UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas

Hayla Lourenço Rodrigues

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CRONIFICAÇÃO DA DOR MUSCULAR EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS FÊMEAS

LIMEIRA
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas

HAYLA LOURENÇO RODRIGUES

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CRONIFICAÇÃODA DOR MUSCULAR EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS FÊMEAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo na área de Ciências do Esporte.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA HAYLA LOURENÇO RODRIGUES E ORIENTADA PELA PROFª. DRª. MARIA CLÁUDIA GONÇALVES DE OLIVEIRA FUSARO

LIMEIRA
2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

Rodrigues, Hayla Lourenço, 1995-
R618a Avaliação do comportamento de cronificação da dor muscular em diferentes fases do ciclo estral de camundongos fêmeas / Hayla Lourenço Rodrigues. – Limeira, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Hiperalgesia. 2. Dimorfismo sexual (Animais). 3. Exercícios físicos. I. Oliveira, Maria Cláudia Gonçalves, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of chronification behavior of muscle pain in different phases of the estrous cycle of female mice
Palavras-chave em inglês:
Hyperalgesia
Sexual dimorphism (Animals)
Exercise
Área de concentração: Ciências do Esporte
Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo
Banca examinadora:
Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro [Orientador]
Andrea Maculano Esteves
Carolina Nascimben Matheus
Data de defesa: 07-07-2021
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/0000-0002-8649-0519
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/9067112652594818

Folha de Aprovação

Autor(a): Hayla Lourenço Rodrigues
Título: Avaliação do Comportamento de Cronificação da Dor Muscular nas Diferentes Fases do Ciclo Estral de Camundongos Fêmeas
Natureza: Dissertação
Área de Concentração: Ciências do Esporte
Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp
Data da Defesa: Limeira-SP, 07 de Julho de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro (orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Andrea Maculano Esteves (membro)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Carolina Nascibem Matheus (membro externo)
Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas

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.

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é totalmente dedicado à minha amada mãe, que não mediu esforços para que eu chegasse até aqui e ao meu querido tio João que hoje é meu anjo no céu.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é direcionado a Deus e a Nossa Senhora, só nós 3 sabemos tudo o que eu passei até aqui. Durante minha caminhada passei por muitas dores, angústias, tristezas e dificuldades e em todos os casos Ele esteve presente para me trazer amparo e força, principalmente nos momentos em que pensei em desistir de tudo, me mostrando que tudo o que foi preparado pra mim é bem maior do que eu sou capaz de imaginar.

Queria agradecer também a minha querida mãe, Vanilda. Ela abriu mão de uma vida pra que eu pudesse ser quem eu sou, me ensinou a ter garra e a nunca desistir dos meus sonhos. Ela é minha mãe, meu pai, meu verdadeiro anjo na Terra. Me ensinou que a honestidade e a simplicidade são as maiores qualidades que um ser humano pode ter e o mais importante, me mostrou a importância de nunca desviar do caminho do bem, mesmo que os outros duvidem de minhas intenções ou façam mau uso disso. Te amo daqui até o infinito.

Ao Vitor, meu amor e companheiro da vida. Meu porto seguro, minha fonte de paz e de caos ao mesmo tempo. Sua força e incentivo foram essenciais para que eu pudesse continuar trilhando o meu caminho, obrigada por não desistir de mim até quando eu mesma já havia desistido.

Meu obrigada especial a minha orientadora Maria Cláudia por ter me aberto as portas do LABEDI mesmo sem me conhecer direito, por ter me dado a oportunidade de conhecer e ver coisas que eu jamais imaginei um dia, além de lições valiosas que vão bem além da ciência, sendo essencial para o meu crescimento profissional e pessoal.

Queria agradecer também à banca do exame de qualificação pelo aceite, por todos os apontamentos, pela gigante contribuição e por todo o carinho com que conduziram aquele momento tão importante para mim. Aproveito para já agradecer também à banca que avaliará este trabalho durante a defesa pelo aceite ao convite e por toda a atenção dispensada a mim, admiro o trabalho de cada um que foi escolhido para este momento.

À FCA/UNICAMP, ao CNEM e a todos os professores que fizeram parte dessa trajetória, sem o trabalho de cada um que atua nessa instituição nada disso seria possível.

A cada um dos professores que passaram pela minha vida em todas as etapas, por toda a atenção e ensinamentos que dedicaram a mim. Levarei cada um em meu coração e a minha memória.

Meu agradecimento também vai para Graciana, Carolina e Guilherme. Com essas pessoas eu pude aprender inúmeras coisas e compartilhei momentos que nunca irei esquecer. Dentro da nossa rotina eu pude aprender muito sobre dor e ciência, mas o que tiro de mais importante de toda essa experiência sem dúvidas são referentes as relações humanas.

Não poderia deixar de agradecer também a professora Taisa Belli, que desde a minha graduação me cativou com a sua forma de ensinar e que foi uma verdadeira ponte

entre mim e a professora verdadeira ponte entre mim e a professora Maria Cláudia, ajudando a tornar esse sonho uma realidade.

Queria agradecer também aos meus queridos amigos da FCA, Gustavo, Felipe e João Pedro, pessoal da portaria e meninas da faxina. Vocês ajudaram a deixar tudo isso mais leve e legal, sou feliz por ter conhecido vocês.

Johnny, meu querido professor de inglês que se tornou meu amigo da vida. Obrigada por sempre acreditar em mim, me mostrar que sou capaz e por ter me deixado conhecer esse ser humano incrível que você é.

Às minhas queridas amigas Marília, Fernanda e Bruna que desde a graduação se tornaram essenciais na minha vida. Obrigada por todo apoio até aqui e por sonharem esse sonho comigo.

À minha terapeuta Natacha Furlan, que foi essencial durante todo esse processo.

Aos meus tios e tias, que mesmo não sabendo direito o que eu faço sempre rezaram e torceram para que tudo desse certo. Eu amo vocês daqui ao infinito!

Por último, mas não menos importante eu gostaria de agradecer à Beatriz. No início de tudo isso eu me senti extremamente sozinha e você me parecia tão distante que eu nunca imaginei que pudéssemos nos tornar tão próximas. Só nós sabemos tudo o que passamos nesse último ano de pandemia e eu não tenho palavras suficientes para te agradecer por não ter largado a minha mão um segundo sequer, você diz que sou a sua âncora aqui, mas nem imagina que sem a sua amizade, talvez eu não teria conseguido. Obrigada por ser minha irmã de alma, te amo!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001” e Processo nº 17/17919-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

EPÍGRAFE

"Por onde for o teu passo, que lá esteja o teu coração".

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

Introdução: Estudos demonstraram maior prevalência e intolerância aos estímulos dolorosos em mulheres e que esse dimorfismo sexual é modulado pelos hormônios gonadais. Os benefícios da prática de exercícios físicos regulares para a prevenção e redução de quadros álgicos já são conhecidos, porém, pouco se sabe sobre a influência dos hormônios gonadais nesse processo. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se o ciclo estral modula a dor muscular aguda e persistente em camundongos fêmeas e sua prevenção por meio de exercícios físicos regulares. **Metodologia:** Para este estudo foram utilizados camundongos Swiss Fêmeas e machos obtidos do CEMIB-UNICAMP. Os experimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas (5234-1/2019). Um modelo animal de transição de dor muscular aguda em persistente foi utilizado. Para isso, foi injetado carragenina (Cg) no músculo gastrocnêmio direito, promovendo uma sensibilidade prévia. Após um intervalo de 10 dias, foi realizada nova injeção de Prostaglandina E_2 ($PGE_{2)}$ no mesmo local, verificando-se a cronificação através dos limiares mecânico nociceptivos do músculo, quantificado pelo analgesímetro RandallSelitto antes e após as injeções. Para avaliar a participação do ciclo estral neste modelo, realizamos a técnica de lavado vaginal antes e após as injeções e do exercício físico. Para avaliar o efeito preventivo do exercício físico, os animais foram submetidos à natação antes da injeção de carragenina. **Resultados:** Quando a Cg foiinjetada em proestro, a hiperalgesia muscular aguda foi maior nas fêmeas do que nosmachos ($p < 0,0001$, ANOVA, teste de Tukey). Em estro e diestro, a Cg induziu menorhiperalgesia muscular aguda em camundongos fêmeas do que em machos ($p < 0,05$,ANOVA, teste de Tukey). Em metaestro, a Cg induziu hiperalgesia muscular em fêmeas com intensidade semelhante aos machos ($p > 0,05$, ANOVA, teste de Tukey).Considerando a hiperalgesia muscular persistente, as fêmeas que estavam na fase de estro no momento da injeção de Cg apresentaram hiperalgesia semelhante a machos ($p > 0,05$, ANOVA, teste de Tukey), enquanto as fêmeas nas demais fases apresentaram menor hiperalgesia do que os machos ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey). Comparando as respostas entre camundongos fêmeas, nossos resultados mostraram que em proestro, a Cg induziu maior hiperalgesia muscular aguda comparada às outras fases ($p < 0,05$, ANOVA Two Way, pós-teste deTukey). Na fase de estro, a Cg induziu maior hiperalgesia muscular persistente comparada às demais fases ($p < 0,05$, ANOVA Two Way, pós-teste de Tukey). Quandoanalisamos a fase estral em fêmeas previamente sensibilizadas pelo Cg, a PGE_2 induziu hiperalgesia muscular crônica semelhante ($p > 0,05$, ANOVA Two Way, pós- teste de Tukey). O exercício físico por natação evitou a cronificação da hiperalgesia muscular de forma semelhante em camundongos machos e fêmeas em todo o ciclo estral ($p > 0,05$, ANOVA, teste de Tukey). **Conclusão:** Resultados demonstraram queo ciclo estral modula a hiperalgesia muscular aguda e persistente, sendo maisimportante para o desenvolvimento do que para a manutenção da hiperalgesia muscular persistente. O exercício físico é eficiente em prevenir a hiperalgesia muscular em camundongos fêmeas, mas não foi influenciada pelo ciclo estral.

Palavras-Chave: Hiperalgesia Muscular, Dimorfismo Sexual, Exercício Físico

ABSTRACT

Introduction: Studies show greater prevalence and intolerance to painful stimuli in women and this sexual dimorphism is modulated by gonadal hormones. The benefit from regular physical exercise to prevent and/or reduce painful conditions is known, but so little is known about the influence of the gonadal hormones in the process. Therefore, the aim of this study was to investigate if the acute and persistent muscle hyperalgesia is modulated by estrous cycle in female mice and its prevention by regular physical exercise. **Methodology:** Swiss female mice (60 days old) obtained from CEMIB-UNICAMP were used for this study. All experiments were approved by the Animal Research Ethics Committee of Campinas State University (5234- 1/2019). An animal model of transition from acute to persistent muscle hyperalgesia was used. To this end, carrageenan (Cg) was injected into the right gastrocnemius muscle. After an interval of 10 days, an injection of prostaglandin E_2 (PGE_2) was performed at the same site. The mechanical muscle nociceptive thresholds was analyzed by the Randall Selitto analgesimeter before and after the injections. To evaluate the participation of the estrous cycle in this model, we performed the technique of vaginal washing before and after the injections and physical exercise. To evaluate the preventive effect of physical exercise, the animals were submitted to swimming before the injection of carrageenan. **Results:** When Cg was injected into proestrus, acute muscle hyperalgesia was greaterin females than in males ($p < 0,0001$, ANOVA, Tukey test). In estrus and diestrus, Cg induced less acute muscle hyperalgesia in female mice than in male mice ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey test). In metestrus, Cg induced muscle hyperalgesia in females similarly to male mice ($p > 0.05$, ANOVA, Tukey test). Considering persistent muscle hyperalgesia, females who were in the estrus phase at the time of Cg injection showedhyperalgesia similar to males ($p > 0.05$, ANOVA, Tukey test), while females in the otherphases had less hyperalgesia than males ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey test). Comparing the responses among female mice, our results showed that in proestrus, Cg induced greater acute muscle hyperalgesia compared to other phases ($p < 0.05$, Two Way ANOVA, Tukey post-test). In the estrus phase, Cg induced greater persistent muscle hyperalgesia compared to the other phases ($p < 0.05$, Two Way ANOVA, Tukeypost-test). When we analyzed the estrous phase in females previously sensitized by Cg, PGE_2 induced similar persistent muscle hyperalgesia ($p > 0.05$, Two Way ANOVA, Tukey post-test). Physical exercise by swimming similarly prevented the chronification of muscle hyperalgesia in male and female mice throughout the estrous cycle ($p > 0.05$, ANOVA, Tukey test). **Conclusion:** Results showed that the estrous cycle modulates acute and persistent muscle hyperalgesia, which is more important for the development of persistent muscle hyperalgesia than for its maintenance. Physical exercise is efficient in preventing muscular hyperalgesia in female mice, but it was not influenced by the estrous cycle.

Keywords: Muscle Hyperalgesia, Sexual Dimorphism, Physical Exercise

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho Experimental 28

Figura 2. Fases do Ciclo Estral 29

Figura 3. Modelo de Hiperalgesia Muscular Aguda e Persistente 30

Figura 4. Linha do tempo – Acompanhamento do Limiar Hiperalgésico 31

Figura 5. Protocolo de Exercício Físico – Natação 32

Figura 6. O dimorfismo sexual na hiperalgesia muscular é influenciado pelo ciclo estral 35

Figura 7. Fases do ciclo estral influenciam na hiperalgesia muscular aguda e persistente 36

Figura 8. Manutenção da hiperalgesia muscular persistente independe do ciclo estral 37

Figura 9. Exercício físico previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente de maneira semelhante em fêmeas e machos 38

Figura 10. A hipoalgesia induzida pelo exercício independe do ciclo estral 39

Figura 11. O exercício físico não aumentou os níveis de corticosterona plasmática 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5TH - 5-hidroxitriptamina
AMP – Monofosfato de Adenosina
AMPc – Monofosfato de Adenosina Cíclico
AUC – Análise de Área Sob a Curva
Cg – Carragenina
ERα – Receptor de Estrogênio
EsRα – Receptor Cognato de Estrogênio Alfa
EsRβ - Receptor Cognato de Estrogênio Beta
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GABA – Receptor do Ácido γ-aminobutírico
IL-6 – Interleucina 6
LH – Hormônio Luteinizante
mL - Mililitro
NaCl – Cloreto de Sódio
Ng – Nanograma
PGE_2 – Prostaglandina E_2
PKA – Proteína Cinase A
PKCε – Proteína Cinase C Episilon
PPARγ - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama
RVM - Ventromedial rostral
Sal - Salina
SERT – Transportador de Serotonina
SNC – Sistema Nervoso Central
TLR4 – Receptor Toll-Like 4
μl – Microlitro
μg – Micrograma

Sumário

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Hiperalgesia Muscular 18
1.2 Ciclo estral 19
1.3 A influência dos hormônios gonodais na hiperalgesia muscular 20
1.4 Dimorfismo sexual 22
1.5 Exercício físico 23
2 OBJETIVOS 26
3 JUSTIFICATIVA 27
4 MATERIAIS E MÉTODOS 28
4.1 Animais 28
4.2 Procedimentos Gerais 28
4.3 Lavado vaginal para determinação da fase do ciclo estral 29
4.4 Modelo de hiperalgesia muscular aguda seguida de hiperalgesia muscular persistente 30
4.5 Quantificação da hiperalgesia muscular 30
4.6 Protocolo de Natação 31
4.7 Quantificação da concentração de corticosterona plasmática 32
4.8 Análise Estatística 33
5 RESULTADOS 34
5.1 Dimorfismo sexual na hiperalgesia muscular aguda e persistente 34
5.2 Comparação entre as diferentes fases do ciclo estral na indução da hiperalgesia muscular aguda e persistente 36
5.3 Comparação entre as fases do ciclo estral na manutenção da hiperalgesia muscular persistente 37
5.4 Análise do dimorfismo sexual na hipoalgesia induzida pelo exercício 37
5.5 Análise do ciclo estral na hipoalgesia induzida pelo exercício 39
Figura 10: 39
5.6 Avaliação dos níveis de corticosterona em animais exercitados 39
6 DISCUSSÃO 41
7 CONCLUSÃO 45
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 46
ANEXOS 55

1 INTRODUÇÃO

A dor é uma modalidade sensorial, que também pode ser interpretada como um evento responsável por proteger o corpo de diversos insultos (LALISSE et al., 2018). É considerada como uma das condições que mais afetam os seres humanos, cuja incidência tende a aumentar cada vez mais com o avanço da idade populacional (SIMON, 2012).

É conhecida também por ser uma das doenças que mais levam o indivíduo a procurar ajuda médica, devido à quantidade de debilidades e incapacidades que a mesma pode causar, trazendo grande prejuízo socioeconômico, fato que é agravado principalmente quando essa dor se torna persistente, passando do estágio de dor aguda para crônica (GUREJE et al., 1998, TURK & RUDY, 1988). Contudo, apesar do seu caráter incapacitante, as alternativas para o tratamento da dor crônica ainda são pouco efetivas (LI et al., 2021).

Além disso, dados mais recentes obtidos a partir do estudo de mecanismos envolvidos no processamento e manutenção da dor em diferentes sexos apontam outro grande problema nas pesquisas acerca do assunto. Diversos estudos apontam grandes divergências, que mostram que não só a prevalência, mas também a intolerância ao estímulo doloroso é maior em mulheres. Tal fato pode ser constatado através de estudos epidemiológicos, que demonstram que a população feminina que sofre com dores crônicas é 6% maior quando comparada à população masculina (FILLINGIM et al., 2009; MOGIL, 2012).

Um relatório consensual (GREESPAN et al., 2007) apontou que quando tratamos de estudos que envolvam dor e seus mecanismos relacionados ao dimorfismo sexual, devemos levar consideração alguns pontos considerados cruciais, como as condições que levam a expressão das diferenças sexuais quanto a experiência e a reatividade a um evento doloroso, quais os mecanismos que medeiam esse processo e também qual o nível de influência que isso causa no tratamento clínico da dor.

Com isto, cada vez mais estudos vem tentando desvendar os mecanismos e vias que atuam na ativação e manutenção da dor em ambos os sexos, levando em consideração os achados que apontam diferenças importantes no processamento

desta condição. Tais diferenças podem ser verificadas tanto em relação a atuação de diferentes células imunes, como também a influência dos hormônios sexuais, bem como a interação desses dois fatores no processamento da dor (SORGE et al., 2015).

Sabe-se que os níveis de hormônios gonodais (estrogênio, progesterona e testosterona) sofrem flutuações ao longo da vida e que tais substâncias possuem efeitos diretos no sistema nervoso central e periférico, sendo que esta flutuação é mais pronunciada em mulheres do que em homens (MANSON, 2010). Tal fato se dá em decorrência de diversos eventos como a gravidez, menopausa e principalmente durante as várias fases que compõem o ciclo menstrual (FILLINGIM et al., 2009).

Em uma situação fisiológica, os hormônios sexuais são produzidos e excretados de acordo com a fase do ciclo reprodutivo em que a mulher se encontra, sendo responsáveis por desempenhar importantes funções no organismo, influenciando inclusive diversas funções sistêmicas, como no modo em como a dor é percebida e modulada, por exemplo.

Martin (2009) mostrou em seu estudo de revisão que a flutuação dos níveis hormonais que ocorre durante o ciclo é responsável por afetar a sensibilidade dolorosa não só em mulheres, mas também em modelo animal. Além disto, outros estudos também relataram que vários tipos de dor, incluindo a musculoesquelética, normalmente afetam mais as mulheres, particularmente entre os 18 e 44 anos de idade, ou seja, durante grande parte do período reprodutivo (KORFF et al., 1988, DE ANGELIS et al., 2005)

Vários estudos apontam de forma bem consolidada a presença de uma analgesia induzida pela gravidez, que pode ser explicada em partes pela ativação do sistema opioide mediada pelo aumento da concentração dos níveis de estrogênio e progesterona (DAWSON-BASOA & GINTZLER, 1996). Estas flutuações hormonais também ocorrem com maior frequência durantes as diferentes fases do ciclo menstrual, podendo este, ser um fator que contribui diretamente para a existência de uma diferença no comportamento doloroso.

Em camundongos, o ciclo estral é dividido em 4 fases: estro, metaestro, diestro e proestro, sendo que durante as duas primeiras etapas, os níveis de estrogênio são mais baixos, tendo um aumento gradual durante a fase diestro e finalmente alcança o seu pico durante a fase proestro, diminuindo a sua

concentraçãoainda ao final desta mesma fase. Já a progesterona alcança o seu pico de concentração ao final da fase de metaestro e novamente ao final de proestro (BUTCHER, 1974; MARTIN, 2009).

O estrogênio e a sua ação nas vias periféricas e centrais relacionadas a dor é uma pauta que vem sendo cada vez mais estudada, porém ainda permanece pouco esclarecida. Alguns dados apontam para o fato de que respostas inflamatórias normalmente são mais evidenciadas em mulheres do que em homens e que isto pode estar fortemente associado aos níveis de estrogênio. Estes estudos mostram que níveis mais altos deste hormônio podem induzir uma resposta anti-inflamatória, por outro lado níveis mais baixos podem desencadear nenhuma ou então uma resposta pró-inflamatória. (STRAUB, 2007).

Um estudo demonstrou a ligação dos hormônios gonodais ao sistema opioide, mostrando que mulheres com uma maior ativação dos receptores mu-opioides cerebrais e com níveis mais altos de estradiol e baixos de progesterona possuíam uma menor resposta a sensibilidade dolorosa, enquanto níveis diminuídos de estrogênio conferiam uma menor ativação desses receptores (ZUBIETA et al., 2002). Entretanto, outros estudos demonstram que dependendo do modelo de hiperalgesia utilizado, o estrogênio pode atuar como um fator pró-nociceptivo em roedores (CHANG et al., 2019). Uma revisão sistemática apontou que a grande maioria dos estudos que investigam a dor durante o ciclo estral demonstram que o aumento da sensibilidade dolorosa ocorre durante a fase proestro, sendo o estrogênio apontado justamente como um fator pro-nociceptivo (MARTIN, 2009). Tais dados ajudam a embasar ainda mais a existência de uma diferença no comportamento doloroso e da possibilidade da ativação de diferentes vias de sinalização dolorosa durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo.

Por outro lado, através do modelo desenvolvido por Dina e colaboradores (2008), sabe-se que a injeção intramuscular de carragenina é capaz de promover uma sensibilização prévia do neurônio nociceptivo aferente primário, fazendo com que após uma injeção de PGE_2 no mesmo local, o animal desenvolva uma resposta hiperalgésica muscular persistente e intensa.

Uma vez que esta diferença pode ser mediada diretamente pela comunicação entre os hormônios sexuais femininos e a atividade das células do

sistema imunes durante o processo inflamatório, a investigação a fim de entender melhor a série de mecanismos envolvidos na manutenção e processamento da dor se mostra de extrema importância, mesmo que embora venham sendo cada vez mais estudados, ainda seguem pouco esclarecidos e, portanto, sem um tratamento efetivo.

Embora já seja bem estabelecido que o exercício físico é capaz de causar efeitos benéficos a saúde, impactando diretamente na melhora da qualidade de vida, a sua aplicação vem se tornando bem mais ampla. O exercício físico vem ganhando cada vez mais espaço como um meio de prevenção e tratamento efetivo para a dor crônica. Já é visto na literatura que quando praticado regularmente, é capaz de prevenir o desenvolvimento de hiperalgesia, através da modulação de vias de sinalização do sistema nervoso central (SLUKA, 2013).

No modelo de exercício físico utilizado em nosso laboratório (AZAMBUJA et al., 2021), foi visto que o exercício físico de intensidade moderada, utilizando um protocolo de natação realizado por três semanas consecutivas, foi capaz de produzir não só uma hipoalgesia na lesão aguda causada após a injeção intramuscular de carragenina, mas também foi capaz de impedir a cronificação da dor muscular em camundongos machos.

Leung et al., (2016) mostrou em seu estudo que tanto camundongos do sexo feminino, como do sexo masculino não desenvolveram hiperalgesia muscular crônica após serem submetidos ao exercício físico por oito semanas. Esta analgesia pode ser explicada pela modulação do sistema imunológico e da liberação de substâncias anti-inflamatórias que impedem o desenvolvimento e estabelecimento da dor muscular crônica.

As vias pelas quais o exercício atua para prevenir o desenvolvimento da nocicepção são diversos, porém a forma pelo qual o mesmo atua se mostra muito mais complexo. Para entender melhor como ele promove os seus efeitos benéficos na dor, é necessário também compreender como os diferentes tipos de exercício físicos, duração e intensidade podem promover a hipoalgesia. Tal investigação se torna ainda mais complexa, quando surge a hipótese de que a resposta ao exercício físico pode diferir de acordo com cada uma das fases do ciclo estral. Sendo assim, dada a importância da investigação dos mecanismos envolvidos na transição e manutenção da dor muscular crônica, o objetivo do presente estudo é presença de uma diferença

comportamento doloroso entre machos e fêmeas em nosso modelo de dor crônica e entre as diferentes fases do ciclo estral e ainda se a resposta do exercício físico como meio de prevenção a dor crônica ocorre de forma diferente durante essas fases.

1.1 Hiperalgesia Muscular

A dor muscular é capaz de trazer diversas manifestações que são descritas como sensação de dor penetrante, radiante e difusa acompanhado por muitas vezes de hiperalgesia. Podemos definir o conceito de hiperalgesia como um aumento na sensibilidade dos receptores capazes de perceber o estímulo doloroso, sendo que esses são chamados de nociceptores e estão localizados no tecido profundo, caracterizando-a como uma sensibilização periférica. No entanto, ela também pode ser ocasionada por uma sensibilização central onde há um aumento na resposta neuronal no corno dorsal da medula. Tanto a sensibilidade quanto a propagação do estímulo doloroso estão diretamente relacionados tanto as mudanças no controle descendente dos chamados centro supra espinhais, como ao aumento da atividade sináptica em neurônios situados no sistema nervoso central (GRAVEN-NIELSEN & ARENDT-NIELSEN, 2010)

Quando tratamos da dor muscular agudam podemos dizer que ela é percebida como uma resposta a ativação dos nociceptores polimodais relacionados às fibras aferentes, localizados no tecido profundo, podendo liberar neuropeptídeos sensibilizantes que irão sensibilizar este nociceptor levando ao quadro de hiperalgesia (MENSE, 1993).

Embora durante muitos anos o conceito de agudo e crônico trazido tenham sido definidos como fenômenos distintos, após anos de estudos chegou-se em um consenso de que não existia uma diferença mecânica entre ambos conceitos, exceto pela presença de cortes temporais baseados no tempo de permanência daquela condição (CROFT et al., 1993). Após anos de experiência clínica, pode-se observar a possibilidade da existência de uma transição funcional do estado de dor aguda para a crônica, embora haja casos onde a dor aguda persista sem nunca se tornar um fenômeno persistente (CERBO et al., 2000).

Estudos demonstraram a ocorrência de alterações plásticas em circuitos do sistema nervoso central devido ao aumento da atividade nas fibras aferentes nociceptivas (KAYSER et al., 1998). Com isso, após a percepção de que algumas

condições de dor crônica poderiam ser iniciadas através de episódios de dor aguda o que suscitou um interesse em isolar as fases aguda e persistente da hiperalgesia a fim de avaliar como se dava a ocorrência desse fenômeno. Para isso, foi utilizada uma injeção de carragenina resultando em uma inflamação de curta duração na pata traseira do rato associada ao quadro de hiperalgesia aguda, levando a uma diminuição do limiar para a resposta de retirada. Dias depois, foi realizada uma nova injeção usando uma citocina inflamatória, a PGE_2, sendo capaz de gerar uma resposta hiperalgésica ainda mais intensa e duradoura, denominada como hiperalgesia persistente. Nesse modelo é importante salientar que o uso da PGE_2 sem a indução de uma lesão anterior seria capaz de gerar apenas uma hiperalgesia aguda de apenas 4 horas de duração (ALEY et al., 2000, DINA et al., 2008, JORGE, et al., 2020).

O uso desse modelo possibilitou então o estudo do chamado priming hiperalgésico, que pode ser definido como um quadro de hipersensibilidade latente a chamada hiperalgesia inflamatória que ainda se encontra intensa e presente mesmo semanas depois do insulto inflamatório (REICHLING & LEVINE, 2009).

1.2 Ciclo estral

A estimativa do ciclo estral em camundongos é tida como uma excelente forma de avaliar o funcionamento do sistema reprodutor de camundongos fêmeas, sendo que a técnica de lavado vaginal (GODMAN et al., 2007) é uma das mais conhecidas e utilizadas em estudos biológicos.

Além disso, os camundongos vêm se mostrando como um excelente modelo para estudos envolvendo hormônios e reprodução, uma vez que seu ciclo possui curta duração (4 a 5 dias) e apresenta grande precisão (EKAMBARAM et al., 2017).O ciclo estral é composto por quatro fases, sendo que cada uma de suas etapas podem ser diferenciadas através das células observadas durante a visualização do muco vaginal coletado em microscópio.

O primeiro estágio é denominado proestro, possui a duração de 1 dia e pode ser comparado a fase folicular do ciclo reprodutivo em humanos. Nele, há a presença de células epiteliais nucleadas seguidos do aumento dos níveis de hormônios 17-β estradiol, do hormônio luteinizante (LH), do hormônio folículo estimulante (FSH) e prolactina em menor proporção. Durante a fase seguinte, denominada estro, é registrado o maior pico dos níveis de hormônio prolactina,

seguido de uma queda gradativa dos níveis 17-β estradiol. Essa etapa é onde ocorrea ovulação e tem uma duração de em média 1 a 2 dias, sendo que um grande númerode células cornificadas podem ser vistas no material coletado. Por fim, temos as duas últimas fases onde é registrado o aumento gradual dos níveis de progesterona até que o mesmo atinja seu maior pico. A fase metaestro possui uma pequena duração se comparado as outras fases e pode ser caracterizado pela presença de leucócitos em abundância rodeado de um pequeno número de células cornificadas. Já diestro, possui uma duração de até dois dias, sendo que as células que caracterizam essa fase são chamadas de leucócitos. Ao final desta última fase também pode ser observado o início do aumento gradual dos níveis de estradiol (EKAMBARAM et al., 2017; GOLDMAN et al., 2007).

1.3 A influência dos hormônios gonodais na hiperalgesia muscular

Diversos estudos apontam que as mulheres possuem uma maior tendência a desenvolver distúrbios inflamatórios, sendo que tal fato pode estar intimamente relacionado à liberação de citocinas pró-inflamatórias e também a plasticidade neuronal. Uma vez que os hormônios possuem influência direta no sistema nervoso central, podemos sugerir que os mecanismos que envolvem ambos fatores podem estar diretamente relacionados às oscilações hormonais que ocorrem durante todo o ciclo estral.

Com o dimorfismo sexual sendo um assunto cada vez mais abordado e discutido, algumas pesquisas vêm tentando compreender melhor o funcionamento das vias dolorosas no decorrer das fases do ciclo reprodutivo. Entretanto, com o evoluir dos estudos tem sido observado resultados pouco consistentes acerca da caracterização da dor em função dessa variável. Tal fato pode se dar em função de diferenças metodológicas básicas e o modelo a ser utilizado, uma vez que já foi apontado na literatura que a resposta nociceptiva pode sofrer importantes variações dependendo do tipo de estímulo utilizado para induzir a sensibilidade dolorosa impactando de forma direta nos resultados obtidos.

Embora ainda sejam poucos os estudos que investiguem o papel das citocinas inflamatórias no dimorfismo sexual, alguns deles nos ajudam a elucidar como as vias inflamatórias atuam em cada um dos gêneros. O estudo de Torrez-Chávez et al; (2010), que investigou o papel dos hormônios gonodais na liberação de citocinas

inflamatórias induzidas por formalina em um modelo de dor na junção temporomandibular, mostrou uma maior expressão e liberação da citocina IL-6 em fêmeas durante as fases diestro e proestro.

A IL-6 é uma citocina que faz parte da cascata de eventos que ocorre durante processos inflamatórios sendo que estudos mais aprofundados demonstraram uma ambiguidade em sua função dependendo do estágio da resposta inflamatória. Corroborando com estes achados Gabay et al., (2006) trouxe em seu estudo que a IL-6 atua como uma citocina anti-inflamatória durante processos agudos, entretanto, quando se trata de processos inflamatórios crônicos, esta mesma citocina parece atuar de forma a contribuir com este processo exercendo um papel pró inflamatório.

Já é entendido também que a injeção de PGE_2 realizada após um estímulo inflamatório primário é capaz de prolongar a resposta hiperalgésica através de uma sinalização inibitória dependente da proteína cinase C epsilon (PKCε) (FERRARI & LEVINE, 2015; PARADA et al; 2005). Essa via possui um mecanismo onde o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) é produzido através da PGE_2 e transportado para o compartimento extracelular, sendo convertido em monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina, por enzimas como a ecto-5ℏucleotidase, cujo produto final estimula a PKCε através da ativação de seus receptores sendo considerada um fator indicativo de plasticidade no receptor nociceptivo (FERRARI & LEVINE, 2015, DUARTE et al, 2012; JACKSON & DUBEY, 2001; REICHLING & LEVINE, 2009).

Um estudo demonstrou que a enzina ecto-5ℏucleotidase, que pode modular a função do hipocampo e a plasticidade sináptica, revelou também ter a sua atividade regulada nos neurônios hipocampais de ratos fêmeas através da atuação de receptores cognatos de estrogênio alfa (EsRα) e beta (EsRβ) MITROVIC, et al; 2016). Tal fato, leva a entender que o EsRα pode atuar de forma importante no dimorfismosexual presente no priming hiperalgésico.

Ferrari e colaboradores (2016) demonstram bem isso em seu estudo, uma vez que seus resultados apontam que a presença do EsRα regula a hiperalgesia induzida por AMP, impactando diretamente na atividade da ecto-5ℏucleotidase. Neste caso, sem o estrogênio a ativação desta enzima é prejudicada e com isso há a interrupção da conversão do AMP em adenosina.

Outro estudo realizado por Fisher et al (2008) sugere que uma maior prevalência de dor em mulheres, principalmente durante a idade reprodutiva, pode ser explicada pela flutuação dos níveis de estrogênio ao longo do ciclo reprodutivo. Sendo assim, acreditamos que a hiperalgesia aguda e persistente pode ser fortemente influenciada pelas oscilações nos níveis hormonais, principalmente quando se trata do estrogênio.

1.4 Dimorfismo sexual

Diversos estudos apontam para uma a maior incidência de condições relacionadas a dor crônica de diversos tipos em mulheres, além de estudos envolvendo animais também demonstrarem que normalmente em camundongos fêmeas a dor crônica é mais intensa e duradoura que em machos o que aponta para a presença de um dimorfismo sexual na dor (FILLINGIM et al., 2009; UNRUH, 1996; VACCA et al., 2014, GREGORY et al., 2013).

Neste sentido, o aumento do número de pesquisas envolvendo essa temática aumentaram expressivamente nos últimos anos, no entanto, ainda se sabe muito pouco acerca dos mecanismos que medeiam essa diferença sexual no comportamento doloroso. Pesquisas revelaram que até a puberdade não há dados que apontem para uma diferença na sensibilidade dolorosa quando comparamos crianças do sexo feminino e masculino (BOERNER et al., 2014; KING et al., 2011). Outro fato interessante a ser observado é que resultados demonstram que não somente os hormônios sexuais femininos estão envolvidos nesse processo, mas também a testosterona. Em modelos de dor neuropática e inflamatória foi observado que este hormônio masculino é capaz de modular a resposta neuro imune do receptor espinhal Toll-Like 4 (TLR4), cuja estimulação está diretamente relacionada a interação entre a resposta imune e adaptativa e também a indução, transição e manutenção de estados de dor persistente (NIU, ZANGH, RO, 2012; SORGE et al., 2011; SORGEet al., 2015; TAKEDA, KAISHO & AKIRA 2003). Lesnak et al (2020) observou em seu estudo que a administração de testosterona em machos e fêmeas orquiectomizados foi capaz de reduzir a sensibilidade hiperalgésica de forma significativa em um modelo de dor muscular induzida por atividade.

Já quando se trata de pesquisas realizadas em seres humanos resultados consistentes demonstram a ocorrência de efeitos antinociceptivos multifatoriais

mediados pela testosterona, uma vez que se observou que baixos níveis deste hormônio são capazes de alterar gerar uma menor ativação das regiões cerebrais que estão evolvidas na inibição da dor descendente (VICENT et al., 2013). Assim, todos os dados discorridos anteriormente apontam que o esclarecimento das vias e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente podem estar profundamente relacionados a atuação dos hormônios gonodais contribuindo para a presença do dimorfismo sexual neste caso.

1.5 Exercício físico

Ao longo dos anos, estudos apontam o uso do exercício físico como uma forma eficiente de prevenir a dor muscular. Com isso, diversos mecanismos vêm sendo apontados pela sua provável atuação nesse processo. Muito se sabe acerca dos benefícios da prática de exercícios físicos para a saúde, entretanto, nos últimos anos foi verificado também que o sedentarismo é capaz de aumentar a incidência de dor musculoesquelética em seres humanos (LANDMARK, et al., 2013).

Embora já tenha sido demonstrado em alguns estudos que sessões agudas de exercício físico contribuem para o aumento da dor muscular tanto em humanos, como em modelos animais, a sua prática regular pode ser crucial para a prevenção da dor muscular crônica em ambos os casos. Cada vez mais a maioria dos estudos vem optando por utilizar exercícios do tipo aeróbicos para avaliar os mecanismos pelo qual ele induz analgesia, principalmente quando se trata de modelos experimentais, explorando a sua capacidade de prevenir o surgimento da dessa condição iniciando as sessões de treinamento antes de submeter os animais a modelos que explorem a hiperalgesia persistente (LESNAK & SLUKA, 2020).

Seguindo esta mesma linha é possível verificar ainda que protocolos de natação tem sido um dos mais utilizados, uma vez que é possível manter um controle minucioso acerca da intensidade e tempo de duração deste. Em contrapartida, seu uso vem sendo constantemente contestado uma vez que ele possui a capacidade de aumentar os níveis de estresse, sendo este também um fator capaz de induzir hipoalgesia através da atuação do sistema opioide (CONTARTEZE et al., 2008; COOPER & CARMODY, 1982). Assim, a fim de atestar a eficácia do exercício físico na prevenção da dor, técnicas biomoleculares que possuem como objetivo verificar o aumento nos níveis do hormônio corticosterona, assim como a realização de um controle minucioso da temperatura da água e um protocolo de adaptação são feitos

para garantir que o estresse não interfira nos resultados obtidos (AZAMBUJA et al., 2020; KREGEL et al., 2007; LIMA et al; 2017).

Quando se trata do uso deste método como forma de tratamento para a prevenção ou alívio da dor crônica, foi observado que a além do tipo de exercício (aeróbio ou resistido) é muito importante também estabelecer a duração e o volume de cada sessão. Já foi visto que embora o exercício físico seja eficiente em reduzir a hiperalgesia em roedores, o treinamento exaustivo bloqueia os efeitos analgésicos obtidos resultando em maior sensibilidade hiperalgésica em comparação com os animais sedentários submetidos ao mesmo modelo (COBIANCHI et al., 2010)

Além disso, foi possível observar a eficácia do exercício físico na prevenção de variados modelos de dor, um exemplo disso pode ser visto através de protocolos onde os animais treinados submetidos a um modelo de dor neuropática tiveram reversão e até mesmo prevenção da hiperalgesia mecânica (CHEN et al., 2012; KUPHAL et al., 2007; ALMEIDA et al., 2015, CHHAYA et al., 2019; KAMI et al., 2016). Quando se trata do uso de modelos de dor muscular também foi visto a sua ação tanto como meio de prevenção, quanto como ferramenta terapêutica, sendo que nestes casos é necessário estipular um limite mínimo de tempo de atividade para que os efeitos de diminuição e reversão da hiperalgesia possam ser observados (AZAMBUJA et al., 2020; LEUNG et al., 2016; SHARMA et al., 2010, LESNAK & SLUKA, 2020).

Para promover esta resposta hipoalgésica o exercício físico se vale da atuação de mecanismos centrais e periféricos. Estudos apontaram que o sistema opioide está envolvido nessa modulação, dados de Parent-Vacon et al (2019) mostraram que no córtex frontal de camundongos fêmeas submetidas a lesão do ervo houve aumento dos chamados peptídeos opioides como a metencefalina, a leucenfalina e a beta-endorfina no córtex frontal após 4 semanas de acesso a rodas de corrida.

Já em modelos de dor neuropática e muscular é possível observar um aumento no transportador de serotonina (SERT) que é o responsável por controlar os níveis extracelulares de serotonina na medula ventromedial rostral (RVM). Neste local em específico, o aumento da serotonina possui um efeito analgésico (LLEWELYN, AZAMMI & ROBERTS, 1984; INASE et al., 1987). Brito et al (2017) demonstrou em seu estudo que animais sedentários que sofreram a indução da hiperalgesia muscular

persistente teve um aumento significativo do SERT na RVM. No entanto, os animais que foram submetidos a atividade voluntária na roda de corrida o exercício foi capaz de evitar o aumento da expressão desse transportador, prevenindo a hiperalgesia persistente.

Protocolos de natação também se mostraram eficientes em prevenir a hiperalgesia persistente através de mecanismos centrais. Um exemplo disso pôde ser observado após ser verificado que 2 semanas desse exercício foi capaz de prevenir o aumento do mensageiro intracelular fosforilado-PKA na medula espinhal lombar em um modelo de injeção intraplantar de glutamato. É sabido que a ativação dos receptores de glutamato é capaz de aumentar o cálcio intracelular ativando a proteína quinase A (PKA) contribuindo para a sensibilização central e periférica (MARTINS et al., 2017). Além disso, foi constatado que a natação regular foi capaz de diminuir os níveis circulantes de adipocinas que neste caso mostraram desempenhar um papel importante na no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (SUN et al., 2019).

Um recente estudo desenvolvido (AZAMBUJA et al., 2021) em nosso laboratório também apontou que um protocolo regular de natação foi eficiente em prevenir a hiperalgesia muscular mecânica aguda e persistente via modulação fenotípica de macrófagos, polarizando-os para um perfil anti-inflamatório, e citocinas por ação dos receptores gama do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPARγ) em camundongos do sexo masculino. Embora todos esses achados contribuam para a firmação do exercício físico como um potencial meio para a prevenção da dor, ainda não se sabe ao certo se esses mecanismos também contribuem para da mesma forma em modelos utilizando camundongos fêmeas, se os hormônios gonodais contribuem diretamente na modulação das vias envolvidas e ainda se há diferenças no comportamento hipoalgésico dependente do sexo.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi investigar se o ciclo estral modula a dor muscular aguda e persistente em camundongos fêmeas, bem como o efeito do exercício físico regular como prevenção da hiperalgesia muscular persistente em de fêmeas em comparação com machos.

3 JUSTIFICATIVA

A dor crônica é um problema de saúde mundial, que afeta milhares de indivíduos em idade produtiva, sendo que o sexo feminino é comprovadamente a população que mais sofre com esta condição. Ela pode gerar um alto grau de incapacidade para o indivíduo, afetando diretamente na realização das atividades de vida diária, trazendo grande prejuízo emocional e social, não só para o paciente, mas também para a sociedade na qual ele está inserido. Sendo assim, entender mais profundamente a transição da dor aguda para a crônica assim como a sua manutenção, são essenciais para o desenvolvimento de novas práticas terapêuticas.

Além disto, uma vez que o exercício físico vem se mostrando como uma alternativa de tratamento eficaz e sem a produção de efeitos colaterais indesejados para a dor crônica, se torna de extrema importância a investigação dos mecanismos pelo qual ele atua, verificando também se é necessário alterar a sua intensidade durante as diferentes fases ciclo menstrual para produzir o efeito hipoalgésico desejado.

A partir disto, salientamos a importância da realização de estudos que investiguem os mecanismos envolvidos no processamento na dor, assim como a utilização do exercício físico como um meio terapêutico alternativo e eficiente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para os experimentos, foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com 60 dias de idade, obtidas do CEMIB- UNICAMP. Osanimais foram armazenados em gaiolas plásticas reunidos em grupos de cinco em cada uma, contendo maravalha. O ambiente onde foram armazenados possui controlede luminosidade (ciclo claro/escuro 12h) com água e ração *ad libitum*. Os experimentos realizados foram aprovados pelo Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas, sob o parecer do protocolo 5234-1/2019 e seguiram as diretrizes do comitê para pesquisa e ética da Associação Internacional para Estudo da Dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

Figura 1:

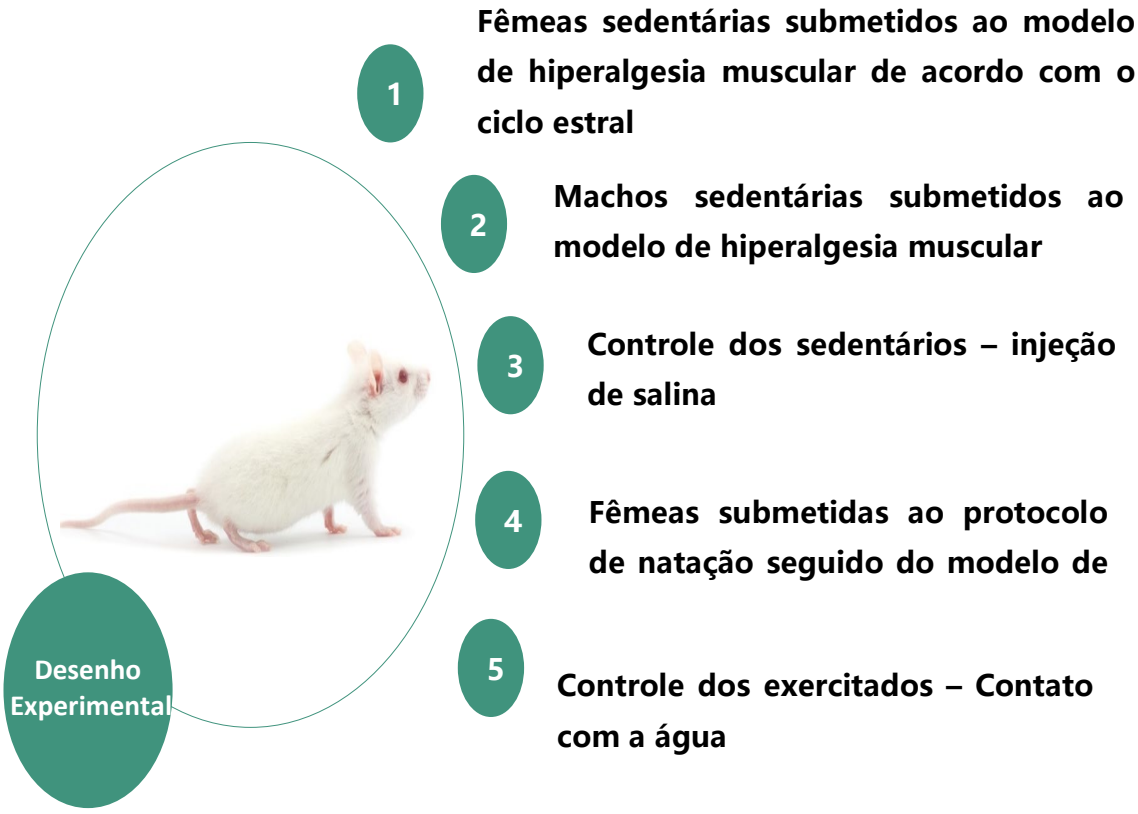

Figura 1: Desenho Experimental

4.2 Procedimentos Gerais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados durante a fase clara, entre às 7:00 e 14:00 h, em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida em 25 ºC (ROSLAND, 1991). Os animais foram ambientados pelo período de uma

hora antes do início dos experimentos em sala silenciosa, sem acesso a água ou comida durante a realização dos experimentos.

4.3 Lavado vaginal para determinação da fase do ciclo estral

Para determinação da fase do ciclo estral em que o animal se encontra foi utilizada a técnica do lavado vaginal. Uma ponteira estéril, contendo 15 µL de solução salina foi introduzida no início do canal vaginal do animal, onde a solução líquida expelida foi aspirada de 3 a 5 vezes para coleta das células da mucosa vaginal (GOLDMAN et al., 2007).

Após este processo, o conteúdo da ponteira foi colocado em uma lâmina de vidro e preparada para imediata análise em um microscópio modelo Olympus CX23. A determinação da fase do ciclo estral em que o animal se encontra foi realizada com base no tipo celular encontrado.

As coletas do ciclo estral foram iniciadas quando os animais se encontravam com 60 dias de idade, por um período de aproximadamente 10 dias consecutivos com o intuito de verificar quais animais se encontravam ciclando regularmente, estando dessa forma aptas a submissão aos experimentos. Após, este período os animais sedentários eram submetidos a novas coletas imediatamente antes das injeções de carragenina e PGE_2, enquanto os animais exercitados passavam pela coleta do ciclo estral imediatamente antes do início do protocolo de adaptação ao exercício e também imediatamente antes do início do primeiro dia de exercício físico. Além disso, coletas semanais eram realizadas a fim de verificar se o exercício físico não teria interrompido a ciclagem desses animais.

Figura 2:

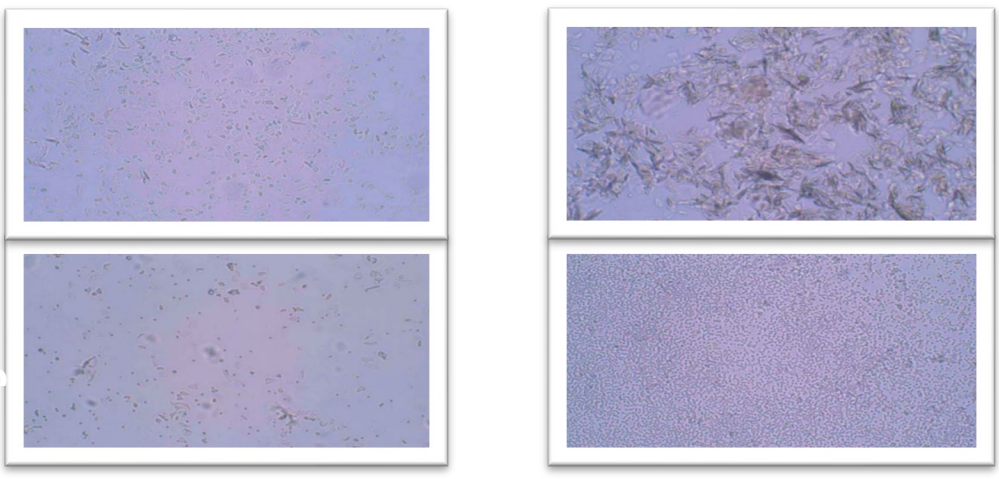

Figura 2: Fases do Ciclo Estral – Adaptado de Goldman et al., 2007

4.4 Modelo de hiperalgesia muscular aguda seguida de hiperalgesia muscular persistente

Imediatamente após a definição do ciclo estral, os animais receberam a injeção de carragenina (100µg) no ventre do músculo gastrocnêmio. A medida do limiar hiperalgésico, utilizando o aparelho Randall Selitto foi feita imediatamente antes da injeção de carragenina (basal), após 1, 3, 6h e diariamente até o sexto dia, onde a hiperalgesia muscular aguda já se encontra reduzida. Em até dez dias depois do primeiro insulto, uma injeção de PGE_2 foi realizada no mesmo local. Após, foram realizadas novamente medidas do limiar hiperalgésico imediatamente antes da PGE_2, após 1, 4h e diariamente até 2 dias pós injeção, voltando a realizar a medida 17 dias pós a injeção. Para o grupo controle, foi utilizado solução salina (NaCl 0,9%, 20 µl) ao invés da carragenina. Em até dez dias, uma injeção de PGE_2 foi realizada no mesmo local (Figura 1, JORGE et al., 2020).

Figura 3:

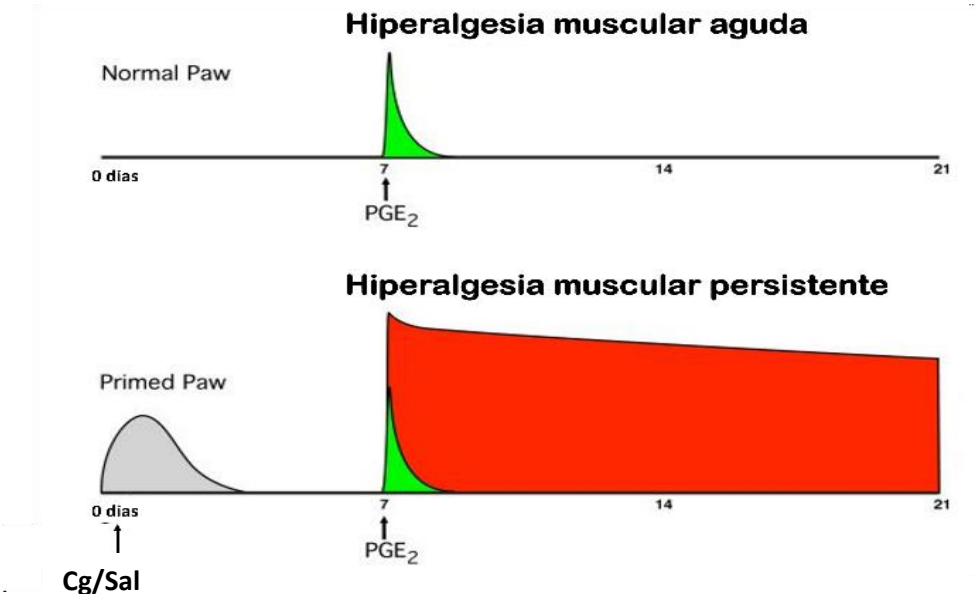

Figura 3: Modelo de Hiperalgesia Muscular Aguda e Persistente - Adaptado de Reichling & Levine., 2009

4.5 Quantificação da hiperalgesia muscular

Para quantificar a hiperalgesia mecânica foi utilizado o método proposto por Randall & Selitto (1957) e adaptado para o tecido muscular de camundongos

(MANJAVACHIET et al., 2010). Foi usado um analgesímetro digital (Insight, Brasil) cuja força mecânica linear com aumento gradual foi aplicada no ventre do músculo gastrocnêmio da pata traseira de camundongos. O registro do limiar hiperalgésico foi quantificado pela média de 3 medidas realizadas em intervalos de 5 minutos, observando a resposta do animal ao estímulo através de respostas como a alteração do ritmo respiratório, *flinch* de pata ou *freezing*, sendo quantificado nos pontos de tempo de 1h a 6 dias após injeção de carragenina/salina e novamente de 1h a 17 dias após injeção de PGE_2, conforme linha temporal abaixo (Figura 4). A hiperalgesia foi quantificada pela variação no limiar nociceptivo mecânico obtido pela subtração da média do limiar nociceptivo mecânico registrado em diferentes tempos após administração dos estímulos inflamatórios ou veículo com os valores registrados antes do início das injeções (baseline).

Figura 4:

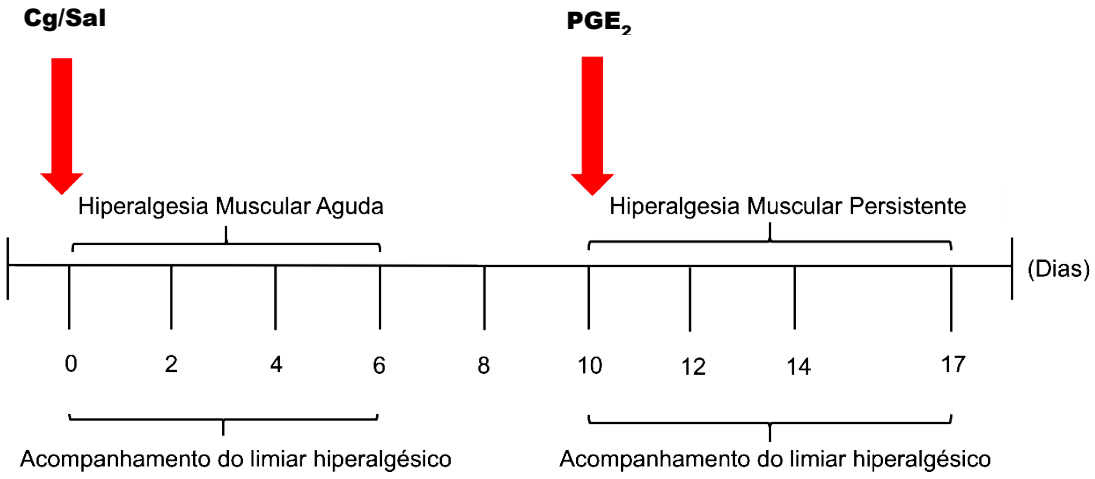

Figura 4: Linha do tempo – Acompanhamento do Limiar Hiperalgésico

4.6 Protocolo de Natação

O treinamento físico utilizado neste estudo foi a natação. Para a realização dos procedimentos a temperatura da água foi mantida em 31 ± 1 ºC, todos os procedimentos foram realizados, em tanques cilíndricos individuais, com superfície lisa (SCARIOT et al., 2016). Todos os animais submetidos à natação foram adaptados progressivamente ao meio líquido para minimizar o estresse por meio do protocolo de adaptação composto por 6 dias de contato com a água, com aumento progressivo do tempo de permanência e da profundidade da água. Antes do início do protocolo de treinamento físico, os animais permaneceram em repouso por 24 horas.

O protocolo de natação teve uma duração total de 15 dias, sendo dividido em três etapas, com cinco dias cada. O volume de treinamento diário totalizou 50 minutos. Na primeira etapa, no primeiro e no segundo dia, os animais nadaram três sessões com dois intervalos de 4 minutos cada. O terceiro, quarto e quinto dia consistiu de duas sessões, com apenas um intervalo de 4 minutos. Na segunda fase mantemos as duas sessões, mas o intervalo foi reduzido para apenas 3 minutos. Na terceira etapa, permaneceram o décimo primeiro e décimo segundo dia com duas sessões e intervalo de 3 minutos. Do décimo terceiro ao décimo quinto dia, as sessões duraram 50 minutos contínuos (adaptado de KUPHAL et al., 2007). A imagem a seguir exemplifica o protocolo descrito (Figura 3).

Como controle do exercício físico, grupos de camundongos fêmeas e machos foram submetidos ao contato com a água, onde permaneciam por 10 minutos em tanques individuais contendo água rasa.

Figura 5:

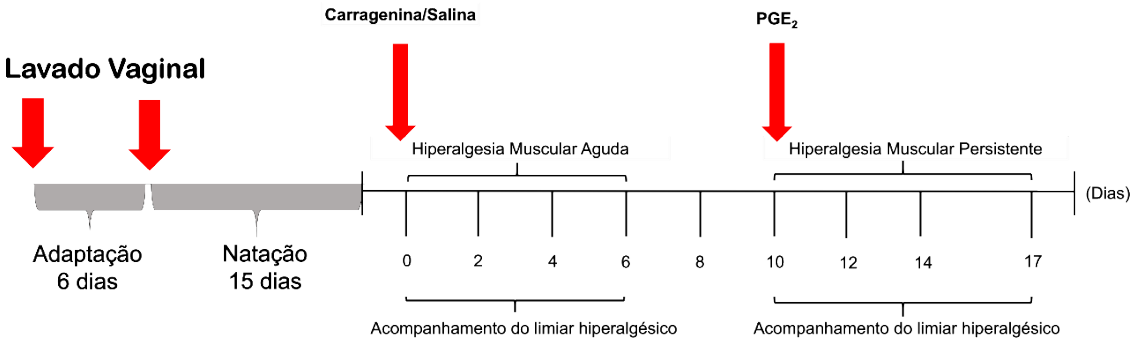

Figura 5: Protocolo de exercício físico – Natação

4.7 Quantificação da concentração de corticosterona plasmática

A análise da concentração plasmática de corticosterona foi realizada para verificar se o protocolo de treinamento físico gerou estresse. As amostras foram coletadas em dois períodos distintos: pré-adaptação ao exercício físico (basal - 24 horas antes do início do protocolo de natação) e pós-término do protocolo de natação (24 horas após o término). Para a obtenção da amostra, foi realizado um pequeno corte na extremidade distal da cauda do animal e coletados aproximadamente 25 µL de sangue por meio de capilares de vidro não heparinizados. O material foi armazenado em temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida encaminhado

para a centrífuga, onde o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. Os níveis de corticosterona presentes no plasma foram analisados através do teste de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), de acordo com as instruções do fabricante (Kit DetectX - Arbor Assays).

4.8 Análise Estatística

Os cálculos da análise estatística foram realizados utilizando o programa Prisma. De acordo com o teste de Kolmogorov Smirnov, todos os dados seguem uma distribuição normal. As diferenças comportamentais entre os grupos foram medidas usando o teste Two-Way análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. A análise da área sobre a curva (AUC) foi feita através do teste estatístico One-Way análise de variância (ANOVA) e Test t de Student. Comparações múltiplas foram realizadas através da aplicação do teste de Tukey. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Dimorfismo sexual na hiperalgesia muscular aguda e persistente

Inicialmente, submetemos camundongos do sexo machos e fêmeas ao mesmo modelo de hiperalgesia muscular aguda e persistente. Observamos que, em ambos os sexos, a injeção de carragenina seguida da injeção de PGE_2 foi eficiente em gerar hiperalgesia muscular aguda e persistente quando comparado aos animais controle, que receberam injeção de solução salina ao invés de carragenina (Figura 6A, B, C e D, Two way ANOVA, $p<0,05$; Tukey test). A análise da AUC confirmou esses resultados (Figura 6A, B, C e D, One way ANOVA, $p< 0,05$; Tukey test).

Para avaliarmos o dimorfismo sexual na fase aguda da dor muscular, comparamos o comportamento hiperalgésico agudo das fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral com o comportamento dos machos. As fêmeas que receberam a carragenina durante a fase proestro desenvolveram hiperalgesia muscular aguda de maior intensidade quando comparada aos machos (Figura 6A, Two way ANOVA, $p<0,05$; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figura 6A, One way ANOVA, $p< 0,05$; Tukey test). Já as fêmeas que receberam carragenina durante a fase metaestro apresentaram hiperalgesia muscular aguda semelhante aos machos (Figura 6C, Two way ANOVA, $p>0,05$; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figura 6C, One way ANOVA, $p>0,05$; Tukey test). Por fim, as fêmeas que receberam carragenina durante as fases estro e diestro apresentaram hiperalgesia muscular aguda de menor intensidade quando comparada aos machos (Figuras 6B e D, Two way ANOVA, $p<0,05$; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figuras 6B e D, One way ANOVA, $p< 0,05$; Tukey test).

A análise do dimorfismo sexual na hiperalgesia muscular persistente demonstrou que as fêmeas que receberam carragenina nas fases proestro, metaestro e diestro exibiram hiperalgesia muscular persistente de menor intensidade quando comparado aos machos (Figura 6A, C e D, Two way ANOVA, $p<0,05$; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figuras 6A, C e D, One way ANOVA, $p< 0,05$; Tukey test). Já as fêmeas que receberam a carragenina na fase estro, exibiram hiperalgesia muscular persistente semelhante aos machos (Figura 6B, Two way ANOVA, $p>0,05$; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figura 6B, One way ANOVA, $p> 0,05$; Tukey test).

Figura 6:

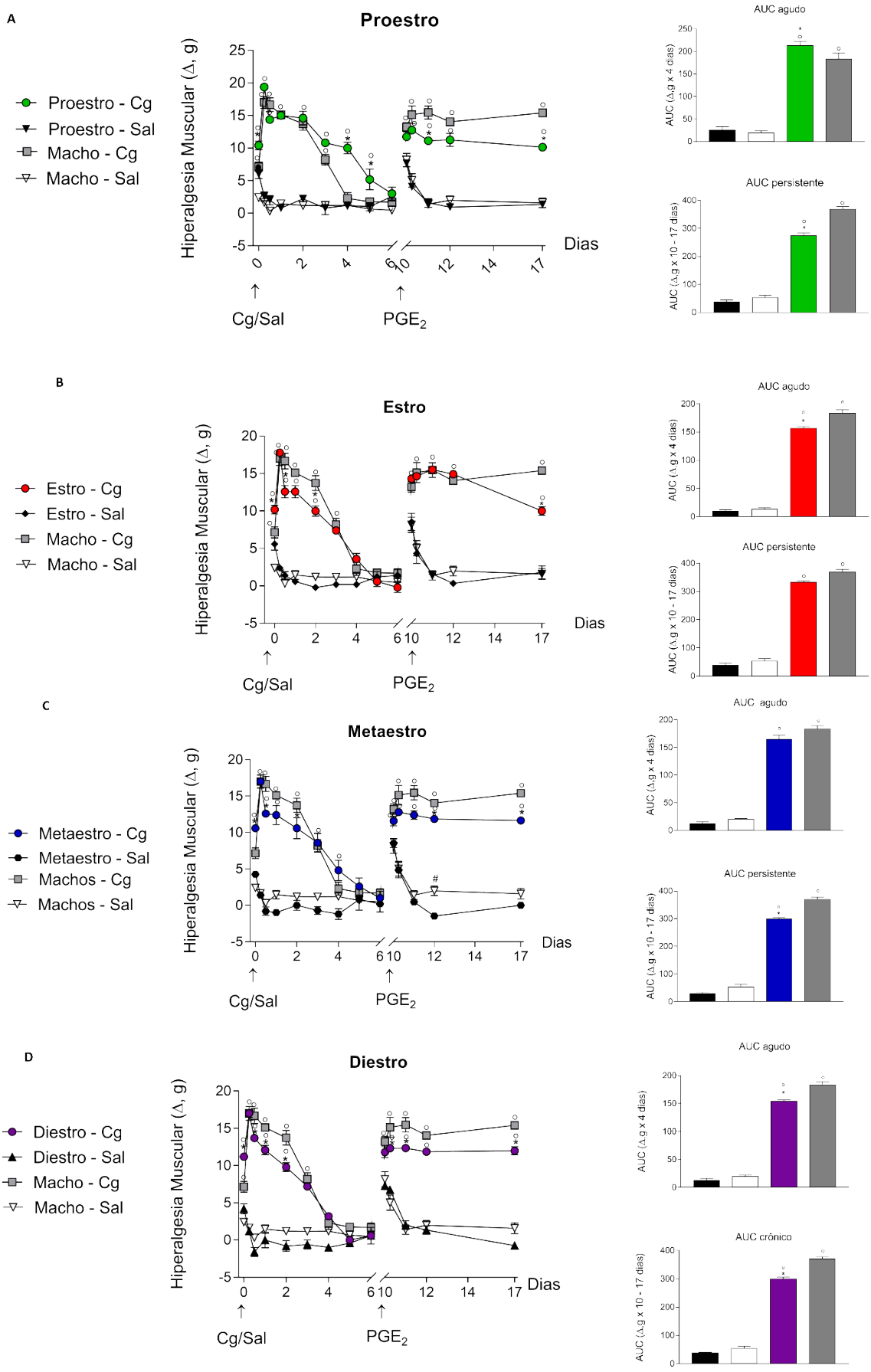
A
Proestro
Proestro - Cg
Proestro - Sal
Macho - Cg
Macho - Sal
Hiperalgesia Muscular (Δ, g)
Dias
Cg/Sal
PGE2
AUC agudo
AUC (Δ.g x 4 dias)
AUC persistente
AUC (Δ.g x 10 - 17 dias)
B
Estro
Estro - Cg
Estro - Sal
Macho - Cg
Macho - Sal
C
Metaestro
Metaestro - Cg
Metaestro - Sal
Machos - Cg
Machos - Sal
D
Diestro
Diestro - Cg
Diestro - Sal
Macho - Cg
Macho - Sal
AUC crônico

Figura 6: O dimorfismo sexual na hiperalgesia muscular é influenciado pelo ciclo estral – Período Agudo: (A) O período agudo mostrou que camundongos fêmeas que receberam carragenina (Cg) na fase de proestro exibiram maior hiperalgesia muscular do que camundongos machos e outras fases do ciclo estral (p <0,05, Two way ANOVA, n = 5). Nas fases estro **(B)** e diestro **(D)**, as fêmeas apresentaram menor hiperalgesia muscular do que os machos (p <0,05, Two way ANOVA, n = 5). Já os camundongos fêmeas na fase metaestro **(C)** apresentaram hiperalgesia muscular semelhante aos camundongos machos (p> 0,05, Two way ANOVA, n = 5). **Período Crônico:** O período crônico mostrou que camundongos fêmeas que receberam carragenina (Cg) na fase de proestro **(A)**, metaestro **(C)** e diestro **(D)** exibiram menor hiperalgesia muscular que camundongos machos (p <0,05, Two way ANOVA, n = 5),enquanto o grupo estro **(B)** apresentou limiares hiperalgésicos semelhantes aos camundongos machos(p> 0,05, Two way, ANOVA, n = 5). AUC confirma esses dados (One way ANOVA, Tukey test). Os símbolos "*" indicam diferença para camundongos machos - Cg / PGE_2, "°" indica diferença para seu respectivo grupo controle (Sal/PGE_2), "#" indica diferença entre grupos controle (Sal/PGE_2) de fêmeas em metaestro e machos.

5.2 Comparação entre as diferentes fases do ciclo estral na indução da hiperalgesia muscular aguda e persistente

Como identificamos dimorfismo sexual na hiperalgesia muscular aguda e persistente, nessa fase do estudo comparamos a indução da hiperalgesia muscular aguda e persistente nas diferentes fases do ciclo estral. Os resultados demonstraram que houve maior hiperalgesia muscular aguda nas fêmeas que receberam carragenina em proestro e maior hiperalgesia muscular persistente nas fêmeas que receberam carragenina em estro quando comparado aos demais grupos (Figura 7, Two way ANOVA, p< 0,05; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figura 7, One way ANOVA, p< 0,05; Tukey test)

Figura 7:

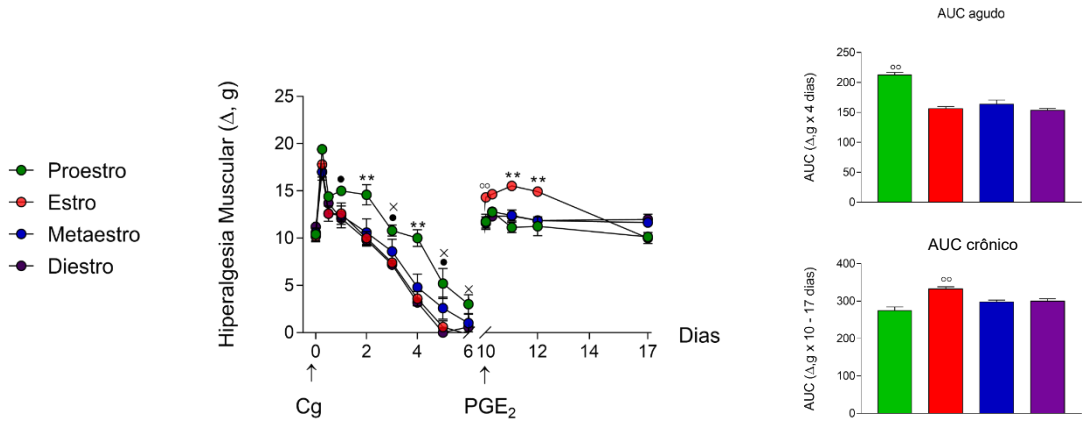

Figura 7: Fases do ciclo estral influenciam na hiperalgesia muscular aguda e persistente. As fêmeas que receberam carragenina durante a fase proestro exibiram maior hiperalgesia aguda que os demais grupos (símbolo "ºº" na AUC, Two way ANOVA, p< 0,05; Tukey test, n=5). Já as fêmeas que receberam carragenina durante a fase estro desenvolveram maior hiperalgesia muscular persistente quando comparada as demais fases (símbolo "ºº" na AUC, Two way ANOVA p< 0,05; Tukey test, n=5). O símbolo "**" demonstra diferença com todos os ciclos, o símbolo "×" demonstra diferença com estro, o símbolo "ºº" demonstra diferença com metaestro, o símbolo "●" demonstra diferença com diestro.

5.3 Comparação entre as fases do ciclo estral na manutenção da hiperalgesia muscular persistente

Para avaliarmos a importância do ciclo estral na manutenção da hiperalgesia muscular persistente, consideramos o ciclo estral avaliado no momento da administração da PGE_2. Os resultados demonstram que não houve diferença na hiperalgesia muscular persistente entre as diferentes fases do ciclo estral (Figura 8, Two way ANOVA, p> 0,05; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figura 8, One way ANOVA, p> 0,05; Tukey test)

Figura 8:

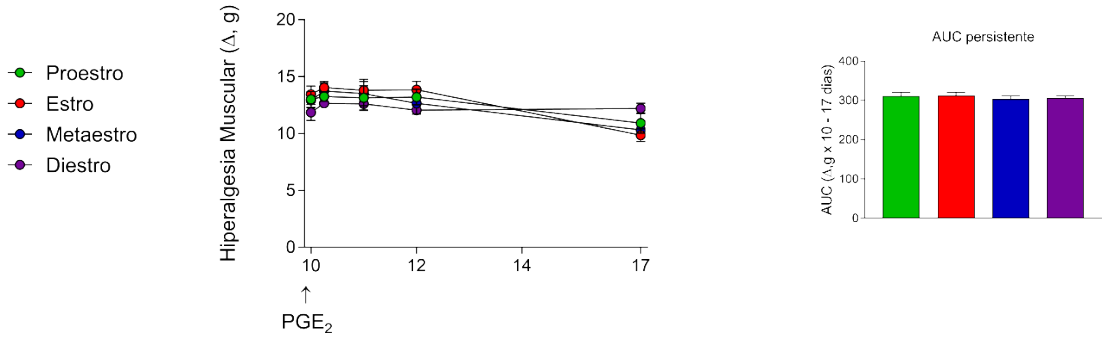

Figura 8: Manutenção da hiperalgesia muscular persistente independe do ciclo estral. Não há diferença na manutenção da hiperalgesia muscular persistente entre as fases do ciclo estral (p> 0,05, Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.4 Análise do dimorfismo sexual na hipoalgesia induzida pelo exercício

O exercício de natação preveniu a hiperalgesia muscular aguda e persistente tanto em machos quanto em fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral (Figura 9A, B, C e D, Two way ANOVA, p< 0,05; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figura 9A, B, C e D, One way ANOVA, p< 0,05; Tukey test). Quando comparamos machos e fêmeas, observamos que a prevenção da hiperalgesia aconteceu de maneira semelhante (Figura 9A, B, C e D, Two way ANOVA, p> 0,05; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figura

9A, B, C e D, One way ANOVA, p> 0,05; Tukey test).

Figura 9:

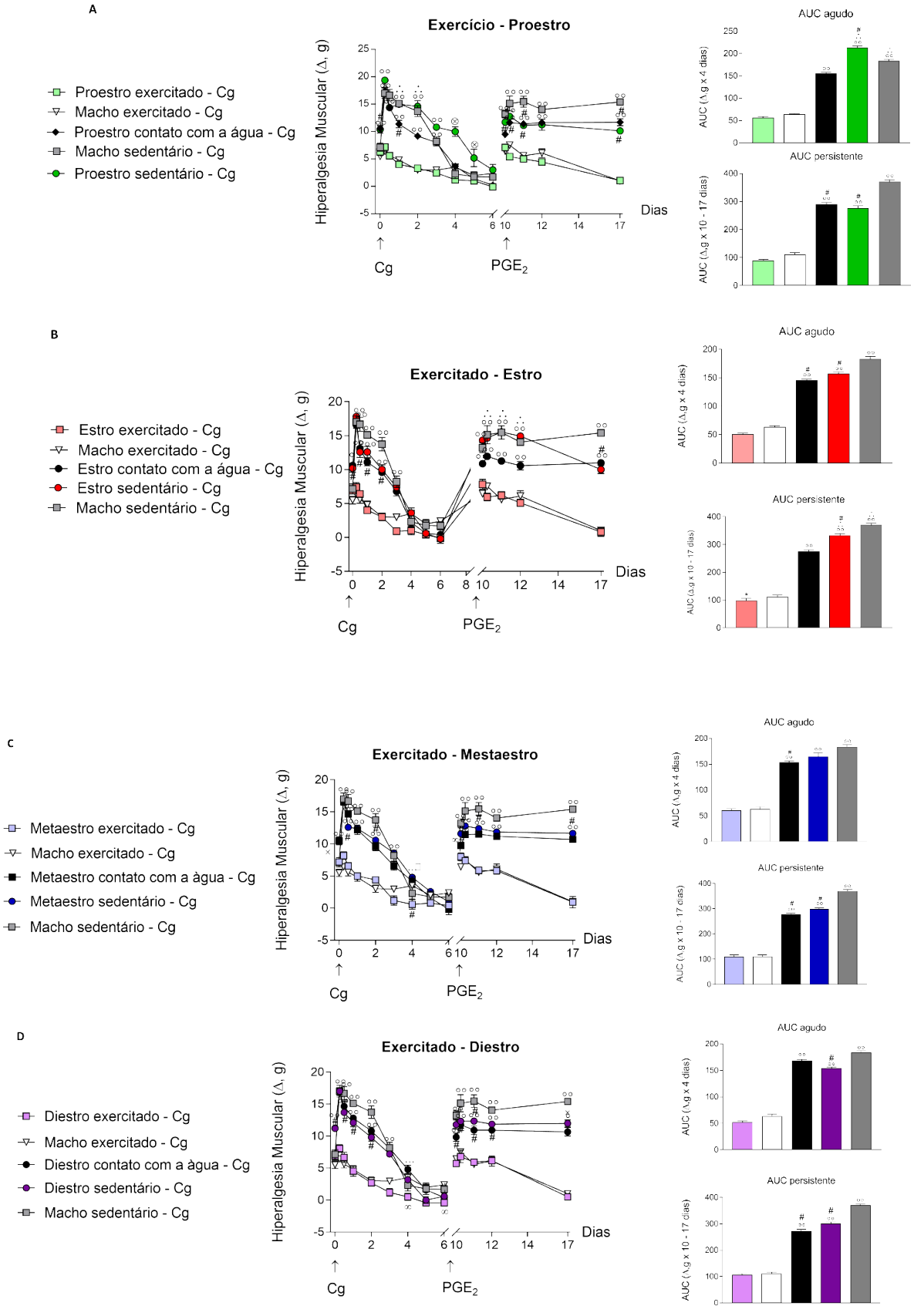

Figura 9: Exercício físico previne a hiperalgesia muscular aguda e persistente de maneira semelhante em fêmeas e machos – **(A), (B), (C) e (D)** O exercício físico foi eficiente em promover a prevenção da hiperalgesia aguda e persistente quando comparados aos animais contato com a água e animais sedentários (p< 0,05, Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey). Além disso, a prevenção ocorreu de maneira semelhante em camundongos fêmeas e machos independente da fase do ciclo estral em que as fêmeas iniciaram o protocolo (p> 0,05, Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey). O símbolo "ºº" demonstra diferença significativa com grupo fêmea e macho exercitados, o símbolo "∴" demonstra diferença significativa com o grupo Controle, o símbolo "#" demonstra diferença significativa com o grupo Macho – Cg, o símbolo "⊗" demonstra diferença significativa com todos os grupos, "..." demonstra diferença significativa com as fêmeas exercitadas, "∞" demonstra diferença significativa com grupo macho exercitado.

5.5 Análise do ciclo estral na hipoalgesia induzida pelo exercício

Uma vez que os resultados anteriores demonstraram que o protocolo de exercício físico proposto foi eficiente em prevenir a hiperalgesia muscular aguda e persistente, nessa etapa analisamos a influência do ciclo estral nessa prevenção. Os dados a seguir demonstraram que, independente do ciclo estral em que as fêmeas receberam a carragenina, não houve diferença significativa na resposta hipoalgésica induzida pelo exercício (Figura 10, Two way ANOVA, p> 0,05; Tukey test). A análise da AUC confirma esses resultados (Figura 10, One way ANOVA, p> 0,05; Tukey test).

Figura 10:

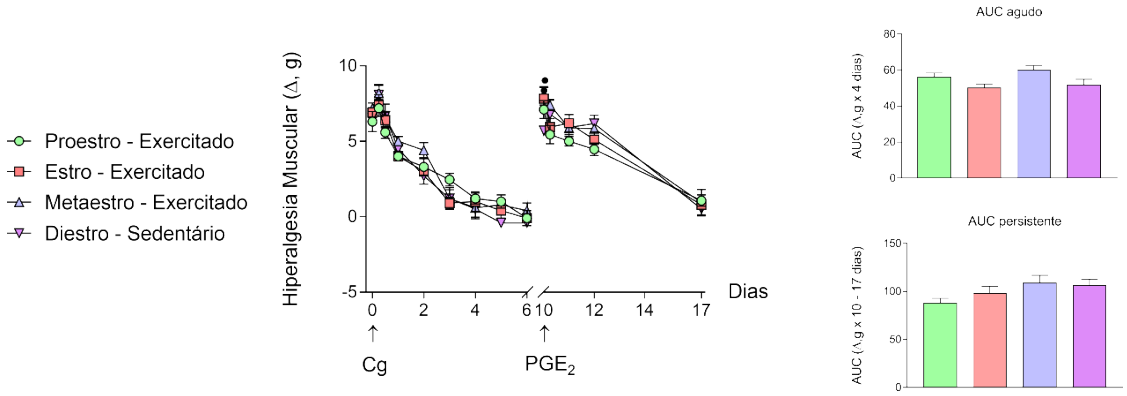

Figura 10: A hipoalgesia induzida pelo exercício independe do ciclo estral – Não há diferença na resposta hipoalgésica induzida pelo exercício nas diferentes fases do ciclo estral. (p> 0,05, Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.6 Avaliação dos níveis de corticosterona em animais exercitados

Para avaliarmos se a hipoalgesia induzida pelo exercício foi resultante de um possível estresse induzido pelo exercício, analisamos a concentração plasmática de corticosterona antes do início do exercício ou contato com a água e 24h após a

finalização dos mesmos. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre os grupos contato com a água e exercitado (Figura 11, p> 0,05, Test t Student).

Figura 11:

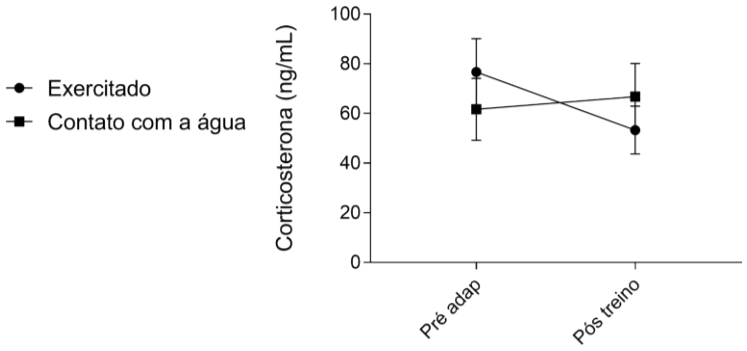

Figura 11: O exercício físico não aumentou os níveis de corticosterona plasmática - Os animais exercitados ou que entraram em contato com água somente não demonstraram diferença nos níveis plasmáticos de corticosterona (p> 0,05, Test t Student).

6 DISCUSSÃO

Apesar do impacto social, econômico e psicológico causado pela dor muscular e do aumento no número de estudos, que demonstram as diferenças sexuais na percepção da dor, muito pouco se sabe sobre quais vias estão envolvidasem seu processamento e de que maneira as oscilações hormonais atuam tanto na hiperalgesia muscular aguda quanto na persistente. A fim de elucidar e caracterizar o comportamento hiperalgésico de fêmeas durante a transição da dor muscular aguda em persistente, nós testamos a hipótese de que o ciclo estral poderia exercerinfluência significativa sobre ambas as fases da dor muscular. Para isto, utilizamos o modelo de hiperalgesia muscular persistente, já padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (JORGE et. al; 2020).

O presente estudo demonstra a diferença no comportamento hiperalgésico muscular em camundongos machos e fêmeas, fato este que ajuda a endossar o papel do dimorfismo sexual na dor. Ao realizarmos a comparação dos camundongos do sexo masculino com cada um dos grupos de fêmeas, de acordo com a fase do ciclo estral em que estas receberam as injeções de carragenina, foi possível observar queos hormônios gonodais estão envolvidos nos processos que modulam a transição da hiperalgesia muscular aguda para a persistente, mas não na sua manutenção. Demonstramos também que o exercício físico de natação reduziu a hiperalgesia muscular aguda e persistente em fêmeas de maneira semelhante aos machos, não indicando um papel para os hormônios gonadais nesse processo.

Quando se trata do dimorfismo sexual presente na dor, uma ampla discussão é levantada. Alguns estudos apontam para uma diferença na sensibilidade dolorosa voltada para os hormônios gonodais e há um consenso de que esses hormônios interferem em componentes que estão envolvidos no processamento da dor (SORGE et. al; 2015; QUEME e JANKOWSKI, 2019). Nossos resultados demonstraram que, no período agudo da hiperalgesia muscular, as fêmeas que receberam a injeção de carragenina em proestro apresentaram maior hiperalgesia muscular aguda em comparação com machos submetidos ao mesmo processo. Esse nosso dado é suportado pela literatura, já que, em um estudo envolvendo hiperalgesia mecânica induzida por carragenina, fêmeas em proestro também apresentaram uma maior sensibilidade dolorosa (TALL & CRISP, 2004). Uma vez que a carragenina é

um agente farmacológico que induz inflamação, é sabido que a partir de sua administração, uma série de eventos são desencadeados, incluindo a liberação de variados mediadores inflamatórios, como a serotonina (hidroxitriptamina – 5TH) (ZHANG et al., 2000). A serotonina é um mediador pró-nociceptivo periférico que contribui para a hipersensibilidade de neurônios aferentes primários (KAUR et al., 2018; RUEFF & DRAY, 1992; SUGIURA et al., 2004). Um estudo já demonstrou a ação dos hormônios gonadais em animais submetidos a um modelo de hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela injeção de serotonina no tecido periférico (KAUR et al.,2018). Esse estudo esclareceu que um dos mecanismos envolvidos na ação da serotonina periférica é dependente do sexo, já que fêmeas em proestro desenvolveram hiperalgesia térmica de maior intensidade e duração em comparação com machos submetidos ao mesmo modelo, corroborando com nossos resultados. Tais achados sugerem uma modulação por meio do hormônio estrogênio, que ele alcança os maiores níveis plasmáticos durante a fase proestro, potencializando a hiperalgesia. O estrogênio é um hormônio que pode ser produzido em diversos tecidos, inclusive no Sistema Nervoso Central. Tran e colaboradores (2020) demonstraram que um dos receptores de estrogênio, o ERα, é expresso no corno dorsal da medula por um subconjunto de interneurônios excitatórios que estão ali localizados, facilitando a nocicepção. Seus dados também sugerem que alguns desses interneurônios também co-expressam substância P e Glutamato, sugerindo que a ação desses elementos em conjunto é capaz de modular a sensibilização de estruturas centrais, como os neurônios nociceptivos, predisponibilizando o desenvolvimento de quadros de dor crônica.

Dores crônicas, de forma geral, costumam afetar as mulheres em maior proporção do que os homens (NAHIN, et al., 2019; BUENO et al., 2018; SORGE & TOTSCH, 2017; MOGIL, 2012). Ao avaliarmos o período persistente da hiperalgesia muscular em fêmeas, observamos que as fêmeas em proestro, metaestro e diestro apresentaram uma menor sensibilidade ao estímulo mecânico quando comparadas aos machos, enquanto as fêmeas em estro apresentaram limiares hiperalgésicos bem parecidos aos dos machos, reforçando ainda mais as evidências de que alguns mecanismos que modulam a dor persistente em fêmeas podem ser ativados de forma dependente de hormônios gonadais. É interessante ressaltar que, embora as fêmeas em proestro tenham apresentado maior hiperalgesia muscular aguda em comparação

com machos e fêmeas nas demais fases do ciclo estral, durante a fase persistente, elas apresentaram menor hiperalgesia muscular do que os machos e fêmeas em estro. Semelhante às fêmeas em proestro, as fêmeas em metaestro e diestro também apresentaram hiperalgesia muscular persistente menos intensa quando comparada a machos. Essas duas fases do ciclo estral são marcadas pelo aumento do hormônio progesterona e existem estudos que indicam que este hormônio diminui as condições dolorosas musculares tanto em humanos (DAVIES, FURDSON-DAVIES & REES, 2003), quanto em animais experimentais. Sugere-se que a ação da progesterona esteja relacionada a ativação do receptor do ácido γ-aminobutírico (GABA) (LIMMROTH, LEE & MOSKOWITZ, 1996), que tem função inibitória no SNC. Embora machos apresentem uma pequena variação hormonal, já foi observado que eles podem sofrer com uma hipersensibilidade dolorosa mediada pelo hormônio testosterona caso sejam expostos a experiências dolorosas (MARTIN et al., 2019), o que também ajuda a justificar o fato de os animais do sexo masculino apresentarem uma maior hiperalgesia muscular persistente quando comparada aos grupos proestro, metaestro e diestro. Já as fêmeas em estro apresentaram hiperalgesia muscular persistente mais intensa quando comparada às demais fases do ciclo estral e de intensidade semelhante aos machos. A fase estro é marcada pelos maiores níveis de prolactina e sabe-se que esse hormônio é capaz de modular uma série de respostas celulares, como a inflamação e o sistema imunológico (BERNTON, MELTZER & HOLADAY, 1988; MATERA, 1996; STRAUB et al., 2002; PATIL et al., 2013). Tais dados nos permitem sugerir um papel importante da prolactina na transição da hiperalgesia muscular aguda em persistente.

Diferentemente da influência dos hormônios gonadais na transição da hiperalgesia muscular aguda em persistente, não observamos diferença na manutenção da resposta hiperalgésica persistente quando consideramos o ciclo estral para administração da PGE_2 em fêmeas previamente sensibilizadas pela carragenina. Em conjunto, esses resultados sugerem que o ciclo estral modula a hiperalgesia muscular aguda assim como a transição para a hiperalgesia muscular persistente. Entretanto, não parece influenciar na manutenção da hiperalgesia muscular persistente.

Finalmente demonstramos que não há dimorfismo sexual na hipoalgesia muscular induzida pelo exercício através de natação, uma vez que o protocolo de

natação utilizado no presente estudo preveniu o desenvolvimento da hiperalgesia muscular aguda e persistente de maneira semelhante entre machos e fêmeas. Ainda, quando analisamos as diferentes fases do ciclo estral, não observamos diferenças nas respostas hipoalgésicas entre as fêmeas. Esses resultados sugerem que o ciclo estral e os hormônios gonadais não estão envolvidos na prevenção da hiperalgesia muscular aguda e persistente pelo exercício. De certa forma, esses resultados parecem interessantes, já que o exercício físico é uma estratégia de prevenção eficiente contra o desenvolvimento de dor crônica que independente do sexo. Portanto, protocolos semelhantes podem ser usados em homens e mulheres. Nosso estudo não avaliou os mecanismos pelos quais o exercício de natação previne o desenvolvimento da hiperalgesia muscular aguda e persistente em machos e fêmeas. Entretanto, um recente trabalho do nosso grupo demonstrou que os receptores PPARγ musculares, via modulação de macrófagos teciduais e citocinas pró e anti-inflamatórias, reduzem a hiperalgesia muscular aguda, transição para a fase persistente e a manutenção da hiperalgesia muscular persistente (AZAMBUJA et al., 2021). Como os níveis de corticosterona não aumentaram após o período de natação, podemos afirmar que a ação preventiva do exercício sobre a hiperalgesia muscular aguda e persistente não é resultado de uma analgesia induzida pelo estresse (HILL et al., 2008).

7 CONCLUSÃO

No presente estudo demonstramos que há dimorfismo sexual na hiperalgesia muscular aguda e persistente. Ainda, que o ciclo estral modula a hiperalgesia muscular aguda e a transição para fase persistente, sem interferir na manutenção da mesma. Finalmente, demonstramos que não há dimorfismo sexual nem influência do ciclo estral na hipoalgesia induzida pelo exercício. Em conjunto, esses dados sugerem que o ciclo estral deva ser considerado nos tratamentos para dores musculares em mulheres. Entretanto, quando a abordagem é a prevenção das dores musculares, podem ser utilizados protocolos de natação semelhantes para homens e mulheres, já que o ciclo estral não interfere nesse processo.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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, 2000.

ALMEIDA, Cayo et al. Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. **Pain**, v. 156, n. 3, p. 504–513, 2015.

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

AZAMBUJA, Graciana De et al. Regular swimming exercise prevented the acute and persistent mechanical muscle hyperalgesia by modulation of macrophages phenotypes and inflammatory cytokines via PPAR γ receptors. **Brain Behavior and Immunity**, n. April, 2021.

BERNTON, Edward W.; MELTZER, Monte S.; HOLADAY, John W. Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. **Science**, v. 239, n. 4838, p. 401–404, 1988.

BOERNER, Katelynn E. et al. Sex differences in experimental pain among healthy children: A systematic review and meta-analysis. **Pain**, v. 155, n. 5, p. 983–993, 2014.

BUENO, C. H. et al. Gender differences in temporomandibular disorders in adult populational studies: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 45, n. 9, p. 720–729, 2018.

BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 94, n. 6, p. 1704–1708, 1974.

CERBO, Rosanna et al. The importance of anxiety and depression as factors in chronicization of primary headaches. **The Journal of Headache and Pain**, v. 1, n. S1, p. S45–S48, 2000.

CHANG, Ju Hsin et al. Ovarian Hormone-dependent and Spinal ERK Activation-regulated Nociceptive Hypersensitivity in Female Rats with Acid Injection-induced Chronic Widespread Muscle Pain. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2019.

CHHAYA, Soha J. et al. Exercise-Induced Changes to the Macrophage Response in the Dorsal Root Ganglia Prevent Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 36, n. 6, p. 877–890, 2019.

CHEN, Yu Wen et al. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. **Anesthesia and Analgesia**, v. 114, n. 6, p. 1330–1337, 2012.

COBIANCHI, S. et al. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v. 168, n.1, p. 273–287, 2010.

CONTARTEZE, Ricardo Vinícius Ledesma et al. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 415–422, 2008.

COOPER, Karen; CARMODY, John. The characteristics of the opioid-related analgesia induced by the stress of swimming in the mouse. **Neuroscience Letters**, v. 31, n. 2, p. 165–170, 1982.

CROFT, P et al. The prevalence of chronic widespread pain in the general population. **The Journal of rheumatology**, v. 20, n. 4, p. 710—713, 1993.

DAVIES, Paul; FURSDON-DAVIES, Christopher; REES, Margaret Cp. Progestogens for menstrual migraine. **Menopause International**, v. 9, n. 3, p. 134, 2003.

DAWSON-BASOA, Mary E.; GINTZLER, Alan R. Estrogen and progesterone activate spinal kappa-opiate receptor analgesic mechanisms. **Pain**, v. 64, n. 3, p. 607–615, 1996.

DE ANGELIS, R.; SALAFFI, F.; GRASSI, W. Prevalence of spondyloarthropathies in an Italian population sample: A regional community-based study. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 36, n. 1, p. 14–21, 2007.

DINA, O. A.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. **Neuroscience**, v. 152, n. 2, p. 521–525, 2008.

DUARTE, Thiago; MENEZES-RODRIGUES, Francisco Sandro; GODINHO, Rosely Oliveira. Contribution of the extracellular cAMP-adenosine pathway to dual coupling of β 2-adrenoceptors to G s and G i proteins in mouse skeletal muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 341, n. 3, p. 820–828, 2012.

EKAMBARAM, Gnanagurudasan; KUMAR, Senthil Kumar Sampath; JOSEPH, Leena Dennis. Comparative study on the estimation of estrous cycle in mice by visual and vaginal lavage method. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 1, p. AC05–AC07, 2017.

FERRARI, Luiz F e Jon D Levine. Mecanismos de membrana plasmática em um modelo pré-clínico de dor crônica em ratos. **The journal of pain**, v. 16, n.1, p. 60-6, 2015.

FERRARI, Luiz F et al. Regulação da expressão de priming hiperalgésico pelo receptor de estrogênio α no rato. **The journal of pain**, v. 18, n.5, p.574-582, 2017.

FILLINGIM, Roger B. et al. Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. **Journal of Pain**, v. 10, n. 5, p. 447–485, 2009.

FISCHER, Luana et al. The Influence of Sex and Ovarian Hormones on Temporomandibular Joint Nociception in Rats. **Journal of Pain**, v. 9, n. 7, p. 630–638, 2008.

GABAY, Cem et al. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 12, p. 2930–2940, 1997.

GRAVEN-NIELSEN, Thomas; ARENDT-NIELSEN, Lars. Assessment of mechanisms in localized and widespread musculoskeletal pain. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 10, p. 599–606, 2010.

GREGORY, Nicholas S et al. Hiperalgesia intensificada pela fadiga em resposta ao insulto muscular: a indução e o desenvolvimento ocorrem de maneira dependente do sexo. **Pain**, v. 154, n.12, p.2668-2676, 2013.

GREENSPAN, Joel D et al. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. **Pain** v. 132, Suppl 1, p. S26-S45, 2007.

GOLDMAN, Jerome M.; MURR, Ashley S.; COOPER, Ralph L. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, 2007.

GUREJE, Oye et al. Persistent Pain and Well-being. **Jama**, v. 280, n. 2, p. 147, 1998.

Hill, E E et al. Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect. **Journal of endocrinological investigation** v. 31, n. 7, p. 587-591, 2008.

INASE, Masahiko et al. Analgesic effects of serotonin microinjection into nucleus raphe magnus and nucleus raphe dorsalis evaluated by the monosodium urate (MSU) tonic pain model in the rat. **Brain Research**, v. 426, n. 2, p. 205–211, 1987.

JORGE, Carolina Ocanha et al. P2X3 receptors contribute to transition from acute to chronic muscle pain. **Purinergic Signalling**, v. 16, n. 3, p. 403–414, 2020.

KAMI, Katsuya et al. Improvements in impaired GABA and GAD65/67 production in the spinal dorsal horn contribute to exercise-induced hypoalgesia in a mouse model of neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 12, p. 1–14, 2016.

KAUR, Sukhbir et al. Kaur, S., Benton, W. L., Tongkhuya, S. A., Lopez, C. M. C., Uphouse, L., & Averitt, D. L. (2018). Sex Differences and Estrous Cycle Effects of Peripheral Serotonin-Evoked Rodent Pain Behaviors. Neuroscience, 384, 87–100. https://doi.org/10.1016/j.neurosci. **Neuroscience**, v. 384, p. 87–100, 2018.

KAYSER, V et al. Sensitization of the nervous system, induced by two successive hindpaw inflammations, is suppressed by a local anesthetic. **Brain research**, v. 794, n.1, p. 19-27, 1998.

KREGEL, Kevin C et al. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. **Am. J. Vet. Res.,** v. 68, n.6, p. 583–583, 2007.

KING, Sara et al. The epidemiology of chronic pain in children and adolescents revisited: A systematic review. **Pain**, v. 152, n. 12, p. 2729–2738, 2011.

KUPHAL, Karen E.; FIBUCH, Eugene E.; TAYLOR, Bradley K. Extended Swimming

Exercise Reduces Inflammatory and Peripheral Neuropathic Pain in Rodents. **Journal of Pain**, v. 8, n. 12, p. 989–997, 2007.

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

LANDMARK, Tormod et al. Longitudinal Associations between Exercise and Pain in the General Population - The HUNT Pain Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 4–9, 2013.

LLEWELYN, M. B.; AZAMI, J.; ROBERTS, M. H.T. The effect of modification of 5-hydroxytryptamine function in nucleus raphe magnus on nociceptive threshold. **Brain Research**, v. 306, n. 1–2, p. 165–170, 1984.

LESNAK, Joseph B.; SLUKA, Kathleen A. Mechanism of exercise-induced analgesia: what we can learn from physically active animals. **PAIN Reports**, v. 5, n. 5, p. e850, 2020.

LESNAK, Joseph B. et al. Testosterone protects against the development of widespread muscle pain in mice. **Pain**, v. 161, n. 12, p. 2898–2908, 2020.

LEUNG, Audrey 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. 70-79, 2016.

LI, Hu Song et al. Protein kinase C lambda mediates acid-sensing ion channel 1a-dependent cortical synaptic plasticity and pain hypersensitivity. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 29, p. 5773–5793, 2021.

LIMA, Adriano Alves de et al. Two water environment adaptation models enhance motor behavior and improve the success of the lactate minimum test in swimming rats. **Motriz. Revista de Educacao Fisica**, v. 23, 2017.

LIMMROTH, Volker; LEE, Won Suk; MOSKOWITZ, Michael A. GABAA-receptor-mediated effects of progesterone, its ring-A-reduced metabolites and synthetic neuroactive steroids on neurogenic oedema in the rat meninges. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, n. 1, p. 99–104, 1996.

MANJAVACHI, Marianne Neves et al. Mechanisms involved in IL-6-induced muscular

mechanical hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 345–355, 2010.

MANSON, Joann E. Pain: Sex differences and implications for treatment. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 59, n. SUPPL. 1, p. S16–S20, 2010.

MARTIN, Loren J. et al. Male-Specific Conditioned Pain Hypersensitivity in Mice and Humans. **Current Biology**, v. 29, n. 2, p. 192- 201.e4, 2019.

MARTIN, Vincent T. Ovarian hormones and pain response: A review of clinical and basic science studies. **Gender Medicine**, v. 6, n. PART 2, p. 168–192, 2009.

MARTINS, Daniel F. et al. High-Intensity Swimming Exercise Decreases Glutamate-Induced Nociception by Activation of G-Protein-Coupled Receptors Inhibiting Phosphorylated Protein Kinase A. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5620–5631, 2017.

MATERA, Lina. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. **Life Sciences**, v. 59, n. 8, p. 599–614, 1996.

MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. **Pain**, v. 54, n. 3, p. 241–289, 1993.

MITROVIĆ, N. et al. 17β-Estradiol upregulates ecto-5'-nucleotidase (CD73) in hippocampal synaptosomes of female rats through action mediated by estrogen receptor-α and -β. **Neuroscience**, v. 324, p. 286–296, 2016.

MOGIL, Jeffrey S. Sex differences in pain and pain inhibition: Multiple explanations of a controversial phenomenon. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 859–866, 2012.

NAHIN, Richard L. et al. Eighteen-Year Trends in the Prevalence of, and Health Care Use for, Noncancer Pain in the United States: Data from the Medical Expenditure Panel Survey. **Journal of Pain**, v. 20, n. 7, p. 796–809, 2019.

NIU, Katelyn Y et al. Efeitos dos hormônios gonadais no sistema do receptor canabinoide periférico 1 (CB1R) sob uma condição de miosite em ratos. **Pain**, v. 153 n.11, p. 2283-2291, 2012.

QUEME, Luis F.; JANKOWSKI, Michael P. Sex differences and mechanisms of muscle pain. **Current Opinion in Physiology**, v. 11, n. 513, p. 1–6, 2019.

PARADA, C. A.; REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCε second messenger pathways. **Pain**, v. 113, n. 1–2, p. 185–190, 2005.

PARENT-VACHON, Madeleine et al. The Effects of Exercise on Pain and Reproductive Performance in Female Pregnant Mice With Neuropathic Pain. **Biological Research for Nursing**, v. 21, n. 5, p. 500–509, 2019.

PATIL, Mayur J. et al. Prolactin regulates TRPV1, TRPA1, and TRPM8 in sensory neurons in a sex-dependent manner: Contribution of prolactin receptor to inflammatory pain. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 9, p. 1154–1165, 2013.

RANDALL, L O; SELITTO, J J. A Method for Measurement of Analgesic Activity on Inflamed Tissue. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 111, n. 4, p. 409–419, set. 1957.

REICHLING, DB, Levine JD. Nociceptor Plasticity in Chronic Pain. v. 32, n. 12, p. 611–618, 2010.

RUEFF, A.; DRAY, A. 5-Hydroxytryptamine-induced sensitization and activation of peripheral fibres in the neonatal rat are mediated via different 5-hydroxytryptamine-receptors. **Neuroscience**, v. 50, n. 4, p. 899–905, 1992.

ROSLAND, Jan Henrik. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, v. 45, n. 2, p. 211–216, 1991.

SCARIOT, Pedro 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. APR, p. 1–10, 2016.

SHARMA, Neena K et al. Neurotrophin-3 Synthesis in an. v. 90, n. 5, p. 1–12, 2010.

Institute of Medicine (US) Committee on Advancing Pain Research, Care, and Education. Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care,

Education, and Research. National Academies Press (US), 2011.

SLUKA, Kathleen A. et al. Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. **Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 6, p. 725–733, 2013.

SORGE, Robert E. et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1081–1083, 2015.

SORGE, Robert E.; TOTSCH, Stacie K. Sex Differences in Pain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 6, p. 1271–1281, 2017.

SORGE, Robert E. et al. Spinal cord toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 43, p. 15450–15454, 2011.

STRAUB, R. H. et al. In polymyalgia rheumatica serum prolactin is positively correlated with the number of typical symptoms but not with typical inflammatory markers. **Rheumatology**, v. 41, n. 4, p. 423–429, 2002.

STRAUB, Rainer H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 5, p. 521–574, 2007.

SUN, Lingling et al. Regular Swimming Exercise Attenuated Neuroma Pain in Rats: Involvement of Leptin and Adiponectin. **Journal of Pain**, v. 20, n. 9, p. 1112–1124, 2019.

SUGIURA, Takeshi; BIELEFELDT, Klaus; GEBHART, G. F. TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 43, p. 9521–9530, 2004.

TAKEDA, Kiyoshi; KAISHO, Tsuneyasu; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–376, 2003.

TALL, Jill M.; CRISP, Terriann. Effects of gender and gonadal hormones on nociceptive responses to intraplantar carrageenan in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 354, n. 3, p. 239–241, 2004.

TRAN, May et al. Ablation of spinal cord estrogen receptor α-expressing interneurons reduces chemically induced modalities of pain and itch. **Journal of Comparative Neurology**, v. 528, n. 10, p. 1629–1643, 2020.

TORRES-CHÁVEZ, Karla E. et al. Sexual dimorphism on cytokines expression in the temporomandibular joint: The role of gonadal steroid hormones. **Inflammation**, v. 34, n. 5, p. 487–498, 2011.

TURK, Denis C, and RUDY, Thomas E. Toward an empirically derived taxonomy of chronic pain patients: integration of psychological assessment data. **Journal of consulting and clinical psychology**, v. 56, n. 2, p. 233-8, 1988.

UNRUH, Anita M. Gender variations in clinical pain experience. **Pain**, v. 65, n. 2–3, p. 123–167, 1996.

VACCA, Valentina et al. Higher pain perception and lack of recovery from neuropathic pain in females: A behavioural, immunohistochemical, and proteomic investigation on sex-related differences in mice. **Pain**, v. 155, n. 2, p. 388–402, 2014.

VINCENT, Katy et al. Brain imaging reveals that engagement of descending inhibitory pain pathways in healthy women in a low endogenous estradiol state varies with testosterone. **Pain**, v. 154, n. 4, p. 515–524, 2013.

VON KORFF, Michael et al. An epidemiologic comparison of pain complaints. **Pain**, v. 32, n. 2, p. 173–183, 1988.

ZAMORA, R.; VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T. R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 6, n. 5, p. 347–373, 2000.

ZHANG, Yu Qiu et al. The release of serotonin in rat spinal dorsal horn and periaqueductal gray following carrageenan inflammation. **NeuroReport**, v. 11, n. 16, p. 3539–3543, 2000.

ZUBIETA, Jon-Kar et al. mu-opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n.12, p. 5100-7, 2002.

ANEXOS

UNICAMP

CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação do comportamento de cronificação da dor muscular em diferentes fases do ciclo estral de camundongos fêmeas**, registrada com o nº **5234-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro e Hayla Lourenço Rodrigues**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido** aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da **Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP,** em reunião de **09/05/2019**.

Finalidade:	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do projeto:	01/05/2019 a 30/04/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	09/05/2019 a 30/04/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)

No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib: SW (Swiss)
No. de animais:	7
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 10.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Origem:	CEMIB/ UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas, FCA/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **<u>05 de junho de 2019</u>**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva

[illegible]