

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Participação de canabinóides endógenos, da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} e do sistema noradrenérgico na antinocicepção induzida pelo exercício físico em ratos.

Giovane Galdino de Souza

Belo Horizonte – MG

2012

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Participação de canabinóides endógenos, da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} e do sistema noradrenérgico na antinocicepção induzida pelo exercício físico em ratos.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea de Castro Perez

Belo Horizonte – MG

2012

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar saúde e perseverança;

À minha orientadora professora Andrea por abrir as portas do laboratório para mim e me a dar a oportunidade de realizar minha pesquisa;

Ao professor Igor, pelos ensinamentos no estudo da dor e exemplo de carisma;

À minha família (mãe Tereza e irmã Geanne), pelo incentivo, apoio e oração;

Ao meu pai (*in mortem*), pai onde você estiver sei que sempre estará ao meu lado!!!

Aos amigos do laboratório de dor, Aline, Átila, Adolfo, Clarice, Daniela Alves, Daniela Pacheco, Luciana, Renato, Lívia, em especial ao Thiago;

A todos os meus colegas mestrandos e doutorandos da Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, pela amizade, companheirismos e alegria;

Aos colaboradores, Grazielle, Felipe, Carlos Xavier, Prof. Dr. Jader, Profa. Dra. Patricia Brum, Aline, Prof. Dra. Daniele Aguiar, Prof. Dr. Vincenzo Di Marzo, Prof. Dr. Gustavo Menezes;

A todos os professores e funcionários do departamento, em especial ao Rinaldo, Jorge e Adriane, pela prestatividade;

A CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos animais de experimentação, que possibilitaram a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Gráficos.....	IX
Lista de Tabela.....	XV
Lista de Abreviaturas.....	XVI
Resumo.....	XXI
INTRODUÇÃO.....	24
1- Dor.....	24
1.1- Contexto histórico.....	24
1.2- Dor e nocicepção.....	26
1.3- Transmissão do impulso nociceptivo.....	27
1.4- Modulação do impulso nociceptivo.....	31
2- Canabinóides endógenos e nocicepção.....	33
3- Óxido nítrico e nocicepção.....	38
4- Sistema noradrenérgico e nocicepção.....	42
5- Exercício físico e nocicepção.....	45
6- Justificativa.....	51
7- Objetivos.....	52
MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
1- Animais de experimentação.....	53
1.1- Protocolos de exercício.....	54
1.1.1- Exercício agudo aeróbico.....	54
1.1.2- Exercício agudo de aorça.....	55
2- Testes algesimétricos.....	61

2.1- Teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	61
2.1.1- Descrição do teste.....	62
2.1.2- Resposta do animal.....	62
2.2- Testes de retirada da cauda ou face frente ao estímulo térmico.....	63
2.2.1- Descrição do teste.....	63
3. Dosagem de nitrito.....	67
3.1- Coleta de plasma e líquido.....	67
3.2- Quantificação do nitrito.....	67
4- Medida da liberação de NO.....	69
5- Determinação da expressão protéica dos receptores α_2C noradrenérgico e canabinoide CB1 pela análise de Western blot.....	70
6- Imunofluorescência para investigação de receptores CB1 and c-FOS em PAG.....	72
7- Análise dos níveis plasmáticos de endocanabinóides por cromatografia gasosa-espectrometria de massa.....	74
8- Drogas, doses e/ou concentrações e soluções.....	75
9- Vias de administração.....	79
9.1- Via subcutânea (s.c.).....	79
9.2- Via intraperitoneal (i.p.).....	79
9.3- Via intratecal (i.t.).....	80
9.4- Via intracerebroventricular (i.c.v.).....	80
9.4.1- Análise histológica para confirmação das injeções.....	82
10- Procedimento experimental.....	83
11- Análise estatística.....	84
RESULTADOS.....	85
DISCUSSÃO.....	186

SUMMARY.....	218
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	221

Lista de Figuras

Figura 1: Terminação das fibras aferentes nas lâminas do corno dorsal da medula.....	28
Figura 2: Principais vias de condução do impulso nociceptivo.....	30
Figura 3: Esteira elétrica adaptada para ratos.....	57
Figura 4: Aparato para a realização do exercício de força.....	57
Figura 5: Aparelho utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de ratos.....	61
Figura 6: Aparelho utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo térmico aplicado na cauda de ratos.....	64
Figura 7: Teste da retirada da cauda.....	65
Figura 8: Teste de retirada de face.....	65
Figura 9: Posicionamento do animal no aparelho extereotáxico.....	82
Figura 10: Incisão no ventrículo lateral direito pela cânula guia.....	83
Figura 11: Representação do procedimento experimental.....	84
Figura 12: Expressão e ativação de receptores canabinóides CB1 e c-FOS na região dorso-lateral da PAG (PAGdl) após o exercício agudo aeróbico.....	115
Figura 13: Expressão e ativação de receptores canabinóides CB1 e c-FOS na região ventro-lateral da PAG (PAGvl) após o exercício agudo aeróbico.....	116
Figura 14: Expressão e ativação de receptores canabinóides CB1 e c-FOS na região dorso-lateral da PAG (PAGdl) após o exercício agudo de força.....	117
Figura 15: Expressão e ativação de receptores canabinóides CB1 e c-FOS na região ventro-lateral da PAG (PAGvl) após o exercício agudo de força.....	118
Figura 16: Representação da liberação de óxido nítrico nas regiões dorsolateral e ventrolateral da PAG após o exercício agudo de força e em animais não exercitados.....	161
Figura 17 - Mecanismos endógenos envolvidos na antinocicepção induzida pelo exercício físico.....	217

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Efeito da estimulação elétrica sobre o limiar nociceptivo no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....58
- Gráfico 2:** Efeito da estimulação elétrica sobre o limiar nociceptivo no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....59
- Gráfico 3:** Efeito da estimulação elétrica sobre o limiar nociceptivo no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....59
- Gráfico 4:** Efeito da contenção do animal no aparato de exercício de força sobre o limiar nociceptivo no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....60
- Gráfico 5:** Variação do tempo de retirada de cauda do animal frente ao aumento da intensidade do estímulo térmico.....66
- Gráfico 6:** Variação do tempo de retirada de face do animal frente ao aumento da intensidade do estímulo térmico.....66
- Gráfico 7:** Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....87
- Gráfico 8:** Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....89
- Gráfico 9:** Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....91
- Gráfico 10:** Efeito da administração intratecal dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....93
- Gráfico 11:** Efeito da administração intratecal dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da

degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....95

Gráfico 12: Efeito da administração intratecal dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....97

Gráfico 13: Efeito da administração intracerebroventricular dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....99

Gráfico 14: Efeito da administração intracerebroventricular dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....101

Gráfico 15: Efeito da administração intracerebroventricular dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção de anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....103

Gráfico 16: Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....106

Gráfico 17: Efeito da administração intratecal dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....108

Gráfico 18: Efeito da administração intracerebroventricular dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....111

Gráfico 19: Detecção por Western Blot da expressão de receptor CB1 para canabinóides em tecido cerebral de ratos após exercício.....113

Gráfico 20: Números de neurônios que expressão o receptor canabinóide

CB1 e c-FOS na PAGdl após o exercício aeróbico.....	115
Gráfico 21: Números de neurônios que expressão o receptor canabinoide CB1 e c-FOS na PAGVI após o exercício aeróbico.....	116
Gráfico 22: Números de neurônios que expressão o receptor canabinoide CB1 e c-FOS na PAGdl após o exercício de força.....	117
Gráfico 23: Números de neurônios que expressão o receptor canabinoide CB1 e c-FOS na PAGvl após o exercício de força.....	118
Gráfico 24: Efeito do exercício agudo aeróbico sobre os níveis plasmáticos de endocanabinóides.....	120
Gráfico 25: Efeito do exercício agudo de força sobre os níveis plasmáticos de endocanabinóides.....	121
Gráfico 26: Efeito da administração subcutânea dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	123
Gráfico 27: Efeito da administração subcutânea dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	124
Gráfico 28: Efeito da administração subcutânea dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....	126
Gráfico 29: Efeito da administração subcutânea dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....	127
Gráfico 30: Efeito da administração subcutânea dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....	129
Gráfico 31: Efeito da administração subcutânea dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....	130
Gráfico 32: Efeito da administração intratecal dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	132
Gráfico 33: Efeito da administração intratecal dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	133
Gráfico 34: Efeito da administração intratecal dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo	

aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....	135
Gráfico 35: Efeito da administração intratecal dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....	136
Gráfico 36: Efeito da administração intratecal dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....	138
Gráfico 37: Efeito da administração intratecal dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....	139
Gráfico 38: Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	141
Gráfico 39: Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores seletivos da óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	142
Gráfico 40: Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....	144
Gráfico 41: Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....	145
Gráfico 42: Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....	147
Gráfico 43: Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....	148
Gráfico 44: Efeito da administração subcutânea dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	150
Gráfico 45: Efeito da administração subcutânea dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	151
Gráfico 46: Efeito da administração intratecal dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de	

força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	153
Gráfico 47: Efeito da administração intratecal dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	154
Gráfico 48: Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores da via NO/cGMP/K ⁺ _{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	156
Gráfico 49: Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	157
Gráfico 50: Efeito do exercício agudo aeróbico e de força sobre os níveis de nitrito no líquor.....	159
Gráfico 51: Efeito do exercício agudo aeróbico e de força sobre os níveis de nitrito no plasma.....	159
Gráfico 52: Efeito do exercício agudo de força sobre a liberação de óxido nítrico na Substância Cinzenta Periaqueductal.....	161
Gráfico 53: Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	163
Gráfico 54: Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico.....	165
Gráfico 55: Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico.....	167
Gráfico 56: Efeito da administração intratecal do antagonista não-seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico nos teste de retirada de pata, cauda e face.....	169
Gráfico 57: Efeito da administração intracerebroventricular do antagonista não-seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico nos teste de retirada de pata, cauda e face.....	171
Gráfico 58: Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	173

Gráfico 59: Efeito da administração intratecal do antagonista não-seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força nos teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	175
Gráfico 60: Efeito da administração intracerebroventricular do antagonista não-seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força nos teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.....	177
Gráfico 61: Efeito do inibidor seletivo para a transmissão noradrenérgica sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico nos teste de retirada de pata, cauda e face.....	179
Gráfico 62: Efeito do inibidor seletivo para a transmissão noradrenérgica sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força nos teste de retirada de pata.....	181
Gráfico 63: Efeito do exercício agudo aeróbico sobre o limiar nociceptivo de camundongos <i>knokouts</i> para os receptores α_2A e α_2C nos teste de retirada de cauda, face e pata.....	183
Gráfico 64: Detecção por Western blot da expressão de receptor α_2C noradrenérgico em tecido cerebral após exercício em ratos.....	185

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC:** Adenilil Ciclase
a.C.: Antes de Cristo
AEA: Anandamida
2-AG: 2-Araquidonilglicerol
AM 251: *N*-(Piperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazole-3-carboxamida
AM 404: *N*-(4-Hidroxifenil)-5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*-eicosatetraenamida
AM 630: 6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]- 1*H*-indol-3-il](4-metoxifenil)metanono
ATP: Trifosfato de Adenosina
BRL 44408: 2-[(4,5-Diidro-1*H*-imidazol-2-il)metil]- 2,3-diidro-1-metil-1*H*-isoindola maleato
BSA: Soro de Albumina Bovina
cAMP: Adenosina Monofosfato Cíclico
C: Graus Celsius
CB1: Receptores para Canabinóides do Tipo 1
CB2: Receptores para Canabinóides do Tipo 2
c-FOS: Gene de Ativação Imediata Como Marcador Neuronal
CGRP: Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
cGMP: Monofosfato Cíclico de Guanosina
DAF-FM: Diacetato 4-amino-5 metilamino-2'7'-difluoresceína
DAG: Diacilglicerol
eNOS: Óxido Nítrico Sintase endotelial
FAAH: Ácido Graxo Amino Hidrolase
FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo
FRDE: Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
GABA: Ácido gama aminabutírico
GC: Guanilil Ciclase Solúvel
Gi: Proteína G inibitória
Gs: Proteína G estimulatória
GTP: Trifosfato de Guanosina
H2: Receptores para Histamina Tipo 2
HU 210: (6*aR*)-*trans*-3-(1,1-Dimetilepti)-6*a*,7,10,10*a*-tetraidro-1-hidroxi-6,6-dimetil-6*H*-dibenzo[*b,d*]piran-9-metanol
iNOS: Óxido Nítrico Sintase Indutível
IP3: Trifosfato de Inositol
K⁺_{ATP}: Canais para Potássio Sensíveis a Adenosina Trifosfato
LDH: Lactato Deldrogenase
L-NAME: NG-Nitro-L-arginina metil esterhidroclorido
L-NMMA: NG-Monometil-L-arginina acetato
L-NIO: *N*⁶-(1-Iminoetil)-L-ornitina diidroclorido
L-NPA: N-propil-L-arginina
MAFP: (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-5,8,11,14-eicosatetraenil-metil ester ácido

fosfonofluorídico

MAGL: Monoacilglicerol Lipase

MAPK: Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos

mRNA: Ácido Ribonucléico Mensageiro

NA: Noradrenalina

NaCl: Cloreto de Sódio

NADPH: Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NADH: Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina

nNOS: Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NO: Óxido Nítrico

NO₃⁻: Nitrato

NO₂⁻: Nitrito

NOS: Óxido Nítrico Sintase

NRM: Núcleo Magno da Rafe

OCT: Optimal Cutting Temperature

ODQ: 1*H*-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalina-1-

OEA: Oleoiletanolamida

PAG: Substância Cinzenta Periaqueductal

PBS: Tampão Fosfato

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PEA: Palmitoiletanolamida

PFA: Paraformaldeído

PGE2: Prostaglandina do tipo E2

PIP2: Fosfatidil Diinositol 4,5 Difosfato

PPAR- α : Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos α

PRGC: Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

SDS-PAGE: Sódio dodecil (lauril) sulfato-poliacrilamida

SIN-1: Amino-3-morfolinil-1,2,3-oxadiazolio clorido

SNC: Sistema Nervoso Central

TBS: Tampão Fosfato Salino

THC: Δ^9 -tetraidrocannabinol

TRPV: Receptores de Potencial Transitório do Tipo Vanilóide

USP: Universidade do Estado de São Paulo

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VDM 11: (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-*N*-(4-Hidroxi-2-metilfenil)-5,8,11,14eicosatetra-enamida

WIN55212-2: (*R*)-(+)-[2,3-Diidro-5-metil-3-(4morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-*de*]-1,4-benzoxazina-6-*yl*]-1nafitalenilmetanona mesilato

2-AG: 2-araquidonil-glicerol

RESUMO

A antinocicepção induzida pelo exercício físico tem sido amplamente investigada na literatura desde o final da década de 70. A maioria dos estudos tem demonstrado o sistema de opióides endógenos como os principais envolvidos nesse efeito. Desse modo, sabendo que existem outras vias endógenas responsáveis por modular tanto o impulso quanto a resposta nociceptiva, o presente estudo objetivou investigar a participação do sistema de canabinóides endógenos, da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} e do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo induzido pelo exercício.

Para o estudo foram utilizados ratos Wistar machos submetidos a um protocolo agudo de exercício aeróbico e a um protocolo agudo de exercício de força. Além desses animais foram também utilizados camundongos com duplo *knockout* para os receptores α 2A e α 2C e seus selvagens submetidos ao exercício aeróbico. Os protocolos de exercício foram realizados em uma esteira elétrica adaptada para ratos e camundongos e em um aparato de agachamento adaptado para ratos. Para a medida do limiar nociceptivo foram utilizados os testes de retirada da pata ao estímulo mecânico, retirada da cauda e retirada da face ao estímulo térmico.

Desse modo, foi então verificado um significativo aumento ($p < 0,05$) no limiar nociceptivo em todos os testes algosimétricos após o exercício aeróbico e no teste de retirada de pata após o exercício de força. Com relação ao envolvimento do sistema de endocanabinóides nesse efeito, foi verificado que a pré-injeção (s.c., i.t. e i.c.v.) tanto do antagonista para o receptor CB1 (AM 251) quanto para o receptor CB2 (AM 630) reverteram esse efeito. Além disso, o efeito antinociceptivo induzido pelos protocolos de exercício foi potencializado após a pré-injeção sistêmica e

central de inibidores das enzimas responsáveis pela degradação de anandamida (MAFP) e do 2-AG (JZL 184) e do inibidor da recaptção da anandamida (VDM 11). Também após os protocolos de exercício também foi encontrado um aumento da expressão de receptores CB1 em tecido cerebral de ratos, avaliado pela técnica de Western blot. Somando a esse resultado, a técnica de imunofluorescência demonstrou uma ativação e um aumento no número de receptores CB1 em neurônios das regiões ventro lateral e dorso lateral da substância cinzenta periaqueductal após os protocolos de exercício. Ambos os protocolos também foram responsáveis por aumentar os níveis plasmáticos dos endocanabinóides anandamida, 2-araquidonil-glicerol, palmitoiletanolamida e oleoiletanolamida.

Para investigar o envolvimento da via NO/cGMP/ K^+_{ATP} na antinocicepção induzida pelos protocolos de exercício foi utilizado o NOArg (inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase), o ODQ (inibidor do monofosfato cíclico de guanosina) e a glibenclamida (bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP})). Assim, a pré administração s.c., i.t. e i.c.v. dessas drogas reverteu o efeito antinociceptivo encontrado após o exercício agudo aeróbico e agudo de força. Além disso, essa reversão também foi encontrada pela pré-administração (s.c., i.t. e i.c.v.) do inibidor específico para a óxido nítrico sintase endotelial, o L -NIO; do inibidor específico para óxido nítrico sintase induzível, a aminoguanidina e do inibidor específico para óxido nítrico sintase neuronal, o L -NPA. Adicionalmente, os níveis de nitrito no plasma e no líquido cerebrospinal de ratos foram aumentados após os protocolos de exercício. Também através do uso do reagente diacetato 4-amino-5 metilamino-2',7'-difluoresceína (DAF-FM DA) foi verificado uma maior liberação de óxido nítrico nas regiões dorso lateral e ventro lateral da substância cinzenta periaqueductal após o exercício de força.

Já, o sistema noradrenérgico parece estar envolvido apenas periféricamente na antinocicepção encontrada após os protocolos de exercício. Visto que, a ioimbina (antagonista não-seletivo para os receptores α_2), a rauvolscina (antagonista seletivo para os receptores α_2C) e o BRL44408 (antagonista seletivo para os receptores α_2A) reverteram o efeito antinociceptivo quando pré-injetados subcutaneamente, porém quando pré-injetada i.t. ou i.c.v. a ioimbina não alterou o efeito antinociceptivo induzido pelos protocolos de exercício. Além disso, após ambos os protocolos não foi verificada alteração na expressão de receptores α_2C em tecido cerebral de ratos. Assim, confirmando o envolvimento periférico desse sistema, o pré-tratamento (3 dias) com a guanetidina, um inibidor do armazenamento e da exocitose da noradrenalina pelos terminais noradrenérgicos, inibiu a antinocicepção induzida pelos exercícios. Em adição, a antinocicepção produzida pelo exercício agudo aeróbico em camundongos selvagens não foi encontrado nos camundongos com duplo *knockout* para os receptores α_2A e α_2C .

Esse estudo sugere evidências que o sistema de canabinóides endógenos e a via NO/cGMP/ K^+_{ATP} estão envolvidos na antinocicepção central e periférica induzida pelo exercício, bem como o sistema noradrenérgico a nível periférico.

Palavras-chave: Antinocicepção, Exercício, Dor.

INTRODUÇÃO

1 - Dor

1.1- Contexto histórico

Desde a pré-história o homem já demonstrava copioso interesse em investigar e controlar a dor. A literatura descreve que os homens primitivos já entendiam a dor acidental e usavam de alguns recursos para controlá-la, tais como massagem e pressão na região dolorosa, água do rio, calor de sol, calor do fogo e utilização de ervas (Keele, 1957).

No ano de 2.250 antes de cristo (a.C.), na Babilônia, alguns arquivos relatam o uso de plantas analgésicas, como a papoula, a mandrágora e o cânhamo (maconha) para o alívio de diversos tipos de dor. Posteriormente, em 1.550 (a.C.), a Farmacopéia Egípcia, escrita no Papiro de Ebers, cita o uso do ópio para o tratamento de diversas enfermidades, dentre elas a dor de cabeça (Mechoulam, 1986).

A partir do século XVII, surgem vários estudiosos que descrevem algumas teorias e hipóteses para elucidar “o fenômeno da dor”. Por exemplo, em 1628, Harvey descobriu a corrente sanguínea e acreditava ser o coração o principal local de transmissão da dor. Entretanto, anos após, em 1664, com a publicação do livro de René Descartes, *L'Homme* (O homem), no qual foi apresentada a Teoria da Especificidade, o cérebro passa a ser considerado o local de sensação dolorosa e de função motora. Nessa mesma época, Darwin sugere a Teoria Intensiva, relatando que “A dor resulta do estímulo excessivo através do toque”. Em 1894, uma teoria que correlaciona fatores críticos da dor como a intensidade do estímulo e o

somatório da resposta central, é descrita por Goldscheider (Bonica & Loeser, 2001). A teoria mais reconhecida e difundida é a Teoria do Portão da Dor, também conhecida como “Teoria da Comporta”, a qual admite existir nos cornos posteriores da medula espinhal um mecanismo neural que atua como portão, podendo aumentar ou diminuir impulsos provenientes de fibras aferentes nociceptivas periféricas a regiões supraespinais, ocorrendo, então, uma resposta reguladora, mesmo antes de acontecer a interpretação desse impulso como uma resposta dolorosa (Melzack & Wall, 1965).

Já no século XIX, surge a morfina, alcalóide isolado a partir do ópio, que representou um significativo avanço dentro da terapia da dor. A partir desse advento, com o desenvolvimento de novos analgésicos, e após o surgimento da seringa e da agulha em 1846, essas drogas começaram a ser utilizadas para o controle da dor durante procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos. Outras drogas e tratamentos, como eletroterapia, cinesioterapia, hidroterapia e termoterapia também foram desenvolvidas a partir desse período e são intensa e extensamente aplicados atualmente (Bonica & Loeser, 2001).

1.2- Dor e nocicepção

Atualmente, a ciência descreve a dor como uma reação evolutiva, cuja principal função é a comunicação de danos estruturais ou funcionais do corpo, através de informações concernentes à localização e à intensidade dos estímulos nocivos e potencialmente lesivos, de forma que alguma reação de defesa ou de fuga possa ser tomada, evitando danos maiores e preservando a integridade do indivíduo (Millan, 1999). Nesse sentido, a dor pode ser considerada uma experiência subjetiva complexa, que não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo ambiental, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (Julius & Basbaum, 2001). Assim, a dor foi conceituada, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões” (IASP, 1994).

A nocicepção é uma forma especializada de sinalização sensorial, que converte informação originada de lesões teciduais em uma resposta (Baranauskas & Nistri, 1998). Desse modo, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e exige a capacidade de abstração e de elaboração de impulsos sensoriais e motores, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo (Casey, 2000). Devido a essas características, nocicepção é um termo mais adequado para experimentação animal, pois alterações nos limiares nociceptivos não são comunicadas verbalmente, mas detectadas comportamentalmente.

Então, pelo fato de dor e de nocicepção não serem sinônimas, alguns termos têm sido sugeridos na prática clínica, principalmente os derivados do sufixo *algisia* (do grego *algesis* = sensibilidade a dor), como hiperalgisia (aumento de sensibilidade à dor), hipoalgisia (diminuição da sensibilidade à dor), alodinia (dor

decorrente de um estímulo que normalmente não provocava dor) e analgesia (sem dor); e, adicionalmente, termos mais apropriados para modelos experimentais em animais, derivados do sufixo *noci* (dano ou lesão em latim), como hipernocicepção, hiponocicepção e antinocicepção, quando se trata de resultados obtidos a partir da avaliação da nocicepção (Parada *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2006).

A nocicepção em animais pode ser avaliada por diferentes modelos experimentais. Alguns autores sugerem a utilização de mais de um teste nociceptivo, devido à sensibilidade diferencial dos animais durante a mensuração do efeito (antinociceptivo ou nociceptivo) a nível periférico e central, melhorando a reprodutibilidade (Dennis & Melzack, 1980; Abbott *et al.*, 1982).

1.3- Transmissão do impulso nociceptivo

Os estímulos nociceptivos são detectados por meio da ativação de receptores sensoriais especializados, denominados nociceptores, os quais são terminações sensoriais responsáveis por conduzirem o impulso até neurônios presentes no corno dorsal da medula espinhal (Basbaum & Jessel, 2000). Os nociceptores, por sua vez, estão localizados extensamente pelo corpo (na pele, nos músculos, nas articulações, nas vísceras e nas meninges) e são classificados de acordo com o estímulo recebido: a) Fibras A δ (A delta): ativados por temperaturas extremas (estímulos térmicos maiores que 45°C e menores que 5°C) e por pressão (estímulos mecânicos), sendo que tais nociceptores são finamente mielinizados e conduzem o impulso elétrico rapidamente (12 a 30 m/s); B) Fibras C: são nociceptores ativados

por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos de alta intensidade e, devido a essa característica responsiva, são também chamados de polimodais. A velocidade de condução do impulso elétrico através das fibras C varia de 0.5 a 2 m/s (Julius & Basbaum, 2001).

Nesse contexto, uma vez deflagrado o impulso elétrico pelo estímulo nociceptivo, esse estímulo é carregado através dos corpos das fibras aferentes primárias até o corno dorsal da medula (impulso oriundo de tronco, membros e vísceras) ou até o gânglio do trigêmeo, quando se refere ao impulso originado ou da cabeça, da cavidade oral ou do pescoço. No corno dorsal da medula, os nociceptores chegam de maneira amplamente organizada em regiões denominadas lâminas. As fibras A δ terminam seu trajeto nas lâminas I e V; e as C, nas lâminas I e II (Millan, 1999) (Figura 1). A partir dessas regiões, são acionados neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem, sendo que alguns são ativados somente por estímulos nocivos (específicos para a nocicepção) e outros respondem a estímulos de alta ou baixa intensidade.

A conexão sináptica entre as fibras aferentes primárias e os neurônios do corno dorsal envolve neurotransmissores como o glutamato, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P, os quais são responsáveis pela produção de potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos e lentos, que, respectivamente, ascendem contralateralmente até o tálamo por diferentes tratos como paleoespinal, espinoreticular, espinomesencefálico, propioespinal (curso medial ao tronco cerebral) e por um trajeto lateral ao tronco cerebral, composto pelos tratos neoespinal e espinoreticular (Sousa & Prado, 2001) (Figura 2A).

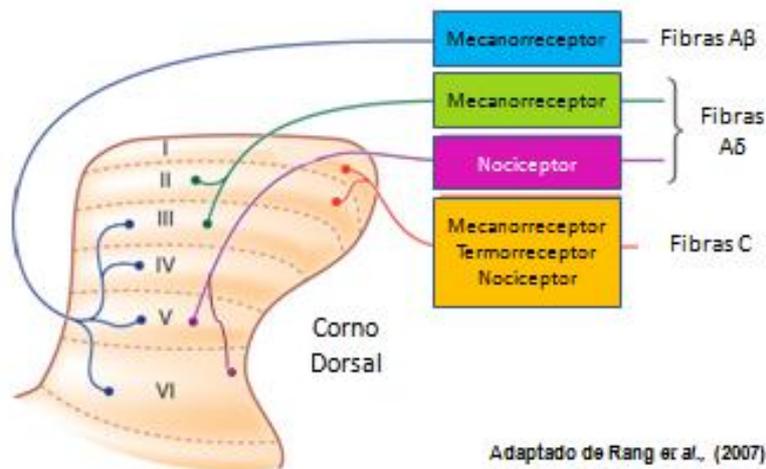


Figura 1 – Terminação das fibras aferentes nas lâminas do corno dorsal da medula

Já os estímulos nociceptivos provenientes da face percorrem um trajeto diferente. Depois de ativar o nociceptor, o estímulo segue por neurônios trigeminais de primeira ordem (que têm seus corpos celulares localizados no gânglio trigeminal), realizando uma primeira sinapse com neurônios de segunda ordem no trato espinhal trigeminal e ascendendo contralateralmente em direção ao tálamo (através do lemnisco trigeminal), onde será realizada a segunda sinapse (Figura 2B) (Okeson, 1998).

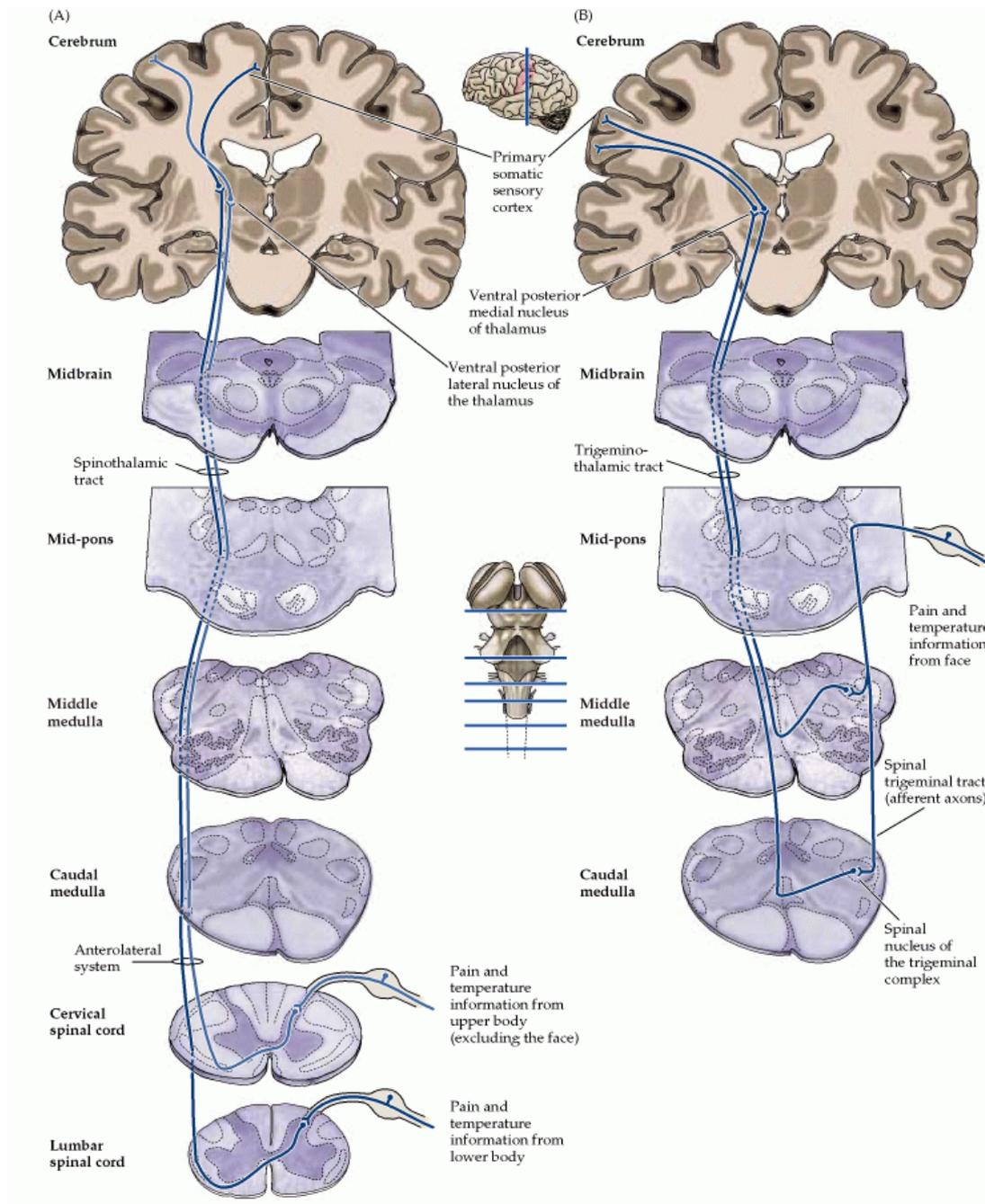


Figura 2 – Principais vias de condução do impulso nociceptivo.

Fonte: Purves *et al.* (2001).

No tálamo, os estímulos conduzidos pelos neurônios de segunda ordem realizam sinapses com neurônios de terceira ordem, os quais emitem projeções até o córtex somatossensorial, no qual as informações serão processadas e interpretadas como dor (Millan, 2002).

1.4- Modulação do impulso nociceptivo

Após a chegada do impulso nociceptivo no córtex, um estímulo é ativado, percorrendo vias descendentes em sentido oposto ao da via nociceptiva ascendente. Esse trajeto modulatório descendente inicia-se principalmente no mesencéfalo, pelo bulbo ventromedial rostral, e termina no corno dorsal da medula espinhal (Gutstein *et al.*, 1998).

A participação do SNC (sistema nervoso central) no controle da dor tem sido objeto de estudo há aproximadamente um século. Em 1911, Head & Holmes designaram o tálamo como centro de percepção de estímulos nociceptivos e o neocórtex como o local responsável por modular tais respostas (McDonald, 2007). Mais tarde, em 1954, Hagbarth & Kerr apresentaram as primeiras evidências diretas que os sítios supramedulares controlariam as vias ascendentes (presumivelmente sensoriais) (Hagbarth & Kerr, 1954). Até que em 1965, Carpenter *et al.* demonstraram o controle descendente dos eferentes sensoriais para vias ascendentes (Carpenter *et al.*, 1965).

No entanto, a existência de um sistema modulatório específico da dor só foi claramente articulada em 1965, na teoria de controle do “portão” da dor, proposta por Melzack & Wall. De acordo com essa teoria, os interneurônios da lâmina II da medula espinhal poderiam inibir ou facilitar os fluxos dos aferentes dentro do corno dorsal antes deles evocarem a resposta e a percepção da dor (Melzack & Wall, 1965).

A partir desse momento, a medula, que era tradicionalmente considerada como simples estação intermediária para os impulsos sensoriais, foi descoberta como uma

complexa estrutura contendo grande variedade neuronal e arranjos sinápticos, bem como considerável número de neurotransmissores e neuropeptídeos. Essa estrutura permite não somente a recepção e a transmissão dos impulsos sensoriais como também um elevado grau de modulação central, envolvendo integração, seleção e dispersão apropriada dos impulsos sensoriais (Bonica, 1990). Anos mais tarde, Reynolds (1969) descobriu que as sinapses moduladoras da dor não estão restritas à medula, mas também a outras estruturas supramedulares como PAG (Substância Cinzenta Periaquedutal), a qual ele estimulou eletricamente e verificou analgesia em ratos. A PAG é uma importante região do circuito do SNC, a qual controla a transmissão do impulso nociceptivo, recebendo impulsos de muitas regiões cerebrais, incluindo o córtex, a amígdala, o hipotálamo e o tálamo (Sandkuhler, 1996; Millan, 2002).

A partir da PAG, o estímulo segue uma via modulatória endógena descendente, a qual está conectada ao núcleo magno da rafe (NMR), no bulbo, e, a partir daí, através de fibras que percorrem o funículo dorsolateral da medula espinhal, assim formando conexões sinápticas com interneurônios do corno dorsal medular (Ren & Dubner, 2002). Essas vias modulatórias descendentes da dor controlam a liberação de neurotransmissores provenientes dos terminais nociceptivos das fibras aferentes primárias no corno dorsal da medula espinhal (Millan, 1999).

A ativação dessas vias pode bloquear direta e indiretamente os neurônios de projeção no corno dorsal. Diretamente, através de seus eferentes serotoninérgicos e catecolaminérgicos (Westlund *et al.*, 1990); e indiretamente, através da inibição dos interneurônios excitatórios (Light & Kavookjian, 1988) ou da excitação dos interneurônios inibitórios, os quais contêm neurotransmissores como o GABA (ácido

gama aminobutírico) e glicina (Todd *et al.*, 1996). Além desses, a via descendente modulatória pode ser modulada por opióides e canabinóides endógenos, óxido nítrico e noradrenalina, os quais podem alterar a aferência do impulso nociceptivo excitatório (Millan, 2002).

2 - Canabinóides endógenos e nocicepção

O sistema endocanabinóide tem sido vastamente descrito nas últimas décadas, devido a suas importantes funções biológicas (Porter & Felder, 2001). A descoberta desse sistema surge a partir da *Cannabis sativa* (maconha), a qual seu ancestral uso medicinal tem sido amplamente descrito na literatura. Como no ano de 2.600 a.C., quando o imperador chinês Huang Ti receitava o uso da *Cannabis* para o alívio de cólica menstrual e da dor de origem reumática (Mechoulam, 1986). Assim, a *Cannabis* tem sido utilizada por diferentes civilizações em uma variedade de aplicações médicas, como dor, estimulação do apetite, náuseas, febre, infecções e distúrbios ginecológicos (Adams & Martin, 1996; Lambert, 2001).

A primeira evidência consistente do antigo uso da *Cannabis* e talvez o testemunho de seu primeiro uso médico foi a descoberta de um material cinza carbonizado contendo um dos principais constituintes dessa planta, o Δ^9 -tetraidrocannabinol (THC), encontrado ao lado do corpo de uma mulher grávida, em uma tumba, próxima à cidade de Jerusalém. A data das moedas de cobre (315-392 a.C.) encontradas ao lado do corpo dessa mulher são, possivelmente, marcadores temporais do uso da *Cannabis sativa*. Entretanto, no mundo ocidental, o uso

terapêutico da maconha foi avaliado e publicado somente no século XIX pelo britânico John Russell Reynolds, médico da rainha Vitória (Zias *et al.*, 1993).

Um pouco recentemente, a partir da década de 1940, alguns compostos da *Cannabis* foram isolados, tais como cannabidiol, cannabinol, Δ^1 -tetraidrocannabinol e Δ^9 -tetraidrocannabinol, os quais obtiveram relevância na aplicação e na pesquisa clínica (Adams *et al.*, 1941; Hollister *et al.*, 1973).

Após a descoberta desses compostos, foi sugerida a existência de receptores específicos, que foram inicialmente investigados através da técnica de radioimunoensaio em 1988, na membrana plasmática de células do cérebro de ratos, (Devane *et al.*, 1988). Assim, em 1990, foi feita a clonagem do receptor existente no cérebro desses animais foi apresentado. Esse receptor pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, o qual é negativamente acoplado ao adenilil ciclase (AC), inibindo a conversão do ATP (trifosfato de adenosina) em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e, conseqüentemente, inibindo a abertura de canais, como o de Ca^{2+} voltagem-dependente (Matsuda *et al.*, 1990). Esse primeiro receptor canabinóide identificado é descrito como CB1, sendo principalmente encontrado no cérebro, na medula espinhal, no sistema nervoso periférico, no trato urinário e gastrointestinal, no aparelho reprodutor e no baço (Pertwee, 1997). Três anos mais tarde, foi descoberto um segundo receptor canabinóide (CB2), localizado em células e tecidos do sistema imune (Munro *et al.*, 1993; Pertwee & Ross, 2002), embora estudos recentes tenham demonstrado a presença desses receptores em muitas regiões cerebrais (Onaivi *et al.*, 2011).

Dessa forma, com a descoberta de receptores canabinóides, um questionamento para possíveis ligantes endógenos ficou em aberto. O primeiro endocanabinóide reconhecido foi a anandamida, seguida pelo 2-araquidonil-glicerol

(2-AG), os quais compõem um grupo maior de ligantes atualmente isolados, com afinidade para ligar e ativar, pelo menos, um desses receptores (Devane *et al.*, 1992; Mechoulam *et al.*, 1995). O metabolismo desses endocanabinóides (anandamida e 2-AG) ocorre através de hidrólise enzimática, pela ação da ácido graxo amino hidrolase (FAAH) e pela monoacilglicerol lipase (MGL) (Giuffrida *et al.*, 2001; Karlsson *et al.*, 1997). Essas enzimas também podem regular os níveis de outros endocanabinóides, como o PEA (palmitoiletanolamida) e o OEA (oleoiletanolamida), os quais, apesar de serem estruturalmente similares à anandamida e ao 2-AG, ativam receptores ativados por proliferadores de peroxissomos α (PPAR- α) e receptores de potencial transitório do tipo vanilóide (TRPV), não ativando receptores canabinóides (Matias *et al.*, 2007). Porém, alguns estudos têm demonstrado que antagonistas para receptores CB2 revertem alguns efeitos produzidos pelo PEA como a antinocicepção (Calignano *et al.*, 1998; Onaivi *et al.*, 2008).

Diante disso, estudos têm investigado o envolvimento do sistema endocanabinóide em uma variedade de respostas fisiológicas, dentre as quais a antinocicepção tem tido grande repercussão.

Muitos desses estudos têm demonstrado a ocorrência de receptores para canabinóides na via de modulação da dor, como PAG, NMR, núcleo reticular paragigantocelular e corno dorsal da medula espinhal (Herkenham *et al.*, 1991; Tsou *et al.*, 1998). Walker *et al.* (1999) encontraram uma reversão da analgesia induzida pela estimulação na região dorsolateral da PAG em ratos após o pré-tratamento com antagonistas para os receptores canabinóides (Walker *et al.*, 1999). Em tal região, também foram encontrados altos níveis de anandamida e 2-AG, após analgesia induzida pelo estresse (Hohmann *et al.*, 2005). Além disso, alguns autores demonstraram que a microinjeção direta na PAG de inibidores da FAAH e MGL

aumentou os níveis de anandamida e 2-AG e, conseqüentemente o efeito antinociceptivo induzido pelo modelo de estresse frente a estímulo elétrico aplicado em pata de ratos (Hohmann *et al.*, 2005; Suplita *et al.*, 2005).

Outras áreas de modulação do impulso nociceptivo, como o NMR e o núcleo paragigantocelular, têm adquirido considerável importância na analgesia frente a agonistas canabinóides sintéticos (Martin *et al.*, 1998; Monhemius *et al.*, 2001). Martin *et al.* (1998) verificaram que a administração de agonistas para receptores canabinóides, como o WIN 55212-2 e HU 210, em áreas específicas do NMR, aumentou a latência da retirada da cauda no teste do *tail-flick*. Nesse mesmo modelo nociceptivo (teste do *tail-flick*), o WIN 55212-2, quando microinjetado no núcleo paragigantocelular, também produziu antinocicepção (Monhemius *et al.*, 2001).

Estudos eletrofisiológicos também têm auxiliado a desvendar a participação dessas áreas no mecanismo da antinocicepção induzida por essas substâncias. Esses registros têm fornecido uma evidência direta que os canabinóides podem modular as células *On – Off*, situadas no bulbo ventromedial rostral do tronco cerebral, as quais aumentam ou inibem o impulso nociceptivo (Meng *et al.*, 1998; Meng & Johansen, 2004). Nessas células, os canabinóides aumentam a atividade da célula *Off*, com conseqüente redução do disparo das células *On*, reproduzindo assim antinocicepção, a qual foi observada frente ao teste de retirada de cauda (Meng *et al.*, 1998).

A nível medular, mais precisamente em lâminas I e II do corno dorsal, receptores CB1 também foram identificados. Essas regiões contêm terminações de populações biologicamente distintas de nociceptores aferentes primários, nos quais os impulsos poderão ser modulados por canabinóides (Farquhar-Smith *et al.*, 2000).

Em adição, a expressão de c-fos (um marcador da expressão neuronal) no corno dorsal da medula, induzida pelo teste da formalina (teste algesimétrico caracterizado pela injeção de um agente álgico na pata de roedores, os quais responderam lambendo a pata testada e tendo o tempo de lambedura cronometrado pelo experimentador), foi reduzida pelo pré-tratamento com o AM 404 (inibidor da recaptação de anandamida) (Borsani *et al.*, 2007). Reforçando a hipótese da participação do sistema canabinóide a nível espinal, outros autores verificaram que o agonista para os receptores canabinóides, o WIN 55212-2, reduziu a nocicepção induzida pelo modelo de compressão de medula espinhal em ratos (Hama & Sagen, 2007).

Muitos estudos também encontraram um efeito antinociceptivo a nível periférico, produzido pelo sistema canabinóide. Uma redução do tempo de lambedura foi verificada após a administração de anandamida e PEA em camundongos submetidos ao teste da formalina, sendo que a pré-administração de antagonistas para os receptores canabinóides reverteu esse efeito (Calignano *et al.*, 1998). Adicionalmente, Ko & Woods (1999) demonstraram que a administração de THC na cauda de macacos rhesus (*Macaca mullata*) minimizou a alodinia produzida pela capsaicina (Ko & Woods, 1999). Em adição, a administração intraplantar do agonista WIN 55212-2 reduziu a hiperalgesia frente a estímulos mecânico e térmico, produzida pela capsaicina em ratos (Johanek *et al.*, 2001).

3- Óxido nítrico e nocicepção

Em 1847, Ascanio Sobrero descobriu a nitroglicerina e verificou que pequenas quantidades dessa substância, quando aplicada sobre a língua produziam forte dor de cabeça. Dois anos mais tarde, Constantin Hering postulou a nitroglicerina como um medicamento homeopático, acreditando na doutrina “semelhante cura semelhante”, após testar o uso da nitroglicerina em jovens voluntários e verificar o alívio de cefaléia.

Em meados do século XIX, cientistas britânicos reconheceram a nitroglicerina como um potente vasodilatador, e em 1876, Willian Murrell descreve seu uso para alívio da *Angina pectoris*. Passados cem anos, a ação vasodilatadora da nitroglicerina começa a ser desvendada, quando Ferid Murad descobre que o óxido nítrico (NO) é liberado a partir da nitroglicerina (Marsh & Marsh, 2000). Assim, a nobre importância do óxido nítrico surge após o descobrimento de que o fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE), até essa época descrito por Furchgott & Zawadzki (1980) por produzir relaxamento no músculo liso vascular, era o próprio NO (Furchgott & Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1987).

O NO é sintetizado em células de mamíferos pela conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina. Tal reação é catalisada por uma família de enzimas conhecidas como NO sintases (NOS), entre as quais, duas são constitutivamente produzidas como a NOS neuronal (nNOS), encontrada no sistema nervoso central, e a NOS endotelial (eNOS), encontrada no endotélio. Ambas geram baixas quantidades de NO e são dependentes da interação com a calmodulina que, por sua vez, é controlada pelos níveis intracelulares de cálcio (Moncada *et al.*, 1991). A outra isoforma da NOS é a induzível (iNOS), amplamente expressa em macrófagos,

células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, células musculares lisas de vasos e células endoteliais, sendo expressa em resposta a estímulos patológicos, tais como inflamação, e libera grandes quantidades de NO (Jacobs *et al.*, 1997).

Uma vez sintetizado, o NO difunde-se para dentro da própria célula ou para células vizinhas e se liga ao grupo heme da enzima guanilil ciclase solúvel (GC), que, por sua vez, transforma o trifosfato de guanosina intracelular (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), o qual promove a abertura de canais para potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) que pode resultar no controle de vários efeitos fisiológicos como vasodilatação, secreção de neurotransmissores, morte celular programada e modulação do impulso nociceptivo (Brayden, 2002; Yamada & Inagaki, 2005; Murad, 2006; Kawano *et al.*, 2009).

Duarte *et al.* (1990) foram um dos primeiros a demonstrar o envolvimento da via NO/cGMP na antinocicepção. Esses autores verificaram que o nitroprussiato de sódio, um doador de NO, produziu antinocicepção na pata de rato com hiperalgesia induzida por prostaglandina E2 (PGE2). Esse efeito antinociceptivo foi aumentado após a administração de um inibidor de fosfodiesterase do cGMP e reduzido após o uso de um inibidor da formação do cGMP (azul de metileno) e do inibidor não seletivo da NOS o L-NMMA (Duarte *et al.*, 1990). A partir daí, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos avaliando a participação da via NO/cGMP/ K^+_{ATP} no efeito antinociceptivo de diferentes substâncias (Bermudez-Ocana *et al.*, 2006; Vale *et al.*, 2007; Hernandez-Pacheco *et al.*, 2008). Além disso, também foi verificado o envolvimento dessa via na analgesia induzida pela dipirona, após a reversão desse efeito pela pré administração do L-NMMA (inibidor da NOS) e o azul de metileno (inibidor do GC), a nível periférico e medular (Lorenzetti & Ferreira, 1996). Além da dipirona, a participação da via NO/GMPc também foi demonstrada na

antinocicepção periférica e central induzida pelo potente analgésico morfina (Ferreira *et al.*, 1991; Duarte & Ferreira, 1992).

Considerando a influência da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} na modulação da nocicepção, estudos também têm demonstrado seu envolvimento em modalidades não farmacológicas para o tratamento da dor. Recentemente, em nosso grupo, Almeida & Duarte (2008) encontraram uma reversão da analgesia induzida pela eletroacupuntura, em um modelo de nocicepção orofacial, após o pré tratamento com um inibidor específico para nNOS e com o inibidor do GC, o ODQ (Almeida & Duarte, 2008). Similar resultado foi registrado pelo presente trabalho, no qual toda a via NO/cGMP/K⁺_{ATP}, inclusive todas isoformas da NOS participaram do efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico em ratos (Galdino *et al.*, 2010a).

Além dos achados previamente citados, o NO também tem sido encontrado em muitas regiões centrais que participam da modulação do impulso nociceptivo. Nesse sentido, o grupo do professor Lovick tem demonstrado que o NO inibe a deflagração do impulso nervoso neuronal induzida por eletroestimulação na PAG de ratos (Lovick, 1996; Hamalainen & Lovick, 1997). A participação da via NO/cGMP também foi encontrada no NMR, uma importante região, através do qual impulsos antinociceptivos supra-espinhais ligam a vias descendentes inibitórias da dor (Basbaum & Fields, 1984). Além disso, Iwamoto & Marion (1994) verificaram que a pré-injeção de um inibidor da NOS e do GC no NMR inibiu o efeito antinociceptivo do agonista muscarínico cis-metildioxolano. Contudo, esse efeito foi revertido após administração de L-arginina (Iwamoto & Marion, 1994).

Em adição, liberação e aumento da iNOS e nNOS têm sido verificadas no gânglio da raiz dorsal e no corno dorsal da medula, em resposta a estímulos inflamatórios (Steel *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1998; Maihofner *et al.*, 2000). A partir

disso, esses autores sugerem uma considerável participação do NO na modulação do impulso nociceptivo a nível espinhal, principalmente relacionada à nocicepção inflamatória. Entretanto, Souza & Prado (2001) demonstraram que o efeito do NO na modulação do impulso nociceptivo a nível espinhal depende de sua concentração liberada, ou seja, quando foram administradas pequenas doses do doador de NO, o SIN-1, foi verificada antinocicepção, enquanto altas doses intensificaram a alodinia mecânica em modelo de dor neuropática em ratos (Sousa & Prado, 2001). Além disso, resultados prévios de nosso grupo fortalecem a hipótese da ação antinociceptiva do NO presente na periferia, onde foram encontrados níveis aumentados de nitrito em tecido de pata de ratos após injeção de substâncias antinociceptivas, dentre elas a quetamina (Romero *et al.*, 2011).

4- Sistema noradrenérgico e nocicepção

A partir da década de 1960 numerosos estudos começam a desvendar a participação do sistema noradrenérgico na modulação da nocicepção. O pioneiro e relevante estudo foi realizado em 1963 por Lundberg & Vyklicky, o qual demonstrou que a liberação de catecolaminas na medula espinhal inibia a transmissão aferente nociceptiva (Lundberg & Vyklicky, 1963). Nesse mesmo ano, foi encontrado no cérebro de ratos o metabólito da noradrenalina (NA), isto é a normetanefrina (Haggendal, 1963), que foi um passo importante para a elucidação da via metabólica da NA no SNC, incluindo regiões envolvidas na modulação da resposta nociceptiva (Rutledge & Jonason, 1967; Sharman, 1973). Diante disso, muitos estudos

investigaram se o sistema noradrenérgico exerceria um papel no controle central da dor.

A partir daí, o *Locus coeruleus* é descrito como um importante local de liberação de NA durante a modulação da nocicepção, o qual, após lesão bilateral, reduziu o efeito antinociceptivo do agonista noradrenérgico clonidina (Kostowski & Jerlicz, 1978). Além disso, estudos verificaram que os grupos de células denominados A6 e A7 presentes em núcleos do *Locus coeruleus* emitem impulsos através de um vasto plexo de varicosidades noradrenérgicas para todas as lâminas do corno dorsal da medula (lâminas I, II, IV, V) (Sluka & Westlund, 1992; Yeomans *et al.*, 1992). Em adição, estudos têm demonstrado considerável antinocicepção após estimulação elétrica desses núcleos (Stamford, 1995; Zhao *et al.*, 1999). Além desses núcleos noradrenérgicos, também foi encontrado que estimulação elétrica ou injeção de agonistas noradrenérgicos na PAG e no NMR poderiam modular a nocicepção (Brodie & Proudfit, 1986; Peng *et al.*, 1996; Budai *et al.*, 1998).

Embora não existam neurônios noradrenérgicos na PAG, evidências sugerem que neurônios noradrenérgicos originados do tronco cerebral contribuem para inibição do impulso nociceptivo via PAG – bulbo rostral ventromedial – corno dorsal da medula (Jensen & Yaksh, 1984; Schroder & Skagerberg, 1985). Essas projeções provindas do tronco cerebral se conectam com projeções originadas da PAG e do bulbo rostral ventromedial, seguindo para os núcleos do *Locus coeruleus* e daí até a medula espinhal (Clark & Proudfit, 1993; Cameron *et al.*, 1995; Holden & Proudfit, 1998).

O envolvimento do sistema noradrenérgico na modulação da nocicepção está principalmente implicado na ativação de receptores α_2 noradrenérgicos (Yaksh, 1985). Salientando, os receptores noradrenérgicos são divididos em 3 classes: α_1 ,

$\alpha 2$ e β (Ruffolo *et al.*, 1993; Bylund *et al.*, 1994; Hieble *et al.*, 1995;). Os receptores $\alpha 1$ apresentam principalmente 3 subtipos ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$ e $\alpha 1C$), os quais são acoplados à proteína Gq, ativando a enzima fosfolipase C, a qual quebra o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 interage com os canais para cálcio do retículo sarcoplasmático, liberando o cálcio que estava retido, para o citoplasma. Similarmente, os receptores $\alpha 2$ são divididos em 3 subtipos: $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ e $\alpha 2C$, os quais são acoplados à proteína Gi (proteína G inibitória), a qual promove, quando ativada, inibição do adenilil ciclase (AC), com consequente aumento da corrente de K^+ e diminuição da corrente de Ca^{2+} , resultando em uma diminuição da excitabilidade neuronal, efeito esse contrário aos receptores $\alpha 1$ (Kukkonen *et al.*, 2001). A última classe, os receptores β , dividida em $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$, estimulam o AC, via proteína G estimulatória (Gs), aumentando a propagação do impulso neuronal (Hieble *et al.*, 1995).

Os receptores $\alpha 2$ são amplamente encontrados em diversas áreas do cérebro, distribuídos pelo córtex e tronco encefálico, principalmente no *Locus coeruleus*, PAG e NMR (Scheinin & Schwinn, 1992; Rosin *et al.*, 1993; Nicholas *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 1996; Millan *et al.*, 2000). Além das regiões supramedulares, esses receptores são bastante expressos na medula espinhal, na qual muitos estudos têm demonstrado a presença de tais receptores no corno dorsal (Jones *et al.*, 1982; Rosin *et al.*, 1993; Young & Kuhar, 1980). Nesse local, uma vez ativados, eles podem reduzir tanto a excitabilidade das fibras aferentes primárias nociceptivas, quanto reduzir a liberação de transmissores pronociceptivos, como substância P e glutamato (Millan, 1998). Em adição, um estudo demonstrou que a PAG apresenta um importante papel na modulação do impulso nociceptivo, ao participar da ativação de receptores $\alpha 2$ presentes no corno dorsal da medula (Peng *et al.*, 1996). Além do

cornu dorsal, Binder *et al.* (2004) demonstraram aumento da expressão de receptores α_2 em tecido de pata inflamada de ratos, após reversão da hiperalgesia pela administração local (intraplantar) de noradrenalina e isoprenalina (Binder *et al.*, 2004). Em adição, Khasar *et al.* (1995) demonstraram que o efeito antinociceptivo induzido pela clonidina (agonista para os receptores α_2 noradrenérgicos) foi revertido pelos antagonistas para os subtipos α_{2A} e α_{2C} , a rauvolscina e o BRL 44408 em modelo de hiperalgesia periférica em ratos (Khasar *et al.*, 1995). Diante disso, os receptores α_2 tem sido um importante alvo para a investigação do mecanismo de ação de muitas substâncias e intervenções antinociceptivas.

5 – Exercício físico e nocicepção

Há mais de 30 anos, pesquisas tem se intensificado para tentar investigar o complexo mecanismo da analgesia induzida pelo exercício físico. Um dos estudos responsáveis por inaugurar esse tipo de investigação foi o estudo do caso de uma mulher com quadro de fortes dores nas pernas, aliviadas durante a prática de corrida. Porém, em repouso, o quadro doloroso retornava e, mais tarde, foi descoberto que a dor devia-se a uma fratura encontrada em ambas as tíbias (Colt & Spyropoulos, 1979). Nesse mesmo ano, Black *et al.* encontraram um aumento do limiar nociceptivo, frente a um teste doloroso de compressão isquêmica no braço, em um indivíduo submetido a 40 minutos de corrida (Black *et al.*, 1979). A partir disso, surgem estudos mais relevantes que encontraram analgesia após exercício moderado e intenso em bicicleta ergométrica, os quais usaram um estímulo elétrico

aplicado em polpa dental como modelo de nocicepção (Pertovaara *et al.*, 1984; Kemppainen *et al.*, 1985; Kemppainen *et al.*, 1986).

Nessa mesma época, com o isolamento e a caracterização dos opióides endógenos, os quais mimetizavam efeitos analgésicos opióides, esses peptídeos passam a ter importância nos estudos que investigaram o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício (Hughes *et al.*, 1975; Goldstein *et al.*, 1979; Miller, 1981). Nesse contexto, em 1981, Haier *et al.* verificaram que a naloxona (antagonista não seletivo para os receptores opióides) reverteu a analgesia produzida após uma corrida de aproximadamente 1 milha de distância em homens e mulheres (Haier *et al.*, 1981). Além da corrida, outro estudo também demonstrou que a naloxona reverteu a analgesia induzida por exercício até a exaustão em bicicleta ergométrica (Droste *et al.*, 1988). Adicionalmente, níveis plasmáticos aumentados de β -endorfina também foram encontrados durante e após o exercício (de Meirleir *et al.*, 1986; Droste *et al.*, 1991).

Em animais, os resultados são similares aos encontrados em humanos, nos quais a antinocicepção tem sido principalmente demonstrada em roedores, submetidos a exercício em esteira ergométrica ou natação, avaliada por estímulos térmicos ou mecânicos. (Bodnar *et al.*, 1978; Willow *et al.*, 1980; Shyu *et al.*, 1982; Carmody & Cooper, 1987; Bement & Sluka, 2005). Além disso, a maioria desses estudos também demonstrou o envolvimento de receptores opióides endógenos nesse efeito (Bodnar *et al.*, 1978; Willow *et al.*, 1980; Shyu *et al.*, 1982).

Apesar desses estudos previamente descritos terem verificado um importante envolvimento dos opióides endógenos na analgesia induzida pelo exercício, outras substâncias com atividade similar (analgésica) foram também investigadas. O hormônio do crescimento foi uma das primeiras substâncias a serem avaliadas.

Níveis plasmáticos aumentados desse hormônio foram correlacionados com analgesia produzida por exercício intenso em bicicleta ergométrica (Kemppainen *et al.*, 1986).

Em adição, outro hormônio também foi investigado, o adrenocorticotrópico, o qual estimula as glândulas adrenais a promoverem a síntese e a secreção de glicocorticóides. Estudos têm demonstrado que níveis plasmáticos aumentados de glicocorticóides reduzem a transmissão do impulso nociceptivo, principalmente no corno dorsal da medula (Marlier *et al.*, 1995; Pinto-Ribeiro *et al.*, 2004) Desse modo, Kemppainen *et al.* (1990) verificaram que o aumento dos níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrópico e o limiar nociceptivo promovidos após exercício aeróbico em bicicleta ergométrica foram reduzidos pelo pré tratamento com dexametasona (Kemppainen *et al.*, 1990), sugerindo, assim, uma possível participação desse hormônio na analgesia produzida pelo exercício. Em adição, outro estudo sugeriu o envolvimento de catecolaminas e cortisol nesse efeito, depois de correlacionarem o aumento do limiar nociceptivo verificado após exercício até a exaustão em bicicleta com o aumento dos níveis plasmáticos dessa substâncias (Droste *et al.*, 1991). Entretanto, apesar do aumento da atividade do sistema simpático durante o exercício e da modulação desse sistema por opióides endógenos (Farrell *et al.*, 1991), esforços não foram realizados para avaliar seu envolvimento na redução da dor provocada pelo exercício.

Outros trabalhos demonstraram que a serotonina e o óxido nítrico também podem participar da antinocicepção induzida pelo exercício. Hoffmann *et al.* (1990) demonstraram que o pré-tratamento com bloqueador da síntese de serotonina inibiu a antinocicepção produzida após contrações no músculo gastroquinêmio de ratos, induzidas por estimulação elétrica (Hoffmann *et al.*, 1990). Apesar da serotonina

contribuir para a facilitação do impulso nociceptivo a nível central, periféricamente esse neurotransmissor pode produzir antinocicepção (Millan, 1995; Millan, 1997).

Em ratos, um trabalho apresentado nessa tese, verificou que a via NO/cGMP/K⁺_{ATP} está envolvida no efeito antinociceptivo produzido por um protocolo de exercício aeróbico agudo moderado até a exaustão. Além disso, esse trabalho também demonstrou o envolvimento das 3 isoformas da NOS nesse efeito (Galdino *et al.*, 2010a).

Contudo, um recente estudo sugeriu a participação de canabinóides endógenos no efeito analgésico do exercício. Sparling *et al.* (2003) encontraram aumento dos níveis de anandamida no plasma, após exercício agudo realizado por indivíduos treinados em esteira e bicicleta ergométrica (Sparling *et al.*, 2003). Apesar de não realizarem avaliação do limiar nociceptivo, os autores sugeriram que o sistema canabinóide endógeno poderia ser responsável pela analgesia encontrada após o exercício. Reforçando esse achado, no ano seguinte (2004), esse mesmo grupo publicou uma revisão, a qual destaca a presença de receptores para canabinóides em locais importantes por mediar respostas fisiológicas durante o exercício, como pele, músculos, células endoteliais e pulmões. Além disso, esses autores realçam a alta propriedade lipofílica da anandamida, a qual facilita sua ação central analgésica durante o exercício (Dietrich & McDaniel, 2004). Nesse contexto, outro estudo registrou que o exercício aeróbico potencializou o efeito de agonistas para os receptores CB1, aumentando a perda de peso em camundongos obesos (Zhou & Shearman, 2004). Além disso, o exercício aumentou a sensibilização de receptores para endocanabinóides em algumas áreas cerebrais como no hipocampo de ratos e no estriatum de camundongos (De Chiara *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2010). Em adição, Keeney *et al.* (2008) encontraram uma diminuição da duração da corrida

em uma linhagem de camundongos corredores, durante um tratamento crônico com um antagonista seletivo para os receptores CB1 (Keeney *et al.*, 2008).

Embora a maioria dos trabalhos descritos na literatura tenham demonstrado que o exercício aeróbico induz analgesia com o envolvimento de algumas vias, são limitados os estudos que investigaram os mecanismos envolvidos na antinocicepção induzida pelo exercício de força. O primeiro estudo que avaliou a analgesia induzida por exercício de força foi realizado em 1994, o qual comparou o efeito de um programa de treinamento de força com um programa de treinamento aeróbico. Porém nesse estudo somente o treinamento aeróbico demonstrou analgesia (Anshel & Russell, 1994). Dois anos mais tarde, Bartholomew *et al.* (1996) encontraram um aumento da tolerância a dor em 13 participantes, após um programa de exercício de força de aproximadamente 20 minutos (Bartholomew *et al.*, 1996). Em adição, outro estudo encontrou um aumento do limiar nociceptivo após um programa de exercício de força para membros superiores e inferiores em homens e mulheres, avaliado por um estímulo pressórico aplicado sobre um dos dedos da mão (Koltyn & Arbogast, 1998).

Entretanto, ao contrário dos trabalhos realizados com exercício aeróbico, nenhum desses trabalhos previamente citados, investigou um possível mecanismo endógeno envolvido na redução da dor induzida pelo exercício de força. Embora, alguns estudos verificassem aumento dos níveis plasmáticos de endorfinas após exercício de força, esse achado nunca havia sido associado à analgesia (Kraemer *et al.*, 1992; Walberg-Rankin *et al.*, 1992; Kraemer *et al.*, 1993). Contudo, recentemente foi demonstrado em dissertação de mestrado o envolvimento de opióides endógenos no efeito antinociceptivo induzido por um modelo de exercício de agachamento (*leg press*) em ratos (Galdino *et al.*, 2010b).

Tendo em vista a eficácia do exercício físico em induzir antinocicepção, tanto em ensaios clínicos quanto experimentais, bem como o escasso conhecimento de substâncias envolvidas nesse efeito, o presente estudo buscou oferecer uma maior compreensão sobre o envolvimento de outros mecanismos antinociceptivos endógenos nesse efeito, especificamente o sistema endocanabinóide, a via NO/cGMP/K_{ATP}⁺ e o sistema noradrenérgico, os quais já estão bem definidos como moduladores da resposta nociceptiva.

6 - Justificativa

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a dor afeta atualmente 30% da população mundial (WHO, 2008). Nesse sentido, avanços para o seu controle e tratamento têm se desenvolvido de maneira crescente. Assim, estudos sobre estratégias farmacológicas e não-farmacológicas estão sendo cada vez mais investigados, e dentro das medidas não-farmacológicas para o controle da dor, o exercício físico tem se destacado muito ultimamente.

Além de produzir menores efeitos colaterais quando comparado ao tratamento farmacológico, o exercício físico também é um tratamento que oferece um menor custo para o paciente. Estudos avaliando o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício iniciaram no final década de 70, onde posteriormente foi demonstrado o envolvimento de opióides endógenos nesse efeito.

Entretanto, com o decorrer dos anos foram descobertas outras vias responsáveis por modularem o impulso nociceptivo, algumas como: o sistema de endocanabinóides, a via NO/cGMP/ K^+ _{ATP} e os receptores α 2 noradrenérgicos. Desse modo, buscando investigar outros mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo induzido pelo exercício físico, o presente estudo investigou a participação dessas três vias nesse efeito.

7 - Objetivos:

7.1- Objetivo Geral:

Investigar a participação de canabinóides endógenos, da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} e do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo sistêmico e central induzido pelo exercício agudo aeróbico e agudo de força.

7.2- Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito dos protocolos de exercício agudo aeróbico e agudo de força sobre o limiar nociceptivo de ratos através dos testes nociceptivos de retirada de cauda e face ao estímulo térmico e pata ao estímulo mecânico.

- Investigar o envolvimento sistêmico e central de receptores CB1 e CB2 para endocanabinóides sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico e de força.

- Investigar o envolvimento sistêmico e central da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico e de força.

- Investigar o envolvimento sistêmico e central de receptores α 2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico e de força.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas para manejo e investigação de dor experimental em animais de laboratório (IASP, 2005) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo: 185/2007.

1 - Animais de experimentação

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando entre 180 e 230 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Cebio-ICB/UFMG) e camundongos machos (C57BL/6J) com duplo *knockout* para receptores $\alpha 2A$ e $\alpha 2C$ e idade de 20 semanas e seus selvagens, cedidos pela Prof^a. Dra. Patrícia Brum, do Departamento de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (USP). Ambas as linhagens foram mantidas em condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acesas às 7:00h), com livre acesso à ração e água antes dos experimentos. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo dois dias antes dos experimentos e agrupados em um número máximo de 4 a 6 animais por caixa.

Para o estudo farmacológico os grupos foram formados por animais sedentários, exercitados e exercitados pré-tratados com antagonistas ou inibidores das vias analgésicas endógenas de interesse do estudo.

Os experimentos foram realizados entre 10 e 14 horas em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura e sempre durante o ciclo claro entre 11:00 e 19:00 horas.

1.1- Protocolos de exercício

1.1.1- Exercício agudo aeróbico

O exercício aeróbico foi realizado em uma esteira ergométrica adaptada para roedores, com capacidade para 6 animais, velocidade e inclinação variáveis (INSIGHT[®], Brasil) (Figura 3). A esteira apresenta em sua parte posterior um dispositivo para estimulação elétrica variando entre 0,2 a 1,2 V de intensidade de corrente, responsável por encorajar os animais a correrem.

Nesse exercício os ratos correram até à fadiga, a uma velocidade leve a moderada progressiva até 20 m/min e 0° de inclinação (Ji *et al.*, 1992) (Tabela 1). De acordo com Mush *et al.* (1988) essa velocidade final fornece um consumo de oxigênio (VO₂) de aproximadamente 51 ml/min/kg. Já os camundongos correram a uma velocidade progressiva até 6 m/min, a qual equivale ao VO₂ aproximado do protocolo realizado em ratos (Ferreira *et al.*, 2007). O critério de fadiga foi determinado pela permanência do animal na grade, a qual apresenta um estímulo elétrico, sem correr durante dez segundos consecutivos ou dois segundos em um intervalo de um minuto (Brooks & White, 1978).

Tabela 1- Protocolo de exercício agudo aeróbico em ratos

Tempo (min)	5	10	15	20	25	30	Fadiga
Velocidade (m/min)	3,0	6,0	10,0	14,0	18,0	20,0	20,0
Inclinação (°)	0	0	0	0	0	0	0

(Adaptado de Ji *et al.*, 1992)

1.1.2- Exercício agudo de força

O exercício de força foi realizado no aparato de exercício de agachamento adaptado para ratos descrito por Tamaki *et al.* (1992). O aparato é constituído de madeira e possui uma superfície de 50 x 60 cm (Figura 4, item 1), a qual se encontra fixado um eixo na posição vertical articulado (Figura 4, item 2) a uma alavanca horizontal móvel de 35 cm de comprimento (Figura 4, item 3) que tem em sua outra extremidade um colete de couro através do qual o animal é contido (Figura 4, item 4) em posição ortostática com os membros inferiores flexionados. Na parte superior dessa alavanca encontra-se uma haste onde são colocados os respectivos pesos (anilhas), os quais correspondem à carga do aparelho imposta ao animal (Figura 4, item 5). Após a realização do movimento, a alavanca é apoiada a um amortecedor de segurança (Figura 4, item 6) que previne impacto nas articulações

do animal, hiperflexão dos membros inferiores e mantém as pernas relaxadas durante o período de repouso. A altura da alavanca é regulada de acordo com o tamanho do animal e o limite do movimento de flexão-extensão de membros inferiores. Para a realização do movimento (extensão dos membros inferiores com o levantamento da alavanca do aparelho) um estímulo elétrico (Figura 4, item 7) com intensidade de 3,0 V, 0,3 s de duração e 2 s de intervalo é aplicado à cauda do animal. Para a prática do exercício de força, os animais foram exercitados com 15 séries de 15 repetições separadas por intervalos de 2 s entre as repetições e 2 min entre as séries (Tamaki *et al.*, 1992).

Antes da realização do exercício de força, os animais foram submetidos ao teste de repetição máxima (RM), com objetivo de avaliar a carga máxima imposta ao animal, e a partir dessa foi utilizada uma carga equivalente a 65-75% da RM para dar início ao respectivo protocolo.

Ambos os protocolos de exercício, tanto aeróbico quanto de força, foram comparados a um grupo controle (Co), formado por animais sedentários que não realizaram nenhum tipo de exercício e que foram mantidos tanto na esteira quanto no aparato de exercício de força por um intervalo de tempo semelhante ao dos animais exercitados. Em um período de 3 dias antecedentes à realização dos exercícios, os animais foram submetidos a uma adaptação na esteira, a qual caminharam a uma velocidade leve de aproximadamente 3 m/min por 5 min/dia. Já para a adaptação no aparato de exercício de força, os animais ficaram contidos no aparelho por aproximadamente 20 min/dia, também durante 3 dias. A adaptação no aparato é importante para a redução do estresse.



Figura 3 – Esteira elétrica adaptada para ratos e camundongos

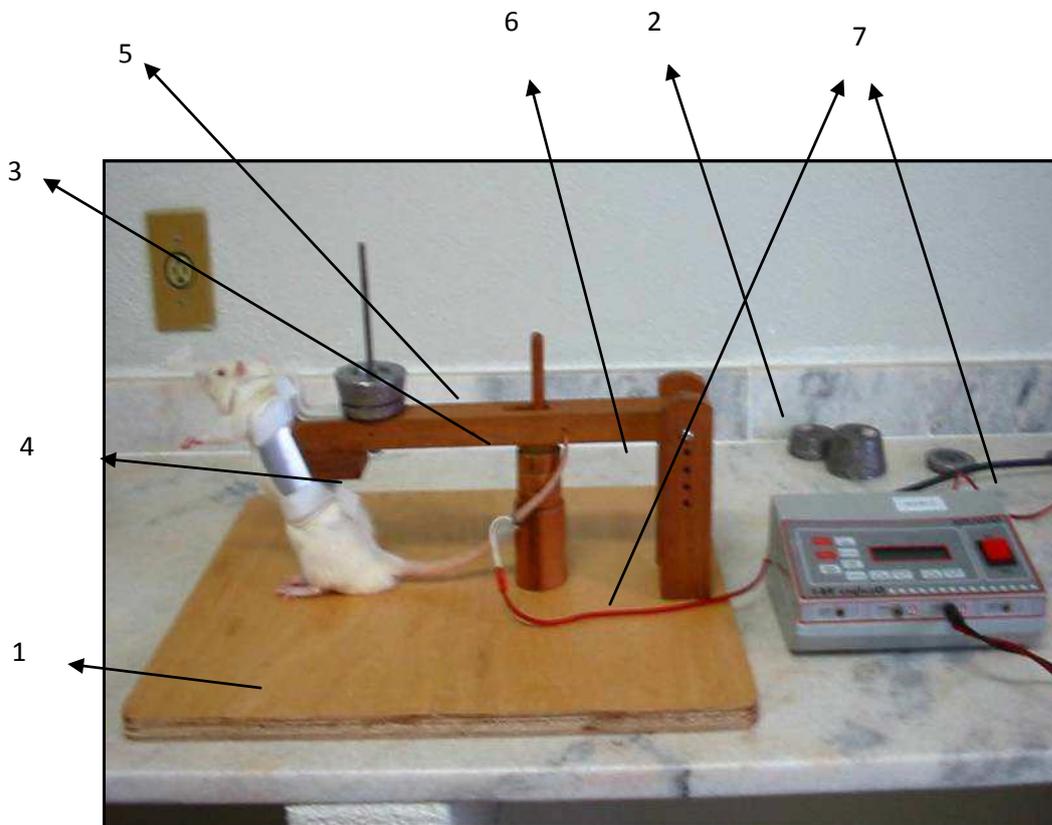


Figura 4 - Aparato para a realização do exercício de força (Fonte: Silva *et al.*, 2007).

- 1- Superfície de madeira
- 2- Eixo articulado vertical
- 3- Alavanca
- 4- Colete de contenção do animal

- 5- carga do aparelho
- 6- Amortecedor
- 7- Estimulador elétrico

A estimulação elétrica utilizada para o encorajamento dos animais durante a prática dos protocolos de exercício é um estímulo causador de estresse e esse poderia influenciar também na sensação dolorosa. Desse modo, foi realizado um grupo experimental formado por animais que não realizaram nenhum protocolo de exercício e que receberam estímulo elétrico similar aos aplicados nos animais durante cada protocolo, com o objetivo de avaliar a influência do estímulo elétrico na resposta antinociceptiva. Os estímulos aplicados aos animais desse grupo experimental foram similares, tanto na quantidade (± 35) quanto no local (extremidade distal da cauda), aos aplicados na esteira e no aparato de força e foram avaliados por todos os testes algosimétricos utilizados no estudo. Assim, podemos observar através dos gráficos 1A, 1B E 1C que o estímulo elétrico aplicado em cada protocolo de exercício não produziu alterações no limiar nociceptivo.

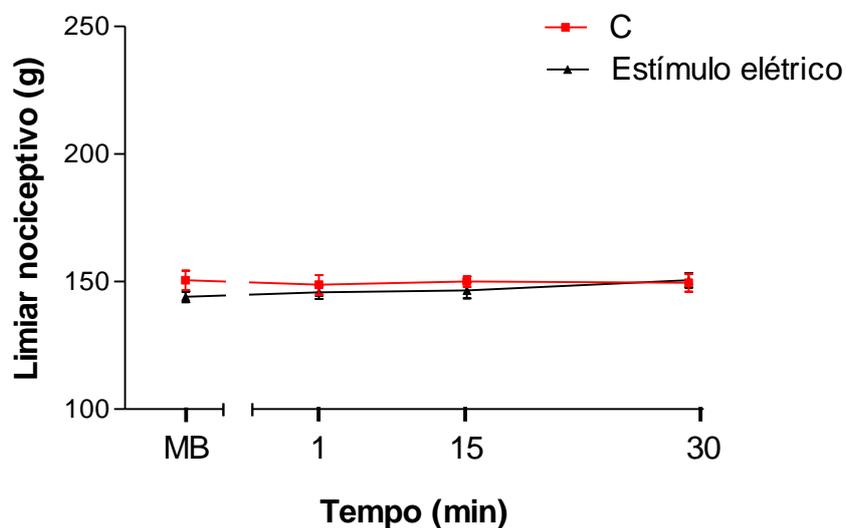


Gráfico 1 - Efeito da estimulação elétrica sobre o limiar nociceptivo no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes do estímulo elétrico. O grupo controle (C) está representado por animais que não receberam o estímulo elétrico. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g). (para cada grupo experimental n=4)

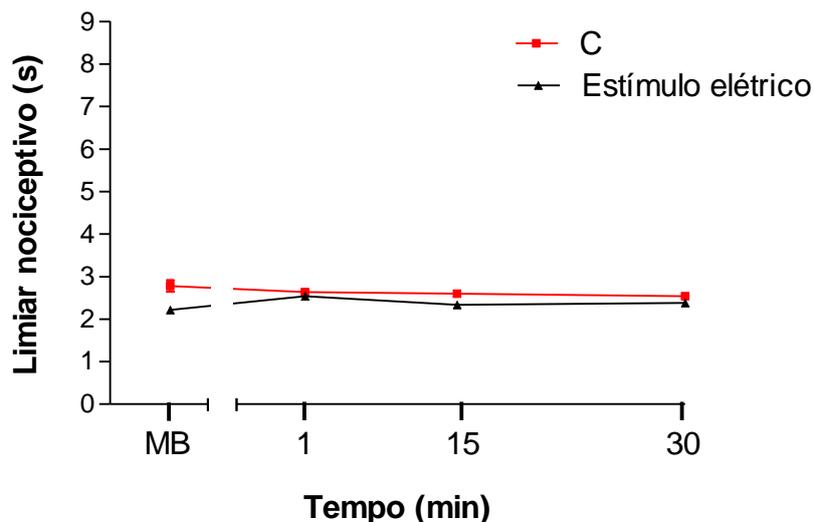


Gráfico 2 - Efeito da estimulação elétrica sobre o limiar nociceptivo no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes do estímulo elétrico. O grupo controle (C) está representado por animais que não receberam o estímulo elétrico. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. (para cada grupo experimental n=4)

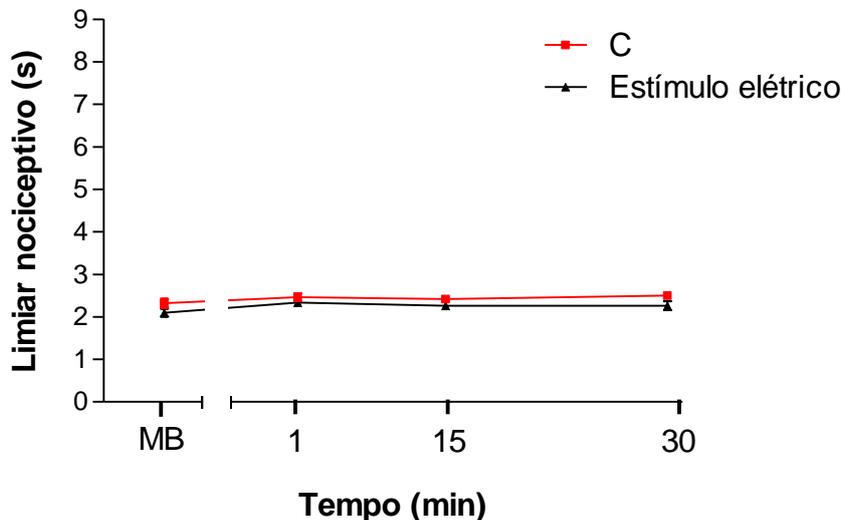


Gráfico 3 - Efeito da estimulação elétrica sobre o limiar nociceptivo no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes do estímulo elétrico. O grupo controle (C) está representado por animais que não receberam o estímulo elétrico. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. (para cada grupo experimental n=4)

Outro fator que poderia também ser responsável por causar estresse e influenciar na avaliação do limiar nociceptivo seria a contenção do animal no aparato de agachamento. Diante disso, com o objetivo de avaliar essa possível influência da contenção, foi realizado um experimento, no qual os animais foram divididos em três grupos: controle (animais não contidos no aparato de agachamento), contidos no aparelho por 20 min (semelhante ao tempo total da realização de 3 séries do protocolo) e contidos no aparelho por 30 min (acima do tempo total da realização de 3 séries do protocolo), avaliados pelo teste algésimétrico de retirada de pata ao estímulo mecânico. Então, de acordo com os resultados apresentados no gráfico 2, podemos observar que a contenção no aparato de agachamento não promoveu alteração do limiar nociceptivo.

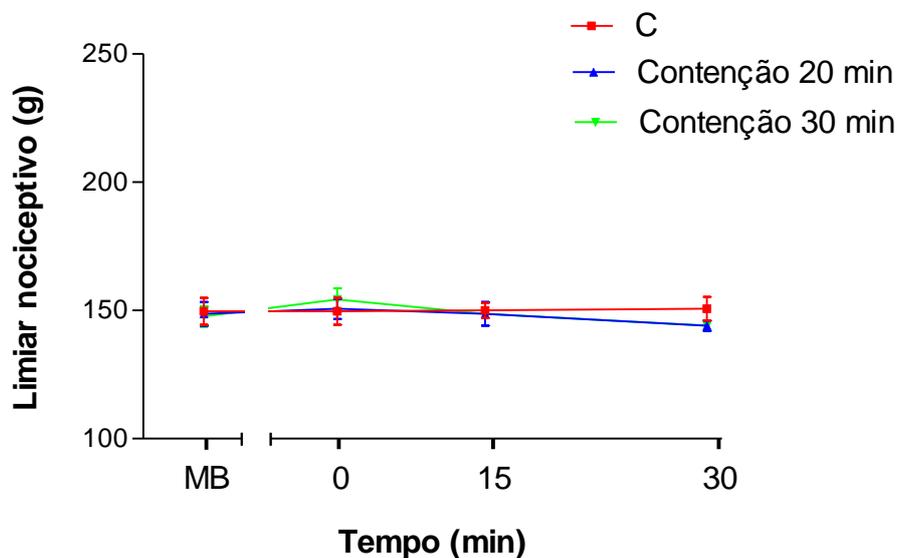


Gráfico 4 - Efeito da contenção do animal no aparato de exercício de força sobre o limiar nociceptivo no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da contenção no aparato de exercício de força. O grupo controle (C) está representado por animais que não foram contidos no aparato. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g). (para cada grupo experimental n=6)

2 - Testes algésimétricos

2.1 - Teste de retirada de pata ao estímulo mecânico.

Para a medida do limiar nociceptivo mecânico foi utilizado o método de retirada de pata, o qual é realizado no aparelho algésimétrico (Ugo Basile, Itália) (Randall & Selitto, 1957), ilustrado abaixo (Figura 5).

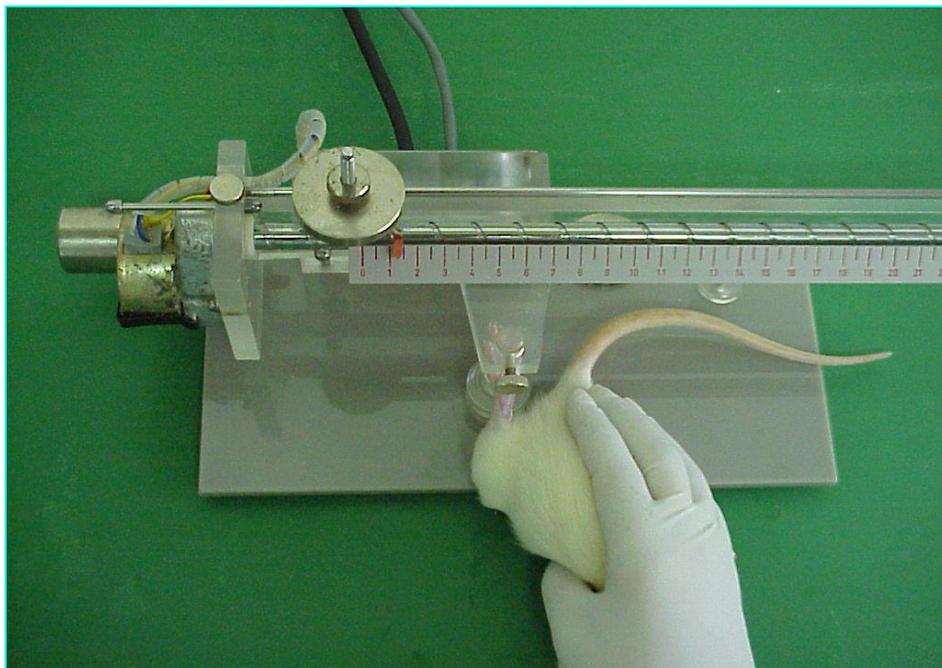


Figura 5 - Aparelho utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de ratos.

Fonte: Laboratório de dor e analgesia (UFMG).

2.1.1- Descrição do teste

No teste, o animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata testada é posicionada, por sua superfície plantar, à parte compressora do aparelho. A parte compressora consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a região posterior da pata do animal, e outra cônica, com uma área de $1,75 \text{ mm}^2$ na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície plantar da pata do rato. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 32 g/s , mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador.

Ao observar a resposta nociceptiva do animal, o experimentador desaciona o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g).

2.1.2 - Resposta do animal

O aprendizado para a medida da antinocicepção no teste de retirada de pata consiste no treinamento do experimentador para detectar o momento em que o animal percebe o estímulo doloroso e desenvolve uma reação: reflexo de retirada da pata. É importante ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho durante 2 dias antecedentes ao teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. A pata do animal é

pressionada pelo aparelho várias vezes, até que o mesmo não manifeste mais uma reação de fuga. Esse procedimento é muito importante, pois permite uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, que durante o teste deverá permanecer quieto, evitando que desenvolva uma reação aversiva simplesmente devido à situação estranha imposta a ele.

2.2 - Testes de retirada da cauda ou face frente ao estímulo térmico.

Os testes consistem na aplicação de calor, por contato de uma resistência elétrica, em uma pequena região da superfície da cauda (3 cm de sua extremidade) ou da face (região das vibrissas) do animal provocando um rápido movimento de retirada (D`amour & Smith, 1941). As vantagens deste método são: simplicidade, sensibilidade, reprodutibilidade e uma baixa variabilidade entre animais do mesmo grupo (Taber, 1973).

2.2.1 - Descrição do teste

O aparelho é controlado pelo experimentador, o qual acionará um interruptor, permitindo assim a passagem de uma corrente elétrica por uma resistência, sob a qual é colocada a cauda do animal, que será aquecida até que o animal realize o reflexo de retirada (Figura 7). Assim, no momento em que o animal realiza o reflexo de retirada o interruptor será pausado pelo experimentador e o tempo de retirada é definido como a latência, a qual é registrada em segundos, através de um cronômetro digital existente no aparelho. Ou seja, quando o pedal é acionado para promover o aquecimento da resistência, o cronômetro também é acionado.

O teste de retirada da face consta de um método adaptado do modelo de retirada de cauda, por Neubert *et al.* (2005) e, consiste de um estímulo térmico aplicado na face direita do animal, especificamente na região das vibrissas, com o propósito de estimular terminações nervosas trigeminais (Neubert *et al.*, 2005). Neste teste o animal responderá com um rápido movimento do pescoço em direção oposta ao estímulo nociceptivo (Figura 8).

A intensidade do estímulo foi regulada para se obter um reflexo de retirada tanto de face quanto de cauda para uma latência de limiar médio de 3,5 s, sendo que a duração máxima foi estipulada de 9,0 s, como prevenção para danos teciduais. A latência escolhida foi a que oferece um intervalo de tempo (s) que melhor permite uma boa reprodutibilidade da resposta antinociceptiva. Para a obtenção dessa latência, foram realizados experimentos com diferentes graus de intensidades (Gráficos 3 e 4), nos quais a intensidade escolhida foi a 5.



Figura 6 – Aparelho utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo térmico aplicado na cauda de ratos

Fonte: Laboratório de dor e analgesia (UFMG).

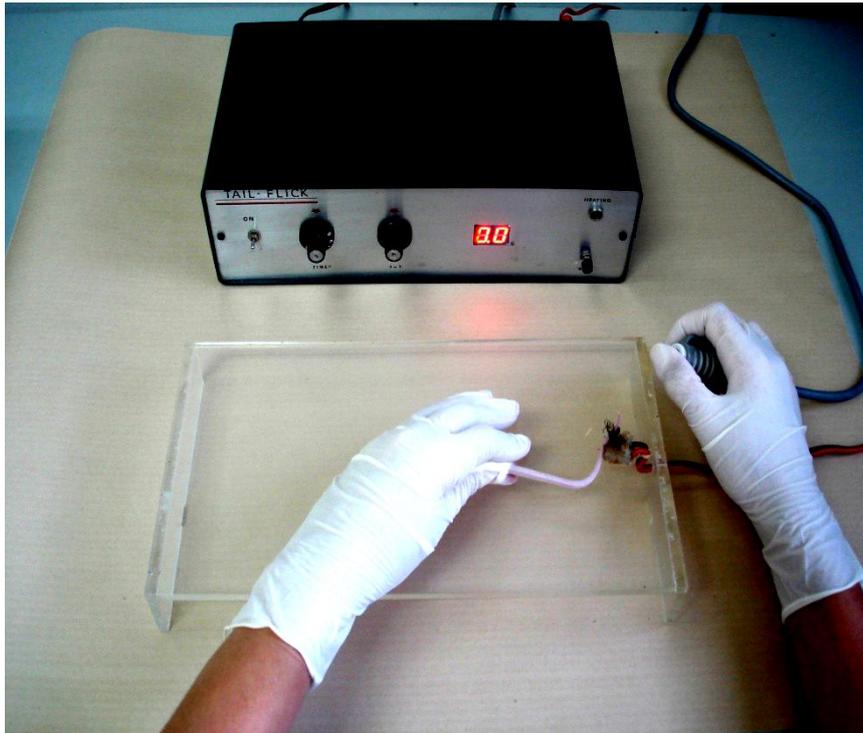


Figura 7 – Teste da retirada da cauda

Fonte: Laboratório de dor e analgesia. UFMG

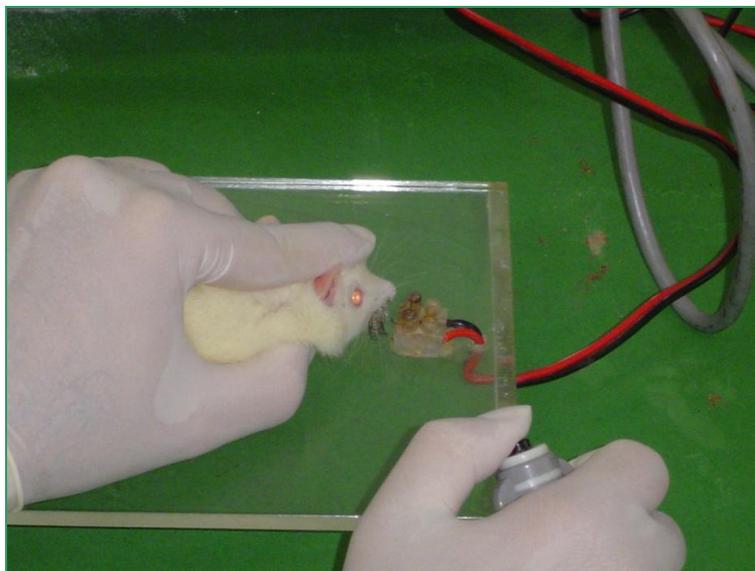


Figura 8 – Teste de retirada de face

Fonte: Laboratório de dor e analgesia. UFMG

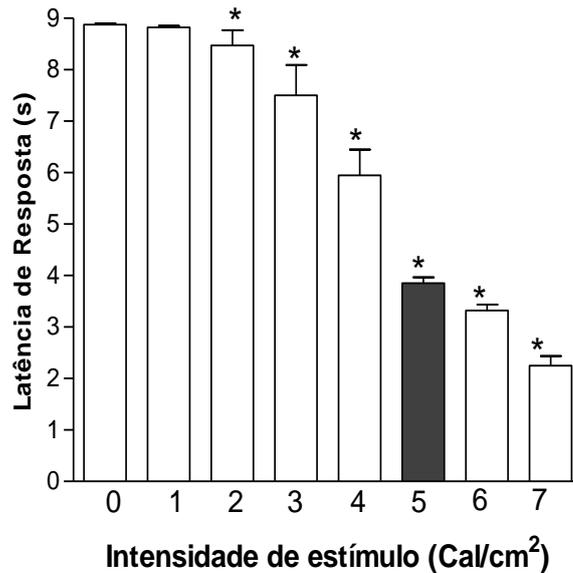


Gráfico 5 - Variação do tempo de retirada de cauda do animal frente ao aumento da intensidade do estímulo térmico. As colunas se referem ao tempo de latência de retirada de cauda frente aos diversos graus de intensidade permitidos pelo aparelho. Cada barra representa a média \pm E.P.M. Foi escolhida para os experimentos subseqüentes a intensidade 5. (para cada grupo experimental n=5).

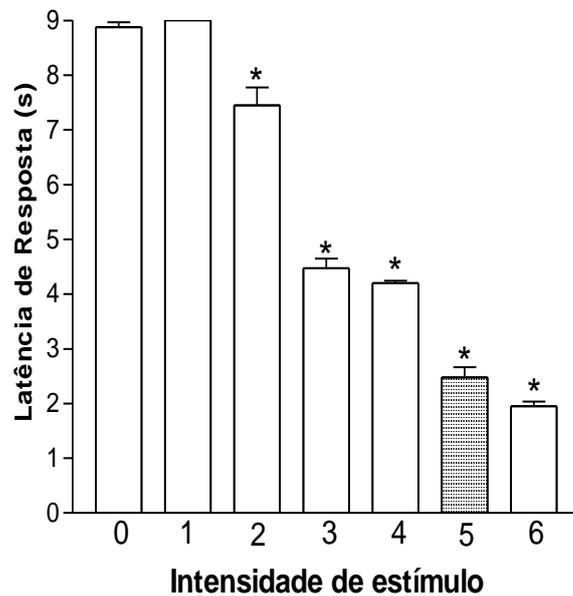


Gráfico 6 - Variação do tempo de retirada de face do animal frente ao aumento da intensidade do estímulo térmico. As colunas se referem ao tempo de latência de retirada de face frente aos diversos graus de intensidade permitidos pelo aparelho. Cada barra representa a média \pm E.P.M. Foi escolhida para os experimentos subseqüentes a intensidade 5. (para cada grupo experimental n=5).

3 – Dosagem de nitrito

3.1 – Coleta de plasma e líquido

Antes do início da coleta de plasma e líquido, os animais foram anestesiados com solução anestésica formada pela mistura de quetamina 10% (80 mg/kg) e xilazina 2% (16 mg/kg), injetada intraperitonealmente (i.p.) no volume de 1ml/kg. Ambas coletas foram realizadas imediatamente após o término dos protocolos de exercício e após um espaço de tempo referente ao grupo exercitado nos animais do grupo controle

Para a coleta de sangue, foi realizada a técnica de punção cardíaca. Nessa técnica o animal anestesiado é colocado em decúbito dorsal em uma superfície rígida, imediatamente após, o coração é localizado com o dedo indicador do experimentador, entre o quarto e o sexto espaço intercostal esquerdo, na região da linha axilar média. Percebido então os batimentos cardíacos nessa região, uma agulha heparinizada (40 x 90 mm, BD[®], Brasil) é introduzida perpendicularmente à parede torácica até o ventrículo esquerdo, a qual após ter penetrado no coração, sofre uma sucção leve pelo experimentador, resultando na coleta de um volume de sangue de aproximadamente 1 ml/min. Após a coleta, o sangue é depositado cuidadosamente em tubos (tipo Falcon) e imediatamente levado a uma centrífuga. O material é então centrifugado por 10 minutos (2000 rpm, 313.6 G) e logo após, o plasma é separado, armazenado em tubos de polipropileno (1,5 ml, EPPENDORF[®], Brasil) e transferido para um freezer a – 80° C.

O líquido foi coletado através de uma agulha (13 x 0,3 mm, BD[®], Brasil) introduzida dentro da cisterna magna, com os animais previamente anestesiados e

colocados em decúbito ventral. O volume retirado sempre é de aproximadamente 100 µl por animal (Nirogi *et al.*, 2009). Após a coleta, o material é acondicionado em tubos de polipropileno (0.5 ml, EPPENDORF[®], Brasil) e, imediatamente submetido à centrifugação por 5 minutos (6500 rpm, 2839.2 G). Logo após a centrifugação, as amostras também são armazenadas em freezer a – 80° C.

3.2 – Quantificação de nitrito

A quantificação de NO, tanto no líquor, quanto no plasma, é realizada de forma indireta através da dosagem de nitrito (NO_2^-), uma vez que o NO é instável quimicamente. Um dos métodos utilizados para a dosagem de nitrito é o ensaio colorimétrico pelo método de Griess. Esse método requer que o nitrato (NO_3^-) seja reduzido a NO_2^- , sendo essa determinada pela reação então denominada Griess. A redução enzimática de NO_3^- para NO_2^- requer a ação da enzima nitrato redutase, a qual executa a reação de forma satisfatória (Green *et al.*, 1982).

Para tal, cada amostra de 100 µl de plasma e 50 µl líquor foram adicionadas em uma placa de 96 poços e, então, incubada por 30 min a 37 °C na presença de 0,2 U/ml de *Aspergillus nitrato redutase*, 50 mM de HEPES, 5 M de FAD, e 0,1 mM de NADPH, totalizando um volume de 500 µl. Para a formação do branco, usado como controle, é adicionado 100 µl de solução de HEPES, ao invés do plasma/líquor. Então, após esse período, 5 µl de LDH (1500 U/ml) e 50 µl ácido pirúvico (100 mM) são adicionados a cada poço com o intuito de oxidar a reação dos nucleotídeos de piridina (NADPH à NADH) que é fortemente inibida pela reação de Griess. Assim, as amostras permaneceram incubadas por um período de 10 min a

37 °C. Em seguida, 50 µl da solução presente na reação anterior são transferidas para outra placa de 96 poços, a qual é adicionada 500 µl de cada um dos reagentes da reação de Griess (0,2% p/v de naftilenoetilenodiamina e 2% p/v de sulfanilamida em 5% v/v de ácido fosfórico) e incubada por 10 min a temperatura ambiente. Logo após, a absorvância é detectada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 543 nm.

4 - Medida da liberação de NO

Para detectar a produção de NO bem como sua liberação induzida pelo protocolo de exercício agudo de força na substância cinzenta periaqueductal (PAG) de ratos Wistar, foi utilizado o indicador de NO diacetato 4-amino-5 metilamino-2'7'-difluoresceína (DAF-FM DA) (Brown *et al.*, 1999). O DAF-FM diacetato é um marcador permanente de NO, sendo permeável e difundido passivamente através das células, onde será diacetilado por esterases intracelulares resultando em DAF-FM. Este composto reage com o NO na presença de oxigênio (O₂) formando o produto benzotriazol fluorescente. Ele não reage com outras espécies reativas de oxigênio nem com formas oxidadas estáveis de NO.

Desse modo, com o objetivo de investigar se os protocolos de exercício estimulam a liberação de NO, previamente ao exercício (10 min) foram injetados 5 µl (i.c.v.) de DAF-FM nos animais exercitados e não exercitados (controle) e, imediatamente após o exercício, os animais foram profundamente anestesiados com quetamina 10% (80 mg/kg) e xilazina 2% (16 mg/kg). Em seguida e depois de verificada a perda completa dos reflexos palpebral, corneal e interdígital, os animais foram perfundidos intracardialmente, por meio de cânula inserida no ventrículo esquerdo,

com solução de salina (NaCl; 0,9 %) seguida por solução de formaldeído (4 %). Após a rigidez muscular, os ratos foram decapitados e os cérebros removidos e armazenados, primeiramente em solução de formaldeído a 10 % por 24 h, e, em seguida, em solução de sacarose a 20% por mais 48 h. Após esse período, os cérebros foram congelados em OCT e seccionados (cortes de 45 μ m) em Criostato (Minotome Plus[®], IEC) a -20°C e, as fatias referentes à região da PAG (representadas pelo nível -7.44 mm do bregma), realizadas de acordo com os cortes demonstrados pelo diagrama do atlas de Paxinos & Watson (1998). Posteriormente as fatias foram colocadas em lâminas e suas imagens foram realizadas e fotografadas através de um microscópio de fluorescência (NIKON ECLIPSE 50i[®], USA) composto por um filtro fluoresceína (excitação azul, 495 nm; emissão verde, 510 nm). A intensidade da fluorescência (pela fração da área e densidade integrada), a qual se correlaciona com quantidade de geração de NO, foi quantitativamente determinada usando o *software* de análise *ImageJ* (NH IMAGE[®], USA).

5- Determinação da expressão protéica dos receptores α 2C noradrenérgico e canabinóide CB1 pela análise de Western blot.

Imediatamente após os protocolos de exercício, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e seus respectivos cérebros foram retirados e homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo Turrax (MARCONI[®], Brasil) em tampão RIPA de lise e um *cocktail* de inibidores de proteases (SIGMA FAST[®], Sigma). Então, foi utilizada a proporção de 200 mg de tecido cerebral para 500 μ l de tampão de lise

enriquecido. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi aliquotado em tubos de polipropileno (1,5 ml, EPPENDORF[®], Brasil) e congelado a -80°C para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Posteriormente, as amostras foram então diluídas em tampão de amostra (4X TRIS HCl/SDS pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% β -mercaptoetanol, Azul de Bromofenol). Para a separação, foram aplicados 50 μ g de proteína em gel de SDS-PAGE (sodio dodecil (lauril) sulfato-poliacrilamida). Para o gel de separação, é utilizado poliácridamida em concentração de 7,5% e 4%.

Desse modo, após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (MILLIPORE[®], USA) com poro de 0,45 μ m de diâmetro. A qualidade da transferência é monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% com 2,5% de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* com o anticorpo primário específico. Os seguintes anticorpos primários utilizados foram: α 2C – AR (C-15): sc- 30439 (SANTA CRUZ[®], USA); CB1R-ab75165 (ABCAM[®], USA).

Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0.3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:2000, anti-goat IgG-HRP e anti-rabbit IgG-HRP, SANTA CRUZ[®], EUA). Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). Então, as bandas protéicas de interesse (53-60 kDa) foram detectadas por uma reação de quimioluminescência

(kit ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) de acordo com a intensidade da densidade óptica de imunorreatividade através do software *ImageJ*TM. Foram utilizados no processo de corrida e transferência o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, ambos da BIO-RAD[®], USA.

6 - Imunofluorescência para receptores CB1 and c-FOS

Com a finalidade de mostrar a presença da co-localização de receptores CB1 e c-FOS na PAG foi realizado ensaio de imunofluorescência em fatias contendo as regiões dorso e ventrolateral da PAG como recentemente descrito por Casarotto *et al.* (2012) (Casarotto *et al.*, 2012). Duas horas após o término dos protocolos de exercício, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uretana (25%, 5 ml/Kg) e perfundidos transcardiacamente com salina e paraformaldeído (PFA 4%) tamponado em tampão fosfato a 0,1 M (PBS, pH 7,4). Os animais controle (não exercitados) permaneceram no biotério até o momento da anestesia e o procedimento da anestesia foi como descrito anteriormente. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e fixados por 2 horas em PFA 4% e estocados por 30 horas em solução de sacarose para crioproteção. Após esse período, secções coronais referentes às regiões da PAG foram obtidas em criostato (cortes de 25 µm) a -16 °C e lavadas em PBS 0.01 M. Logo em seguida, as secções foram incubadas em glicina 0.1 M, lavadas novamente e incubadas por 1 hora em soro bovino a 5% (BSA, SIGMA[®], USA) e PBS 0.01 M, pH 7.4 contendo Triton X-100 (0.3%). Posteriormente, as secções foram incubadas por 2 dias em temperatura ambiente em uma mistura com anticorpo primário policlonal de cabra anti-CB1 (diluído 1:200, SANTA CRUZ[®], USA) e anticorpo primário policlonal de coelho anti-Fos (1:2000,

SANTA CRUZ[®], USA) diluída em PBS 0.01 M contendo BSA a 5% e Triton X-100 a 0.3%. Após a incubação com os anticorpos primários, as secções foram lavadas em PBS e incubadas por 1 hora em uma mistura com anticorpos secundários anti-coelho (Alexa 594, 1:1000, MOLECULAR PROBES[®], USA) e anti-cabra (Alexa 488, 1:1000, MOLECULAR PROBES[®], USA). Logo em seguida, as secções foram lavadas em PBS e transferida para as lâminas, utilizando-se como meio de montagem Fluomount-G (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES[®],USA). As imagens das secções foram então obtidas primeiramente usando um microscópio (Olympus BX50, USA) através de um sistema computadorizado de imagem (Image Pro-Plus 4.0, MEDIA CYBERNETICS, USA). As lâminas foram excitadas por laser de argônio a um comprimento de onda de 488 nm e por um laser de He-Ne a um comprimento de onda de 543 nm, respectivamente. As emissões da fluorescência foram separadas por um espelho dicróico em 570 nm usando um filtro de banda única de 510-540 nm para Alexa 488 (canal verde) e de 560-600 nm para o Alexa 546 (canal vermelho). Os canais verdes e vermelhos foram então unidos digitalmente pelo software Olympos Fluoview e as imagens foram exportadas para o formato TIF.

A identificação da dupla marcação das células foi similar a descrita em recentes trabalhos (Aguiar & Guimaraes, 2009; Beijamini & Guimaraes, 2006). O número de células com imunoreatividade para c-FOS e para receptores CB1 e a dupla marcação de ambos foram manualmente contados com o auxílio de um sistema de imagem computadorizado (ImageJ, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH[®], USA). A análise foi realizada de forma cega por um pesquisador. Para cada experimento 2 secções de cada animal foram analisadas. Os sítios neuroanatômicos foram identificados com o auxílio do atlas de Paxinos & Watson (1986). A localização

Antero-posterior ao bregma das regiões analisadas foram as seguintes: porção rostral contendo as regiões dorso e ventrolateral da PAG, encontradas na posição 7.44 mm do bregma.

7- Análise dos níveis de endocanabinóides por cromatografia gasosa-espectrometria de massa

Dentre os métodos de análise química, a cromatografia gasosa é um dos mais empregados, encontrando aplicações nos mais variados ramos da pesquisa científica e tecnológica, devido à capacidade que possui de separar espécies químicas, de forma seletiva e específica. Após a separação das moléculas foi aplicado a espectrometria de massa, método para identificar os diferentes [átomos](#) que compõem uma [substância](#). Um [espectrômetro](#) de massa bombardeia átomos eletricamente carregados. Os íons atravessam um [campo magnético](#) que curva suas trajetórias de modos diferentes, dependendo de suas massas. O campo separa os íons em um padrão, o chamado espectro de massa. A massa e a carga dos íons podem ser medidas por sua posição no [espectro](#), sendo então identificadas.

As amostras de plasma foram coletadas imediatamente após a realização de ambos os protocolos de exercício. A técnica de coleta dessas amostras foi a mesma descrita previamente para a dosagem de nitrito.

Posteriormente, as amostras foram congeladas, extraídas e lavadas com clorofórmio/Etanol (2:1) por três vezes, e então purificadas pela cromatografia de seqüência aberta em câmara de sílica e pela cromatografia líquida normal feita em

fase alta, descrita por De Petrocellis *et al.* (1999). Em seqüência, as amostras foram submetidas a cromatografia gasosa-espectrometria de massa por impacto de elétrons e tiveram os endocanabinóides (anandamida (AEA), 2-araquidonilglicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) e oleoiletanolamida (OEA)) quantificados por um processo de diluição isotópica (De Petrocellis *et al.*, 1999).

Os protocolos de exercício e a coleta das amostras de plasma foram realizados e obtidos em nosso laboratório. Em seguida, essas amostras foram enviadas e então processadas no *Istituto di Chimica Biomolecolare* em Pozzuoli (Nápoles, Itália), sob a supervisão do professor Vincenzo Di Marzo.

8 - Drogas, doses e/ou concentrações e soluções

- **AM 251** (N-(peperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pitazole-3-carboxamida) (TOCRIS[®] - USA): Antagonista para o receptor CB1. Diluído em solução salina (0,9%) com 20% de DMSO.

- 2,0; 4,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
- 30,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
- 3,0; 6,0 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).

- **AM 630** (6-iodo-2-metil-1-[2-(morfolinil)etil]-1H-iodol-3-il(metoxifenil)metanona) (TOCRIS[®] – USA): Antagonista para receptores CB2. Diluído em solução salina (0,9%) com DMSO (20%).

- 4,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
- 10,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);

- 5,0 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).
- **MAFP** (ácido metil araquidonil fluorfosfano/(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-5, 8, 11, 14-eicosatetraenil-metil ester fosfofluorídrico) (TOCRIS[®] - USA): Inibidor de anandamida amidase. Diluído em salina (0,9%) com 2,5% de etanol anidro.
- 2,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
 - 10,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
 - 0,2; 0,4 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).
- **JZL 184** 4-[Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)hidroximetil]-1-piperidinecarboxílico ácido 4-nitrofenil éster (TOCRIS[®] - USA): inibidor da monoacilglicerol lipase. Diluído em salina (0.9%) com DMSO (20%).
- 4 mg/kg - via subcutânea (s.c.);
 - 7,0 µg/10,0 µl - via intratecal (i.t.);
 - 7,0 µg/5 µl - via intracerebroventricular (i.c.v.).
- **VDM 11** ((5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-N-(4-hidroxi-2-metilfenil)-5, 8, 11, 14-eicosatetraenamida (TOCRIS[®] - USA): Inibidor da recaptação de anandamida. Diluído em Tocrisolve (solvente produzido pela TOCRIS[®]).
- 5,0; 10,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
 - 10,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
 - 10,0 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).
- **NOArg** (N-nitro-L-arginine) (RBI[®], USA): Inibidor inespecífico para NOS. Diluído em solução salina (0,9%).
- 2,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);

- 50,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
- 10,0 µg/5 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).

- **Aminoguanidina** (SIGMA[®], USA): Inibidor específico da iNOS. Diluído em solução salina (0,9%).

- 2,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
- 10,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
- 10,0 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).

- **L-NIO** (dihidroclorido de N⁵-(1-iminoetil)-L-ornitina) (SIGMA[®], USA): Inibidor específico da eNOS. Diluído em solução salina (0,9%).

- 2,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
- 10,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
- 10,0 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).

- **L-NPA** (N-propil-L-arginina) (CAYMAN[®], USA): Inibidor específico da nNOS. Diluído em solução salina (0,9%).

- 2,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
- 10,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
- 10,0 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).

- **ODQ** (1H-[1, 2, 4]oxidiazole[4, 3-a]quinoxalina-1-ona) (TOCRIS[®], USA): Inibidor da guanilil ciclase. Diluído em solução de salina com DMSO a 10%.

- 2,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
- 4,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
- 10,0 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).

- **Glibenclamida** (SIGMA[®], USA): Bloqueador de canais para potássio ATP sensíveis (K^+_{ATP}). Diluído em solução de salina com Tween 1%.

- 2,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
- 10,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
- 10,0 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).

- **loimbina** (TOCRIS[®], USA): Antagonista para o receptor α_2 noradrenérgico. Diluído em solução salina (0,9%).

- 4,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.);
- 5,0; 10,0 µg/10,0 µl – via intratecal (i.t.);
- 30,0; 60,0 µg/5,0 µl – via intracerebroventricular (i.c.v.).

- **Rauvolscina** (TOCRIS[®], USA): Antagonista para o receptor adrenérgico do tipo α_2C . Diluído em salina (0,9%).

- 4,0; 8,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.).

- **BRL 44408** (TOCRIS[®], USA): Antagonista para o receptor adrenérgico do tipo α_2A . Diluído em salina (0,9%).

- 4,0 mg/kg – via subcutânea (s.c.).

- **Guanetidina**: (SANTA CRUZ[®], USA): inibidor seletivo da neurotransmissão noradrenérgica nos [nervos](#) pós-ganglionares. Acredita-se que atua principalmente prevenindo a liberação de [norepinefrina](#) das terminações nervosas, além de causar depleção periférica da norepinefrina nas terminações nervosas simpáticas, bem como em tecidos. Diluído em salina (0,9%).

- 30,0 mg/kg – via intraperitoneal (i.p)

Os animais que receberam essa droga foram pré-tratados por 3 dias anteriores ao dia do experimento.

As doses escolhidas de cada droga foram de acordo com resultados prévios obtidos no laboratório de dor e analgesia da UFMG.

9 - Vias de administração

As substâncias utilizadas nesse estudo foram administradas pelas seguintes vias:

9.1 - Via subcutânea (s.c.)

Para avaliação do efeito sistêmico, as drogas foram injetadas subcutaneamente, através de uma seringa hipodérmica com agulhas 13 x 0.4 mm (BD[®], Brasil), na região da nuca do animal no volume de 1 ml/kg. Para os grupos controle, foram administrados solução salina (0.9%), ou seu respectivo veículo diluente, no mesmo volume (1 ml/kg).

9.2 - Via intraperitoneal (i.p.)

Essa via também foi utilizada com o objetivo de avaliar o efeito sistêmico de algumas drogas. Para a injeção, os animais são colocados em decúbito ventral e, através de uma seringa hipodérmica com agulhas 13 x 0,4 mm (BD[®], Brasil), os fármacos são injetados na região abdominal, mais precisamente no quadrante inferior esquerdo. O volume das drogas injetado, em cada animal, é de 1 ml/kg. Os

grupos controle para essa via receberam o mesmo volume de solução salina ou veículo diluente.

9.3 - Via intratecal (i.t.)

A utilização da via intratecal foi com o objetivo de avaliar o possível envolvimento de alguns mediadores endógenos na antinocicepção induzida pelo exercício a nível medular. Previamente à administração das drogas, os ratos são depilados na região dorsal (lombar). Desse modo, a palpação dos espaços intervertebrais é facilitada e, após a sedação dos animais por inalação de isoflurano (3,5%) (CRISTÁLIA[®], Brasil) uma injeção é feita, no volume de 10 µl, através de uma agulha 13 x 0.3 mm acoplada a uma seringa hipodérmica (BD[®], Brasil) diretamente no espaço subaracnóide, entre a quinta e a sexta vértebra lombar (Mestre *et al.*, 1994). Esse volume foi o mesmo administrado, tanto para as drogas quanto para seus respectivos veículos diluentes.

9.4 - Via intracerebroventricular (i.c.v.)

A escolha dessa via (i.c.v.) foi com o intuito de investigar o envolvimento supra medular de alguns mediadores endógenos envolvidos na antinocicepção induzida pelo exercício. Para tal, foi previamente realizada a neurocirurgia estereotáxica descrita a seguir.

Essa cirurgia primeiramente baseia-se no deslocamento tridimensional de um ponto, obedecendo coordenadas determinadas, e que permite a projeção espacial

deste ponto (bregma), e a localização precisa de qualquer estrutura por ele representada. É usada quando se deseja atuar especificadamente sobre uma determinada estrutura encefálica. Para isso, a cirurgia é realizada com auxílio de um aparelho estereotáxico (STOELTING[®], USA).

Os ratos foram previamente anestesiados com uma solução contendo quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), injetada intraperitonealmente (i.p.). Imediatamente após anestesia, é realizada tricotomia da região superior da cabeça, a qual é posicionada e fixada no estereotáxico por meio de duas barras auriculares (Figura 9). Após assepsia da pele com solução contendo álcool iodado, o anestésico local lidocaína, contendo vasoconstritor, é injetado subcutâneamente na região do escalpo a ser aberta, a fim de evitar dor e reduzir possível sangramento. Em seguida, é realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana. A torre do estereotáxico é colocada em posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal ajustada até que os pontos bregma e lâmbda da calota fiquem nivelados. O ponto de introdução das cânulas-guia (16 mm), confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável (25 x 7 mm, BD[®], Brasil), direcionadas para o ventrículo lateral direito, foi determinado a partir do bregma levando em conta as coordenadas estereotáxicas obtidas com o atlas de Paxinos & Watson (1986), as quais são: -1,5 mm posterior ao bregma; -2,5 lateral ao bregma; e -3,3 inferior ao topo do crânio (Paxinos & Watson, 1986). Após a localização do ponto de inserção, é realizada a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício, foram introduzidas as cânulas-guia e, então, fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica de uso odontológico e de pequenos parafusos de

aço inox, os quais são fixados na calota craniana previamente às leituras das coordenadas estereotáxicas.

Após a completa fixação das cânulas-guia, a torre do estereotáxico é removida e, com o objetivo de evitar a obstrução das cânulas é introduzido nas mesmas um mandril de aço inoxidável (15 mm). Como medida profilática, após a cirurgia todos os animais receberam uma associação de antibióticos (0,2 ml de pentabiótico veterinário) por via intramuscular no músculo gastrocnêmio. Esses animais foram mantidos em caixas individuais, em sala com temperatura e luminosidade controladas, por um período de 5 dias anterior ao experimento.

As drogas e seus respectivos veículos diluentes foram injetados no ventrículo lateral direito, em um volume de 5 μ l. Para a administração foi utilizada uma seringa de precisão (Hamilton[®], USA) de 10 μ l, conectada a um tubo polietileno PE-10 (10 cm) e a uma agulha injetora (11 mm).



Figura 9 – Posicionamento do animal no aparelho estereotáxico.

9.4.1 - Análise histológica para confirmação das injeções

O posicionamento correto da cânula para a injeção intracerebroventricular no ventrículo lateral direito foi verificado após todos os experimentos, onde os animais foram profundamente anestesiados com xilazina 2% (0,2 ml / rato) e hidrato de cloral 1,5% (1,0 ml / rato). Em seguida e após a perda completa dos reflexos palpebral, corneal e interdigital, os animais foram perfundidos intracardicamente com solução de salina (NaCl; 0,9 %) seguida por solução de formaldeído (10 %). Após a rigidez muscular, os ratos foram decapitados e os cérebros removidos e armazenados, primeiramente em solução de formaldeído a 10 % por 24 h, e, em seguida, em solução de sacarose a 30% por mais 24 h. Após esse período, os cérebros foram seccionados (cortes de 50 µm) no Criostato (Minotome Plus, IEC), colocados em lâminas gelatinizadas e a localização dos sítios das injeções era feita através de microscopia, comparando-se a à região contralateral (Figura 10).

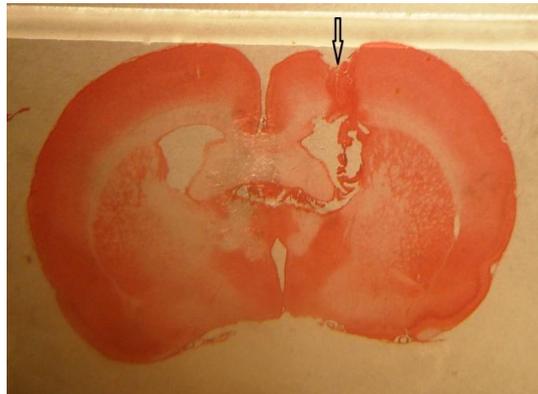


Figura 10 - Representação da incisão no ventrículo lateral direito pela cânula guia.

10 - Procedimento experimental

Em todos os experimentos, primeiramente foi realizada a medida basal do limiar nociceptivo em cada teste nociceptivo, antes do início de cada protocolo de exercício e da administração de cada droga. As medidas foram sempre em

triplicatas, observando um intervalo mínimo de 10 segundos entre cada medida, sendo o resultado a média dessas medidas.

Os fármacos e/ou seus veículos diluentes foram sempre injetados dez minutos antes do início de cada protocolo de exercício, para os animais que receberam injeção por via sistêmica. No caso dos animais que receberam injeção por via i.t. ou i.c.v., o exercício foi iniciado imediatamente após a administração.

Assim, imediatamente após e a cada 15 min do término do exercício, foram realizadas novas medidas do limiar nociceptivo em cada animal, sendo a primeira medida realizada pelo teste de retirada de pata, seguida da medida no teste de retirada de cauda e do teste de retirada de face. Essas medidas foram mantidas enquanto perdurou o efeito antinociceptivo. O procedimento experimental está representado pela figura 11.

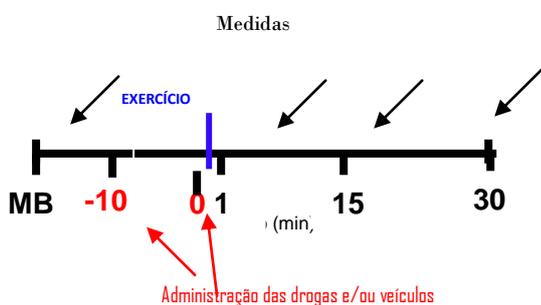


Figura 11 - Representação do procedimento experimental, MB: medida basal.

11 - Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm EPM. Para o tratamento estatístico dos dados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas, sendo considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$. O t -teste foi utilizado para os resultados obtidos através das análises de imunofluorescência e cromatografia gasosa-espectrometria de massa.

RESULTADOS

1- Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata.

Inicialmente, o gráfico 7A mostra que o protocolo de exercício agudo aeróbico produziu um significativo aumento ($p < 0,05$) no limiar nociceptivo frente ao estímulo mecânico de retirada de pata. Também podemos verificar que esse efeito perdurou aproximadamente 15 min, retornando aos níveis basais após 30 min do término do exercício.

Desse modo, sabendo que o protocolo de exercício aeróbico foi eficaz em produzir antinocicepção, o objetivo inicial dos experimentos foi verificar uma possível participação de ambos receptores para canabinóides (CB1 e CB2) nesse efeito.

Então, após o pré tratamento (10 min antes do início do exercício) com o antagonista para o receptor CB1 (AM 251; 2 e 4 mg/kg) e o antagonista para o receptor CB2 (AM 630, 4 mg/kg), o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício agudo aeróbico foi totalmente revertido ($p < 0,05$) (Gráficos 7A e 7B). Lembrando que, a dose de 2 mg/kg do AM 251 reverteu apenas parcialmente o efeito no primeiro minuto após o exercício aeróbico.

Também podemos verificar que o pré tratamento com o VDM 11, o inibidor da recaptação do canabinóide endógeno anandamida, na dose de 10 mg/kg, prolongou o tempo do efeito antinociceptivo ($p < 0,05$) induzido pelo exercício aeróbico de 15

min para 30 min. Contudo, a dose de 5 mg/kg não alterou a antinocicepção. Porém, a intensidade da ação antinociceptiva induzida pelo exercício não foi alterada pelo VDM 11 em animais controle (Gráfico 7C).

Sabendo-se que o MAFP e o JZL 184 são ferramentas farmacológicas utilizadas com o objetivo de inibir as enzimas responsáveis pela degradação da anandamida (FAAH) e do 2-AG (MGL), potencializando a antinocicepção (Ates *et al.*, 2003), nós utilizamos essas drogas nesse estudo com o intuito de investigar o envolvimento da anandamida e do 2-AG na antinocicepção produzida pelo exercício aeróbico. Além disso, estudos têm demonstrado que a FAAH também é responsável pela degradação de outros endocanabinóides como o PEA e o OEA (Matias *et al.*, 2007). Assim, o MAFP na dose de 2 mg/kg (s.c.) não potencializou o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício, mas o prolongou, passando de 15 min de duração para mais de 30 min ($p < 0,05$) (Gráfico 7D). Já, o JZL 184 (4 mg/kg) apenas potencializou esse efeito após 15 min do final do exercício. Lembrando que os veículos e as drogas não alteraram o limiar nociceptivo quando administrados separadamente em grupos controle (Gráfico 7D).

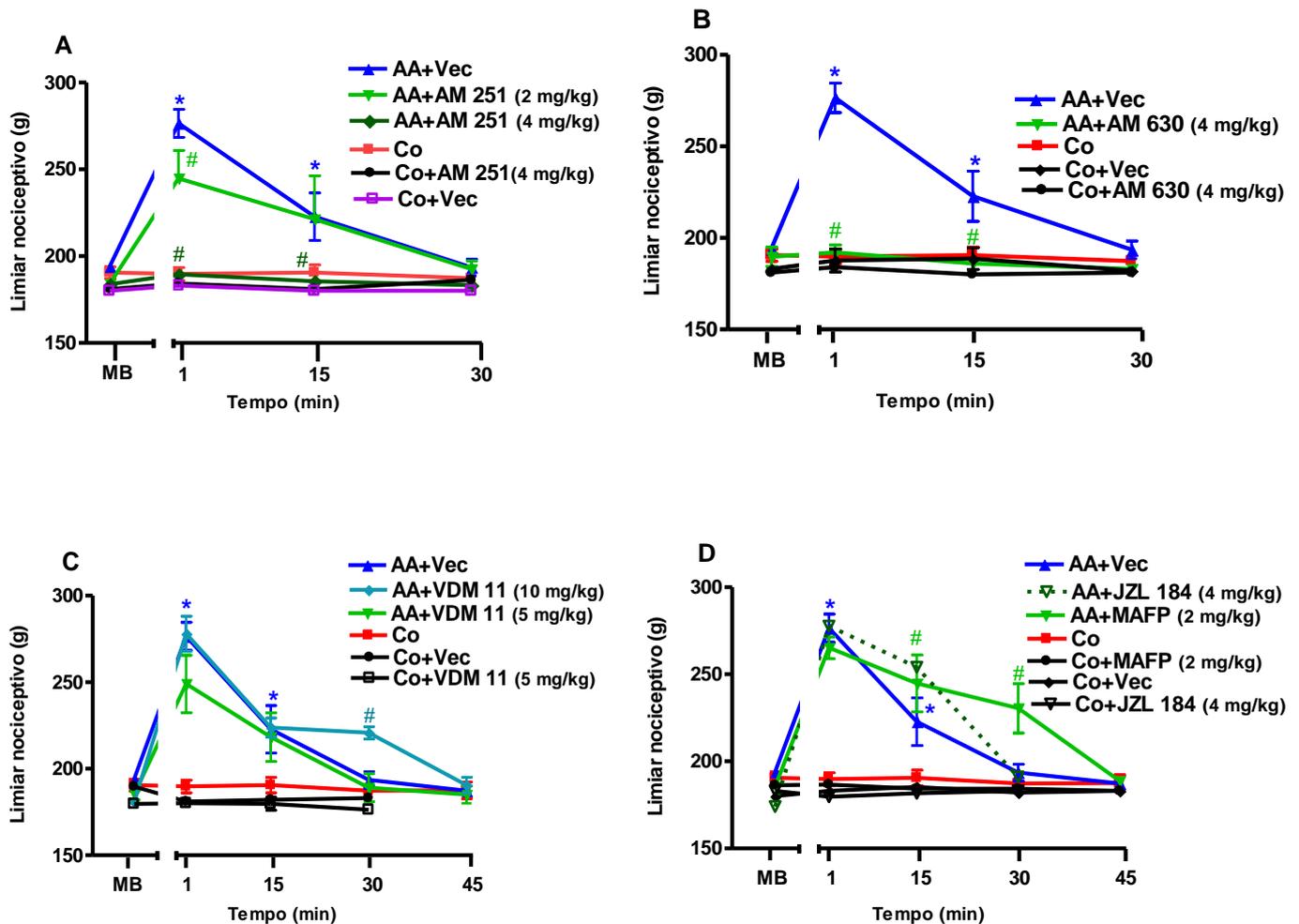


Gráfico 7 - Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptção da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 42.5 (± 3.0) min para os animais exercitados. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

2- Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda.

O teste de retirada de cauda é um importante modelo para avaliar e reproduzir uma resposta nociceptiva ou antinociceptiva a nível medular (D`amour & Smith, 1941). Nesse teste, o exercício agudo aeróbico também produziu antinocicepção, que foi revertida completamente ($p < 0,05$) pelos antagonistas AM 251 e AM 630, na dose de 4 mg/kg (Gráficos 8A e 8B). Porém, similar ao resultado encontrado no teste de retirada de pata, o AM 251 na dose de 2 mg/kg produziu apenas um efeito parcial, o qual foi demonstrado no primeiro minuto após o exercício (Gráfico 8A).

Os gráficos 8C e 8D mostram que o VDM 11 (5 mg/kg) e o MAFP (2 mg/kg) potencializaram ($p < 0,05$) após 30 min e prolongaram o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício de 15 min para 30 min. Também através do gráfico 8D podemos verificar que o JZL 184 (4 mg/kg) potencializou o efeito antinociceptivo encontrado após 15 min do término do exercício. Todas as drogas ou veículos quando administrados separadamente não alteraram o limiar nociceptivo do grupo controle.

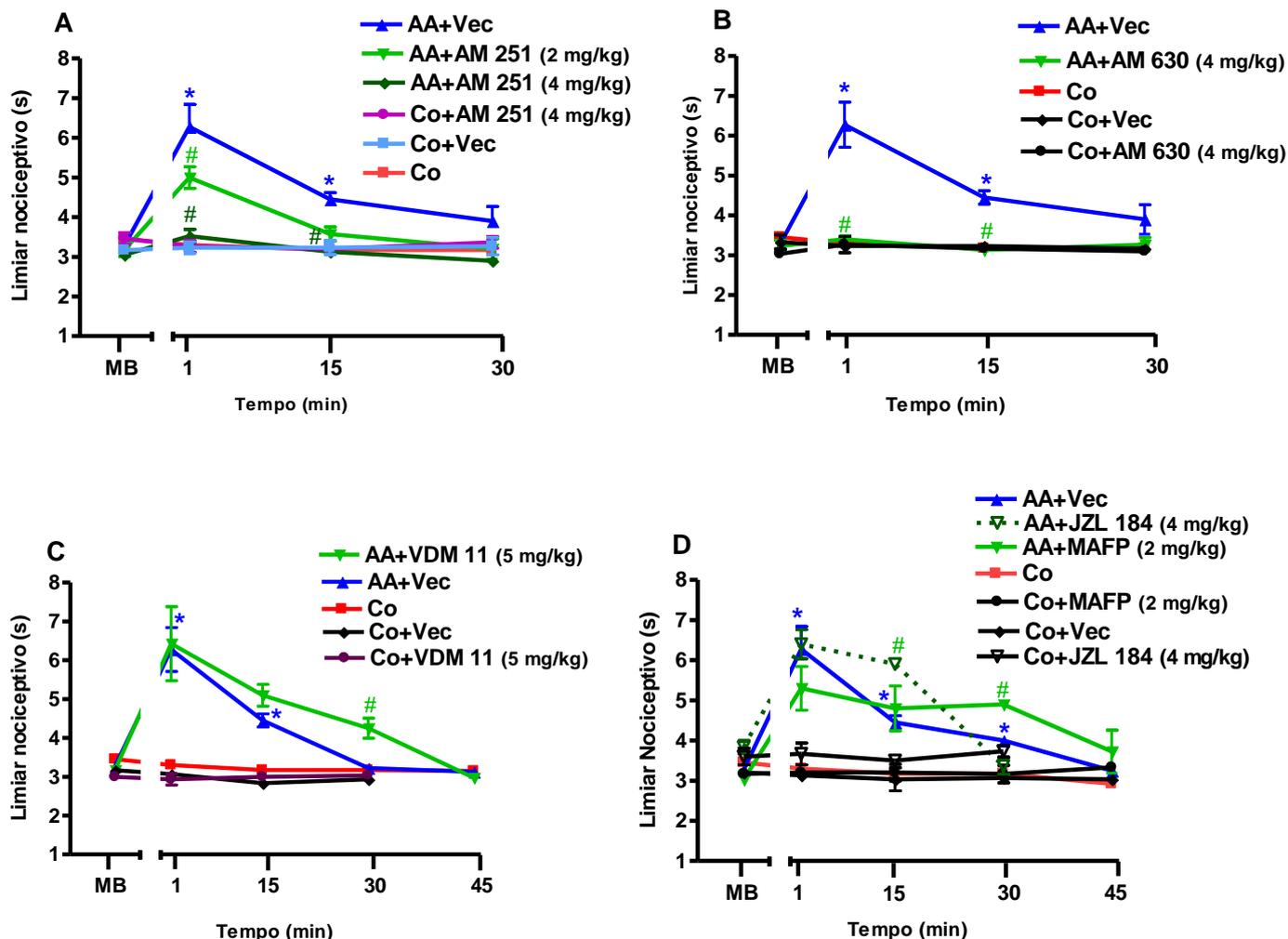


Gráfico 8 - Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptção da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da degradação da anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 39.5 (± 1.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

3- Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face.

Nesse teste, foi também podemos verificar uma significativa reversão ($p < 0,05$) da antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico após o pré tratamento com os antagonistas AM 251 (2 mg/kg) e o AM 630 (4 mg/kg) (Gráficos 9A e 9B).

O inibidor da recaptção da anandamida (VDM 11, 5 mg/kg) demonstrou tanto potencializar ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo do exercício 30 min após seu final quanto prolongá-lo de 15 min para 30 min (Gráfico 9C). Já o inibidor da degradação da anandamida (MAFP, 2 mg/kg) além de prolongar, potencializou esse efeito ($p < 0,05$) tanto após 15 min do exercício quanto após 30 min do seu término (Gráfico 9D). Um potencialização do efeito antinociceptivo 15 min após o exercício também foi verificado após o pré tratamento com JZL 184 (4 mg/kg) (Gráfico 9D). As drogas ou veículos utilizados separadamente não alteraram o limiar nociceptivo do grupo controle.

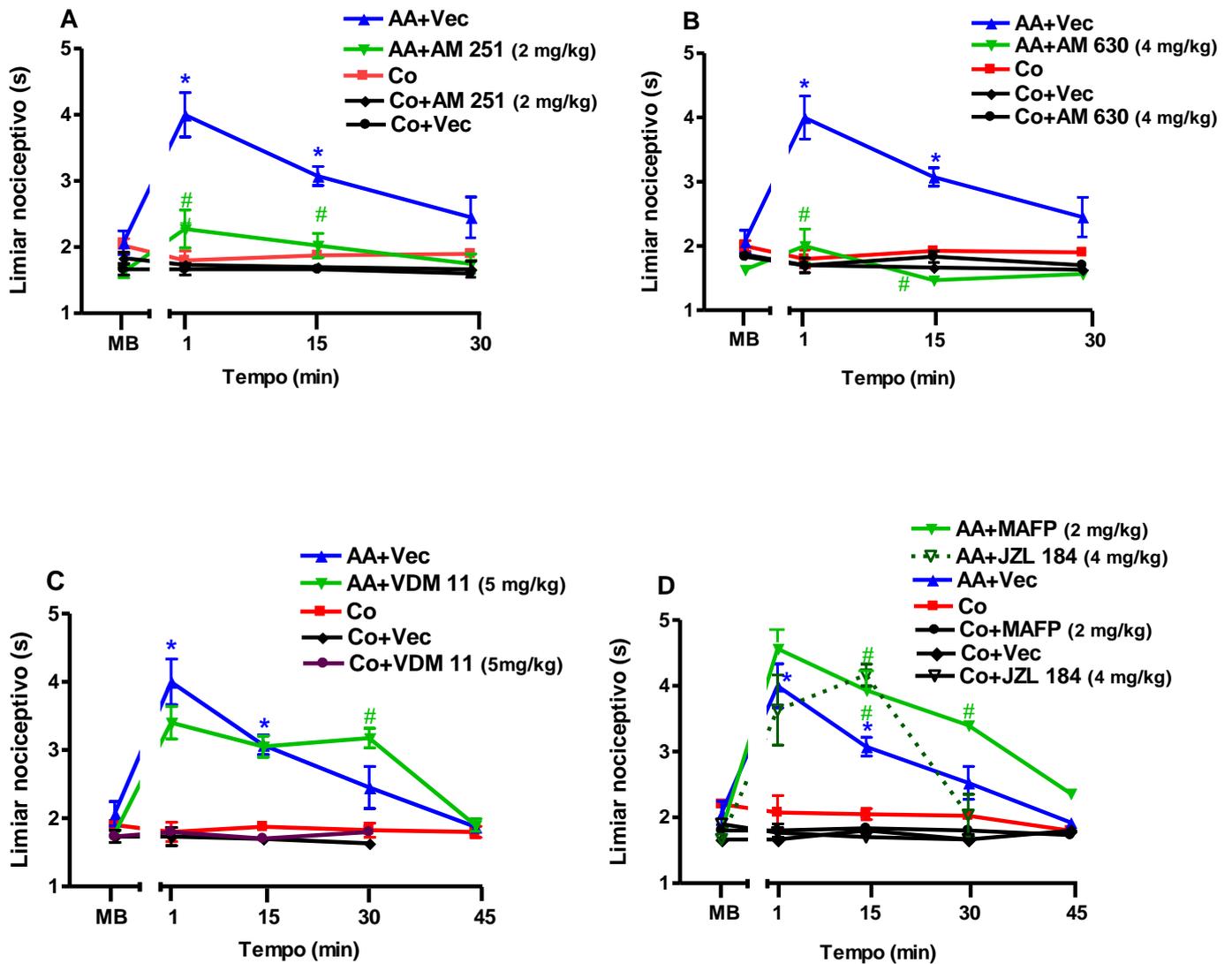


Gráfico 9 - Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptção da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 47.5 (\pm 3.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

4- Efeito da administração espinal (i.t.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata.

Sabendo da importância da medula em modular o impulso nociceptivo primário, podendo esse efeito resultar principalmente em analgesia (Millan, 1999), o presente estudo objetivou avaliar a participação do sistema de canabinóides endógenos na antinocicepção induzida pelo exercício a nível medular. Assim, ambos os antagonistas dos receptores e os inibidores da recaptação da anandamida e degradação da anandamida e do 2-AG foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício.

Dessa forma, o AM 251 (30 µg/10 µl) e o AM 630 (10 µg/10 µl) reverteram significativamente ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo induzido após o exercício aeróbico no teste de retirada de pata (Gráficos 10A e 10B).

No gráfico 10C podemos observar que o VDM 11 (10 µg/10 µl) não somente potencializou após 15 e 30 min, como também prolongou a antinocicepção de 15 para 30 min após o exercício. Através do Gráfico 10D também podemos observar que o MAFP (10 µg/10 µl) e o JZL 184 (7 µg/10 µl) prolongaram o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício de 15 para 30 min, além de intensificar esse efeito após o 30º min do final do exercício. A injeção isolada dessas drogas ou veículo não alterou o limiar nociceptivo em cada grupo controle.

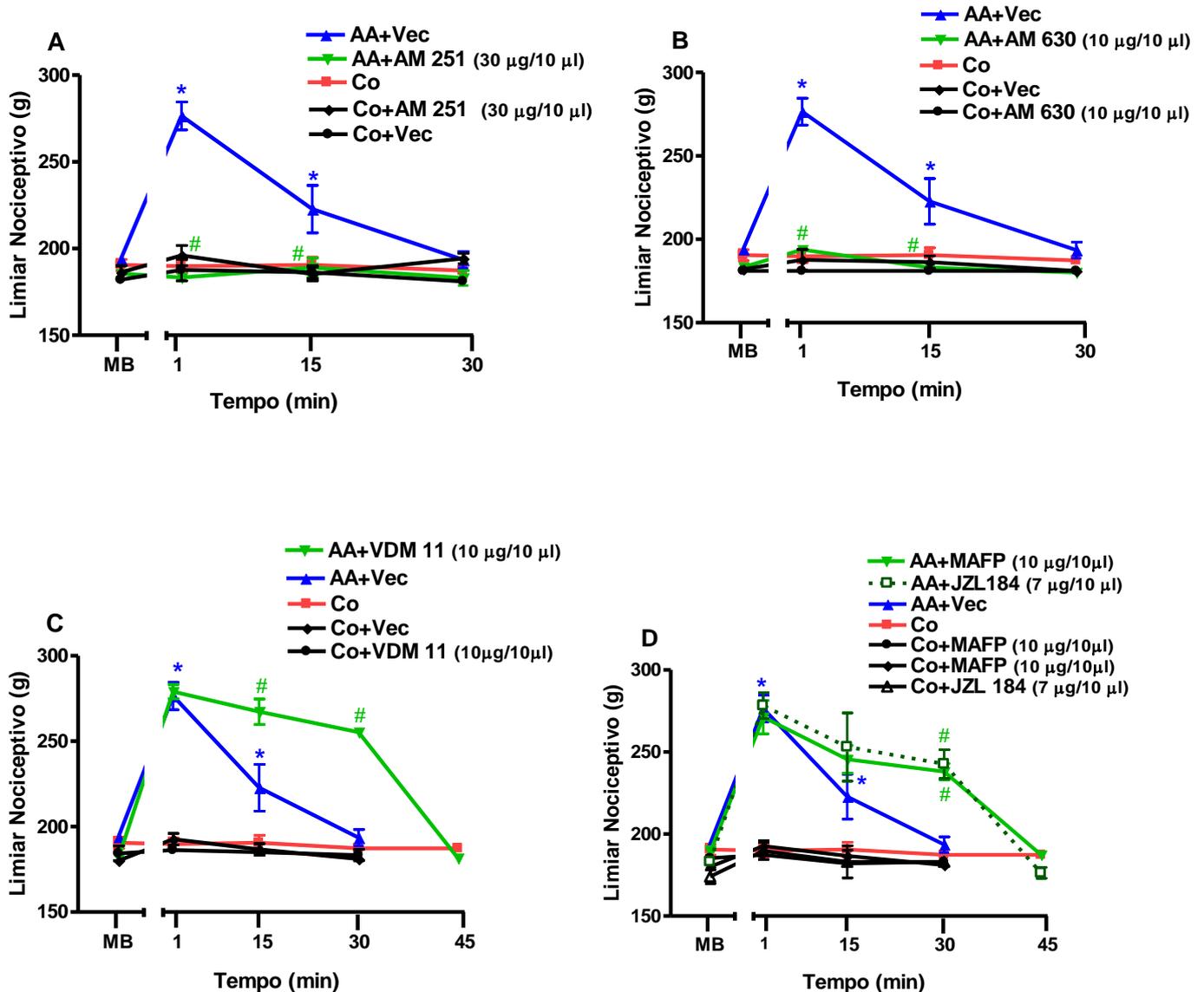


Gráfico 10 - Efeito da administração intratecal dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptação da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 44.0 (± 2.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5- Efeito da administração espinal (i.t.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda.

Os resultados dos gráficos 11A e 11B mostram que no teste de retirada de cauda a pré injeção do AM 251 na dose de 30 µg/ 10 µl reverteu ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício. Esse efeito também foi bloqueado pelo AM 630 na dose de 10 µg/10 µl.

Somando-se a esses resultados, o VDM 11 (10 µg/10 µl) e o MAFP (10 µg/10 µl) intensificaram significativamente ($p < 0,05$) a antinocicepção no período de 15 min após o término do exercício (Gráfico 11C e 11D). Já a pré injeção do JZL 184 (7 µg/10 µl) não somente potencializou o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício após 30 min do seu final, mas também prolongou esse efeito de 15 para 30 min (Gráfico 11D). Nenhuma dessas drogas ou veículo alteram o limiar nociceptivo de cada grupo controle.

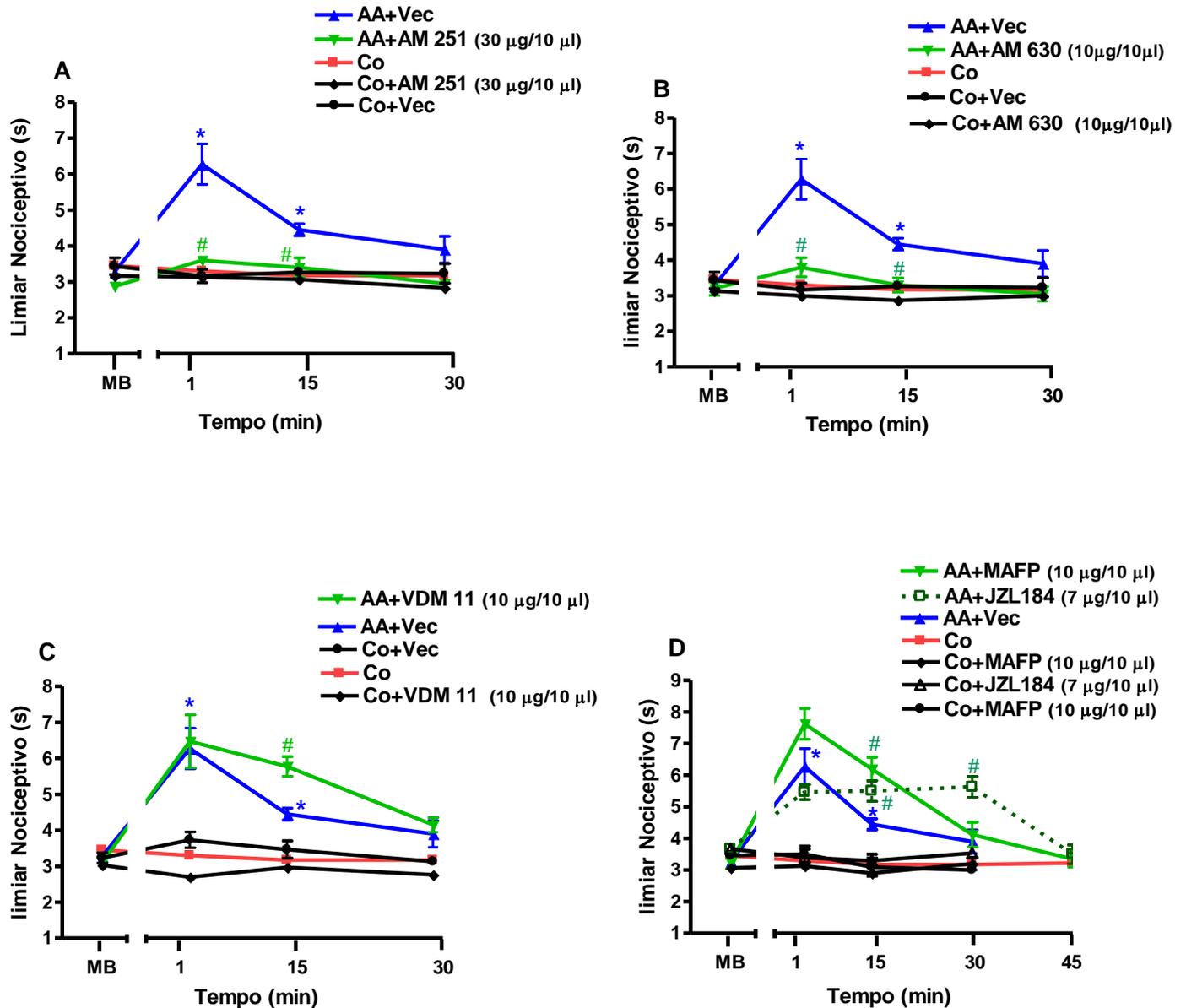


Gráfico 11 - Efeito da administração intratecal dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptção da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 45.0 (± 4.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica e significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

6- Efeito da administração espinal (i.t.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face.

O efeito antinociceptivo induzido pelo exercício agudo aeróbico foi significativamente revertido ($p < 0,05$) tanto pelo antagonista CB1 (AM 251, 30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) quanto pelo antagonista CB2 (AM 630, 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), ambos injetados antes do início do exercício (Gráficos 12A e 12B).

Reforçando a participação do sistema canabinóide, verificamos que o pré tratamento com o inibidor da recaptção da anandamida, o VDM 11 (10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), aumentou o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício, especificamente 15 min do seu final (Gráfico 12C).

Além disso, o MAFP (inibidor da degradação da anandamida, 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), potencializou significativamente ($p < 0,05$) a antinociceção encontrada imediatamente após o exercício aeróbico, enquanto o JZL 184 (7 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) prolongou esse efeito aos 15 min (Gráfico 12D).

Quando administradas isoladamente no grupo controle, essas drogas ou veículos não modificaram o limiar nociceptivo apresentado pelos animais controle.

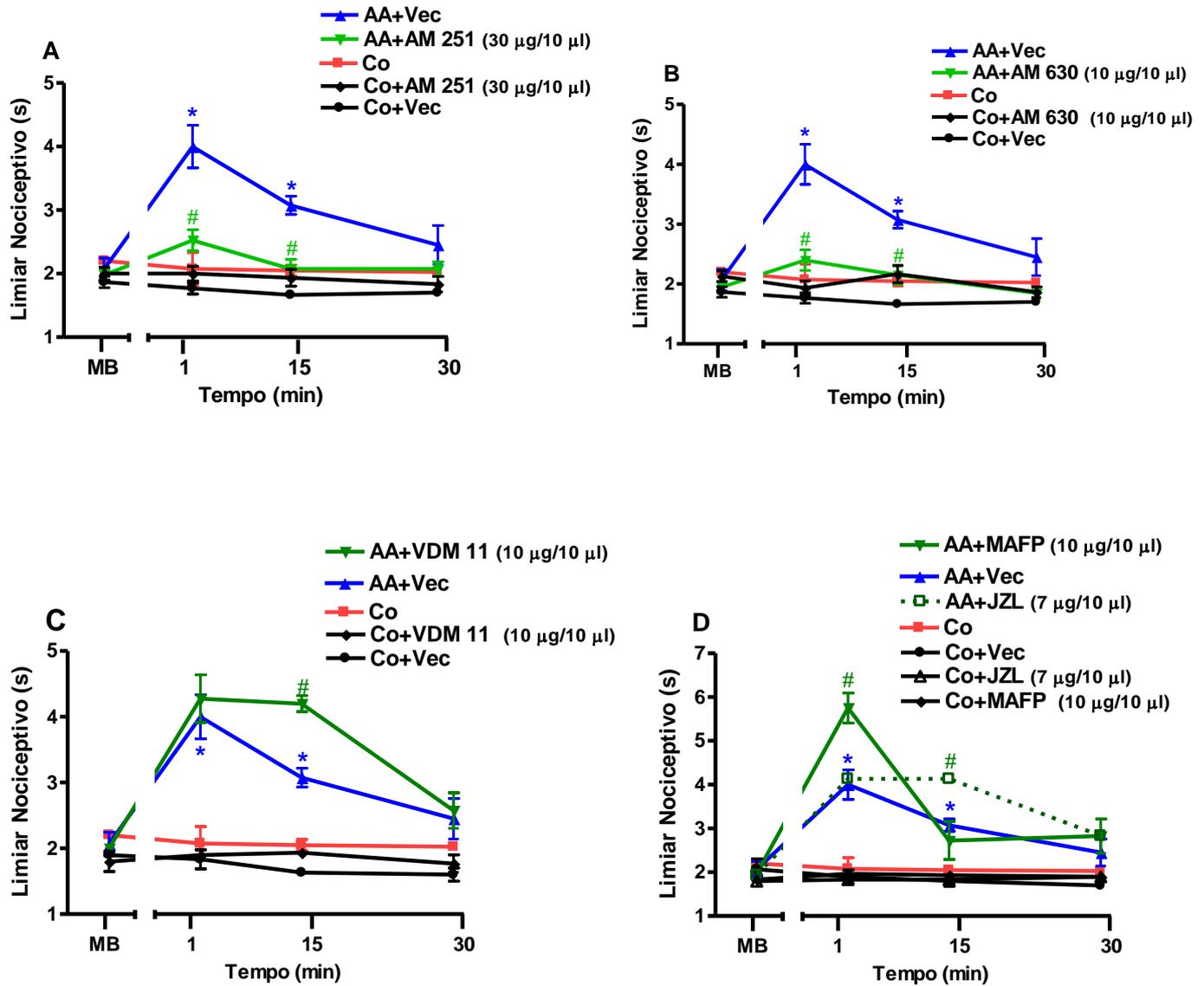


Gráfico 12 - Efeito da administração intratecal dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptação da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 46.0 (± 1.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

7- Efeito da administração supraespinal (i.c.v.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata.

Depois de ter constatado um possível envolvimento do sistema canabinóide na antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico a nível espinal, o intuito do presente estudo foi verificar se essa participação também ocorreria supraespinalmente.

Nesse sentido, as drogas foram injetadas intrecerebroventricularmente (i.c.v.) imediatamente antes do início do exercício aeróbico. Assim, de acordo com os gráficos 13A e 13B podemos verificar que os antagonistas para os receptores canabinóides AM 251 (3 µg/5 µl) e AM 630 (5 µg/5 µl) bloquearam significativamente ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo encontrado após o exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata.

Além disso, o VDM 11 (inibidor da recaptção da anandamida, 10 µg/5 µl) injetado previamente ao exercício, não somente potencializou a antinocicepção após 15 e 30 min do exercício como também prolongou ($p < 0,05$) esse efeito de 15 min para 30 min (Gráfico 13C). Podemos observar também que o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico foi potencializado e prolongado de forma significativa ($p < 0,05$) pelo MAFP (0.4 µg/5 µl) e pelo JZL 184 (7 µg/5 µl). Esse efeito que retornava aos níveis basais após 30 min, após a pré injeção do MAFP e do JZL 184 retornou após 45 min (Gráfico 14D). Entretanto o MAFP na dose de 0.2 µg/5 µl não foi capaz de promover nenhuma modificação sobre o efeito do exercício.

A injeção i.c.v. dessas drogas ou veículos não produziu modificações no limiar nociceptivo do grupo controle no teste de retirada de pata.

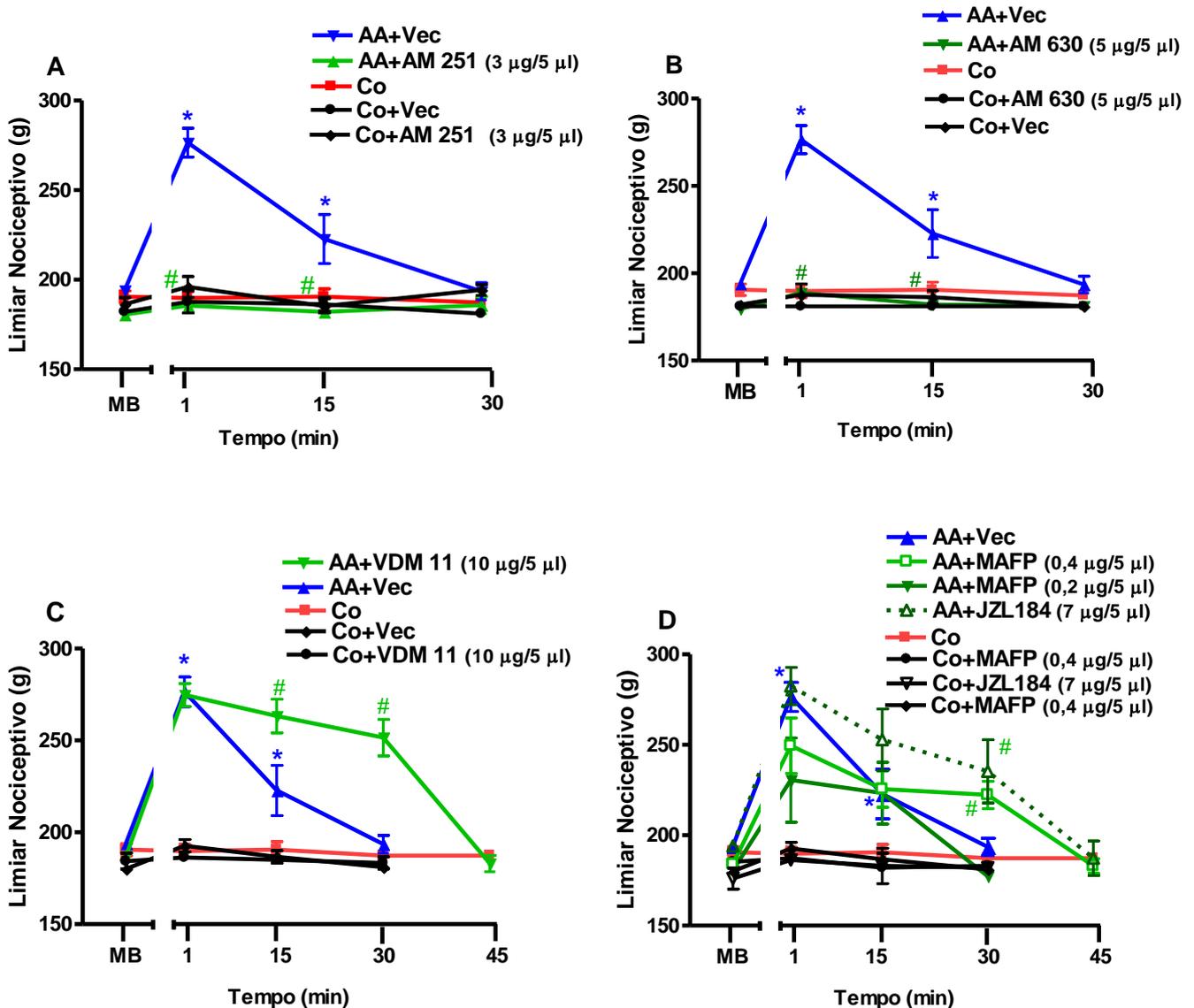


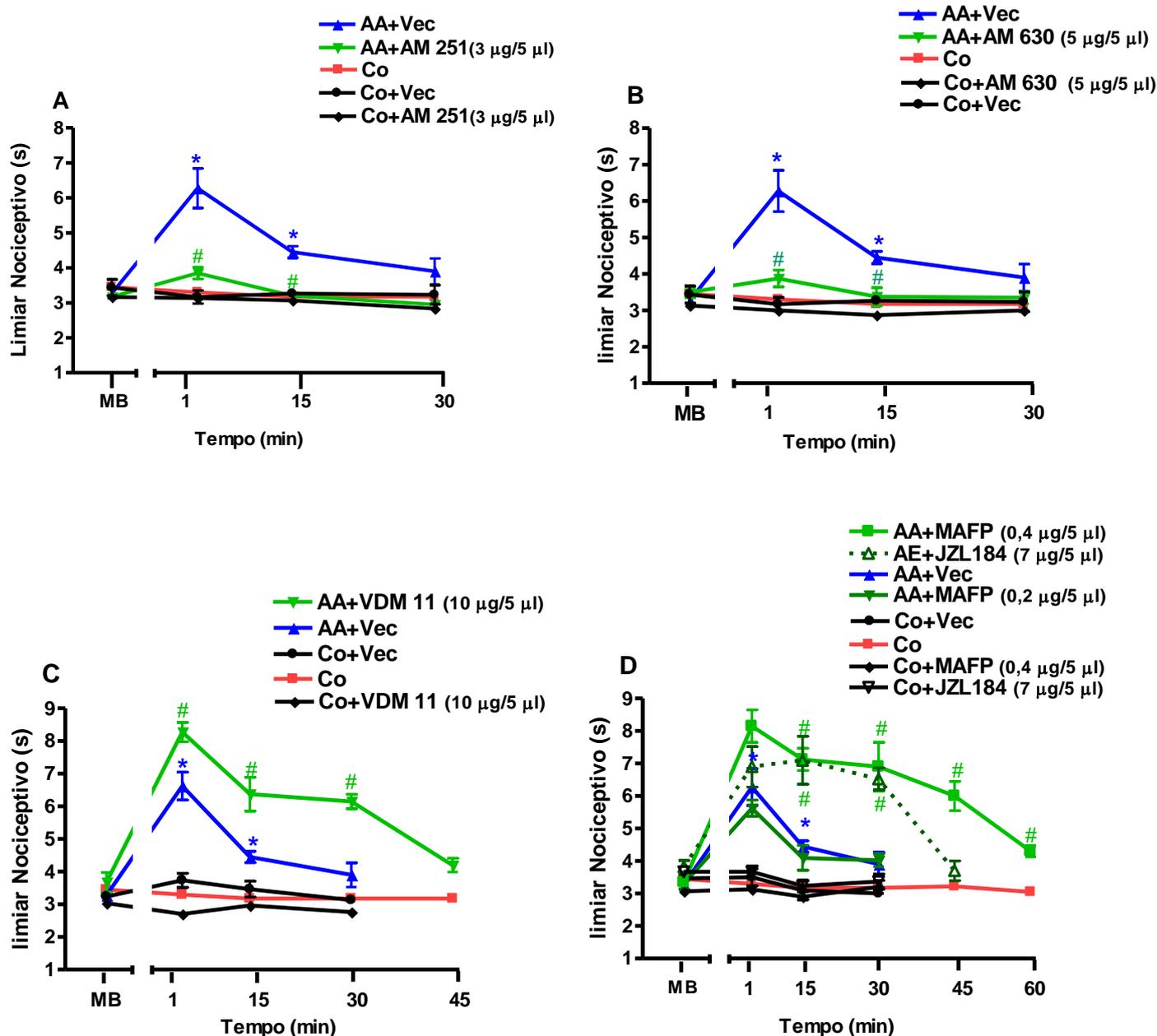
Gráfico 13 - Efeito da administração intracerebroventricular dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptação da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 44.0 (± 1.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

8- Efeito da administração supraespinal (i.c.v.) dos antagonistas para os receptores canabinoides e dos inibidores da recaptação anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda.

Como podemos observar nos gráficos 14A e 14B, o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício agudo aeróbico foi revertido ($p < 0,05$) pela pré injeção intracerebroventricular (i.c.v.) dos antagonistas para os receptores CB1 (AM 251, 3 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e CB2 (AM 630, 5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$).

Em adição, a pré administração do VDM 11 (inibidor da recaptação da anandamida, 10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) potencializou após 1, 15 e 30 min o efeito antinociceptivo encontrado após o exercício aeróbico. O VDM 11 também prolongou significativamente ($p < 0,05$) esse efeito para mais de 30 min (Gráfico 14C).

Outro resultado considerável foi demonstrado pelo inibidor da FAAH (MAFP, 0,4 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), o qual significativamente potencializou a antinocicepção nos intervalos de 15, 30, 45 e 60 min após o término do exercício. Além disso, o MAFP prolongou de forma significativa ($p < 0,05$) esse efeito de 15 para 60 min (Gráfico 14D). Em adição, a pré injeção i.c.v. do inibidor da MGL (JZL 184, 7 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) tanto potencializou esse efeito após 15 e 30 min como prolongou por até 30 min.



G
ráfico 14 - Efeito da administração intracerebroventricular dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptação da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 41.5 (4.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

9- Efeito da administração supraespinal (i.c.v.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face.

Os gráficos 15A e 15B mostram que o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico no teste de retirada de face frente foi revertido de maneira significativa ($p < 0,05$) pelos antagonistas para os receptores canabinóides o AM 251 (3 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e o AM 630 (5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$).

Também podemos observar que o VDM 11 na dose de 20 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ prolongou significativamente ($p < 0,05$) esse efeito antinociceptivo produzido pelo exercício aeróbico de 15 min para 30 min. Além disso, o VDM 11 potencializou a antinociceção no intervalo de 30 min após o exercício (Gráfico 15C). Entretanto, a dose de 10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ de VDM 11 não produziu nenhuma alteração nesse efeito.

Reforçando sobre a presença do sistema canabinóide nesse efeito, o MAFP (inibidor da FAAH, 0,4 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e o JZL 184 (7 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) prolongaram de maneira significativa ($p < 0,05$) a duração da antinociceção de 15 para 30 min e também potencializaram esse efeito 30 min após o exercício (Gráfico 16D). Contudo, a dose de 0,2 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ de MAFP não demonstrou eficácia.

Nenhuma droga ou veículo utilizado nesse experimento alterou o limiar nociceptivo do grupo controle quando administrados separadamente.

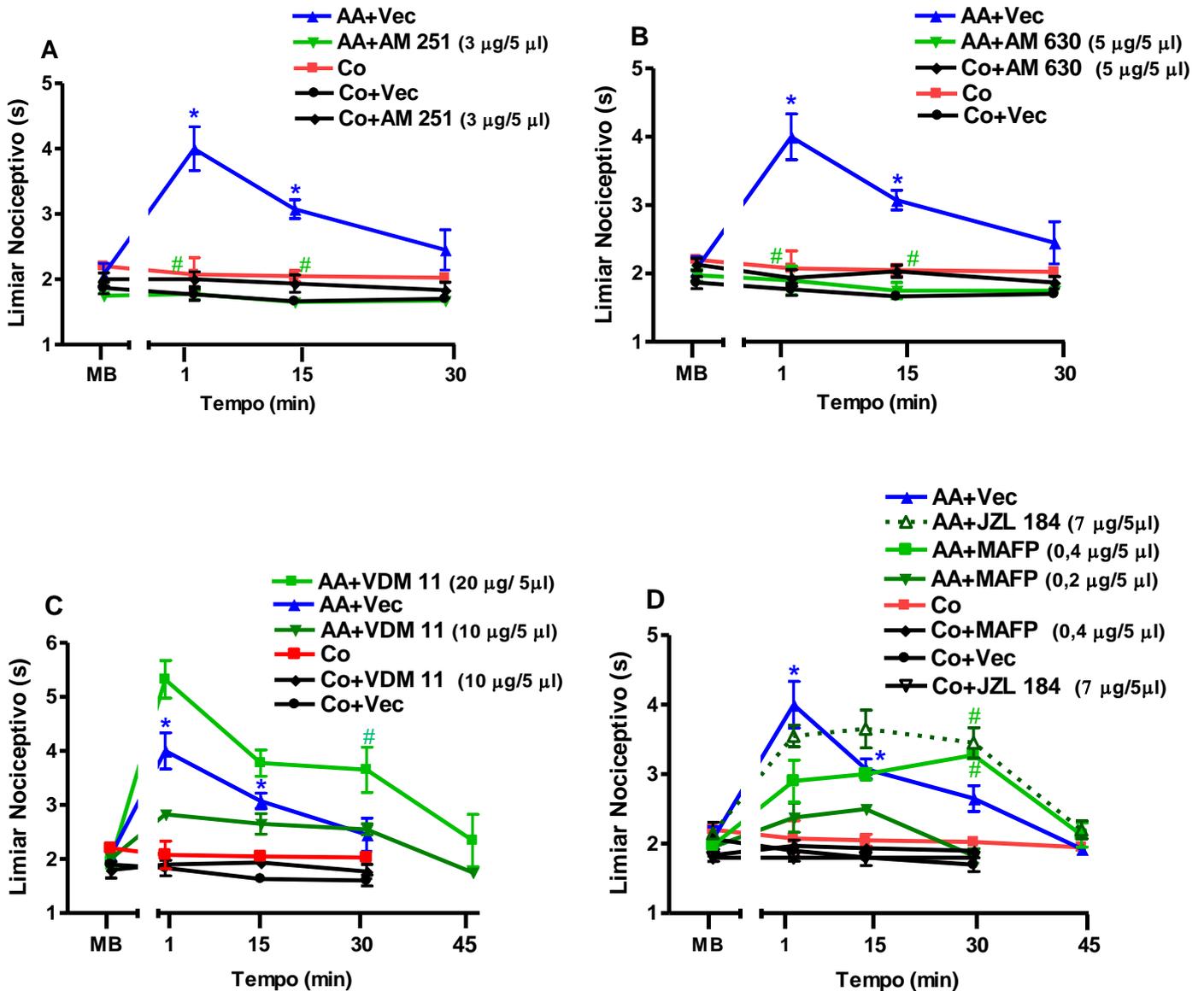


Gráfico 15 - Efeito da administração intracerebroventricular dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção de anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptção da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 48.0 (\pm 5.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica e significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

10- Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

A partir dos resultados anteriores, que mostraram a eficácia do exercício aeróbico em induzir antinocicepção, com o envolvimento do sistema endocanabinóide nesse efeito, procuramos verificar se o exercício de força também provocaria tal efeito.

Poucos estudos têm documentado o efeito analgésico do exercício de força. Entretanto, a maioria deles foi realizada em humanos e apenas um foi realizado em ratos, o qual investigou a influência do sistema de opióide endógeno (Anshel & Russel, 1994; Batholomew *et al.* 1996; Galdino *et al.* 2010b). Diante disso, o presente estudo demonstrou que protocolo de exercício agudo de força foi eficaz em aumentar de forma significativa ($p < 0,05$) o limiar nociceptivo, de tal modo que esse efeito retornou aos níveis basais após 15 min.

Nesse sentido, foi então também investigada uma provável participação do sistema de canabinóides endógenos nesse efeito. Assim, ambos antagonistas para os receptores CB1 (AM 251, 4 mg/kg) e CB2 (AM 630, 4 mg/kg) reverteram significativamente ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo produzido após o exercício de força no teste de retirada de pata (Gráficos 16A e 16B).

Somando ao prévio achado, o inibidor da recaptção da anandamida (VDM 11, 2,5 mg/kg) não apenas potencializou ($p < 0,05$) esse efeito nos intervalos de 1, 15 e 30 minutos após o exercício, como também prolongou ($p < 0,05$) de 1 para 30 min (Gráfico 16C).

Um resultado similar foi demonstrado pelo MAFP e pelo JZL 184, que potencializaram significativamente ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício de força, tanto imediatamente quanto após 15 min de seu término. Em adição, tais drogas (MAFP e JZL 184) aumentaram a duração do efeito de 1 para 15 min. (Gráfico 16D).

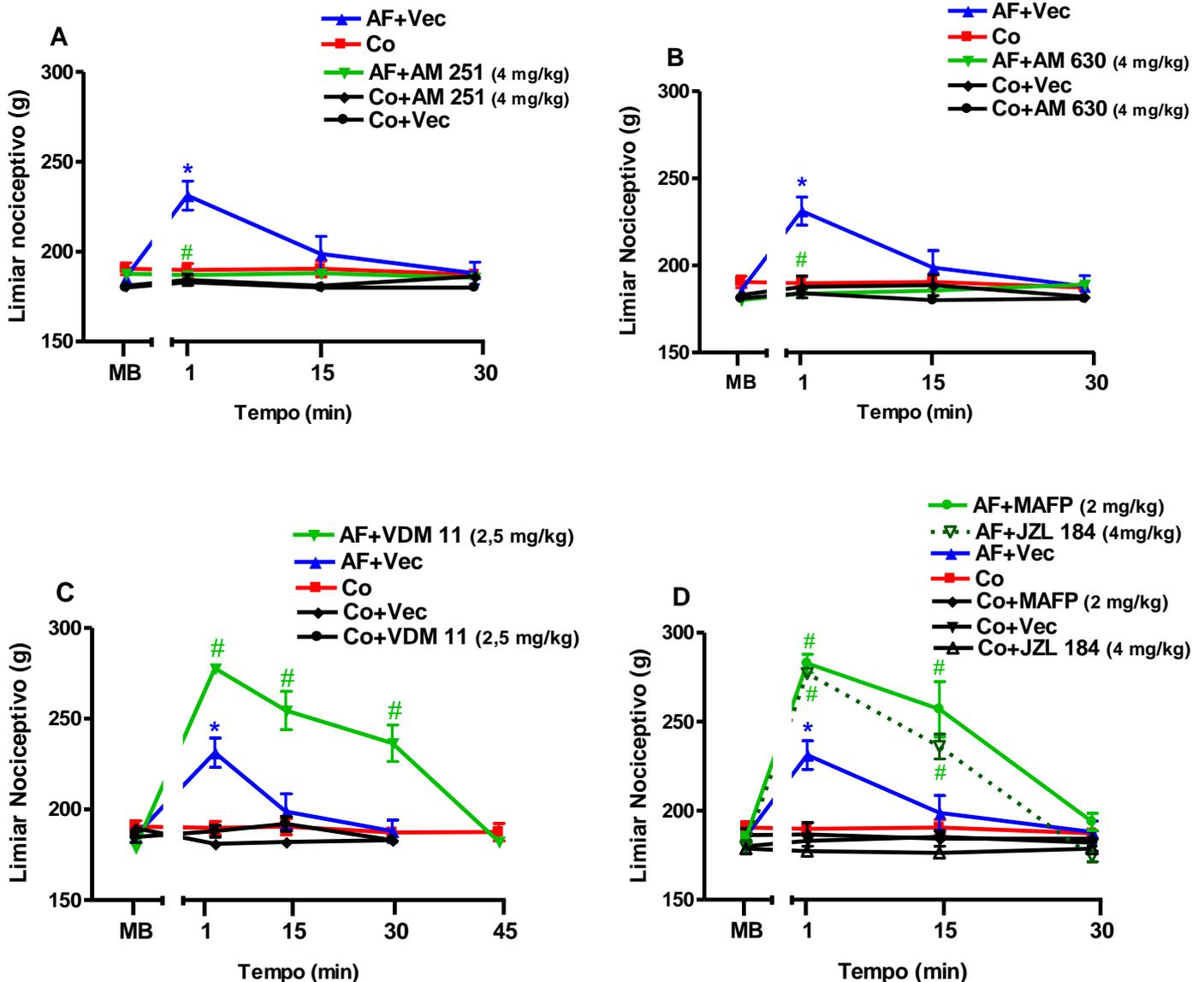


Gráfico 16 - Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptação da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

11- Efeito da administração espinal (i.t.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

A pré injeção intratecal (i.t.) dos antagonistas AM 251 (30 µg/10 µl) e AM 630 (10 µg/10 µl) bloqueou de maneira significativa ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo induzido após o exercício agudo de força no teste de retirada de pata (Gráficos 17A e 17B).

Através dessa via também podemos observar nos gráficos C e D um efeito bem similar produzido pelo tanto VDM 11 (10 µg/10 µl) quanto pelo MAFP (10 µg/10 µl), os quais potencializaram consideravelmente a antinocicepção nos intervalos de 1, 15 e 30 minutos após o final do exercício (Gráficos 17C e 17D). Além disso, essas drogas prolongaram significativamente ($p < 0,05$) a duração do efeito antinociceptivo de 1 min para 30 min após o exercício (Gráficos 17C e 17D). Também no Gráfico 17D podemos observar que a pré administração do JZL 184 (7 µg/10 µl) não só potencializou o efeito antinociceptivo encontrado após 1 e 15 minutos do exercício, mas também prolongou esse efeito para 15 min.

Todas as drogas ou veículos utilizados nesse experimento não alteraram o limiar nociceptivo do grupo controle quando administrados isoladamente.

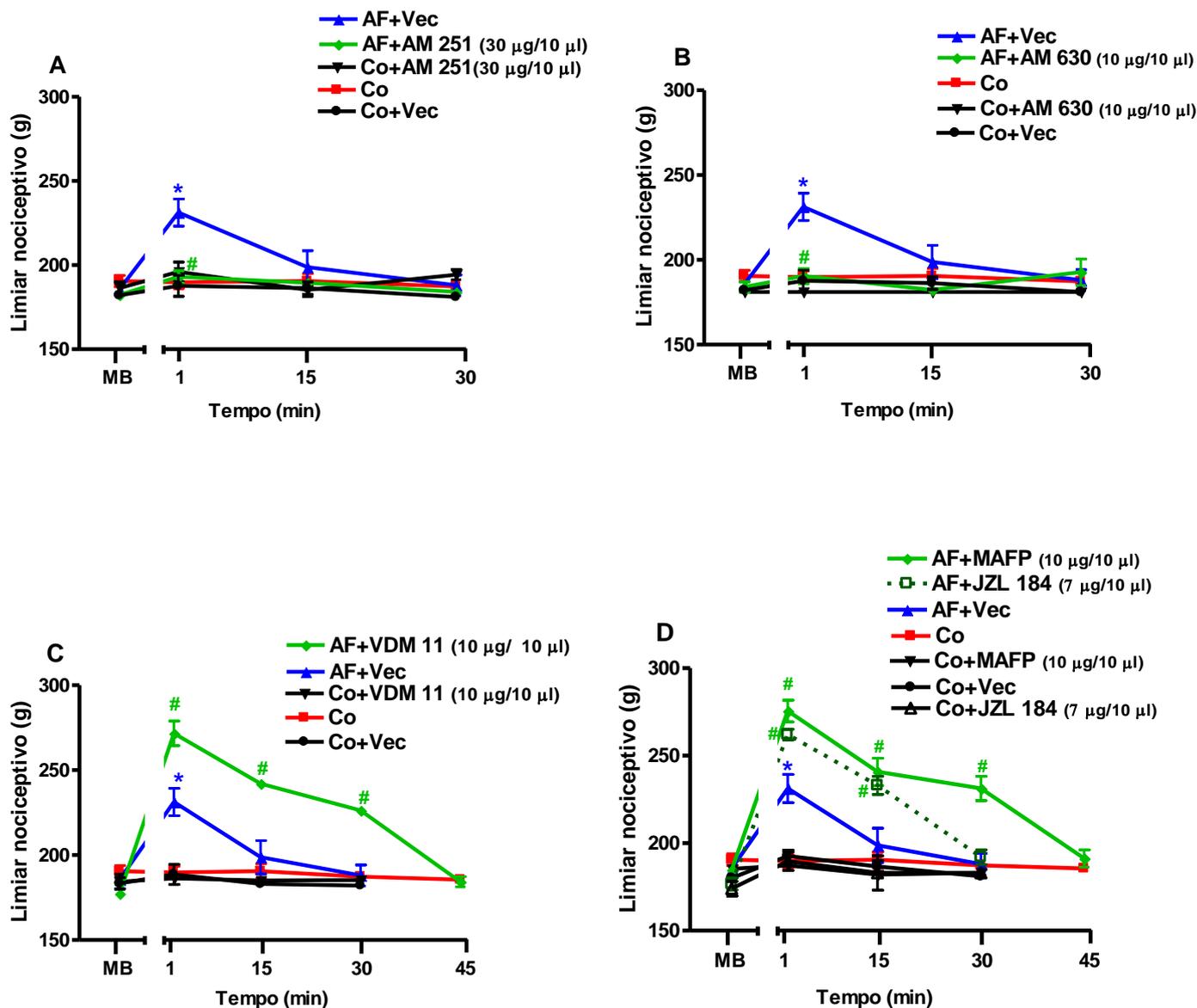


Gráfico 17 - Efeito da administração intratecal dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptção da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

12- Efeito da administração supraespinal (i.c.v.) dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptção da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

De acordo com o gráfico 18A podemos observar que o AM 251 mostrou eficácia significativa ($p < 0,05$) em antagonizar o efeito antinociceptivo do exercício de força, somente na dose de 6 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$, visto que a dose de 3 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ não promoveu nenhuma alteração nesse efeito.

Reforçando esse resultado, o AM 630 (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) também impediu significativamente ($p < 0,05$) a antinocicepção induzida pelo exercício de força, sugerindo também o envolvimento de receptores para canabinoides CB2 nesse efeito (Gráfico 18B).

Além disso, o efeito foi potencializado após 1 e 15 min do final do exercício pela pré injeção do VDM 11 (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), o qual também o prolongou esse efeito de 1 min por até 15 min (Gráfico 18C).

Outro significativo ($p < 0,05$) aumento da duração do efeito, de 1 para 30 min, foi demonstrada após a pré injeção do MAFP (0,4 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$). Esse inibidor da anandamida amidase também incrementou o efeito antinociceptivo tanto imediatamente ao término, quanto passados 15 e 30 minutos do final do exercício de força. Ademais, a duração do efeito foi também prolongada de 1 para 30 min (Gráfico 18D). Em adição, o JZL 184 (7 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) também potencializou esse efeito imediatamente e após 15 min do exercício e o prolongou de 1 para 15 min (Gráfico 18D).

Embora, demonstramos um efeito antinociceptivo induzido pelo exercício de força no teste de retirada de pata, o mesmo efeito não foi encontrado nos testes de retirada de cauda e face.

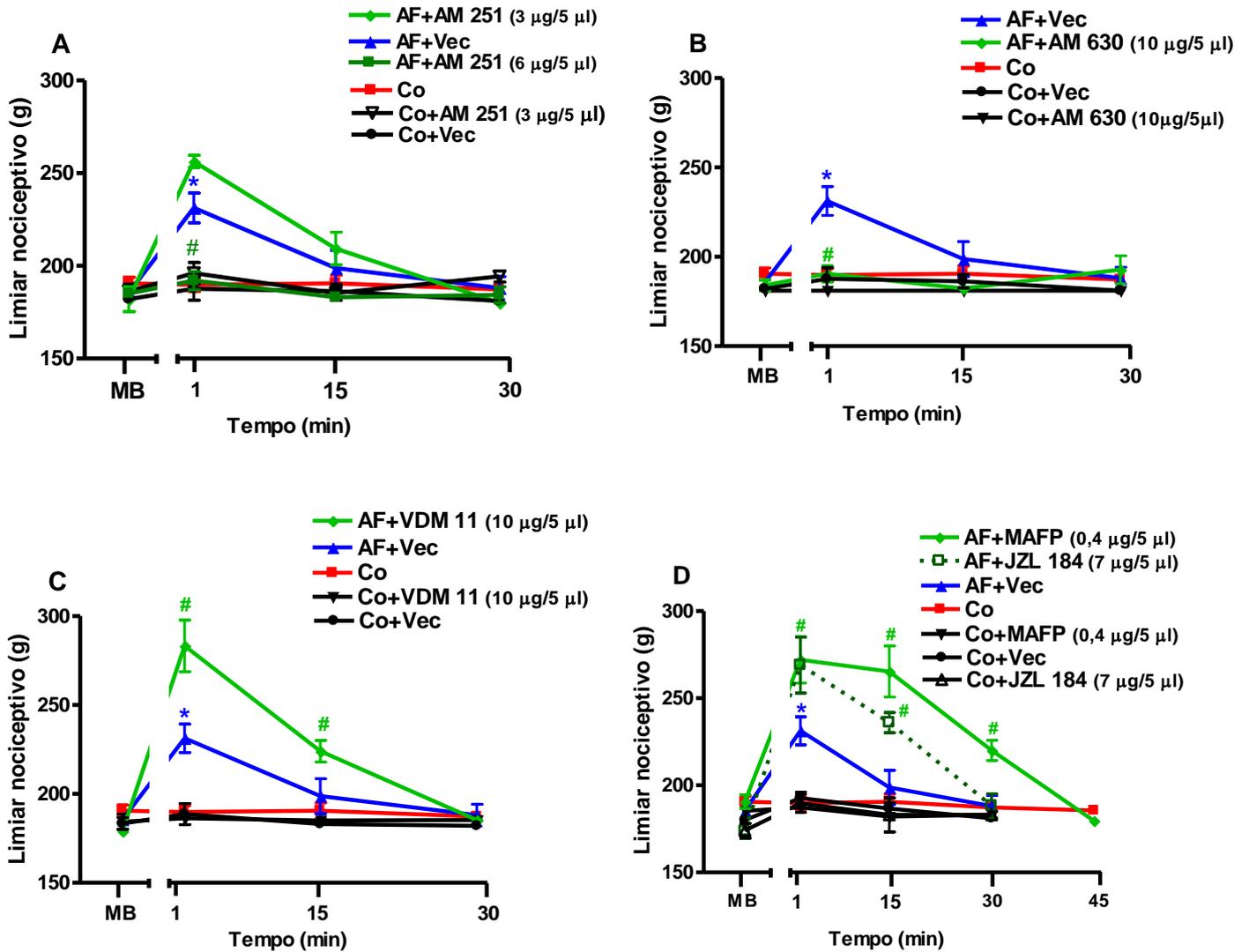


Gráfico 18 - Efeito da administração intracerebroventricular dos antagonistas para os receptores canabinóides e dos inibidores da recaptação da anandamida e da degradação da anandamida e do 2-AG sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O AM 251 (Gráfico A, antagonista para o receptor canabinóide CB1), o AM 630 (Gráfico B, antagonista para o receptor canabinóide CB2), o VDM 11 (Gráfico C, inibidor da recaptação da anandamida), o MAFP (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada a anandamida) e o JZL 184 (Gráfico D, inibidor da enzima que degrada o 2-AG) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

13- Perfil da expressão de receptores CB1 induzida pelo exercício agudo aeróbico e o exercício agudo de força.

O gráfico 19 apresenta a análise da expressão do receptor CB1 em tecido cerebral após os protocolos de exercício aeróbico e de força. Podemos verificar que ambos os protocolos de exercício promoveram aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão do receptor CB1 quando comparados ao grupo controle. Sendo que o exercício agudo de força apresentou um maior aumento da expressão do receptor comparado ao exercício agudo aeróbico.

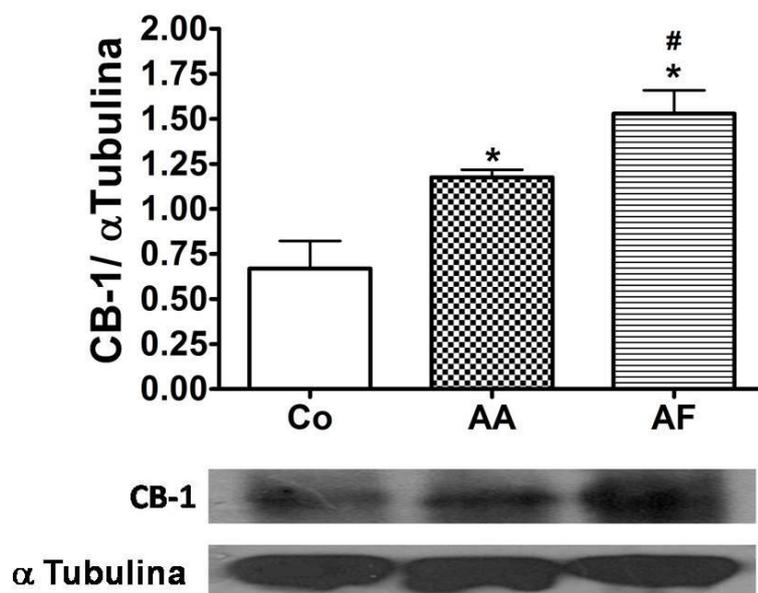


Gráfico 19 - Detecção por Western Blot da expressão de receptor CB1 para canabinóides em tecido cerebral de ratos após exercício. Os extratos cerebrais de ratos foram preparados de um grupo controle (Co, representado por animais que não realizaram exercício) e de animais submetidos ao exercício agudo aeróbico (AA) e o exercício de força (AF). O protocolo de exercício agudo aeróbico perdurou 46.5 (\pm 4.5) min. Os valores representam a média \pm S.E.M. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) entres os grupos AA e AF, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

14- Ativação de receptores canabinóides CB1 em PAG após os protocolos de exercício agudo aeróbico e agudo de força

Diante dos prévios resultados encontrados pelo Western blot nós avaliamos a expressão, ativação e co-localização de receptores canabinóides do tipo CB1 dentro das regiões dorso e ventro lateral da PAG (importantes regiões que participam do controle descendente da dor) através da técnica de imunofluorescência pela dupla marcação de receptores CB1 (representado em verde) e c-FOS (representada em vermelho, uma proteína marcadora da ativação neuronal).

Assim, de acordo com figuras 12, 13, 14 e 15 podemos verificar que ocorreu um significativo ($p < 0,05$) aumento no número de receptores canabinóides do tipo (CB1), os quais estão representados em verde, nas regiões dorso e ventro lateral da PAG após os protocolos de exercício aeróbico e de força quando comparado ao grupo controle (constituído por animais não exercitados). Além disso, a dupla marcação para o receptor CB1 e c-FOS também pôde demonstrar que os neurônios que expressam os receptores CB1 em ambas as regiões da PAG (dorso-lateral e ventro-lateral) foram ativados pelos 2 protocolos de exercício. Desse modo, esses resultados reforçam, a hipótese do envolvimento central dos receptores canabinóides CB1 na antinocicepção induzida pelo exercício físico.

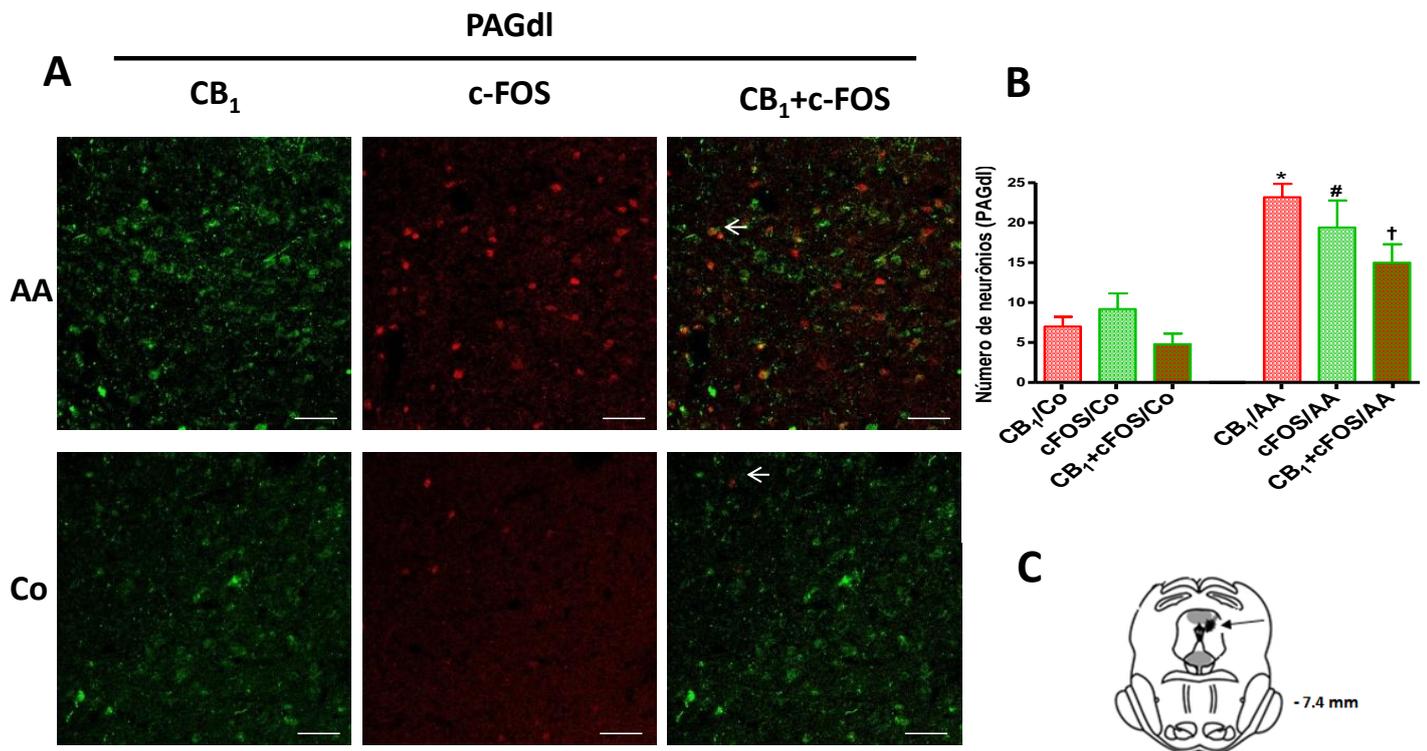


Figura 12 - Expressão e ativação de receptores canabinóides CB1 e c-FOS na região dorso lateral da PAG (PAGdl) após o exercício agudo aeróbico (AA). (A) Imagem representativa da dupla marcação por imunofluorescência de receptores canabinóides CB1 (verde) e c-FOS (vermelho) dentro da PAGdl. (B) **Gráfico - 20:** Número de neurônios na PAGdl após o AA. São apresentadas as médias \pm S.E.M. de cada grupo de 5 animais. O protocolo de exercício agudo aeróbico perdurou 43.5 (\pm 0.5) min.* Indica significância estatística ($p < 0,05$) sobre a ativação e expressão de receptor canabinóide CB1 após o AA (CB1/AA) em relação ao grupo Controle (CB1/Co). # Indica significância estatística ($p < 0,05$) sobre a ativação de c-FOS após o AA (c-FOS/AA) em relação ao grupo Controle (c-FOS/Co). † indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre a dupla marcação de imunofluorescência para a ativação, expressão e co-localização do receptor canabinóide CB1 e c-FOS após o AA (CB1+c-FOS/AA) em relação ao grupo controle (CB1+c-FOS/Co). ($p < 0,05$), *t*-teste. (C) Representação esquemática da secção coronal da PAGdl (circulo negro) do cérebro de ratos (De acordo com o atlas de Paxinos & Watson, 1986).). As flechas indicam a dupla marcação do receptor CB1 e c-FOS.

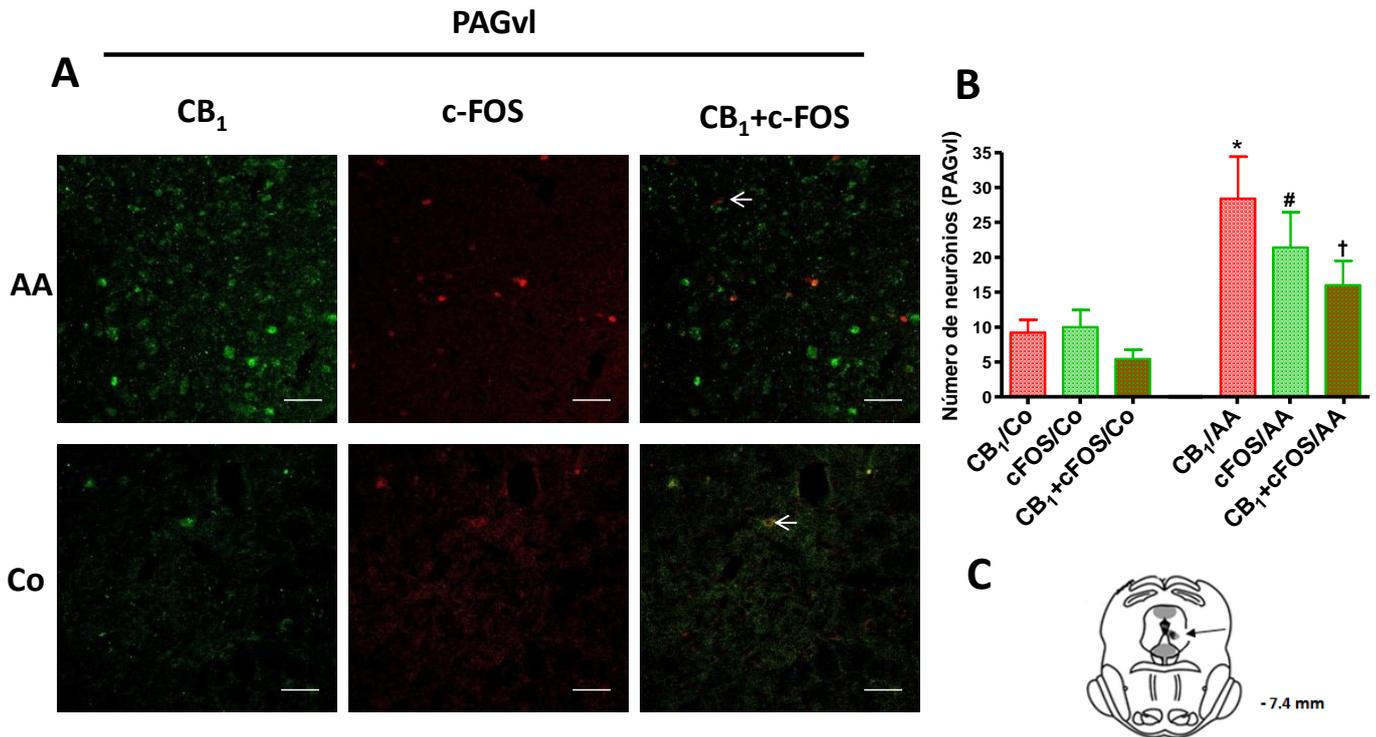


Figura 13 - Expressão e ativação de receptores canabinóides CB1 e c-FOS na região ventro lateral da PAG (PAGvl) após o exercício agudo aeróbico (AA). (A) Imagem representativa da dupla marcação por imunofluorescência de receptores canabinóides CB1 (verde) e c-FOS (vermelho) dentro da PAGvl. (B) **Gráfico 21** - Número de neurônios na PAGvl após o AA. Os dados são apresentados de acordo com a média \pm S.E.M. de um número de 5 animais. O protocolo de exercício agudo aeróbico perdurou 43.5 (\pm 0.5) min.* Indica significância estatística ($p < 0,05$) sobre a ativação e expressão de receptor canabinóide CB1 após o AA (CB1/AA) em relação ao grupo Controle (CB1/Co). # Indica significância estatística ($p < 0,05$) sobre a ativação de c-FOS após o AA (c-FOS/AA) em relação ao grupo Controle (c-FOS/Co). † indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre a dupla marcação de imunofluorescência para a ativação, expressão e co-localização do receptor canabinóide CB1 e c-FOS após o AA (CB1+c-FOS/AA) em relação ao grupo controle (CB1+c-FOS/Co). ($p < 0,05$), *t*-teste. (C) Representação esquemática da secção coronal da PAGvl (circulo negro) do cérebro de ratos (De acordo com o atlas de Paxinos & Watson, 1986). As flechas indicam a dupla marcação do receptor CB1 e c-FOS.

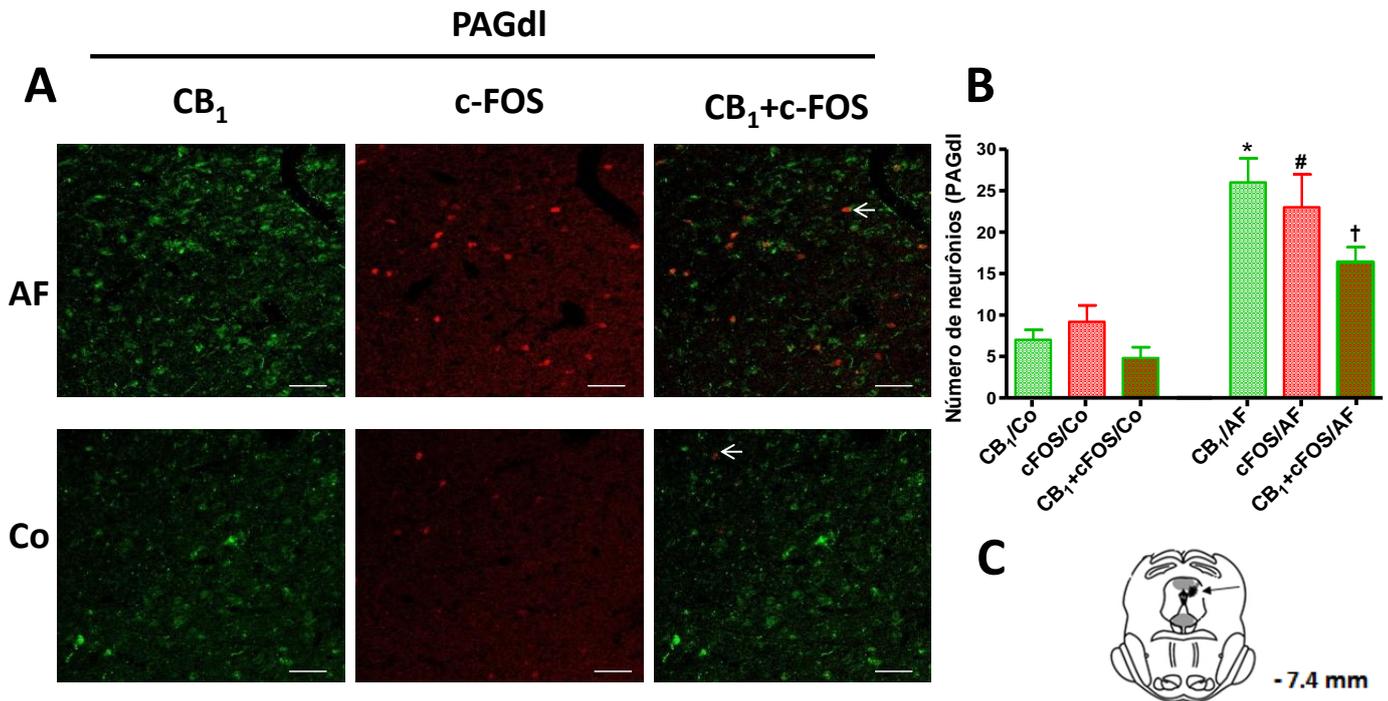


Figura 14 - Expressão e ativação de receptores canabinóides CB1 e c-FOS na região dorso lateral da PAG (PAGdl) após o exercício agudo de força (AF). (A) Imagem representativa da dupla marcação por imunofluorescência de receptores canabinóides CB1 (verde) e c-FOS (vermelho) dentro da PAGdl. (B) **Gráfico - 22:** Número de neurônios na PAGdl após o AF. Os dados são apresentados de acordo com a média \pm S.E.M. de um número de 5 animais. * Indica significância estatística ($p < 0,05$) sobre a ativação e expressão de receptor canabinóide CB1 após o AF (CB1/AF) em relação ao grupo Controle (CB1/Co). # Indica significância estatística ($p < 0,05$) sobre a ativação de c-FOS após o AF (c-FOS/AF) em relação ao grupo Controle (c-FOS/Co). † indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre a dupla marcação de imunofluorescência para a ativação, expressão e co-localização do receptor canabinóide CB1 e c-FOS após o AF (CB1+c-FOS/AF) em relação ao grupo controle (CB1+c-FOS/Co). ($p < 0,05$), *t*-teste. (C) Representação esquemática da secção coronal da PAGdl (circulo negro) do cérebro de ratos (De acordo com o atlas de Paxinos & Watson, 1986). As flechas indicam a dupla marcação do receptor CB1 e c-FOS.

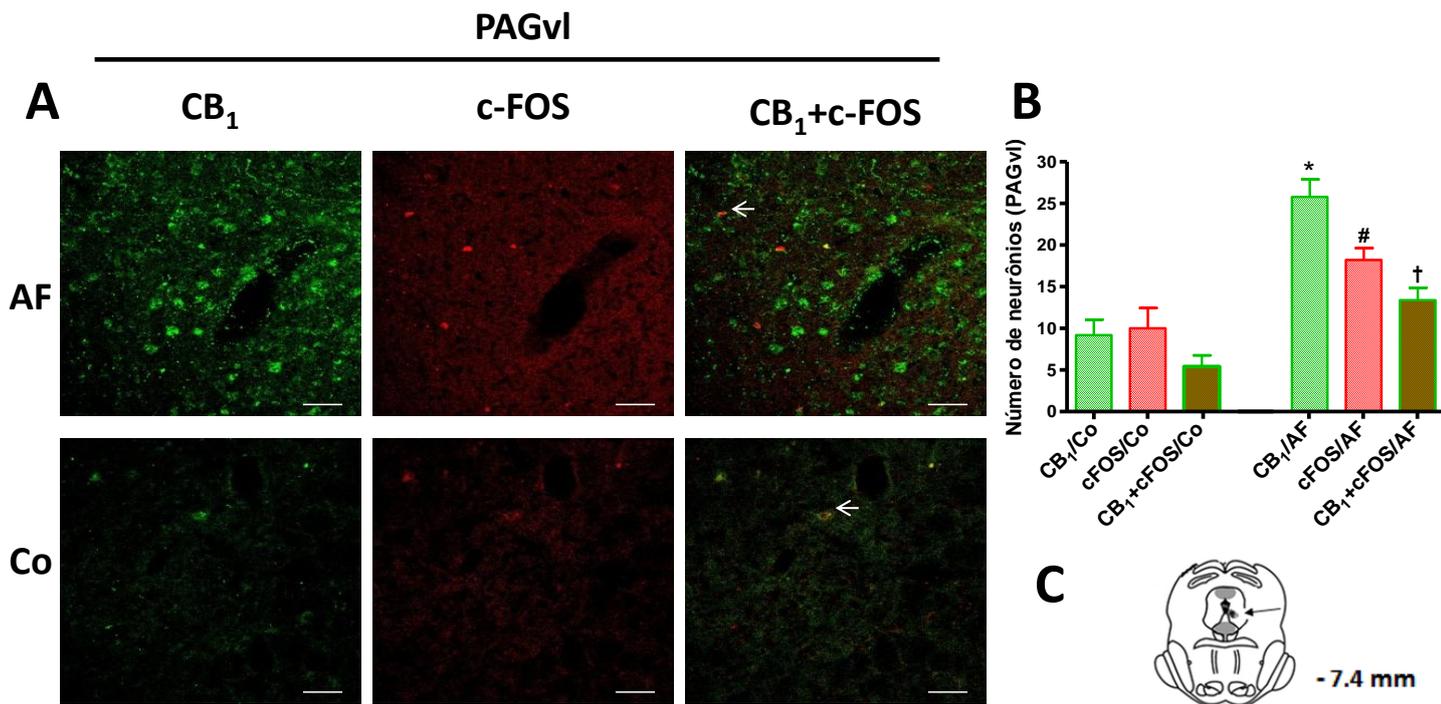


Figura 15 - Expressão e ativação de receptores canabinóides CB1 e c-FOS na região ventro lateral da PAG (PAGvl) após o exercício agudo de força (AF). (A) Imagem representativa da dupla marcação por imunofluorescência de receptores canabinóides CB1 (verde) e c-FOS (vermelho) dentro da PAGvl. (B) **Gráfico - 23:** Número de neurônios na PAGvl após o AF. Os dados são apresentados de acordo com a média \pm S.E.M. de um número de 5 animais. * Indica significância estatística ($p < 0,05$) sobre a ativação e expressão de receptor canabinóide CB1 após o AF (CB1/AF) em relação ao grupo Controle (CB1/Co). # Indica significância estatística ($p < 0,05$) sobre a ativação de c-FOS após o AF (c-FOS/AF) em relação ao grupo Controle (c-FOS/Co). † indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre a dupla marcação de imunofluorescência para a ativação, expressão e co-localização do receptor canabinóide CB1 e c-FOS após o AF (CB1+c-FOS/AF) em relação ao grupo controle (CB1+c-FOS/Co). ($p < 0,05$), *t*-teste. (C) Representação esquemática da secção coronal da PAGvl (circulo negro) do cérebro de ratos (De acordo com o atlas de Paxinos & Watson, 1986). As flechas indicam a dupla marcação do receptor CB1 e c-FOS.

15- Efeito do exercício agudo aeróbico e exercício agudo de força sobre os níveis plasmáticos de endocanabinóides.

De acordo com os gráficos 24 e 25 podemos observar que imediatamente após os protocolos de exercício aeróbico e de força ocorreu um significativo ($p < 0,05$) aumento dos níveis plasmáticos de anandamida, 2-AG, PEA e OEA quando comparado ao grupo controle que foi composto por animais que não realizaram o exercício. Também podemos observar que esses aumentos foram maiores após o exercício aeróbico quando comparado ao exercício de força.

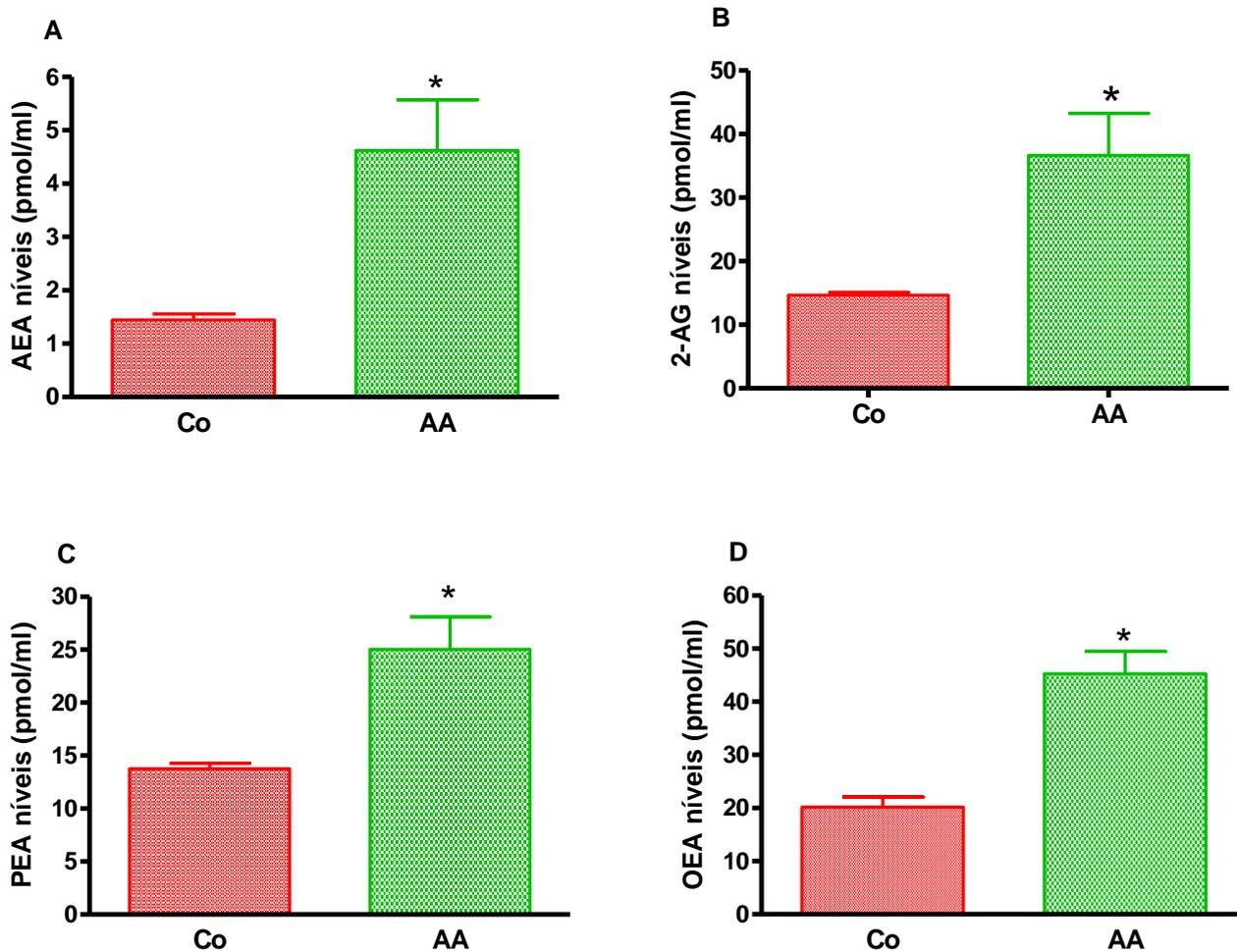


Gráfico 24 – Efeito do exercício agudo aeróbico sobre os níveis plasmáticos de endocanabinóides. O exercício agudo aeróbico (AA) promoveu um aumento da concentração plasmática de AEA (anandamida) (A), 2-AG (2-araquidonil-glicerol) (B), PEA (palmitoiletanolamida) (C) e OEA (oleoiletanolamida) (D). A duração do exercício aeróbico foi de aproximadamente 43.0 (\pm 1.0) min. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da concentração de cada endocanabinóide. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Co). $n=5$ por grupo. *t*-teste.

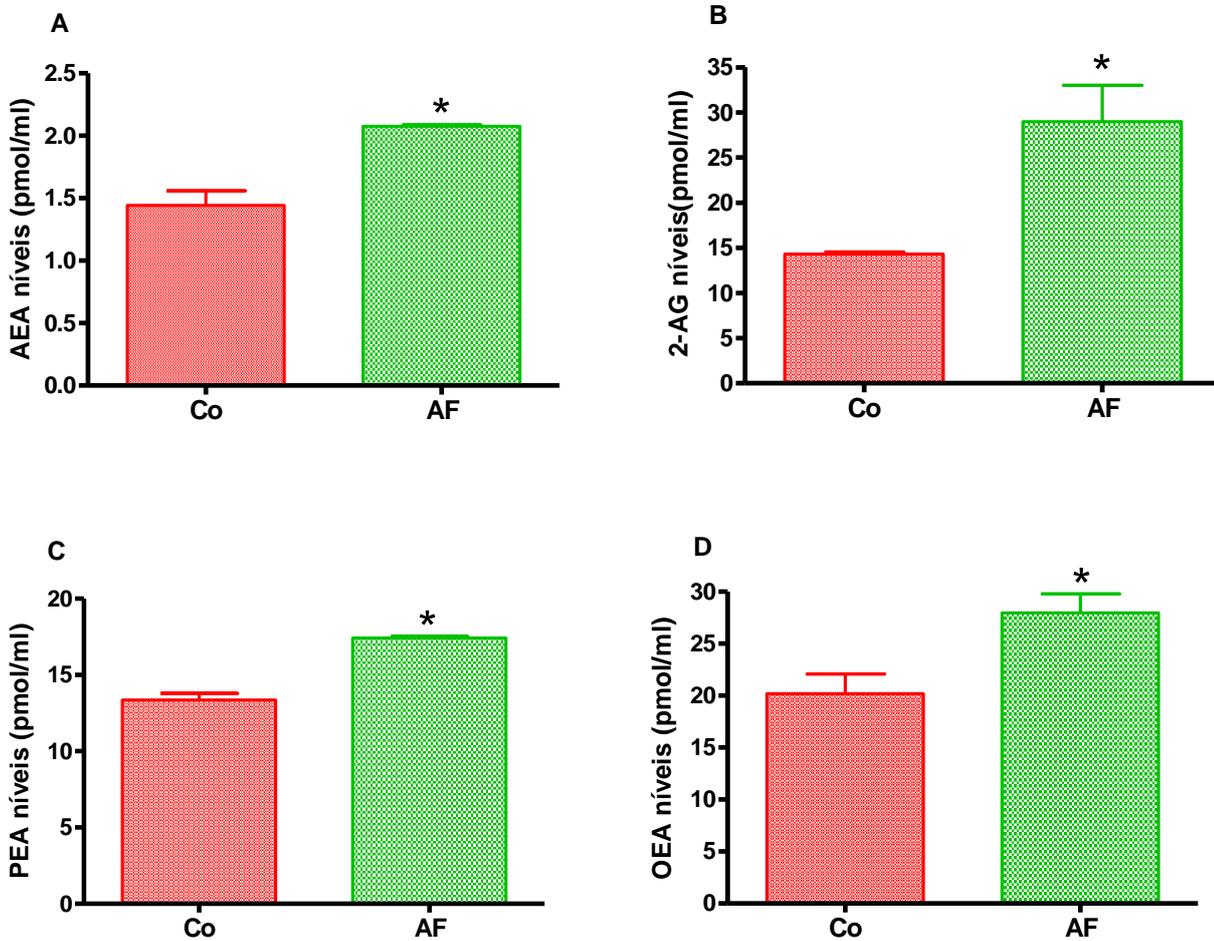


Gráfico 25 – Efeito do exercício agudo de força sobre os níveis plasmáticos de endocanabinóides. O exercício agudo de força (AF) promoveu um aumento da concentração plasmática de AEA (anandamida) (A), 2-AG (2-araquidonil-glicerol) (B), PEA (palmitoiletanolamida) (C) e OEA (oleoiletanolamida) (D). Cada barra representa a média \pm E.P.M. da concentração de cada endocanabinóide. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Co). $n=5$ por grupo. *t*-teste .

16 - Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata.

Podemos observar através do gráfico 26A que a pré injeção do inibidor não seletivo da NO sintase (NOS), o NOArg (2 mg/kg), inibiu significativamente ($p < 0,05$) a antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico. Diante disso, nosso próximo objetivo foi avaliar se toda a via NO/cGMP/K⁺_{ATP} estaria envolvida nesse efeito. Para isso, foram pré administrados o ODQ (2 mg/kg), um inibidor da guanilil ciclase, a qual é responsável por transformar o guanosina trifosfato intracelular (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), que promoverá a abertura de K⁺_{ATP} e a glibenclamida (2 mg/kg), um bloqueador desse tipo de canal. Assim, ambos (ODQ e glibenclamida) reverteram de forma significativa a antinocicepção ($p < 0,05$), confirmando a participação de toda a via NO/cGMP/K⁺_{ATP} (Gráficos 26B e 26C).

Portanto, depois de confirmado a participação da via, o intuito agora foi verificar se as três isoformas da NOS estariam envolvidas no efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico. Dessa maneira, foram utilizados um inibidor específico para eNOS, o L-NIO (2 mg/kg); um inibidor específico para iNOS, a aminoguanidina (2 mg/kg) e um inibidor específico para nNOS, o L-NPA (2 mg/kg). Então, podemos verificar de acordo com os gráficos 27A, 27B e 27C que a antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico foi significativamente ($p < 0,05$) revertida pelos inibidores específicos da NOS, confirmando também a participação das 3 isoformas nesse efeito.

Lembramos que nenhuma droga ou veículo utilizado nesse experimento alterou o limiar nociceptivo quando administrado separadamente.

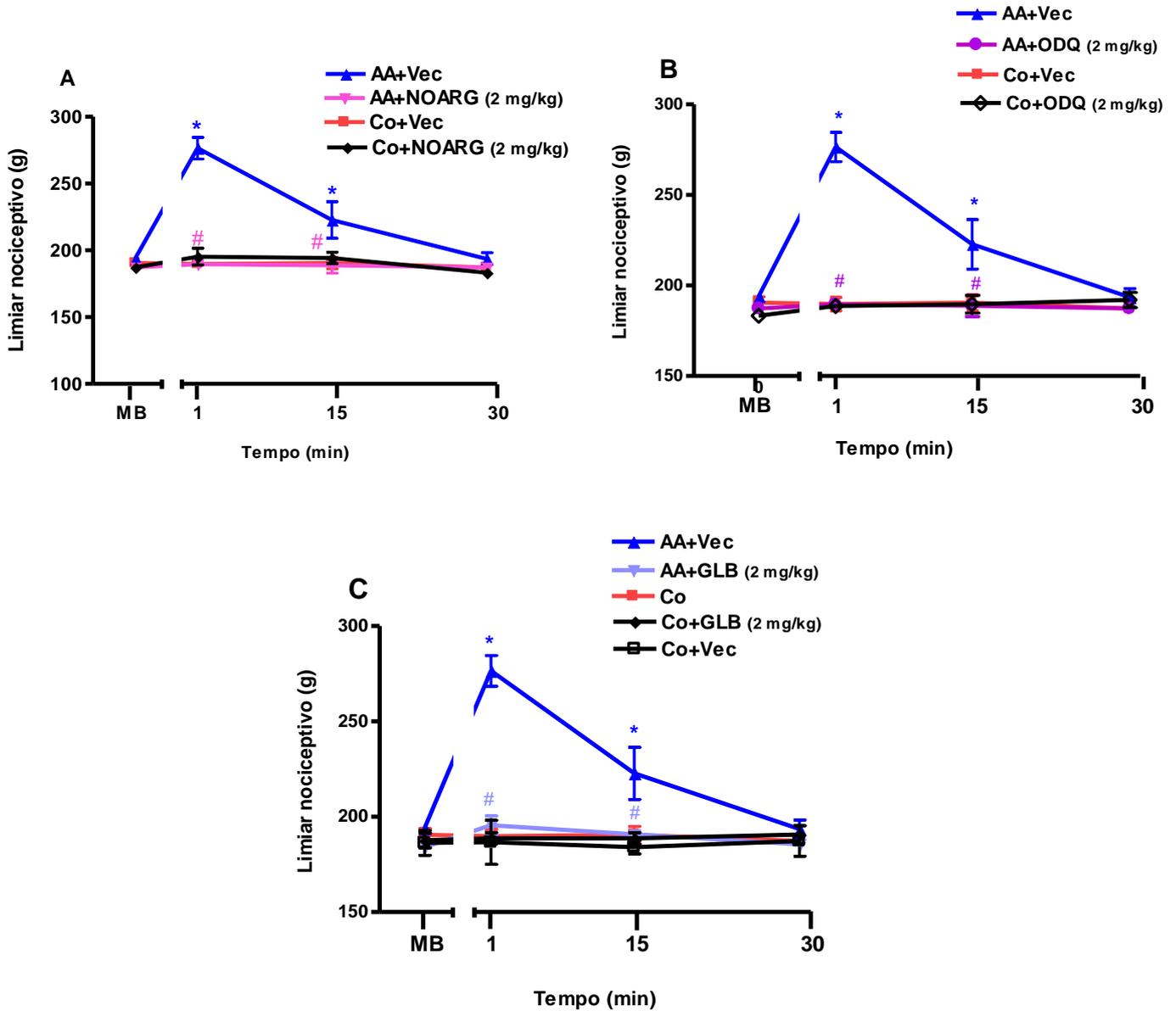


Gráfico 26 - Efeito da administração subcutânea dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 44.0 (±3.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo AA+Vec, n=4 por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

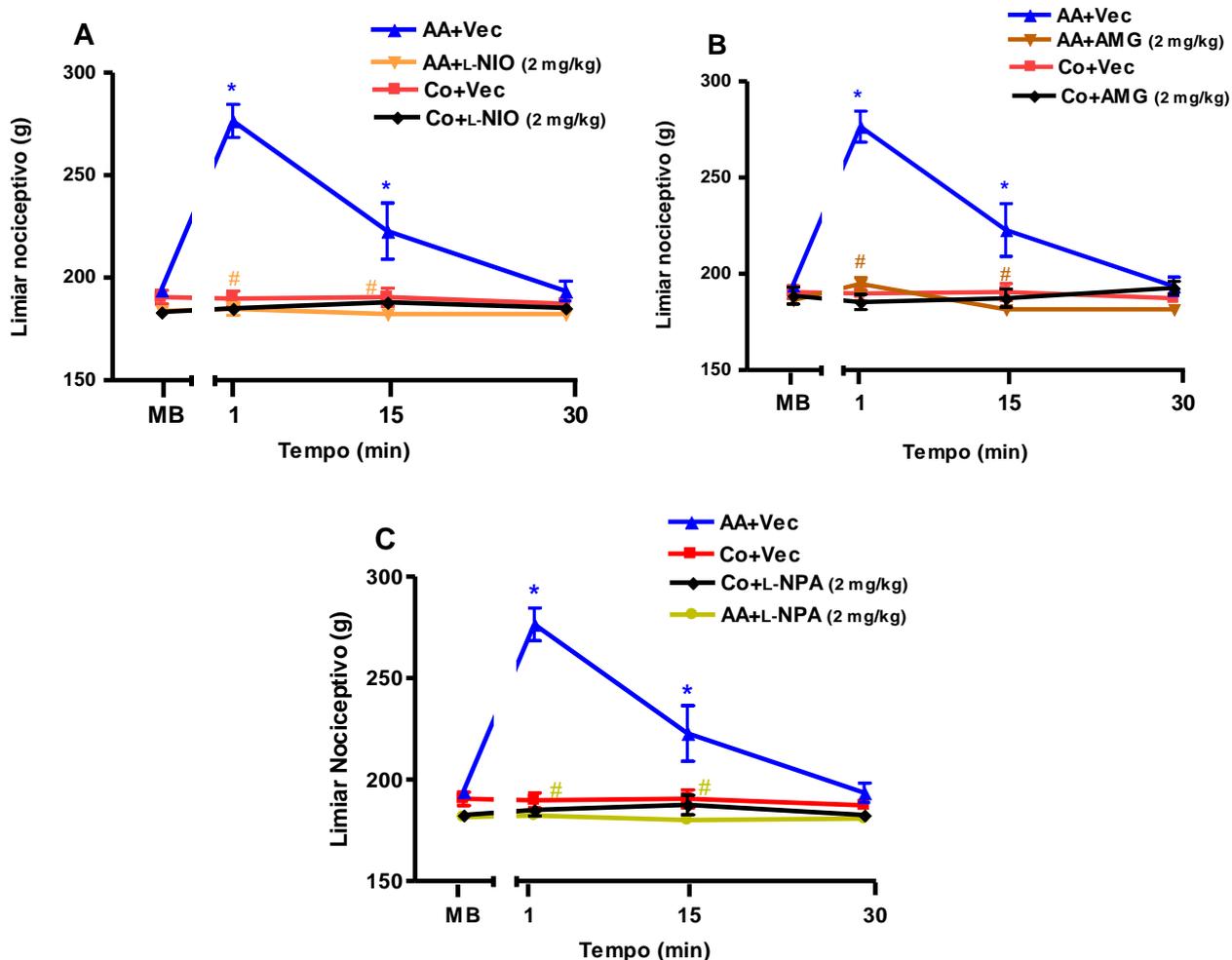


Gráfico 27 - Efeito da administração subcutânea dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L-NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L-NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 41.0 (± 2.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

17 - Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda.

A antinocicepção produzida após o exercício aeróbico frente ao teste de retirada de cauda também foi revertida pelos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP}. A participação dessa via pode ser verificada pelos gráficos 28A, 28B e 28C, os quais mostram que o NOArg (2 mg/kg), o ODQ (2 mg/kg) e a glibenclamida (2 mg/kg) reverteram significativamente ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo.

Além disso, nesse teste todos os inibidores das 3 isoformas da NOS (L-NIO, L-NPA, aminoguanidina) reverteram também de maneira significativa ($p < 0,05$) esse efeito (Gráficos 29A, 29B e 29C).

Ressaltamos que nenhuma das drogas ou veículos alterou o limiar nociceptivo do grupo controle quando administradas isoladamente.

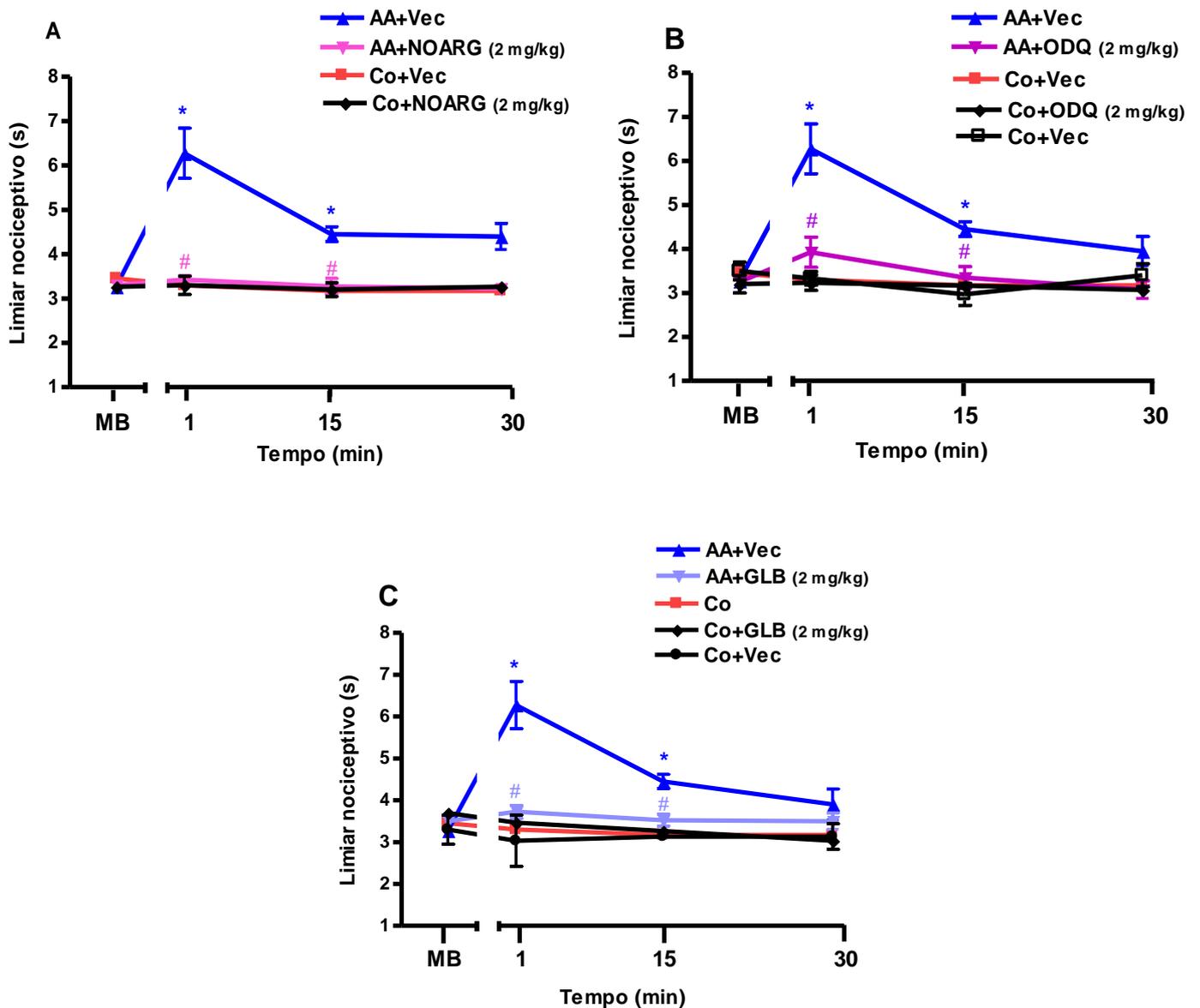


Gráfico 28 - Efeito da administração subcutânea dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 40.0 (± 3.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

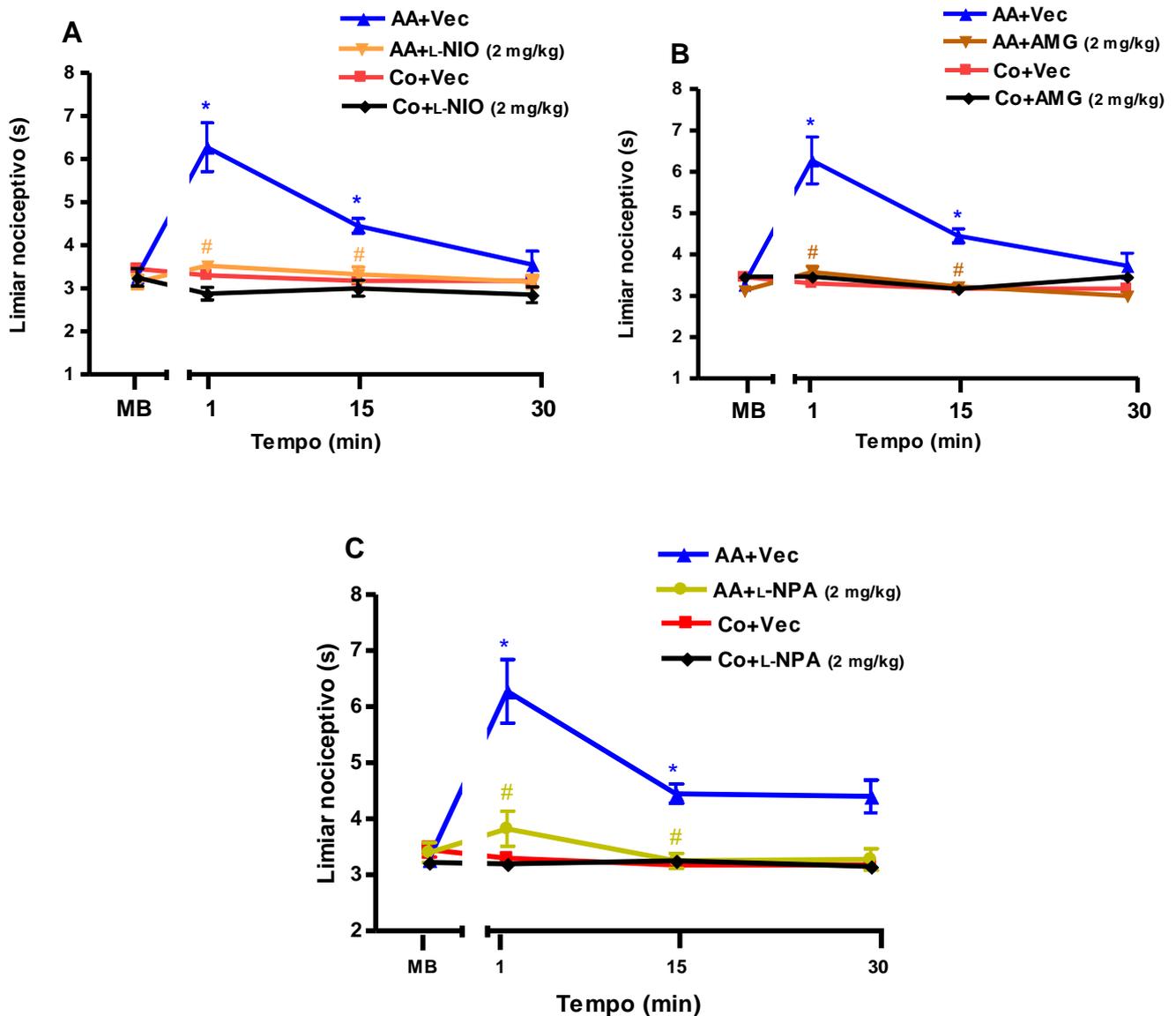


Gráfico 29 - Efeito da administração subcutânea dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L-NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L-NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 47.0 (\pm 3.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

18 - Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face.

Podemos observar através do gráfico 30A que o inibidor não seletivo da NOS (NOArg, 2 mg/kg) reverteu de forma significativa ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico. Além disso, a pré injeção do inibidor da guanilil ciclase, o ODQ (2 mg/kg) e do bloqueador de canais de K⁺_{ATP} (glibenclamida) também aboliu esse efeito, reforçando assim a hipótese do envolvimento da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} na antinocicepção promovida pelo exercício aeróbico (Gráficos 30B e 30C).

Também foi demonstrado através do teste de retirada de face, a participação da eNOS, iNOS e nNOS na antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico, onde tal efeito foi significativamente revertido pelo L-NIO (2 mg/kg), aminoguanidina (2 mg/kg) e o L-NPA (2 mg/kg) (Gráficos 31A, 31B e 31C). As drogas ou veículos utilizados nesse experimento não afetaram o limiar nociceptivo quando isoladamente injetados.

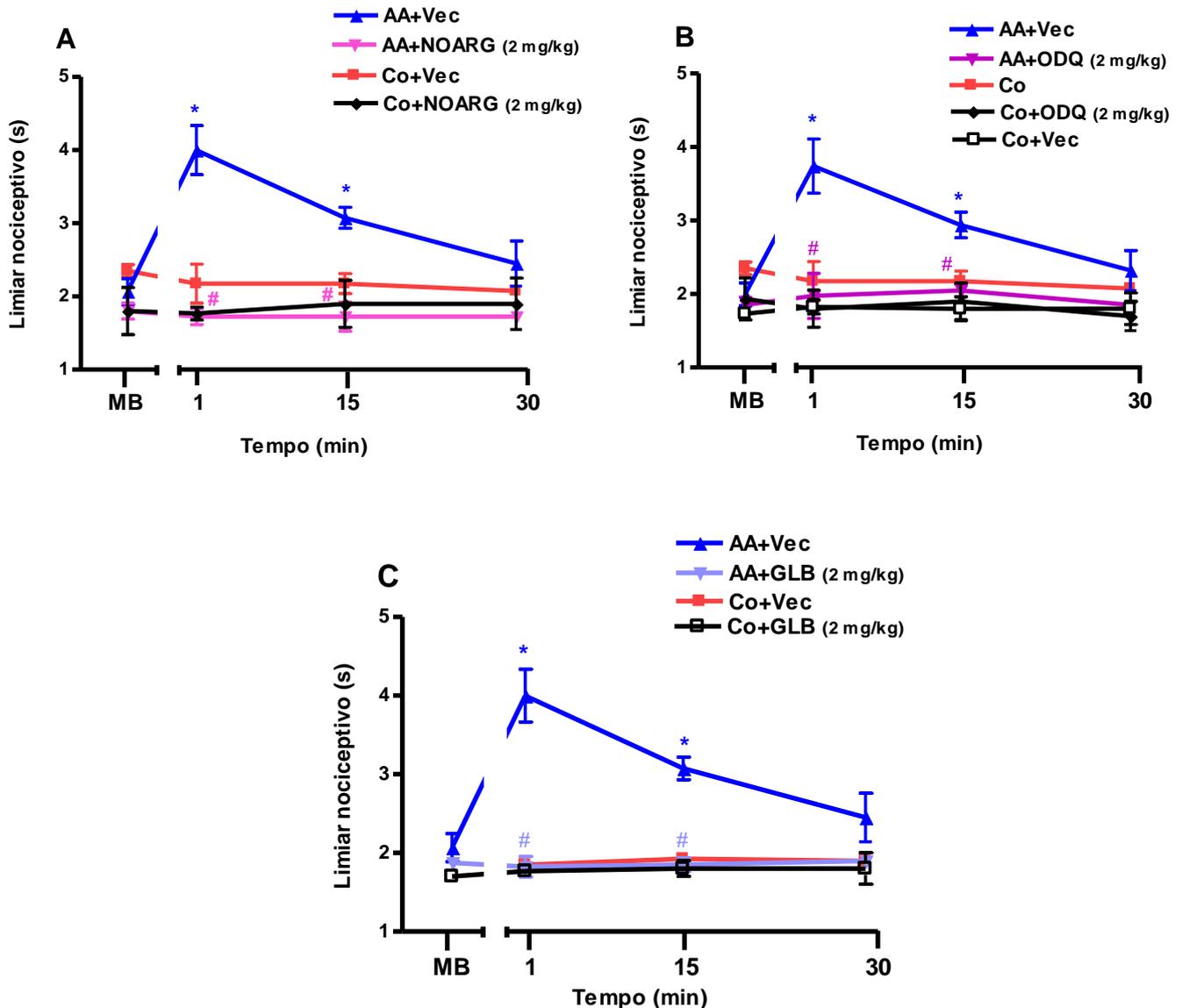


Gráfico 30 - Efeito da administração subcutânea dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 41.0 (± 6.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

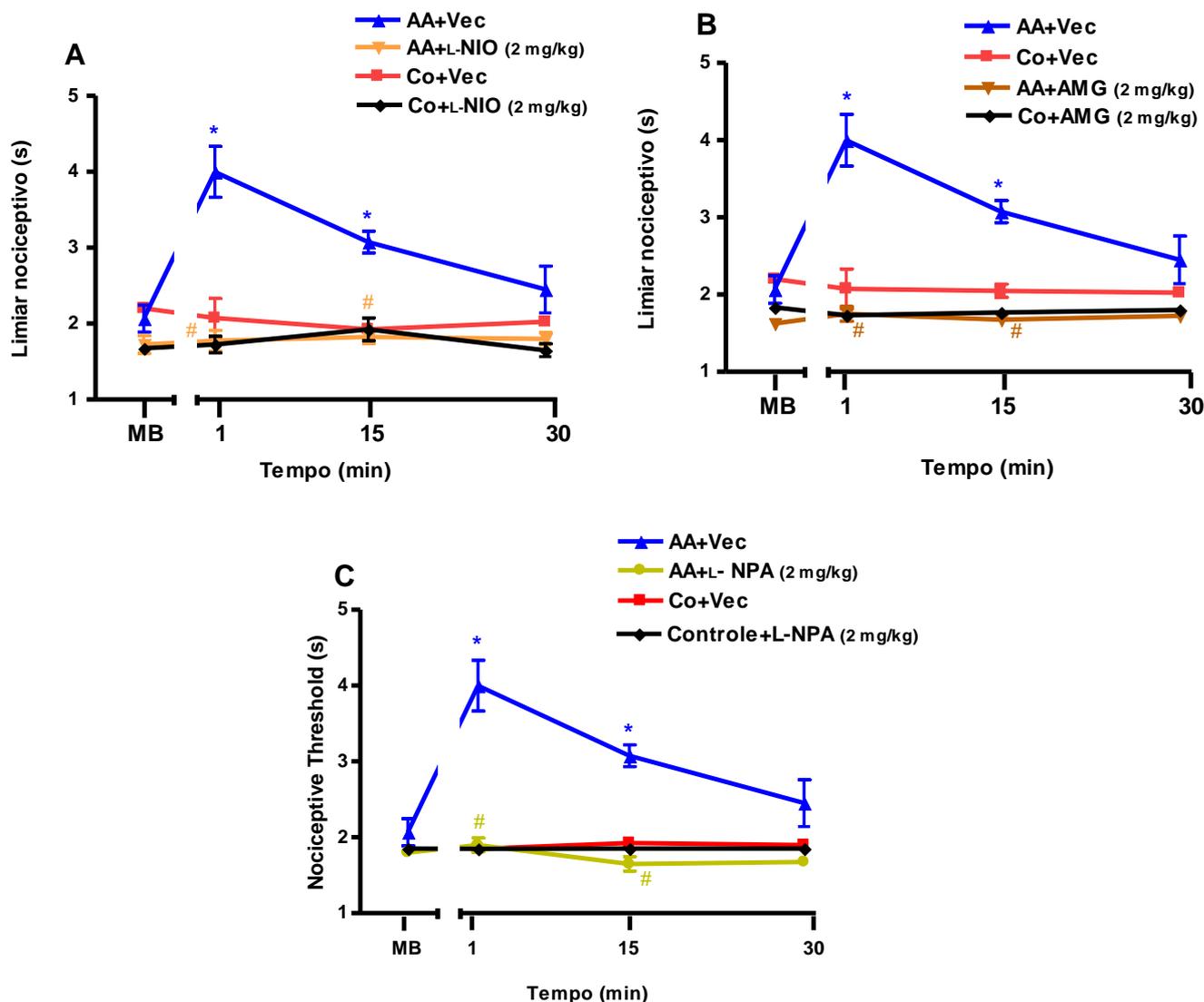


Gráfico 31 - Efeito da administração subcutânea dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L -NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L -NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 45.0 (\pm 2.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

19 - Efeito da administração espinal (i.t.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata.

Quando administrados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício agudo aeróbico, o NOArg (50 µg/10 µl), o ODQ (4 µg/10 µl) e a glibenclamida (10 µg/10 µl) reverteram de forma significativa ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo produzido após tal (Gráficos 32A, 32B e 32C). Através dessa via evidencia-se um envolvimento a nível medular na resposta.

De maneira a incrementar esse resultado, a pré administração (i.t.) dos inibidores seletivos para a NOS (L-NIO, L-NPA e a aminoguanidina) na dose de 10 µg/10 µl também impediram indução da antinocicepção após o exercício frente ao estímulo nociceptivo mecânico (Gráficos 33A, 33B e 33C). Isso, reforça a hipótese de uma provável participação das 3 isoformas da NOS nesse efeito.

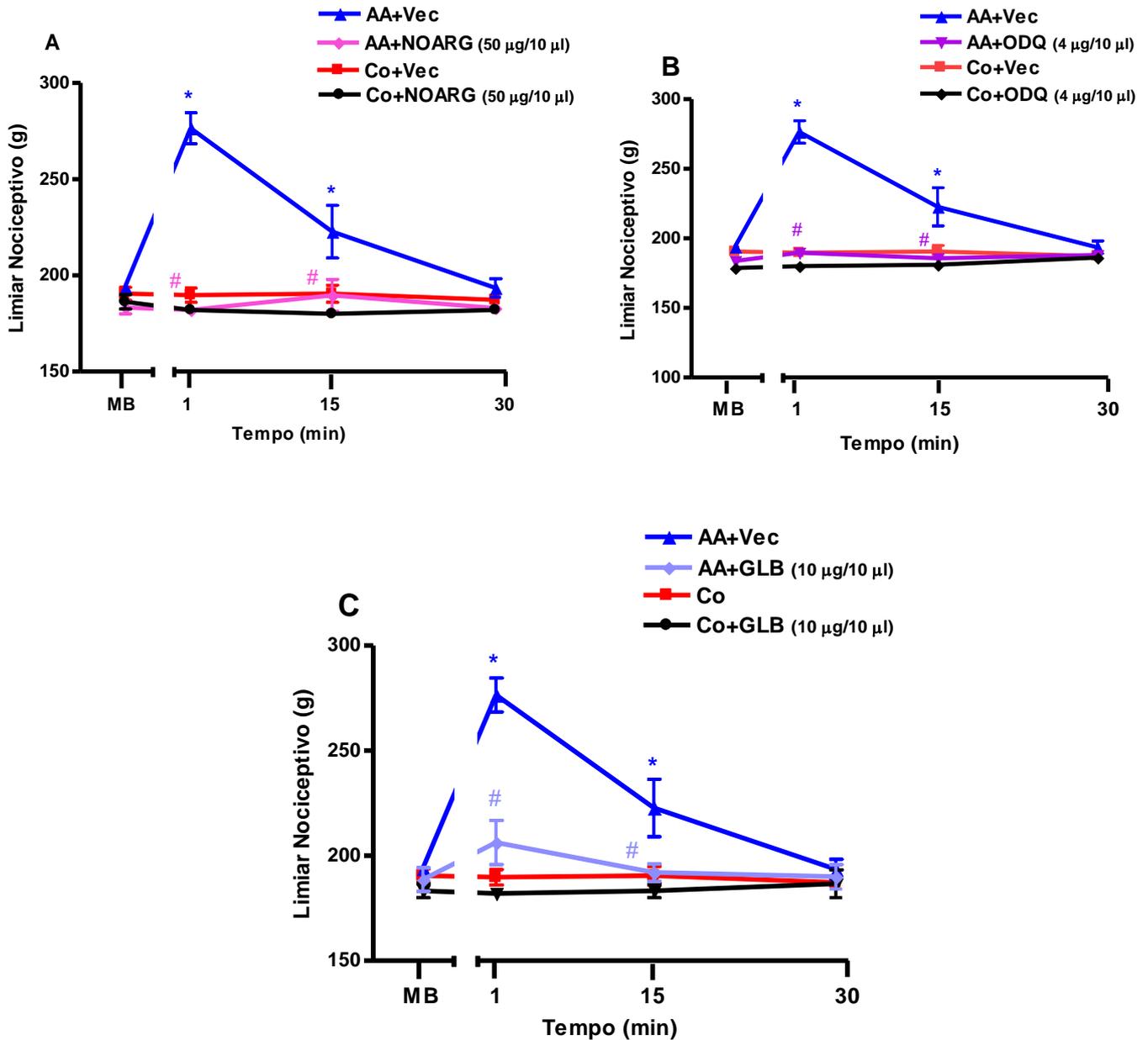


Gráfico 32 - Efeito da administração intratecal dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 48.0 (±3.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo AA+Vec, n=4 por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

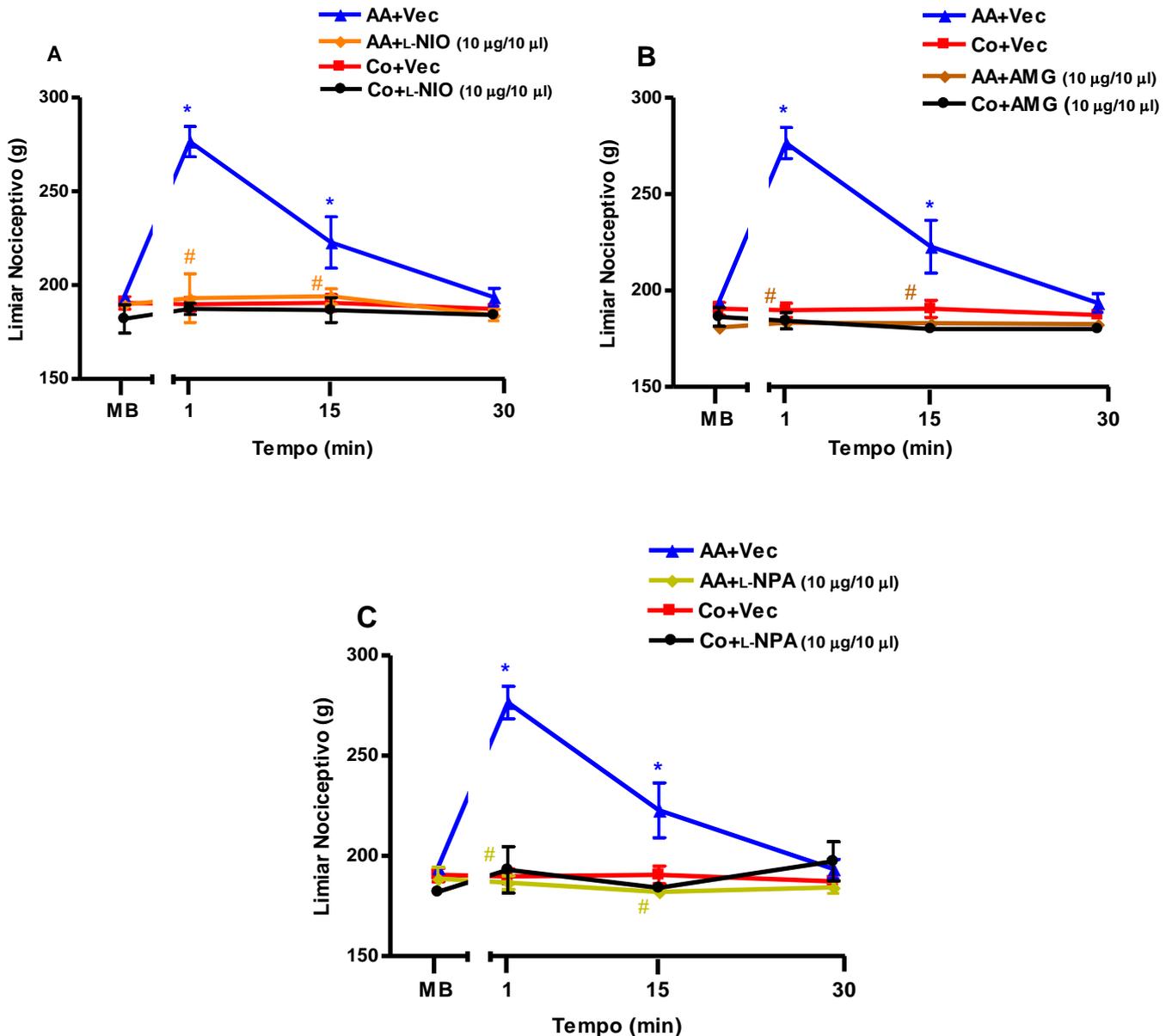


Gráfico 33 - Efeito da administração intratecal dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O $L-NIO$ (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o $L-NPA$ (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou $43.0 (\pm 3.0)$ min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

20 - Efeito da administração espinal (i.t.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda.

No teste de retirada de cauda o inibidor não seletivo da NOS (NOArg, 50 µg/50 µl), o inibidor do guanilil ciclase (ODQ, 4 µg/10 µl) e o bloqueador do K⁺_{ATP} (glibenclamida, 10 µg/10 µl), reverteram significativamente ($p < 0,05$) a antinocicepção encontrada após o exercício aeróbico quando pré administrados via i.t. (Gráficos 34A, 34B e 34C).

Similar reversão também foi encontrada pela pré injeção do inibidor seletivo da eNO (L-NIO, 10 µg/10 µl), do inibidor seletivo da iNOS (aminoguanidina, 10 µg/10 µl) e do inibidor seletivo da nNOS (L-NPA, 10 µg/10 µl) (Gráficos 35A, 35B e 35C).

Quando administrados isoladamente no grupo controle, as drogas ou veículos não modificaram o limiar nociceptivo.

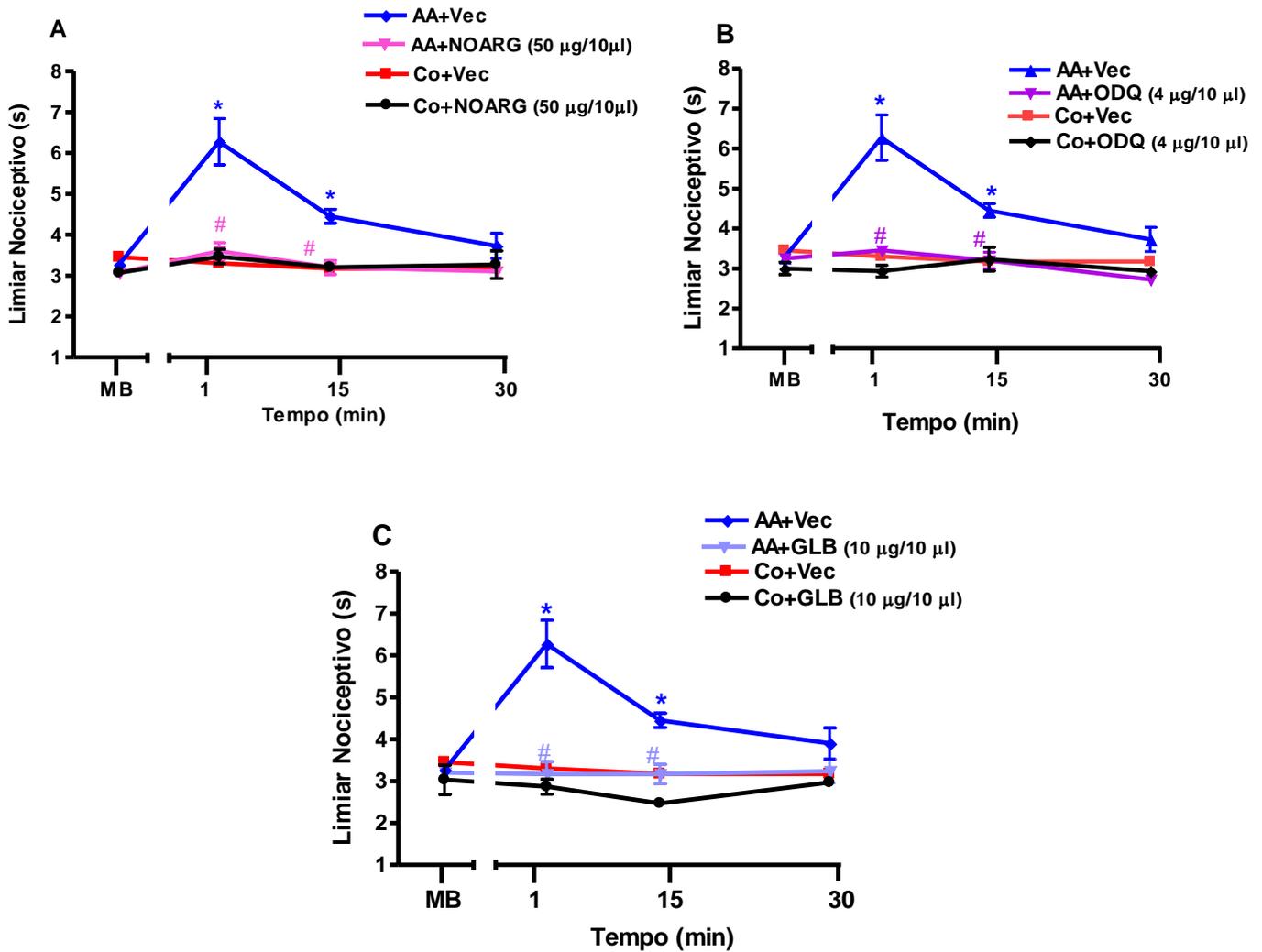


Gráfico 34 - Efeito da administração intratecal dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 42.0 (±3.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo Co. # indic significância a estatística (p<0,05) em relação ao grupo AA+Vec, n=4 por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

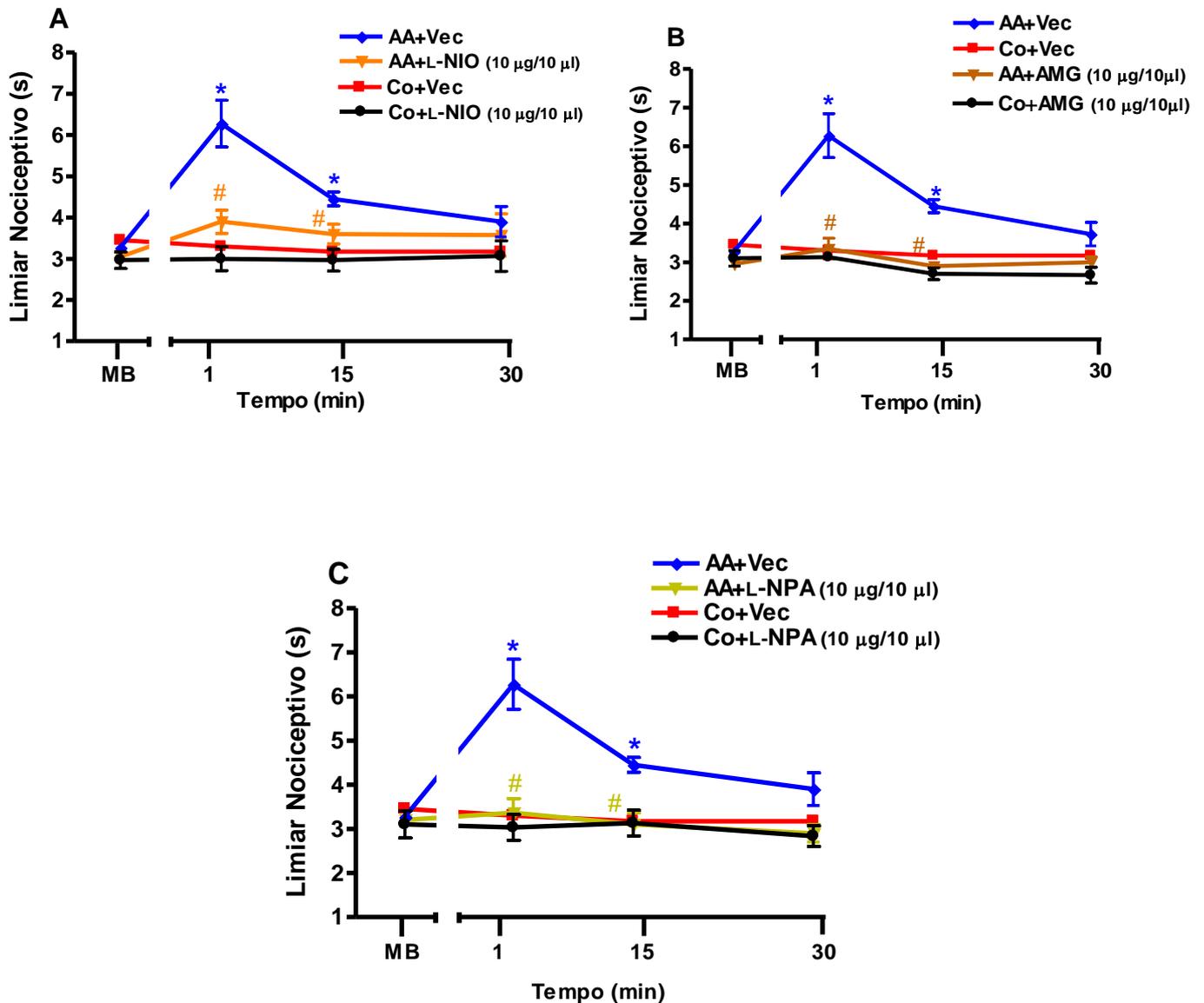


Gráfico 35 - Efeito da administração intratecal dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L -NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L -NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 38.0 (\pm 2.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

21 - Efeito da administração espinal (i.t.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face.

A antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico frente ao estímulo nociceptivo aplicado na região da face do animal foi significativamente revertida ($p < 0,05$) pelos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP}, o NOArg (50 µg/10 µl), o ODQ (4 µg/10 µl) e a glibenclamida (10 µg/10 µl) (Gráficos 36A, 36B e 36C).

Esse efeito antinociceptivo também foi revertido pelos inibidores seletivos para as 3 isoformas da NOS: o L-NIO (10 µg/10 µl), a aminoguanidina (10 µg/10 µl) e o L-NPA (10 µg/10 µl) (Gráficos 37A, 37B e 37C).

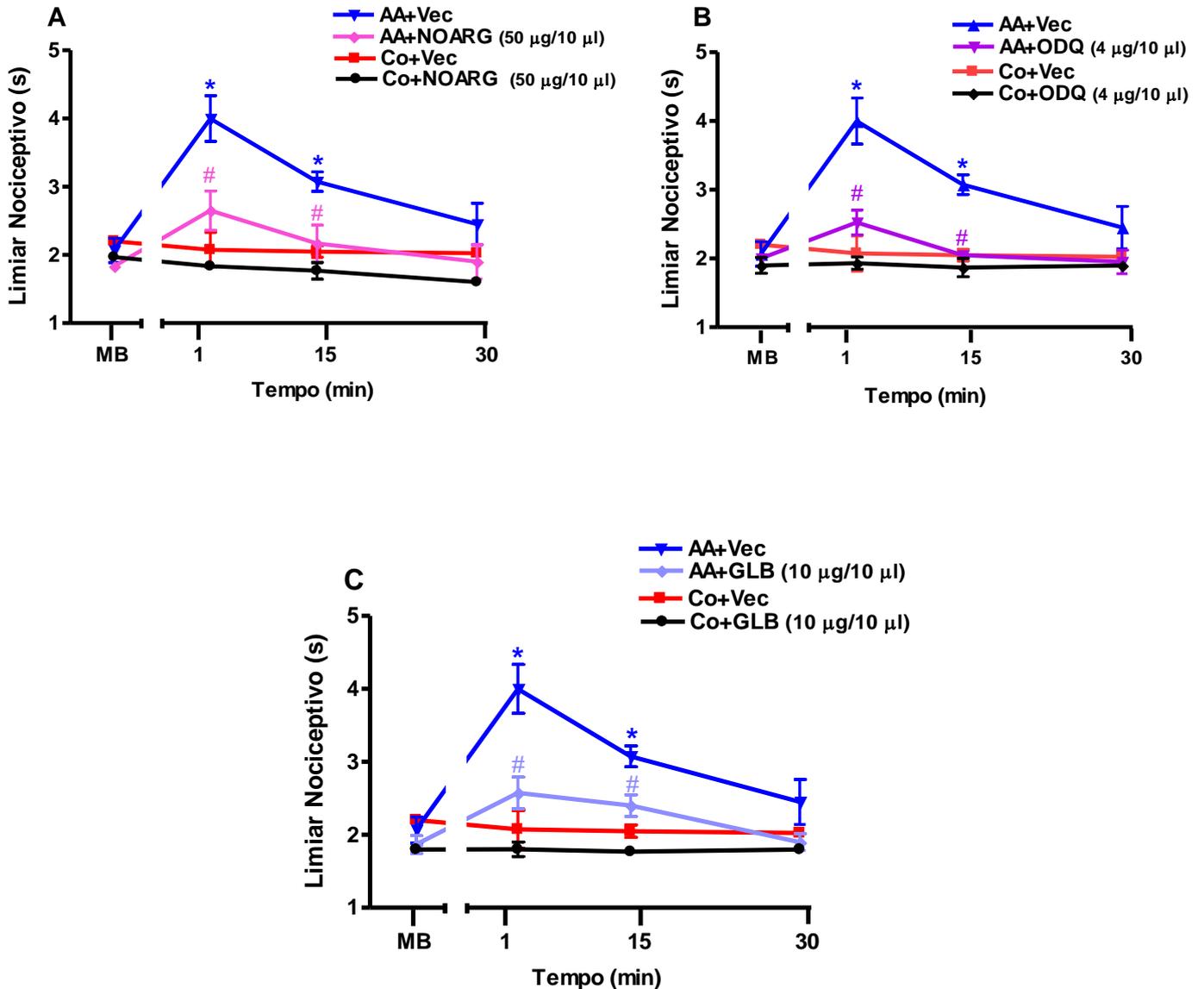


Gráfico 36 - Efeito da administração intratecal dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 40.5 (±3.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo AA+Vec, n=4 por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

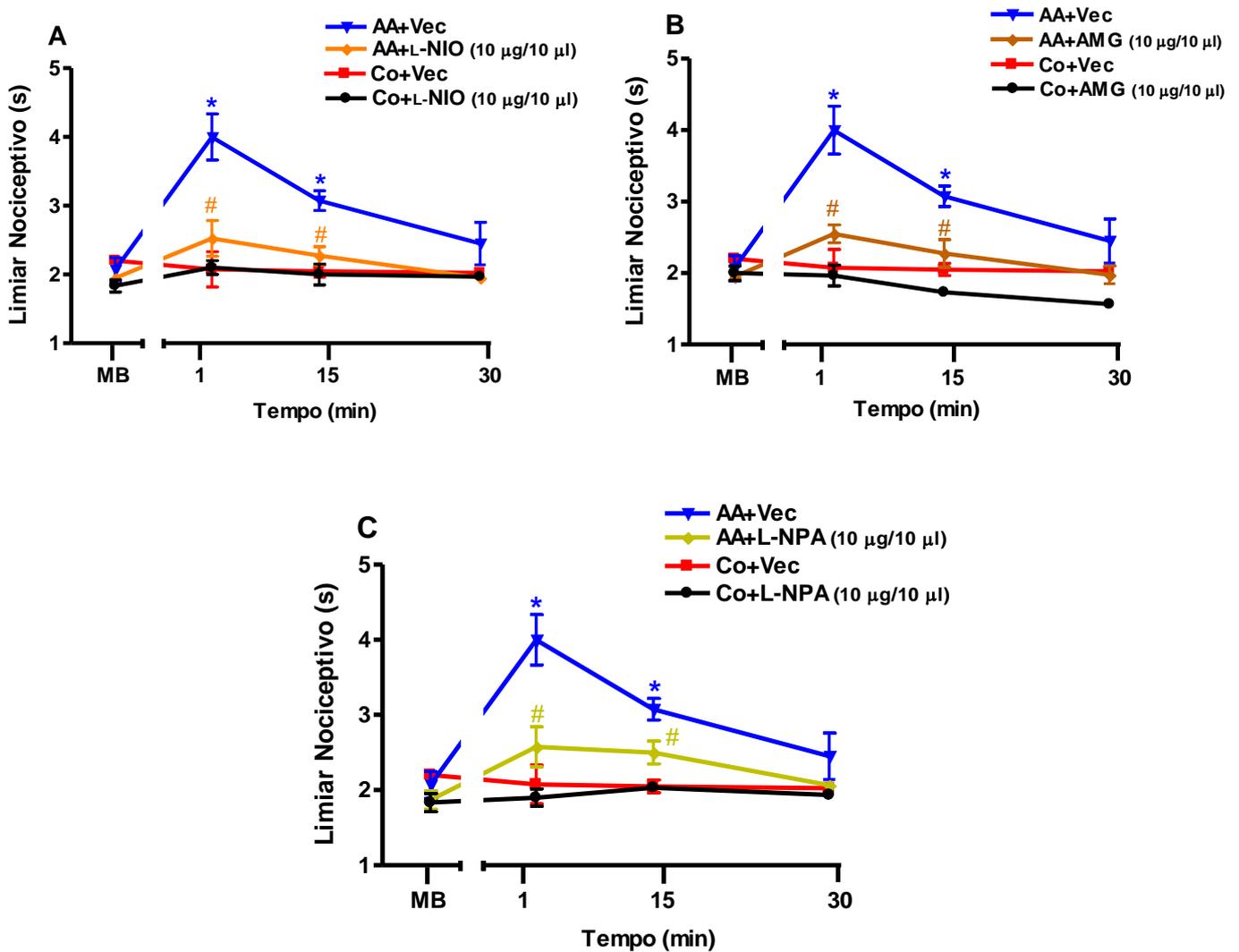


Gráfico 37 - Efeito da administração intratecal dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L-NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L-NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 48.0 (\pm 3.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

22 - Efeito da administração supraespinal (i.c.v.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata.

Como podemos observar de acordo com os gráficos 38A, 38B e 38C, uma possível participação central da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} na antinocicepção induzida pelo exercício no teste de retirada de pata pode ser considerada, pois os inibidores dessa via (NOArg, ODQ e glibenclamida) na dose de 10 µg/5 µl, pré injetados intracerebroventricularmente, reverteram completamente esse efeito.

Além disso, o efeito antinociceptivo foi revertido pelos inibidores seletivos da NOS (L-NIO, 10 µg/5 µl; aminoguanidina, 10 µg/5 µl; L-NPA, 10 µg/5 µl) (Gráficos 39A, 39B e 39C).

Por outro lado, quando administrados isolados, essas drogas ou veículos não alteraram o limiar nociceptivo.

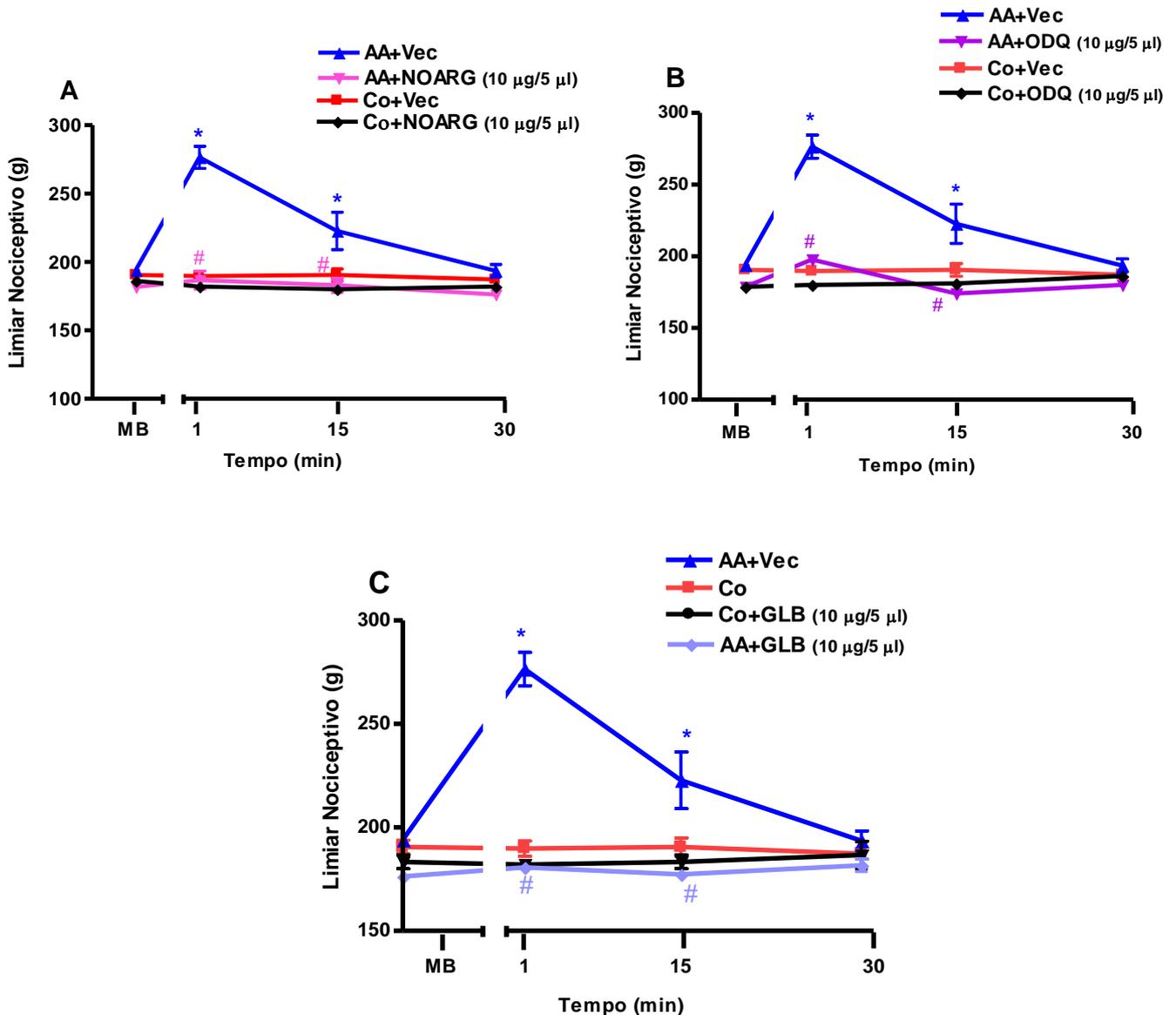


Gráfico 38 - Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 41.5 (+4.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

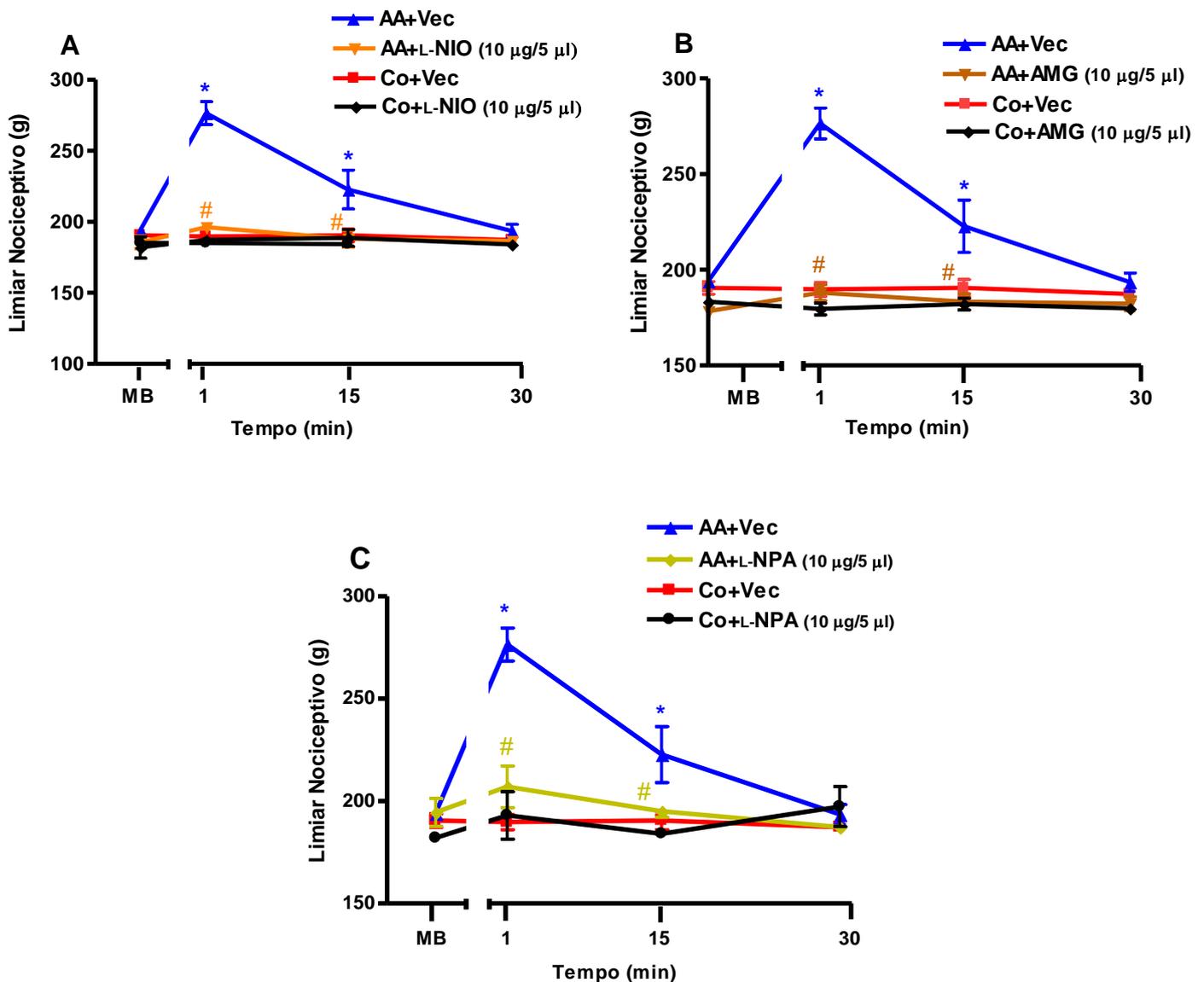


Gráfico 39 - Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores seletivos da óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L-NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L-NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 39.0 (± 3.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica e significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

23 - Efeito da administração supraespinal (i.c.v.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda.

No teste de retirada de cauda, o efeito antinociceptivo produzido após o exercício agudo aeróbico foi significativamente ($p < 0,05$) inibido pelo NOArg (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), ODQ (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e pela glibenclamida (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), ambos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} (Gráficos 40A, 40B e 40C).

Essa inibição pode também ser observada pelos inibidores seletivos da NOS, o L-NIO (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), a aminoguanidina (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) e o L-NPA (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) (Gráficos 41A, 41B e 41C).

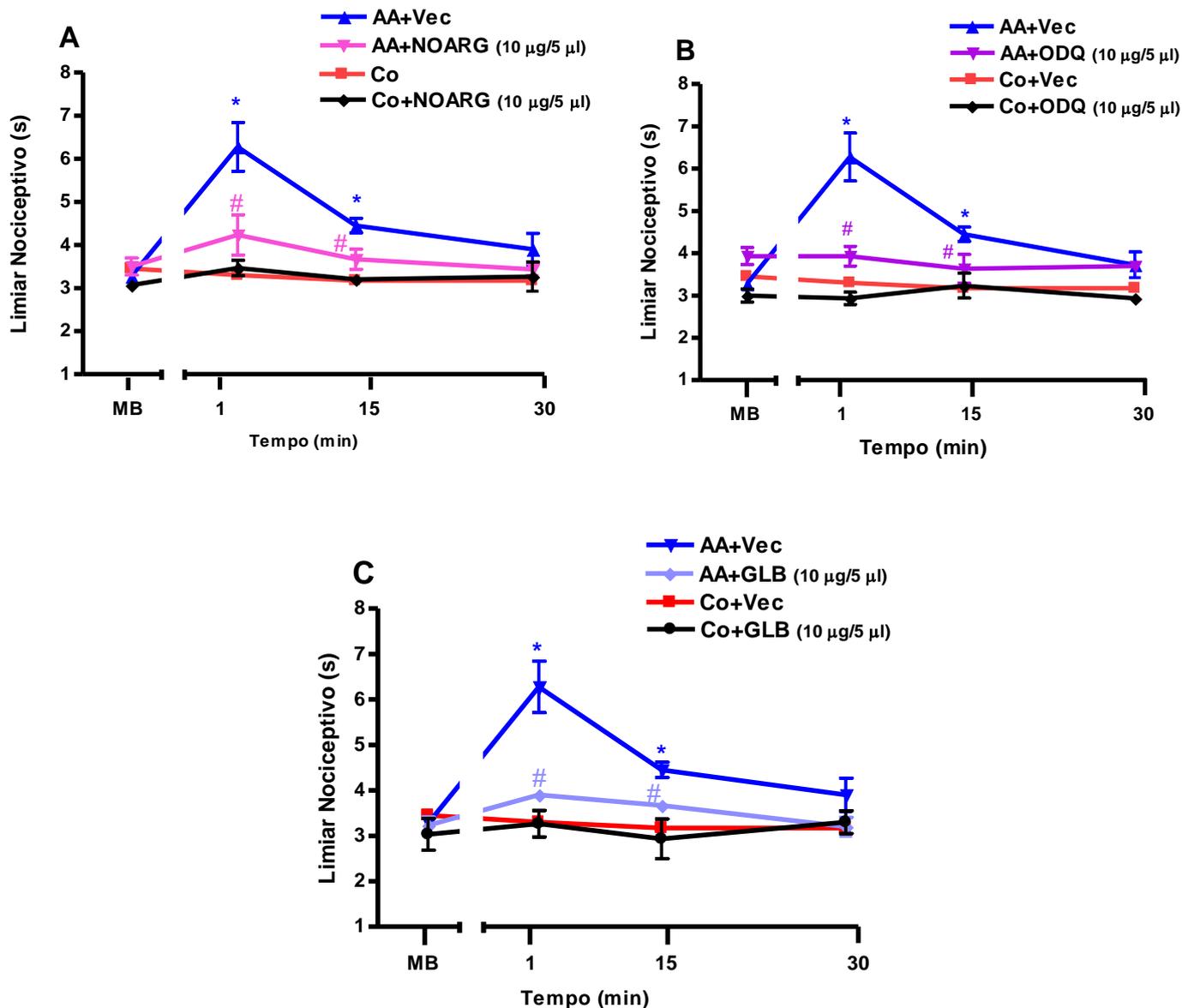


Gráfico 40 - Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 40.0 (±1.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo AA+Vec, n=4 por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

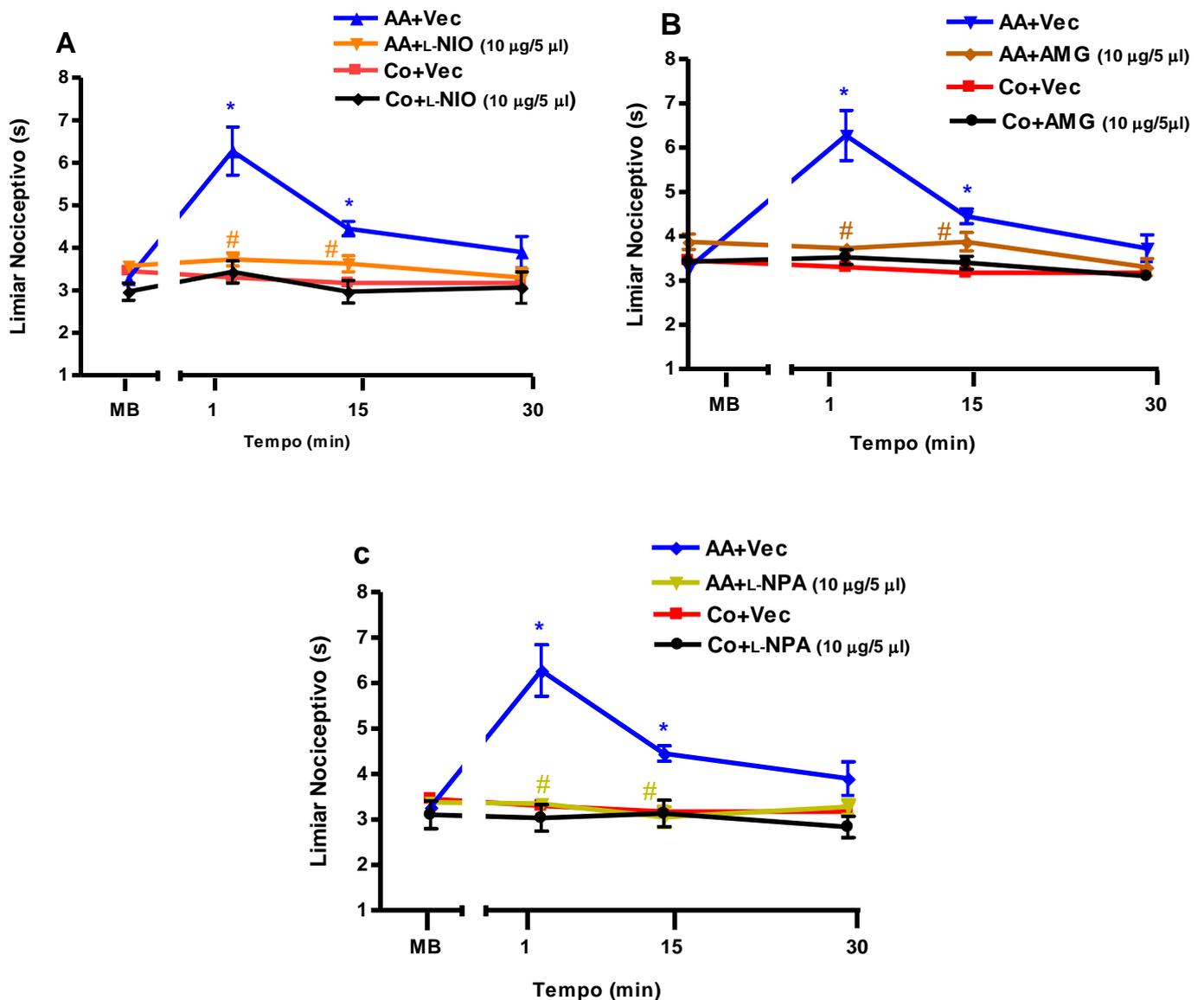


Gráfico 41 - Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por animais que não realizaram o protocolo de exercício. O L-NIO (Gráfico D, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico E, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L-NPA (Gráfico F, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou $46.0 (\pm 3.5)$ min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

24 - Efeito da administração supraespinal (i.c.v.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face.

O inibidor não seletivo da NOS, o NOArg (10 µg/5 µl), reverteu o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício aeróbico no teste de retirada de face (Gráfico 42A). Somando a esse resultado, a participação de toda a via foi posteriormente demonstrada quando o inibidor do guanilil ciclase (ODQ, 10 µg/5 µl) e o bloqueador do K⁺_{ATP} também inibiram esse efeito (Gráficos 42B e 42C).

Outro resultado importante foi demonstrado pelos gráficos 43A, 43B e 43C, os quais demonstram que os inibidores seletivos para as 3 isoformas da NOS (L-NIO, 10 µg/5 µl; aminoguanidina, 10 µg/5 µl ; L-NPA, 10 µg/5 µl) quando administrados previamente ao exercício, também inibiram de maneira significativa (p<0,05) seu efeito antinociceptivo.

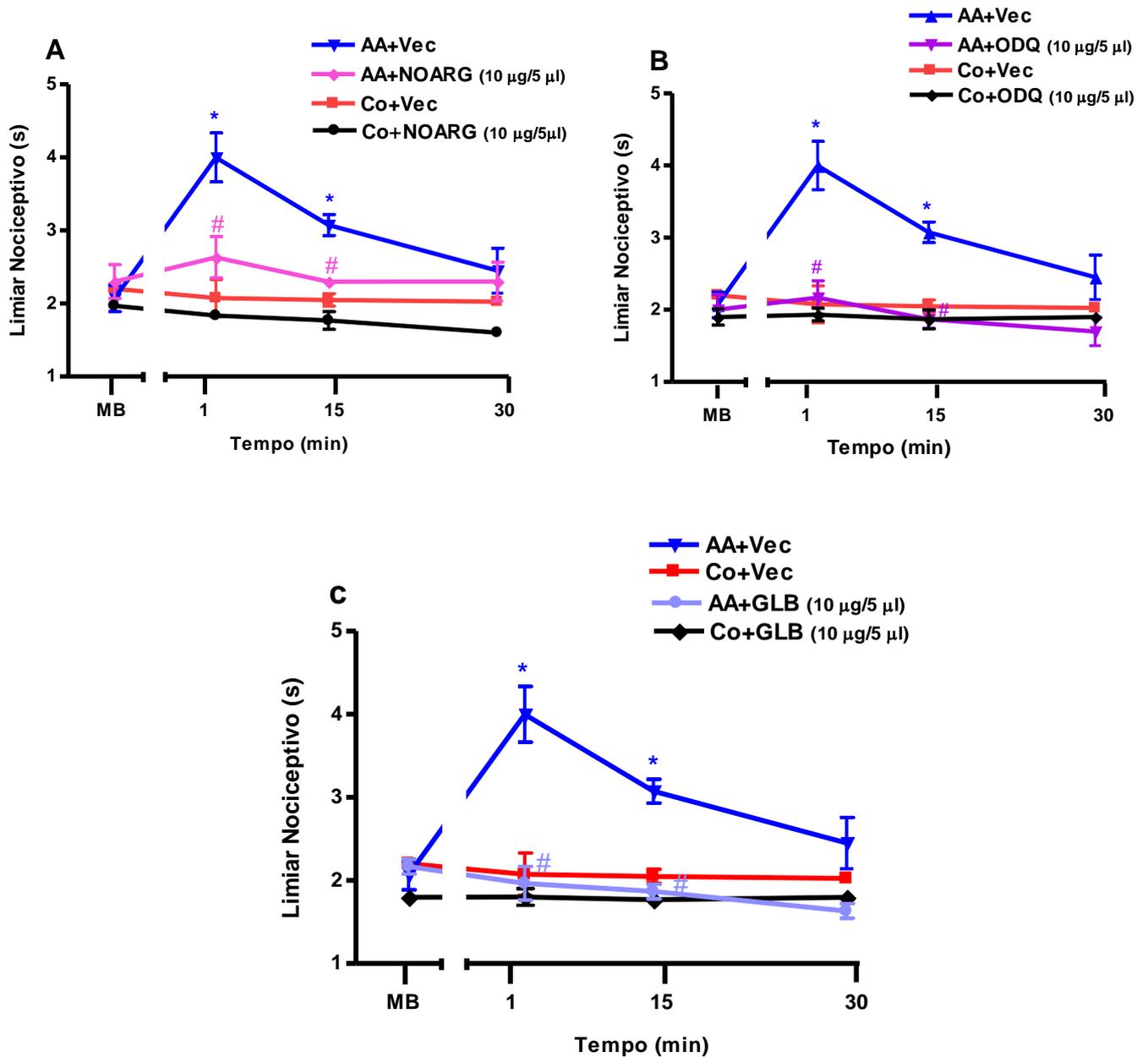


Gráfico 42 - Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 42.0 (±2.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo AA+Vec, n=4 por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

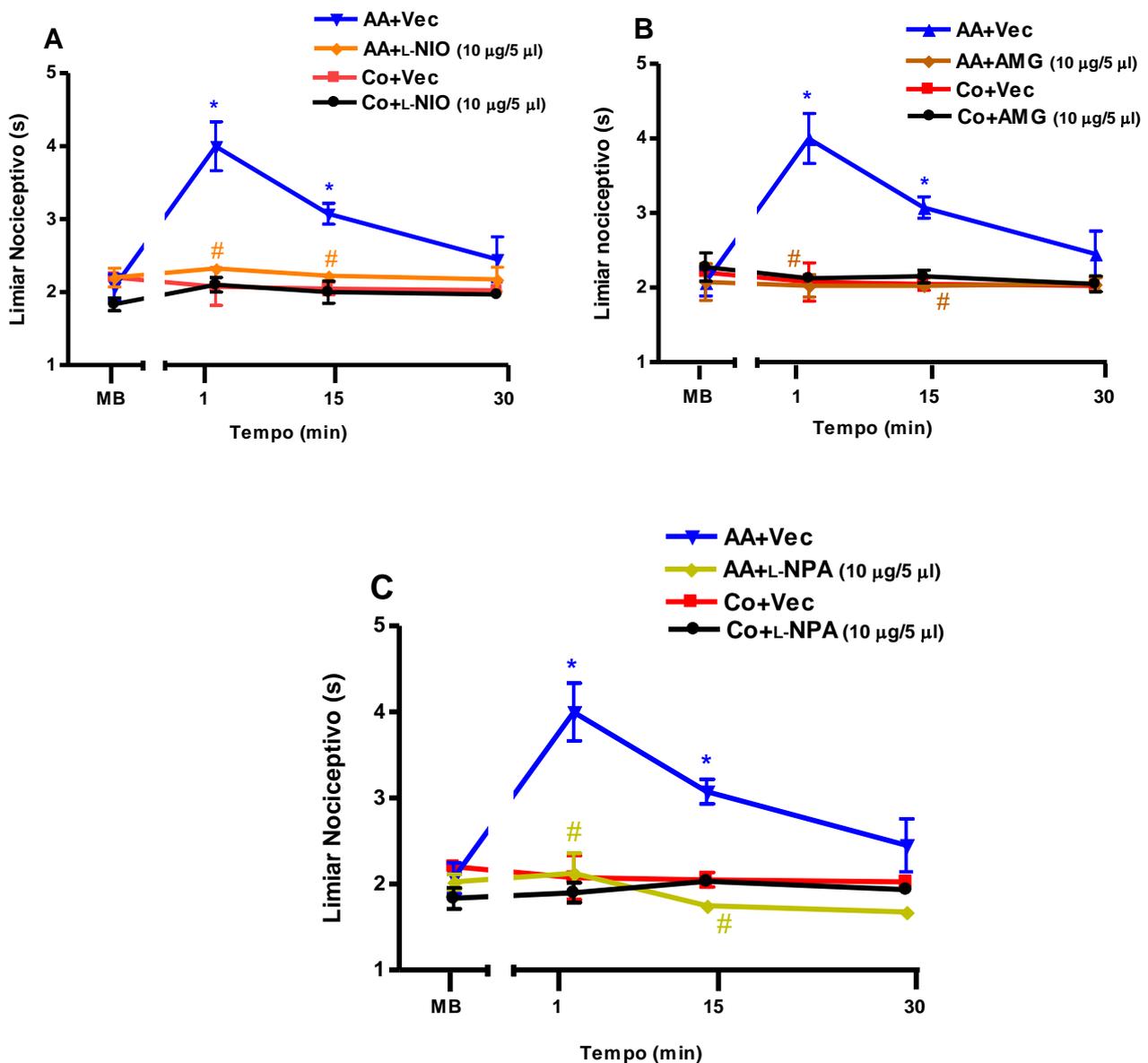


Gráfico 43 - Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L-NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L-NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 47.0 (± 4.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica e significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

25 - Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

Similarmente aos resultados demonstrados com o exercício aeróbico, a via NO/cGMP/K⁺_{ATP} também parece estar envolvida na antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força, onde tal efeito foi revertido tanto pelo inibidor não seletivo da NOS (NOArg, 2 mg/kg) quanto pelo inibidor do guanilil ciclase (ODQ, 2 mg/kg) e pelo bloqueador do K⁺_{ATP} (glibencamida, 2 mg/kg) (Gráficos 44A, 44B e 44C).

Além disso, quando previamente administrados, os inibidores seletivos da NOS (L-NIO, 2 mg/kg; aminoguanidina, 2 mg/kg; L-NPA, 2 mg/kg) reverteram o efeito antinociceptivo encontrado após o exercício de força no teste de retirada de pata (Gráficos 45A, 45B e 45C).

Todas as drogas ou veículos utilizados nesse experimento não alteraram o limiar nociceptivo do grupo controle.

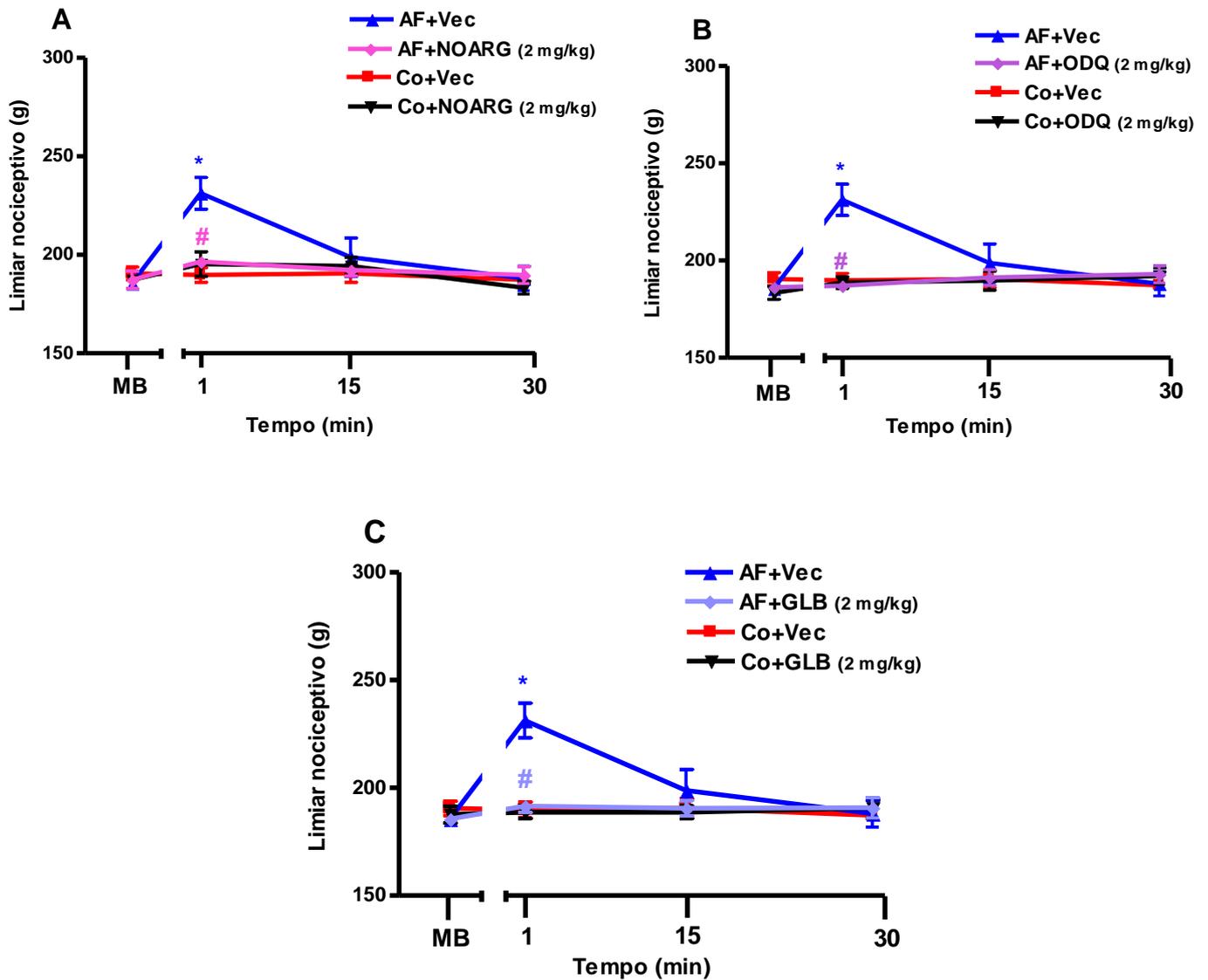


Gráfico 44 - Efeito da administração subcutânea dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica e significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

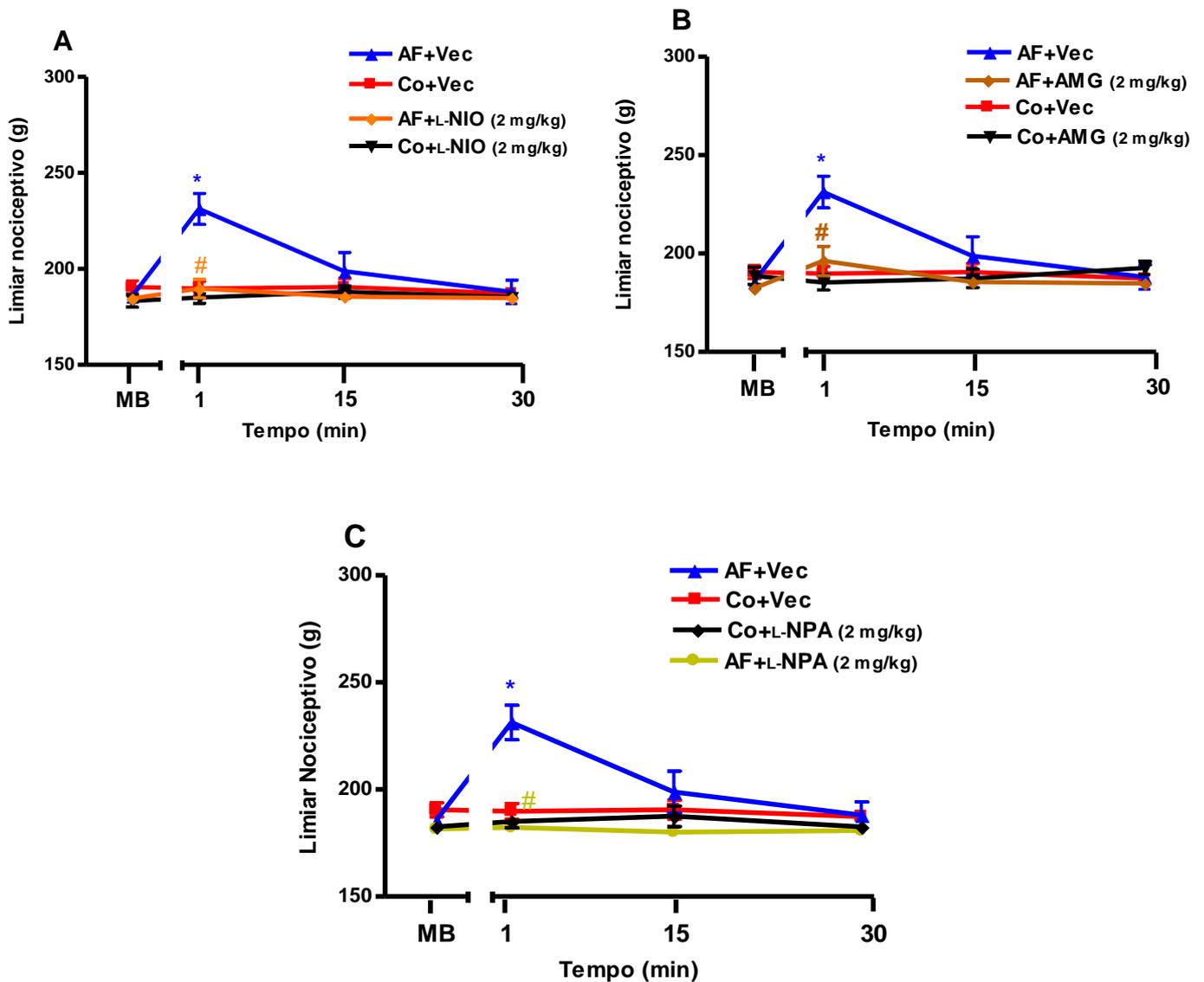


Gráfico 45 - Efeito da administração subcutânea dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L -NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L -NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados subcutaneamente 10 min antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

26 - Efeito da administração espinal (i.t.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

Nos gráficos 46A, 46B e 46C podemos observar que a pré injeção (i.t.) do NOArg (50 µg/10 µl), ODQ (10 µg/10 µl) e a glibenclamida (10 µg/10 µl) reverteu o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício de força, sugerindo assim, uma participação a nível medular da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} nesse efeito.

Nesse contexto, sugerimos também que a antinocicepção encontrada após o exercício de força pode ter o envolvimento das 3 isoformas da NOS, a nível medular, onde a pré injeção intratecal dos inibidores dessas isoformas (L-NIO, 10 µg/10 µl; aminoguanidina, 10 µg/10 µl e o L-NPA, 10 µg/10 µl) inibiram esse efeito (Gráficos 47A, 47B e 47C).

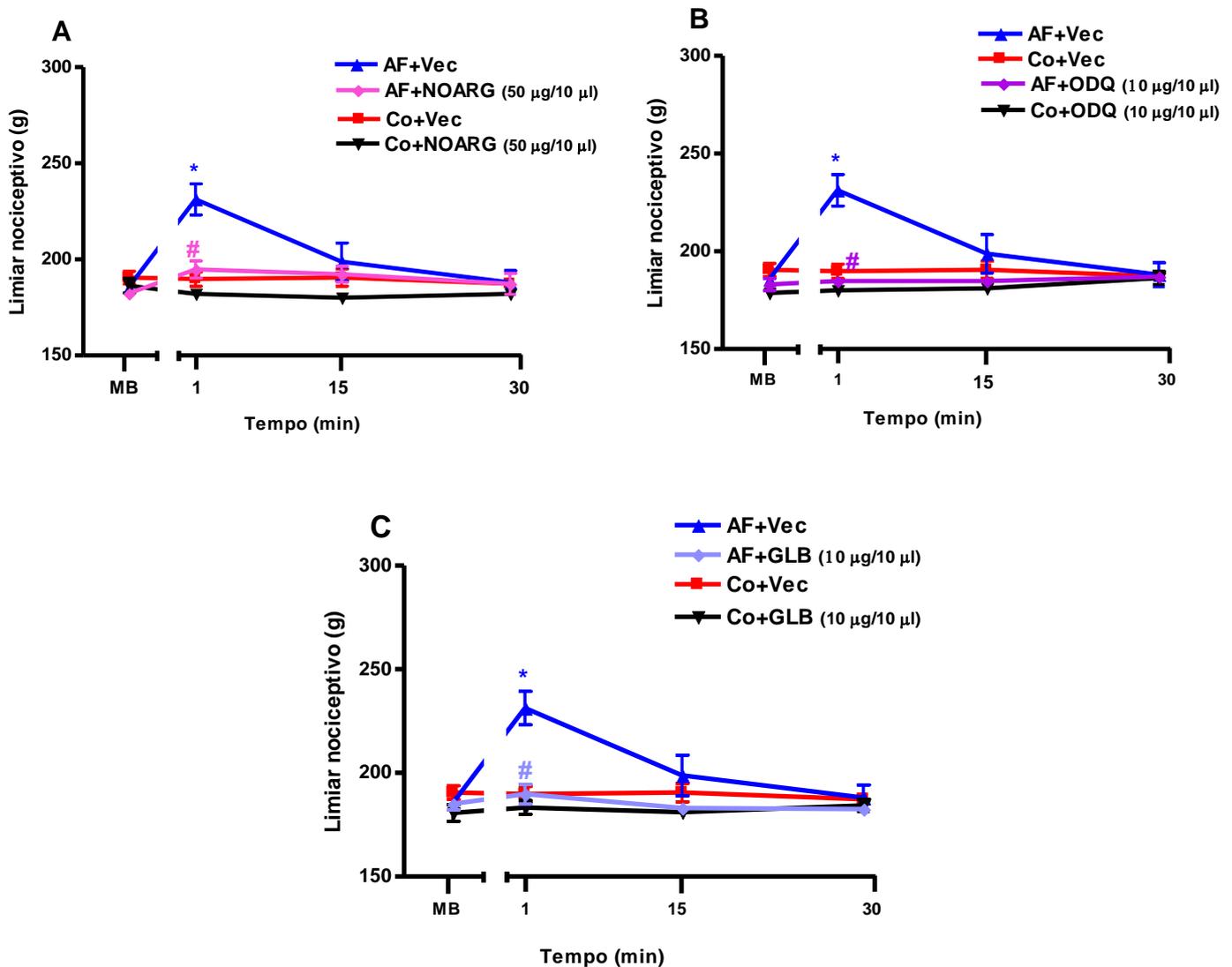


Gráfico 46 - Efeito da administração intratecal dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por animais que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

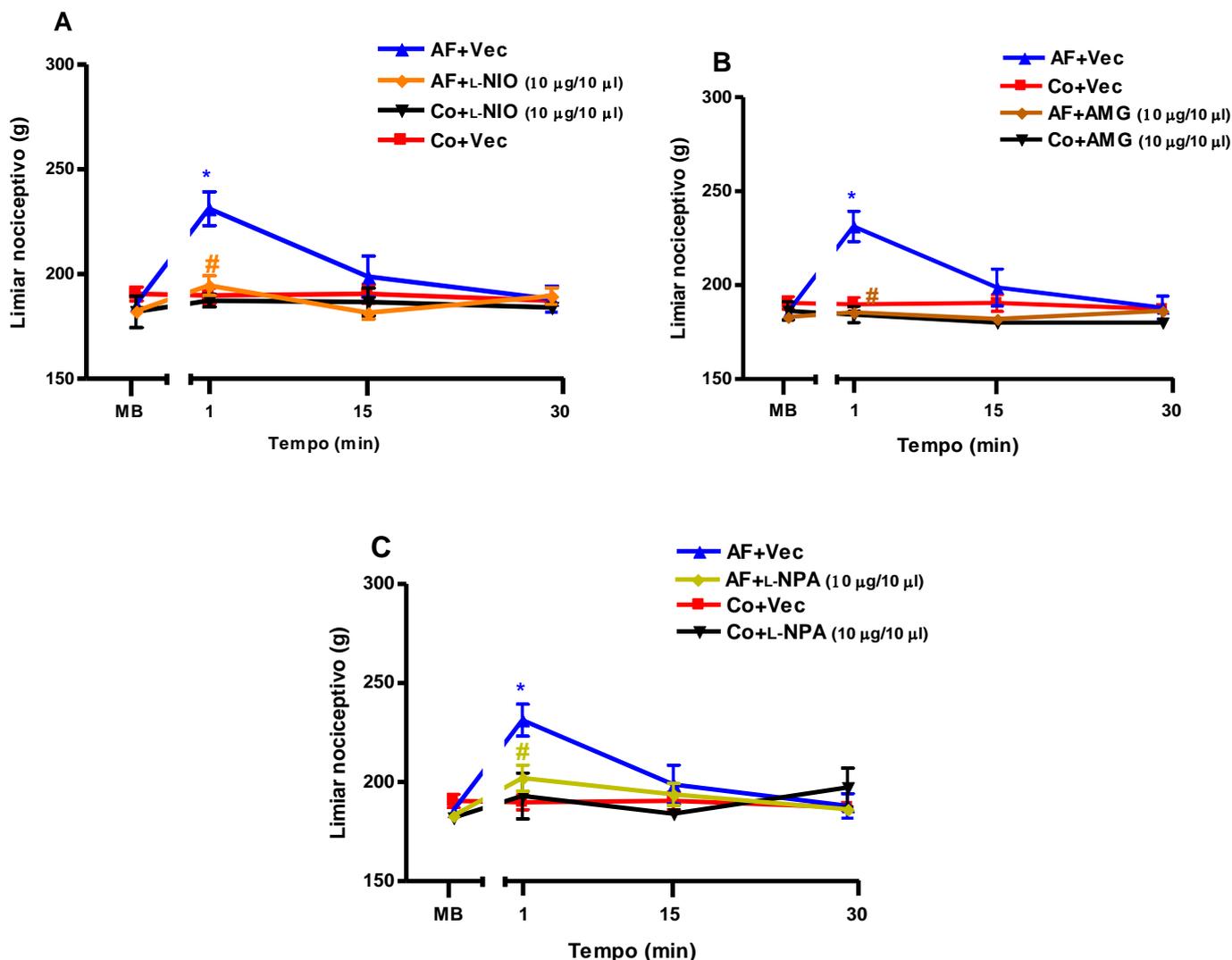


Gráfico 47 - Efeito da administração intratecal dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L -NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L -NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados intratecalmente imediatamente antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

27 - Efeito da administração supraespal (i.c.v.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

A pré injeção intracerebroventricular (i.c.v.) dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} evidenciou uma possível participação central no efeito antinociceptivo induzido após o término das séries do exercício de força. Esse efeito foi revertido tanto pelo inibidor não seletivo da NOS (NOArg, 10 µg/5 µl) quanto pelos inibidores do guanilil ciclase (ODQ, 10 µg/5 µl) e dos canais K⁺_{ATP} (glibenclamida, 10 µg/5 µl) (Gráficos 48A, 48B e 48C).

Ademais, a antinociceção produzida pelo exercício de força também pode ter o envolvimento das 3 isoformas da NOS (iNOS, eNOS e nNOS), visto que os inibidores seletivos para elas (L-NIO, aminoguanidina, L-NPA) também inibiram significativamente (p<0,05) esse efeito (Gráficos 49A, 49B e 49C).

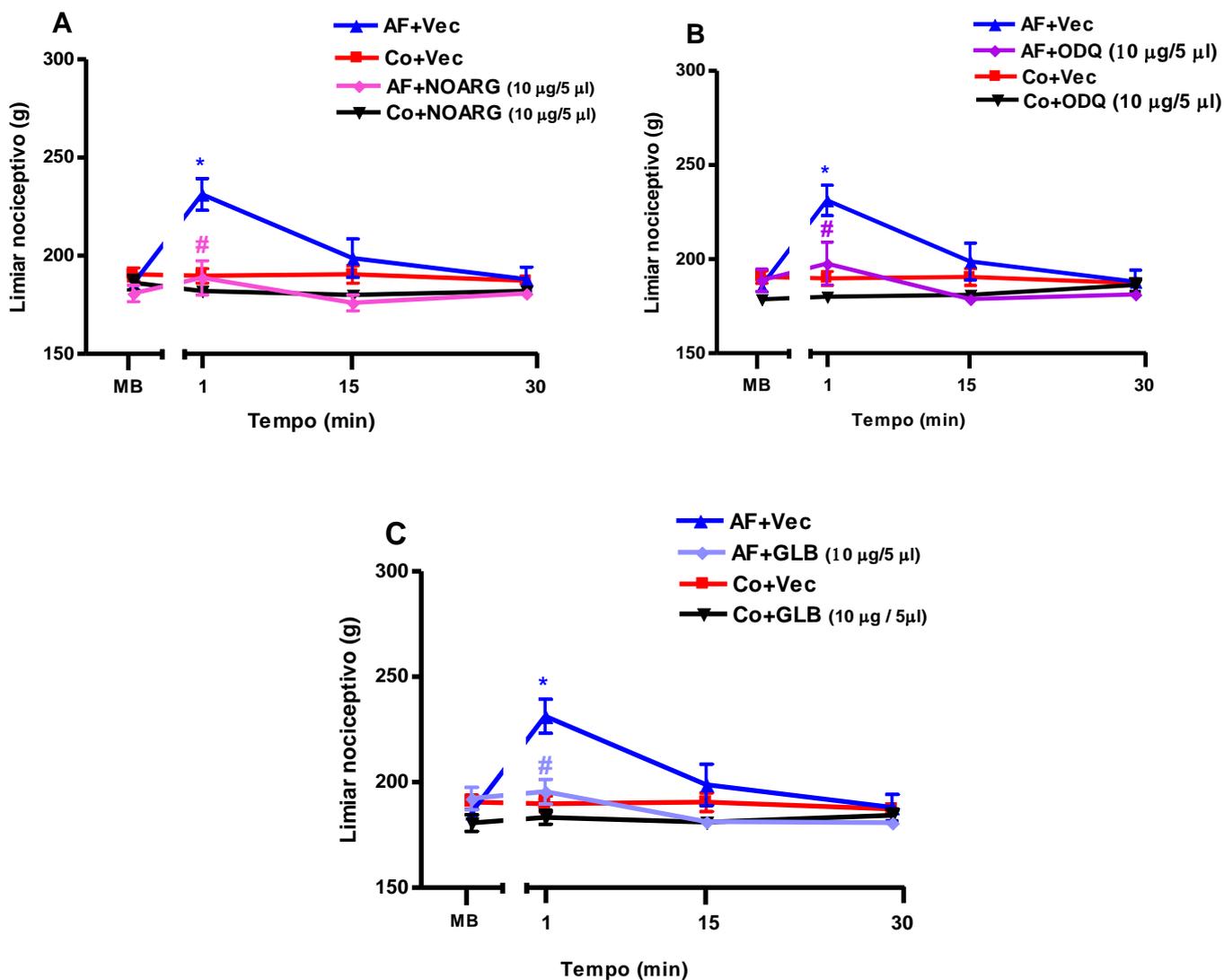


Gráfico 48 - Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O NOArg (Gráfico A, inibidor não seletivo da NO sintase), ODQ (Gráfico B, inibidor do guanilil ciclase) e a GLB (Gráfico C, Glibenclamida, bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico, cGMP: guanosina monofosfato cíclico, K⁺_{ATP}: canais para potássio sensíveis ao ATP.

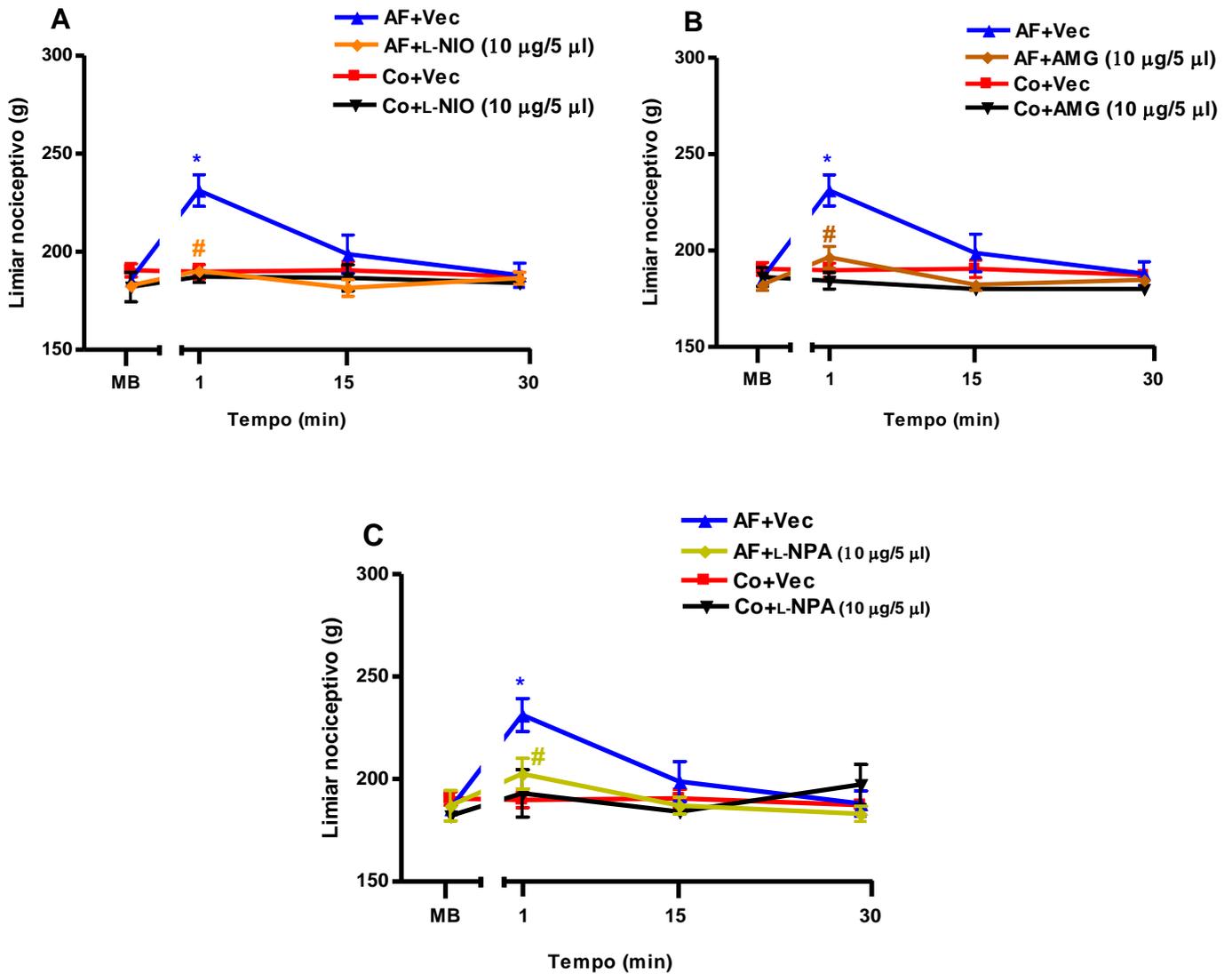


Gráfico 49 - Efeito da administração intracerebroventricular dos inibidores seletivos para a óxido nítrico sintase sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. O L-NIO (Gráfico A, inibidor seletivo da NO sintase endotelial), a AMG (Gráfico B, aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase indutível) e o L-NPA (Gráfico C, inibidor seletivo da NO sintase neuronal) foram injetados intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. NO: óxido nítrico.

28 - Efeito do exercício agudo aeróbico e de força sobre os níveis de nitrito no plasma e no líquido cefalorraquidiano.

Como podemos observar através dos gráficos 50 e 51, ambos protocolos de exercício promoveram aumento dos níveis de nitrito tanto no plasma quanto no líquido, sendo que o maior aumento de nitrito no plasma foi após o exercício aeróbico e, no líquido foi encontrado após o exercício de força.

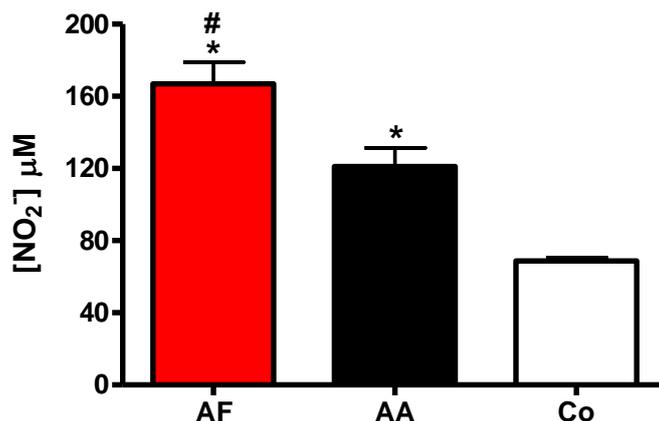


Gráfico 50 – Efeito do exercício agudo aeróbico e de força sobre os níveis de nitrito no líquido de ratos. O exercício agudo aeróbico (AA) e o exercício agudo de força (AF) promoveram um aumento da concentração de nitrito (NO₂⁻) no líquido. A duração do exercício aeróbico foi de aproximadamente 40.0 (±1.0) min. Cada barra representa a média ± E.P.M. da concentração de nitrito. * indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo controle (Co). # indica significância estatística (p<0,05) entre os grupos AF e AA, n=5 por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

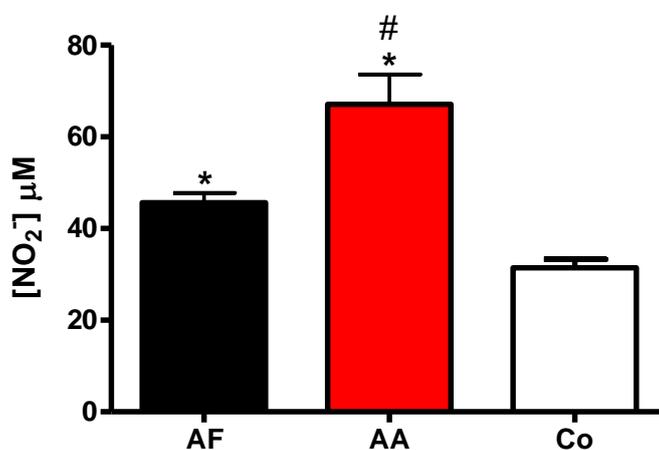


Gráfico 51 – Efeito do exercício agudo aeróbico e de força sobre os níveis de nitrito no plasma de ratos. O exercício agudo aeróbico (AA) e o exercício agudo de força (AF) promoveram um aumento da concentração de nitrito (NO₂⁻) no plasma. A duração do exercício aeróbico foi de aproximadamente 40.0 (±1.0) min. Cada barra representa a média ± E.P.M. da concentração de nitrito. * indica significância estatística (p<0,05) em relação ao grupo controle (Co). # indica significância estatística (p<0,05) entre os grupos AF e AA, n=5 por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

29 - Efeito do exercício agudo de força sobre a liberação de óxido nítrico na Substância Cinzenta Periaqueductal (PAG).

A figura 12 demonstra um maior número de fluorescência do NO nas regiões dorso lateral e ventro lateral da PAG após o exercício de força quando comparados ao grupo controle, formado por animais não exercitados. Também podemos observar que o número de fluorescência do NO foi maior na região dorso lateral comparada a ventro lateral da PAG nos animais exercitados. Os gráficos 52A e 52B representam o aumento área fracionada e da densidade integrada da fluorescência de NO em relação ao grupo exercitado comparado ao grupo controle (não-exercitado).

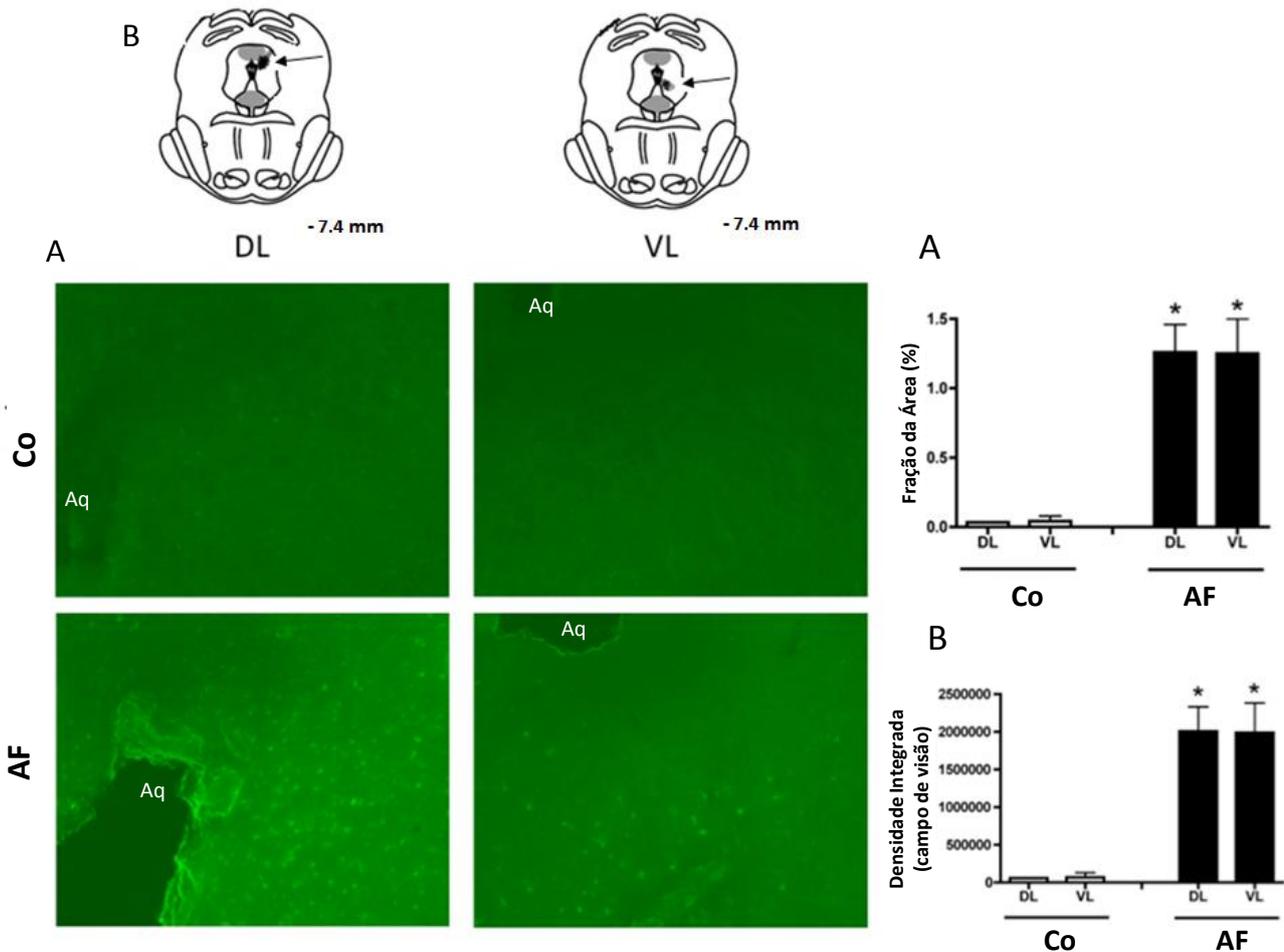


Figura 16 – Efeito do exercício agudo de força sobre a liberação de óxido nítrico na Substância Cinzenta Periaqueductal (PAG). **A:** O exercício agudo de força (AF) induziu um aumento da fluorescência de óxido nítrico nas regiões dorso lateral (DL) e ventro lateral (VL) da PAG. **B:** As figuras representam a área de secção da PAG (caudal), com as respectivas regiões investigadas, de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (1986). **Gráfico 52:** Cada barra representa a média \pm E.P.M. da fração de área (**A**) e da densidade integrada (**B**). * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Co). One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Aq = Aqueduto cerebral, NO= Óxido nítrico, n=4 por grupo.

30 - Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata.

De acordo com Millan (2002) os subtipos de receptores α_2 como α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} parecem estar envolvidos na antinocicepção (Millan, 2002). Como o mecanismo de ação dos receptores α_{2B} nesse efeito ainda está pouco elucidado e, devido a isso optamos por utilizar antagonistas para os receptores α_{2A} e α_{2C} .

Inicialmente para verificar a participação dos receptores α_2 no efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico foi utilizado a ioimbina (4 mg/kg), um antagonista não seletivo para esses receptores. Podemos observar no gráfico 53A que esse antagonista reverteu de maneira significativa ($p < 0,05$) a antinocicepção encontrada após o exercício aeróbico.

Diante desse resultado, confirmando a participação de receptores α na antinocicepção, o próximo intuito do trabalho foi investigar a participação dos subtipos α_{2A} e α_{2C} nesse efeito. Nesse sentido, podemos verificar que tanto a rauvolscina (antagonista seletivo para o receptor α_{2C} , 4 mg/kg) quanto o BRL 44408 (antagonista seletivo para o receptor α_{2A} , 4 mg/kg) reverteram significativamente ($p < 0,05$) a antinocicepção produzida pelo exercício aeróbico (Gráficos 53B e 53C).

Nenhuma das drogas ou veículos utilizados nesse e nos próximos experimentos promoveram alterações do limiar nociceptivo do grupo controle.

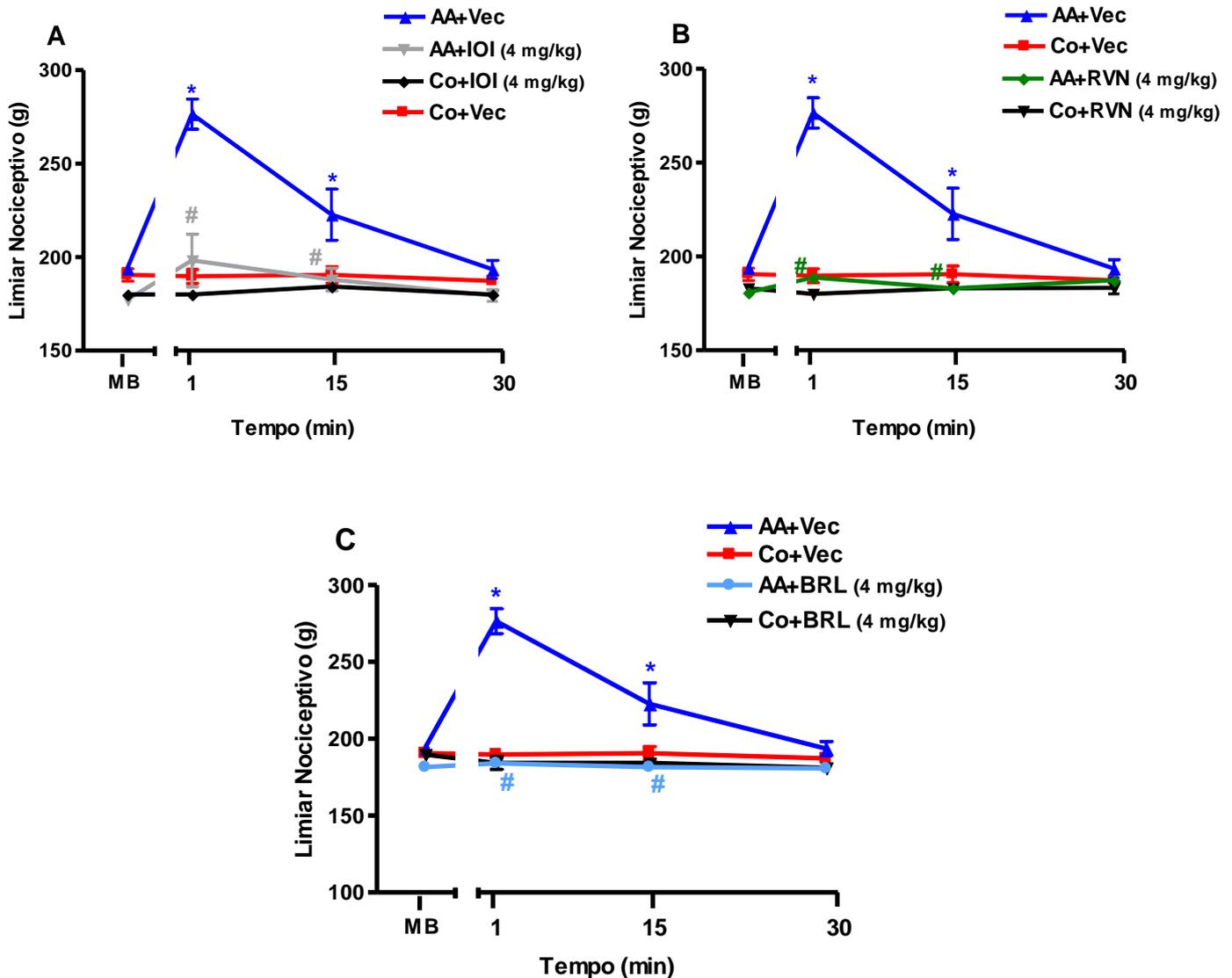


Gráfico 53 - Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores $\alpha 2$ noradrenérgicos sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. A IOI (Gráfico A, ioimbina, antagonista não seletivo para os receptores $\alpha 2$ noradrenérgicos), RVN (Gráfico B, rauvolscina, antagonista seletivo para o receptor $\alpha 2C$ noradrenérgico) e BRL 44408 (Gráfico C, antagonista seletivo para o receptor $\alpha 2A$ noradrenérgico) foram injetados subcutaneamente 10 antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 41.0 (0.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

31 - Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda.

No teste de retirada de cauda a pré injeção sistêmica de ioimbina (4 mg/kg) reverteu completamente o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico agudo (Gráfico 54A).

Além disso, os inibidores seletivos para os receptores α_2C (rauvolscina, 8 mg/kg) e α_2A (BRL 44408, 4 mg/kg) confirmaram o envolvimento desses receptores após inibirem significativamente ($p < 0,05$) a antinocicepção encontrada após o exercício aeróbico (Gráficos 54B e 54C). Porém, a rauvolscina na dose de 4 mg/kg não alterou o efeito antinociceptivo (Gráfico 54B).

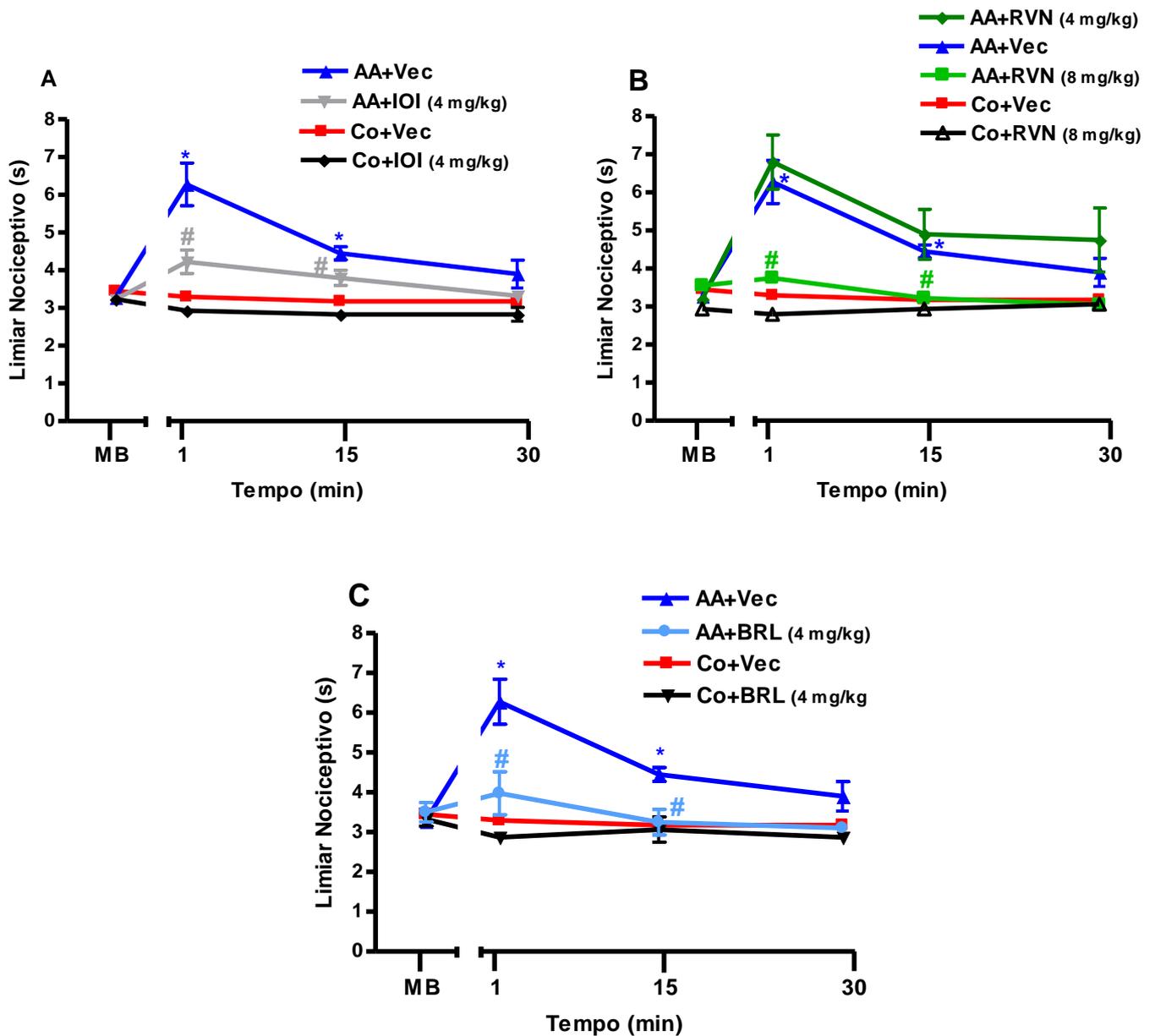


Gráfico 54 - Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de cauda ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. A IOI (Gráfico A, ioimibina, antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos), RVN (Gráfico B, rauvolscina, antagonista seletivo para o receptor α_{2C} noradrenérgico) e BRL 44408 (Gráfico C, antagonista seletivo para o receptor α_{2A} noradrenérgico) foram injetados subcutaneamente 10 antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 45.0 (+1.5) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

32 - Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face.

A antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico frente ao teste de retirada de face também foi revertida pela ioimbina (4 mg/kg) (Gráfico 55A). Desse modo, depois de confirmada a participação dos receptores α_2 noradrenérgicos na antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico, foi então avaliada a participação dos subtipos α_{2C} e α_{2A} , utilizando os antagonistas seletivos rauvolscina (4 mg/kg) e BRL 44408 (4 mg/kg). Então, após a pré injeção desses antagonistas podemos observar, através dos gráficos 55B e 55C, que o efeito antinociceptivo também foi inibido. Essas mesmas drogas não alteraram o limiar nociceptivo dos animais controle.

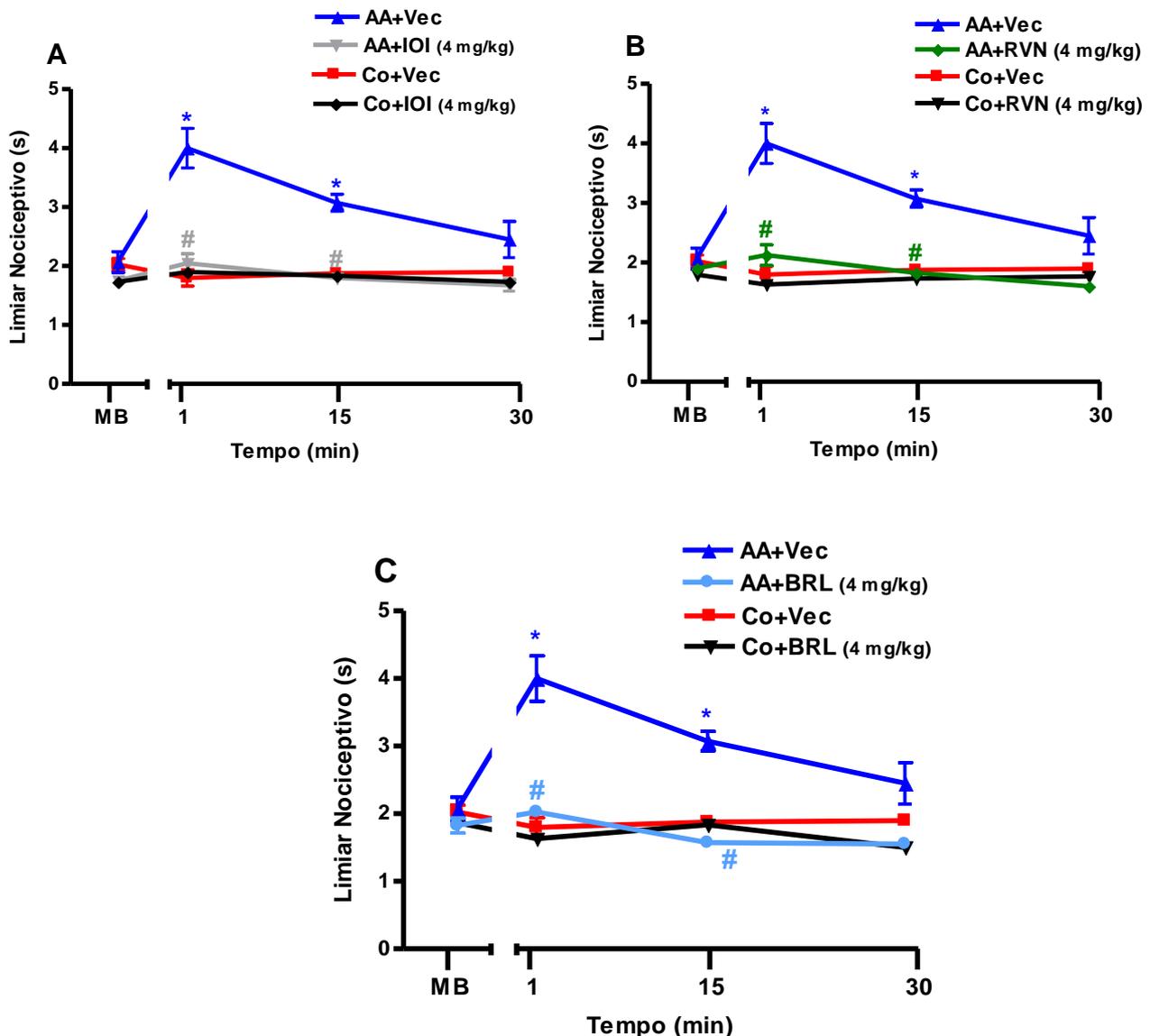


Gráfico 55 - Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores $\alpha 2$ noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de face ao estímulo térmico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. A IOI (Gráfico A, ioimbina, antagonista não seletivo para os receptores $\alpha 2$ noradrenérgicos), RVN (Gráfico B, rauvolscina, antagonista seletivo para o receptor $\alpha 2C$ noradrenérgico) e BRL 44408 (Gráfico C, antagonista seletivo para o receptor $\alpha 2A$ noradrenérgico) foram injetados subcutaneamente 10 antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 49.0 (± 2.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

33 - Efeito da administração espinal (i.t.) do antagonista para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata, cauda e face.

Diferente dos resultados encontrados após a injeção sistêmica, a administração intratecal de ioimbina, tanto na dose de 5 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ quanto na dose de 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$, não alterou o efeito antinociceptivo encontrado após o exercício agudo aeróbico em nenhum teste algesimétrico (Gráficos 56A, 56B e 56C).

Sendo assim, após ter verificado o não envolvimento do receptor α_2 noradrenérgico nesse efeito, não foi necessário investigar a participação de seus subtipos.

Diante disso, esse experimento sugere o não envolvimento do receptor α_2 noradrenérgico na antinocicepção induzida pelo exercício a nível medular, avaliado pelos testes de retirada de pata, cauda e face.

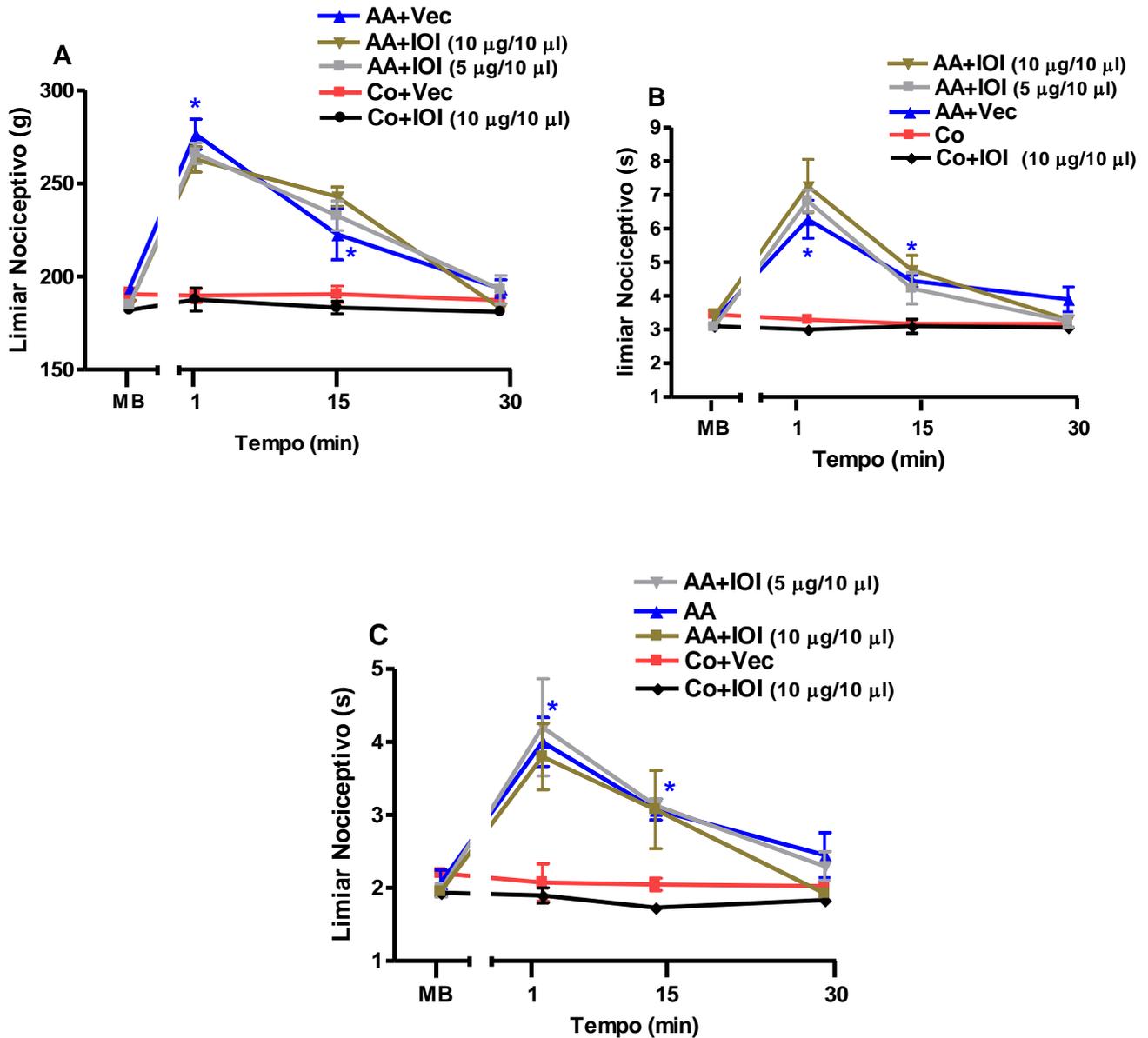


Gráfico 56 - Efeito da administração intratecal do antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico nos teste de retirada de pata, cauda e face. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. A IOI (ioimbina, antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos) foi injetada intratecalmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 46.0 (\pm 1.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Gráfico A: representa o teste de retirada de pata, gráfico B: representa o teste de retirada de cauda e o gráfico C representa o teste de retirada de face.

34- Efeito da administração supraespinal (i.c.v.) do antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata, cauda e face.

Como podemos observar de acordo com os gráficos 57A, 57B e 57C, a ioimbina também não alterou o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício aeróbico em nenhum teste algésimétrico, quando pré injetada intracerebroventricularmente nas doses 30 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ e 60 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$.

Esse resultado associado ao previamente encontrado pela via i.t. pode sugerir que o receptor α_2 noradrenérgico não participa do efeito antinociceptivo induzido pelo exercício agudo aeróbico a nível de sistema nervoso central.

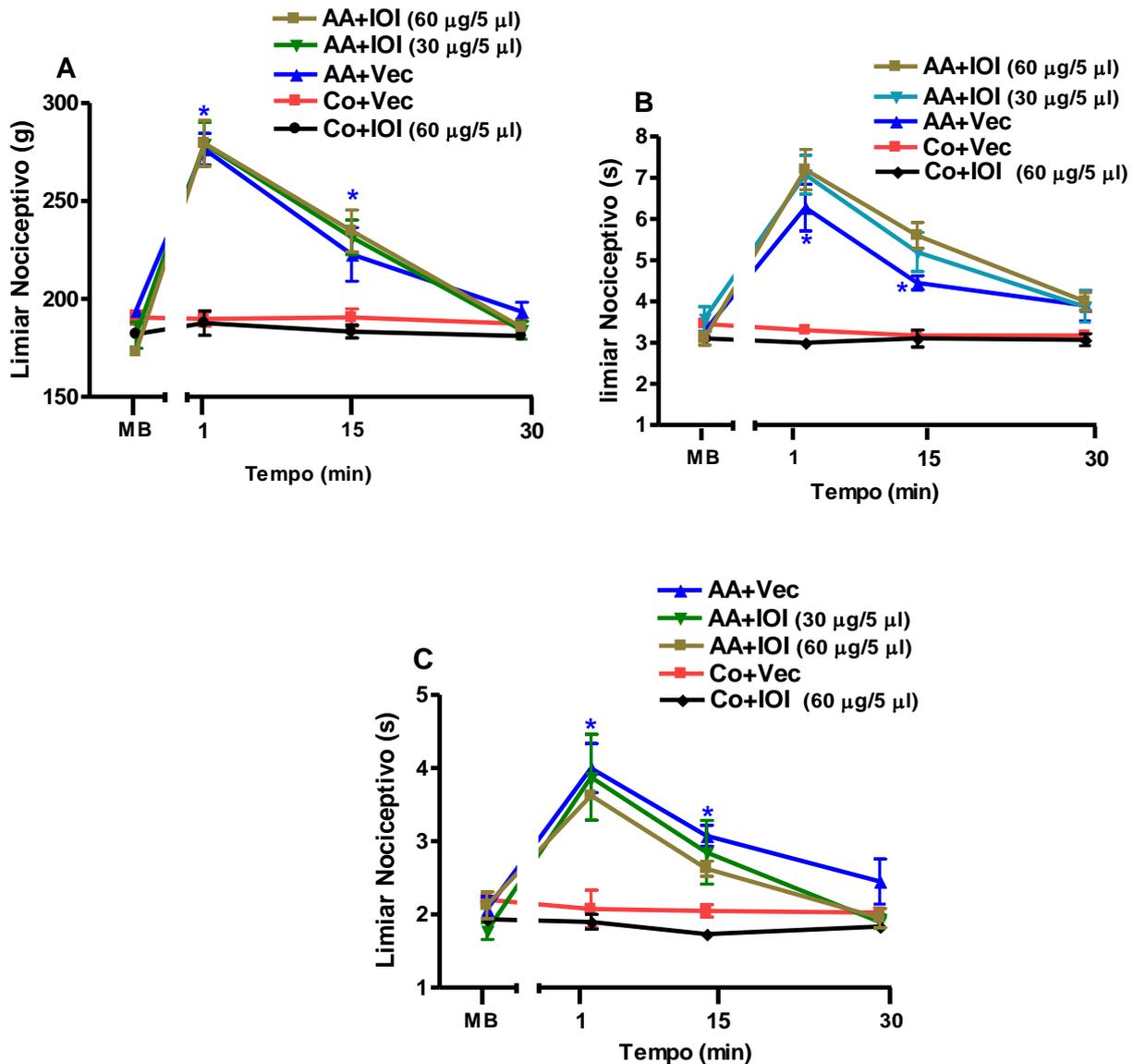


Gráfico 57 - Efeito da administração intracerebroventricular do antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico nos teste de retirada de pata, cauda e face. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. A IOI (ioimbina, antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos) foi injetada intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício aeróbico, o qual perdurou 44.0 (± 1.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n = 4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Gráfico A: representa o teste de retirada de pata, gráfico B: representa o teste de retirada de cauda e o gráfico C representa o teste de retirada de face.

35 - Efeito da administração sistêmica (s.c.) dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

Similarmente aos resultados encontrados pelo exercício aeróbico no teste de retirada de pata, a antinocicepção induzida pelo exercício de força também foi significativamente ($p < 0,05$) revertida tanto pela administração sistêmica prévia de ioimbina (4 mg/kg) quanto pelos antagonistas seletivos para os receptores α_2 , a rauvolscina (4 mg/kg) e BRL 44408 (4 mg/kg) (Gráficos 58A, 58B e 58C).

As drogas ou veículos utilizados nesse experimento não alteraram o limiar nociceptivo do grupo controle quando administradas separadamente.

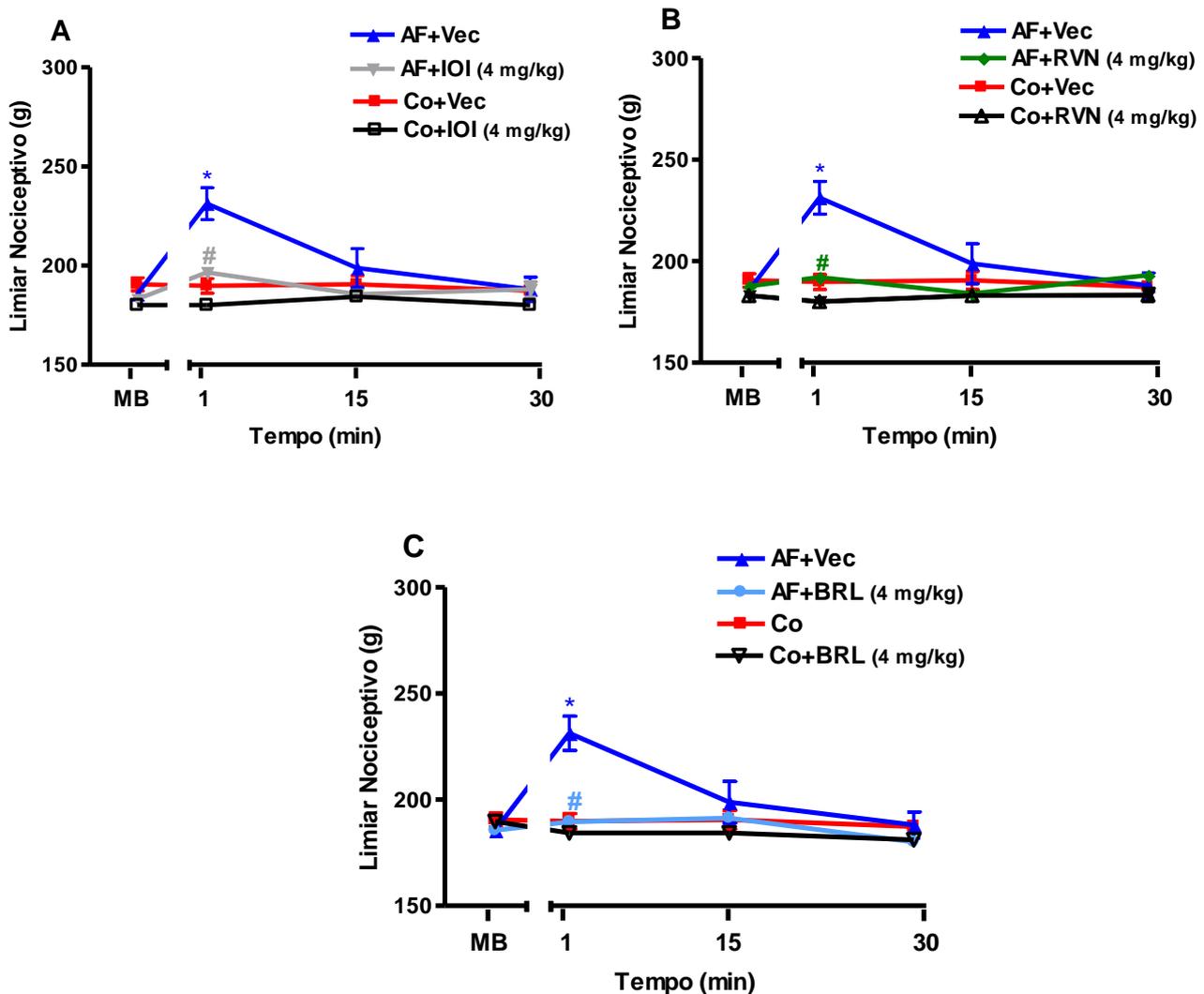


Gráfico 58 - Efeito da administração subcutânea dos antagonistas para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por animais que não realizaram o protocolo de exercício. A IOI (Gráfico A, ioimbina, antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos), RVN (Gráfico B, rauvolscina, antagonista seletivo para o receptor α_{2C} noradrenérgico) e BRL 44408 (Gráfico C, antagonista seletivo para o receptor α_{2A} noradrenérgico) foram injetados subcutaneamente 10 antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

36 - Efeito da administração espinal (i.t.) do antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

O antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos (ioimbina, 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) pré injetado intratecalmente não reverteu o efeito antinociceptivo induzido pelo exercício agudo de força (Gráfico 59). Interessantemente, a ioimbina nessa mesma dose também não reverteu a antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico, anteriormente demonstrado pelo gráfico 56A. Quando administrada no grupo controle essa droga não alterou o limiar nociceptivo.

Sendo assim, podemos descartar uma possível participação desses receptores nesse efeito a nível espinal.

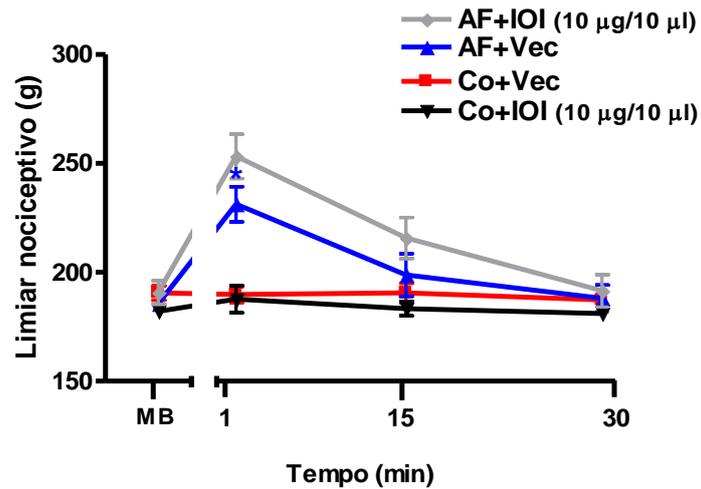


Gráfico 59 - Efeito da administração intratecal do antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força nos teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por ratos que não realizaram o protocolo de exercício. A IOI (ioimbina, antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos) foi injetada intratecalmente imediatamente antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. [#] indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

37 - Efeito da administração supraespinal (i.c.v.) do antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

Reforçando os resultados previamente demonstrados do não envolvimento central dos receptores α_2 noradrenérgicos no efeito antinociceptivo induzido pelo exercício, o antagonista não seletivo ioimbina (30 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ e 60 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) também não reverteu esse efeito quando administrada intracerebroventricularmente previamente ao exercício de força (Gráfico 60). Sendo esse resultado também muito similar ao encontrado com o exercício aeróbico.

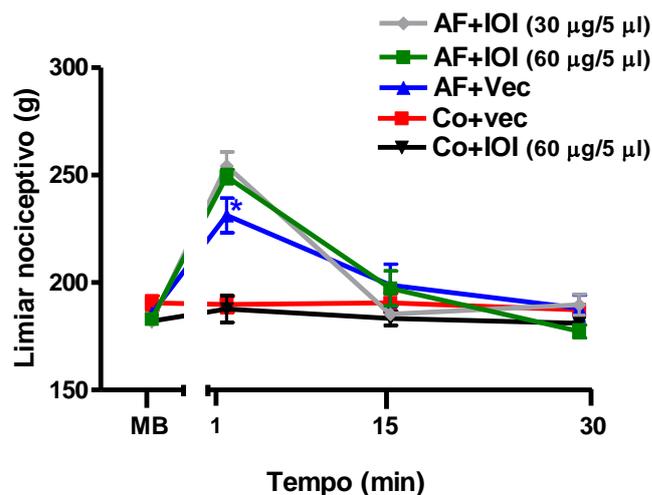


Gráfico 60 - Efeito da administração intracerebroventricular do antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo de força nos teste de retirada de pata ao estímulo mecânico. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por animais que não realizaram o protocolo de exercício. A IOI (ioimbina, antagonista não seletivo para os receptores α_2 noradrenérgicos) foi injetada intracerebroventricularmente imediatamente antes do início do exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

38 - Efeito do inibidor seletivo da neurotransmissão noradrenérgica sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo aeróbico no teste de retirada de pata, cauda e face.

De acordo com os experimentos anteriores, o sistema noradrenérgico parece estar envolvido na antinocicepção induzida pelo exercício a nível periférico, pois a pré administração da ioimbina reverteu esse efeito somente quando por via sistêmica (s.c.).

Sendo assim, para reforçar essa hipótese nós utilizamos um inibidor seletivo da neurotransmissão noradrenérgica (guanetidina, 30 mg/kg, i.p.), o qual pode atuar periféricamente no terminais noradrenérgicos impedindo tanto o armazenamento na vesícula do terminal noradrenérgico quanto a exocitose da noradrenalina.

Desse modo, os animais que foram pré tratados com a guanetidina não apresentaram mudanças no limiar nociceptivo basal em nenhum dos 3 testes, após o exercício agudo aeróbico (Gráficos 61A, 61B e 61C). Lembrando que no teste de retirada de cauda, imediatamente após o exercício, o efeito foi revertido parcialmente ($p < 0,05$).

Também podemos verificar através desses gráficos que o tratamento com a guanetidina não promoveu alteração do limiar nociceptivo do grupo controle composto por animais não exercitados.

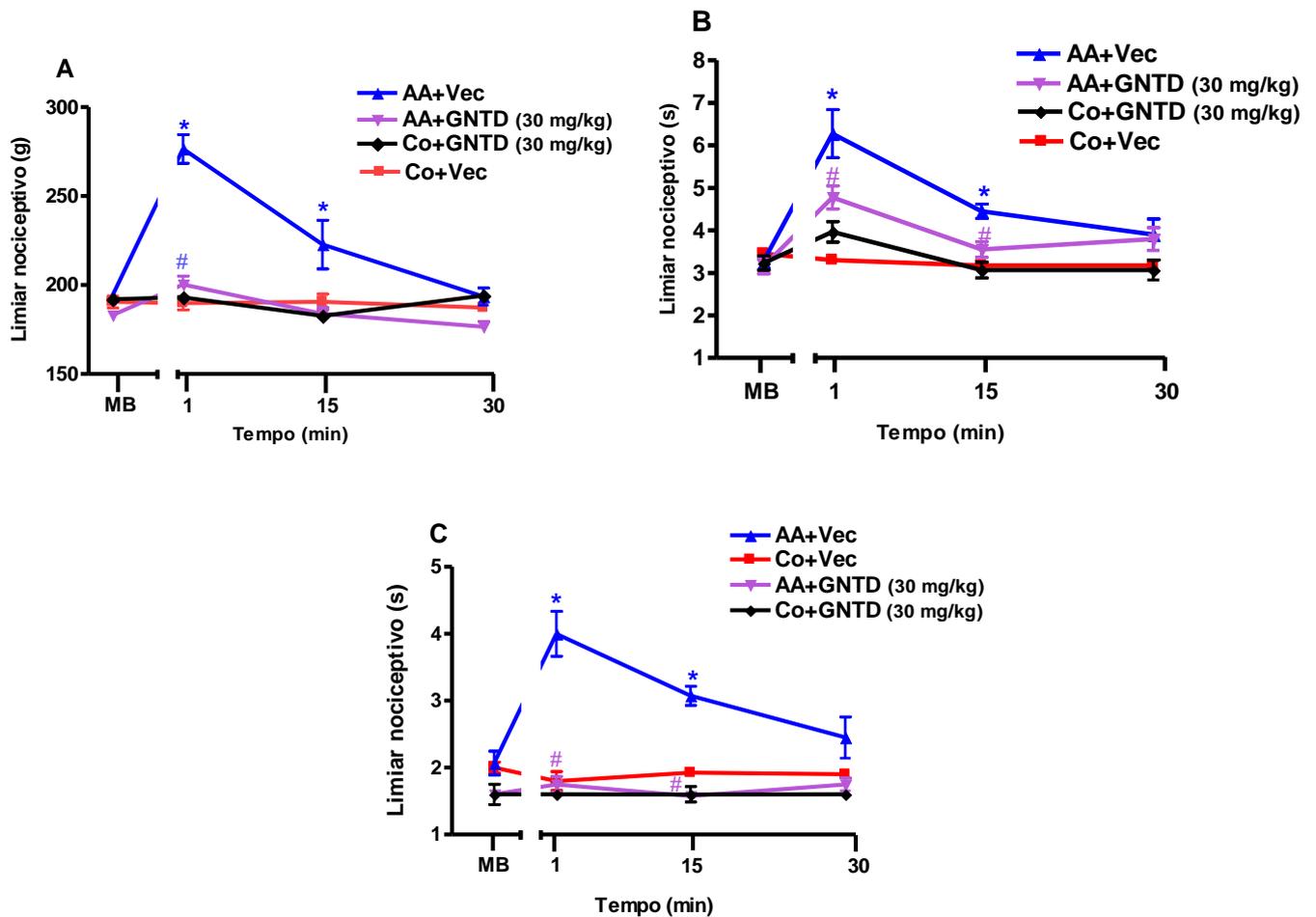


Gráfico 61 - Efeito do inibidor seletivo para a transmissão noradrenérgica sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo aeróbico nos teste de retirada de pata, cauda e face. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo aeróbico (AA). O grupo controle (Co) está representado por animais que não realizaram o protocolo de exercício. A GNTD (guanetidina, inibidor seletivo para a transmissão noradrenérgica) foi injetada intraperitonealmente durante 3 dias até a realização do exercício aeróbico, o qual perdurou 41.5 (\pm 3.0) min. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Gráfico A: representa o teste de retirada de pata, gráfico B: representa o teste de retirada de cauda e o gráfico C representa o teste de retirada de face.

39 - Efeito do inibidor seletivo da neurotransmissão noradrenérgica sobre a antinocicepção induzida pelo exercício agudo de força no teste de retirada de pata.

O efeito antinociceptivo induzido pelo exercício de força também foi revertido após o pré tratamento com a guanetidina (30 mg/kg, i.p.). Esse resultado reforça a hipótese de uma participação periférica do sistema noradrenérgico nesse efeito (Gráfico 62).

Lembrando que quando administrados centralmente (i.t. e i.c.v), os antagonistas para esses receptores não alteraram a antinocicepção induzida pelo exercício de força. (Gráficos 59 e 60).

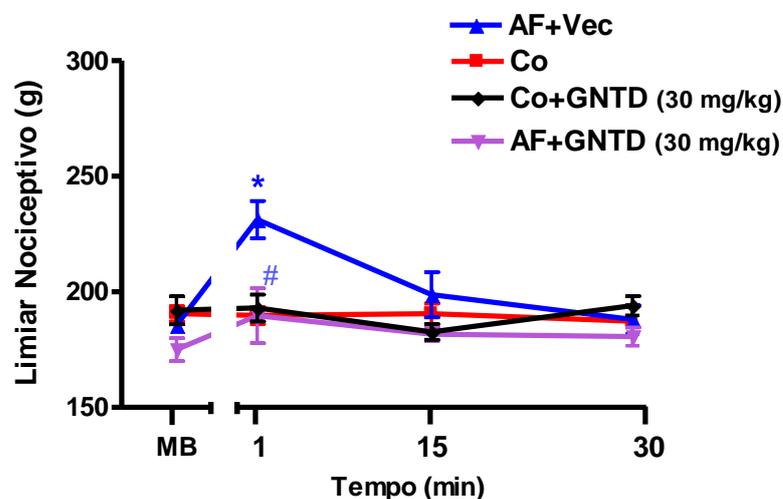


Gráfico 62 - Efeito do inibidor seletivo para a transmissão noradrenérgica sobre a antinociceção induzida pelo exercício agudo de força nos teste de retirada de pata. A medida basal (MB) foi realizada antes da injeção da droga e do início do exercício agudo de força (AF). O grupo controle (Co) está representado por animais que não realizaram o protocolo de exercício. A GNTD (guanetidina, inibidor seletivo para a transmissão noradrenérgica) foi injetada intraperitonealmente durante 3 dias até realizarem exercício. As drogas e o veículo (Vec) não alteraram o limiar nociceptivo do grupo Co. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF+Vec, $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

40 - Efeito do exercício agudo aeróbico sobre o limiar nociceptivo de camundongos com duplo *knockout* para os receptores noradrenérgicos α 2A e α 2C no teste de retirada de cauda, face e pata.

De acordo com a literatura, a qual relata o envolvimento dos receptores α 2A e α 2C na modulação do impulso nociceptivo (Millan, 1998) e para reforçar o envolvimento de tais receptores no efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico, o presente trabalho utilizou camundongos com dupla deleção para os receptores α 2A e α 2C.

Como podemos nos gráficos 63A (teste de retirada de cauda), 63B (teste de retirada de face) e 63C (teste de retirada de pata), imediatamente após o exercício aeróbico foi verificado um aumento do limiar nociceptivo apenas no grupo selvagem (*wildetype*) quando comparado ao grupo composto por animais *knockouts* para os receptores α 2A e α 2C. Esse efeito foi encontrado imediatamente após o exercício e retornou aos níveis basais após 15 min nos 3 testes nociceptivos. Desse modo, esses resultados reforçam o envolvimento de tais receptores nesse efeito.

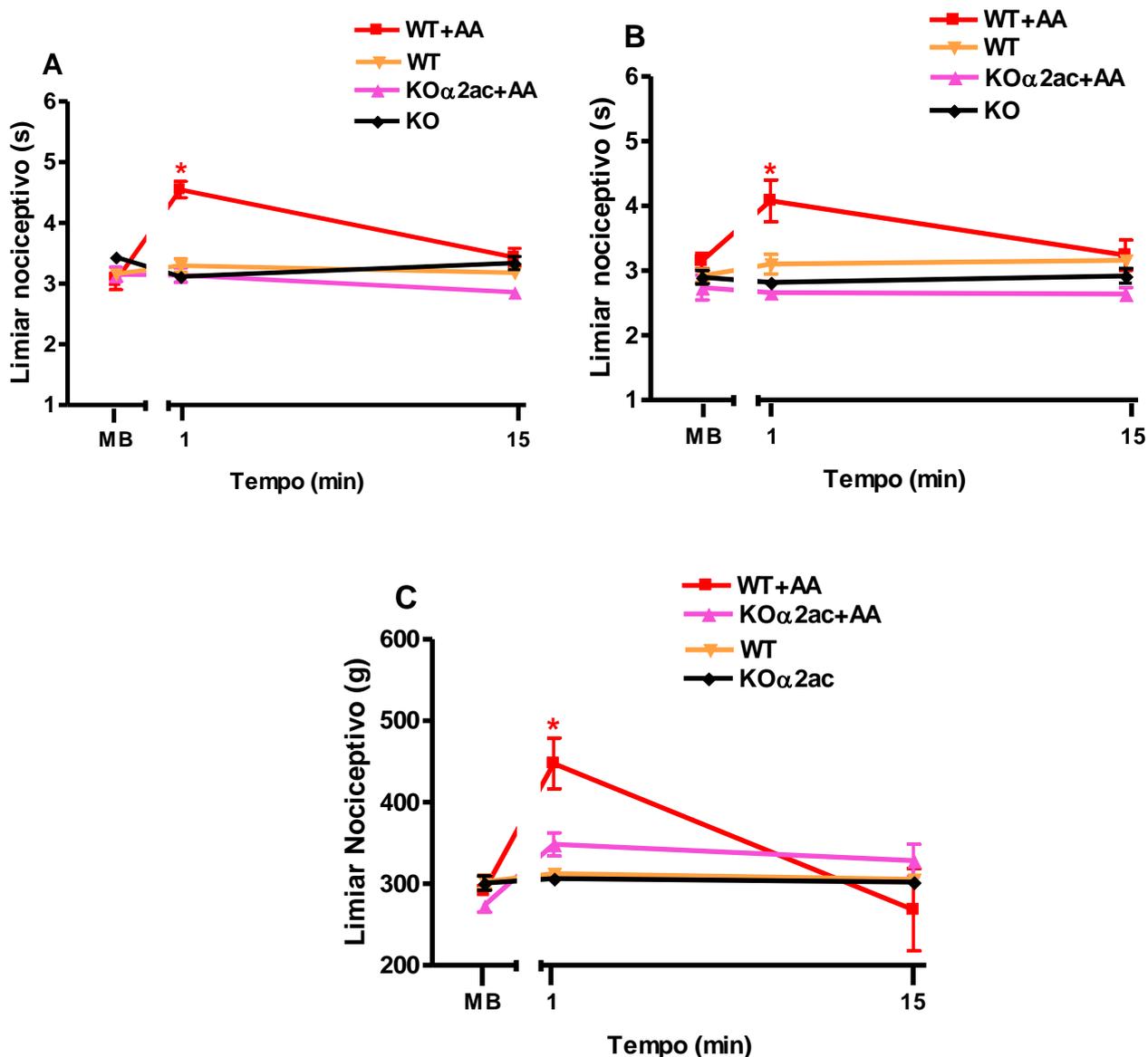


Gráfico 63 - Efeito do exercício agudo aeróbico sobre o limiar nociceptivo de camundongos *knokouts* para os receptores α 2A e α 2C nos teste de retirada de cauda, face e pata. A medida basal (MB) foi realizada antes do início do exercício agudo aeróbico (AA). WT: está representando animais selvagens que não realizaram o protocolo de exercício aeróbico, WT+AA: grupo composto por animais selvagens que realizaram o exercício agudo aeróbico, KO α 2AC: está representando animais com duplo *knokout* para os receptores α 2A e α 2C que não realizaram o exercício agudo aeróbico, KO α 2AC+AA: grupo composto por animais com duplo *knokout* para os receptores α 2A e α 2C que realizaram o exercício aeróbico agudo. Nos grupos submetidos ao exercício, este perdurou 49.0 (\pm 3.0) min. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo WT. $n=4$ por grupo. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Gráfico A: representa o teste de retirada de cauda, gráfico B: representa o teste de retirada de face e o gráfico C representa o teste de retirada de pata.

41 - Perfil da expressão de receptor $\alpha 2C$ noradrenérgico induzida pelo exercício agudo aeróbico e o exercício agudo de força em ratos.

O gráfico 64 representa a análise da expressão do receptor $\alpha 2C$ noradrenérgico em tecido cerebral após os protocolos de exercício aeróbico e de força. Podemos verificar que não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) na expressão do receptor $\alpha 2C$ após ambos protocolos de exercício.

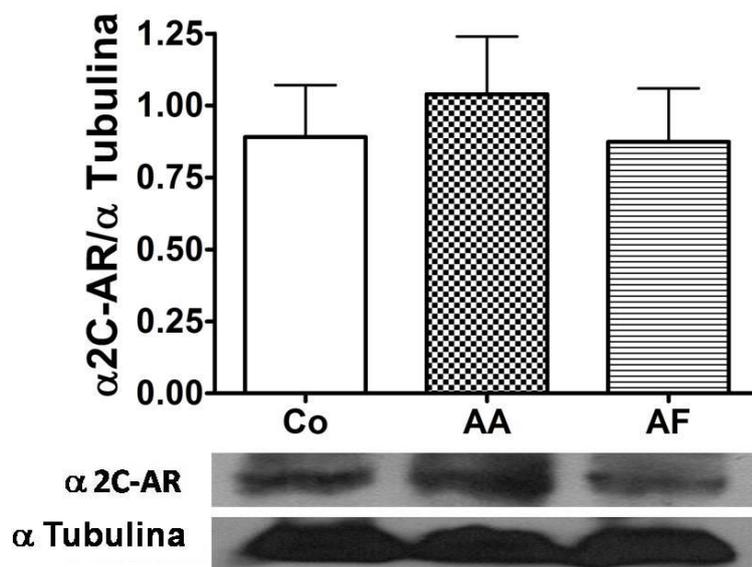


Gráfico 64 - Detecção por Western blot da expressão de receptor $\alpha 2C$ noradrenérgico em tecido cerebral após exercício em ratos. Os extratos cerebrais de ratos foram preparados do grupo controle (Co, representado por animais que não realizaram exercício) e de animais submetidos ao exercício agudo aeróbico (AA) e o exercício agudo de força (AF). O protocolo de exercício agudo aeróbico perdurou 45.0 (± 1.0) min. Os valores representam a média \pm S.E.M. utilizando-se 4 animais para cada grupo. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

DISCUSSÃO

Os benefícios produzidos pelo exercício frente a diferentes condições patológicas estão amplamente documentados na literatura. Dentre esses benefícios propiciados pelo exercício, destacamos a prevenção e a redução da pressão arterial em hipertensos, o aumento da densidade óssea em indivíduos com osteoporose, bem como uma ação ansiolítica e antidepressiva (Sinaki, 1989; Salmon, 2001; Pescatello *et al.*, 2004). Além disso, o exercício físico tem sido um importante instrumento para o alívio da dor de diversas enfermidades que podem gerar desconforto e incapacitação no ser humano, tais como artrite reumatóide, fibromialgia, osteoartrite e dor lombar crônica (Dellhag *et al.*, 1992; Kovar *et al.*, 1992; Burckhardt *et al.*, 1994; Moffett *et al.*, 1999) .

Desse modo, a prática do exercício físico como uma estratégia de tratamento não farmacológico para o controle da dor pode apresentar algumas vantagens por reduzir, consideravelmente, tanto o custo quanto os efeitos colaterais de algumas drogas, se utilizadas em associação.

Entretanto, o mecanismo pelo qual o exercício físico produz analgesia não está muito bem elucidado. Algumas evidências têm sido defendidas para explicar tal efeito. Uma delas surgiu após estudos demonstrarem a existência de nociceptores no músculo estriado esquelético, os quais podem ser ativados, tanto por estiramento mecânico quanto químico (Stacey, 1969; Mense, 1977; Mense & Meyer, 1985). Além disso, os nociceptores musculares esqueléticos estão localizados próximos às paredes das arteríolas e circunjacente ao tecido conectivo, ou seja, uma localização ideal para receber substâncias álgicas liberadas de dano ou atividade muscular (Mense, 1993a). Dentre essas substâncias, destacamos a bradicinina, o potássio, a

serotonina, a substância P e a histamina, as quais agem diretamente nas fibras aferentes nociceptivas, aumentando a frequência de disparo de impulsos originados do estímulo nociceptivo (Mense & Stahnke, 1983; Mense, 1993b). Dessa forma, esse aumento da frequência de disparo ativará outras estruturas envolvidas na condução ascendente do impulso nociceptivo (Mense, 2003) e, após o estímulo nociceptivo ser interpretado como dor pelo córtex cerebral, a ativação da via descendente modulatória da dor pode ser iniciada.

Outra evidência se baseia no princípio da ativação do portão da dor, onde a atividade de fibras sensoriais aferentes não nociceptivas (Fibras do tipo I e II), as quais são encontradas no fuso muscular e no órgão tendinoso de Golgi, podem modificar a atividade das fibras aferentes nociceptivas no corno dorsal da medula (Melzack & Wall, 1965).

Além disso, após autores verificarem que a elevação da pressão arterial ou a estimulação de barorreceptores arteriais poderia inibir a dor em humanos (Randich & Maixner, 1984; Dworkin *et al.*, 1994), é possível acreditar que a analgesia produzida pelo exercício se enquadre nesse contexto, pois durante o exercício há aumento da pressão arterial sistólica e, conseqüentemente, da estimulação dos barorreceptores, suportando uma provável relação entre os sistemas da regulação cardiovascular e do controle da dor.

Entretanto, a evidência mais aceita e melhor elucidada para responder o mecanismo de analgesia induzida pelo exercício, é a que defende que, durante o exercício físico, ocorre a liberação de substâncias endógenas em regiões periféricas, medulares ou supramedulares, podendo modular o impulso nociceptivo (Black *et al.*, 1979; Janal, 1996; Koltyn, 2000).

Com relação ao portão da dor, nós sugerimos que dificilmente o efeito antinociceptivo encontrado após o exercício aeróbico seria advindo desse mecanismo, pois o estímulo tátil aplicado na cauda e na face dos animais pela esteira durante o exercício aeróbico é mínimo, podendo ocorrer uma baixa ativação de fibras sensoriais não nociceptivas. Já na teoria da pressão arterial, a qual defende uma analgesia induzida pelo aumento da pressão arterial, alguns trabalhos verificaram analgesia, mesmo sem o aumento da pressão arterial após o exercício. Além disso, outro estudo realizado por nosso grupo verificou que ratos hipertensos submetidos ao exercício crônico apresentaram retorno do limiar nociceptivo que se encontrava aumentado aos níveis basais, mesmo sem produzir alterações da pressão arterial (Galdino *et al.*, 2010c).

Assim, nosso estudo defendeu principalmente a evidência do envolvimento de vias analgésicas endógenas na antinocicepção induzida pelo exercício.

Dessa forma, o presente estudo demonstrou que o protocolo de exercício aeróbico produziu antinocicepção frente aos estímulos nociceptivos mecânicos e térmicos. Outros estudos também encontraram esse efeito, porém a maioria deles foi realizada em humanos, exercitados em bicicleta ou esteira ergométrica, ou em animais, submetidos ao nado (Willow *et al.*, 1980; Haier *et al.*, 1981; Cooper & Carmody, 1982; Shyu *et al.*, 1982; Pertovaara *et al.*, 1984; Bement & Sluka, 2005; Kempainen *et al.*, 1985). Uma vantagem do exercício realizado em esteira seria de induzir menos estresse ao animal, quando comparado ao nado. Em adição, Contaterze *et al.* (2008) demonstraram que o nado induziu maior liberação de hormônios relacionados ao estresse, como o ACTH e corticosterona, quando comparado a corrida em ratos (Contaterze *et al.*, 2008). Além disso, poucos estudos avaliaram a antinocicepção em animais submetidos em exercício em esteira

ergométrica, lembrando que a utilização experimental de animais apresenta como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conhecido com outros métodos (Heywood, 1987). Bement & Sluka (2005) também verificaram antinocicepção em animais submetidos à corrida em esteira ergométrica. Porém, nesse estudo, o efeito antinociceptivo foi encontrado em modelo de hiperalgesia crônica induzida em músculo gastroquinêmio; enquanto em nosso estudo a antinocicepção foi encontrada a partir do limiar normal do animal, sem indução de hiperalgesia (Bement & Sluka, 2005).

Poucos trabalhos na literatura demonstraram que o exercício de força também induz analgesia (Anshel & Russell, 1994; Bartholomew *et al.*, 1996; Koltyn & Arbogast, 1998). Além disso, nenhum desses trabalhos investigou um mecanismo envolvido nesse efeito. Recentemente nosso grupo verificou a participação do sistema de opióides endógenos na antinocicepção induzida pelo exercício de força em ratos (Galdino *et al.*, 2010b). Curiosamente, a duração do efeito antinociceptivo encontrado após o exercício de força em nosso modelo foi similar àquela encontrada em um estudo realizado em humanos, no qual em ambos trabalhos o efeito perdurou por aproximadamente 5 minutos (Koltyn & Arbogast, 1998).

Ao contrário do exercício de força, o efeito antinociceptivo produzido por nosso protocolo de exercício agudo aeróbico perdurou por mais de 15 min. Kemppainen *et al.* (1985) também demonstraram que o efeito analgésico encontrado em homens após exercício progressivo em bicicleta ergométrica foi de aproximadamente 15 min (Kemppainen *et al.*, 1985). Porém, outro estudo em que se utilizava esse mesmo protocolo de exercício em humanos encontrou uma analgesia de até 30 min (Pertovaara *et al.*, 1984). Em animais, um estudo verificou que a duração da antinocicepção induzida após o nado retornou progressivamente aos níveis basais

após 30 min (Cooper & Carmody, 1982), o qual foi similar à duração encontrada pelo exercício aeróbico em nosso estudo.

Em uma revisão de literatura, Koltyn (2002) encontrou que a analgesia induzida pelo exercício está diretamente relacionada à intensidade, ou seja, quanto maior a intensidade, maior a analgesia (Koltyn, 2002). Porém, em nosso estudo, procuramos aplicar uma intensidade de exercício que fosse semelhante à aplicada na prática clínica. Apesar de o protocolo que utilizamos ser de intensidade moderada, a duração do efeito foi similar aos estudos previamente apresentados, que realizaram exercícios com intensidade alta.

No entanto, quando comparamos a intensidade e a duração da antinocicepção entre os protocolos por nós utilizados, verificamos que o exercício agudo aeróbico se mostrou mais eficiente em ambos os parâmetros. Esse resultado corrobora um estudo que verificou que ambos os exercício são eficazes no alívio da dor em idosos com osteoartrite, porém uma maior analgesia foi produzida pelo exercício aeróbico (Ettinger *et al.*, 1997). No entanto, nesse estudo o efeito foi encontrado em indivíduos que apresentavam hiperalgesia subjacente, diferente do modelo proposto por no estudo.

Os exercícios aeróbicos dependem do oxigênio para a queima de substratos, os quais produzirão energia que será transportada para os músculos em atividade (Coats *et al.*, 1992). Assim, para suprir essa energia consumida pelo músculo em atividade, o exercício aeróbico aumenta a capacidade cardíaca e pulmonar e cronicamente resulta em uma melhoria do condicionamento aeróbico do indivíduo (Sullivan *et al.*, 1988).

Já os exercícios de força, são classificados como anaeróbicos e caracterizam-se por séries de alta intensidade (60-80% de 1RM) e números baixos de repetições

(entre 10 e 30). Estes eventos são realizados próximos à intensidade máxima, duram curtos períodos de tempo (menos de 30s) e dependem da disponibilidade de fontes de energia muscular proveniente do ATP e da fosfocreatina armazenadas (Boutcher, 1990; Lambert & Evans, 2005).

Além dessas diferenças apresentadas, durante o exercício aeróbico ocorre uma ativação de mais grupos musculares, quando comparado ao exercício de força, o qual é destinado a específicos grupos musculares (Ploutz *et al.*, 1994; Lenk *et al.*, 2010). Diante dessas desigualdades apresentadas, sugerimos que a maior antinocicepção encontrada no protocolo de exercício agudo aeróbico pode gerar um maior número de *inputs* aferentes, os quais podem resultar em um maior grau de ativação de neurônios responsáveis pela liberação substâncias e neurotransmissores envolvidos na modulação da nocicepção. Além disso, o maior recrutamento muscular durante o protocolo de exercício aeróbico pode produzir um maior número de microlesões em miofibrilas, que podem sensibilizar mais nociceptores musculares, os quais podem também ativar o controle descendente modulatório da dor (Rotto *et al.*, 1990; Stebbins *et al.*, 1990; Mense, 1996) . Reforçando, Kjaer *et al.* (1989) verificaram que os impulsos provenientes dos centros motores cerebrais durante o exercício, podem diretamente aumentar a atividade de centros neuroendócrinos centrais (Kjaer *et al.*, 1989).

Ademais, alguns estudos compararam exercício aeróbico e de força, e demonstraram que a ativação do sistema cardiovascular, com conseqüente aumento de noradrenalina circulante e as concentrações plasmáticas de β -endorfina, um opióide endógeno envolvido na antinocicepção, foram maiores após o exercício aeróbico (Goldfarb & Jamurtas, 1997; Pescatello *et al.*, 2004; Lambert & Evans, 2005; Pontifex *et al.*, 2009).

Então, após verificarmos que os protocolos de exercícios utilizados nesse estudo foram eficazes em induzir antinocicepção, o próximo intuito do estudo foi investigar a participação de algumas substâncias analgésicas endógenas nesse efeito.

Até o momento, os opióides endógenos têm sido os principais candidatos postulados em participar da analgesia induzida pelo exercício (Koltyn, 2000). Além desses peptídeos, alguns estudos avaliaram também a participação da serotonina ou de hormônios relacionados ao estresse (Kemppainen *et al.*, 1985; Kemppainen *et al.*, 1986; Hoffmann *et al.*, 1990; Kemppainen *et al.*, 1990). Entretanto, outras vias endógenas que poderiam estar envolvidas nesse efeito não haviam sido investigadas.

Assim, seguindo a linha de pesquisa de nosso grupo e um embasamento na literatura científica, propusemos verificar se o sistema endocanabinóide, a via NO/cGMP/K⁺_{ATP} e os receptores α 2 noradrenérgicos estariam envolvidos no mecanismo antinociceptivo encontrado após os exercícios agudo aeróbico e agudo de força.

De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, verificamos que os antagonistas de receptores para canabinóides endógenos (CB1 e CB2), quando administrados por via sistêmica, espinal ou supraespinal, reverteram a antinocicepção induzida pelos exercícios aeróbico e de força. Apesar de a literatura ainda não ter demonstrado o envolvimento desses receptores na analgesia induzida pelo exercício, Sparling *et al.* (2003) evidenciavam a participação desse sistema nesse efeito, ao encontrarem níveis plasmáticos aumentados de anandamida após exercício aeróbico em humanos (Sparling *et al.*, 2003).

A reversão da antinocicepção em nosso modelo pelos antagonistas canabinóides sugere uma provável participação do sistema endocanabióide a nível periférico, medular e supramedular.

O papel antinociceptivo dos canabinóides a nível periférico tem sido amplamente demonstrado. Richardson *et al.* (1998) verificaram uma reversão de hiperalgesia periférica induzida por carragenina (i.pl.) em pata de ratos, após administração local de anandamida, sendo esse efeito revertido pelo SR141716A (um antagonista para os receptores CB1) (Richardson *et al.*, 1998).

Além disso, esses autores demonstraram que a anandamida inibiu a liberação de CGRP (Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina), em pele isolada de pata de ratos, com conseqüente redução da excitabilidade de fibras C. Em adição, receptores CB1 têm sido encontrados em gânglio da raiz dorsal e em neurônios aferentes primários de ratos (Pertwee, 1997). Além disso, esses receptores podem se dirigir, através de um transporte axonal do gânglio da raiz dorsal da medula, em direção a terminais periféricos de nervos sensoriais, em modelo de ligadura do nervo ciático em ratos. Essa evidência foi demonstrada utilizando "*binding*" e autorradiografia de alta resolução, que encontraram um maior número de receptores para canabinóides do tipo CB1 próximo a uma ligadura (Hohmann *et al.*, 1999).

Apesar de estar bem fundamentada a existência de receptores CB1 em fibras aferentes primárias do tipo A e C e o seu envolvimento na antinocicepção periférica (Ahluwalia *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2003), a participação de receptores CB2 nesse efeito ainda não está bem elucidada. O receptor CB2 está localizado em células-imune presentes na periferia, podendo estar envolvido indiretamente na antinocicepção (Casanova *et al.*, 2003). Malan *et al.* (2003) sugerem que, após o receptor CB2 ser ativado, pode ocorrer uma redução na liberação de mediadores,

tais como prostanóides, citocinas, ATP, serotonina e histamina, que sensibilizam os nociceptores presentes na periferia (Malan *et al.*, 2001). A ativação desses receptores resulta na inibição da atividade do adenilil ciclase pela estimulação proteína Gi e de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Pertwee, 1997). Além disso, o efeito inibitório promovido por canabinóides em vários testes que avaliaram a função de células-imune foi impedido pelo bloqueio da redução do cAMP intracelular (Schatz *et al.*, 2003)

Nesse contexto, um estudo verificou que a antinocicepção produzida pelo agonista para receptores CB2, o AM 1241, em pata de ratos, foi revertida pela naloxona (antagonista para receptores opióides) e, além disso, o AM 1241 estimulou a liberação de β -endorfina em cultura de queratinócitos em pele de ratos e de humanos, sugerindo que a antinocicepção encontrada pela ativação de receptores CB2 é causada pela liberação de opióides endógenos (Ibrahim *et al.*, 2005). Um resultado que corrobora esse achado foi verificado por nosso grupo de pesquisa, no qual encontramos o envolvimento de opióides endógenos, tanto após exercício aeróbico (Galdino, 2008) quanto exercício de força, podendo esse efeito ser via CB2 (Galdino *et al.*, 2010b). A participação de receptores CB2 na periferia também foi reforçada por outro trabalho que verificou que o AM 1241 não produzia antinocicepção em camundongos *knockouts* para o receptor CB2, quando comparado aos animais selvagens (Ibrahim *et al.*, 2006). Em adição, Guindon *et al.* (2011) encontraram que o efeito antinociceptivo produzido por inibidores da FAAH (ácido graxo amino hidrolase, responsável pelo metabolismo da anandamina) e da MGL (monoacilglicerol lipase, responsável pelo metabolismo do 2-AG) em pata de ratos, foi revertido pelo AM 630 (antagonista para os receptores CB2) (Guindon *et al.*, 2011). Sendo assim, ambos os receptores canabinóides (CB1 e CB2) podem

estar envolvidos na modulação do impulso nociceptivo a nível periférico, o que reforça os resultados demonstrados pelo presente estudo.

Já está amplamente documentado que a administração intratecal de canabinóides produz analgesia com supressão da atividade neuronal nociceptiva (Yaksh, 1981; Smith & Martin, 1992; Hohmann *et al.*, 1998). Ademais, receptores para canabinóides são encontrados no corno dorsal da medula e apresentaram aumentados em situações de injúria, como constrição de nervo ciático, além de poderem inibir impulsos provenientes de fibras nociceptivas primárias (Hohmann & Herkenham, 1998; Hohmann *et al.*, 1999; Farquhar-Smith *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2003; Sagar *et al.*, 2005). No corno dorsal da medula, os receptores CB1 são encontrados principalmente em interneurônios e astrócitos (Farquhar-Smith *et al.*, 2000; Salio *et al.*, 2002).

Além disso, receptores CB2 também podem participar da modulação da nocicepção a nível medular. Esse efeito foi verificado após alguns estudos demonstrarem que a antinocicepção induzida por diferentes agonistas para os receptores CB2, injetados por via intratecal, foi revertida pelo pré tratamento como AM 630 (Romero-Sandoval & Eisenach, 2007; Hsieh *et al.*, 2011).

Reforçando, aumentos das concentrações de anandamida e PEA têm sido encontrados após lesão de medula espinhal, seguido de uma *upregulation* de enzimas responsáveis por sua síntese (NAPE-PLD, diacilglicerol lípase- α) e de uma *downregulation* de enzimas responsáveis por sua degradação (FAAH e MAGL) (Garcia-Ovejero *et al.*, 2009). Acrescenta-se que esse estudo demonstrou que os receptores para canabinóides CB1 estavam constitutivamente expressos em oligodendrócitos e induzidamente expressos em astrócitos reativos e os receptores CB2 estavam bastante expressos em infiltrados de células-imune e astrócitos.

Nesse contexto, a inibição da antinocicepção encontrada pelo exercício com a prévia injeção intratecal de antagonistas para os receptores CB1 e CB2 reforça também o resultado demonstrado por esse estudo sobre o envolvimento dos canabinóides nesse efeito, a nível medular.

A nível supra-espinal, quando pré injetados intracerebroventricularmente os antagonistas para os receptores CB1 e CB2 (AM 251 e AM 630) também inibiram o efeito antinociceptivo causado pelo exercício físico. A participação central dos canabinóides na modulação do impulso nociceptivo também tem sido bastante documentada. Walker & Hohmann (2005) demonstraram que a injeção de agonistas canabinóides via i.c.v. ou diretamente em algumas regiões do SNC produziu analgesia (Walker & Hohmann, 2005). Dentre essas regiões, destacam-se algumas envolvidas na modulação da nocicepção, como PAG, NMR, amígdala e tálamo (Martin *et al.*, 1995; Lichtman *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 1998). Nesse sentido, também foi verificado que estímulos elétricos aplicados em algumas dessas áreas, como principalmente na PAG, provocaram claramente antinocicepção em ratos, além de promover aumento das concentrações locais de anandamida (Walker *et al.*, 1999). Em adição, a microinjeção de AM 251 (antagonista CB1) dentro da PAG reverteu antinocicepção pós-ictal em ratos geneticamente epiléticos (Samineni *et al.*, 2011). Reiterando, a pré injeção de antagonista para receptores CB1, o SR141716A, nessa área, inibiu esse efeito (Walker *et al.*, 1999). Ademais, inibidores de FAAH e de MGL, e da recaptação de endocanabinóides, quando injetados na PAG ou RVM incrementaram a antinocicepção induzida pelo estresse (Hohmann *et al.*, 2005; Suplita *et al.*, 2005; Suplita *et al.*, 2006).

Além disso, enfatizando nossos resultados sobre o envolvimento supramedular de receptores CB1 no efeito antinociceptivo induzido pelo exercício, também demonstramos, através da técnica de *Western blot*, um significativo aumento da expressão de receptores CB1 em amostra de cérebro homogeneizado de ratos após os exercícios (aeróbico e força). Em adição, através da técnica de imunofluorescência também foi verificado que ambos os protocolos de exercício produziram um aumento da expressão e da ativação em neurônios das regiões ventro e dorso lateral da PAG. A PAG apresenta importantes funções no controle descendente da dor e em ações antinociceptivas de agonistas canabinóides (Martin *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1999). Essa estrutura também contém tanto receptores canabinóides quanto mRNA para esses receptores (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992; Tsou *et al.*, 1998). Uma vez ativados por endocannabinóides, os receptores CB1 podem induzir antinocicepção através de uma redução de influências inibitórias gabaérgicas sobre neurônios que se projetam da PAG para as células *off* do RVM (Vaughan *et al.*, 2000).

Outros estudos também encontraram aumento da expressão desse tipo de receptor no hipocampo e no estriato após treinamento aeróbico crônico em ratos (Gomes da Silva *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2010). Já Wang *et al.* (2009) demonstraram que esse aumento em cérebro de ratos pode ocorrer de forma aguda, após 30, 60 e 120 minutos de uma sessão de eletroacupuntura (no ponto GV20, na região do bregma) (Wang *et al.*, 2009). Além disso, outro estudo demonstrou que a expressão desses receptores no hipocampo e no hipotálamo também foi aumentada, após o intervalo de 1 hora da injeção intraperitoneal de Δ^9 -THC e canabidiol (Hayakawa *et al.*, 2008). Embora os mecanismos sobre a rápida expressão de receptores CB1 não tenham sido bem elucidados, esses estudos citados previamente dão suporte aos

resultados apresentados no presente estudo, em que a expressão de receptores CB1 pode ter aumentado, após aproximadamente 40 min da duração do exercício aeróbico e 30 min do exercício de força.

Apesar de a maior parte dos estudos designarem os receptores CB1 como os principais responsáveis pelos efeitos centrais produzidos pelos canabinóides devido, principalmente, a sua existência em centros supraespinais (Di Marzo *et al.*, 2004; Lambert & Fowler, 2005), nosso estudo encontrou uma reversão do efeito antinociceptivo após a pré-injeção central de antagonistas para os receptores CB2. Além disso, outros estudos têm demonstrado a existência de receptores CB2 no cérebro de ratos e camundongos, e a importância de tais receptores na antinocicepção nessa região (Munro *et al.*, 1993; Griffin *et al.*, 1997; Van Sickle *et al.*, 2005; Jhaveri *et al.*, 2007). Nesse contexto, Xi *et al.* (2011) demonstraram que a administração do JWH 133 e do GW 405833 (agonistas seletivos para receptores canabinóides CB2) no núcleo *accubens* inibiu o aumento da locomoção induzida pela injeção intravenosa de cocaína (um inibidor da recaptção de dopamina e noradrenalina) e o aumento dos níveis de dopamina nesse local, ou seja, esses receptores poderiam estar envolvidos em respostas supra-medulares (Xi *et al.*, 2011).

Além disso, essa inibição foi bloqueada pelo pré tratamento com o AM 630 e também não foi verificada em camundongos *knockouts* para o receptor CB2, suportando, assim, a existência supraespinal desses receptores.

Apesar de os resultados apresentados, estudos que possam confirmar a existência central desses receptores são bastante inconsistentes e têm causado debate e controvérsias, principalmente devido à especificidade dos anticorpos comercializados para receptores CB2. Segundo Onaivi *et al.* (2011) alguns desses

anticorpos comercializados não detectam o receptor CB2 em camundongos nativos e em transfectados. Outro problema que ocorre com a expressão de CB2, decorre do fato de que tal receptor apresenta duas isoformas (CB2a e CB2b). A isoforma CB2a é encontrada em regiões cerebrais e testículos; enquanto a isoforma CB2b é encontrada em tecidos periféricos, como no baço. Assim, a maioria dos anticorpos comercializados podem ter maior interação com a isoforma CB2b, dificultando a investigação central desse receptor (Liu *et al.*, 2009; Atwood & Mackie, 2010). Por esse motivo, o presente estudo optou por não investigar, através de técnicas biomoleculares, a influência dos protocolos de exercício sobre a expressão de receptores CB2.

Estudos têm demonstrado que alguns endocanabinóides, como a anandamida e o 2-AG quando injetados periféricamente também induzem antinocicepção (Smith *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1995; Mechoulam *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 1997; Guindon *et al.*, 2007).

Assim, o próximo intuito deste trabalho foi verificar se a inibição da degradação desses endocanabinóides potencializaria o efeito antinociceptivo produzido pelos protocolos de exercício. Nesse sentido, é importante ressaltar que a anandamida e o 2-AG são degradados pela FAAH e, além disso, há uma segunda enzima a MGL que catalisa também a hidrólise do 2-AG (Deutsch & Chin, 1993; Cravatt *et al.*, 1996; Hohmann *et al.*, 2005).

Além de participar da degradação e da hidrólise da anandamida e do 2-AG, essas enzimas também podem regular parcialmente os níveis de PEA (palmitoiletanolamida) e de OEA (oleoiletanolamida), os quais apresentam estrutura molecular, síntese e degradação relacionadas a tais endocanabinóides (anandamida e 2-AG), bem como vias catabólica e metabólica similares à anandamida (Matias *et*

al., 2007). Além disso, apesar de estudos demonstrarem que o PEA e o OEA não ativam receptores canabinóides, estudos encontraram que alguns efeitos do PEA foram antagonizados pelo AM 630 (antagonista para receptor CB2) (Calignano *et al.*, 1998; Onaivi *et al.*, 2008)

Assim, o efeito antinociceptivo produzido pelo exercício aeróbico e de força foi incrementado pela pré administração sistêmica e central de MAFP e JZL 184 (inibidores da FAAH e MGL) em todos os testes nociceptivos. Tais enzimas são encontradas em importantes regiões que fazem parte da modulação da nocicepção e, dando suporte aos nossos resultados, alguns estudos têm demonstrado um aumento, tanto no efeito antinociceptivo quanto nos níveis de anandamida e 2-AG, após o pré tratamento sistêmico e central com inibidores da FAAH e MGL (Guindon & Hohmann, 2009). Em face desse fato, nós sugerimos que ambas as drogas podem ter aumentado os níveis de canabinóides endógenos liberados durante o exercício, os quais interagiram com seus receptores em maior escala, incrementando, assim, o efeito antinociceptivo.

Sustentando a hipótese da participação de endocanabinóides na antinocicepção induzida pelo exercício, imediatamente após ambos os protocolos de exercício, foi encontrado aumento nos níveis de anandamida, 2-AG, PEA e OEA no plasma. Em adição, Sparling *et al.* (2003) encontraram aumento nos níveis plasmáticos de anandamida após uma sessão de corrida e ciclismo em humanos (Sparling *et al.*, 2003). Outros estudos também encontraram aumento desses endocanabinóides dentro de tecido de pata, corno dorsal da medula, PAG e RVM durante resposta antinociceptiva em ratos (Guindon & Hohmann, 2009). Além disso, alguns estudos também demonstraram a participação da anandamida, 2-AG, PEA e OEA na modulação da resposta nociceptiva (Pertwee, 2001; Suardiaz *et al.*, 2007).

Essa participação pode ocorrer após a ativação de receptores canabinóides. No entanto, a anandamida, o 2-AG e o PEA ligam-se a esses receptores com diferente afinidade e eficácia (Matias *et al.*, 2007; Guindon & Hohmann, 2009). Já o OEA, alguns estudos verificaram que ele pode regular o ganho de peso corporal de ratos, pela ativação de PPAR- α (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001). Entretanto, Suardiaz *et al.* (2007) demonstraram que a antinocicepção produzida pelo OEA em modelo de contorção abdominal em camundongos selvagens para o receptor PPAR- α não foi alterada nos camundongos *Knockouts* para esse receptor, sugerindo o envolvimento de outro mecanismo desse efeito (Suardiaz *et al.*, 2007). Assim, esses resultados fortalecem a hipótese de que o exercício físico induz a liberação de endocanabinóides, a qual pode participar do seu efeito antinociceptivo.

Alguns estudos têm também utilizado como ferramenta farmacológica experimental, para avaliar o envolvimento do sistema de canabinóides, inibidores do transportador de anandamida. A recaptção de endocanabinóides do terminal nervoso, principalmente de anandamida presente no espaço sináptico, pode ocorrer por difusão facilitada, porém um transportador específico ainda não foi clonado (Moore *et al.*, 2005). Além disso, estudos têm avaliado melhor esse mecanismo, utilizando inibidores da recaptção da anandamida, como, por exemplo, o VDM 11, o qual tem demonstrado produzir antinocicepção em modelos animais, com ou sem inflamação, e até mesmo em dor neuropática (de Lago *et al.*, 2004; Hohmann *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006). Essas evidências dão suporte aos nossos resultados, que demonstraram um aumento da resposta antinociceptiva induzida pelos protocolos de exercício, tanto na intensidade quanto na duração, após o pré tratamento com o VDM 11.

Nesse contexto, sugerimos que o sistema endocanabinóide pode participar da antinocicepção induzida pelos protocolos de exercício, nos níveis periférico e central. Somando-se a isso, os endocanabinóides também podem ser responsáveis pelo “*Runner’s High*”, que se trata de uma sensação de euforia durante o exercício, geralmente inesperada, em que o atleta pode superar seus limites em relação à distância e a duração do tempo durante uma corrida prolongada (Beh *et al.*, 1996). Esse efeito, que até então era compreendido como envolvendo apenas endorfinas, pode também ter o envolvimento de endocanabinóides, pois tais compostos são altamente lipossolúveis, atravessando rapidamente a barreira hematoencefálica, além de produzirem menos depressão respiratória, facilitando, assim, o desempenho do atleta (Sparling *et al.*, 2003). Além disso, por questões de ética experimental, estudos em humanos têm encontrado aumento dos níveis de endorfinas somente no plasma, não sendo avaliado centralmente, em que uma afirmação do envolvimento dessas substâncias em efeitos centrais tem sido questionada (Dietrich & McDaniel, 2004).

Estudos também têm demonstrado o envolvimento do sistema endocanabinóide em importantes respostas durante o exercício, tais como: vasodilatação muscular, broncodilatação e euforia (Sparling *et al.*, 2003). Esse sistema também pode estar envolvido no controle do movimento, visto que ambos os seus receptores foram encontrados nos gânglios da base e cerebelo (Pertwee, 2001; Onaivi *et al.*, 2011). Além disso, outro estudo sugere o envolvimento desse sistema na capacidade física aeróbica, após demonstrar que o pré tratamento com o Rimonabant, um antagonista CB1, reduziu a velocidade e a distância da corrida em camundongos (Keeney *et al.*, 2008). Os receptores canabinóides também têm sido

encontrados no hipotálamo e podem mediar o controle da termorregulação durante o exercício (Rawls & Benamar, 2011).

Além da possível participação do sistema de canabinóides endógenos, a via NO/cGMP/K⁺_{ATP} também pode estar envolvida no efeito antinociceptivo induzido pelos protocolos de exercício físico utilizados nesse estudo. Essa participação foi deduzida, principalmente quando a pré administração, tanto sistêmica (s.c.) quanto central (i.t., i.c.v) de inibidores para NOS (NOARG), cGMP (ODQ) e o bloqueador do K⁺_{ATP} (glibenclamida) aboliram a antinocicepção encontrada após ambos os tipos de exercício. Em adição, outros estudos também demonstraram um envolvimento, tanto do óxido nítrico quanto de toda a via NO/cGMP/K⁺_{ATP} na modulação do impulso nociceptivo, tanto a nível periférico quanto central em modelos de hiperalgesia em ratos (Hara *et al.*, 1995; Osborne & Coderre, 1999; Jesse *et al.*, 2007; Hernandez-Pacheco *et al.*, 2008).

O óxido nítrico é uma molécula com funções importantes durante o exercício como metabolismo e recaptção da glicose pelos músculos, aumento do fluxo sanguíneo muscular e redução do consumo de oxigênio pelo miocárdio (Kingwell, 2000). Assim, uma incapacidade da sua produção, particularmente pelo sistema vascular endotelial, pode contribuir para limitações na *performance* física.

Durante o exercício físico, alguns fatores podem contribuir para o aumento da produção de NO, tais como o aumento do débito cardíaco, que promoverá um aumento do fluxo sanguíneo, principalmente para os músculos exercitados, levando a um maior estresse por cisalhamento endotelial (*shear stress*), aumentando, assim, a expressão e a atividade da eNOS (Van Citters & Franklin, 1969; Sessa *et al.*, 1994; Maiorana *et al.*, 2003; Chavoshan *et al.*, 2011). Além desse, outros mecanismos como a deformação mecânica do endotélio das veias por contrações musculares,

liberação de acetilcolina das terminações de neurônios motores e a desoxigenação das hemoglobinas responsáveis por promoverem a liberação de ATP dos glóbulos vermelhos, também têm sido descritos responsáveis por ativar eNOS durante a atividade física (Ellsworth, 2004; Clifford *et al.*, 2006; Van Teeffelen & Segal, 2006; Kawai *et al.*, 2010).

Entretanto, ao contrário da eNOS, que está presente no endotélio dos vasos, a nNOS é encontrada nas fibras musculares e em neurônios (Frandsen *et al.*, 1996; Rothe *et al.*, 2005). Em adição, estudos também encontraram aumento da expressão dessa enzima após exercício em animais e humanos (Vassilakopoulos *et al.*, 2003; McConell *et al.*, 2007; Chavoshan *et al.*, 2011; Huber-Abel *et al.*, 2011). Dessa forma, algumas explicações para a suprarregulação da nNOS durante o exercício tem sido defendidas. Uma delas seria o metabolismo muscular que se encontra sensível ao NO em vários locais, dentre eles o de recaptção da glicose (Reid, 1998).

Nesse sentido, o aumento da nNOS pelo exercício pode servir como um incremento para o metabolismo da glicose. Além disso, um estudo encontrou que outras proteínas que participam do controle do fluxo de glicose para dentro do músculo também se encontram suprarreguladas durante a atividade contrátil (Rodnick *et al.*, 1990). Assim, o aumento do NO pela nNOS durante o exercício seria um mecanismo fisiológico para controlar o consumo de oxigênio e de nutrientes pelas fibras musculares contráteis, quando a demanda exceder sua oferta. Nesse contexto, outra teoria defende que a nNOS localizada na placa motora, quando sofre ativação neuromuscular, libera NO que pode modular a transmissão colinérgica, contribuindo assim pelo aumento do tônus vasodilatador muscular durante o exercício (Kusner & Kaminski, 1996; Ribera *et al.*, 1998). Desse modo, o aumento da

expressão da nNOS, durante o exercício, tanto pode exercer uma indireta função no auxílio do fornecimento energético muscular quanto pode estar envolvidas em outras ações, como na antinocicepção.

Outro mecanismo que pode estar envolvido no aumento da NOS pelo exercício seria o cálcio liberado do retículo sarcoplasmático para o citoplasma das fibras musculares, durante a contração constante, o qual pode ativar ambas isoformas constitutivas (nNOS e eNOS), que são dependentes de cálcio (Moncada, 1993). Também há evidências de que o cálcio extracelular pode aumentar a ativação da NOS durante o aumento da intensidade do exercício físico (Thompson *et al.*, 1996). Assim, o cálcio é importante não somente para o mecanismo da contração muscular, mas também na ativação das isoformas de NOS dependentes dele.

Assim, nosso estudo demonstrou que após os exercícios agudo aeróbico e agudo de força, tanto a eNOS quanto a nNOS podem participar do mecanismo antinociceptivo induzido pela via NO/cGMP/K⁺_{ATP} (Galdino *et al.*, 2010a); sendo que os inibidores dessas isoformas inibiram esse efeito frente aos 3 testes nociceptivos, quando pré-injetados sistêmica ou centralmente. De fato, outros estudos também demonstraram o envolvimento, tanto da eNOS quanto da nNOS, no efeito antinociceptivo induzido pela eletroacupuntura aplicada em ratos e na antinocicepção encontrada em camundongos introduzidos em uma câmara hipobárica, equivalente a 10.000 e 20.000 pés de altitude e expostos em uma caixa com óxido nitroso (Ishikawa & Quock, 2003; Almeida & Duarte, 2008; Choi *et al.*, 2010).

Somando-se às isoformas constitutivas, a isoforma induzida (iNOS) também pode estar envolvida na antinocicepção induzida pelos protocolos de exercícios utilizados nesse estudo, em o inibidor mais específico para essa isoforma, a

aminoguanidina, quando pré-administrada pelas vias s.c., i.t. e i.c.v. impediu esse efeito.

Durante a contração produzida pelo exercício, seja ele aeróbico ou de força, ocorrem microlesões em miofibrilas, com conseqüente aumento da produção de citocinas (Northoff *et al.*, 1994; Lewicki *et al.*, 1988; Pedersen, 2000; MacIntyre *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2001; Izquierdo *et al.*, 2009). Além disso, estudos encontraram, durante e após a atividade física, um aumento da concentração de bradicinina, tanto no músculo quanto no plasma (Rett *et al.*, 1989; Blais *et al.*, 1999; Langberg *et al.*, 2002). Nesse sentido, o aumento de citocinas pelo exercício pode induzir a produção de NO a partir da iNOS, visto que elas aumentam a expressão dessa isoforma (Cavicchi & Whittle, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Wakita *et al.*, 2001; Hernanz *et al.*, 2004; Murthy *et al.*, 2004; Savard *et al.*, 2008). Em adição, alguns autores verificaram um aumento da expressão da iNOS em endotélio de ratos e em tecido muscular e plasma humano, após exercício agudo (Niess *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Rudnick *et al.*, 2004).

Além da expressão da NOS no músculo, estudos também têm demonstrado que o exercício induz o aumento dessas isoformas no sistema nervoso central (Kim *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2006; Mayhan *et al.*, 2011). Roberts *et al.* (1999) demonstraram que, quando a demanda muscular encontra-se aumentada, como durante a atividade física, a atividade induzida dessas enzimas também pode estar aumentada em outras regiões do corpo, inclusive SNC (Roberts *et al.*, 1999).

Assim, os estudos indicados acima reforçam a hipótese do presente trabalho, a qual sugere o envolvimento da iNOS no mecanismo antinociceptivo encontrado pelos protocolos exercício. Apesar de a maioria dos relatos na literatura demonstrarem uma implicação dessa isoforma na nocicepção (Dudhgaonkar *et al.*,

2004; Sekiguchi *et al.*, 2004; Celerier *et al.*, 2006; Hancock & Riegger-Krugh, 2008; Ristic *et al.*, 2010), nossos resultados estão consistentes com outros trabalhos que encontraram o envolvimento da iNOS na inibição do impulso nociceptivo (Ishikawa & Quock, 2003; Almeida & Duarte, 2008), pois a NOS também pode apresentar um duplo efeito, seja ele noci ou antinociceptivo, dependendo da concentração liberada, do local e do modelo experimental utilizado (Sousa & Prado, 2001; Cury *et al.*, 2011).

O presente estudo também demonstrou que os protocolos de exercício aumentaram os níveis de nitrito tanto no plasma quanto no líquido (Galdino *et al.*, 2010a). Outros estudos têm associado o exercício com o aumento dos níveis de nitrito, no plasma e no líquido, tanto em humanos quanto em roedores (Zhang *et al.*, 2006; Bloomer *et al.*, 2007). O nitrito é um produto da degradação oxidativa do metabolismo do NO, apesar de ser uma medida indireta, a dosagem do nitrito tem sido bastante aceita como referência para a determinação da formação dessa substância em diferentes sistemas biológicos (Gladwin *et al.*, 2005). Assim, sugerimos que, durante esses exercícios, pode ocorrer liberação de NO, tanto a nível periférico quanto central, a qual pode ativar a via NO/cGMP/K⁺_{ATP} com consequente antinocicepção. Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que a injeção direta de doadores de NO em NMR, corno dorsal da medula e pata de ratos, provocou antinocicepção (Duarte *et al.*, 1990; Iwamoto & Marion, 1994; Sousa & Prado, 2001).

Considerando esses resultados, nosso estudo também demonstrou um aumento da liberação de NO nas regiões dorso e ventro lateral da PAG após o exercício de força. Tais regiões contêm colunas de células que apresentam grandes quantidades de NOS, onde o NO pode ser liberado e, conseqüentemente, participar da modulação do impulso nociceptivo (Lovick, 1996; Ishide *et al.*, 2005;

Chaitoff *et al.*, 2008). Desse modo, dentro da PAG, o NO pode promover a liberação de serotonina, a partir de terminais nervosos, a qual também é um importante neurotransmissor envolvido na inibição do impulso nociceptivo ao nível do corno dorsal da medula (Hamalainen & Lovick, 1997). Assim, essas evidências reforçam nossos resultados, os quais defendem o envolvimento central do NO na antinocicepção encontrada após o exercício.

Outros estudos também demonstraram que o NO aumenta os níveis intracelulares de cGMP no músculo esquelético durante a contração muscular (Young *et al.*, 1997; Young & Leighton, 1998). Nesse contexto, Garthwaite *et al.* (2006), verificaram que o NO também pode estimular a guanilil ciclase em axônios do SNC aumentando os níveis de cGMP nesse local (Garthwaite *et al.*, 2006). Tais resultados suportam nosso estudo, o qual demonstrou que o ODQ (inibidor do GMPc), pré-administrado sistemicamente ou centralmente, reverteu o efeito antinociceptivo promovido pelos protocolos de exercício, podendo sua produção ser modulada pelo NO, tanto a nível periférico quanto central, durante tal evento.

Então, com a finalidade de confirmar todo o envolvimento da via NO/GMPc/ K^+_{ATP} na antinocicepção induzida pelo exercício, nós utilizamos um bloqueador para os canais K^+_{ATP} (glibenclamida), que também demonstrou prevenir esse efeito. Os canais K^+_{ATP} são encontrados na superfície das membranas e em mitocôndrias de diferentes tipos de células, incluindo células β do pâncreas, neurônios, miócito cardíaco, fígado, célula muscular lisa (Baukrowitz & Fakler, 2000), bem como em estruturas responsáveis pela condução e pelo controle da resposta nociceptiva como nociceptores, gânglio da raiz dorsal da medula e PAG (Plevry, 1993; Ristoiu *et al.*, 2002). Além disso, os canais K^+_{ATP} são importantes por definir o potencial de repouso da membrana e controlar a excitabilidade de uma variedade de

neurônios periféricos e centrais. No caso dos nociceptores, eles podem ser hiperpolarizados, uma vez ativados os canais K^+_{ATP} , ocorrendo, então, inibição da deflagração do impulso nociceptivo (Bonica *et al.*, 1990).

Além disso, um estudo demonstrou aumento da expressão desses canais em corações de ratos após exercício aeróbico (Brown *et al.*, 2005), o que nos reforça a sugerir que, durante os protocolos de exercício do presente estudo, também pode ocorrer tal aumento, principalmente em estruturas responsáveis por conduzir a resposta nociceptiva.

Desse modo, os protocolos de exercícios utilizados nesse estudo podem induzir a liberação de NO pela ativação das 3 isoformas de NOS, com consequente ativação do cGMP, que ativará a abertura de canais K^+_{ATP} , os quais hiperpolarizarão o terminal nervoso, reduzindo, assim, a deflagração do impulso nociceptivo.

Para controlar a homeostasia, que se encontra alterada durante o exercício físico, várias adaptações fisiológicas são ativadas, objetivando suprir a demanda energética do nosso organismo, a qual se encontra aumentada (Brum *et al.*, 2004). Dentre essas adaptações, a ativação do sistema nervoso autônomo simpático tem extrema importância (Vissing *et al.*, 1998; Saito, 2000; Akita *et al.*, 2007). Essa ativação é responsável por promover aumento da frequência cardíaca, do volume sistólico e do débito cardíaco, com conseqüente aumento da pressão arterial, podendo ser encontrada tanto em exercícios agudos quanto realizados cronicamente, de natureza aeróbica ou anaeróbica (Forjaz & Tinucci, 2000; Forjaz *et al.*, 2003). Essas respostas produzidas pelo sistema simpático durante o exercício ocorrem pela ação de neurotransmissores, liberados pelas terminações simpáticas, dentre os quais destacamos a noradrenalina (Negrão & Barreto, 2010).

Além disso, durante a atividade física ocorre uma ativação neuroendócrina, a qual promoverá a liberação de alguns hormônios e neurotransmissores que também participam do controle metabólico e cardiorrespiratório. Entretanto, dentro dessas substâncias, a noradrenalina pode ser tanto um neurotransmissor, liberado das terminações do sistema nervoso simpático, quanto um hormônio, liberado da glândula adrenal (Negrão & Barreto, 2010). Uma vez liberada, independente do local, irá produzir determinadas ações que ocorrem através da ativação de receptores, dentre eles os α e β (McArdle *et al.*, 2002).

Nesse contexto, alguns trabalhos têm relatado aumento da ativação e da expressão de receptores α_2 noradrenérgicos pelo exercício físico agudo ou crônico em ratos (Stich *et al.*, 1999; Wang & Cheng, 1999; Stich *et al.*, 2000; Stich *et al.*, 2002). Além disso, tais estudos investigaram o envolvimento desses receptores no metabolismo de gordura e na ativação plaquetária.

Dessa forma, esses receptores também podem estar envolvidos em outras respostas, tais como a antinocicepção induzida pelo exercício. Visto que muitos trabalhos já evidenciaram o envolvimento deles na modulação da resposta nociceptiva (Yaksh, 1985; Eisenach *et al.*, 1995; Millan, 2002; King *et al.*, 2005; Omiya *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2011).

Assim, essa questão foi primeiramente confirmada por Oluyomi & Hart (1990), que encontraram uma atenuação da antinocicepção induzida pelo nado em camundongos, avaliada pelo teste da placa quente, após pré tratamento com ioimbina (Oluyomi & Hart, 1990).

Ainda reforçando o envolvimento desse sistema, o grupo do professor Tukuyama demonstrou que a clonidina, um agonista para os receptores α_2 noradrenérgicos, potencializou o efeito antinociceptivo induzido pelo nado forçado

em camundongos, o qual foi revertido pela ioimbina pré administrada sistemicamente (Tokuyama *et al.*, 1991a; Tokuyama *et al.*, 1991b). Entretanto, esses estudos citados previamente não investigaram o envolvimento central desses receptores na antinocicepção encontrada após o nado. Nesse sentido, nosso trabalho investigou o envolvimento dos receptores α_2 , bem como de seus subtipos (α_2A e α_2C), tanto a nível periférico quanto central.

Nesse contexto, o nosso estudo encontrou uma reversão da antinocicepção produzida pelo exercício aeróbico e de força após o pré tratamento sistêmico com o antagonista não seletivo ioimbina, nos 3 testes nociceptivos. Muitos estudos têm demonstrado enfaticamente a participação dos receptores α_2 na modulação da dor, através da administração sistêmica desse antagonista em animais, e até mesmo, em humanos, avaliados por testes nociceptivos térmicos e mecânicos (Bansinath *et al.*, 1989; Aley & Levine, 1997; Morales *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2011).

No entanto, como a ioimbina é um antagonista não seletivo, o presente estudo investigou também a participação das subclasses dos receptores α_2 , no caso os receptores α_2A e α_2C , no efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico e de força.

Estudos utilizando a técnica de PCR demonstraram a presença mRNA para α_2A e/ou α_2C em gânglio da raiz dorsal de ratos e humanos (Nicholas *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 1997; Gold *et al.*, 1997; Ongioco *et al.*, 2000). Além disso, outros estudos sugerem que esses receptores estão envolvidos na inibição dos impulsos de fibras aferentes primárias nociceptivas, (Millan, 1992; Graham *et al.*, 1997; Hunter *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1999). Esses receptores também têm sido envolvidos no mecanismo da antinocicepção periférica em diferentes modelos de hiperalgesia (Khasar *et al.*, 1995; Aley & Levine, 1997; Tomic *et al.*, 2007). Desse modo, esses

achados fortalecem os resultados encontrados em nosso trabalho, que demonstraram que a pré injeção sistêmica do antagonista seletivo para o receptor $\alpha 2A$ (BRL 44408) e do antagonista seletivo para o receptor $\alpha 2C$ (rauvolscina) reverteram o efeito antinociceptivo do exercício, avaliado pelo estímulo térmico aplicado sobre a cauda e a face e o estímulo mecânico aplicado sobre a pata.

Entretanto, a nível central, a pré administração (i.t. ou i.c.v.) de ioimbina não alterou o efeito antinociceptivo produzido pelos protocolos de exercício. No entanto, muitos estudos demonstraram a presença de receptores $\alpha 2$ diversas regiões do SNC, tais como *Locus coeruleus*, NMR, PAG e corno dorsal da medula, as quais participam da modulação descendente da dor (Jones *et al.*, 1982; Bouchenafa & Livingston, 1987; Rosin *et al.*, 1993; Vaughan *et al.*, 1996; Eisenach *et al.*, 1998; D'Angelo *et al.*, 1999; Dougherty & Staats, 1999). Além disso, alguns estudos também verificaram uma participação central de receptores $\alpha 2$ noradrenérgicos, após reversão da antinocicepção pela prévia injeção de ioimbina (Buerkle & Yaksh, 1998; Grabow *et al.*, 1999; Millan, 2002). Entretanto, outros trabalhos verificaram que esse antagonista, quando injetado intratecalmente ou em algumas estruturas do cérebro de roedores também pode produzir antinocicepção ou até mesmo inibir impulsos nociceptivos provenientes de fibras aferentes primárias em roedores (Dennis *et al.*, 1980; Kanui *et al.*, 1993; Szymbor & Kowalczyk, 1996; Kohane *et al.*, 2001; Khodayar *et al.*, 2006). Porém, em nosso estudo, esse efeito não foi verificado, visto que, quando administrada pelas vias s.c., i.t., ou i.c.v. nos animais não exercitados (controle positivo), o limiar nociceptivo mensurado em cada teste algosimétrico não foi alterado. Além disso, a antinocicepção encontrada após os protocolos de exercício nos animais pré-tratados com ioimbina (i.t. ou i.c.v.) não foi diferente dos animais exercitados pré-tratados (i.t. ou i.c.v.) com salina.

Somando ao resultado encontrado pela administração i.t., a pré injeção intracerebroventricular de ioimbina nas doses de 30 e 60 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ também não reverteu a antinocicepção induzida pelo exercício aeróbico e de força. Outro estudo que usou esse antagonista por essa mesma via, também na dose de 60 μg não encontrou uma reversão da antinocicepção induzida por um antidepressivo inibidor da recaptação de noradrenalina (Yokogawa *et al.*, 2002). Nesse mesmo estudo, o autor sugere que neurônios noradrenérgicos podem realizar sinapses com neurônios serotoninérgicos, os quais liberam serotonina, que irá agir no corno dorsal da medula, induzindo antinocicepção. Lembrando que um estudo encontrou a participação desse neurotransmissor (serotonina) no mecanismo da analgesia induzida pelo exercício (Hoffmann *et al.*, 1990).

Além disso, outro estudo demonstrou que somente a pré injeção sistêmica (4 mg/kg), mas não a i.c.v. (30 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) de ioimbina, reverteu o efeito antinociceptivo produzido pelo impropgan, antagonista de receptor para histamina do tipo H₂ e um analgésico não-opióide (Svokos *et al.*, 2001). Esses achados foram similares ao do presente estudo, tanto na resposta quanto nas doses utilizadas, sugerindo que a participação dos receptores α_2 noradrenérgicos na antinocicepção induzida pelo exercício pode ser periférica, onde o sistema noradrenérgico poderá agir inibindo a deflagração de fibras aferentes primárias nociceptivas.

Além disso, a expressão de receptores $\alpha_2\text{C}$ em tecido cerebral de ratos, investigada pela técnica de *Western blot*, não foi alterada após ambos os protocolos de exercício realizados por esse estudo. Apesar do aumento de receptores não ser um indício para produção de um determinado efeito, esse resultado sugere a ausência do envolvimento de tais receptores no efeito antinociceptivo produzido pelos exercícios a nível central. Além disso, outro estudo também verificou que a

expressão de receptores α_2 noradrenérgicos e as concentrações plasmáticas de noradrenalina não foram alteradas após treinamento aeróbico (Richterova *et al.*, 2004).

Apesar de o presente estudo não encontrar alterações na expressão de receptores α_2C em cérebro após exercício, outros estudos demonstraram a importância desses receptores, os quais estão presentes em diferentes situações fisiológicas como agregação plaquetária, controle do fluxo sanguíneo muscular e lipólise (Stich *et al.*, 1999; Wang & Cheng, 1999; Buckwalter *et al.*, 2001). De acordo com esses estudos a ativação ou a expressão de receptores α_2 noradrenérgicos pelo exercício tem produzido importantes efeitos periféricos, visto que esses receptores estão localizados em terminais nervosos noradrenérgicos, modulando a liberação de noradrenalina (Hein *et al.*, 1999).

Considerando-se então, a evidência do envolvimento do sistema noradrenérgico em receptores α_2 a nível periférico, o presente estudo demonstrou que pré tratamento com a guanetidina, uma droga que pode inibir tanto o armazenamento quanto a liberação de noradrenalina dos terminais noradrenérgicos, inibiu completamente a antinocicepção induzida pelos protocolos de exercício.

Além disso, uma vez inibida a liberação desse neurotransmissor, esse, por sua vez, não irá ativar receptores α_2 e, conseqüentemente, produzir antinocicepção, visto que tais receptores podem ser expressos em neurônios sensoriais periféricos (Millan, 2002; Nicholson *et al.*, 2005)

A ação periférica da noradrenalina pode ser a partir de sua liberação pelas terminações do sistema nervoso simpático ou pela glândula adrenal. Porém, estudos fornecem evidências de seus efeitos serem via medula adrenal, em que, após adrenalectomia, os níveis de catecolaminas em resposta ao exercício foram

reduzidos (Richter *et al.*, 1980; Sonne *et al.*, 1985). Além disso, essa substância também é bastante liberada por terminais noradrenérgicos simpáticos periféricos (Scheurink *et al.*, 1989) e um estudo verificou uma redução das concentrações plasmáticas de noradrenalina durante o exercício, após simpatectomia química induzida pela guanetidina em ratos (Blomqvist & Saltin, 1983). Entretanto, a guanetidina não alterou a produção de catecolaminas pela medula adrenal (Athos *et al.*, 1962). Assim, a provável liberação da noradrenalina e o consequente efeito antinociceptivo produzidos pelos protocolos de exercício utilizados em nosso estudo pode ser via terminais noradrenérgicos, visto que a guanetidina aboliu esse efeito.

Apesar de a guanetidina poder inibir a liberação de noradrenalina, esse efeito não alterou significativamente a *performance* dos animais em ambos protocolos de exercício utilizados nesse estudo.

Em suporte à hipótese do envolvimento de receptores α_2 noradrenérgicos na antinocicepção induzida pelo exercício, verificamos também que tal efeito não foi encontrado em camundongos com duplo *knockout* para os receptores α_2A e α_2C comparados com os selvagens (*wide type*). Fairbanks *et al.* (2002) também demonstraram que o efeito antinociceptivo da monoxinida (agonista α_2) foi reduzido em camundongos *knockouts* para os receptores α_2A e α_2C (Fairbanks *et al.*, 2002). Camundongos *knockouts* para receptores α_2 noradrenérgicos têm se tornado uma importante ferramenta para o estudo do mecanismo antinociceptivo de várias substâncias (Hunter *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997; Fairbanks *et al.*, 2002; Kingery *et al.*, 2002).

Também não foi encontrada diferença na *performance* durante o exercício entre os animais *knockouts* e selvagens, mesmo que já tenha sido relatado que

esses animais apresentam uma redução do rendimento físico aeróbico (Cunha *et al.*, 2009).

Em resumo, o presente estudo demonstrou que, de maneira aguda, tanto o exercício aeróbico quanto o de força foram eficazes em produzir antinocicepção frente a estímulos mecânico ou térmico. Desse modo, tal efeito pode envolver a mobilização da via NO/cGMP/K⁺_{ATP} e do sistema de endocanabinoides endógenos através da ativação de receptores CB1 e CB2, de maneira sistêmica e, central. Além disso, também foi verificada a participação periférica de receptores α 2 noradrenérgicos nesse efeito.

Ademais, sugerimos que ambas as vias podem ser ativadas em conjunto durante o exercício físico, participando de forma sinérgica no efeito antinociceptivo. Assim, de maneira a reforçar essa hipótese, foi verificado através de alguns trabalhos que agonistas para receptores CB1 e CB2 reduziram a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica, através da ativação da via NO/GMPc/K⁺_{ATP} (Reis *et al.*, 2009; Negrete *et al.*, 2011). Em adição, Stefano *et al.* (1996) demonstraram que alguns locais com alta seletividade de ligação para a anandamida, presentes em monócitos e microglia, podem apresentar acoplamento e liberação de NO (Stefano *et al.*, 1996). Além da ativação induzida pelo sistema endocanabinóide, a via NO/cGMP também pode ser ativada por receptores α 2 noradrenérgicos. Essa resposta foi vista em um estudo realizado por nosso grupo, no qual a antinocicepção induzida pela xilazina (um agonista para receptores α 2) foi revertida pré administração periférica de NOARG (inibidor não-seletivo da NOS) e ODQ (inibidor do cGMP) (Romero & Duarte, 2009). Somando a esses resultados, Lichtman & Martin (1991) relataram que o sistema canabinóide pode ativar neurônios noradrenérgicos. Essa evidência foi confirmada após esses autores verificarem que

o pré tratamento com a ioimbina bloqueou o efeito antinociceptivo produzido pelo Δ^9 -THC (Lichtman & Martin, 1991) (Figura 17).

Assim, os resultados demonstrados no presente estudo abrem uma janela importante para a investigação científica para a compreensão dos mecanismos endógenos de analgesia deflagrada pelo exercício físico, bem como para a compreensão de mecanismos alternativos para o tratamento da dor.

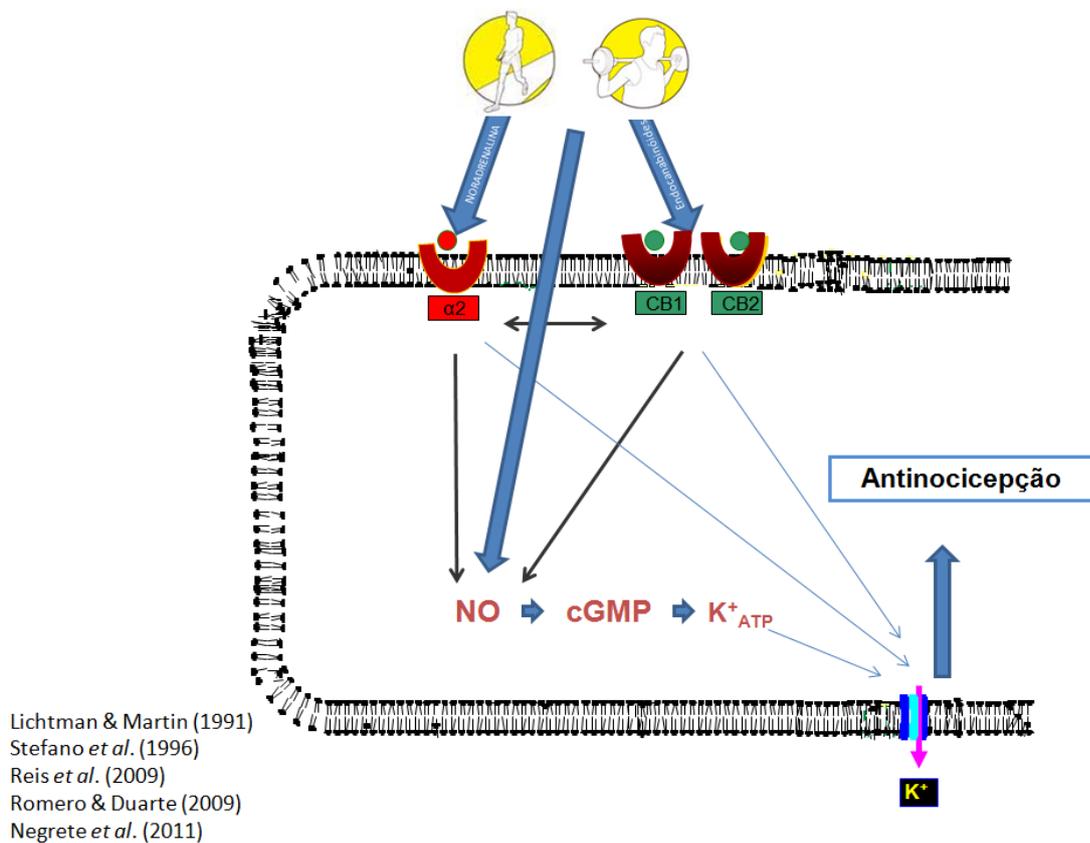


Figura 17 - Mecanismos endógenos envolvidos na antinociceção induzida pelo exercício físico

SUMMARY

The antinociception induced by physical exercise has been widely investigated in the literature since the end of the 1970's. The majority of studies have demonstrated the endogenous opioid system as the main one involved in this effect. This way, knowing that there are other endogenous pathways responsible for modulate both response and impulse nociceptive, the present study aimed to investigate the participation of the endocannabinoid system, NO/cGMP/K⁺_{ATP} pathway and the noradrenergic system in the antinociceptive effect induced by exercise.

For the study, were used male Wistar rats submitted to an acute aerobic exercise protocol and an acute resistance exercise protocol. Moreover, were also used male α 2A and α 2C adrenergic receptors knockout mice and its widetype, submitted also to acute aerobic exercise protocol. The exercise protocols were performed on a treadmill adapted for rats and mice and in a weight-lifting apparatus adapted for rats. The nociceptive threshold was measured by paw withdrawal, tail-flick face-flick tests. Immediately after the exercise protocols, was found an increased significant ($P < 0.05$) in the nociceptive threshold in all nociceptive tests after aerobic exercise and in the paw withdrawal test after resistance exercise. The respect of the involvement of the endocannabinoids system in the exercise-induced antinociception was found that the pre-injection (s.c., i.t. and i.c.v.) of CB1 and CB2 cannabinoid receptors antagonists (AM251 and AM630) reversed this effect. Furthermore, the antinociceptive effect induced by exercise protocols was potentiated and prolonged after systemic and central of enzymes degrade anandamide and 2-AG inhibitors (MAFP and JZL 184) and anandamide reuptake inhibitor (VDM 11). Following the exercise protocols was also found an increase of CB1 cannabinoid receptor expression in the brain tissue of

rats quantified by Western blot analysis. Adding to this result, the immunofluorescence technique demonstrated activation and increase in the neurons number that expressed CB1 cannabinoid receptors in the ventro lateral and dorso lateral periaqueductal gray matter regions after the exercise protocols. Both exercise protocols were also responsible for increased of the endocannabinoids levels anandamide, 2-arachidonoylglycerol, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the plasma.

To investigate the involvement of NO/cGMP/ K^+_{ATP} in the antinociception effect induced by exercise protocols were used NOArg (non-selective inhibitor of nitric oxide synthase), the ODQ (inhibitor of cyclic guanosine monophosphate) and glibenclamide (blocker of ATP-sensitive potassium channels (K^+_{ATP})). Thus, the pre-administration s.c., i.t. and i.c.v. of these drugs reversed the antinociceptive effect found after the acute aerobic exercise and acute resistance exercise. In addition, this reversion was also found by the pre administration (s.c., i.t. and i.c.v.) of specific endothelial nitric oxide synthase inhibitor, the L-NIO; the specific inducible nitric oxide synthase inhibitor, the aminoguanidine and a specific neuronal nitric oxide synthase inhibitor, the L-NPA. Additionally, the plasma and cerebrospinal fluid levels of nitrite were increased after both exercise protocols. Also through the reagent 4-amino-5 diacetate methylamino-2'7'-difluoresceína (DAF-FM) was verified a greater release of nitric oxide (NO) in both PAG regions after the resistance exercise.

However, the noradrenergic system seems to be involved only peripherally in the antinociception found after the exercise protocols. Yohimbine (a non-selective α_2 adrenoreceptors antagonist), rauvolfina (a selective α_2C adrenoreceptors antagonist) and BRL44408 (a selective α_2A adrenoreceptors antagonist) reversed the antinociceptive effect when subcutaneously pre-injected, but when pre-injected

i.t. or i.c.v the yohimbine it did not alter the antinociceptive effect induced by acute aerobic exercise and acute resistance exercise. Furthermore, after both protocols were not verified alteration in the $\alpha 2C$ receptors expression changed in the brain tissue of rats. Thus, confirming the peripheral involvement of this system, the pre-treatment (3 days) with the guanethidine, a storage and exocytosis norepinephrine inhibitor from noradrenergic terminals, inhibited exercise-induced antinociception. In addition, the antinociception produced by the acute aerobic exercise protocol in wildtype mice was not found in $\alpha 2A$ and $\alpha 2C$ adrenoreceptors knockout mice.

This study suggests evidence that the endocannabinoid system and NO/cGMP/ K^+_{ATP} pathway are involved in the peripheral and central antinociception induced by exercise, as well as the noradrenergic system at the peripheral level.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, F.V., Melzack, R., Samuel, C., 1982. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Exp Neurol*. 75, 644-51.

Adams, R., Lowe, S., Jellinek, C., Wolff, H., 1941. Tetrahydrocannabinol homologs with marijuana activity. *J Am Chem Soc*. 63, 1971-3.

Adams, I.B., Ryan, W., Singer, M., Thomas, B.F., Compton, D.R., Razdan, R.K., Martin, B.R., 1995. Evaluation of cannabinoid receptor binding and in vivo activities for anandamide analogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 273, 1172-81.

Adams, I.B., Martin, B.R., 1996. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. 91, 1585-614.

Aguiar DC, Guimaraes FS. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. *J Neurosci Res* 2009;87:2418-2429.

Ahluwalia, J., Urban, L., Capogna, M., Bevan, S., Nagy, I., 2000. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*. 100, 685-8.

Akita, Y., Otani, H., Matsuhisa, S., Kyoj, S., Enoki, C., Hattori, R., Imamura, H., Kamihata, H., Kimura, Y., Iwasaka, T., 2007. Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292, H2051-9.

Aley, K.O., Levine, J.D., 1997. Multiple receptors involved in peripheral alpha 2, mu, and A1 antinociception, tolerance, and withdrawal. *J Neurosci*. 17, 735-44.

Almeida, R.T., Duarte, I.D., 2008. Nitric oxide/cGMP pathway mediates orofacial antinociception induced by electroacupuncture at the St36 acupoint. *Brain Res*. 1188, 54-60.

Anshel, M.H., Russell, K.G., 1994. Effect of aerobic and strength training on pain tolerance, pain appraisal and mood of unfit males as a function of pain location. *J Sports Sci*. 12, 535-47.

Ates, M., Hamza, M., Seidel, K., Kotalla, C.E., Ledent, C., Guhring, H., 2003. Intrathecally applied flurbiprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. *Eur J Neurosci*. 17, 597-604.

Athos, W.J., Mc, H.B., Fineberg, S.E., Hilton, J.G., 1962. The effects of guanethidine on the adrenal medulla. *J Pharmacol Exp Ther*. 137, 229-34.

Atwood, B.K., Mackie, K., 2010. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*. 160, 467-79.

Bansinath, M., Ramabadran, K., Turndorf, H., Puig, M.M., 1989. Effect of yohimbine on nociceptive threshold in normoglycemic and streptozotocin-treated hyperglycemic mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 33, 459-63.

Baranauskas, G., Nistri, A., 1998. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol.* 54, 349-65.

Bartholomew, J.B., Lewis, B.P., Linder, D.E., Cook, D.B., 1996. Post-exercise analgesia: replication and extension. *J Sports Sci.* 14, 329-34.

Basbaum, A.I., Fields, H.L., 1984. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci.* 7, 309-38.

Basbaum, A.I., Jessel, T.M., 2000. The perception of pain. In *Principles of neural science*. Vol.1, E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessel, eds. McGraw-Hill, New York, pp. 472-491.

Baukrowitz, T., Fakler, B., 2000. KATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem.* 267, 5842-8.

Beh, H.C., Mathers, S., Holden, J., 1996. EEG correlates of exercise dependency. *Int J Psychophysiol.* 23, 121-8.

Bejjamini V, Guimaraes FS. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res* 2006;170:52-61.

Bement, M.K., Sluka, K.A., 2005. Low-intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner. *Arch Phys Med Rehabil.* 86, 1736-40.

Bermudez-Ocana, D.Y., Ambriz-Tututi, M., Perez-Severiano, F., Granados-Soto, V., 2006. Pharmacological evidence for the participation of NO-cyclic GMP-PKG-K⁺ channel pathway in the antiallodynic action of resveratrol. *Pharmacol Biochem Behav.* 84, 535-42.

Binder, W., Mousa, S.A., Sitte, N., Kaiser, M., Stein, C., Schafer, M., 2004. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *Eur J Neurosci.* 20, 92-100.

Black, J., Chesher, G.B., Starmer, G.A., Egger, G., 1979. The painlessness of the long distance runner. *Med J Aust.* 1, 522-3.

Blais, C., Jr., Adam, A., Massicotte, D., Peronnet, F., 1999. Increase in blood bradykinin concentration after eccentric weight-training exercise in men. *J Appl Physiol.* 87, 1197-201.

Blomqvist, C.G., Saltin, B., 1983. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol.* 45, 169-89.

Bloomer, R.J., Smith, W.A., Fisher-Wellman, K.H., 2007. Glycine propionyl-L-carnitine increases plasma nitrate/nitrite in resistance trained men. *J Int Soc Sports Nutr.* 4, 22.

Bodnar, R.J., Kelly, D.D., Spiaggia, A., Ehrenberg, C., Glusman, M., 1978. Dose-dependent reductions by naloxone of analgesia induced by cold-water stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 8, 667-72.

Bonica, J.J., 1990. Evolution and current status of pain programs. *J Pain Symptom Manage.* 5, 368-74.

Bonica, J.J., Yaksh, T., Liebeskind, J.C., Pechnick, R.N., De paulis, A., 1990. Biochemistry and modulation of nociception and pain. In *The management of Pain.* Vol. 1, J.J. Bonica, ed. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 95-121.

Bonica, J.J., Loeser, J.D., 2001. History and pain concepts and therapies. In *Bonica's management of pain.* Vol. 3, J.D. Loeser, S.H. Butler, S.R. Chapman, D.C. Turk, eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 3-16.

Borsani, E., Labanca, M., Bianchi, R., Rodella, L.F., 2007. AM404 decreases Fos-immunoreactivity in the spinal cord in a model of inflammatory pain. *Brain Res.* 1152, 87-94.

Bouchenafa, O., Livingston, A., 1987. Autoradiographic localisation of alpha 2 adrenoceptor binding sites in the spinal cord of the sheep. *Res Vet Sci.* 42, 382-6.

Brayden, J.E., 2002. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29, 312-6.

Brodie, M.S., Proudfit, H.K., 1986. Antinociception induced by local injections of carbachol into the nucleus raphe magnus in rats: alteration by intrathecal injection of monoaminergic antagonists. *Brain Res.* 371, 70-9.

Brooks, G.A., White, T.P., 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol.* 45, 1009-15.

Brown, D.A., Lynch, J.M., Armstrong, C.J., Caruso, N.M., Ehlers, L.B., Johnson, M.S., Moore, R.L., 2005. Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol.* 564, 619-30.

Brown, L.A., Key, B.J., Lovick, T.A., 1999. Bio-imaging of nitric oxide-producing neurones in slices of rat brain using 4,5-diaminofluorescein. *J Neurosci Methods.* 92, 101-10.

Brum, P.C., Forjaz, C.L.M., Tinucci, T., Negrão, C.E., 2004. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Rev. paul. Educ. Fís.* 18, 21-31.

Buckwalter, J.B., Naik, J.S., Valic, Z., Clifford, P.S., 2001. Exercise attenuates alpha-adrenergic-receptor responsiveness in skeletal muscle vasculature. *J Appl Physiol.* 90, 172-8.

Budai, D., Harasawa, I., Fields, H.L., 1998. Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha2-adrenergic receptors. *J Neurophysiol.* 80, 2244-54.

Buerkle, H., Yaksh, T.L., 1998. Pharmacological evidence for different alpha 2-adrenergic receptor sites mediating analgesia and sedation in the rat. *Br J Anaesth.* 81, 208-15.

Burckhardt, C.S., Mannerkorpi, K., Hedenberg, L., Bjelle, A., 1994. A randomized, controlled clinical trial of education and physical training for women with fibromyalgia. *J Rheumatol.* 21, 714-20.

Boutcher, S.H., 1990. Aerobic fitness: measurement and issues. *J Sports Exerc Psychol.* 12, 235-47

Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R., Jr., Trendelenburg, U., 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 46, 121-36.

Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., Piomelli, D., 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* 394, 277-81.

Cameron, A.A., Khan, I.A., Westlund, K.N., Cliffer, K.D., Willis, W.D., 1995. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. I. Ascending projections. *J Comp Neurol.* 351, 568-84.

Carmody, J., Cooper, K., 1987. Swim stress reduces chronic pain in mice through an opioid mechanism. *Neurosci Lett.* 74, 358-63.

Cannon, J.T., Prieto, G.J., Lee, A., Liebeskind, J.C., 1982. Evidence for opioid and non-opioid forms of stimulation-produced analgesia in the rat. *Brain Res.* 243, 315-21.

Carpenter, D., Engberg, I., Lundberg, A., 1965. Differential Supraspinal Control of Inhibitory and Excitatory Actions from the Fra to Ascending Spinal Pathways. *Acta Physiol Scand.* 63, 103-10.

Casanova, M.L., Blazquez, C., Martinez-Palacio, J., Villanueva, C., Fernandez-Acenero, M.J., Huffman, J.W., Jorcano, J.L., Guzman, M., 2003. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest.* 111, 43-50.

Casarotto, P.C., Terzian, A.L., Aguiar, D.C., Zangrossi, H., Guimaraes, F.S., Wotjak, C.T., Moreira, F.A., 2012. Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB(1)) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel ,*Neuropsychopharmacology.* 37, 478-86.

Casey, K.L., 2000. The imaging of pain: Background and rationale. In: Casey, K.L., Bushnell (Eds). Pain imaging, pp. 1-29.

Cavicchi, M., Whittle, B.J., 1999. Potentiation of cytokine induced iNOS expression in the human intestinal epithelial cell line, DLD-1, by cyclic AMP. *Gut*. 45, 367-74.

Celerier, E., Gonzalez, J.R., Maldonado, R., Cabanero, D., Puig, M.M., 2006. Opioid-induced hyperalgesia in a murine model of postoperative pain: role of nitric oxide generated from the inducible nitric oxide synthase. *Anesthesiology*. 104, 546-55.

Chaitoff, K.A., Patel, D., Ally, A., 2008. Effects of endothelial NOS antagonism within the periaqueductal gray on cardiovascular responses and neurotransmission during mechanical, heat, and cold nociception. *Brain Res*. 1236, 93-104.

Chalimoniuk, M., Wronski, Z., Gilewski, K., Stolecka, A., Langfort, J., 2005. Does exercise training affect NO/GC/cGMP pathway in the brain? *J Human Kinetics*. 13, 27-40.

Khasar, S.G., Green, P.G., Chou, B., Levine, J.D., 1995. Peripheral nociceptive effects of alpha -adrenergic receptor in the rat. *Neuroscience*. 66, 427-32.

Chavoshan, B., Fournier, M., Lewis, M.I., Porszasz, J., Storer, T.W., Da, X., Rambod, M., Casaburi, R., 2011. Testosterone and resistance training effects on muscle nitric oxide synthase isoforms in COPD men. *Respir Med*.

Cho, H.J., Kim, D.S., Lee, N.H., Kim, J.K., Lee, K.M., Han, K.S., Kang, Y.N., Kim, K.J., 1997. Changes in the alpha 2-adrenergic receptor subtypes gene expression in rat dorsal root ganglion in an experimental model of neuropathic pain. *Neuroreport*. 8, 3119-22.

Choi, S.M., Chung, S.Y., Seol, C.A., Sul, J.G., Kwon, M.S., 2010. The role of neuronal nitric oxide synthase on hypobaric hypoxia-induced antinociception in writhing test. *Arch Pharm Res*. 33, 1103-10.

Clark, F.M., Proudfit, H.K., 1993. The projections of noradrenergic neurons in the A5 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat: anatomical evidence that A5 neurons modulate nociception. *Brain Res*. 616, 200-10.

Clifford, P.S., Kluess, H.A., Hamann, J.J., Buckwalter, J.B., Jasperse, J.L., 2006. Mechanical compression elicits vasodilatation in rat skeletal muscle feed arteries. *J Physiol*. 572, 561-7.

Coats, A.J., Adamopoulos, S., Radaelli, A., McCance, A., Meyer, T.E., Bernardi, L., Solda, P.L., Davey, P., Ormerod, O., Forfar, C., et al., 1992. Controlled trial of physical training in chronic heart failure. Exercise performance, hemodynamics, ventilation, and autonomic function. *Circulation*. 85, 2119-31.

Colt, E.W., Spyropoulos, E., 1979. Running and stress fractures. *Br Med J*. 2, 706.

Contarteze, R.V., Manchado, Fde. B., Gobatto, C.A., De Mello, M.A. 2007. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 151, 415-22.

Cooper, K., Carmody, J., 1982. The characteristics of the opioid-related analgesia induced by the stress of swimming in the mouse. *Neurosci Lett.* 31, 165-70.

Costa, B., Siniscalco, D., Trovato, A.E., Comelli, F., Sotgiu, M.L., Colleoni, M., Maione, S., Rossi, F., Giagnoni, G., 2006. AM404, an inhibitor of anandamide uptake, prevents pain behaviour and modulates cytokine and apoptotic pathways in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol.* 148, 1022-32.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 384, 83-7.

Cunha, T.F., Saito, T.A., Bueno Júnior, C.R., Coelho, M.A., Mattos, K.C., Brum, P.C., 2009. Resposta Taquicárdica e Controle Autonômico no Exercício Físico em Modelo Genético de Insuficiência Cardíaca. *Rev Bras Med Esporte.* 15, 260-263.

Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 1755-60.

[Cury Y](#), [Picolo G](#), [Gutierrez VP](#), [Ferreira SH](#)., 2011. The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide.* 25, 253-54.

D'Angelo, R., Evans, E., Dean, L.A., Gaver, R., Eisenach, J.C., 1999. Spinal clonidine prolongs labor analgesia from spinal sufentanil and bupivacaine. *Anesth Analg.* 88, 573-6.

D'amour, E.F., Smith, D., 1941. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72, 74-79.

De Chiara, V., Errico, F., Musella, A., Rossi, S., Mataluni, G., Sacchetti, L., Siracusano, A., Castelli, M., Cavasinni, F., Bernardi, G., Usiello, A., Centonze, D., 2010. Voluntary exercise and sucrose consumption enhance cannabinoid CB1 receptor sensitivity in the striatum. *Neuropsychopharmacology.* 35, 374-87.

de Lago, E., Ligresti, A., Ortar, G., Morera, E., Cabranes, A., Pryce, G., Bifulco, M., Baker, D., Fernandez-Ruiz, J., Di Marzo, V., 2004. In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *Eur J Pharmacol.* 484, 249-57.

de Meirleir, K., Naaktgeboren, N., Van Steirteghem, A., Gorus, F., Olbrecht, J., Block, P., 1986. Beta-endorphin and ACTH levels in peripheral blood during and after aerobic and anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 55, 5-8.

De Petrocellis, L., Melck, D., Bisogno, T., Milone, A., Di Marzo, V., 1999. Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: possible role in the feeding response. *Neuroscience.* 92, 377-87.

Dellhag, B., Wollersjo, I., Bjelle, A., 1992. Effect of active hand exercise and wax bath treatment in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res.* 5, 87-92.

Dennis, S.G., Melzack, R., 1980. Pain modulation by 5-hydroxytryptaminergic agents and morphine as measured by three pain tests. *Exp Neurol.* 69, 260-70.

Dennis, S.G., Melzack, R., Gutman, S., Boucher, F., 1980. Pain modulation by adrenergic agents and morphine as measured by three pain tests. *Life Sci.* 26, 1247-59.

Deshmukh, A.S., Long, Y.C., de Castro Barbosa, T., Karlsson, H.K., Glund, S., Zavadoski, W.J., Gibbs, E.M., Koistinen, H.A., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R., 2010. Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK)alpha1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. *Diabetologia.* 53, 1142-50.

Deutsch, D.G., Chin, S.A., 1993. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol.* 46, 791-6.

Devane, W.A., Dysarz, F.A., 3rd, Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34, 605-13.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258, 1946-9.

Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Melck, D., Martin, B.R., 1999. Cannabimimetic fatty acid derivatives: the anandamide family and other endocannabinoids. *Curr Med Chem.* 6, 721-44.

Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L., 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 3, 771-84.

Dietrich, A., McDaniel, W.F., 2004. Endocannabinoids and exercise. *Br J Sports Med.* 38, 536-41.

Dougherty, P.M., Staats, P.S., 1999. Intrathecal drug therapy for chronic pain: from basic science to clinical practice. *Anesthesiology.* 91, 1891-918.

Droste, C., Meyer-Blankenburg, H., Greenlee, M.W., Roskamm, H., 1988. Effect of physical exercise on pain thresholds and plasma beta-endorphins in patients with silent and symptomatic myocardial ischaemia. *Eur Heart J.* 9 Suppl N, 25-33.

Droste, C., Greenlee, M.W., Schreck, M., Roskamm, H., 1991. Experimental pain thresholds and plasma beta-endorphin levels during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 23, 334-42.

Duarte, I.D., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1990. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 186, 289-93.

Duarte, I.D., Ferreira, S.H., 1992. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 221, 171-4.

Dudhgaonkar, S.P., Kumar, D., Naik, A., Devi, A.R., Bawankule, D.U., Tandan, S.K., 2004. Interaction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors in formalin-induced nociception in mice. *Eur J Pharmacol.* 492, 117-22.

Dworkin, B.R., Elbert, T., Rau, H., Birbaumer, N., Pauli, P., Droste, C., Brunia, C.H., 1994. Central effects of baroreceptor activation in humans: attenuation of skeletal reflexes and pain perception. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 6329-33.

Eisenach, J.C., DuPen, S., Dubois, M., Miguel, R., Allin, D., 1995. Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain. The Epidural Clonidine Study Group. *Pain.* 61, 391-9.

Eisenach, J.C., Hood, D.D., Curry, R., 1998. Intrathecal, but not intravenous, clonidine reduces experimental thermal or capsaicin-induced pain and hyperalgesia in normal volunteers. *Anesth Analg.* 87, 591-6.

Ellsworth, M.L., 2004. Red blood cell-derived ATP as a regulator of skeletal muscle perfusion. *Med Sci Sports Exerc.* 36, 35-41.

Ettinger, W.H., Jr., Burns, R., Messier, S.P., Applegate, W., Rejeski, W.J., Morgan, T., Shumaker, S., Berry, M.J., O'Toole, M., Monu, J., Craven, T., 1997. A randomized trial comparing aerobic exercise and resistance exercise with a health education program in older adults with knee osteoarthritis. The Fitness Arthritis and Seniors Trial (FAST). *JAMA.* 277, 25-31.

Fairbanks, C.A., Stone, L.S., Kitto, K.F., Nguyen, H.O., Posthumus, I.J., Wilcox, G.L., 2002. $\alpha(2C)$ -Adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. *J Pharmacol Exp Ther.* 300, 282-90.

Farquhar-Smith, W.P., Egertova, M., Bradbury, E.J., McMahon, S.B., Rice, A.S., Elphick, M.R., 2000. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci.* 15, 510-21.

Farrell, P.A., Ebert, T.J., Kampine, J.P., 1991. Naloxone augments muscle sympathetic nerve activity during isometric exercise in humans. *Am J Physiol.* 260, E379-88.

Ferreira, J.C., Rolim, N.P., Bartholomeu, J.B., Gobatto, C.A., Kokubun, E., Brum, P.C., 2007. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34, 760-5.

Ferreira, S.H., Duarte, I.D., Lorenzetti, B.B., 1991. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol.* 201, 121-2.

Forjaz, C.L.M., Tinucci, T., 2000. A medida da pressão arterial no exercício. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 7, 79-87.

Forjaz, C.L.M., Rezk, C.C., Melo, C.M., Santos, D.A., Teixeira, L., Nery, S.S., Tinucci, T., 2003. Exercício resistido para o paciente hipertenso: indicação ou contra-indicação. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 10, 119-124.

Frandsen, U., Lopez-Figueroa, M., Hellsten, Y., 1996. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 227, 88-93.

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288, 373-6.

Galdino, G.S., 2008. Avaliação da participação de opióides endógenos na antinocicepção induzida por diferentes protocolos de exercício físico sobre o limiar nociceptivo em ratas [dissertação]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Galdino, G.S., Cortes, S.F., Duarte, I.D., Perez, A.C., 2010a. Involvement of the nitric oxide/(C)GMP/K(ATP) pathway in antinociception induced by exercise in rats. *Life Sci*. 86, 505-9.

Galdino, G.S., Duarte, I.D., Perez, A.C., 2010b. Participation of endogenous opioids in the antinociception induced by resistance exercise in rats. *Braz J Med Biol Res*. 43, 906-9.

Galdino, G.S., Lopes, A.M., Franca, V.M., Duarte, I.D., Perez, A.C., 2010c. Evaluation of exercise and potassium chloride supplementation on blood pressure and nociceptive threshold in hypertensive rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 35, 184-7.

Garcia-Ovejero, D., Arevalo-Martin, A., Petrosino, S., Docagne, F., Hagen, C., Bisogno, T., Watanabe, M., Guaza, C., Di Marzo, V., Molina-Holgado, E., 2009. The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis*. 33, 57-71.

Garthwaite, G., Bartus, K., Malcolm, D., Goodwin, D., Kollb-Sielecka, M., Dooleniya, C., Garthwaite, J., 2006. Signaling from blood vessels to CNS axons through nitric oxide. *J Neurosci*. 26, 7730-40.

Giuffrida, A., Beltramo, M., Piomelli, D., 2001. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*. 298, 7-14.

Gladwin, M.T., Schechter, A.N., Kim-Shapiro, D.B., Patel, R.P., Hogg, N., Shiva, S., Cannon, R.O., 3rd, Kelm, M., Wink, D.A., Espey, M.G., Oldfield, E.H., Pluta, R.M., Freeman, B.A., Lancaster, J.R., Jr., Feelisch, M., Lundberg, J.O., 2005. The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol*. 1, 308-14.

Gold, M.S., Dastmalchi, S., Levine, J.D., 1997. Alpha 2-adrenergic receptor subtypes in rat dorsal root and superior cervical ganglion neurons. *Pain*. 69, 179-90.

Goldfarb, A.H., Jamurtas, A.Z., 1997. Beta-endorphin response to exercise. An update. *Sports Med.* 24, 8-16.

Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L., 1979. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 6666-70.

Gomes da Silva, S., Araujo, B.H., Cossa, A.C., Scorza, F.A., Cavalheiro, E.A., Naffah-Mazzacoratti Mda, G., Arida, R.M., 2010. Physical exercise in adolescence changes CB1 cannabinoid receptor expression in the rat brain. *Neurochem Int.* 57, 492-6.

Grabow, T.S., Hurley, R.W., Banfor, P.N., Hammond, D.L., 1999. Supraspinal and spinal delta(2) opioid receptor-mediated antinociceptive synergy is mediated by spinal alpha(2) adrenoceptors. *Pain.* 83, 47-55.

Graham, B.A., Hammond, D.L., Proudfit, H.K., 1997. Differences in the antinociceptive effects of alpha-2 adrenoceptor agonists in two substrains of Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 283, 511-9.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126, 131-8.

Griffin, G., Fernando, S.R., Ross, R.A., McKay, N.G., Ashford, M.L., Shire, D., Huffman, J.W., Yu, S., Lainton, J.A., Pertwee, R.G., 1997. Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol.* 339, 53-61.

Guindon, J., Desroches, J., Beaulieu, P., 2007. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. *Br J Pharmacol.* 150, 693-701.

Guindon, J., Hohmann, A.G., 2009. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 8, 403-21.

Guindon, J., Guijarro, A., Piomelli, D., Hohmann, A.G., 2011. Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol.* 163, 1464-78.

Gutstein, H.B., Mansour, A., Watson, S.J., Akil, H., Fields, H.L., 1998. Mu and kappa opioid receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuroreport.* 9, 1777-81.

Hagbarth, K.E., Kerr, D.I., 1954. Central influences on spinal afferent conduction. *J Neurophysiol.* 17, 295-307.

Haier, R.J., Quaid, K., Mills, J.C., 1981. Naloxone alters pain perception after jogging. *Psychiatry Res.* 5, 231-2.

Hama, A., Sagen, J., 2007. Antinociceptive effect of cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in rats with a spinal cord injury. *Exp Neurol.* 204, 454-7.

Hamalainen, M.M., Lovick, T.A., 1997. Involvement of nitric oxide and serotonin in modulation of antinociception and pressor responses evoked by stimulation in the dorsolateral region of the periaqueductal gray matter in the rat. *Neuroscience.* 80, 821-7.

Hancock, C.M., Riegger-Krugh, C., 2008. Modulation of pain in osteoarthritis: the role of nitric oxide. *Clin J Pain.* 24, 353-65.

Hara, S., Kuhns, E.R., Ellenberger, E.A., Mueller, J.L., Shibuya, T., Endo, T., Quock, R.M., 1995. Involvement of nitric oxide in intracerebroventricular beta-endorphin-induced neuronal release of methionine-enkephalin. *Brain Res.* 675, 190-4.

Hayakawa, K., Mishima, K., Hazekawa, M., Sano, K., Irie, K., Orito, K., Egawa, T., Kitamura, Y., Uchida, N., Nishimura, R., Egashira, N., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2008. Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol via CB(1) receptor-dependent mechanism. *Brain Res.* 1188, 157-64.

Head, H., Holmes, G., 1911. Sensory disturbances from cerebral lesions. *Brain.* 34, 102-254.

Hein, L., Altman, J.D., Kobilka, B.K., 1999. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature.* 402, 181-4.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* 11, 563-83.

Hernandez-Pacheco, A., Araiza-Saldana, C.I., Granados-Soto, V., Mixcoatl-Zecuatl, T., 2008. Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin. *Eur J Pharmacol.* 596, 70-6.

Hernanz, R., Briones, A.M., Alonso, M.J., Vila, E., Salaices, M., 2004. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287, H225-34.

Heywood R. 1987. The use of animals in testing. *ATLA.* 14, 329-33.

Hieble, J.P., Bondinell, W.E., Ruffolo, R.R., Jr., 1995. Alpha- and beta-adrenoceptors: from the gene to the clinic. 1. Molecular biology and adrenoceptor subclassification. *J Med Chem.* 38, 3415-44.

Hill, M.N., Titterness, A.K., Morrish, A.C., Carrier, E.J., Lee, T.T., Gil-Mohapel, J., Gorzalka, B.B., Hillard, C.J., Christie, B.R., 2010. Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus.* 20, 513-23.

Hoffmann, P., Skarphedinsson, J.O., Delle, M., Thoren, P., 1990. Electrical stimulation of the gastrocnemius muscle in the spontaneously hypertensive rat increases the pain threshold: role of different serotonergic receptors. *Acta Physiol Scand.* 138, 125-31.

Hohmann, A.G., Herkenham, M., 1998. Regulation of cannabinoid and mu opioid receptors in rat lumbar spinal cord following neonatal capsaicin treatment. *Neurosci Lett.* 252, 13-6.

Hohmann, A.G., Tsou, K., Walker, J.M., 1998. Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2. *Neurosci Lett.* 257, 119-22.

Hohmann, A.G., Tsou, K., Walker, J.M., 1999. Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *J Neurophysiol.* 81, 575-83.

Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J.F., Walker, J.M., Holmes, P.V., Crystal, J.D., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D., 2005. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature.* 435, 1108-12.

Holden, J.E., Proudfit, H.K., 1998. Enkephalin neurons that project to the A7 catecholamine cell group are located in nuclei that modulate nociception: ventromedial medulla. *Neuroscience.* 83, 929-47.

Holister, L.E., Gillespie, H.K., 1973. Delta-8- and delta-9-tetrahydrocannabinol. Comparison in man by oral and intravenous administration. *Clin Pharmacol Ther.* 14, 353-7.

Hsieh, G.C., Pai, M., Chandran, P., Hooker, B.A., Zhu, C.Z., Salyers, A.K., Wensink, E.J., Zhan, C., Carroll, W.A., Dart, M.J., Yao, B.B., Honore, P., Meyer, M.D., 2011. Central and peripheral sites of action for CB receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Br J Pharmacol.* 162, 428-40.

Huber-Abel, F.A., Gerber, M., Hoppeler, H., Baum, O., 2011. Exercise-induced angiogenesis correlates with the up-regulated expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.*

Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R., 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature.* 258, 577-80.

Hunter, J.C., Fontana, D.J., Hedley, L.R., Jasper, J.R., Lewis, R., Link, R.E., Secchi, R., Sutton, J., Eglen, R.M., 1997. Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor

subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol.* 122, 1339-44.

IASP, 1994. Classification of Chronic Pain. In IASP Task Force on Taxonomy. Vol., H. Merskey, N. Bogduk, eds. IASP press, Seattle, pp. 209-214.

IASP. 1995. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16, 09-110.

IASP, 2005. Animal Models of Pain and Ethics of Animal Experimentation. In Core Curriculum for Professional Education in Pain. Vol. 1, J.E. Charlton, ed. IASP press, Seattle.

Ibrahim, M.M., Porreca, F., Lai, J., Albrecht, P.J., Rice, F.L., Khodorova, A., Davar, G., Makriyannis, A., Vanderah, T.W., Mata, H.P., Malan, T.P., Jr., 2005. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 3093-8.

Ibrahim, M.M., Rude, M.L., Stagg, N.J., Mata, H.P., Lai, J., Vanderah, T.W., Porreca, F., Buckley, N.E., Makriyannis, A., Malan, T.P., Jr., 2006. CB2 cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain.* 122, 36-42.

Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Wood, K.S., 1987. Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. *Circ Res.* 60, 82-92.

Ishide, T., Amer, A., Maher, T.J., Ally, A., 2005. Nitric oxide within periaqueductal gray modulates glutamatergic neurotransmission and cardiovascular responses during mechanical and thermal stimuli. *Neurosci Res.* 51, 93-103.

Ishikawa, M., Quock, R.M., 2003. Role of nitric-oxide synthase isoforms in nitrous oxide antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 306, 484-9.

Iwamoto, E.T., Marion, L., 1994. Pharmacological evidence that nitric oxide mediates the antinociception produced by muscarinic agonists in the rostral ventral medulla of rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 269, 699-708.

Izquierdo, M., Ibanez, J., Calbet, J.A., Navarro-Amezqueta, I., Gonzalez-Izal, M., Idoate, F., Hakkinen, K., Kraemer, W.J., Palacios-Sarrasqueta, M., Almar, M., Gorostiaga, E.M., 2009. Cytokine and hormone responses to resistance training. *Eur J Appl Physiol.* 107, 397-409.

Jacobs, R.A., Satta, M.A., Dahia, P.L., Chew, S.L., Grossman, A.B., 1997. Induction of nitric oxide synthase and interleukin-1beta, but not heme oxygenase, messenger RNA in rat brain following peripheral administration of endotoxin. *Brain Res Mol Brain Res.* 49, 238-46.

Janal, M.N., 1996. Pain sensitivity, exercise and stoicism. *J R Soc Med.* 89, 376-81.

Jensen, T.S., Yaksh, T.L., 1984. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociceptive effects produced by glutamate at brainstem sites. *Brain Res.* 321, 287-97.

Jesse, C.R., Savegnago, L., Nogueira, C.W., 2007. Role of nitric oxide/cyclic GMP/K(+) channel pathways in the antinociceptive effect caused by 2,3-bis(mesitylseleno)propenol. *Life Sci.* 81, 1694-702.

Jhaveri, M.D., Sagar, D.R., Elmes, S.J., Kendall, D.A., Chapman, V., 2007. Cannabinoid CB2 receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. *Mol Neurobiol.* 36, 26-35.

Ji, L.L., Fu, R., Mitchell, E.W., 1992. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol.* 73, 1854-9.

Johanek, L.M., Heitmiller, D.R., Turner, M., Nader, N., Hodges, J., Simone, D.A., 2001. Cannabinoids attenuate capsaicin-evoked hyperalgesia through spinal and peripheral mechanisms. *Pain.* 93, 303-15.

Jones, D.J., Kendall, D.E., Enna, S.J., 1982. Adrenergic receptors in rat spinal cord. *Neuropharmacology.* 21, 367-70.

Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413, 203-10.

Kanui, T.I., Tjolsen, A., Lund, A., Mjellem-Joly, N., Hole, K., 1993. Antinociceptive effects of intrathecal administration of alpha-adrenoceptor antagonists and clonidine in the formalin test in the mouse. *Neuropharmacology.* 32, 367-71.

Karlsson, M., Contreras, J.A., Hellman, U., Tornqvist, H., Holm, C., 1997. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem.* 272, 27218-23.

Kawai, Y., Yokoyama, Y., Kaidoh, M., Ohhashi, T., 2010. Shear stress-induced ATP-mediated endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human lymphatic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298, C647-55.

Kawano, T., Zoga, V., Kimura, M., Liang, M.Y., Wu, H.E., Gemes, G., McCallum, J.B., Kwok, W.M., Hogan, Q.H., Sarantopoulos, C.D., 2009. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. *Mol Pain.* 5, 12.

Keele, K.D., 1957. *Anatomies of medicine. Vol. 1*, Oxford university press, New York.

Keeney, B.K., Raichlen, D.A., Meek, T.H., Wijeratne, R.S., Middleton, K.M., Gerdeman, G.L., Garland, T., Jr., 2008. Differential response to a selective cannabinoid receptor antagonist (SR141716: rimonabant) in female mice from lines selectively bred for high voluntary wheel-running behaviour. *Behav Pharmacol.* 19, 812-20.

Kelly, S., Jhaveri, M.D., Sagar, D.R., Kendall, D.A., Chapman, V., 2003. Activation of peripheral cannabinoid CB1 receptors inhibits mechanically evoked responses of spinal neurons in noninflamed rats and rats with hindpaw inflammation. *Eur J Neurosci.* 18, 2239-43.

Kemppainen, P., Pertovaara, A., Huopaniemi, T., Johansson, G., Karonen, S.L., 1985. Modification of dental pain and cutaneous thermal sensitivity by physical exercise in man. *Brain Res.* 360, 33-40.

Kemppainen, P., Pertovaara, A., Huopaniemi, T., Johansson, G., 1986. Elevation of dental pain threshold induced in man by physical exercise is not reversed by cyproheptadine-mediated suppression of growth hormone release. *Neurosci Lett.* 70, 388-92.

Kemppainen, P., Paalasmaa, P., Pertovaara, A., Alila, A., Johansson, G., 1990. Dexamethasone attenuates exercise-induced dental analgesia in man. *Brain Res.* 519, 329-32.

Khasar, S.G., Green, P.G., Chou, B., Levine, J.D., 1995. Peripheral nociceptive effects of alpha 2-adrenergic receptor agonists in the rat. *Neuroscience.* 66, 427-32.

Khodayar, M.J., Shafaghi, B., Naderi, N., Zarrindast, M.R., 2006. Antinociceptive effect of spinally administered cannabinergic and 2-adrenoceptor drugs on the formalin test in rat: possible interactions. *J Psychopharmacol.* 20, 67-74.

Kim, S.S., Kim, H., Lee, S.J., Chang, H.K., Shin, M.C., Jang, M.H., Shin, M.S., Kim, C.J., 2003. Treadmill exercise suppresses food-deprivation-induced increase of nitric oxide synthase expression in rat paraventricular nucleus. *Neurosci Lett.* 353, 41-4.

King, E.W., Audette, K., Athman, G.A., Nguyen, H.O., Sluka, K.A., Fairbanks, C.A., 2005. Transcutaneous electrical nerve stimulation activates peripherally located alpha-2A adrenergic receptors. *Pain.* 115, 364-73.

Kingery, W.S., Agashe, G.S., Guo, T.Z., Sawamura, S., Davies, M.F., Clark, J.D., Kobilka, B.K., Maze, M., 2002. Isoflurane and nociception: spinal alpha2A adrenoceptors mediate antinociception while supraspinal alpha1 adrenoceptors mediate pronociception. *Anesthesiology.* 96, 367-74.

Kingwell, B.A., 2000. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J.* 14, 1685-96.

Kjaer, M., Secher, N.H., Bach, F.W., Sheikh, S., Galbo, H., 1989. Hormonal and metabolic responses to exercise in humans: effect of sensory nervous blockade. *Am J Physiol.* 257, E95-101.

Ko, M.C., Woods, J.H., 1999. Local administration of delta9-tetrahydrocannabinol attenuates capsaicin-induced thermal nociception in rhesus monkeys: a peripheral cannabinoid action. *Psychopharmacology (Berl).* 143, 322-6.

Kobayashi, N., Higashi, T., Hara, K., Shirataki, H., Matsuoka, H., 1999. Effects of imidapril on NOS expression and myocardial remodelling in failing heart of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 44, 518-26.

Kohane, D.S., Lu, N.T., Crosa, G.A., Kuang, Y., Berde, C.B., 2001. High concentrations of adrenergic antagonists prolong sciatic nerve blockade by tetrodotoxin. *Acta Anaesthesiol Scand.* 45, 899-905.

Koltyn, K.F., Arbogast, R.W., 1998. Perception of pain after resistance exercise. *Br J Sports Med.* 32, 20-4.

Koltyn, K.F., 2000. Analgesia following exercise: a review. *Sports Med.* 29, 85-98.

Koltyn, K.F., 2002. Exercise-induced hypoalgesia and intensity of exercise. *Sports Med.* 32, 477-87.

Kostowski, W., Jerlicz, M., 1978. Effects of lesions of the Locus coeruleus and the ventral noradrenergic bundle on the antinociceptive action of clonidine in rats. *Pol J Pharmacol Pharm.* 30, 647-51.

Kovar, P.A., Allegrante, J.P., MacKenzie, C.R., Peterson, M.G., Gutin, B., Charlson, M.E., 1992. Supervised fitness walking in patients with osteoarthritis of the knee. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 116, 529-34.

Kraemer, W.J., Fry, A.C., Warren, B.J., Stone, M.H., Fleck, S.J., Kearney, J.T., Conroy, B.P., Maresh, C.M., Weseman, C.A., Triplett, N.T., et al., 1992. Acute hormonal responses in elite junior weightlifters. *Int J Sports Med.* 13, 103-9.

Kraemer, W.J., Dziados, J.E., Marchitelli, L.J., Gordon, S.E., Harman, E.A., Mello, R., Fleck, S.J., Frykman, P.N., Triplett, N.T., 1993. Effects of different heavy-resistance exercise protocols on plasma beta-endorphin concentrations. *J Appl Physiol.* 74, 450-9.

Kukkonen, J.P., Jansson, C.C., Akerman, K.E., 2001. Agonist trafficking of G(i/o)-mediated alpha(2A)-adrenoceptor responses in HEL 92.1.7 cells. *Br J Pharmacol.* 132, 1477-84.

Kusner, L.L., Kaminski, H.J., 1996. Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res.* 730, 238-42.

Lambert, C.P., Evans, W.J., 2005. Adaptations to aerobic and resistance exercise in the elderly. *Rev Endocr Metab Disord.* 6, 137-43.

Lambert, D.M., 2001. [Medical use of cannabis through history]. *J Pharm Belg.* 56, 111-8.

Lambert, D.M., Fowler, C.J., 2005. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem.* 48, 5059-87.

Langberg, H., Bjorn, C., Boushel, R., Hellsten, Y., Kjaer, M., 2002. Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. *J Physiol.* 542, 977-83.

Lee, M.H., Kim, H., Kim, S.S., Lee, T.H., Lim, B.V., Chang, H.K., Jang, M.H., Shin, M.C., Shin, M.S., Kim, C.J., 2003. Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils. *Life Sci.* 73, 2455-65.

Lenk, K., Schuler, G., Adams, V., 2010. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 1, 9-21.

Lewicki, R., Tchorzewski, H., Majewska, E., Nowak, Z., Baj, Z., 1988. Effect of maximal physical exercise on T-lymphocyte subpopulations and on interleukin 1 (IL 1) and interleukin 2 (IL 2) production in vitro. *Int J Sports Med.* 9, 114-7.

Lichtman, A.H., Martin, B.R., 1991. Cannabinoid-induced antinociception is mediated by a spinal alpha 2-noradrenergic mechanism. *Brain Res.* 559, 309-14.

Lichtman, A.H., Cook, S.A., Martin, B.R., 1996. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J Pharmacol Exp Ther.* 276, 585-93.

Light, A.R., Kavookjian, A.M., 1988. Morphology and ultrastructure of physiologically identified substantia gelatinosa (lamina II) neurons with axons that terminate in deeper dorsal horn laminae (III-V). *J Comp Neurol.* 267, 172-89.

Lim, G., Sung, B., Ji, R.R., Mao, J., 2003. Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain.* 105, 275-83.

Liu, Q.R., Pan, C.H., Hishimoto, A., Li, C.Y., Xi, Z.X., Llorente-Berzal, A., Viveros, M.P., Ishiguro, H., Arinami, T., Onaivi, E.S., Uhl, G.R., 2009. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav.* 8, 519-30.

Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1996. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm Res.* 45, 308-11.

Lovick, T.A., 1996. Role of nitric oxide in medullary raphe-evoked inhibition of neuronal activity in the periaqueductal gray matter. *Neuroscience.* 75, 1203-9.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.

Lundberg, A., Vyklicky, L., 1963. Inhibitory interaction between spinal reflexes to primary afferents. *Experientia.* 19, 247-8.

MacIntyre, D.L., Sorichter, S., Mair, J., Berg, A., McKenzie, D.C., 2001. Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *Eur J Appl Physiol.* 84, 180-6.

Maihofner, C., Euchenhofer, C., Tegeder, I., Beck, K.F., Pfeilschifter, J., Geisslinger, G., 2000. Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthases and soluble guanylyl cyclase in mouse spinal cord following nociceptive stimulation. *Neurosci Lett.* 290, 71-5.

Mailleux, P., Vanderhaeghen, J.J., 1992. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience.* 48, 655-68.

Maiorana, A., O'Driscoll, G., Taylor, R., Green, D., 2003. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med.* 33, 1013-35.

Marlier, L.N., Csikos, T., Rebaudengo, N., Borboni, P., Patacchioli, F.R., Angelucci, L., Privat, A., Lauro, R., 1995. Distribution of glucocorticoid receptor mRNA in the rat spinal cord. *Neuroreport.* 6, 2245-9.

Marsh, N., Marsh, A., 2000. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 27, 313-9.

Martin, W.J., Patrick, S.L., Coffin, P.O., Tsou, K., Walker, J.M., 1995. An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sci.* 56, 2103-9.

Martin, W.J., Patrick, S.L., Coffin, P.O., Tsou, K., Walker, J.M., 1995. An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sci.* 56, 2103-9.

Martin, W.J., Hohmann, A.G., Walker, J.M., 1996. Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: correlation between electrophysiological and antinociceptive effects. *J Neurosci.* 16, 6601-11.

Martin, W.J., Tsou, K., Walker, J.M., 1998. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla. *Neurosci Lett.* 242, 33-6.

Martins, M.A., de Castro Bastos, L., Tonussi, C.R., 2006. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *J Pain.* 7, 100-7.

Malan Jr, T.F., Ibrahim, M.M., Deng, H., Liu, Q., Mata, H.P., Vanderah, T., Porreca, F., Makriyannis, A., 2001. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain.* 93, 239-5.

Matias, I., Gonthier, M.P., Petrosino, S., Docimo, L., Capasso, R., Hoareau, L., Monteleone, P., Roche, R., Izzo, A.A., Di Marzo, V., 2007. Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells. *Br J Pharmacol.* 152, 676-90.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346, 561-4.

Mayer, D.J., 1984. Analgesia produced by electrical stimulation of the brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 8, 557-64.

Mayhan, W.G., Arrick, D.M., Patel, K.P., Sun, H., 2011. Exercise training normalizes impaired NOS-dependent responses of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300, H1013-20.

McArdle, W.D., Katch, F.I., Katch, V.L., 2002. *Fundamentos de fisiologia do exercício.* Vol., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

McConell, G.K., Bradley, S.J., Stephens, T.J., Canny, B.J., Kingwell, B.A., Lee-Young, R.S., 2007. Skeletal muscle nNOS mu protein content is increased by exercise training in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293, R821-8.

McDonald, I., 2007. Gordon Holmes Lecture: Gordon Holmes and the neurological heritage. *Brain.* 130, 288-98.

Mechoulam, R., 1986. The most comprehensive history of the recreational and medicinal use of Cannabis throughout the centuries. In *Cannabis as Therapeutic Agent* Vol. 1, R. Mechoulam, ed. CRC Press Boca Raton, FL, pp. 1–19

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50, 83-90.

Melzack, R., Wall, P.D., 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science.* 150, 971-9.

Meng, I.D., Manning, B.H., Martin, W.J., Fields, H.L., 1998. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature.* 395, 381-3.

Meng, I.D., Johansen, J.P., 2004. Antinociception and modulation of rostral ventromedial medulla neuronal activity by local microinfusion of a cannabinoid receptor agonist. *Neuroscience.* 124, 685-93.

Mense, S., 1977. Muscular nociceptors. *J Physiol (Paris).* 73, 233-40.

Mense, S., Stahnke, M., 1983. Responses in muscle afferent fibres of slow conduction velocity to contractions and ischaemia in the cat. *J Physiol.* 342, 383-97.

Mense, S., Meyer, H., 1985. Different types of slowly conducting afferent units in cat skeletal muscle and tendon. *J Physiol.* 363, 403-17.

Mense, S., 1993a. Peripheral mechanisms of muscle nociception in local muscle pain. *J. Musculoskeletal Pain.* 1, 133-170.

Mense, S., 1993b. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain.* 54, 241-89.

Mense, S., 1996. Group III and IV receptors in skeletal muscle: are they specific or polymodal? *Prog Brain Res.* 113, 83-100.

Mestre, C., Pelissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., Eschalier, A., 1994. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 32, 197-200.

Millan, M.J., 1992. Evidence that an alpha 2A-adrenoceptor subtype mediates antinociception in mice. *Eur J Pharmacol.* 215, 355-6.

Millan, M.J., 1995. Serotonin (5-HT) and pain: a reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity. *Semin Neurosci.* 7, 409–19.

Millan, M.J., 1997. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: Dickenson, A., Besson, J.M, Eds, *The Pharmacology of Pain, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol.130. Springer, Berlin, pp. 385–446.

Millan, M.J., 1998. Alpha 2-adrenergic mechanisms of analgesia: strategies for improving their therapeutic window and identification of the novel, potent alpha 2A-adrenergic receptor agonist, S 18616. *Adv Pharmacol.* 42, 575-9.

Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 57, 1-164.

Millan, M.J., Lejeune, F., Gobert, A., 2000. Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressant agents. *J Psychopharmacol.* 14, 114-38.

Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 66, 355-474.

Miller, R.J., 1981. Peptides as neurotransmitters: focus on the enkephalins and endorphins. *Pharmacol Ther.* 12, 73-108.

Moffett, J.K., Torgerson, D., Bell-Syer, S., Jackson, D., Llewlyn-Phillips, H., Farrin, A., Barber, J., 1999. Randomised controlled trial of exercise for low back pain: clinical outcomes, costs, and preferences. *BMJ.* 319, 279-83.

Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43, 109-42.

Moncada, S., 1993. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 28, 97-9.

Monhemius, R., Azami, J., Green, D.L., Roberts, M.H., 2001. CB1 receptor mediated analgesia from the Nucleus Reticularis Gigantocellularis pars alpha is activated in an animal model of neuropathic pain. *Brain Res.* 908, 67-74.

Moon, M., Huh, Y., Park, C., 2006. L-nitroimidazole ornithine limits exercise-induced increases in cell proliferation in the hippocampus of adult mice. *Neuroreport.* 17, 1121-5.

Moore, S.A., Nomikos, G.G., Dickason-Chesterfield, A.K., Schober, D.A., Schaus, J.M., Ying, B.P., Xu, Y.C., Phebus, L., Simmons, R.M., Li, D., Iyengar, S., Felder, C.C., 2005. Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 17852-7.

Morales, L., Perez-Garcia, C., Alguacil, L.F., 2001. Effects of yohimbine on the antinociceptive and place conditioning effects of opioid agonists in rodents. *Br J Pharmacol.* 133, 172-8.

Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365, 61-5.

Murad, F., 2006. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med.* 355, 2003-11.

Murthy, K.G., Szabo, C., Salzman, A.L., 2004. Cytokines stimulate expression of inducible nitric oxide synthase in DLD-1 human adenocarcinoma cells by activating poly(A) polymerase. *Inflamm Res.* 53, 604-8.

Negrão, C.E., Barreto, A.C.P., 2010. *Cardiologia do Exercício: do Atleta ao Cardiopata.* Vol. 2, Manole, São Paulo.

Negrete, R., Hervera, A., Leanez, S., Martin-Campos, J.M., Pol, O., 2011. The antinociceptive effects of JWH-015 in chronic inflammatory pain are produced by nitric oxide-cGMP-PKG-KATP pathway activation mediated by opioids. *PLoS One.* 6, e26688.

Neubert, J.K., Widmer, C.G., Malphurs, W., Rossi, H.L., Vierck, C.J., Jr., Caudle, R.M., 2005. Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. *Pain.* 116, 386-95.

Nicholas, A.P., Pieribone, V., Hokfelt, T., 1993. Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 328, 575-94.

Nicholas, A.P., Hokfelt, T., Pieribone, V.A., 1996. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci.* 17, 245-55.

Nicholson, R., Dixon, A.K., Spanswick, D., Lee, K., 2005. Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett.* 380, 316-21.

Niess, A.M., Sommer, M., Schneider, M., Angres, C., Tschositsch, K., Golly, I.C., Battenfeld, N., Northoff, H., Biesalski, H.K., Dickhuth, H.H., Fehrenbach, E., 2000. Physical exercise-induced expression of inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in human leukocytes: effects of RRR-alpha-tocopherol supplementation. *Antioxid Redox Signal.* 2, 113-26.

Nirogi, R., Kandikere, V., Mudigonda, K., Bhyrapuneni, G., Muddana, N., Saralaya, R., Benade, V., 2009. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *J Neurosci Methods.* 178, 116-9.

Northoff, H., Weinstock, C., Berg, A., 1994. The cytokine response to strenuous exercise. *Int J Sports Med.* 15 Suppl 3, S167-71.

Okeson, J.P., 1998. *Dores bucofaciais de Bell.* Vol.1, Quintessence, São Paulo.

Okuda, K., Iwasaka, H., Hagiwara, S., Takeshima, N., Takatani, J., Uchino, T., Noguchi, T., 2011. The antinociceptive effects of estradiol on adjuvant-induced hyperalgesia in rats involve activation of adrenergic and serotonergic systems. *J Anesth.*

Oluyomi, A.O., Hart, S.L., 1990. Alpha-adrenoceptor involvement in swim stress-induced antinociception in the mouse. *J Pharm Pharmacol.* 42, 778-84.

Omiya, Y., Yuzurihara, M., Suzuki, Y., Kase, Y., Kono, T., 2008. Role of alpha2-adrenoceptors in enhancement of antinociceptive effect in diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 592, 62-6.

Onaivi, E.S., Carpio, O., Ishiguro, H., Schanz, N., Uhl, G.R., Benno, R., 2008. Behavioral effects of CB2 cannabinoid receptor activation and its influence on food and alcohol consumption. *Ann N Y Acad Sci.* 1139, 426-33.

Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gu, S., Liu, Q.R., 2012. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J Psychopharmacol.* 26, 92-103.

Ongioco, R.R., Richardson, C.D., Rudner, X.L., Stafford-Smith, M., Schwinn, D.A., 2000. Alpha2-adrenergic receptors in human dorsal root ganglia: predominance of alpha2b and alpha2c subtype mRNAs. *Anesthesiology.* 92, 968-76.

Osborne, M.G., Coderre, T.J., 1999. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 126, 1840-6.

- Parada, C.A., Vivancos, G.G., Tambeli, C.H., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2003. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 2923-8.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Vol.1, Academic Press, New York.
- Pedersen, B.K., 2000. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines. *Immunol Cell Biol.* 78, 532-5.
- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Schjerling, P., 2001. Exercise and interleukin-6. *Curr Opin Hematol.* 8, 137-41.
- Peng, Y.B., Lin, Q., Willis, W.D., 1996. Involvement of alpha-2 adrenoceptors in the periaqueductal gray-induced inhibition of dorsal horn cell activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 278, 125-35.
- Pertovaara, A., Huopaniemi, T., Virtanen, A., Johansson, G., 1984. The influence of exercise on dental pain thresholds and the release of stress hormones. *Physiol Behav.* 33, 923-6.
- Pertwee, R.G., 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 74, 129-80.
- Pertwee, R.G., 2001. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol.* 63, 569-611.
- Pertwee, R.G., Ross, R.A., 2002. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66, 101-21.
- Pescatello, L.S., Franklin, B.A., Fagard, R., Farquhar, W.B., Kelley, G.A., Ray, C.A., 2004. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc.* 36, 533-53.
- Pinto-Ribeiro, F., Almeida, A., Pego, J.M., Cerqueira, J., Sousa, N., 2004. Chronic unpredictable stress inhibits nociception in male rats. *Neurosci Lett.* 359, 73-6.
- Pleuvry, B.J., 1993. Opioid receptors and their relevance to anaesthesia. *Br J Anaesth.* 71, 119-26.
- Ploutz, L.L., Tesch, P.A., Biro, R.L., Dudley, G.A., 1994. Effect of resistance training on muscle use during exercise. *J Appl Physiol.* 76, 1675-81.
- Pontifex, M.B., Hillman, C.H., Fernhall, B., Thompson, K.M., Valentini, T.A., 2009. The effect of acute aerobic and resistance exercise on working memory. *Med Sci Sports Exerc.* 41, 927-34.
- Porter, A.C., Felder, C.C., 2001. The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther.* 90, 45-60.

Prado, W.A., 1999. Medicamentos Almgésicos de Aço Central. In: Graeff, F.G., Guimaraes, F.S, Eds. Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo, Atheneu.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., Lamantia, A., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2001. Neuroscience, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc.

Randall, L.O., Selitto, J.J., 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 111, 409-19.

Randich, A., Maixner, W., 1984. Interactions between cardiovascular and pain regulatory systems. *Neurosci Biobehav Rev.* 8, 343-67.

Rawls, S.M., Benamar, K., 2011. Effects of opioids, cannabinoids, and vanilloids on body temperature. *Front Biosci.* 3, 822-45.

Reid, M.B., 1998. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand.* 162, 401-9.

Reis, G.M., Pacheco, D., Perez, A.C., Klein, A., Ramos, M.A., Duarte, I.D., 2009. Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide. *Life Sci.* 85, 351-6.

Ren, K., Dubner, R., 2002. Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain.* 100, 1-6.

Rett, K., Wicklmayr, M., Fink, E., Maerker, E., Dietze, G., Mehnert, H., 1989. Local generation of kinins in working skeletal muscle tissue in man. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 370, 445-9.

Reynolds, D.V., 1969. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science.* 164, 444-5.

Ribera, J., Marsal, J., Casanovas, A., Hukkanen, M., Tarabal, O., Esquerda, J.E., 1998. Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res.* 51, 90-102.

Richardson, J.D., Kilo, S., Hargreaves, K.M., 1998. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain.* 75, 111-9.

Richter, E.A., Galbo, H., Sonne, B., Holst, J.J., Christensen, N.J., 1980. Adrenal medullary control of muscular and hepatic glycogenolysis and of pancreatic hormonal secretion in exercising rats. *Acta Physiol Scand.* 108, 235-42.

Richterova, B., Stich, V., Moro, C., Polak, J., Klimcakova, E., Majercik, M., Harant, I., Viguier, N., Crampes, F., Langin, D., Lafontan, M., Berlan, M., 2004. Effect of endurance training on adrenergic control of lipolysis in adipose tissue of obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 1325-31.

Ristic, D., Spangenberg, P., Ellrich, J., 2010. Inhibition of nNOS prevents and inhibition of iNOS reverses alpha,beta-meATP-induced facilitation of neck muscle nociception in mice. *Eur J Pharmacol.* 647, 55-61.

Ristoiu, V., Pluteanu, F., Flonta, M.L., Reid, G., 2002. Few cultured rat primary sensory neurons express a tolbutamide-sensitive K⁺ current. *J Cell Mol Med.* 6, 271-4.

Roberts, C.K., Barnard, R.J., Jasman, A., Balon, T.W., 1999. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 277, E390-4.

Rodnick, K.J., Holloszy, J.O., Mondon, C.E., James, D.E., 1990. Effects of exercise training on insulin-regulatable glucose-transporter protein levels in rat skeletal muscle. *Diabetes.* 39, 1425-9.

[Rodríguez de Fonseca, F.](#), [Navarro, M.](#), [Gómez, R.](#), [Escuredo, L.](#), [Nava, F.](#), [Fu, J.](#), [Murillo-Rodríguez, E.](#), [Giuffrida, A.](#), [LoVerme, J.](#), [Gaetani, S.](#), [Kathuria, S.](#), [Gall, C.](#), [Piomelli, D.](#), 2001. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* 414, 209-12.

Romero-Sandoval, A., Eisenach, J.C., 2007. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology.* 106, 787-94.

Romero, T.R., Duarte, I.D., 2009. alpha(2)-Adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat. *Eur J Pharmacol.* 613, 64-7.

Romero, T.R., Galdino, G.S., Silva, G.C., Resende, L.C., Perez, A.C., Cortes, S.F., Duarte, I.D., 2011. Ketamine Activates the L-Arginine/Nitric Oxide/Cyclic Guanosine Monophosphate Pathway to Induce Peripheral Antinociception in Rats. *Anesth Analg.*

Rosin, D.L., Zeng, D., Stornetta, R.L., Norton, F.R., Riley, T., Okusa, M.D., Guyenet, P.G., Lynch, K.R., 1993. Immunohistochemical localization of alpha 2A-adrenergic receptors in catecholaminergic and other brainstem neurons in the rat. *Neuroscience.* 56, 139-55.

Rothe, F., Langnaese, K., Wolf, G., 2005. New aspects of the location of neuronal nitric oxide synthase in the skeletal muscle: a light and electron microscopic study. *Nitric Oxide.* 13, 21-35.

Rotto, D.M., Schultz, H.D., Longhurst, J.C., Kaufman, M.P., 1990. Sensitization of group III muscle afferents to static contraction by arachidonic acid. *J Appl Physiol.* 68, 861-7.

Rudnick, J., Puttmann, B., Tesch, P.A., Alkner, B., Schoser, B.G., Salanova, M., Kirsch, K., Gunga, H.C., Schiffli, G., Luck, G., Blottner, D., 2004. Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *FASEB J.* 18, 1228-30.

Ruffolo, R.R., Jr., Nichols, A.J., Stadel, J.M., Hieble, J.P., 1993. Pharmacologic and therapeutic applications of alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33, 243-79.

Rutledge, C.O., Jonason, J., 1967. Metabolic pathways of dopamine and norepinephrine in rabbit brain in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 157, 493-502.

Ryan, W.J., Banner, W.K., Wiley, J.L., Martin, B.R., Razdan, R.K., 1997. Potent anandamide analogs: the effect of changing the length and branching of the end pentyl chain. *J Med Chem.* 40, 3617-25.

Sagar, D.R., Kelly, S., Millns, P.J., O'Shaughnessey, C.T., Kendall, D.A., Chapman, V., 2005. Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Eur J Neurosci.* 22, 371-9.

Saito, M., 2000. Exercise-induced sympathetic activation is correlated with cerebral hemisphere laterality, but not handedness. *Acta Physiol Scand.* 170, 111-8.

Salio, C., Doly, S., Fischer, J., Franzoni, M.F., Conrath, M., 2002. Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 329, 13-6.

Salmon, P., 2001. Effects of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a unifying theory. *Clin Psychol Rev.* 21, 33-61.

Samineni, V.K., Premkumar, L.S., Faingold, C.L., 2011. Post-ictal analgesia in genetically epilepsy-prone rats is induced by audiogenic seizures and involves cannabinoid receptors in the periaqueductal gray. *Brain Res.* 1389, 177-82.

Sandkuhler, J., 1996. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. *Prog Neurobiol.* 50, 49-81.

Savard, M., Barbaz, D., Belanger, S., Muller-Esterl, W., Bkaily, G., D'Orleans-Juste, P., Cote, J., Bovenzi, V., Gobeil, F., Jr., 2008. Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signaling in immediate early gene activation. *J Cell Physiol.* 216, 234-44.

Schatz AR, Koh WS, Kaminski NE., 1993. Delta 9-tetrahydrocannabinol selectively inhibits T-cell dependent humoral immune responses through direct inhibition of accessory T-cell function. *Immunopharmacology.* 26, 129-137.

Scheinin, M., Schwinn, D.A., 1992. The locus coeruleus. Site of hypnotic actions of alpha 2-adrenoceptor agonists? *Anesthesiology.* 76, 873-5.

Scheurink, A.J., Steffens, A.B., Bouritius, H., Dreteler, G.H., Bruntink, R., Remie, R., Zaagsma, J., 1989. Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. *Am J Physiol.* 256, R155-60.

Schroder, H.D., Skagerberg, G., 1985. Catecholamine innervation of the caudal spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 242, 358-68.

Sekiguchi, F., Mita, Y., Kamanaka, Y., Kawao, N., Matsuya, H., Taga, C., Kawabata, A., 2004. The potent inducible nitric oxide synthase inhibitor ONO-1714 inhibits neuronal NOS and exerts antinociception in rats. *Neurosci Lett.* 365, 111-5.

Sessa, W.C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J., Hintze, T.H., 1994. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res.* 74, 349-53.

Shannon, H.E., Lutz, E.A., 2000. Effects of the I(1) imidazoline/alpha(2)-adrenergic receptor agonist moxonidine in comparison with clonidine in the formalin test in rats. *Pain.* 85, 161-7.

Sharman, D.F., 1973. The catabolism of catecholamines. Recent studies. *Br Med Bull.* 29, 110-5.

Shyu, B.C., Andersson, S.A., Thoren, P., 1982. Endorphin mediated increase in pain threshold induced by long-lasting exercise in rats. *Life Sci.* 30, 833-40.

Sinaki, M., 1989. Exercise and osteoporosis. *Arch Phys Med Rehabil.* 70, 220-9.

Silva, D.A.S., Melo, L.A., Cabral de Oliveira, A.C., 2007. Efeito do treinamento físico na massa corporal de ratos. *Motriz.* 13, 43-50.

Sluka, K.A., Westlund, K.N., 1992. Spinal projections of the locus coeruleus and the nucleus subcoeruleus in the Harlan and the Sasco Sprague-Dawley rat. *Brain Res.* 579, 67-73.

Smith, P.B., Martin, B.R., 1992. Spinal mechanisms of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced analgesia. *Brain Res.* 578, 8-12.

Smith, P.B., Compton, D.R., Welch, S.P., Razdan, R.K., Mechoulam, R., Martin, B.R., 1994. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 270, 219-27.

Sonne, B., Mikines, K.J., Richter, E.A., Christensen, N.J., Galbo, H., 1985. Role of liver nerves and adrenal medulla in glucose turnover of running rats. *J Appl Physiol.* 59, 1640-6.

Sousa, A.M., Prado, W.A., 2001. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.* 897, 9-19.

Sparling, P.B., Giuffrida, A., Piomelli, D., Rosskopf, L., Dietrich, A., 2003. Exercise activates the endocannabinoid system. *Neuroreport.* 14, 2209-11.

Stacey, M.J., 1969. Free nerve endings in skeletal muscle of the cat. *J Anat.* 105, 231-54.

- Stamford, J.A., 1995. Descending control of pain. *Br J Anaesth.* 75, 217-27.
- Stebbins, C.L., Carretero, O.A., Mindroiu, T., Longhurst, J.C., 1990. Bradykinin release from contracting skeletal muscle of the cat. *J Appl Physiol.* 69, 1225-30.
- Steel, J.H., Terenghi, G., Chung, J.M., Na, H.S., Carlton, S.M., Polak, J.M., 1994. Increased nitric oxide synthase immunoreactivity in rat dorsal root ganglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett.* 169, 81-4.
- Stefano, G.B., Liu, Y., Goligorsky, M.S., 1996. Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J Biol Chem.* 271, 19238-42.
- Stich, V., de Glisezinski, I., Crampes, F., Suljkovicova, H., Galitzky, J., Riviere, D., Hejnova, J., Lafontan, M., Berlan, M., 1999. Activation of antilipolytic alpha(2)-adrenergic receptors by epinephrine during exercise in human adipose tissue. *Am J Physiol.* 277, R1076-83.
- Stich, V., De Glisezinski, I., Crampes, F., Hejnova, J., Cottet-Emard, J.M., Galitzky, J., Lafontan, M., Riviere, D., Berlan, M., 2000. Activation of alpha(2)-adrenergic receptors impairs exercise-induced lipolysis in SCAT of obese subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279, R499-504.
- Stich, V., Marion-Latard, F., Hejnova, J., Viguerie, N., Lefort, C., Suljkovicova, H., Langin, D., Lafontan, M., Berlan, M., 2002. Hypocaloric diet reduces exercise-induced alpha 2-adrenergic antilipolytic effect and alpha 2-adrenergic receptor mRNA levels in adipose tissue of obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 1274-81.
- Stone, L.S., MacMillan, L.B., Kitto, K.F., Limbird, L.E., Wilcox, G.L., 1997. The alpha2a adrenergic receptor subtype mediates spinal analgesia evoked by alpha2 agonists and is necessary for spinal adrenergic-opioid synergy. *J Neurosci.* 17, 7157-65.
- Stone, L.S., Vulchanova, L., Riedl, M.S., Wang, J., Williams, F.G., Wilcox, G.L., Elde, R., 1999. Effects of peripheral nerve injury on alpha-2A and alpha-2C adrenergic receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. *Neuroscience.* 93, 1399-407.
- Suardiaz, M., Estivill-Torrus, G., Goicoechea, C., Bilbao, A., Rodriguez de Fonseca, F., 2007. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain.* 133, 99-110.
- Sullivan, M.J., Higginbotham, M.B., Cobb, F.R., 1988. Exercise training in patients with severe left ventricular dysfunction. Hemodynamic and metabolic effects. *Circulation.* 78, 506-15.
- Suplita, R.L., 2nd, Farthing, J.N., Gutierrez, T., Hohmann, A.G., 2005. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuropharmacology.* 49, 1201-9.

Suplita, R.L., 2nd, Gutierrez, T., Fegley, D., Piomelli, D., Hohmann, A.G., 2006. Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia. *Neuropharmacology*. 50, 372-9.

Svokos, K., Nalwalk, J.W., Leurs, R., Menge, W.M., Timmerman, H., Hough, L.B., 2001. A role for spinal, but not supraspinal, alpha(2) adrenergic receptors in the actions of impropion, a powerful, non-opioid analgesic. *Brain Res*. 923, 12-9.

Szymbor, B., Kowalczyk, M., 1996. Influence of CCK-8 and yohimbine on supraspinal modulation of nociceptive process. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 56, 243-8.

Taber, R.I., 1973. Predictive value of analgesic assays in mice and rats. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 8, 191-211.

Tamaki, T., Uchiyama, S., Nakano, S., 1992. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc*. 24, 881-6.

Thompson, M., Becker, L., Bryant, D., Williams, G., Levin, D., Margraf, L., Giroir, B.P., 1996. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 81, 2415-20.

Todd, A.J., Watt, C., Spike, R.C., Sieghart, W., 1996. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci*. 16, 974-82.

Tokuyama, S., Takahashi, M., Kaneto, H., 1991a. Further evidence for the participation of an alpha 2-adrenoceptor mediated mechanism in the production of forced swimming-stress induced analgesia in mice. *J Pharmacobiodyn*. 14, 637-41.

Tokuyama, S., Takahashi, M., Kaneto, H., 1991b. Participation of an alpha 2-mediated mechanism in the production of forced swimming-stress induced analgesia in mice. *J Pharmacobiodyn*. 14, 357-61.

Tomic, M.A., Vuckovic, S.M., Stepanovic-Petrovic, R.M., Ugresic, N.D., Paranos, S., Prostran, M.S., Boskovic, B., 2007. The involvement of peripheral alpha 2-adrenoceptors in the antihyperalgesic effect of oxcarbazepine in a rat model of inflammatory pain. *Anesth Analg*. 105, 1474-81, table of contents.

Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K., Walker, J.M., 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 83, 393-411.

Vale, M.L., Rolim, D.E., Cavalcante, I.F., Ribeiro, R.A., Souza, M.H., 2007. Role of NO/cGMP/KATP pathway in antinociceptive effect of sildenafil in zymosan writhing response in mice. *Inflamm Res*. 56, 83-8.

Van Citters, R.L., Franklin, D.L., 1969. Cardiovascular performance of Alaska sled dogs during exercise. *Circ Res*. 24, 33-42.

- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D., Sharkey, K.A., 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 310, 329-32.
- VanTeeffelen, J.W., Segal, S.S., 2006. Rapid dilation of arterioles with single contraction of hamster skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290, H119-27.
- Vassilakopoulos, T., Deckman, G., Kebbewar, M., Rallis, G., Harfouche, R., Hussain, S.N., 2003. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 284, L452-7.
- Vaughan, C.W., Bandler, R., Christie, M.J., 1996. Differential responses of lateral and ventrolateral rat periaqueductal grey neurones to noradrenaline in vitro. *J Physiol*. 490 (Pt 2), 373-81.
- Vaughan, C.W., Connor, M., Bagley, E.E., Christie, M.J., 2000. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol*. 57, 288-95.
- Vissing, J., Vissing, S.F., MacLean, D.A., Saltin, B., Quistorff, B., Haller, R.G., 1998. Sympathetic activation in exercise is not dependent on muscle acidosis. Direct evidence from studies in metabolic myopathies. *J Clin Invest*. 101, 1654-60.
- Wakita, T., Shintani, F., Yagi, G., Asai, M., Nozawa, S., 2001. Combination of inflammatory cytokines increases nitrite and nitrate levels in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Brain Res*. 905, 12-20.
- Walberg-Rankin, J., Franke, W.D., Gwazdauskas, F.C., 1992. Response of beta-endorphin and estradiol to resistance exercise in females during energy balance and energy restriction. *Int J Sports Med*. 13, 542-7.
- Walker, J.M., Huang, S.M., Strangman, N.M., Tsou, K., Sanudo-Pena, M.C., 1999. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 12198-203.
- Walker, J.M., Hohmann, A.G., 2005. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol*. 509-54.
- Wang, J.S., Cheng, L.J., 1999. Effect of strenuous, acute exercise on alpha2-adrenergic agonist-potentiated platelet activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19, 1559-65.
- Wang, Q., Peng, Y., Chen, S., Gou, X., Hu, B., Du, J., Lu, Y., Xiong, L., 2009. Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system. *Stroke*. 40, 2157-64.

Westlund, K.N., Sorkin, L.S., Ferrington, D.G., Carlton, S.M., Willcockson, H.H., Willis, W.D., 1990. Serotonergic and noradrenergic projections to the ventral posterolateral nucleus of the monkey thalamus. *J Comp Neurol.* 295, 197-207.

WHO (World Health Organization), 2008. The global burden of disease: 2004 update. Geneva.

Willow, M., Carmody, J., Carroll, P., 1980. The effects of swimming in mice on pain perception and sleeping time in response to hypnotic drugs. *Life Sci.* 26, 219-24.

Wu, J., Lin, Q., Lu, Y., Willis, W.D., Westlund, K.N., 1998. Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis. *Exp Brain Res.* 118, 457-65.

Xi, Z.X., Peng, X.Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.Y., Liu, Q.R., Yang, H.J., Bi, G.H., Li, J., Gardner, E.L., 2011. Brain cannabinoid CB receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci.* 14, 1160-6.

Yaksh, T.L., 1981. The antinociceptive effects of intrathecally administered levonantradol and desacetyllevonantradol in the rat. *J Clin Pharmacol.* 21, 334S-340S.

Yaksh, T.L., 1985. Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacol Biochem Behav.* 22, 845-58.

Yamada, K., Inagaki, N., 2005. Neuroprotection by KATP channels. *J Mol Cell Cardiol.* 38, 945-9.

Yang, A.L., Tsai, S.J., Jiang, M.J., Jen, C.J., Chen, H.I., 2002. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. *J Biomed Sci.* 9, 149-55.

Yeomans, D.C., Clark, F.M., Paice, J.A., Proudfit, H.K., 1992. Antinociception induced by electrical stimulation of spinally projecting noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group of the rat. *Pain.* 48, 449-61.

Yokogawa, F., Kiuchi, Y., Ishikawa, Y., Otsuka, N., Masuda, Y., Oguchi, K., Hosoyamada, A., 2002. An investigation of monoamine receptors involved in antinociceptive effects of antidepressants. *Anesth Analg.* 95, 163-8, table of contents.

Yoon, M.H., Huang, L.J., Choi, J.I., Lee, H.G., Kim, W.M., Kim, C.M., 2011. Antinociceptive effect of intrathecal ginsenosides through alpha-2 adrenoceptors in the formalin test of rats. *Br J Anaesth.* 106, 371-9.

Young, M.E., Radda, G.K., Leighton, B., 1997. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J.* 322 (Pt 1), 223-8.

Young, M.E., Leighton, B., 1998. Evidence for altered sensitivity of the nitric oxide/cGMP signalling cascade in insulin-resistant skeletal muscle. *Biochem J.* 329 (Pt 1), 73-9.

Young, W.S., 3rd, Kuhar, M.J., 1980. Noradrenergic alpha 1 and alpha 2 receptors: light microscopic autoradiographic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 1696-700.

Zhang, Y., Lee, T.S., Kolb, E.M., Sun, K., Lu, X., Sladek, F.M., Kassab, G.S., Garland, T., Jr., Shyy, J.Y., 2006. AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, 1281-7.

Zhao, Y., Zhang, C., Kang, Y.M., Qiao, J.T., Dafny, N., 1999. Endogenous adenosine involved in the mediation of spinal antinociception produced by stimulating locus coeruleus. *Life Sci.* 65, PL67-74.

Zhou, D., Shearman, L.P., 2004. Voluntary exercise augments acute effects of CB1-receptor inverse agonist on body weight loss in obese and lean mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 77, 117-25.

Zias, J., Stark, H., Sellgman, J., Levy, R., Werker, E., Breuer, A., Mechoulam, R., 1993. Early medical use of cannabis. *Nature.* 363, 215.