Imaging Systems. **Neuroscience Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 401–418, 18 jun. 2019.

YAKEU, G. et al. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: Roles of PPAR γ and Th2 cytokines. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 2, p. 668–673, 2010.

YANG, X. et al. Resveratrol regulates microglia M1/M2 polarization via PGC-1 α in conditions of neuroinflammatory injury. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 64, p. 162–172, 2017.

YOON, H. et al. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. **Experimental Neurology**, v. 267, p. 107–114, 2015.

ZHANG, J. et al. Prevention and reversal of latent sensitization of dorsal horn neurons by glial blockers in a model of low back pain in male rats. **Journal of neurophysiology**, v. 4, p. jn.00680.2016, 2017.

ZHANG, M. et al. MiR-130b promotes obesity associated adipose tissue inflammation and insulin resistance in diabetes mice through alleviating M2 macrophage polarization via repression of PPAR- γ . **Immunology letters**, v. 180, p. 1–8, dez. 2016.

ZHANG, R.-X. et al. IL-1 α alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. **Pain**, v. 135, n. 3, p. 232–239, abr. 2008.

ZHANG, S. et al. Annexin A2 binds to endosomes and negatively regulates TLR4- triggered inflammatory responses via the TRAM-TRIF pathway. **Scientific reports**, p. 1–15, 2015.

ZHOU, D. et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 2, p. 192–197, 2014.

ZIEMKIEWICZ, N. et al. The Role of Innate and Adaptive Immune Cells in Skeletal Muscle Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3265, 23 mar.

2021.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, jun. 1983.

ZUMERLE, S. et al. Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. **Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 1- 10.e4, 2 abr. 2019.

◆ ANEXOS

Anexo 1 – Artigo publicado no jornal “*Brain, behavior and immunity*” em 2021



Regular swimming exercise prevented the acute and persistent mechanical muscle hyperalgesia by modulation of macrophages phenotypes and inflammatory cytokines via PPAR γ receptors

Graciana de Azambuja^a, Carolina O. Jorge^a, Beatriz B. Gomes^a, Hayla R. Lourenço^a, Fernando M. Simabuco^b, Maria Claudia G. Oliveira-Fusaro^{a,*}

^a Laboratory of Pain and Inflammation Research, School of Applied Sciences, University of Campinas, Brazil

^b Multidisciplinary Laboratory in Food and Health, School of Applied Sciences, University of Campinas, Brazil

