

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GUSTHAVO AUGUSTO ALVES RODRIGUES

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TREINAMENTO DE FORÇA E DA
SUPLEMENTAÇÃO COM A PROTEÍNA DO SORO DO LEITE NA
NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR LESÃO MUSCULAR EM RATOS**

Alfenas/MG

2019

GUSTHAVO AUGUSTO ALVES RODRIGUES

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TREINAMENTO DE FORÇA E DA
SUPLEMENTAÇÃO COM A PROTEÍNA DO SORO DO LEITE NA
NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR LESÃO MUSCULAR EM RATOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL- MG.
Área de concentração: Ciências Fisiológicas.
Orientador: Professor Doutor Giovane Galdino de Souza.

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

R696i Rodrigues, Gusthavo Augusto Alves.
Investigação do efeito do treinamento de força e da suplementação com Whey Protein na dor induzida por lesão muscular. / Gusthavo Augusto Alves Rodrigues. - Alfenas/MG, 2019.
97 f.: il. --
Orientador: Giovane Galdino de Souza.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Músculo Esquelético. 2. Ferimentos e Lesões. 3. Treinamento de Resistência. 4. Medição da Dor. 5. Neuroglia. I. Souza, Giovane Galdino de. II. Título.

CDD-615.82

GUSTHAVO AUGUSTO ALVES RODRIGUES

"INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO DE FORÇA E DA INGESTÃO DE WHEY
PROTEIN NA DOR INDUZIDA POR LESÃO MUSCULAR".

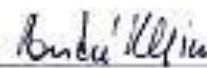
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em
Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de
Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Aprovada em: 25/12/19

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. André Klein
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais
- UFMG

Assinatura: 

Prof. Dr. Alexandre Giveti Paiva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

Aos meus pais, meus irmãos e Priscila meu eterno amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me deu Jesus e seu Espírito Santo, me deu vida e me guardou até aqui.

Agradeço a minha esposa por ter me ensinado que a vida só vale a pena se for compartilhada.

Agradeço ao meu pai por ter me ensinado, da maneira mais difícil, que a vida é dura e por isso eu devo trabalhar mais duro ainda.

Agradeço a minha mãe por ter me ensinado que a vida é doce por isso eu devo ser sensível o suficiente para apreciar cada segundo dela.

Agradeço aos meus irmãos que me ensinaram que a vida me observa e por isso eu devo me tornar um exemplo.

Agradeço aos meus amigos que me ensinaram que a vida é também feita de gargalhas.

Agradeço a todos meus professores e mestres por terem me ensinado que as coisas mais importantes eu terei que aprender sozinho.

Agradeço ao meu orientador, pelo apoio e atenção incondicional, e por ter me ensinado que na ciência devemos dar um passo de cada vez.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório pelo auxílio quando precisei. Agradeço aos colaboradores de outros laboratórios pelas parcerias que foram fundamentais para esse trabalho e aos colaboradores do departamento de histologia e fisiologia. Agradeço aos técnicos e técnicas de laboratório, secretários, bioteristas, seguranças, auxiliares de limpeza, e todos os funcionários desta Universidade pela colaboração direta ou indireta.

Agradeço ao Marcelo Silva de Carvalho pela plataforma de marcha e auxílio na confecção do aparato de treinamento de força, na padronização da termografia e na escrita do projeto.

Agradeço ao Instituto Federal do Sul de Minas pelo apoio durante a realização desse trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos aqueles que torceram pelo meu sucesso e o sucesso desse trabalho, e me auxiliaram de alguma forma positiva, para que hoje pudesse se concretizar, não apenas um sonho de receber um título, mas o objetivo de aprender um pouco mais.

“Aqueles que são sábios reluzirão como o sol, e aqueles que ensinam a sabedoria serão como as estrelas que brilham para sempre ...
E diz a palavra do Senhor: Muitos viajarão para todos os lados em busca de conhecimento, e assim a ciência se multiplicará”.
(Daniel: 12: 3-4)

RESUMO

Lesões do músculo estriado esquelético representam aproximadamente 55% da causa de lesões durante a prática esportiva. A dor é um dos principais sintomas durante a lesão muscular. O processo de modulação da dor durante a lesão muscular é complexo e envolve vários mecanismos, dentre eles é importante destacar a participação das células da glia. As células da glia, principalmente a micróglia e o astrócito, quando ativadas participam da modulação da nocicepção a nível espinal. O tratamento da lesão muscular geralmente é conduzido com protocolos tradicionais, entretanto o treinamento de força (TF) e a suplementação com proteína do soro do leite (PSL) podem ser uma alternativa de tratamento. Porém, o efeito do TF e PSL sobre a ativação das células da glia após a lesão muscular ainda não está bem esclarecido. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta nociceptiva e a participação das células da glia durante a lesão muscular, bem como investigar o efeito do TF e da suplementação com PSL sobre estas respostas após a lesão muscular. Para o estudo, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 250g e 300g. A lesão muscular foi induzida através um modelo de contusão por impacto mecânico. Posteriormente, os animais foram submetidos a um tratamento de duas semanas com o TF (3 vezes por semana) e suplementação com PSL (diariamente). Durante o tratamento foi avaliado o limiar nociceptivo, a temperatura local, os padrões de marcha e número de células inflamatórias no tecido. Para a avaliação da participação das células da glia espinais na modulação da nocicepção foi realizado um ensaio farmacológico. Para a avaliação da expressão de proteínas relacionadas à ativação de microglias (Iba-1) e astrócitos (GFAP), foi utilizado o ensaio de western blot. Os resultados demonstraram que tanto o TF quanto a suplementação com PSL foram capazes de reduzir a hiperalgesia mecânica e o número de células inflamatórias no local da lesão. O TF melhorou os padrões de marcha dos animais. Além disso, foi verificado farmacologicamente que as células da glia espinais têm uma participação na modulação central da dor induzida pela lesão muscular. O ensaio de Western Blot, demonstrou que de fato há um aumento da expressão de Iba-1 e GFAP espinais, após a lesão muscular, e que a expressão de Iba-1 no grupo submetido ao TF e no grupo TF+PSL foram estatisticamente iguais ao grupo controle. Em conclusão, o presente estudo verificou que o tratamento com TF e suplementação com PSL promoveram uma resposta antinociceptiva e controle do quadro inflamatório, associado à inibição da ativação da micróglia espinal.

Palavras-chave: Músculo. Lesões. Treinamento de Resistência. Medição da Dor. Neuroglia.

ABSTRACT

Muscle lesion accounts for about 55% for all causes of sports related injuries. The pain is one of the main symptoms during muscle lesion. Pain modulation during muscle lesion is complex and involves several mechanisms including the participation of glial cells mainly the microglia and astrocytes. Strength training and whey protein supplementation has been used as an alternative treatment for muscle lesion. However, the effect of strength training and whey protein supplementation over the glial cells activation is unknown. The aim of this study was to investigate the nociceptive responses and the glial activation during muscle injury as well as the effectiveness of the strength training and whey protein supplementation as a treatment. The experiments were conducted on male Wistar rats, weighting around 250g and 300g. The muscle injury was induced using a mass drop contusion model. Then, the animals were submitted to a two weeks long treatment, with strength training (3 times a week) and whey protein supplementation (daily). During the treatment, it was assessed the paw withdrawal threshold, the temperature on the injury site, the gait patterns and the number of inflammatory cells. A pharmacological test was conducted in order to evaluate the participation of glial cells on the central modulation of the nociception. Using a Western Blot assay it was investigated the expression of microglia (Iba-1) and astrocytes (GFAP). The results indicated that both the strength training and the whey protein supplementation were effective on reducing the hyperalgesia and the number of inflammatory cells. Furthermore, the strength training showed a significant improvement on the gait patterns. The pharmacological test showed that the glial cells participate on the pain modulation centrally. Most importantly, the western blot assay indicated that there is an increased expression of activated glial cells after muscle lesion, and that microglial activation was similar to the control group after the strength training treatment. In conclusion, the strength training and the whey protein supplementation demonstrated some positive effects on the nociceptive responses, inflammatory responses and microglial activation.

Key words: Muscle. Injury. Resistance Training. Nociception. Glial cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via ascendente da dor	20
Figura 2 - Tipos de Fibras Nociceptivas.....	21
Figura 3 - Graus de Lesão Muscular	22
Figura 4 - Aparato de Lesão Muscular	32
Figura 5 - Aparato do Treinamento de Força	34
Figura 6 - Plataforma de Marcha	39
Figura 7 - Cronograma do Experimento Piloto	44
Figura 8 - Cronograma do Experimento.....	45
Figura 9 - Imagem Representativa da Temperatura no Local da Lesão.....	54
Figura 10 - Imagem Representativa das Variáveis de Marcha Analisadas	62
Figura 11 - Imagens Representativas das Análises Histológicas do Tecido Muscular	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von frey eletrônico em animais submetidos ao protocolo de lesão muscular	48
Gráfico 2-	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von frey eletrônico em animais submetidos aos tratamentos com TF e PSL após o protocolo de lesão muscular	50
Gráfico 3-	Avaliação da temperatura do local da lesão de animais submetidos ao protocolo de lesão muscular	51
Gráfico 4-	Avaliação da correlação entre a temperatura do local da lesão e o limiar nociceptivo	52
Gráfico 5-	Avaliação do efeito das intervenções com TF e PSL sobre a temperatura do local da lesão dos animais submetidos ao protocolo de lesão	53
Gráfico 6-	Avaliação inicial da amplitude articular de movimento durante a marcha em animais submetidos ao protocolo de lesão muscular.....	56
Gráfico 7-	Avaliação inicial da área de contato da pata durante a marcha em animais submetidos ao protocolo de lesão muscular	57
Gráfico 8-	Avaliação da correlação entre a amplitude articular de movimento e o limiar nociceptivo	58
Gráfico 9-	Avaliação da correlação entre a área de contato da pata e o limiar nociceptivo..	59
Gráfico 10-	Avaliação do efeito das intervenções com TF e PSL sobre a amplitude articular de movimento dos animais submetidos ao protocolo de lesão	60
Gráfico 11-	Avaliação do efeito das intervenções com TF e PSL sobre a área de contato da pata dos animais submetidos ao protocolo de lesão	61

Gráfico 12- Análise do efeito do TF e PSL no número de células inflamatórias do músculo lesionado	63
Gráfico 13- Análise da concentração de lactato sanguíneo em repouso e após o exercício de força	65
Gráfico 14- Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von frey para investigação da participação da micróglia na dor muscular no 7º dia após lesão.....	66
Gráfico 15- Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von frey para investigação da participação da micróglia na dor muscular no 14º dia após lesão	67
Gráfico 16 - Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von frey para investigação da participação de astrócitos na dor muscular no 7º dia após lesão	68
Gráfico 17- Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von frey para investigação da participação de astrócitos na dor muscular no 14º dia após lesão	69
Gráfico 18- Investigação do efeito da intervenção com TF e com PSL sobre a ativação da micróglia espinal no 15º dia de tratamento através do ensaio de western blot ...	71
Gráfico 19- Investigação do efeito da intervenção com TF e PSL sobre a ativação de astrócito espinal no 15º dia de tratamento através da análise de western blot.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição do Suplemento Alimentar.....	36
---------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C -	Grau Celsius
µg -	Microgrma
µL -	Microlitro
µm -	Micrometro
ACSM-	<i>American College of Sports Medicine</i>
AINES -	Anti-inflamatórios não esteroides
ANOVA -	Análise de Variância
CFA -	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
DAMPs-	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i>
dL -	Decilitro
E.P.M. -	Erro Padrão da Média
Fluo -	Fluorocitrato
g -	gramas
GFAP-	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
H3K9 -	Histona H3 Lisina 9
HDAC1 -	Histona Deacetilase 1
HCl -	Ácido clorídrico
Hz -	Hertz
i.p. -	Intraperitoneal
i.t. -	Intratecal
IASP -	<i>International Association for the Study of Pain</i>
Iba-1-	<i>Ionized calcium-binding adaptor molecule-1</i>
IL-6 -	Interleucina 6
IL-1β -	Interleucina 1β
10 -	Interleucina 10kDa - Kilodalton
Kg -	Kilograma
L -	Litros
LPS -	Lipopolisacarídeo
MAPKs -	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MEE-	Músculo Estriado Esquelético
mg -	Miligrama

min -	Minutos
Mino -	Minociclina
mL -	Mililitro
mm -	Milímetros
mmol -	Milimol
mTOR -	<i>Mammalian Target of Rapamicin</i>
NFκB -	<i>Nuclear Factor- Kappa B</i>
nmol -	Nanomol
O ₂ -	Oxigênio
p70S6K1-	Proteína Ribosomal S6 Kinase beta-1
pH -	Potencial hidrogeniônico
PRRs-	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PSL-	Proteína do Soro do Leite
RM -	Repetição Máxima
rpm -	Rotações por minuto
ROS-	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SNC-	Sistema Nervoso Central
TF-	Treinamento de Força
TNFα -	<i>Tumoral necrosis factor alpha</i>
V –	Voltz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	MODULAÇÃO DA DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
2.2	FISIOPATOLOGIA DA LESÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.	21
2.3	MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO MUSCULAR.....	24
2.4	TRATAMENTO DE LESÕES MUSCULARES.....	25
2.5	CÉLULAS DA GLIA E A MODULAÇÃO DA DOR	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVOS GERAIS	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	ANIMAIS	31
4.2	MODELO DE LESÃO MUSCULAR.....	31
4.3	PROTOCOLO DE TF	32
4.4	DOSAGEM DE LACTATO	34
4.5	SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNA DO SORO DO LEITE	35
4.6	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO.....	36
4.7	ANÁLISE DE MARCHA	37
4.8	AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA.....	39
4.9	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	40
4.10	DROGAS UTILIZADAS NO ESTUDO	41
4.11	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	42
4.12	INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IBA-1 E GFAP ATRAVÉS DO ENSAIO DE WESTERN BLOT	42
4.13	DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	43
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5.	RESULTADOS	48
5.1	INVESTIGAÇÃO DO PROTOCOLO DE LESÃO MUSCULAR SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO.....	48

5.2	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TF E PSL SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO	49
5.3	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO PROTOCOLO DE LESÃO E DO TRATAMENTO COM TF E PSL SOBRE A ANÁLISE TERMOGRÁFICA.....	50
5.4	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO PROTOCOLO DE LESÃO E DO TRATAMENTO COM TF E PSL SOBRE OS PADRÕES DE MARCHA	54
5.5	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TF E PSL SOBRE A ANÁLISE HISTOLÓGICA DA LESÃO MUSCULAR	62
5.6	EFEITO DO TF SOBRE O LACTATO SANGUÍNEO	64
5.7	ENVOLVIMENTO DE MICRÓGLIA E ASTRÓCITOS ESPINAIS NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR LESÃO MÚSCULAR.....	65
5.8	EFEITO DO TF E PSL SOBRE A EXPRESSÃO DE MICRÓGLIA E ASTRÓCITOS ESPINAIS.....	69
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO.....	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO.....	100

1 INTRODUÇÃO

Lesões do músculo estriado esquelético representam aproximadamente 55% da causa de lesões durante a prática esportiva. Além disso, é a principal causa de perda de funcionalidade, que pode ser acompanhada de um quadro álgico severo e de longa duração (GIGANTE et al., 2014). O processo de cicatrização e recuperação após lesões musculares é complexo e dependente da ação conjunta de uma série de fatores. Muito embora, algumas das fases desse processo são características e estão bem estabelecidas, sendo estas: fase de degeneração, inflamação e regeneração (SMITH et al., 2008; JARVINEN et al., 2005; TIDBALL, 2005.).

O processo inflamatório envolvendo a recuperação do músculo lesionado é uma das fases mais emblemáticas, pois depende de ações muito bem orquestradas de fatores pró e anti-inflamatórios (TIDBALL, 2005; BASSEL-DUBY; OLSON, 2006). Portanto, a fase de inflamação é um momento estratégico para o desenvolvimento de tratamentos pró-resolutivos (ALESSANDRI et al., 2013). A inflamação por sua vez, é conhecida por apresentar alguns sinais e sintomas específicos: dor, perda de função, aumento da temperatura local, edema e eritema (FREIRE; VAN DYKE, 2013; DIBBINS, 2018). Dentre esses sintomas, a dor pode ser considerada uma das mais notáveis causas de desconforto para o indivíduo.

De acordo com a IASP (*International Association for the Study of Pain*) a dor é conhecida por ser uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial ou real (LOESER; TREEDE, 2008). Durante o processo de inflamação gerado pela lesão muscular, há uma produção de diversos agentes inflamatórios que podem gerar uma percepção aumentada de um estímulo doloroso, conhecido como hiperalgesia. Além dos mecanismos periféricos envolvidos na resposta nociceptiva, mecanismos centrais também participam da modulação da dor (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Dentre esses mecanismos, destaca-se a ação de células gliais, que consistem em três principais grupos de células: os astrócitos, as micróglias e os oligodendrócitos, sendo que astrócito e microglia são as principais células envolvidas na modulação neuroimune da dor (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013). Entretanto, até o presente momento há poucos estudos que tenham investigado a participação das células da glia na dor induzida por lesão muscular.

O protocolo tradicional para tratamento de lesão muscular é amplamente conhecido pela aplicação do princípio baseado na sigla PRICE: Proteção, Repouso, “Ice”, Compressão e Elevação (BLEAKLEY et al., 2007). Dependendo da extensão e severidade da lesão, também

podem ser utilizados medicamentos como anti-inflamatórios não esteroidais (RAHUSEN; WEINHOLD; ALMEKINDERS, 2004; ALMEKINDERS, 1999). Entretanto alguns estudos têm proposto formas alternativas de tratamento da lesão muscular, nas quais se destacam tratamentos não farmacológicos (RANTANEN et al., 1999; AMARAL; PARIZOTO; SALVINI, 2001).

O treinamento de força (TF), por sua vez, tem apresentado características de ação antinociceptiva (GALDINO et al., 2014). Além disso, estudos têm encontrado que a ingestão de suplementos alimentares, como a proteína do soro do leite (PSL) pode atenuar microlesões musculares causadas pelo exercício (KATO et al., 2016). Entretanto, até o presente momento, nenhum estudo investigou o efeito de TF e PSL no controle da dor muscular induzida por lesão, tão pouco seu efeito sobre a ativação glial. Desta forma, o presente trabalho investigou o efeito do TF e ingestão de PSL na nocicepção e em variáveis relacionadas à inflamação em um modelo de lesão muscular induzido por contusão mecânica, bem como, a participação das células da glia nesse modelo de dor muscular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os tópicos a seguir irão apresentar a revisão de literatura contextualizada aos objetivos e problematização do presente estudo.

2.1 MODULAÇÃO DA DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP - *International Association for the Study of Pain*) define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tais danos. Portanto, um mecanismo extremamente complexo está envolvido na modulação da dor, possuindo componentes sociais, emocionais e biológicos. Devido a essas variáveis, cada indivíduo poderá apresentar experiências e respostas diferentes a estímulos dolorosos (LOESER; TREEDE, 2008). Além disso, em condições homeostáticas normais a dor funciona como proteção a agentes nocivos de forma a identificá-los e gerar uma rápida resposta de retirada através do arco reflexo (ZIMMERMANN et al., 2012).

Levando em consideração o aspecto fisiológico da modulação da dor, toda vez que um membro, órgão ou tecido do organismo humano é exposto a uma situação de dano tecidual, é ativado uma série de mecanismos extremamente complexos. Dessa forma, esse estímulo nocivo será transformado em uma sinalização nociceptiva que será progressivamente transmitida para centros superiores do sistema nervoso central (SNC), onde será processado e por fim interpretado pelo indivíduo como dor. Uma vez que os nociceptores reconhecem esse estímulo nocivos, esse estímulo é convertido em potencial elétrico através da despolarização da fibra e são conduzidos ao longo do neurônio primário até o corpo dos neurônios localizados no chamado gânglio da raiz dorsal. Uma vez que esse estímulo passa pelo gânglio da raiz dorsal ele é conduzido até um neurônio de segunda ordem localizado no corno dorsal da medula espinal. Uma vez que esse potencial de ação chega até a medula espinal ele é conduzido através dos chamados tratos ou vias até regiões supraespinais onde esses estímulos serão interpretados e entendidos pelo indivíduo como uma sensação dolorosa (CAMERON, 2013). A figura 1 ilustra a transmissão do estímulo doloroso.

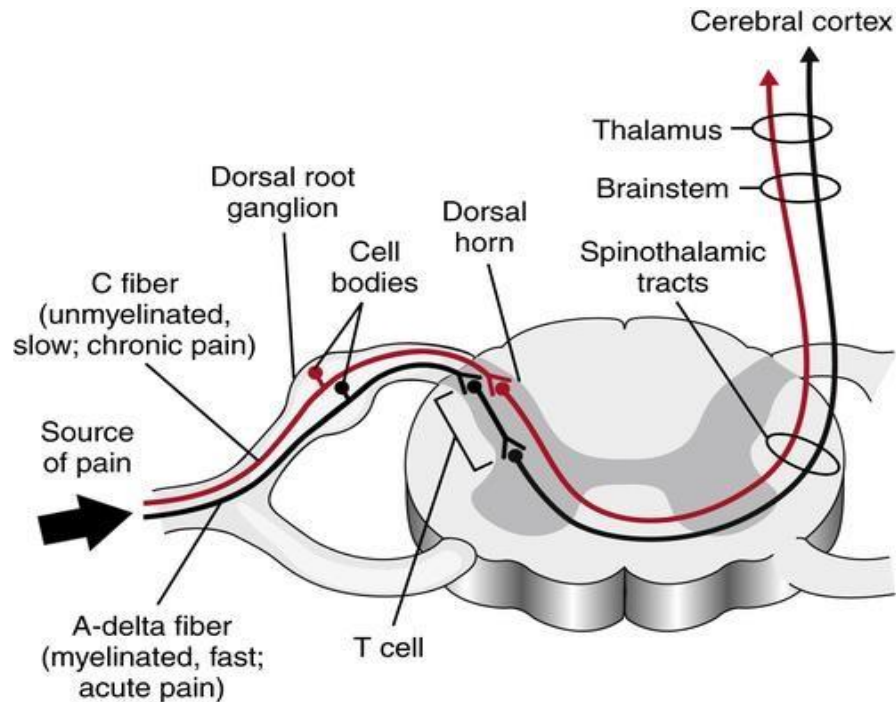


Figura 1 - Via Ascendente da Dor
 Fonte: Cameron, 2013.

Nota: São representadas as diferentes fibras nociceptivas e estruturas envolvidas na transmissão do potencial elétrico através do axônio até o corpo celular no neurônio de primeira ordem e posteriormente até o neurônio de segunda ordem na medula espinhal e em seguida a ascensão pelos tractos espinotalâmicos até porções supraespinhais do SNC.

A condução desses sinais nociceptivos são transmitidos através de fibras nociceptivas, que podem ser diferenciadas de acordo com suas características anatômicas e funcionais, influenciando assim em suas respostas fisiológicas frente a um estímulo nocivo. Essas fibras são categorizadas como fibras do tipo C que são fibras não mielinizadas e as fibras do tipo A δ que são mielinizadas. As fibras do tipo C por não serem mielinizadas e serem de diâmetro pequeno possuem uma baixa capacidade de condução do sinal e uma velocidade mais lenta, portanto estão associadas à condução prolongada do estímulo doloroso. Entretanto são capazes de detectar diversos tipos de estímulos como, por exemplo, estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química, até estímulos que não são nocivos ao indivíduo. Por sua vez, as fibras do tipo A δ são fibras mielinizadas que possuem um diâmetro médio e, portanto possuem uma capacidade de condução com maior velocidade que as fibras do tipo C. Essas fibras A δ estão assim associadas à transdução mais rápida e aguda do estímulo doloroso e diferentemente das fibras do tipo C são mais especializadas a detecção de estímulos nocivos mecânicos (CAMERON, 2013). Vale ressaltar que no tecido muscular, além das fibras

motoras e proprioceptivas, é encontrada uma grande quantidade de fibras nociceptivas, portanto respostas dolorosas podem ser facilmente identificadas (MENSE, 2008). A figura 1 ilustra os tipos de fibras, de acordo com a velocidade de condução do sinal e com o tipo de estímulo detectado por esse tipo de fibra (CAMERON, 2013).

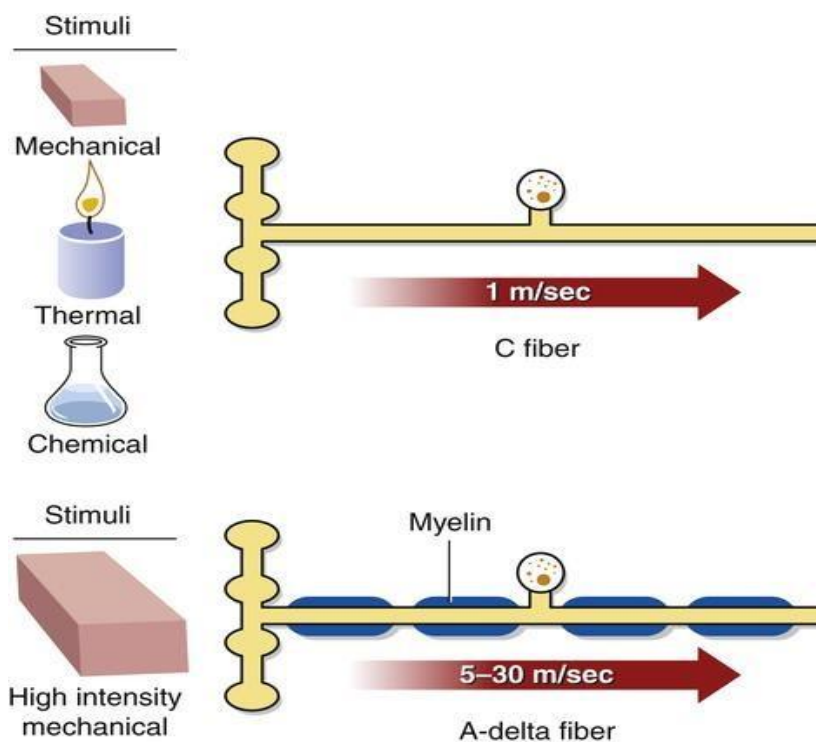


Figura 2 - Tipos de Fibras Nociceptivas

Fonte: CAMERON, 2013.

Nota: Tipos de fibras nociceptivas de acordo com velocidade de transmissão do sinal e tipo de estímulos nocivos detectados por cada uma delas.

2.2 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.

O músculo estriado esquelético (MEE) pode constituir cerca de até 45% da massa corporal total. Adicionalmente, lesões no MEE são uma das causas mais comuns de dores crônicas e disfunção física em atletas e praticantes regulares de exercício físico, podendo chegar até 55% de todas as lesões esportivas (GIGANTE et al., 2014). O MEE pode sofrer lesões por estiramento, contusões e lacerações (FERNADES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). As lesões no MEE podem ser categorizadas como traumas diretos e indiretos (BAOGE et al., 2012; LONGO et al., 2012). As lesões diretas são representadas pelas lacerações e contusões, enquanto as lesões indiretas são representadas pelos estiramentos musculares. Uma

contusão muscular ocorre quando uma força de compressão súbita é aplicada sobre o ventre muscular enquanto o estiramento muscular ocorre quando uma força de tração excessiva é aplicada ao músculo que conduz à sobrecarga das miofibrilas gerando uma ruptura dessas fibras (LONGO et al., 2012).

Atualmente, as lesões musculares podem ser classificadas em três categorias de lesão: Lesão leve (grau I), moderada (grau II) e grave (grau III) em conformidade com os seus sinais e sintomas (JÄRVINEN et al., 2005; FERNADES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). Estiramentos e contusões leves (grau I) representam uma lesão de apenas algumas fibras musculares com pequeno edema e desconforto, acompanhadas de nenhuma ou mínima perda de força e restrição de movimentos (JÄRVINEN et al., 2005, FERNADES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). Já os estiramentos e contusões moderadas (grau II), provocam um dano maior ao músculo com evidente perda de função. É possível palpar irregularidades muscular no local específico da lesão onde ocorre a formação de um hematoma local com eventual equimose dentro de dois a três dias (JÄRVINEN et al., 2005; FERNADES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). Quando uma lesão estende-se por toda a secção transversal do músculo e resulta em perda completa de função muscular e dor intensa é considerada como sendo grave (grau III). Nesse tipo de lesão, a falha na estrutura muscular é evidente, e a equimose costuma ser extensa, situando-se muitas vezes distante ao local da ruptura (JÄRVINEN et al., 2005; FERNADES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). A figura 3 ilustra as três categorias de graus de lesão de acordo com o nível de acometimento do MEE.

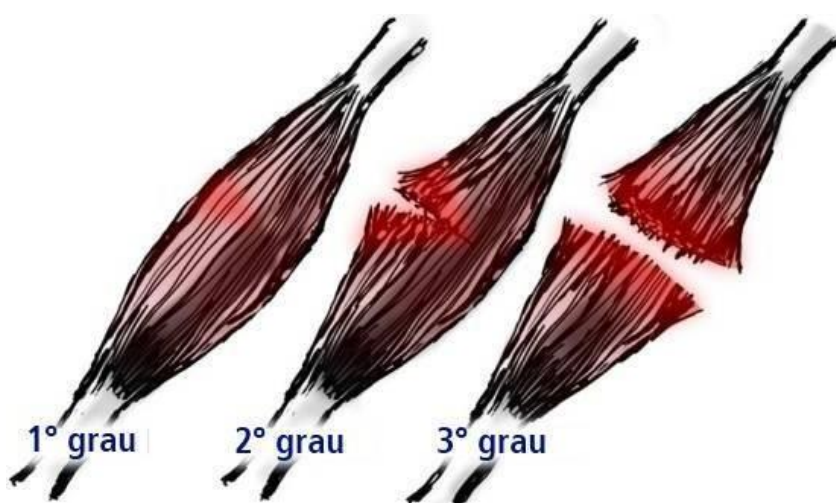


Figura 3 - Graus de Lesão Muscular

Fonte: Google fotos.

Nota: A lesão de 1º grau é quando há pequenas lesões estruturais no MEE, nas lesões de 2º grau ocorrem lesões de várias fibras musculares acometendo uma boa parte do músculo, já as lesões de 3º grau causam um rompimento total do músculo acometido.

Durante a lesão muscular acontecem algumas modificações específicas no tecido, essas modificações são divididas em fases: Degeneração, inflamação, regeneração e remodelamento (SMITH, et al. 2008; JARVINEN; KAARIAINEN; KALIMO, 2005; TIDBALL, 2005.). A fase de destruição (degeneração) é caracterizada pela ruptura e necrose de fibras musculares, seguida pela formação de um hematoma entre as fibras musculares rompidas e pela reação de células inflamatórias (JÄRVINEN et al., 2005; FERNADES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011).

Inicia-se, portanto, um processo de inflamação, caracterizado pela migração de células inflamatórias para o local da lesão e também o surgimento de vários mediadores inflamatórios. A inflamação por sua vez, é conhecida por apresentar alguns sinais cardinais como a dor, a perda de função, o aumento da temperatura local, o edema e o eritema (FREIRE; VAN DYKE, 2013; DIBBINS, 2018). Nesse sentido, a dor é um sintoma que pode influenciar diretamente nos três pilares primordiais para a saúde do indivíduo: biológico, social e psicológico (CHAPPLAN; GAVRIN, 1999). A formação de edema no local da lesão, por sua vez, é gerada por rompimento dos vasos, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação (LEE; MITCHELL; HEALY, 2012; HAYASHI, 2012). Essas respostas muitas vezes são acompanhadas de um aumento na temperatura, caracterizado por uma hiperemia local que pode ser avaliado através de termografia cutânea (ALESSANDRINO; BALCONI, 2013). Neste aspecto, a análise de termografia tem se demonstrado como uma relevante alternativa de análise de lesão tecidual (SACHARUK, 2011; AKANKSHA; ARJUN; CILA, 2014). Outra resposta que deve ser destacada é a perda de função do membro acometido pela lesão, que no caso de membros inferiores, pode ser avaliada através do estudo de padrões de marcha (FU et al., 2009; VAREJÃO et al., 2002; LAMBER et al., 2014). Além disso, o processo de lesão muscular em si, pode se intensificar pela liberação de citocinas e interleucinas originadas de migração celular e de uma resposta pró-inflamatória proveniente dos miócitos lesionados (BARROSO; THIELE, 2011). Há de se ressaltar que algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) contribuem não só para fisiopatologia da lesão tecidual, mas também redução do limiar nociceptivo, bem como, para a perpetuação de outros mediadores envolvidos na modulação e manutenção da dor (OLIVEIRA et al., 2011).

As fases finais da inflamação são caracterizadas por um caráter pró-resolutivo da lesão, existe uma migração de células inflamatórias, que por sua vez, irá levar a uma liberação de citocinas anti-inflamatórias contribuindo para o processo de reparo e regeneração (FULLERTON; GILROY, 2016). Nessa fase de reparo, verifica-se a regeneração das miofibrilas e a produção concomitante de uma cicatriz de tecido conectivo, além de uma

angiogênese no local lesionado (JÄRVINEN et al., 2005; FERNADES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). Já a outra parte da fase de regeneração, a remodelamento, representa o momento de maturação das miofibrilas regeneradas, reorganização do tecido cicatricial e do restabelecimento da capacidade funcional muscular (JÄRVINEN et al., 2005).

2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO MUSCULAR

Para estudar a dinâmica fisiopatológica e as respostas nociceptivas durante as lesões musculares, modelos experimentais utilizando animais têm demonstrado uma grande importância para realização de estudos científicos. Esses modelos permitem uma devida confiabilidade e certa reprodutibilidade aos processos de lesão observados em seres humanos (SOUZA; GOTTFRIED, 2013).

A maioria dos modelos experimentais de lesão muscular utilizou lesão por estiramento através da estimulação elétrica em um determinado grupo muscular com o intuito de contrair esse músculo, associado a um alongamento forçado no sentido contrário à contração (PACHIONI et al., 2009; NAKAZATO et al., 2010; PRATT et al., 2012, SOUZA; GOTTFRIED, 2013). Além disso, foram descritos alguns modelos que utilizam injeção intramuscular de substâncias inflamatória como CFA e carragenina (ASGAR, et al. 1999; RADHAKRISHNAN; MOORE; SLUKA, 2003). Existem ainda modelos que induzem lesão por meio de exercício excêntrico. No entanto, esses modelos promovem lesões majoritariamente de 1º grau, que são de caráter subagudo (ARMSTRONG; OGILVIE; SCHWANE, 1983; KYPAROS; MATZIARI; ALBANI, 2001; ZUO et al., 2018). Um dos modelos experimentais que têm sido utilizados para provocar a lesão direta por contusão muscular, é composto por uma esfera ou massa metálica liberada de uma altura pré-determinada, sobre o ventre muscular do animal, gerando um impacto direto, não penetrante no local (FALCAI et al., 2010; McBRIER, 2009; PUNTEL et al., 2011; MACEDO et al., 2016).

Um dos primeiros estudos a propor um modelo de lesão muscular por impacto direto foi conduzido por Crisco e seus colaboradores (1994). A importância desse estudo se destaca ao criar um modelo mais próximo à contusão muscular por trauma direto, devido a não ser um modelo invasivo, uma vez que até então, a maioria dos estudos utilizavam-se de modelos invasivos com incisão e retração de pele e músculo, portanto dado o caráter invasivo e

penetrante dos modelos, as avaliações histológicas e funcionais do músculo eram limitadas. Crisco et al. (1994), propõem um modelo onde uma esfera metálica de 170g a uma altura de 120cm era liberada diretamente ao ventre muscular do animal. Esse modelo mostrou-se reprodutível e confiável, e apresentou mudanças estruturais e histológicas no tecido muscular, bem como respostas à capacidade funcional do tecido principalmente nos estágios iniciais da lesão.

Alguns anos depois, foi proposto um modelo de lesão também baseado em queda de massa metálica sobre o ventre muscular, porém tal modelo foi readaptado e utilizou um peso de 200g a uma altura de 30 cm (MIAMOTO; BUNHO; SALVINI, 2001; MIAMOTO; GRAZIANO; SALVINI, 1999). Além de modificar o peso da esfera e altura propostos por Crisco et al. (1994), Miamoto et al. (1999) avalia as respostas histológicas e funcionais para uma única contusão e também para seguidas contusões. No modelo que utilizou apenas uma sessão de contusão muscular, as modificações histológicas foram encontradas somente nos estágios iniciais da lesão. Já no modelo que aplicou seguidas sessões de contusão, a lesão apresentou um caráter mais crônico, perdurando por um maior período de tempo e se delongando mais para a recuperação da funcionalidade do músculo.

Um estudo ainda mais recente realizou adaptações no peso e altura desses mesmos modelos de lesão muscular e criou também propostas para o tratamento dessas lesões (FALCAI et al., 2010). Falcai et al. (2010), utilizaram um peso de 250g lançado a uma altura de 30 cm. Posteriormente, investigaram o efeito da laserterapia de baixa intensidade como forma de tratamento à lesão muscular. Esses autores encontraram resultados positivos que demonstraram consideráveis modificações estruturais e funcionais no músculo lesionado. Embora vários estudos tenham investigado, por meio de análises histológicas, o processo de cicatrização e recuperação tecidual do tecido muscular submetido à lesão, bem como, as respostas funcionais em modelos de contusão mecânica, até o presente momento nenhum outro estudo investigou respostas nociceptivas nesse modelo de lesão. Uma vez que a dor é um dos sinais cardinais com maior impacto na percepção e cotidiano do indivíduo é de fundamental importância elucidar tal sintoma em modelos de lesão muscular.

2.4 TRATAMENTO DE LESÕES MUSCULARES

O tratamento ideal para as lesões musculares ainda não está claramente definido e os regimes de tratamento recomendados são em sua maioria conservadores (SHI et al., 2009). O

protocolo padrão para o tratamento de lesões musculares se baseia no princípio conhecido pela sigla PRICE: proteção, repouso, crioterapia, compressão e elevação do membro. Além disso, é muito comum a intervenção farmacoterapêutica com utilização de medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (BAOGE et al., 2012). Entretanto, estudos têm proposto novas alternativas para o tratamento de lesões musculares como exercícios isométricos, isotônicos e isocinéticos (JÄRVINEN et al., 2005), terapia ultrassônica (SHU et al., 2012; MONTALTI et al., 2013), laserterapia (BORATO et al., 2008) e intervenções não farmacológicas utilizando suplementos alimentares e medicamentos naturais (TIPTON, 2015; COOKE et al., 2010).

Embora seja menos recomendado, há também o tratamento invasivo que geralmente é indicado em situações específicas, como quando ocorre o estiramento de mais da metade do ventre muscular (lesão de grau II extensa) ou a presença de um grande hematoma intramuscular com ruptura completa da musculatura (grau III) e culminando na necessidade de intervenção cirúrgica, para diminuir a dor e a perda funcional (JÄRVINEN et al., 2005).

A prevenção às lesões pode ser feita através de exercícios de fortalecimento muscular (TYLER et al., 2002; PULL; RANSON, 2007), embora seja controverso o uso de alongamento, este também pode ser utilizado para diminuir a chances de eventuais lesões dependendo do tipo de atividade ou esporte envolvido (WITVROUW et al., 2004). Os exercícios pliométricos e de equilíbrio também contribuem para evitar lesões e recorrências (ALENTORN-GELI et al., 2009; MARKOVIC; MIKULIC, 2010). Além disso, exercícios que visam a estimular e melhorar a propriocepção muscular do indivíduo também pode ser uma forma de evitar lesões diversas (PORTER; RUSHTON, 2015; POSTLE; PAK; SMITH, 2012; RIVA et al., 2016).

De acordo com o Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM, *American College of Sports Medicine*) o TF desempenha uma função primordial nos programas de atividade física e é recomendado como forma de melhorar a saúde geral e condicionamento físico (ACSM, 2009). As principais indicações para esse tipo de exercício são aumento da força e hipertrofia muscular, melhora de quadros dolorosos como na fibromialgia (HOOTEN et al., 2012), prevenir e tratar lesões esportivas (TYLER et al., 2002; PULL; RANSON, 2007), melhora do humor, autoestima, redução do estresse, depressão e ansiedade (COSTA; SOARES; TEIXEIRA, 2007).

Assim como o TF, a proteína do soro do leite (do inglês Whey Protein) também tem sido demonstrada efetiva em diminuir danos e lesões musculares (SUNDELL; HULMI; ROSSI, 2011). A PSL possui alto valor nutricional, alto teor de aminoácidos essenciais,

especialmente os de cadeia ramificada. Ademais, apresentam alto teor de cálcio e de peptídeos bioativos do soro (HARAGUCH; ABREU; PAULA; 2006).

Há diversos efeitos benéficos da PSL descritos na literatura, tais como: Otimização do reparo e remodelamento tecidual após a lesão (COOKE et al., 2010), auxílio na síntese proteica muscular esquelética (HARAGUCH; ABREU; PAULA; 2006), redução de marcadores de lesão muscular (LOLLO et al., 2014). Além de uma ação hipotensiva, antioxidante, hipocolesterolêmica (KIM et al., 2007; HARAGUCH; CARVALHO-SILVA et al., 2012).

A associação entre o uso de PSL e exercícios de força muscular têm sido exploradas em ensaios clínicos e tem gerado resultados positivos como o ganho de força, otimização do treinamento, melhora do desempenho físico, aumento da massa magra (HARAGUCH; ABREU; PAULA; 2006; CRIBB et al., 2007; BURKE et al., 2001). Um estudo também encontrou que essa associação acelerou a proliferação de células satélites, como parte do processo de regeneração e remodelamento do tecido muscular em humanos (FARUP et al., 2014). Entretanto, não há nenhum estudo que tenha avaliado a influência da ingestão de PSL, bem como sua associação com o TF, no controle da dor induzida por lesão muscular.

2.5 CÉLULAS DA GLIA E A MODULAÇÃO DA DOR

Na presença de lesão tecidual, a resposta ao estímulo nociceptivo ocorre tanto a nível periférico quanto a nível central, principalmente através de uma sensibilização aumentada ao nível do corno dorsal da medula espinal. Além de mediadores e neurotransmissores envolvidos nas sinapses entre os nociceptores periféricos e neurônios de segunda ordem, há um mecanismo envolvendo células do sistema imunológico do SNC que desempenha uma importante função na modulação da dor (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Nesse mecanismo, destaca-se a ação de células gliais.

Acreditava-se que as células gliais no SNC tinha uma função apenas de sustentação, pelo fato de não transmitirem impulso nervoso (PIO-HORTEGA, 2013). Entretanto, com o avanço dos estudos foi demonstrado que tais células são fundamentais para a manutenção da homeostase do SNC, interagindo de forma dinâmica com células neuronais, produzindo diversos neurotransmissores e contribuindo diretamente para a formação da bainha de mielina (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013). As células da glia consistem em três principais grupos

de células: astrócitos, micróglia e oligodendrócitos, sendo que astrócitos e micróglia são as principais células envolvidas na modulação neuroimune da dor (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013).

Em mamíferos, a célula da glia encontrada em maior número no SNC é o astrócito, podendo chegar a uma proporção de 60 a 70% de todas as células e de até 90% dentre as células da glia (TJALKENS; POPICHAK; KIRKLEY, 2017). Os astrócitos são cruciais para manutenção bem como para a função adequada e saudável do SNC, pois fornecem um importante suporte metabólico auxiliando na homeostase dos neurônios (ALLEN; EROGLU, 2017). O processo de desenvolvimento, diferenciação e maturação dos astrócitos é diferente para cada parte do SNC. Entretanto, em mamíferos, a geração dessas células geralmente ocorre em estágios mais avançados da neurogênese (MILLER; GAUTHIER, 2007). A ativação dos astrócitos desencadeia diversas modificações nessas células, podendo ser tanto modificações morfológicas, como hipertrofia e ramificação, quanto modificações na sua função imunorreguladora. Além disso, é importante destacar que um dos marcadores da ativação de astrócitos é o aumento da expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*). Embora existam outros marcadores celulares da ativação de astrócitos, o GFAP tem se demonstrado como o marcador mais consistente em ambos estados, fisiológicos e patológicos (O'CALLAGHAN; SRIRAM, 2005).

A micróglia representa cerca de 10 a 20% das células do SNC, entretanto esse número pode variar bastante e depende de vários fatores, como por exemplo, a região do SNC, uma vez que a distribuição pode modificar de uma localização para outra (LAWSON et al., 1900; PERRY; GORDON, 1991). Dentre outras localidades do SNC, a densidade microglial é particularmente alta no hipocampo e na medula espinal (LAWSON et al., 1900, ZHANG et al., 2008). A origem embrionária da micróglia acontece fora do SNC a partir de células precursoras mielóides e adentram o SNC durante o desenvolvimento embrionário (RANSOHOFF; PERRY, 2009). Embora haja diversas restrições e divergências, a micróglia é apontada por alguns como os macrófagos do SNC, assim como os macrófagos periféricos apresentam ações fagocíticas, e diferentes morfologias dependendo de seus estados fisiológicos (TAVES et al., 2013). Embora, muitos estudos tenham focado no papel da micróglia durante seu estado de ativação, ambos estados, ativado e quiescente, apresentam uma interação dinâmica com as funções e conectividades sinápticas (TREMBLAY et al., 2011). Em estado quiescente, a micróglia apresenta ramificações com comprimento e espessura simétrica, se projetando similarmente pela célula, entretanto, em estados patológicos há modificações morfológicas, caracterizadas pelo desenvolvimento de

ramificações menores, com um maior corpo celular e aparência celular diferenciada (AYOUB; SALM, 2003; MORRISON; FILOSA, 2013). Além disso, em vários modelos experimentais de indução de dor, a diferenciação fenotípica da micróglia é caracterizada pela expressão de alguns marcadores específicos, como por exemplo, o cálcio ionizado adaptador de ligação molécula-1 (Iba-1, *ionized calcium-binding adaptor molecule-1*). Iba-1 é uma proteína de 147 aminoácidos que se liga ao cálcio envolvido no rearranjo dos filamentos de actina presente no citoesqueleto da célula. A ativação glial é marcada pela movimentação celular e ação fagocítica, levando a uma intensa modificação da disposição da actina citoplasmática, portanto levando a um aumento da expressão de Iba-1 (OSHAWA et al., 2000).

Foi demonstrado que mesmo com lesões fora do SNC, há uma ativação de células gliais na medula espinal, de forma a gerar uma sensibilização central a estímulos dolorosos periféricos (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013). Um dos primeiros estudos envolvendo respostas gliais a estímulos inflamatórios periféricos foram realizados utilizando o modelo de nocicepção periférica induzido pelo teste de formalina (FU et al., 1999). No teste da formalina, que é amplamente conhecido e estabelecido como um modelo de dor inflamatória, a formalina (5%) é injetada via subcutânea na pata do animal. Desse modo, os autores observaram que após a injeção da formalina houve ativação glial na medula espinal (demonstrado através do aumento de sinais imunorreativos de marcadores de micróglia), iniciando no primeiro dia e com um pico no sétimo dia após a injeção (FU; LIGHT; MAIXNER, 2000). Além disso, foi demonstrado que a aplicação de um anestésico local, mesmo bloqueando as respostas comportamentais associadas a dor, não foi capaz de inibir a ativação glial induzida pela formalina. Portanto, mesmo que haja uma redução do estímulo nociceptivo, através da aplicação de um anestésico local, ainda assim a resposta inflamatória gerada perifericamente é capaz de desenvolver uma ativação glial (FU; LIGHT; MAIXNER, 2000).

Embora os estudos tenham avançado consideravelmente na compreensão da participação das células da glia na modulação da dor inflamatória, pesquisas recentes têm desvendado mecanismos envolvendo suas alterações fenotípicas e o aumento da transmissão no sinal nociceptivo ainda estão a ser investigados (GUAN; HELLMAN; SCHUMACHER, 2016). Entretanto, até onde podemos dizer, nenhum outro estudo demonstrou uma participação de células gliais em modelos de contusão muscular, tão pouco se investigou o efeito do TF e da ingestão de PSL na inibição dessas células e redução da dor muscular.

3 OBJETIVOS

Abaixo estão descritos os objetivos deste trabalho.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito do treinamento de força associado ou não à suplementação com a pretína do soro do leite, no controle da dor muscular em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar o efeito do TF e da suplementação com PSL, de forma isolada e combinada, sobre a lesão muscular, temperatura muscular e padrões de marcha;
- b) Avaliar o envolvimento de astrócitos e micróglia durante a dor muscular induzida pelo trauma;
- c) Investigar o efeito do TF e da ingestão de PSL, de forma isolada e combinada, sobre a participação de astrócitos e micróglia durante a dor muscular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) / Minas Gerais/ Brasil, sob os protocolos n°: 019/2018 e n°: 661/2015 (ANEXO). Seguem abaixo os materiais e métodos utilizados no estudo.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), de 7 semanas, com peso entre 220 a 250 g, provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL. Após atingirem o peso desejado, os animais foram direcionados para o Biotério da UNIFAL - Campus Santa Clara, e mantidos sob condições padrões de temperatura (22,1 °C), ciclo claro/escuro (12 h/12 h) e umidade de 65 %, com livre acesso a ração e água até o início de cada experimento. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, sendo 6 animais por caixa. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL (CEUA).

4.2 MODELO DE LESÃO MUSCULAR

Para realizar a indução da dor muscular, foi utilizado um modelo de lesão muscular por impacto mecânico, adaptado de Falcai et al. (2010) (figura 4). Este modelo consiste na lesão por contusão causada pela queda de uma massa metálica sobre o músculo gastrocnêmio da perna direita do animal. Para a indução da lesão, foi utilizado um aparato, que apresenta duas hastes fixas laterais e uma haste condutora do peso centralizado entre as hastes laterais (figura 4). O peso é composto de um pêndulo de aço inox, pesando 250g e de ponta arredondada, que é suspenso por dentro da haste condutora a uma altura de 30cm, ficando preso por um fio de nylon, que é liberado pelo experimentador, se chocando com a perna do animal (figura 4). Antes de serem submetidos ao protocolo de lesão os animais são anestesiados com Cetamina (CEVA®, Brasil) (12 mg/kg) e Xilazina (CEVA®, Brasil) (1

mg/kg), administradas por via intraperitoneal (i.p.). Logo em seguida, os animais são posicionados em decúbito lateral no qual a face interna da perna posterior direita do animal fique direcionada para cima, posicionada no exato local onde cairá o peso de metal. Sendo assim, o animal é posicionado e o cordão de nylon é puxado e dessa maneira o peso fica suspenso, então o cordão é liberado e o peso cai sobre o músculo do animal (figura 4). Os animais são monitorados até o fim do efeito anestésico e então são redirecionados ao biotério de manutenção.

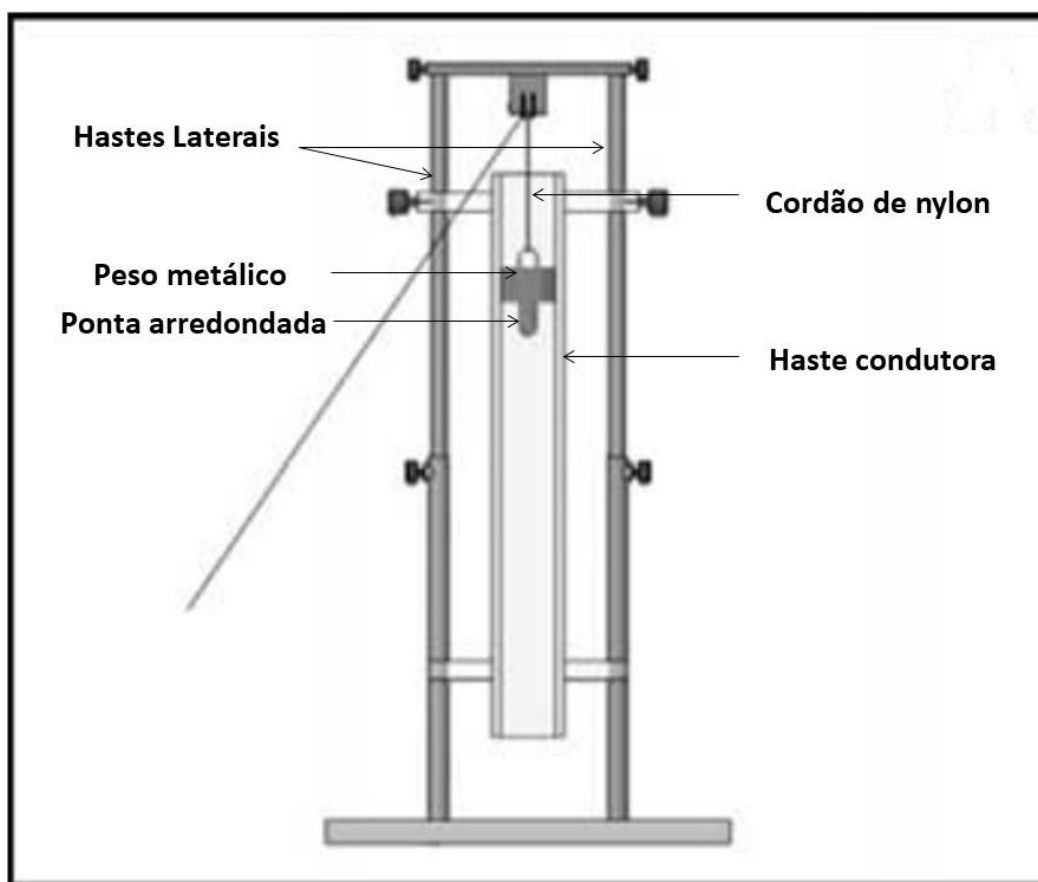


Figura 4 - Aparato de Lesão Muscular

Fonte: Adaptado de Falcai et al., 2010.

Nota: O aparato conta com duas hastes laterais e um tubo condutor ao centro. Dentro do tubo condutor fica posicionado o peso, dessa forma o tubo condutor tem a função de guiar e direcionar a queda do peso, para que assim a ponta arredondada tenha sempre o mesmo local de contato ao cair. É utilizado um cordão de nylon para suspender o peso no ar, e quando o cordão é liberado o peso cai diretamente em um ponto demarcado.

4.3 PROTOCOLO DE TF

O TF muscular utilizado no presente estudo foi baseado no modelo proposto por Tamaki *et al.* (1992). O exercício é realizado em um aparato constituído de madeira que possui uma superfície plana de aproximadamente 50 x 60 cm, a qual se encontra fixada um eixo na posição vertical articulado a uma alavanca horizontal móvel de 35 cm de comprimento (figura 5, item 2), que tem em sua outra extremidade um colete de couro (figura 5, item 1) através do qual o animal é contido em posição ortostática com os membros inferiores flexionados. Na parte superior dessa alavanca encontra-se uma haste onde são colocados os respectivos pesos (figura 5, item 3), que correspondem à carga do aparelho imposta ao animal. Após a realização do movimento, a alavanca é apoiada a um amortecedor de segurança (adaptada pelos autores) 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 com intensidade de 3,0 V, 0,3 s de duração e dois segundos de intervalo é aplicado à cauda do animal, promovido pelo aparelho NEURODYN II (IMBRAMED, Brasil) (figura 5, item 5). Os animais executaram três séries de dez levantamentos com pausa de dois minutos entre as séries, durante três dias na semana, por duas semanas.

Uma semana antes de iniciarem o TF, os animais foram adaptados ao aparato (PANVELOSKI-COSTA *et al.*, 2012). No primeiro dia eles foram adaptados somente à contenção por meio do colete. Posteriormente, no segundo dia eles realizaram o movimento de levantamento de peso sem a utilização de carga, recebendo um estímulo elétrico baixo (1 Hz, com duração 0,3 segundos), e do terceiro dia até o dia do protocolo de lesão foi adicionada uma carga de peso baixa para adaptação dos animais.

Antes de iniciar o protocolo de TF, cada animal foi submetido ao teste de repetição máxima (RM), com objetivo de avaliar a carga máxima imposta ao animal, a qual foi utilizada como referência para prescrição do respectivo protocolo. Esse teste operacionalmente é definido como a maior carga que pode ser movida por uma amplitude específica de movimento uma única vez e com execução correta (PEREIRA; GOMES, 2003). O RM foi realizado antes do início do protocolo e no final da primeira semana foi reaplicado para utilização como referência para a segunda semana de treinamento, pois geralmente existe um ganho de força durante o treinamento. A partir do peso alcançado no teste de RM foi utilizado como referência de peso máximo alcançado (100%), e posteriormente foram utilizadas as porcentagens referentes à prescrição do treino. Na primeira semana foi realizado o protocolo

de TF no 3º, 5º e 7º dia após a lesão, onde foram utilizadas as cargas de 30% do RM no 3º dia, 40% do RM no 5º dia e 50% do RM no 7º dia. Na segunda semana de treinamento foi realizado o protocolo de TF no 10º, 12º e 14º dia após a lesão, onde foram adotadas as cargas de 60% do RM no 10º dia, 70% do RM no 12º dia e 80% do RM no 14º dia.

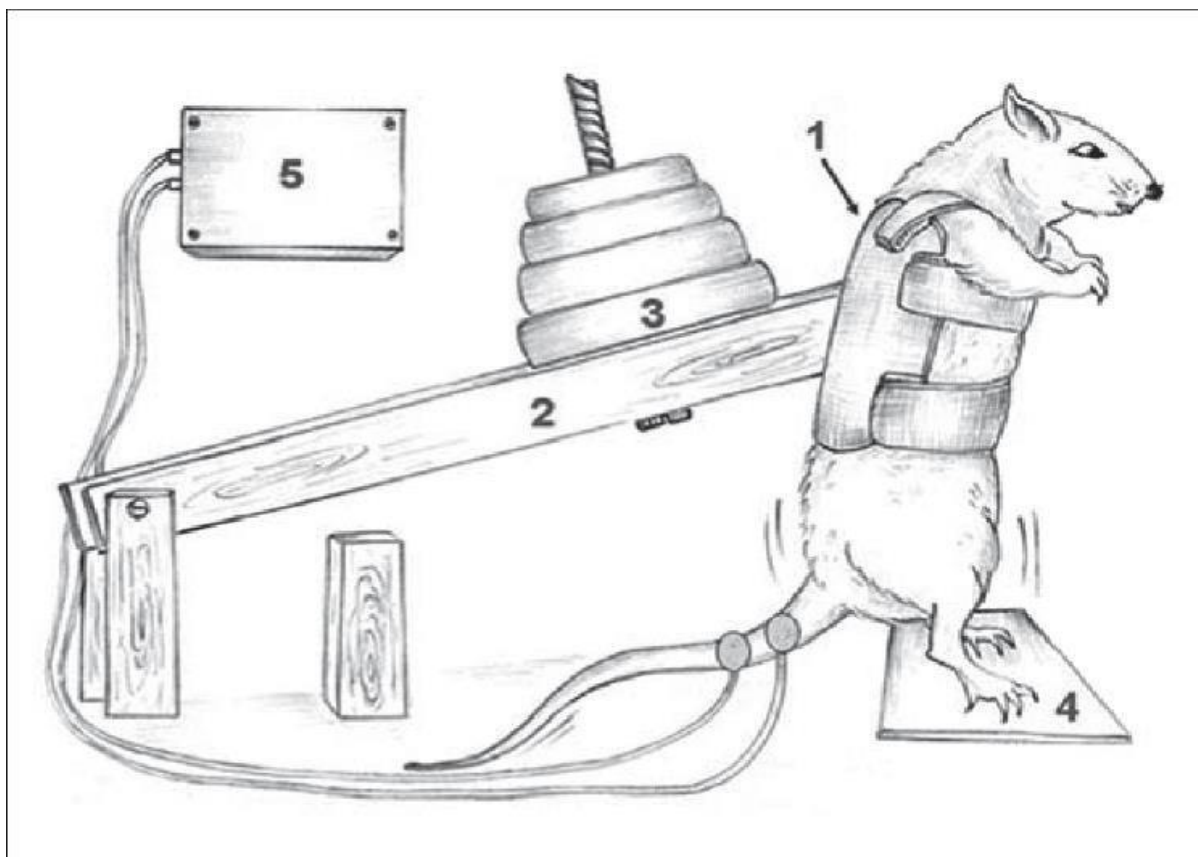


Figura 5 - Aparato do Treinamento de Força

Fonte: Aguiar,2010, adaptado de Tamaki1992

Nota: O animal é colocado no colete de contenção (Item 1), que fica afixado a uma alavanca apoiada a um eixo fixo (Item 2). O peso é colocado sobre uma haste modulando a carga do exercício (Item 3). Os animais ficam com os pés apoiados em uma plataforma de madeira (Item 4). E para a realização do exercício é aplicado um estímulo elétrico na cauda do animal (Item 5).

4.4 DOSAGEM DE LACTATO

Para a dosagem de lactato foi utilizado o lactímetro digital Accutred Plus™ (Roche, Suíça). O aparelho possui considerável confiabilidade e aplicação tanto para prática clínica quanto para pesquisa (BALDARI et al., 2009). Para a dosagem, os animais foram devidamente contidos para coleta do sangue, para isso foi utilizada uma agulha 13 x 0,3 mm para realizar um pequeno furo na ponta da cauda do animal permitindo a retirada de algumas

gotas do sangue capilar. O sangue coletado foi aplicado diretamente a uma fita de análise do aparelho e a leitura era realizada em 60 segundos.

A primeira coleta foi realizada 3 dias após a lesão com os animais em repouso para avaliar a medida basal (MB) antes de iniciar o protocolo de treinamento. Posteriormente, foram realizadas mais duas coletas, com os animais em estado de pós-exercício, uma no final da primeira semana de treinamento (7º dia após lesão), e outra no final da segunda semana de treinamento (14º dia após lesão). As coletas pós-exercício foram realizadas 3 minutos após o final da 3ª série da última sessão de cada semana. Dessa maneira, na primeira semana os animais realizaram o protocolo de TF no 7º dia após lesão com 50% do RM, e 3 minutos depois da última série de exercícios o sangue foi coletado e o lactato sanguíneo foi mensurado. Da mesma forma, na segunda semana de treinamento, os animais realizaram o protocolo de TF no 14º dia após a lesão com 80% do RM, e 3 minutos depois da última série de exercícios o sangue foi coletado e o lactato sanguíneo foi mensurado. Sendo assim, as coletas foram realizadas com o intuito de avaliar a intensidade do TF ao final de cada semana (PANVELOSKI-COSTA et al., 2012).

4.5 SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNA DO SORO DO LEITE

Os animais durante todo o protocolo tiveram livre acesso à água e comida. Além da alimentação normal dos animal foi realizada a administração de PSL diariamente durante as duas semanas concomitante ao protocolo de TF. Os grupos tratados que foram submetidos à intervenção nutricional receberam uma suplementação alimentar com a proteína do soro do leite hidrolisada Alacen 895® (NZMP, EUA), via gavagem oral (Tabela 1). A gavagem foi realizada no volume de aproximadamente 1ml/kg, na concentração 1g/kg (KATO, 2016).

Aminoácidos	Quantidade a cada 100g
Aminoácidos Essenciais	
Isoleucina	6,2g
Leucina	14,0g
Lisina	11,1g
Metionina	2,9g
Fenilalanina	3,8g
Treonina	5,0g
Triptofano	2,4g
Valina	5,7g
Aminoácidos Não Essenciais	
Histidina	2,1g
Alanina	5,9g
Arginina	2,8g
Ácido Aspártico	11,6g
Cisteína	3,8g
Ácido Glutâmico	18,2g
Glicina	1,8g
Prolina	4,6g
Serina	3,9g
Tirosina	4,2g

Tabela 1 - Composição do suplemento

Fonte: NZMP

Nota: Destacada a composição da PSL, referente uma porção de 100 gramas. Estão destacadas as concentrações de aminoácidos essenciais e não essenciais.

4.6 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO

Para realizar a avaliação do limiar nociceptivo os animais foram alocados sobre uma plataforma suspensa, contendo caixas de vidro transparente fumê, e uma tela de metal na parte inferior. Os animais eram mantidos um a um dentro das caixas de vidro para aclimação,

durante 30 minutos, antes de iniciar a experimentação. Foi utilizado um analgesímetro digital modelo *Von Frey* (Insight Instrumentos, Ribeirão Preto, Brasil), o qual se utiliza de haste metálica que apresenta em sua extremidade distal uma ponteira de plástico rígido de 0,8mm de diâmetro. Uma célula de carga é utilizada como um transdutor de força anexado a ponteira de plástico rígido. Dessa maneira toda vez que uma força é aplicada sob a ponteira o sistema eletrônico permite que os resultados sejam registrados no leitor digital. O sistema mensura, grava e exibe no *display* os dados do teste em gramas, de acordo com a pressão aplicada, com até 0.1g de precisão (TENA et al., 2012). Os animais eram alocados em caixas de vidro sobre uma tela de metal em plataforma suspensa. Os pequenos espaços da tela de metal permitiam a exposição e acesso à região plantar das patas dos animais. Portanto, a ponteira de plástico do aparelho de Von Frey eletrônico era utilizada para aplicar uma pressão de forma constante e gradual, sob a região plantar da pata posterior direita do animal, de modo a levantar a pata do animal da tela. Quando o animal percebia o estímulo doloroso apresentava uma resposta de retirada da pata, seguida ou não de uma lambida ou de um leve chacoalhar. Uma vez que o animal realizava a resposta de retirada da pata, o aparelho de Von Frey eletrônico registrava a força, em gramas, da pressão que havia sido aplicada a pata do animal, podendo então determinar qual foi o limiar de retirada da pata do animal. Essa medição foi feita três vezes consecutivas em cada animal e a média das medidas foi adotada como o limiar nociceptiva do animal. Todas as mensurações foram realizadas pelo mesmo experimentador. Também foi utilizado um protocolo de avaliação às cegas, onde o experimentador não distinguia o grupo ao qual o animal pertencia.

4.7 ANÁLISE DE MARCHA

Modelos de análise da marcha em filmagens têm sido utilizado para monitorar as mudanças da marcha após as lesões que geram quadros inflamatórios e dolorosos (FU et al., 2009). Diversos padrões e variáveis relacionadas à marcha dos animais podem ser analisadas através da filmagem (VAREJÃO et al., 2002).

O aparato que foi utilizado para análise da marcha é composto de uma plataforma suspensa, com um corredor de vidro de 120 cm de comprimento (sendo 100 cm de área transparente aberta e 20 cm de área escura coberta), altura de 15 cm e largura de 10 cm de comprimento apoiado no centro de uma estrutura metálica de suporte de 77 cm de altura e 55 cm de largura. Além disso, o aparato contém um espelho na parte inferior do corredor de

vidro posicionado a 45°, que permite a filmagem da região plantar da pata do animal (Figura 6).

Esse equipamento foi posicionado a 100 cm de distância de uma câmera fotográfica digital HD (Nikon COOLPIX P600, São Paulo, Brasil) que foi utilizada para filmar a movimentação dos animais ao longo da plataforma (VAREJÃO et al., 2002). Após ter sido gravado o deslocamento dos animais na plataforma, os registros de filmagens foram transferidos para um cartão de memória e armazenados em computador para futura análise.

Durante uma semana, previamente às aquisições de imagens da marcha, os animais foram aclimatados no aparato, com o intuito de diminuir o estresse e os comportamentos exploratórios (VAREJÃO et al., 2002). Logo em seguida e previamente as análises, os animais tiveram seus pelos tricotomizados em toda extensão lateral dos membros inferiores utilizando um tosador elétrico para facilitar a exposição de alguns os pontos anatômicos (terço proximal da tíbia e articulação com o joelho direito e maléolo lateral direito) da perna direita, os quais foram marcados com tinta preta e utilizados durante a análise da marcha (FU et al., 2009; VAREJÃO et al., 2002).

Para avaliação foi utilizado o *software* KINOVEA (Patreon, França) que permite a captura automática das filmagens. Além disso, o *software* fornece uma amplificação da imagem, redução da velocidade de execução dos vídeos e análise da imagem pausada podendo realizar o cálculo de ângulos, distâncias e tempo de cada passo realizado pelo animal. Durante a análise, foi avaliado os padrões de marcha sobre um plano lateral, onde foi possível verificar a amplitude articular do movimento de acordo com os pontos anatômicos demarcados. A variável referente à amplitude articular, levou em consideração a fase de apoio da pata contralateral, ou seja, o momento em que a pata ipsilateral está em fase de balanço, e isso demanda um maior esforço do lado lesionado. Foi avaliado também, o plano ventral onde foi possível avaliar a área de contato plantar da pata do animal com a plataforma de vidro. Para isso foi utilizado um índice determinado pela média da distância entre a 1ª e 5ª falange da pata contralateral, e a distância entre a ponta da terceira falange e a última parte da área plantar da pata do animal que entrou em contato com a plataforma de vidro. Esse cálculo equivale à determinação da área de um losango pela fórmula $A=D.d/2$.



Figura 6 - Plataforma de Marcha

Fonte: Marcelo Silva de Carvalho.

Nota: A imagem ilustra a plataforma na qual foi realizada a filmagem para futuras análises da marcha dos animais.

4.8 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA

A termografia é uma ferramenta não invasiva e indolor que utiliza da captação e interpretação da emissão de raios infravermelhos para a avaliação de temperatura (JIANG et al., 2005). Essa ferramenta vem assumindo cada vez mais relevância e aplicação no contexto clínico e experimental, sendo capaz de analisar a temperatura superficial da pele (SANCHIS-SÁNCHEZ et al., 2014). A temperatura superficial da pele é um fator importante para a fisiologia humana já que serve também como indicador da presença de alguma disfunção, tal como inflamação. Além disso, a avaliação da temperatura tem sido utilizada como indicador de lesão tecidual, já que o aumento ou diminuição do fluxo de sangue pode levar a alterações de temperatura (RING; AMMER, 2012). As lesões musculares apresentam uma variação

térmica localizada que provocam um aumento da temperatura local, dessa forma a termografia pode ser utilizada como método de apoio ao diagnóstico no grau de lesão muscular (BANDEIRA et al., 2014).

As câmeras termográficas tem a capacidade de obter por meio de sensores a radiação infravermelha emitida pelo corpo e transformá-la em sinais elétricos. Esses sinais são processados em imagens que podem ser interpretados em um computador, tornando possível a mensuração com acurácia da temperatura da superfície dos corpos (KASTBERGER; STACHL, 2003; JIANG et al., 2005). A termografia vem sendo utilizada na avaliação da dor, da inflamação, (JIANG et al., 2005) bem como nas lesões desportivas (JIANG et al., 2005; BANDEIRA et al., 2014).

Para a realização da aquisição das imagens termográficas foi utilizada a câmera FLIR modelo E60 (FLIR, USA). Previamente a avaliação, os animais foram sedados com Cetamina (CEVA®, Brasil) (12 mg/kg) e Xilazina (CEVA®, Brasil) (1 mg/kg), e assim que tinham suas respostas motoras inibidas, foram posicionados e a imagem termográfica foi realizada de imediato. Durante a realização das fotos os animais foram alocados dentro de uma caixa de madeira com um revestimento interno que mantinha a superfície onde o animal era colocado com a mesma temperatura ambiente (23°C, controlada por ar condicionado). Para a aquisição das imagens os animais foram posicionados em decúbito dorsal com a face medial da perna voltada para cima, dessa forma foi possível fotografar a parte da perna onde foi realizada a lesão bem como a mesma parte da perna contralateral. Ambas as pernas foram tricotomizadas de modo a não haver interferência do pelo do animal sobre a análise da temperatura. Para a realização das fotos, a câmera foi ajustada a uma posição fixa a uma distância de 30 cm do animal e um ponto fixo da câmera era utilizado para padronização das imagens.

4.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os animais foram sacrificados com *overdose* de Cetamina (CEVA®, Brasil) e Xilazina (CEVA®, Brasil) e em seguida parte do músculo lesionado foi retirado de cada animal e fixados em solução de paraformaldeído tamponado (pH= 7,2) a 4% preparado em tampão fosfato 1M. Os tecidos foram desidratados em série concentração crescente de etanol (70% - 100%) e incluídos em resina histológica de glicolmetacrilato (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Em cada bloco, foram retirados 4 cortes histológicos de 3 µm de

espessura em micrótomo rotativo com o auxílio de navalhas de vidro. Cada corte foi retirado com uma diferença de 60µm entre um e outro, para evitar a análise da mesma área histológica. Em seguida os cortes foram montados em lâminas histológicas de vidro e posteriormente corados com hematoxilina (1 hora), e fucsina básica (1 minuto) e posteriormente colados com cola transparente a uma lamínula de vidro (NOVAES et al., 2013).

Em cada corte histológico foram capturadas 5 imagens por meio de uma câmera fotográfica digital (DsFi1, Nikon, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio óptico (Eclipse 80i, Nikon, Tóquio, Japão). As imagens foram obtidas com a objetiva de 40× por meio de programa de captura de imagens (NIS-Elements, Nikon, Tóquio, Japão). Na análise histopatológica foi inicialmente realizada uma análise qualitativa, verificando características gerais do tecido como áreas de necrose celular, tamanho e integridades dos miócitos, presença de fibrose, dentre outras. Além disso, foi realizada uma análise através da contagem de células inflamatórias.

A inflamação dos miócitos foi avaliada pelo método estereológico. O número de núcleos celulares na área de teste (QA_{inf}) foi determinado por meio de um *software* de análise de imagens Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, Maryland, EUA). O número de núcleos celulares por unidade de área (células / mm²) foi determinado pela relação $QA_{inf} = \Sigma f_o / A_t$, onde Σ / A representa somatório do número de perfis de núcleos de células na área de teste, e A_t corresponde dimensão da área de teste (NOVAES et al., 2013).

4.10 DROGAS UTILIZADAS NO ESTUDO

Para a investigação da participação das células da glia no modelo de dor muscular foi realizado um teste farmacológico onde foram utilizadas as seguintes drogas Minociclina (SIGMA®, EUA) inibidor de micróglia, diluída em solução salina estéril (0,9%) nas doses de 100 µg e 200 µg no volume de 10µL por via intratecal. Fluorocitrato (INVIVOGEN®, EUA): Inibidor de astrócitos, diluído em solução salina estéril (0,9%) nas doses de 1,0 nmol e 2,0 nmol no volume de 10 µL por via intratecal. Para os grupos controle foram administrados o veículo de salina estéril (0.9%) em volume de 10µL.

4.11 VIA DE ADMINISTRAÇÃO

Todas as drogas foram administradas por via intratecal (i.t.). Para que o teste fosse padronizado e houvesse administração correta das drogas, foi realizado treinamento prévio da administração de 5µL de lidocaína 2% (DENSPLY PHARMACEUTICAL®, Japão) e a paralisia dos membros posteriores era considerada uma administração correta. Primeiramente os animais foram tricotomizados e anestesiados com Isoflurano 2% (CRISTÁLIA®, Brasil) e O₂ (2 L/min), através de um vaporizador calibrado em seguida os animais foram posicionados em decúbito ventral de uma forma que se facilita o reconhecimento dos espaços intervertebrais. A injeção de 10µL da droga ou veículo utilizado foi feita no espaço subaracnóide entre a quarta e quinta vértebra lombar após a verificação de um reflexo da cauda (*Flinch*) quando a agulha (13 x 0,3 mm) era inserida (HYLDEN; WILCOX, 1980).

4.12 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IBA-1 E GFAP ATRAVÉS DO ENSAIO DE WESTERN BLOT

O ensaio molecular de western blot foi utilizado para investigar o efeito do o TF e da suplementação com PSL sobre a ativação de astrócitos e micróglia espinal. Para isso, foi avaliada a expressão de Iba-1 (Marcador de células microgliais) e GFAP (marcador de astrócitos). Para tal, foi utilizado tecido medular da região lombar (Segmentos L4-L6) coletados após 14 dias de intervenção com TF e PSL e seus grupos controle. Para a coleta de tecidos, os animais receberam uma “*overdose*” Cetamina (CEVA®, Brasil) e Xilazina (CEVA®, Brasil) e em seguida foram decapitados e os tecidos foram retirados e mantidos em um biofreezer a -80°C até o dia do experimento.

Para o experimento, os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo Turrax (MARCONI®, Brasil), adicionados em uma solução contendo tampão RIPA de lise e um “*cocktail*” de inibidores de proteases (SIGMA®, Brasil). Então, foi utilizada a proporção de aproximadamente de 0,04 g de tecido medular (região lombar) para 200 µl de tampão de lise enriquecido. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos e 4°C e o sobrenadante foi aliquoteado em tubos de polipropileno (1,5 ml, EPPENDORF® Brasil) e armazenados em um *biofreezer* a -80°C para posterior utilização.

Posteriormente, as amostras foram então diluídas em tampão de amostra (4X TRIS HCl/SDS pH=6.8, 3% Glicerol, 1% SDS, 10% β -mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) e fervidas em banho-maria a 95°C por 5 minutos. Para o gel de separação, foi utilizado poliacrilamida em concentração de 10% para a marcação de GFAP e 15% para a marcação de Iba1. Foram utilizados 70 μ g de proteína de cada amostra no gel de separação para que então fossem submetidas à eletroforese por meio do aparato Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BIO-RAD®, EUA), com corrente de 120 V durante todo o processo. Após o processo de separação e corrida no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (MILLIPORE®, USA) com poro de 0,45 μ m de diâmetro, por meio do sistema semi-seco Trans-Blot Turbo (BIO-RAD®, EUA). A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em solução TBS-Tween (TBST) até que a solução Ponceau fosse eliminada e colocada em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado e 0,1% de BSA), por 7 horas, para a marcação de Iba-1 anti-rat e de GFAP anti-rabbit. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por cinco minutos (por cinco vezes) e incubada *overnight* com o anticorpo primário específico: Anti-GFAP (PA1239 BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY®, EUA) na concentração de 1:500 e anti-Iba-1 (016-20001 WAKO®, EUA) na concentração de 1:500. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T por 5 minutos (por cinco vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário na concentração 1:2000 anti-mouse IgG-HRP (A9044 Sigma-Aldrich®, EUA), para a marcação de GFAP e o anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004 Sigma-Aldrich®, EUA) na concentração 1:2000 para Iba1. A β -actina (A2228 Sigma-Aldrich®, EUA) na concentração 1:3000 foi utilizada como controle interno da reação. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (cinco minutos por cinco vezes). Então, as bandas de interesse, Iba-1 17 kDa, GFAP 49 kDa e β -actina 41 kDa e foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (kit ECL Clarity™ BIO-RAD®, EUA) de acordo com a intensidade da densidade óptica de imunorreatividade e analisadas pelo *software* ImageLab (BIO-RAD®, EUA).

4.13 DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Primeiramente foi realizado um estudo piloto para avaliar o efeito hiperalgésico do modelo de dor causado por lesão muscular. No teste piloto foi utilizado apenas o grupo de

animais lesionados e o grupo de animais controle, sendo avaliada a hiperalgesia muscular por meio do teste de Von Frey eletrônico durante 21 dias. Inicialmente foi realizada uma medida basal do limiar nociceptivo e posterior foram realizadas medidas a cada 2 dias, sendo os valores monitorados e as avaliações foram realizadas até o limiar nociceptivo dos animais lesionados retornar aos níveis basais. Foram avaliados também os parâmetros referente à marcha, termografia e histologia dos tecidos no 1º, 8º, 15º e 21º dia após a lesão. Posteriormente os dados referente à marcha, termografia foram correlacionados aos dados referente ao limiar nociceptivo dos respectivos animais (Figura 7).

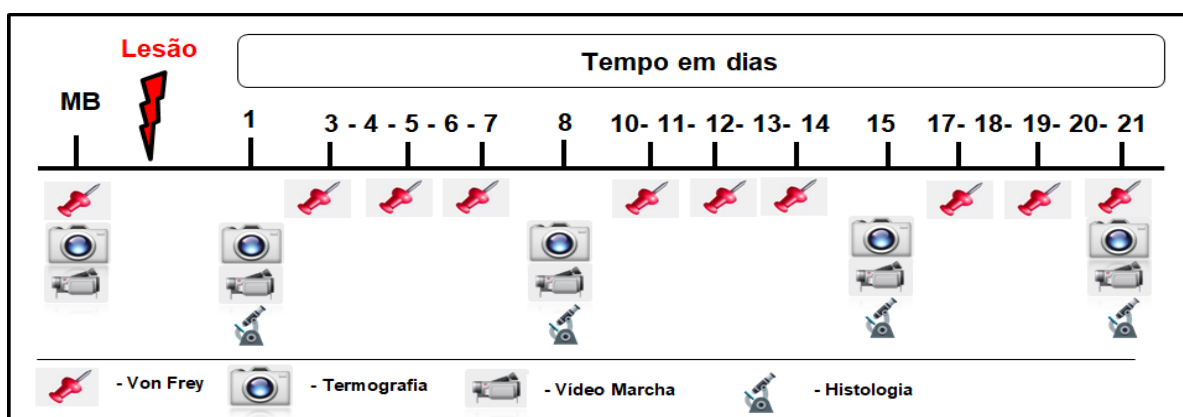


Figura 7 - Cronograma do Experimento Piloto

Fonte: Do autor (Fonte ícones: WhatsApp®).

Nota: A sigla MB: Medida Basal. Os ícones ilustram os procedimentos que foram realizados em cada dia durante o experimento piloto. A legenda abaixo da figura descreve o que cada ícone representa.

Após ter verificado os dias de maior resposta hiperalgésica, foi realizado um protocolo de duas semanas de intervenções com o TF e PSL. O protocolo de TF e suplementação com a PSL foram realizados de forma isolada e também foi utilizado um grupo que incluía ambos TF e PSL. O TF foi realizado no 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º dias após a lesão. A intervenção com a PSL foi iniciada 24h após o protocolo de lesão, administrada diariamente por meio de gavagem oral. A análise termográfica e da marcha foram realizadas antes da lesão e nos dias 1º, 8º e 15º após a lesão. Foi realizado um teste de RM (para determinar a prescrição de carga para o treino) antes da lesão, no 2º e no 9º dia após a lesão.

Após concluir as intervenções e análises foram coletados os tecidos para posteriores análises histológicas e moleculares.

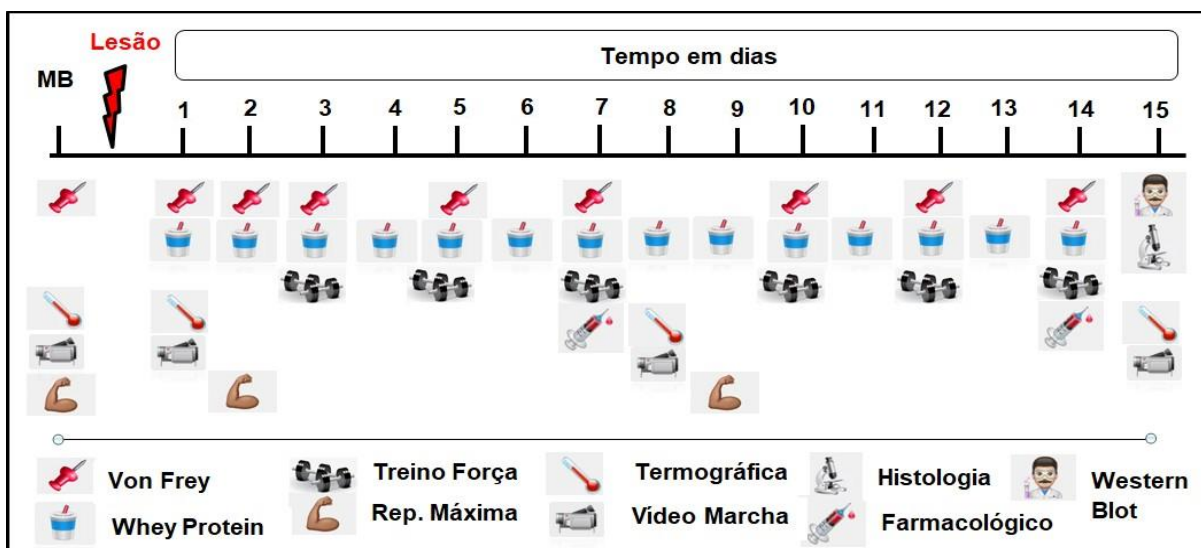


Figura 8 - Cronograma do Experimento

Fonte: Do autor (Fonte ícones: WhatsApp®).

Nota: A sigla MB: Medida Basal. Os ícones ilustram os procedimentos que foram realizados em cada dia durante o experimento. A legenda abaixo da figura descreve o que cada ícone representa.

Para a realização dos protocolos experimentais, os animais foram divididos nos entre os grupos Controle (n=6) que foi constituído por animais que não foram submetidos ao protocolo de lesão e nem às intervenções com TF e PSL. C+PSL (Controle+Proteína do soro do leite, n=6) constituído por animais que não foram submetidos ao protocolo de lesão, receberam a suplementação com PSL e não realizaram o TF. C+TF (Controle+Treinamento de Força, n=6) constituído por animais que não foram submetidos ao protocolo de lesão, realizaram o TF e não receberam a suplementação de PSL. C+PSL+TF (Controle+Proteína do Soro do Leite+Treinamento de Força, n=6) constituído por animais que não foram submetidos ao protocolo de lesão, receberam a suplementação com a PSL e realizaram o TF. Lesão (n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão, mas não receberam a suplementação de PSL nem realizaram o TF. L+PSL (Lesão+PSL, n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão, receberam a suplementação com PSL mas não realizaram o TF. L+TF (Lesão+Treinamento de Força, n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão, realizaram o TF mas não receberam a suplementação de PSL. L+PSL+TF (Lesão+ Proteína do soro do leite +Treinamento de Força, n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão, receberam a suplementação de PSL e também realizaram o TF. Todos os grupos passaram por uma avaliação inicial (MB) e reavaliações após o protocolo de lesão ao longo de duas semanas.

Para o estudo farmacológico que investigou o envolvimento de micróglia e astrócitos espinais no modelo de dor muscular proposto pelo presente estudo, foram utilizados 5 grupos

para cada droga utilizada, Minociclina (inibidor de microglia) e Fluorocitrato (Inibidor de Astrócitos): Para a Minociclina foram utilizados os grupos, C+Veh (Controle +Veículo n=6) constituído por animais que não foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração do veículo da droga minociclina. C+Mino (Controle + Minociclina n=6) constituído por animais que não foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração da droga minociclina. L+Veh (Lesão + Veículo n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração do veículo da droga minociclina. L+Mino(100µg) (Lesão + Minociclina 100µg, n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração da droga minociclina na dose de 100 µg. L+Mino(200µg) (Lesão + Minociclina 200 µg n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração da droga minociclina na de 200 µg.

Para fluorocitrato foram utilizados os seguintes grupos C+Veh (Controle +Veículo n=6) constituído por animais que não foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração do veículo da droga Fluorocitrato. C+Fluo (Controle + Fluorocitrato n=6) constituído por animais que não foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração da droga Fluorocitrato. L+Veh (Lesão + Veículo n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração do veículo da droga Fluorocitrato. L+Fluo (1 nmol) (Lesão + Fluorocitrato 1 nmol, n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração da droga Fluorocitrato na dose de 1 nmol. L+Fluo (2 nmol) (Lesão + Fluorocitrato 2 nmol n=6) constituído por animais que foram submetidos ao protocolo de lesão e receberam a administração da droga Fluorocitrato na dose de 2 nmol.

O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado antes do protocolo em uma medida basal (MB) e 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas, 7 horas, 24 horas e 48 horas após a administração das drogas, tanto para grupos de animais com 7, quanto para 14 dias de lesão, com o intuito de investigar a participação de cada célula em um processo intermediário e mais tardio da dor muscular.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O valor amostral foi calculado pela fórmula $n = ((Z_{\alpha/2} \sigma) / e)^2$. Os dados coletados das avaliações e reavaliações foram agrupados em um banco de dados, utilizando-se o aplicativo Microsoft Office Excel (2010) e analisados pelo *software* estatístico GraphPad Prism 6.0.1. Os resultados foram apresentados como a média \pm Erro padrão da média (E.P.M.). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizados testes paramétricos para a análise de variância de duas vias (ANOVA- *Two way*) e análise de variância de uma via (ANOVA- *One way*). Posteriormente, a análise dos dados passou pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Para a análise de correlações foram utilizados os testes de Correlação de Pearson e regressão linear simples. Para todos os testes foi considerada uma diferença estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 INVESTIGAÇÃO DO PROTOCOLO DE LESÃO MUSCULAR SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO

Inicialmente, como descrito no item 4.13, foi realizado um estudo piloto para a padronização do modelo lesão muscular e da avaliação do limiar nociceptivo. O gráfico 1 demonstra que os animais submetidos ao protocolo de lesão muscular apresentaram uma redução do limiar nociceptivo após o 3º dia, atingindo uma maior redução no 7º dia. A hiperalgesia mecânica permanece significativa até o 14º dia ($p < 0,001$ $F_{1,8} = 33.78$) e a partir do 17º dia após lesão não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa comparada aos animais controle, retornando próximo aos valores basais (Gráfico 1).

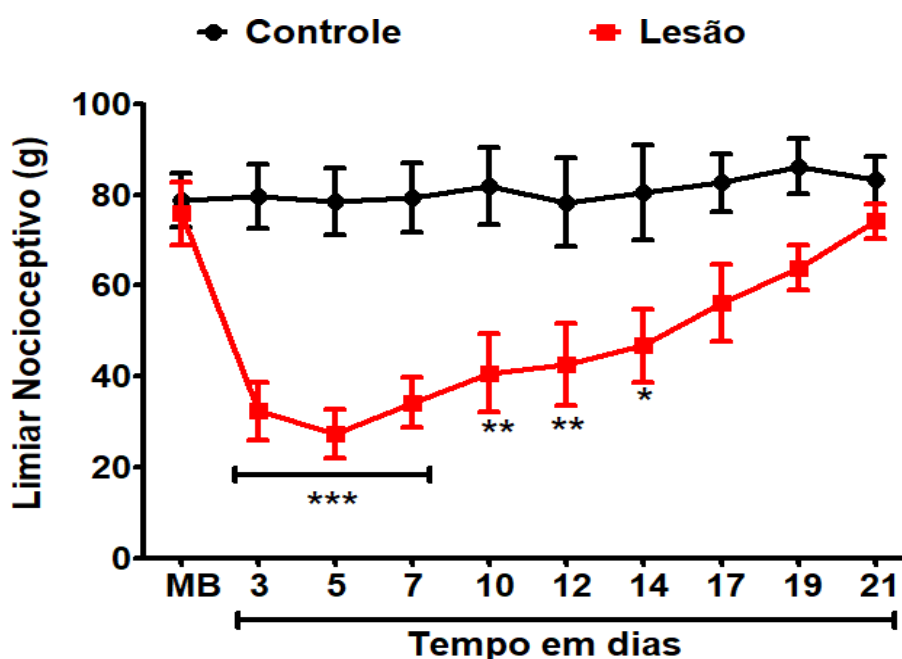


Gráfico 1 - Avaliação do Limiar Nociceptivo pelo Teste de Von Frey Eletrônico em Animais Submetidos ao Protocolo de Lesão Muscular

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra o efeito do protocolo de lesão muscular sobre o limiar nociceptivo. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von Frey eletrônico antes do protocolo de lesão (MB, medida basal) e no 3º, 5º, 7º, 10º, 12º, 14º, 17º, 19º e 21º dia após o protocolo de lesão. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ($n=5$ em todos os grupos).

5.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TF E DA PSL SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO

Após observar que o protocolo de lesão muscular proposto pelo estudo foi eficaz em promover hiperalgesia, nós avaliamos o efeito do TF (Treinamento de Força) e suplementação com PSL (Proteína do soro do leite), utilizados de maneira isolada ou combinada, sobre a resposta nociceptiva. Além disso, de acordo com as respostas do limiar nociceptivo verificadas no gráfico 1, foi determinado que o protocolo de tratamento teria uma duração de 14 dias, considerando apenas o período em que o quadro hiperalgésico ainda permanecia presente no modelo de lesão. Assim, os grupos tratados apresentaram uma diferença significativa em relação aos grupos não tratados a partir do 10º dia de intervenção ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 16.62$) (Gráfico 2). No 10º dia ambos os grupos TF e TF+PSL apresentaram uma diferença estatística em relação ao grupo Lesão ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 16.62$) (Gráfico 2). Porém, a partir do 12º dia todos os grupos (TF, PSL, TF+PSL) apresentaram uma redução significativa da hiperalgesia em relação ao grupo lesionado ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 16.62$) (Gráfico 2). Entretanto, assim como o grupo Lesão todos os tratamentos também apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo controle, ou seja, os tratamentos não foram suficientes para reverter completamente a redução do limiar nociceptivo após a lesão.

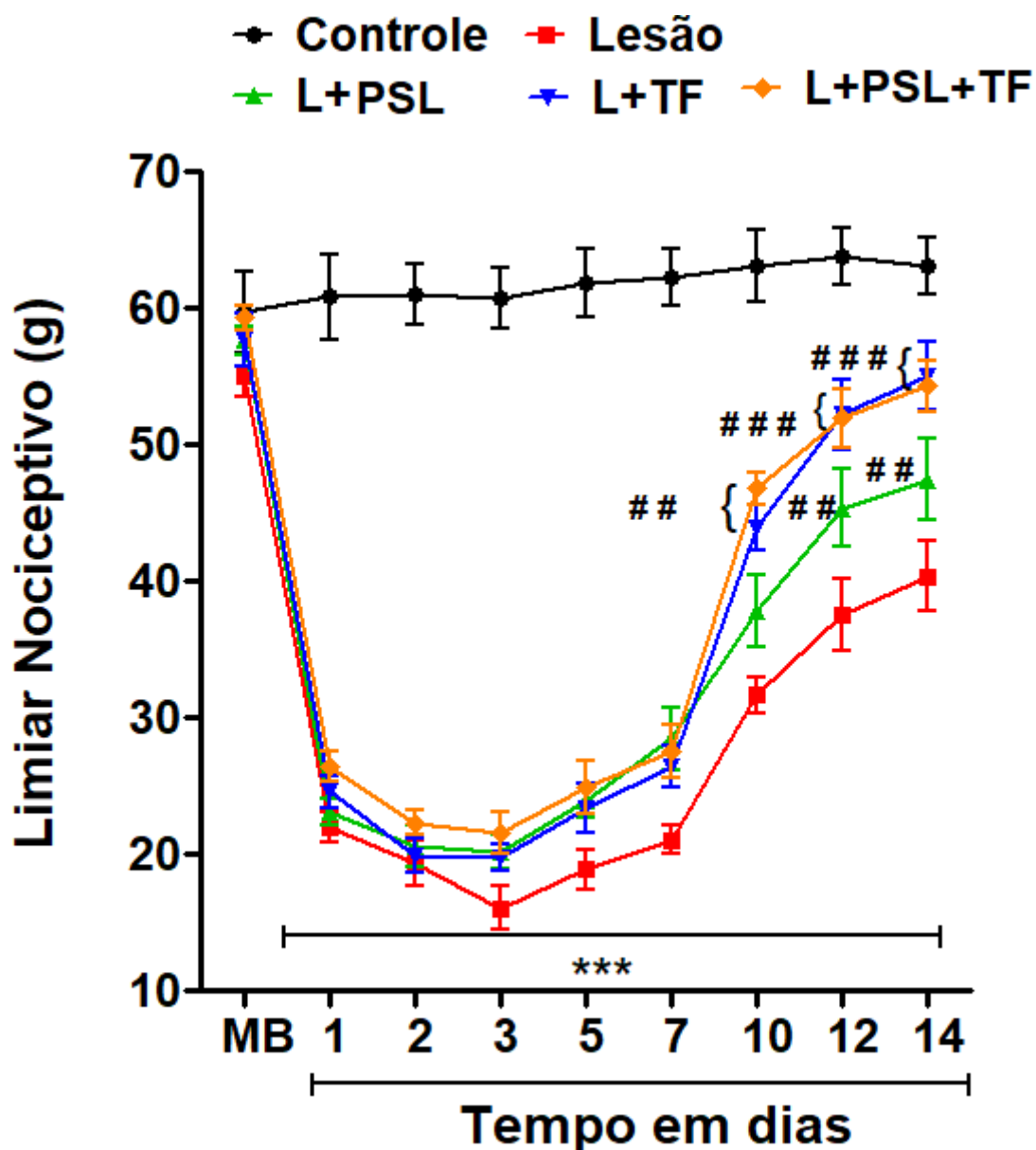


Gráfico 2 - Avaliação do Limiar Nociceptivo pelo Teste de Von Frey Eletrônico em Animais Submetidos aos Tratamentos com TF e PSL após o Protocolo de Lesão Muscular.

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra o efeito dos tratamentos com o TF, PSL e TF+PSL sobre o limiar nociceptivo após o protocolo de lesão muscular. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von Frey eletrônico antes do protocolo de lesão (MB, medida basal) e no 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º dia após o protocolo de lesão. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ***: $P < 0.001$, indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. ###: $P < 0.001$, #: $p < 0.01$, indica diferença significativa em relação ao grupo lesão ($n=6$ em todos os grupos).

5.3 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO PROTOCOLO DE LESÃO E DO TRATAMENTO COM TF E PSL SOBRE A ANÁLISE TERMOGRÁFICA

Foi utilizada uma avaliação termográfica, como forma indireta de investigar a resposta inflamatória induzida pelo modelo de lesão muscular, bem como o efeito da PSL e do TF sobre essa resposta. Verificou-se que a temperatura muscular aumentou a partir do 1º dia de lesão, com um pico dessa avaliação no 8º dia ($p < 0,001$ $F_{1,8} = 19,03$) (Gráfico 3). Após o 15º dia de lesão a temperatura local não apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Gráfico 3). Além disso, os resultados obtidos através dessa avaliação inicial foram correlacionados às respostas do limiar nociceptivo, apontando uma correlação entre o aumento da temperatura local e a redução do limiar nociceptivo ($p = 0,048$, $r = -0,88$, $r^2 = 0,77$) (Gráfico 4). Quando avaliada as intervenções, não foi encontrado diferença entre os tratamentos, nem isolados nem combinado, com o grupo não submetido à lesão sem intervenção (Gráfico 5).

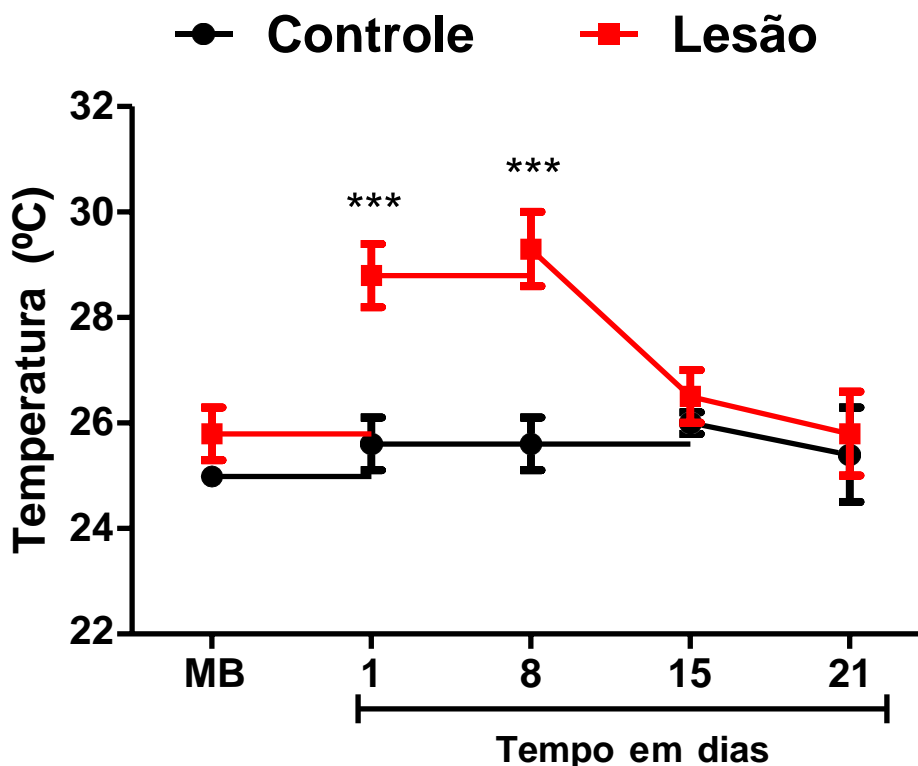


Gráfico 3 - Avaliação da Temperatura do Local da Lesão de Animais Submetidos ao Protocolo de Lesão Muscular

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra o efeito do protocolo de lesão muscular sobre a temperatura do local da lesão. A temperatura local foi avaliada pelo método de termografia antes do protocolo de lesão (MB, medida basal) e no 1º, 8º, 15º, e 21º dia após o protocolo de lesão. Além disso, o gráfico demonstra a temperatura da perna dos animais que não foram submetidos ao protocolo de lesão (controle). Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. da temperatura (°C). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ***: $P < 0,001$, indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ($n = 5$ por grupo).

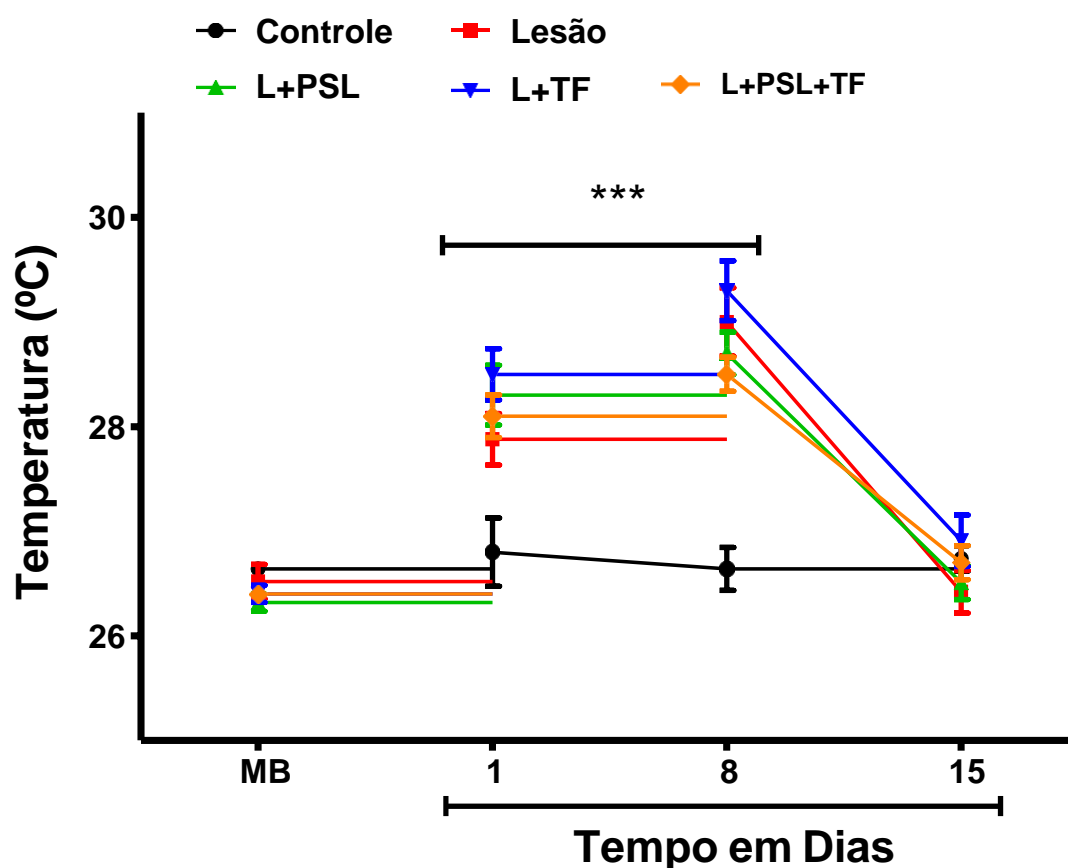


Gráfico 5 - Avaliação do Efeito das Intervenções com TF e PSL sobre a Temperatura do Local da Lesão dos Animais Submetidos ao Protocolo de Lesão

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra o efeito dos tratamentos com TF, PSL, e TF+PSL sobre a temperatura local dos animais submetidos ao protocolo de lesão muscular. A temperatura local foi avaliada pelo método da termografia antes do protocolo de lesão (MB, medida basal) e no 1º, 8º e 15º dia após o protocolo de lesão. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. da temperatura local (°C). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ***: $P < 0.001$, indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ($n=6$ em todos os grupos).

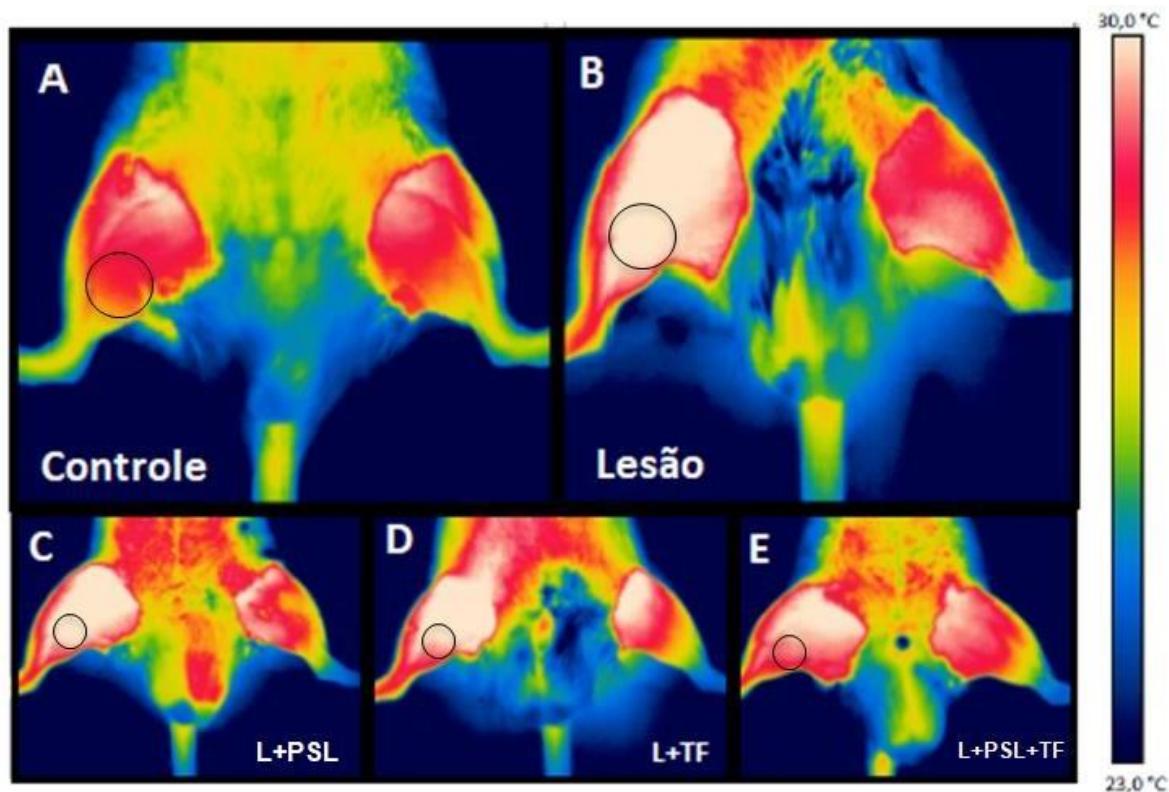


Figura 9 - Imagem Representativa da Temperatura no Local da Lesão

Fonte: Do autor.

Nota: A ilustração representa os resultados encontrados nos grupos tratados e não tratados no 7º dia de protocolo. A imagem A representa o grupo controle. B representa o grupo submetido ao protocolo de lesão. C representa o grupo lesionado e submetido à suplementação com PSL. D representa o grupo lesionado e submetido ao TF. E representa o grupo lesionado e submetido a ambos, PSL e TF. O círculo nas imagens representa o local de avaliação da temperatura. A escala na lateral direita baliza a coloração referente à temperatura mensurada nos animais, variando entre 23°C e 30 °C.

5.4 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO PROTOCOLO DE LESÃO E DO TRATAMENTO COM TF E PSL SOBRE OS PADRÕES DE MARCHA

Para investigar o efeito do modelo de lesão muscular, bem como dos tratamentos, sobre a marcha dos animais, foi avaliado os padrões de marcha em um plano lateral, onde foi possível avaliar a amplitude articular do movimento (Gráfico 6). Foi observado que os animais submetidos ao protocolo de lesão apresentaram uma redução significativa na amplitude articular do movimento logo no 1º dia e perdurando até o 15º dia após lesão ($p < 0,001$ $F_{1,8}=68,53$) (Gráfico 6). Além disso, o padrão da marcha foi avaliado em um plano ventral onde foi possível avaliar a área de contato plantar da pata do animal com a plataforma de vidro (Gráfico 7). Os resultados demonstraram que houve uma redução significativa da área de contato da pata a partir do 1º dia e se prolongando até o 15º dia após a lesão ($p < 0,001$

$F_{1,8} = 22,24$) (Gráfico 7). Ambas as variáveis foram correlacionadas com o limiar nociceptivo. A variável referente à amplitude articular do grupo submetido à lesão apresentou uma alta correlação com a resposta nociceptiva dos animais ($p < 0.001$, $r = 0.89$, $r^2 = 0.80$) (Gráfico 8A). De maneira interessante, o limiar nociceptivo e a amplitude articular do grupo controle, não apresentou correlação ($p = 0.542$, $r = 0.11$, $r^2 = 0.01$) (Gráfico 8B). Isso demonstra que essa variável é bastante sensível para a investigação da lesão muscular. A variável referente à área de contato da pata do animal lesionado também apresentou uma forte correlação com limiar nociceptivo ($p < 0.001$, $r = 0.78$, $r^2 = 0.61$) (Gráfico 9A), não apresentando correlação para o animal controle ($p = 0.82$, $r = 0.03$, $r^2 = 0.001$) (Gráfico 9B). As respostas comportamentais referentes à marcha também foram avaliadas nos grupos submetidos à intervenção com PSL e TF para ambas variáveis, amplitude articular e área de contato da pata. A amplitude articular de todos os grupos com lesão apresentou uma redução significativa em relação ao grupo controle nos dias 1, 8 e 15 após lesão ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 31,89$) (Gráfico 10). Além disso, o grupo L+TF e o grupo L+PSL+TF apresentaram uma diferença significativa em relação aos grupos Lesão e L+PSL no 8º dia ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 31,89$) (Gráfico 10). Em relação a variável da área de contato da pata, os grupos submetidos ao tratamento com TF e TF+PSL também apresentaram uma diferença significativa para o grupo Lesão e L+PSL no 8º e no 15º dia após lesão ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 65,07$) (Gráfico 11). Além disso, no 15º dia os grupos TF e TF+PSL não apresentaram diferença estatística para o grupo controle, indicando que em no final da segunda semana de intervenção os tratamentos foram capazes de reverter completamente a redução na área de contato induzida pelo protocolo de lesão muscular (Gráfico 11).

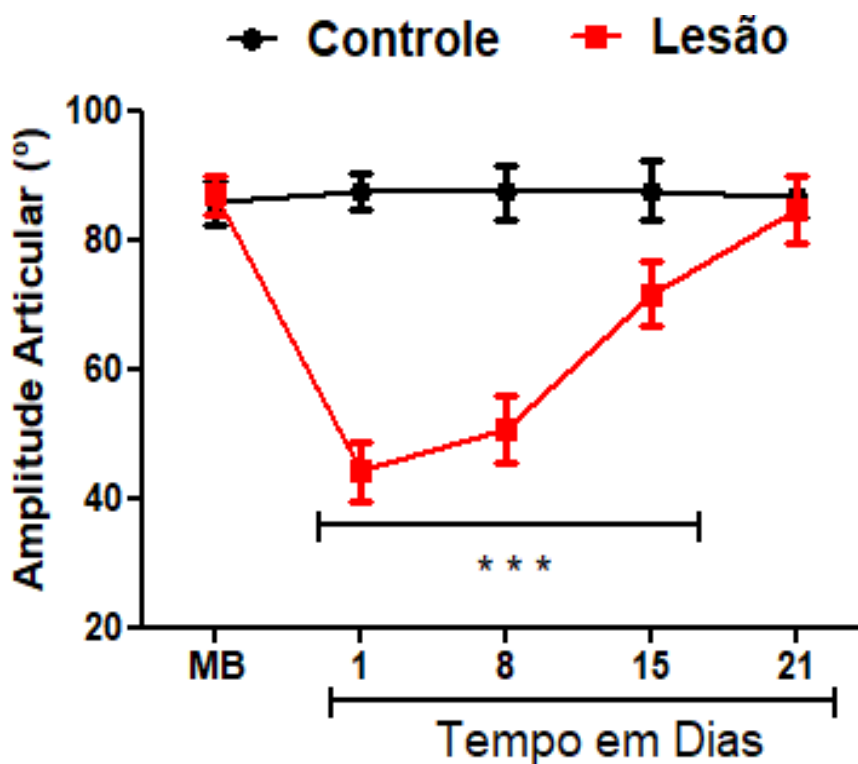


Gráfico 6- Avaliação Inicial da Amplitude Articular de Movimento Durante a Marcha em Animais Submetidos ao Protocolo de Lesão Muscular

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra o efeito do protocolo de lesão muscular sobre a amplitude articular de movimento nos animais submetidos à lesão. A amplitude articular de movimento foi avaliada pela análise do vídeo da marcha dos animais antes da lesão (MB, medida basal) e no 1º, 8º, 15º, e 21º dia após o protocolo de lesão. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. da amplitude de movimento (°). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ***: $P < 0.001$, indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (n=5 por grupo).

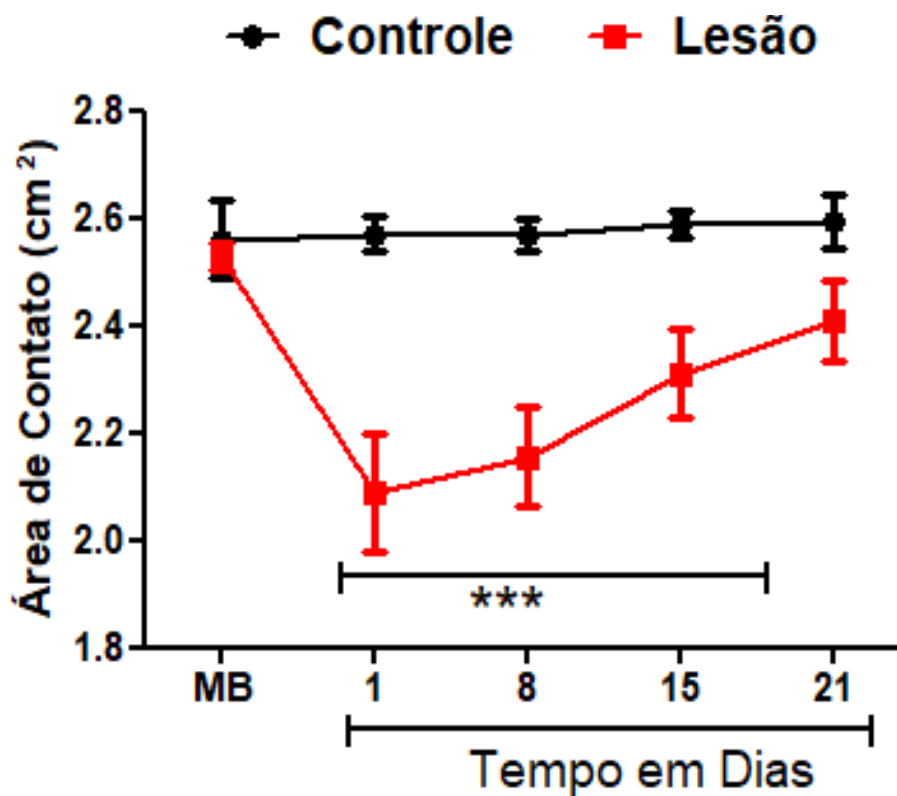


Gráfico 7- Avaliação Inicial da Área de Contato da Pata Durante a Marcha em Animais Submetidos ao Protocolo de Lesão Muscular

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra o efeito do protocolo de lesão muscular sobre a área de contato da pata dos animais submetidos à lesão. A área de contato da pata com a plataforma de vidro foi avaliada pela análise do vídeo da marcha dos animais antes da lesão (MB, medida basal) e no 1º, 8º, 15º, e 21º dia após o protocolo de lesão. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. da área de contato (cm²). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ***: $P < 0.001$, indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (n=5 por grupo).

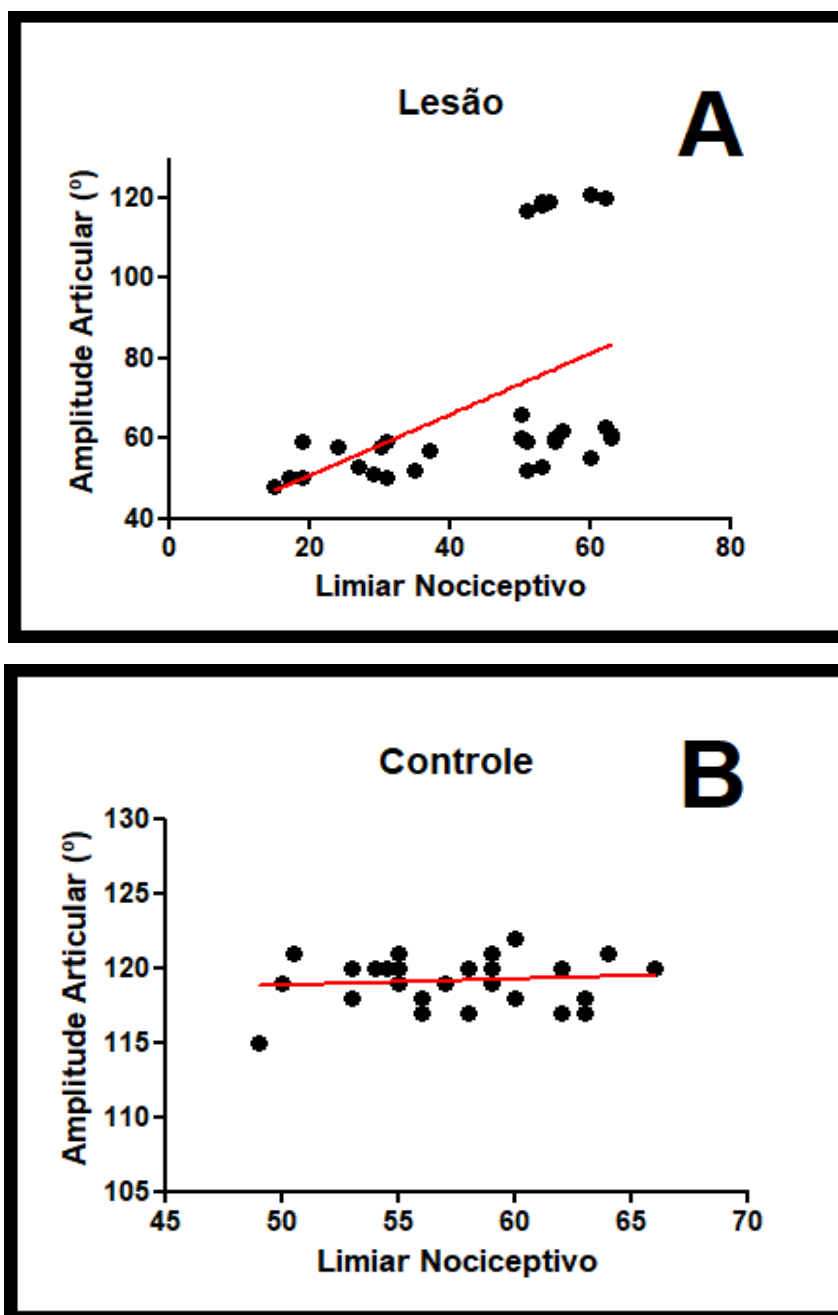


Gráfico 8 - Avaliação da Correlação entre a Amplitude Articular de Movimento e o Limiar Nociceptivo

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra a correlação entre a amplitude articular (°) e o limiar nociceptivo (g) no grupo submetido à lesão muscular (Imagem A) e no grupo controle (Imagem B). O teste de correlação de Pearson aponta que houve uma forte correlação entre a amplitude articular do movimento com o limiar nociceptivo no grupo submetido ao protocolo de lesão e não houve correlação no grupo controle. Imagem A: correlação do grupo lesionado ($p < 0.001$, $r = 0.89$, $r^2 = 0.80$). Imagem B: grupo controle não apresentou correlação ($p = 0.542$, $r = 0.11$, $r^2 = 0.01$). Os dados são apresentados como distribuição de pontos e linha de correlação ($n = 10$ animais totais).

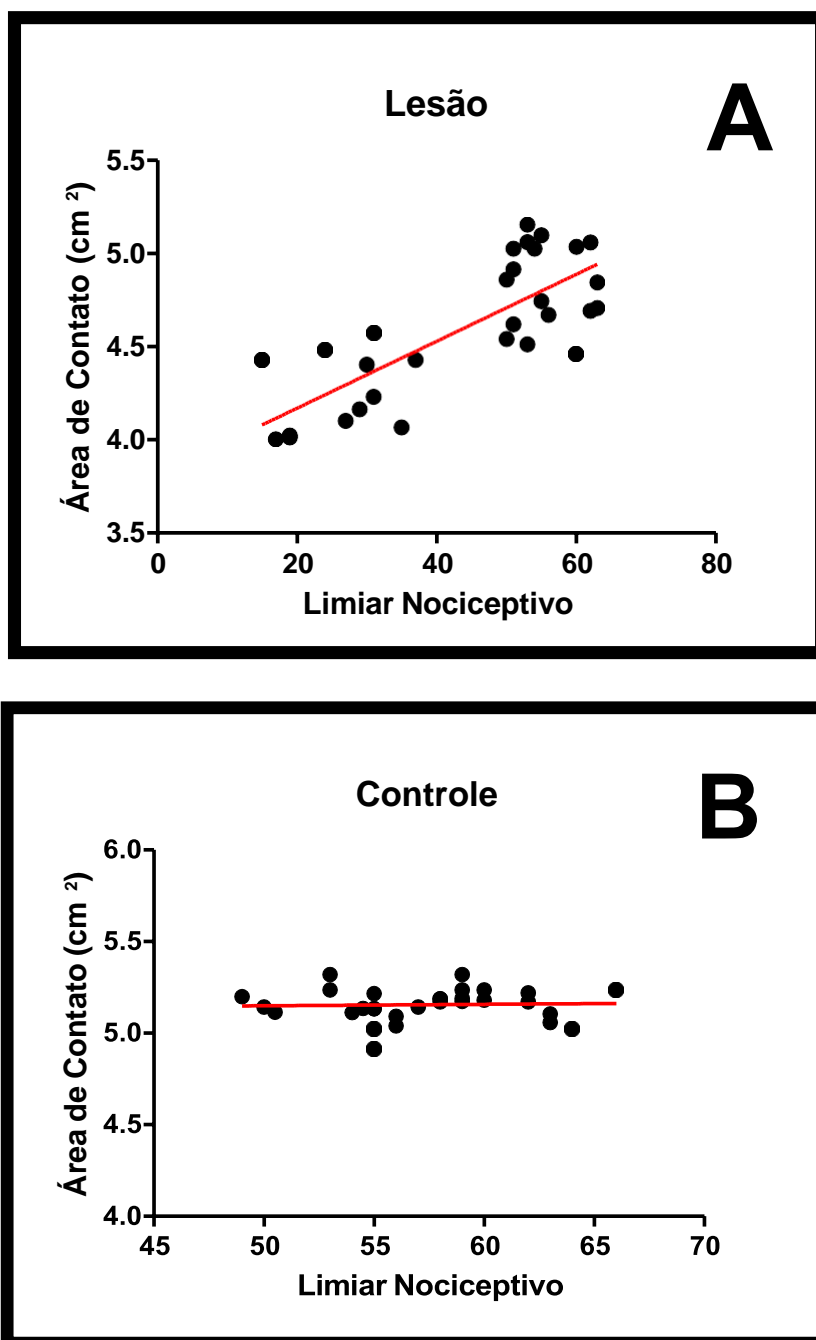


Gráfico 9 - Avaliação da Correlação entre a Área de Contato da Pata e o Limiar Nociceptivo
Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra a correlação entre a área de contato da pata com a superfície de vidro (cm²) e o limiar nociceptivo (g) no grupo submetido à lesão muscular (Imagem A) e no grupo controle (Imagem B). O teste de correlação de Pearson aponta que houve uma forte correlação entre a área de contato da pata com o limiar nociceptivo no grupo submetido ao protocolo de lesão e não houve correlação no grupo controle. Imagem A: correlação do grupo lesionado ($p < 0.001$, $r = 0.78$, $r^2 = 0.61$). Imagem B: grupo controle não apresentou correlação ($p = 0.82$, $r = 0.03$, $r^2 = 0.001$). Os dados são apresentados como distribuição de pontos e linha de correlação ($n = 10$ animais totais).

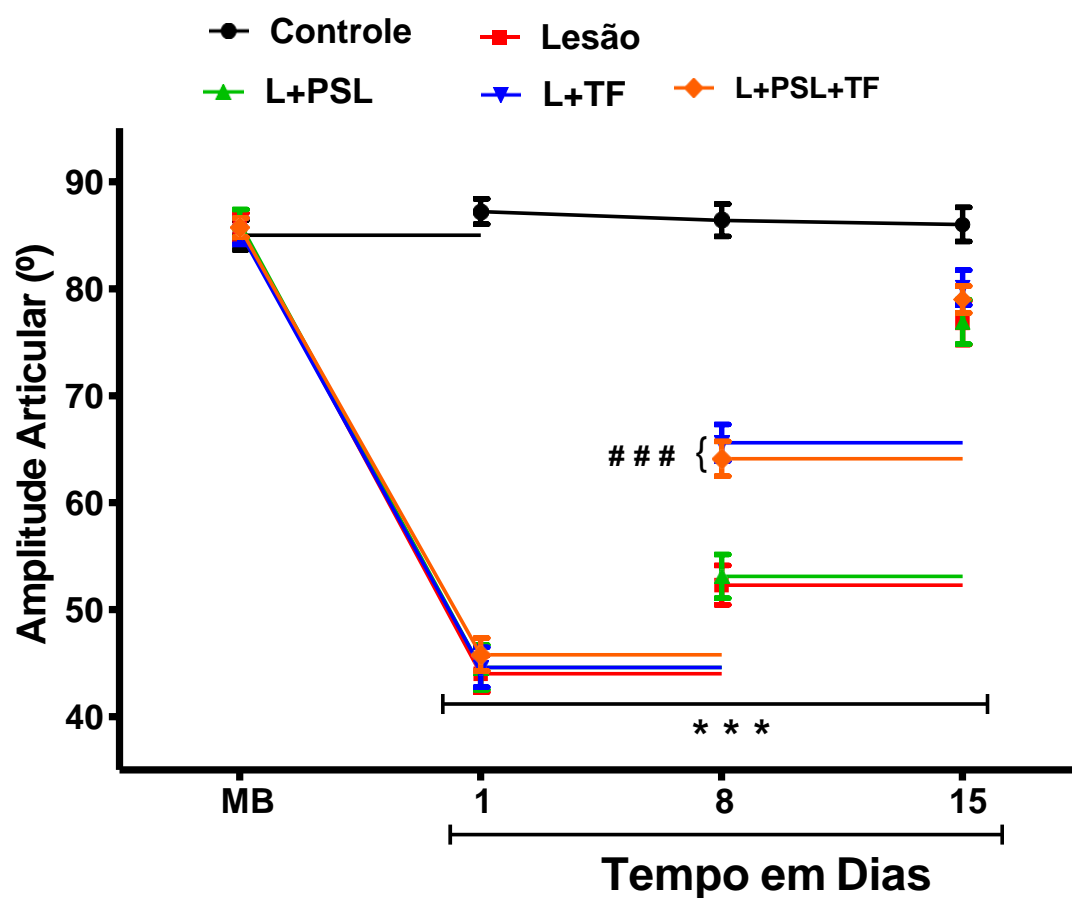


Gráfico 10 - Avaliação do Efeito das Intervenções com TF e PSL sobre a Amplitude Articular de Movimento dos Animais Submetidos ao Protocolo de Lesão

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra o efeito dos tratamentos com TF, PSL, e TF+PSL sobre a amplitude articular de movimento dos animais submetidos ao protocolo de lesão muscular. A amplitude articular de movimentos foi avaliada pela análise do vídeo da marcha dos animais antes da lesão (MB, medida basal) e no 1º, 8º e 15º dia após o protocolo de lesão. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. da amplitude de movimento (°). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ***: $p < 0.001$, indicam diferença significativa em relação ao grupo Controle. # # #: $p < 0.001$, indica diferença significativa em relação ao grupo Lesão. (n=6 em todos os grupos).

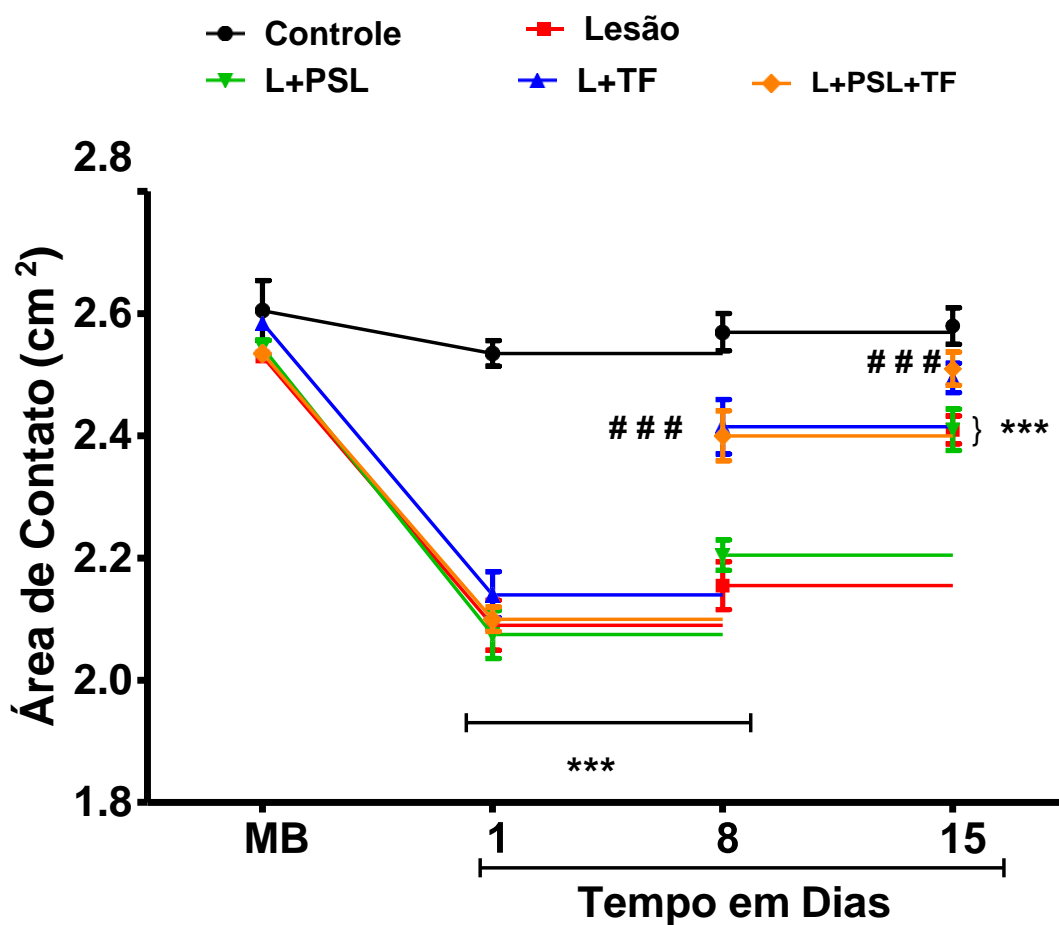


Gráfico 11 - Avaliação do Efeito das Intervenções com TF e PSL sobre a Área de Contato da Pata dos Animais Submetidos ao Protocolo de Lesão

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra o efeito dos tratamentos com TF, PSL, e TF+PSL sobre a área de contato da pata dos animais submetidos ao protocolo de lesão muscular. A área de contato da pata do animal com a superfície de vidro foi avaliada pela análise do vídeo da marcha dos animais antes da lesão (MB, medida basal) e no 1º, 8º e 15º dia após o protocolo de lesão. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. da área de contato (cm²). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ***: $p < 0.001$, indicam diferença significativa em relação ao grupo Controle. ### $p < 0.001$: indica diferença significativa em relação ao grupo Lesão (n=6 em todos os grupos).

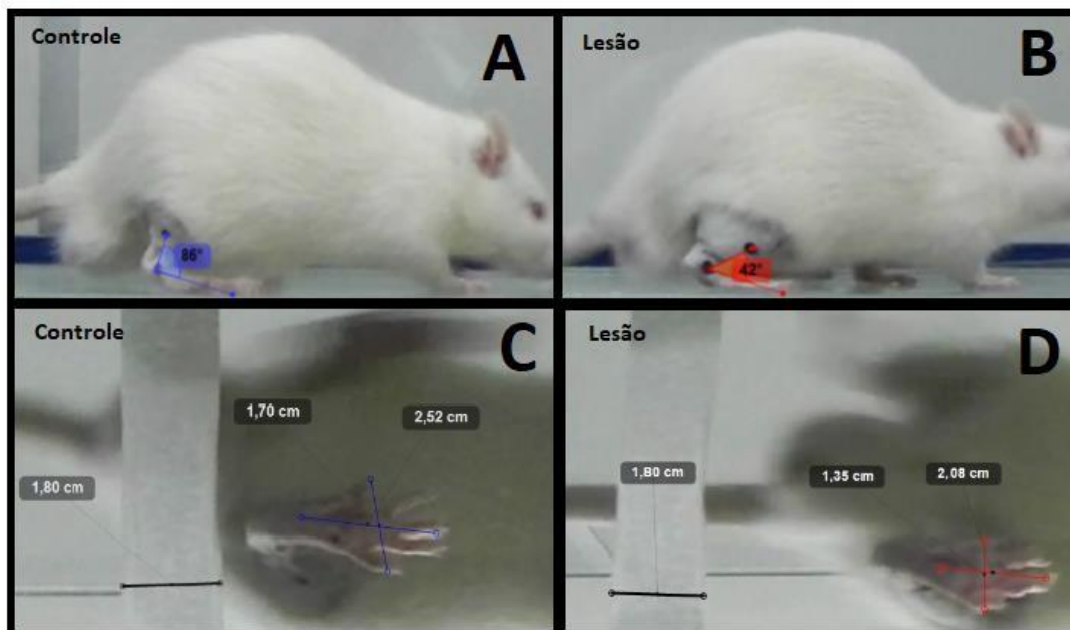


Figura 10 - Imagem Representativa das Variáveis de Marcha Analisadas

Fonte: Do autor.

Nota: As imagens demonstram as variáveis utilizadas para a análise da marcha. A: representa amplitude articular do grupo controle. B: representa a amplitude articular do grupo lesionado. C: representa a área de contato da pata direita do animal controle. D: representa a área de contato do animal lesionado. Foi utilizado como medida calibradora 1.80 cm que equivale à largura da fita posicionada no fundo da plataforma de vidro.

5.5 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TF E PSL SOBRE A ANÁLISE HISTOLÓGICA DA LESÃO MUSCULAR

Após 15 dias de indução da lesão muscular, foi realizada a análise histológica do tecido muscular com o intuito de avaliar a densidade de células inflamatórias, o nível da lesão e o efeito dos tratamentos (Gráfico 12). Os dados são apresentados em número de núcleos de células inflamatórias na área de teste (QA_{inf}), determinando assim a densidade de células inflamatórias presente no tecido. É possível observar que houve um aumento significativo do número de células inflamatórias nos grupos submetidos à lesão quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 44,85$) (Gráfico 12). Além disso, os grupos que foram submetidos à intervenção com TF, PSL e TF+PSL apresentaram uma redução significativa na densidade de células inflamatórias quando comparados ao grupo apenas com lesão ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 44,85$) (Gráfico 12). Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos tratados (TF, PSL, TF+PSL) (Gráfico 12). A figura 11 ilustra a densidade de células inflamatórias no tecido

muscular dos grupos controle e lesão e dos grupos submetidos à intervenção com TF, PSL e TF+PSL.

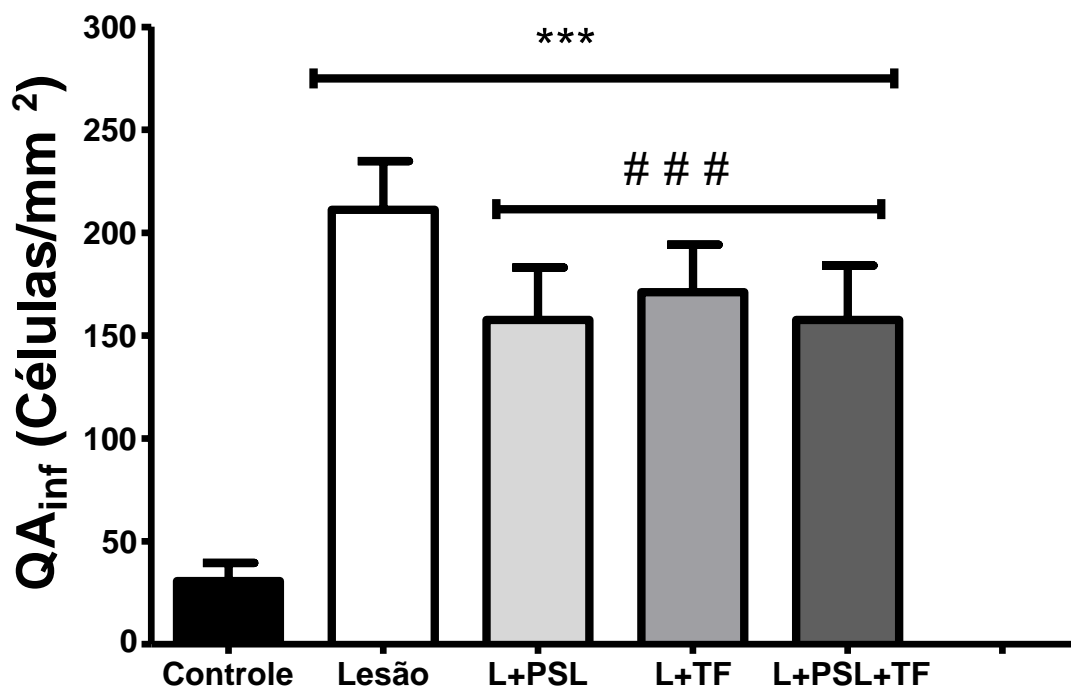


Gráfico 12 - Análise do Efeito do TF e PSL no Número de Células Inflamatórias do Músculo Lesionado

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra os grupos submetidos à intervenção com TF, PSL e TF+PSL no 15º dia após a lesão. A densidade de células inflamatórias está expressa pela média \pm E.P.M. de QA_{inf} (Células/mm²). One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ***: $p < 0.001$, indica diferença significativa em relação ao grupo Controle. # #: $p < 0.01$; #: $p < 0.05$: indicam diferença significativa em relação ao grupo Lesão. (n=6 em todos os grupos)

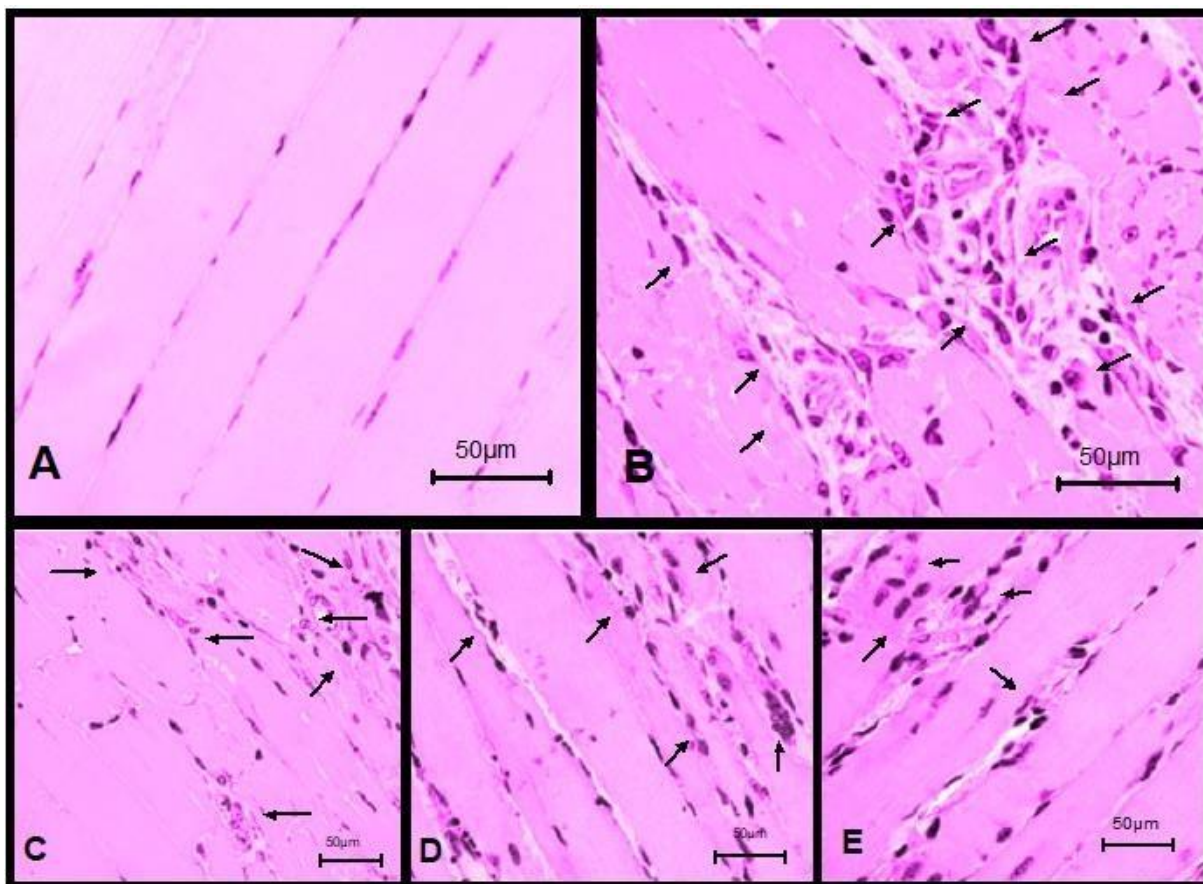


Figura 11 - Imagens Representativas das Análises Histológicas do Tecido Muscular

Fonte: Do autor.

Nota: As imagens acima representam as análises histológicas do tecido muscular. As setas apontam os locais de maior concentração de células inflamatórias. A: Grupo controle. B: Grupo lesionado e não submetido a nenhuma intervenção. C: Grupo submetido à intervenção com PSL. D: Grupo submetido à intervenção com TF. E: Grupo submetido à intervenção com TF combinado a suplementação com PSL. Foi utilizado como medida calibradora 50µm para todas as imagens.

5.6 EFEITO DO TF SOBRE O LACTATO SANGUÍNEO

A análise do lactato sanguíneo foi utilizada para avaliar a intensidade do exercício de força e foi realizada antes, após a última sessão da primeira semana de treino e após última sessão da segunda semana de treinamento (Gráfico 13). Os resultados demonstram que houve uma diferença significativa ao comparar o mesmo grupo nos diferentes tempos de avaliação: MB, 1ª semana e 2ª semana ($p < 0,001$ $F_{2,9} = 72,50$) (Gráfico 13). Na 2ª semana os níveis de lactato sanguíneo após exercício foram significativamente maiores que na 1ª semana e na MB, bem como os valores encontrados após o exercício na 1ª semana foram maiores que os valores em repouso na MB ($p < 0,001$ $F_{2,9} = 72,50$). Isso indica que o aumento da carga de 50% do RM (Última sessão de treino da 1ª semana) para 80% do RM (Última sessão de treino da 2ª

semana) influenciou diretamente em um aumento da intensidade dos exercícios executados. Entretanto, não foi encontrada nenhuma diferença quando comparado os diferentes grupos no mesmo tempo: MB, 1ª semana e 2ª semana (Gráfico 13). Dessa maneira os valores de lactato sanguíneo foram os mesmos para todos os grupos quando comparados dentro do mesmo tempo. Isso indica que o teste de RM realizado individualmente para cada animal foi uma forma eficiente de normalizar a prescrição da intensidade dos exercícios para cada grupo.

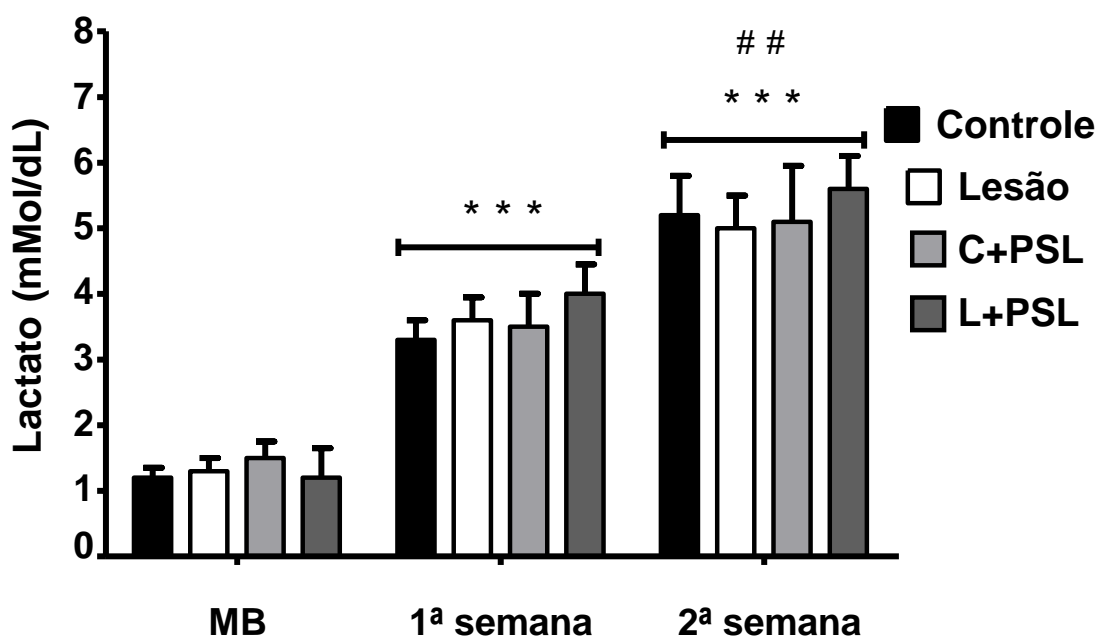


Gráfico 13 - Análise da Concentração de Lactato Sanguíneo em Repouso e após o Exercício de Força

Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico demonstra as concentrações de lactato sanguíneo dos grupos em repouso (MB), e após a execução no exercício (1ª semana e 2ª semana). Os grupos Controle, Lesão, C+PSL e L+PSL foram avaliados 3 minutos após do final do exercício. O lactato sanguíneo está expresso pela média \pm E.P.M. da concentração (mmol/dl). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ***: $p < 0.001$, indica diferença significativa em relação à MB. # #: $p < 0.01$, indicam diferença significativa em relação à 1ª semana. (n=4 em todos os grupos).

5.7 ENVOLVIMENTO DE MICRÓGLIA E ASTRÓCITOS ESPINAIS NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR LESÃO MÚSCULAR

Um ensaio farmacológico foi utilizado para investigar a participação de células da glia espinais (micróglia e astrócitos) na dor induzida pelo modelo de lesão muscular do presente estudo. Assim, inicialmente a minociclina, um inibidor de micróglia, foi administrado (i.t.) tanto em uma fase intermediária após o 7º dia da lesão quanto em uma fase mais tardia, após o

14º dia de lesão. Podemos verificar no gráfico 14 que a minociclina nas doses de 100µg e 200µg reverteu a hiperalgesia mecânica a partir da 2ª, 3ª, 5ª hora de sua administração ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 21,10$)(Gráfico 14). Um resultado similar foi encontrado após o 14º dia de lesão, no qual ambas as doses de minociclina (100µg e 200µg) foram eficazes na reversão da hiperalgesia mecânica induzida pela lesão muscular ($p < 0,001$ $F_{4,25} = 36,61$) (Gráfico 15). Tais resultados sugerem que tanto no 7º quanto no 14º dia após lesão há uma participação da micróglia na gênese da dor muscular.

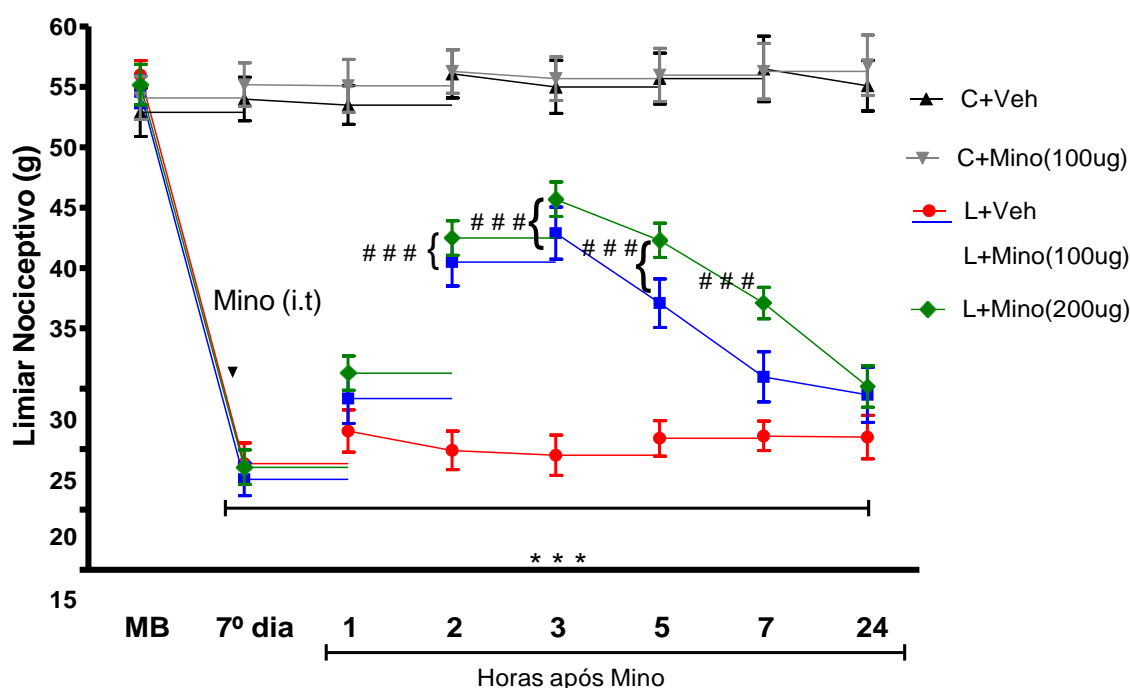


Gráfico 14 - Avaliação do Limiar Nociceptivo pelo Teste de Von Frey Eletrônico para Investigação da Participação da Micróglia na Dor Muscular no 7º dia após Lesão

Fonte: Do autor.

Nota: O limiar nociceptivo foi avaliado antes do protocolo de lesão muscular (MB) e no 7º dia após lesão antes da administração de minociclina i.t. (100µg e 200µg). Logo em seguida foram feitas avaliações do limiar nociceptivo na 1ª, 2ª, 3ª, 5ª, 7ª e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Two-way ANOVA seguido do teste Bonferroni. ***: $p < 0,001$, indica diferença significativa em relação ao grupo Controle. ###: $p < 0,001$, indica diferença significativa em relação ao grupo Lesão. (n=6 em todos os grupos).

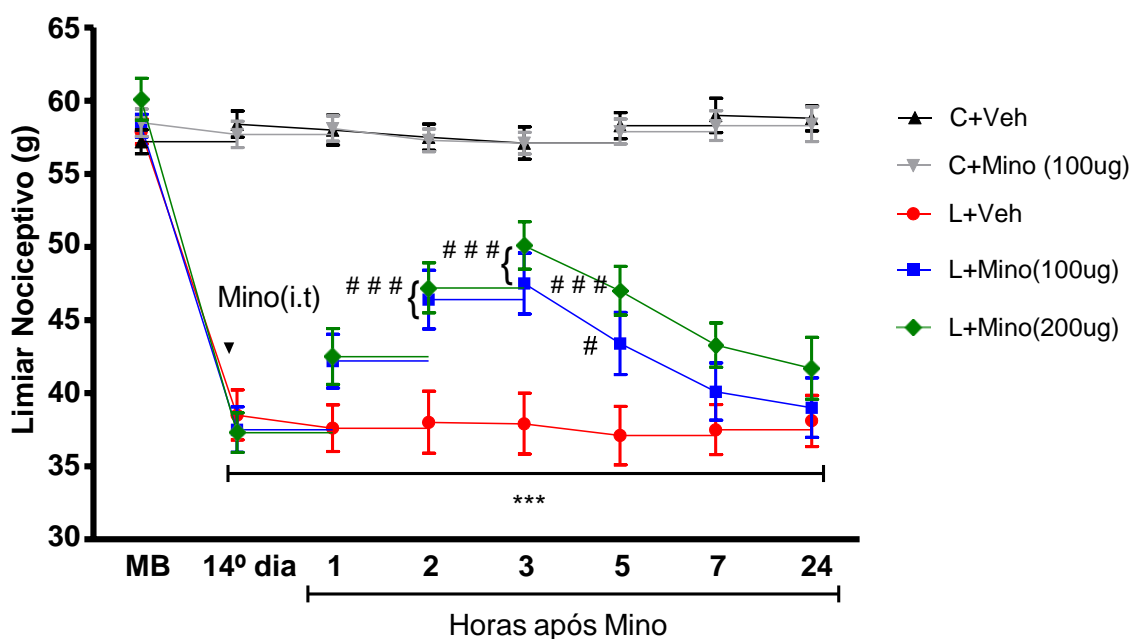


Gráfico 15 - Avaliação do Limiar Nociceptivo pelo Teste de Von Frey Eletrônico para Investigação da Participação da Micróglia na Dor Muscular no 14º dia após Lesão

Fonte:

Do autor.

Nota:

O limiar nociceptivo foi avaliado antes do protocolo de lesão muscular (MB) e no 14º dia após lesão antes da administração de minociclina i.t. (100µg e 200µg). Logo em seguida foram feitas avaliações do limiar nociceptivo na 1ª, 2ª, 3ª, 5ª, 7ª e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média ±E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *** : p<0.001, indica diferença significativa em relação ao grupo Controle. ### : p<0.001, # : p<0.05, indicam diferença significativa em relação ao grupo Lesão. (n=6 em todos os grupos)

Além do envolvimento na micróglia no modelo de dor muscular, foi demonstrado que os astrócitos espinais também participam desse processo. A administração do inibidor de astrócitos, o fluorocitrato, reverteu a hiperalgesia mecânica tanto no 7º dia após a 5ª h (p<0,05), 7ª h (p<0,001) e 24ª h (p<0,001) de sua administração (p<0,001 $F_{4,25}= 17,89$) (Gráfico 16), quanto no 14º dia de lesão após a 2ª h (p<0,05), 3ª h (p<0,001) 5ª h (p<0,001), e 7ª h (p<0,001) de sua administração, (p<0,001 $F_{4,25}= 46,14$) (Gráfico 17). Tais resultados também sugerem um envolvimento de astrócitos espinais na hiperalgesia induzida pela lesão muscular.

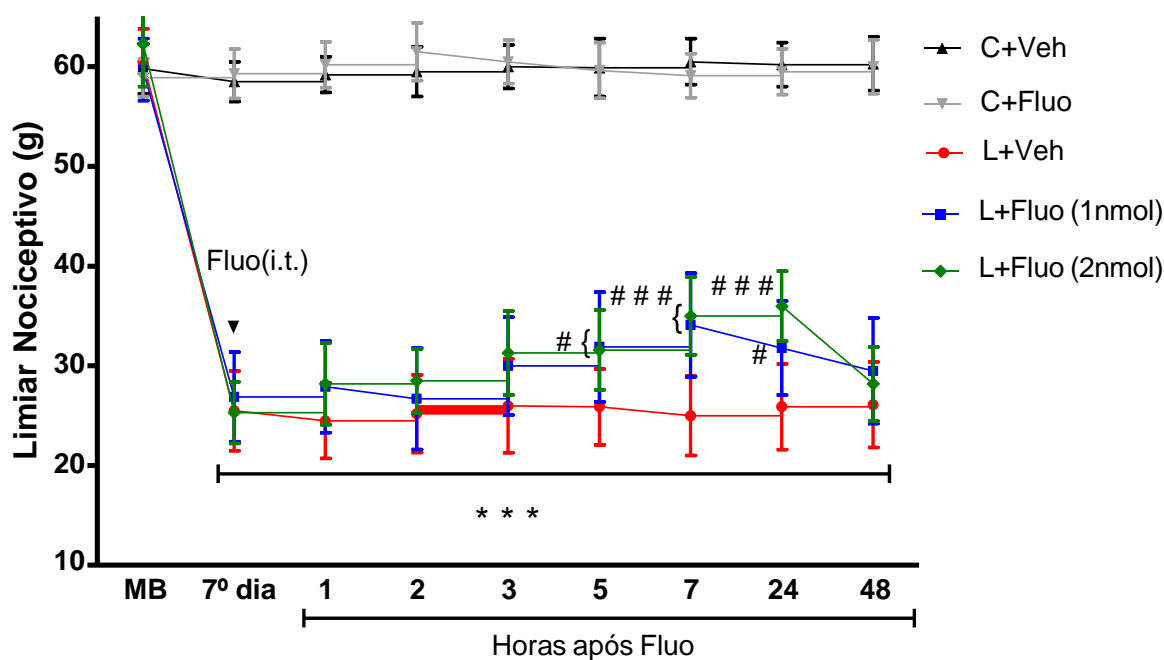


Gráfico 16 - Avaliação do Limiar Nociceptivo pelo Teste de Von Frey Eletrônico para Investigação da Participação de Astrócitos na Dor Muscular no 7º dia após Lesão

Fonte: Do autor

Nota: O limiar nociceptivo foi avaliado antes do protocolo de lesão muscular (MB) e no 7º dia após lesão antes da administração de fluorocitrato i.t. (1nmol e 2nmol). Logo em seguida foram feitas avaliações do limiar nociceptivo na 1ª, 2ª, 3ª, 5ª, 7ª e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média ±E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *** : p<0.001, indica diferença significativa em relação ao grupo Controle. # # # : p<0.001, # : p<0.05, indicam diferença significativa em relação ao grupo Lesão. (n=6 em todos os grupos)

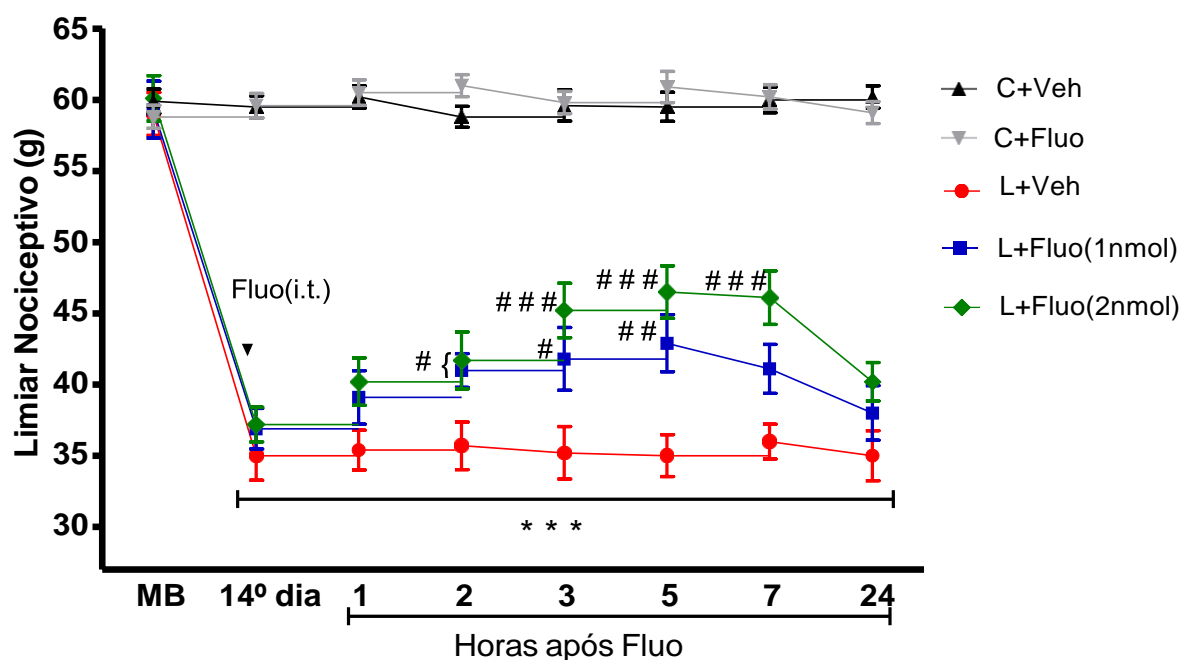


Gráfico 17 - Avaliação do Limiar Nociceptivo pelo Teste de Von Frey Eletrônico para Investigação da Participação de Astrócitos na Dor Muscular no 14º dia após Lesão

Fonte: Do autor.

Nota: O limiar nociceptivo foi avaliado antes do protocolo de lesão muscular (MB) e no 14º dia após lesão antes da administração de fluorocitrato i.t. (1nmol e 2nmol). Logo em seguida foram feitas avaliações do limiar nociceptivo na 1ª, 2ª, 3ª, 5ª, 7ª e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. ***: $p < 0.001$, indica diferença significativa em relação ao grupo Controle. ###: $p < 0.001$, ##: $p < 0.01$, #: $p < 0.05$, indicam diferença significativa em relação ao grupo Lesão. (n=6 em todos os grupos)

5.8 EFEITO DO TF E PSL SOBRE A EXPRESSÃO DE MICRÓGLIA E ASTRÓCITOS ESPINAIS

Após verificar a participação das células da glia no modelo de dor muscular, observado através das avaliações comportamentais com os testes farmacológicos, foi investigado o efeito do tratamento com TF e PSL sobre a expressão espinal de proteínas para o Iba1 (um marcador de micróglia) e do GFAP (um marcador de astrócitos). Para isso foi utilizado uma análise de expressão de proteínas por meio do ensaio de Western Blot.

Primeiramente o resultado demonstra um aumento significativo na expressão de Iba1 entre o grupo submetido ao protocolo de lesão e o grupo controle ($p < 0,01$ $F_{4,15} = 6.85$) (Gráfico 18). Esse resultado está de acordo com os resultados encontrados nos experimentos comportamentais que encontraram a participação da micróglia espinal no modelo de dor

muscular (Gráfico 15). Além disso, o resultado da análise molecular aponta que, assim como o grupo Lesão, o grupo L+PSL (Submetido à lesão muscular e tratado com proteína do soro do leite) apresentou um aumento significativo em relação ao grupo controle (Gráfico 18). Isso indica que a ingestão de PSL não apresentou nenhum efeito sobre a ativação glial. Além disso, não foi verificada diferença na expressão de Iba1 nos grupos submetidos ao TF e ao TF associado à PSL em relação ao grupo controle (Gráfico 18). Sugerindo que o tratamento com TF e com TF associado ao PSL foram capazes de impedir a ativação glial, mantendo níveis basais. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa ($p > 0.05$) entre os grupos submetidos a diferentes tratamentos (Gráfico 18).

Além disso, foi avaliado a expressão de GFAP, marcador de astrócitos. Os resultados confirmaram os resultados encontrados no teste farmacológico do 14º dia após lesão, indicando que de fato há uma participação de astrócitos na modulação da dor induzida por lesão muscular ($p < 0,01$ $F_{4,15} = 7.16$) (Gráfico 19). Entretanto, não foi encontrado nenhuma diferença entre os grupos submetidos ao tratamento em relação ao grupo lesionado e não tratado.

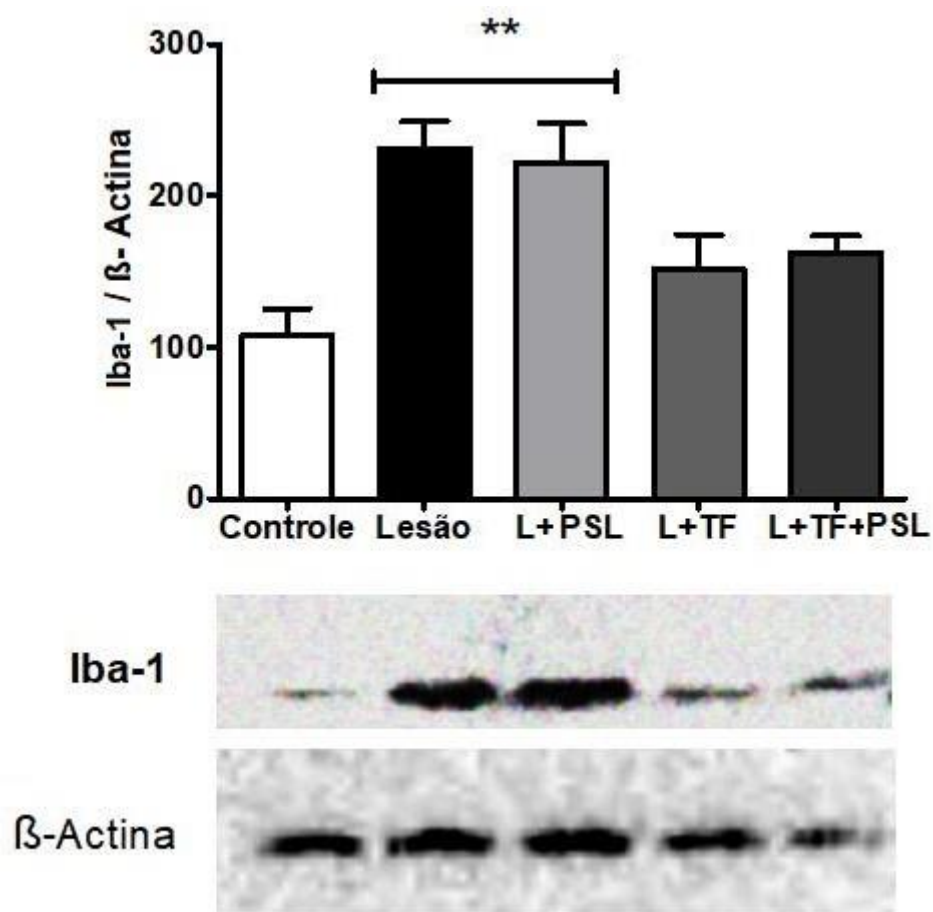


Gráfico 18 - Investigação do Efeito da Intervenção com TF e com PSL sobre a Ativação da Micróglia Espinal no 15º dia de Tratamento através da Análise de Western Blot

Fonte: Do autor.

Nota: Os animais foram submetidos ao protocolo de lesão muscular e posteriormente tratados com o TF e PSL, de forma separada e combinada, durante 14 dias. Após o tratamento foi coletado o tecido medular da região lombar no 15º dia de protocolo. Os dados foram expressos pela média ±E.P.M. da expressão de Iba-1 normalizada pela expressão de β-Actina (Iba-1/ β-Actina). One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. **: $p < 0.01$, indica diferença significativa em relação ao grupo Controle (n=4 em todos os grupos).

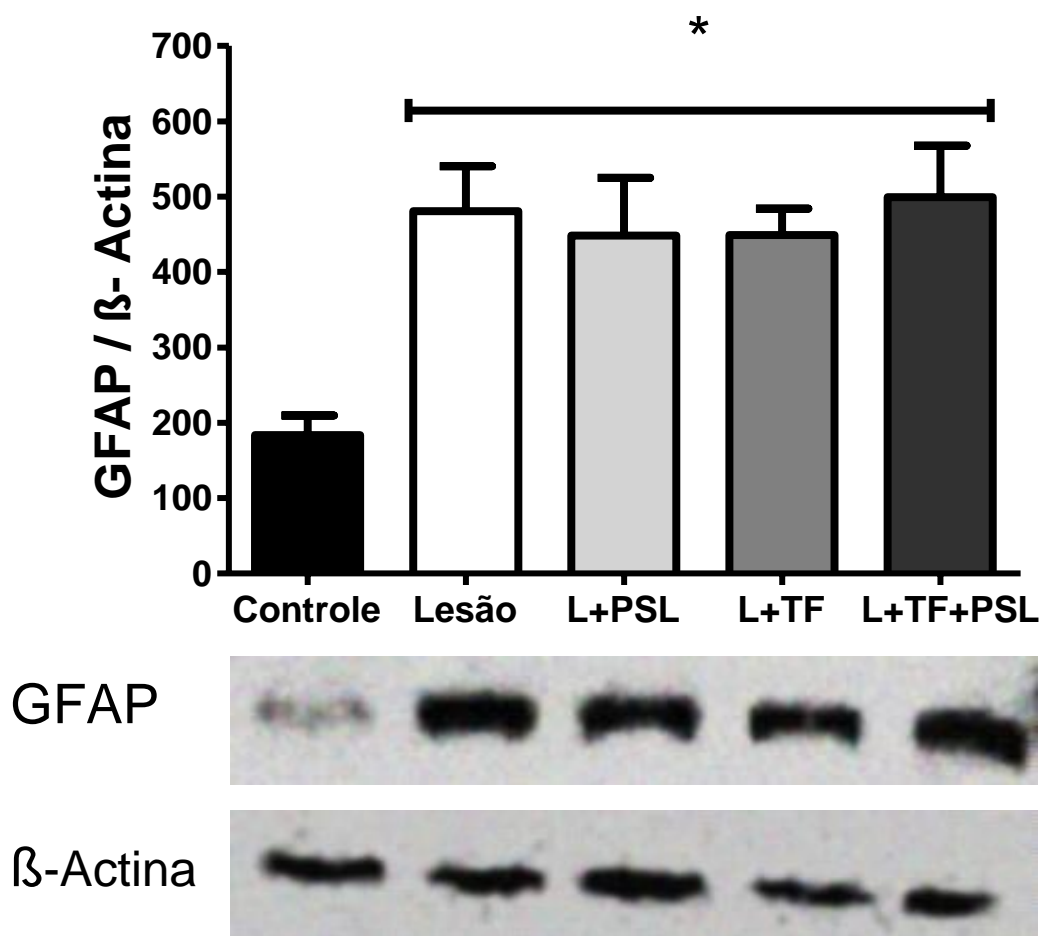


Gráfico 19 - Investigação do Efeito da Intervenção com TF e com PSL sobre a Ativação de Astrócito Espinal no 15º dia de Tratamento através da Análise de Western Blot

Fonte: Do autor.

Nota: Os animais foram submetidos ao protocolo de lesão muscular e posteriormente tratados com o TF e PSL, de forma separada e combinada, durante 14 dias. Após o tratamento foi coletado o tecido medular da região lombar no 15º dia de protocolo. Os dados foram expressos pela média ±E.P.M. da expressão de GFAP normalizada pela expressão de β-Actina (GFAP/ β-Actina). One-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *: $p < 0.05$, indica diferença significativa em relação ao grupo Controle. (n=4 em todos os grupos)

6 DISCUSSÃO

Os resultados iniciais referentes à resposta nociceptiva indicaram que o modelo de lesão muscular induzido por trauma foi capaz de reduzir significativamente o limiar deretirada da pata (g) dos animais submetidos à lesão em relação aos animais controle. Os resultados demonstram que a partir do primeiro dia após lesão houve uma redução significativa do limiar nociceptivo, sendo que o pico de hiperalgesia foi encontrado no 7º dia após a lesão, e essa hiperalgesia perdurou até 14 dias. Até o presente momento, os estudos que investigaram a lesão muscular induzida por trauma avaliaram as respostas inflamatórias referentes à lesão, porém não avaliaram a influência desse modelo sobre o limiar nociceptivo mecânico (MIAMOTO; BUNHO; SALVINI, 2001; MIAMOTO; GRAZIANO; SALVINI, 1999; FALCAI, et al. 2010). Embora outros estudos tenham demonstrado que a lesão muscular é capaz de induzir uma hiperalgesia mecânica em animais, esses trabalhos utilizaram modelos de lesão diferentes ao que foi utilizado no presente estudo (ASGAR, et al. 1999; RADHAKRISHNAN; MOORE; SLUKA, 2003). Além disso, o modelo de lesão utilizado no presente estudo pode ser de fundamental importância para futuras investigações, pois além de demonstrar o comportamento em relação à resposta hiperalgésica, propõe uma forma de lesão gerada por impacto mecânico, simulando uma contusão, o que seria o mais próximo às lesões musculares encontrados em quadros clínicos.

O presente estudo também demonstrou que o TF e a suplementação com PSL foram capazes de reverter parcialmente a hiperalgesia induzida pela lesão muscular. Os resultados apontam que o grupo submetido à lesão muscular e posteriormente tratado com o TF apresentou uma reversão significativa na redução do limiar nociceptivo, a partir do 10º dia após início do tratamento, em relação ao grupo submetido ao protocolo de lesão. Já o grupo que foi submetido à lesão muscular e posteriormente tratado com a ingestão de PSL apresentou uma reversão significativa na redução do limiar nociceptivo, apenas a partir do 12º dia após o início do tratamento, em relação ao grupo que foi submetido ao protocolo de lesão e não recebeu tratamento. O grupo que foi submetido à lesão e tratado com TF associado à ingestão de PSL, também apresentou uma melhora no limiar nociceptivo após o 10º dia de tratamento em relação ao grupo Lesão, entretanto, esse grupo não apresentou nenhuma diferença em relação o grupo tratado apenas com o TF. Esse resultado indica que a utilização do PSL associado ao TF não potencializou os efeitos antinociceptivos do tratamento com TF,

porém quando utilizado de forma isolada a ingestão de PSL também foi capaz de gerar respostas antinociceptivas.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que o TF é capaz de gerar uma resposta antinociceptiva em ratos (GALDINO; DUARTE; PEREZ, 2010; NAUGLE; FILLINGIM; RILEY, 2012;). Em um estudo que investigou a ação do TF sobre o limiar nociceptivo em animais não submetidos à lesão muscular, demonstrou-se que o TF possui uma ação antinociceptiva, tanto de forma imediata, após o protocolo de TF, como também, a continuidade do treinamento é capaz de gerar uma resposta antinociceptivas até o 45º dia de treinamento (GALDINO; DUARTE; PEREZ, 2010). De acordo com outros estudos, o TF é capaz de gerar uma resposta antinociceptivas através mecanismos envolvendo a via de NO/GMPc/KATP, adrenoceptores α_2 , e opióides endógenos (GALDINO; DUARTE; PEREZ, 2010; GALDINO; DUARTE; PEREZ, 2013; GALDINO et al., 2014; STAGG et al., 2011).

Um dos únicos trabalhos que utilizam o TF como forma de tratamento de lesão foi realizado por (ANTUNES et al., 2012). Diferentemente do modelo utilizado no presente estudo, Antunes et al. (2012) utilizam um modelo de lesão no tendão e o TF realizado em meio aquático. Os resultados apresentados por Antunes et al., (2012) indicam que houve uma pequena melhora no limiar nociceptivo dos animais submetidos ao tratamento com TF. A investigação experimental do TF como uma forma alternativa de tratamento de lesões pode trazer novas perspectivas para de tratamento de lesões musculares, pois leva a uma melhor compreensão dos seus mecanismos de ação e cria possibilidades para sua aplicação na prática clínica, podendo ser implementado em programas de recuperação funcional e em atletas. De acordo com Jones (2015), O TF possui uma ação positiva no controle da dor muscular me pacientes com fibromialgia. Entretanto, são necessárias diversas adaptações envolvendo prescrições de intensidade e volume de treino, que são ajustadas de acordo com a capacidade funcional de cada paciente. Além disso, Jones (2015) propõe que o aumento de carga deve ser progressivo, respeitando as limitações individuais de cada paciente. No presente estudo, a carga e intensidade foram implementadas de forma progressiva e prescritas de acordo com as avaliações de RM de cada animal. Embora o TF tenha apresentado resultados positivos no controle da hiperalgesia após lesões, futuros estudo deverão ser conduzidos para melhor esclarecer a influência de variáveis como a frequência e a intensidade do treinamento sobre a resposta nociceptiva após lesão.

A suplementação com PSL também foi utilizado nesse trabalho como forma de tratamento para a lesão muscular, demonstrando um resultado positivo no controle da nocicepção. Uma das hipóteses sobre os meios de ação do PSL na redução da hiperalgesia

mecânica é baseada na capacidade de reduzir citocinas pró-inflamatórias apresentada pelo PSL (KATO et al., 2015). De acordo com um estudo que investigou a suplementação com leucina em animais submetidos à lesão muscular por contração excêntrica, a suplementação foi capaz de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e melhorou o reparo muscular nos animais com lesão (KATO, et al. 2015). A leucina é um dos principais aminoácidos presentes na PSL e age por meio de receptores específicos ativando a via da mTOR (mammalian target of rapamicin) (GRAN; CAMERON-SMITH, 2011). O trabalho desenvolvido por Kato et al. (2015), demonstrou que a suplementação com leucina reduziu significativamente os níveis de IL-6 e aumentaram a síntese proteica. Acredita-se que esses resultados são provenientes de um aumento da expressão de fatores miogênicos e um aumento na expressão de mTOR, que por sua vez possui uma ação anti-inflamatório em miócitos (DRUMMOND; RASMUSSEN, 2008). Além disso, outro estudo realizado pelos mesmos pesquisadores indicou que a suplementação com leucina é capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica por lesão muscular induzida por contração excêntrica (KATO, et al. 2015). Esse estudo também constatou que a ingestão de leucina aumentou significativamente a expressão de p70S6K1, que é um dos principais fatores de transcrição nuclear da via da mTOR. Dessa forma, esse estudo sugere que o aumento da expressão de p70S6K1 tem um papel fundamental no controle da inflamação e redução da hiperalgesia nos animais submetidos à lesão muscular induzida por contração excêntrica. Entretanto, os resultados encontrados por Kato et al. (2015) referentes ao limiar nociceptivo, foram avaliados apenas até o 3º dia após a lesão, indicando uma ação aguda da suplementação com leucina. Os resultados encontrados pelo presente estudo também apresentam uma ação antinociceptiva, porém com um início após o 10º dia após lesão. Acreditamos que as diferenças encontradas nas respostas, sejam devido ao fato de que os modelos de lesão utilizados também são diferentes. Uma vez que, o modelo de lesão utilizado no presente estudo é um modelo de contusão por impacto mecânico, diferentemente do modelo de lesão por contração excêntrica, podendo assim influenciar diretamente na resposta nociceptiva, bem como na resposta ao tratamento com a suplementação.

A termografia tem sido aplicada como forma de diagnóstico para verificação de inflamações ou algum processo relacionado às variações de temperatura corporal, que ocorrem em alguns estados patológicos como, por exemplo, lesões musculares (AL-NAKHLI et al., 2012). A lesão muscular leva a um processo inflamatório, que é característico por apresentar algum dos sinais cardinais relacionado à inflamação, dentre esses está o aumento da temperatura (FREIRE; VAN DYKE, 2013; DIBBINS, 2018). Por isso foi utilizada como uma

forma indireta de avaliar a inflamação gerada pelo modelo de lesão muscular utilizado no presente estudo. Os resultados encontrados sugerem que houve um aumento significativo na temperatura entre os animais submetidos ao protocolo de lesão muscular em relação aos animais do grupo controle, causando um aumento de aproximadamente 2°C no tecido lesionado. Estudos demonstraram que variações entre 1,5°C já são consideradas sinais de alterações patológicas (RING; AMMER, 2012). O aumento na temperatura local foi identificado no 1º e no 8º dia após a lesão, e não foi encontrado diferença no 15º dia após lesão. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com TF e PSL em relação ao grupo submetido à lesão e não tratado. Esses resultados indicam que embora a lesão muscular cause um aumento de temperatura local, indicando o estado inflamatório do músculo, o tratamento não foi capaz de reduzir a inflamação no tecido a ponto de diminuir a temperatura local. Outros estudos já haviam proposto que lesões musculares causam uma variação de temperatura que pode ser identificada pela termografia (BANDEIRA et al., 2014). Além disso, um dos importantes achados desse estudo é a indicação de uma alta correlação entre a temperatura local e a redução do limiar nociceptivo. Um estudo realizado anteriormente avaliou a lesão muscular induzida por exercício investigou também a os níveis de dor através de escala visual de dor, entretanto não foi demonstrada nenhuma correlação entre essas duas variáveis (AL-NAKHLI et al., 2012). Portanto, o presente estudo apresentou de maneira inédita que há uma correlação entre o aumento de temperatura e a redução do limiar nociceptivo durante a lesão muscular.

As avaliações iniciais referentes à análise dos padrões de marcha indicaram que o protocolo de lesão teve uma influência direta na amplitude articular de movimento e na superfície de contato da pata. Tanto na variável relacionada à amplitude articular de movimento quanto na variável de área de contato da pata, o grupo submetido à lesão muscular apresentou uma redução significativa nos padrões de marcha. A redução na amplitude articular e da área de contato se iniciaram logo no 1º dia após o protocolo de lesão e perdurou até o 15º dia após a lesão muscular. O padrão de marcha tem sido utilizado como forma de avaliar a função muscular durante algum tipo de lesão que pode levar ao acometimento da locomoção do animal (FU et al., 2009; VAREJÃO et al., 2002; LAMBER et al., 2014). Dessa maneira, os padrões relacionados à marcha são uma forma de avaliar outro importante sinal cardinal da inflamação: a perda de função. Além disso, a disfunção causada pela lesão muscular é um dos acometimentos mais comuns e pertinentes para o indivíduo que sofreu algum tipo de lesão tendo em vista que isso influencia diretamente na funcionalidade do

membro acometido e realização de ações cotidianas (ARRINGTON; MILLER, 1995; ZURALES et al., 2016).

O presente estudo encontrou também uma correlação entre as variáveis relacionadas à marcha e a redução no limiar nociceptivo. Quando foi avaliada a variável de amplitude articular de movimento, no grupo submetido à lesão, foi observada uma alta correlação entre a redução do ângulo articular e a redução do limiar nociceptivo, demonstrando que as duas variáveis são diretamente proporcionais. Não foi encontrada nenhuma correlação entre as variáveis no grupo controle. Para a variável de área de contato da pata também foi encontrada uma alta correlação com a redução do limiar nociceptivo no grupo lesionado. Porém, não foi encontrada correlação nenhuma no grupo controle. Esses resultados apontam que a correlação entre as variáveis do padrão de marcha e a variável da resposta nociceptiva dos animais só é encontrada durante a lesão muscular, demonstrando que ambas variáveis são sensíveis para a redução do limiar nociceptivo e alterações no padrão de marcha. Estudos anteriores já demonstraram que a dor influencia diretamente os padrões de marcha de animais e humanos, modificando tanto a distribuição de peso dos membros lesionados, bem como a amplitude de movimento (VANDEN-HOORN et al., 2015; BOUFFARD et al., 2018).

O presente estudo também investigou o efeito do TF e da suplementação com o PSL sobre as variáveis relacionadas aos padrões de marcha dos animais. Os resultados apontam que o tratamento com TF apresentou uma melhora significativa nas alterações de marcha do grupo submetido à lesão. No 8º dia após a lesão muscular, para a variável de amplitude articular de movimento, quando comparado ao grupo lesionado não tratado, foi encontrada uma melhora significativa no ângulo articular no grupo TF e no grupo TF+PSL. Muito embora, essa melhora não foi suficiente para retornar a níveis basais. Quando avaliada a variável de área de contato da pata também foi encontrada uma melhora significativa nos grupos TF e TF+PSL no 8º e no 15º após a lesão. Uma possível explicação para o efeito positivo na marcha encontrado após o treinamento de força é pelo fato da alta correlação entre a variável de nocicepção e as variáveis de marcha. Sendo assim, uma vez que o treinamento de força reduz a hiperalgesia mecânica essa melhora se reflete em uma melhora nos padrões de marcha. Até o presente momento nenhum outro estudo apresentou o TF como uma forma de melhorar os padrões de marcha após a lesão muscular. Entretanto é importante destacar um estudo conduzido por Ilha et al. (2007) que avaliou o TF como forma de tratamento para lesão do nervo ciático investigando alterações nos padrões de marcha dos animais. Embora o modelo de lesão e protocolo de treinamento não sejam os mesmos utilizados no presente estudo os

resultados de Ilha et al. (2007) também encontraram que o treinamento com TF foi eficaz para melhorar os padrões de marcha relacionados à área de contato da pata.

Diferentemente do tratamento com TF o grupo tratado com PSL não apresentou diferença significativa no padrão de marcha em relação ao grupo lesionado não tratado. Portanto para esse modelo de lesão o PSL não apresentou nenhuma melhora nos padrões de marcha. Entretanto, é possível destacar um estudo que investigou algo discretamente semelhante. Esse trabalho conduzido por Kato et al. (2015) investigou a função contrátil muscular após um modelo de lesão induzido por contrações excêntricas, e posteriormente tratado com suplementação com proteína. Diferentemente dos nossos achados, os resultados desse estudo encontraram que o tratamento foi sim eficaz em melhorar a função contrátil do músculo, aumentando significativamente a força de contração e resistência no tempo de contração muscular (KATO et al., 2015). É importante destacar que apesar de ambos os estudos investigarem o uso de suplementação para o tratamento de lesão muscular, existem inúmeras diferenças que certamente influenciam diretamente nos resultados. Dentre elas podemos destacar a diferença entre os modelos de lesão muscular que foram implementados e principalmente as variáveis investigadas, uma vez que os padrões de marcha são respostas comportamentais diferentemente da força de contração muscular que são respostas puramente biomecânicas e fisiológicas do músculo.

Os resultados da análise histológica indicam que o modelo de lesão utilizado causou um aumento significativo no número de células inflamatórias no músculo lesionado. Entretanto, esse aumento da resposta inflamatória durante a lesão muscular já foi demonstrado anteriormente por diversos autores e já é algo bem estabelecido (MIAMOTO; BUNHO; SALVINI, 2001; FALCAI et al., 2010; SAKUMA et al., 2016). Além disso, um importante achado desse estudo aponta que houve uma redução estatisticamente significativa entre os animais submetidos ao tratamento com TF, PSL e TF+PSL em relação aos animais lesionados não tratados. Esse resultado aponta que os tratamentos foram capazes de diminuir, mas não reverter o aumento de células inflamatórias gerado pela lesão muscular.

Estudos anteriores apontam que a suplementação com proteína foi capaz de reduzir o número de células inflamatórias em animais submetidos à lesão muscular por contração excêntrica, bem como reduzir o a expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a expressão de fatores miogênicos (KATO et al., 2015). Em relação ao TF, uma das principais respostas agudas ao exercício de força é um aumento da resposta inflamatória no músculo, que é causada pelo estresse mecânico do exercício gerando o rompimento de pontes cruzadas e microlesões nos miofilamentos de actina e miosina. Entretanto, estudos têm verificado que

embora o exercício de força realizado de forma aguda (apenas uma sessão de exercício) cause um estresse ao músculo, quando realizado de forma contínua (em repetidas sessões) o exercício de força é capaz de auxiliar no remodelamento tecidual, aumento de força e também no aumento de fatores de crescimento que auxiliam no reparo tecidual e uma maior produção de proteínas miofibrilares (KARAGOUNIS, et al. 2010; FRAGALA, et al., 2015). O estudo de Karagounis et al. (2010) demonstra que após uma única sessão de TF os níveis de TNF- α e de p38MAPK aumentaram consideravelmente, entretanto após a terceira sessão de TF, esses números já haviam reduzido para níveis basais. Além disso, os resultados demonstram que as concentrações de proteínas miofibrilares, haviam aumentado significativamente após o 5º dia de TF. Foi encontrado também um aumento significativo de P70S6k fosforilada, que é um dos principais fatores de transcrição da via da mTOR. De uma forma geral os resultados demonstraram uma rápida atenuação na resposta inflamatória depois de repetidas sessões de exercício de força, associada a um aumento da sinalização das vias de transcrição e síntese proteica. Dessa forma, é importante demonstrar que até o presente momento nenhum estudo investigou o TF como forma de tratamento para a lesão muscular, porém o que alguns achados encontraram foi que o exercício de força realizado de forma contínua possui um efeito protetor ao músculo. Embora esse estudo não tenha investigado o efeito do TF em uma condição de lesão muscular, os corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, sugerindo que o efeito acumulativo do TF pode contribuir para adaptações no musculoesquelético e auxiliar no controle da inflamação local.

O lactato sanguíneo foi mensurado em repouso, após a última sessão de exercício da 1ª semana de treinamento (com 50% do RM) e após a última sessão de exercício da 2ª semana (com 80% RM). Dessa maneira os resultados apontam que a média do lactato para todos os grupos foram menores em estado de repouso quando comparados aos exercícios, e também os resultados da primeira semana de treinamento foram menores que na segunda semana de treinamento. Portanto, é possível afirmar que a carga incremental do exercício de força influenciou diretamente na intensidade do treinamento uma vez que a concentração de lactato no sangue é uma das formas mais comuns de controle da intensidade de exercícios de força. Essa relação de intensidade e lactato já haviam sido demonstradas por estar diretamente associada às vias de geração de energia através do glicogênio intramuscular (PANVELOSKI-COSTA et. al., 2012). Além disso, é importante destacar que não houve diferença nas concentrações do lactato entre os grupos quando comparados no mesmo tempo. Dessa forma na MB as concentrações de lactato foram as mesmas para os grupos (controle, lesão, controle+PSL e lesão+PSL), bem como na 1ª e na 2ª semana. Esse resultado demonstra que o

TF apresentou a mesma intensidade para todos os grupos envolvidos no treinamento. Além disso, tais achados corroboram com os resultados encontrados em outro trabalho, que investiga as respostas do TF sobre as concentrações de lactato sanguíneo em ratos, demonstrando que o aumento da carga do exercício (através do aumento da porcentagem do RM) influencia diretamente na intensidade do exercício (PANVELOSKI-COSTA et. al.,2012).

Um dos principais achados do presente estudo é a participação das células gliais espinais na modulação da dor muscular induzida por contusão. Tais respostas foram encontradas através dos resultados iniciais obtidos pelos testes comportamentais após a inibição intratecal da micróglia e astrócito e posteriormente através da análise de western blot. Os resultados comportamentais referentes à participação da micróglia na dor muscular durante os testes farmacológicos apontaram que houve uma reversão da hiperalgesia logo após a administração intratecal de inibidores de micróglia e astrócitos. Portanto, confirmando a participação da micróglia e do astrócito na modulação da dor muscular tanto na primeira como na segunda semana do protocolo. Estudos anteriores, utilizando um modelo de miosite crônica induzido pela administração de CFA, já haviam demonstrado a participação de micróglia e astrócitos na modulação central da dor muscular (ROSA et al., 2017; CHACUR et al., 2009). O trabalho conduzido por Chacur et al. (2009), indica que há um aumento significativo da expressão de micróglia (OX42) após a administração de CFA intramuscular. Além disso, é demonstrado que a administração intratecal de minociclina e anticorpo anti- TNF- α , influencia em uma redução do limiar nociceptivo. Da mesma maneira, o presente estudo não encontrou uma reversão total da hiperalgesia mecânica após a administração de 200 μ g de minociclina, a reversão foi apenas parcial. Acredita-se que tal resposta seja devido ao envolvimento não apenas de micróglia, mas também de astrócitos e processos diretamente neuronais na modulação central da dor. Quanto à administração de anti-TNF- α intratecal, demonstra o que alguns estudos já haviam apontado, que um aumento de citocinas pró-inflamatórias no corno dorsal da medula contribui para amplificação do estímulo nociceptivo contribuindo para sensibilização central (CHACUR et al. 2009; MARCHAND; PERRETTI; MCMAHON, 2005). Outro estudo conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa demonstrou que, além da participação microglial, há um envolvimento do astrócito na modulação da nocicepção induzida por injeção intramuscular de CFA (TENCHERT et al., 2004). Demonstrando, portanto que há uma participação fundamental de células da glia na modulação central da dor muscular.

Além disso, um estudo conduzido por Chen e Nuñez (2010), indicou que há uma ação do sistema imunológico inato que é desencadeada pela ação de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs- pattern recognition receptors) ativada através de fatores liberados pelo tecido exposto ao estresse ou lesão, conhecidos como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs-*damage-associated molecular patterns*) (CHEN; NUÑEZ, 2010). Quando os DAMPs se ligam aos seus PRR cognatos, isso inicia uma resposta inflamatória através de via intracelulares, como a vias das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs - mitogen activated protein kinases), e do fator nuclear kappa B (NFκB - nuclear factor- Kappa B) (CHEN; NUÑEZ, 2010). A ativação dessas vias, por sua vez, leva a um aumento de vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e interleucinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, e IL-10), e espécies reativas de oxigênio (ROS- reactive oxygen species) (ROMERO-SANDOVAL; SWEITZER, 2015; JI et al., 2009). Portanto, contribuindo para a sensibilização central, ativação de células gliais e uma intensificação do estímulo doloroso. Embora o presente estudo não tenha investigado nenhuma via específica de ativação para a ativação das células gliais, foi possível demonstrar que o modelo de lesão muscular utilizado gera respostas a nível central por ativar células gliais.

Por fim, foi investigado também o efeito do TF e da suplementação com PSL sobre a expressão das células da glia espinais em animais submetidos à lesão muscular. Os resultados apresentaram que o TF e TF+PSL foi capaz de impedir o aumento da expressão microglial, e a PSL não teve nenhum efeito sobre a ativação microglial. Já os resultados referentes à expressão de astrócitos, demonstrou que nenhum dos tratamentos foi capaz de melhorar a sua ativação na medula espinal. Embora o efeito do TF sobre o controle central da dor ainda seja desconhecido, alguns estudos apontam que o exercício físico possui efeitos benéficos no controle a neuroinflamação como, por exemplo, aumento de citocinas anti-inflamatórias e uma redução de citocinas pró-inflamatórias e ativação microglial (SVENSSON; LEXELL; DEIERBORG, 2015; EYRE; BAUNE, 2012; DUMAN et al., 2009). Tais estudos apontam que o exercício físico tem um papel fundamental no controle da neuroinflamação em alguns modelos de depressão em animais (EYRE; BAUNE, 2012; DUMAN et al., 2009). É sugerido que o exercício físico é capaz de influenciar diretamente no fenótipo da micróglia, modificando de um caráter pró-inflamatório para o anti-inflamatório (EYRE; BAUNE, 2012; DUMAN et al., 2009).

Além disso, alguns estudos destacam um papel neuroprotetor do exercício físico sobre ratos idosos, demonstrando uma melhora na ativação de células gliais (KOHMAN et al., 2012; KOHMAN et al., 2013; LITTLEFIELD et al., 2015). Um estudo conduzido por

Kohman et al. (2012), investigou o efeito do exercício voluntário sobre a ativação microglial em camundongos adultos e idosos. Os resultados indicaram que animais com maior idade, apresentavam um aumento da expressão de microglias e o exercício voluntário realizado na roda de corrida reduziu a expressão de micróglias em relação aos animais não exercitados. Outro estudo conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa demonstrou que o exercício voluntário foi eficaz no controle da neuroinflamação induzida por LPS, aumentando a expressão de micróglias associadas um fenótipo neuroprotetor (KOHMAN et al. 2013). Embora esses estudos não investiguem a ação direta da microglia na modulação da nocicepção, é possível sugerir que o exercício físico possui uma ação neuroprotetora, e que essa neuroproteção influencia diretamente a ativação microglial. Portanto, o exercício físico voluntário é capaz de influenciar positivamente, a ativação microglial em situações de neuroinflamação.

Pouco é conhecido sobre a influência do exercício físico sobre as células gliais na sensibilização central e na modulação da dor a níveis espinhais. Estudos têm demonstrado que o exercício físico possui ações distintas sobre a ativação de células da glia espinhais, podendo tanto aumentar quanto diminuir sua ativação. Um estudo experimental conduzido por Pereira et al. (2015) indica que o exercício físico excêntrico realizado de forma extenuante por prolongado período de tempo simula estados de overtraining, e isso aumenta a hiperalgesia mecânica e também a ativação de células gliais espinhais. Entretanto, outros estudos têm demonstrado que o exercício físico em esteira, realizado de forma moderada e curta duração, pode ser capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e a ativação de células gliais na medula espinhal (KAMI et al., 2016; COBIANCHI et al., 2010). Esses achados indicam que o exercício físico é capaz de influenciar diretamente na ativação glial e na modulação da nocicepção, e também que a diferença na intensidade e volume do treinamento pode ser determinante para a resposta do exercício em relação à analgesia e ativação glial.

O estudo conduzido por Cobianchi et al. (2010) indica que o exercício físico de corrida em esteira realizado em curta (7 dias) e longa duração (17 dias) foram capazes de reduzir a alodinia mecânica induzida por constrição do nervo ciático. Adicionalmente, os resultados apontaram que o exercício realizado tanto em curta, quanto em longa duração foram capazes de reduzir a ativação microglial após lesão no nervo. Já a ativação de astrócitos foi reduzida apenas nos exercícios realizados em curto prazo, e permaneceu a mesma nos exercícios realizados em longo prazo. Tais resultados corroboram para os achados no presente estudo, uma vez que o TF foi capaz de gerar uma inibição da ativação microglial, e não houve redução de astrócitos, uma vez que avaliamos o efeito do tratamento apenas em longo prazo

(15 dias). Portanto, como não avaliamos o efeito do tratamento em curto prazo, não é possível afirmar que o TF também teria influência na ativação glial assim como foi indicado por Cobianchi et al. (2010).

Um estudo mais recente conduzido por Kami et al. (2016), indica que o exercício em esteira é capaz gerar respostas antinociceptiva e também de controlar acetilação de histonas em microglias, modulando a nocicepção na medula espinal. A acetilação de histonas através das histonas acetiltransferases gera um relaxamento da cromatina e facilitação de transcrição de genes específicos, já a desacetilação através de histonas desacetilases causam uma condensação da cromatina e conseqüentemente uma redução da transcrição de genes alvo. Kami et al. (2016) apontam que o exercício físico em esteira é capaz de aumentar acetilação (H3K9) e reduzir a desacetilação (HDAC1) de histonas em micróglias ativadas na medula espinal, contribuindo para uma característica anti-inflamatória da micróglio, aumentando a liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10. Não foi encontrada diferença em astrócitos. Esses resultados indicam que o exercício físico é capaz de influenciar positivamente respostas antinociceptiva através da acetilação de histonas em micróglias e não em astrócitos. Tais estudos são de fundamental importância para uma melhor compreensão do efeito do exercício físico no controle da nocicepção através das células gliais. Embora o presente estudo tenha utilizado o TF ao invés de exercício em esteira, os resultados também indicam uma ação positiva do exercício físico sobre o controle da nocicepção através de células gliais.

O presente estudo é o primeiro a apontar uma possível ação do TF sobre o controle da dor através da micróglio espinal. Até o presente momento, nenhum outro estudo investigou o efeito do TF sobre mediadores inflamatórios na medula, nem mesmo o efeito do TF sobre a ação da micróglio durante a dor muscular, por isso não existem claras indicações de qual seria a possível via de ação do TF sobre a ativação microglial. Portanto, para um melhor entendimento do efeito do TF na participação das células da gliais na modulação da nocicepção à níveis espinhais, algumas questões devem ser melhor elucidadas como por exemplo, o efeito do volume e intensidade do TF, características pró e anti-inflamatórias das células gliais e também vias específicas de ação do TF. Por isso, futuros experimentos deverão ser conduzidos para melhor esclarecer algumas questões que permanecem sem respostas.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que o TF e a suplementação com PSL podem auxiliar no tratamento da lesão muscular, pois possuem uma ação positiva no controle da hiperalgesia e inflamação. Foi observado também que há uma participação das células gliais no modelo de lesão muscular por contusão que foi utilizado no presente estudo e que o treinamento de força pode inibir essa participação.

REFERÊNCIAS

AKANKSHA, B.; ARJUN, C.; CILA, H. Heat transfer model for deep tissue injury: a step towards an early thermographic diagnostic capability. **Diagnostic Pathology**, v. 9, n. 36, 2014.

ALENTORN- GELI, E. et al. Prevention of non-contact anterior cruciate ligament injuries in soccer players. Part 2: a review of prevention programs aimed to modify risk factors and to reduce injury rates. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 17, n. 8, p. 859-79, 2009.

ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189-212, 2013.

ALESSANDRINO, F.; BALCONI, G. Complications of muscle injuries. **Journal of Ultrasound**, v. 16, n. 4, p. 215–222, 2013.

ALLEN, N. J.; EROGLU C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. **Neuron**, v. 96, n. 3, p. 697-708, 2017.

ALMEKINDERS, L. C. Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies. **Sports Med**, v. 28, n. 6, p. 383-388, 1999.

AL-NAKHLI, H. H. et al. The Use of Thermal Infra-Red Imaging to Detect Delayed Onset Muscle Soreness. **Journal of Visualized Experiments**, v. 59, 2012.

AMARAL, A. C.; PARIZOTTO, N. A.; SALVINI, T. F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. **Lasers in Medical Science**, v. 16, n. 1, p. 44-51, 2001.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine & Science in Sports & Exercised**, v. 41, n. 3, p. 687-708, 2009.

ANTUNES, J. et al. Exercício resistido em meio aquático para ratos Wistar submetidos a trauma em tendão: avaliação da nocicepção e edema. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 55–58, 2012.

ARMSTRONG, R. B.; Ogilvie, R. W.; Schwane, J. A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environment and Exercise Physiology**. v. 54, n. 1, p. 80–93, 1983.

ARRINGTON, E. D.; MILLER, M. D. Skeletal muscle injuries. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 411–422, 1995.

ASGAR, J. et al. The role of TRPA1 in muscle pain and mechanical hypersensitivity under inflammatory conditions in rats. **Neuroscience**, v. 310, p. 206–215, 2015.

AYOUB, A. E.; SALM, A. K. Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 21, p. 7759–7766, 2003.

BALDARI, C. et al. Accuracy, reliability, linearity of Accutrend and Lactate Pro versus EBIO plus analyzer. **European Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 1, p. 105–111, 2009.

BANDEIRA, F. et al. A termografia no apoio ao diagnóstico de lesão muscular no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.20, n.1, p. 59-64, 2014.

BAOGE, L. et al. Treatment of Skeletal Muscle Injury: A Review. **International Scholarly Research Network Orthopedics**, v. 2012, p.1-7, 2012.

BARROSO, G. C.; Thielle, E. S. Muscle injuries in athletes. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 4, p. 354-58, 2011.

BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 19–37, 2006.

BLEAKLEY, C. M. et al. The PRICE study (Protection Rest Ice Compression Elevation): design of a randomised controlled trial comparing standard versus cryokinetic ice applications in the management of acute ankle sprain. **Musculoskeletal Disorder**, v. 125, n. 8, 2007.

BORATO, E. Avaliação imediata da dor e edema em lesão muscular induzida por formalina e tratada com laser 808 nm. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 5, p. 446-449, 2008.

BOUFFARD, J. et al. Effect of experimental muscle pain on the acquisition and retention of locomotor adaptation: Different motor strategies for a similar performance. **Journal of Neurophysiology**. v. 119, n. 5, p. 1647-1657, 2018.

BURKE, D. G. et al. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. **International Journal of Sports, Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 11, n. 3, p. 349-64, 2001.

CAMERON, M. H. **Physical agents in rehabilitation: from research to practice**. 4th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders, 2013.

CHACUR, M. et al. Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: An immunohistochemical and behavioural study in rats. **European Journal of Pain**. v.13, n.1, p. 915-923, 2009.

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v. 353, p. 2233–2237, 1999.

CHEN, G.Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–837, 2010.

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

COOKE, M. B. et al. Whey protein isolate attenuates strength decline after eccentricity-induced muscle damage in healthy individuals. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, n. 30, p. 1-9, 2010.

COSTA, R. A.; SQUARES, H. L. R.; TEIXEIRA, J. A. C. Benefícios da atividade física e do exercício físico na depressão. **Revista do Departamento de Psicologia**, v. 19, n. 1, p. 269-276, 2007.

CRIBB, P. J. et al. Effects of whey isolate, creatine, and resistance training on muscle hypertrophy. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, p. 298-307, 2007.

CRISCO, J. J. et al. A muscle contusion injury model. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 22, n. 5, p. 702-710, 1994.

DRUMMOND, M. J.; RASMUSSEN, B. B. Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signalling and human skeletal muscle protein synthesis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, n. 3, p. 222–226, 2008.

DUMAN, C. et al. Peripheral insulin-like growth factor-I produces antidepressant-like behavior and contributes to the effect of exercise. **Behavior Brain Research**. v. 198, p. 366-371, 2009.

EYRE, H.; BAUNE, B. Neuroimmunological effects of physical exercise in depression. **Brain Behavior Immunology**. v. 26, p. 251-266, 2012.

FALCAI, M. J. et.al. Análise biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidas à lesão muscular e tratados com laserterapia de baixa intensidade. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 4, p. 444-448, 2010.

FARUP, J. et al. Whey protein supplementation accelerates satellite cell proliferation during recovery from eccentric exercise. **Amino Acids**, v. 46, p. 11, p. 2503-2516, 2014.

FERNANDES, L. T.; PEDRINELLI, A.; HERNANDEZ, A. J. Muscle Injury- Physiopathology, diagnosis, treatment and clinical presentation. **Revista brasileira de ortopedia**, v.46, n.3, p. 247-255, 2011.

FRAGALA, M. et al. Leukocyte IGF-1 Receptor Expression during Muscle Recovery. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 47, n. 1, p. 92–99, 2015.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology** 2000, v.63, n. 1, p. 149-164, 2013.

FU, K. Y. et al. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. **Brain Research**, v. 825, n. 1–2, p. 59–67, 1999.

FU, K. Y.; Light, A. R.; Maixner, W. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. **Neuroscience**, v. 101, n. 4, p. 1127–35, 2000.

FU, S-C. et al. The use of motion analysis to measure pain-related behaviour in a rat model of degenerative tendon injuries. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 179, p. 309-318, 2009.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016.

GALDINO, G. et al. Acute resistance exercise induces antinociception by activation of the endocannabinoid system in rats. **Anesthesia and Analgesia**, v. 119, n. 3, p. 702-715, 2014.

GALDINO, G. et al. The Nitric oxide/CGMP/KATP pathway mediates systemic and central antinociception induced by resistance exercise in rats. **International Journal of Neuroscience**, v. 125, n. 10, p. 765–773, 2014.

GALDINO, G. S., DUARTE, I. D. G., PEREZ, A. C. Participation of endogenous opioids in the antinociception induced by resistance exercise in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 9, p. 906–909, 2010.

GALDINO, G.S.; DUARTE, I. D.; PEREZ, A. C. Differential Involvement of Central and Peripheral α_2 Adrenoreceptors in the Antinociception Induced by Aerobic and Resistance Exercise. **Anesthesia & Analgesia**, v. 116, n. 3, p. 703–711, 2013.

- GIBBINS, I. The five cardinal signs of inflammation. **The Medical Journal of Australia**, v. 208, n.7, p. 295, 2018.
- GIGANTE, A. et al. The effects of growth factors on skeletal muscle lesions. **Joints**, v.4, n.1, p.180-186, 2014.
- GRAN, P.; CAMERON-SMITH, D. The actions of exogenous leucine on mTOR signalling and amino acid transporters in human myotubes. **BMC Physiology**, v. 11, n. 1, p. 10, 2011.
- GUAN, Z.; HELLMAN, J.; SCHUMACHER, M. Contemporary views on inflammatory pain mechanisms: TRPing over innate and microglial pathways Faculty Rev), **F1000Research**, v. 5, p. 1-20, 2016
- HARAGUCH, F. K.; ABREU, W. C. A.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.
- HAYASHI, D. et al. Traumatic injuries of thigh and calf muscles in athletes: role and clinical relevance of MR imaging and ultrasound. **Insights Imaging**, v. 3, n. 6, p. 591-601, 2012.
- HOOTEN, W. M. et al. Effects of strength vs. aerobic exercise on pain severity in adults with fibromyalgia: a randomized equivalence trial. **Pain**, v. 153, n. 4, p. 915-923, 2012.
- HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: A new technique. **European Journal of Pharmacology**, v. 67, n. 2-3, p. 313-316, 1980.
- ILHA, J. et al. Endurance and Resistance Exercise Training Programs Elicit Specific Effects on Sciatic Nerve Regeneration After Experimental Traumatic Lesion in Rats. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 22, n. 4, p. 355-366, 2007.
- JÄRVINEN, T. A. H. et al. Muscle injuries: Biology and treatment. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 5, p.745-764, 2005.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? **Pain**, v. 154, p. S10–S28, 2013.

JI, R.R. et al. MAP kinase and pain. **Brain Research Reviews**, v.60, n.1, p.135–148, 2009.

JIANG, L. J. et al. A perspective on medical infrared imaging. **Journal of Medical Engineering & Technology**, v. 29, n. 6, p. 257-267, 2005.

JONES, K. D. Recommendations for resistance training in patients with fibromyalgia. **Arthritis Research and Therapy**, v. 258, n. 17, p. 1-2, 2015.

KAMI, K. et al. Histone Acetylation in Microglia Contributes to Exercise-Induced Hypoalgesia in Neuropathic Pain Model Mice. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 5, p. 588–599, 2016.

KARAGOUNIS, L. et al. Contraction-induced changes in TNF α and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 5, p. 839–848, 2010.

KASTBERGER, G.; STACHL, R. Infrared imaging technology and biological applications. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v.35, n.3, p.429-429, 2003.

KATO, H. et al. Leucine-enriched essential amino acids attenuate inflammation in rat muscle and enhance muscle repair after eccentric contraction. **Amino Acids**, v. 48, n. 9, p. 2145-2155, 2016.

KATO, H. et al. Leucine-enriched essential amino acids attenuate muscle soreness and improve muscle protein synthesis after eccentric contractions in rats. **Amino Acids**, v. 47, n. 6, p. 1193–1201, 2015.

KIM, S. B. et al. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6 ,p. 625-631, 2007.

KOHMAN, R. A. et al. Exercise reduces activation of microglia isolated from hippocampus and brain of aged mice. **Journal of Neuroinflammation**, v.10, n. 1, p 2-9, 2013.

KOHMAN, R. A. et al. Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 5, p. 803–810, 2012.

KYPAROS, A. et al. A decrease in soleus muscle force generation in rats after downhill running. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 26, n. 4, p. 323–335, 2001.

LAMBERT, C. S. et al. Gait analysis and the cumulative gait index (CGI): Translational tools to assess impairments exhibited by rats with olivocerebellar ataxia. **Behavioural Brain Research**, v. 274, p. 334–343, 2014.

LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–170, 1990.

LEE, J. C.; MITCHELL, A. W. M.; HEALY, J. C. Imaging of muscle injury in the elite athlete. **The British Journal of Radiology**, v. 85, n. 1016, p. 1173-1185, 2012.

LITTLEFIELD, A. M. et al. Voluntary exercise attenuates LPS-induced reductions in neurogenesis and increases microglia expression of a proneurogenic phenotype in aged mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2015.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

LOLLO, P. C. B.; AMAYA-FARFAN, J.; CARVALHO-SILVA, L. B. Physiological and physical effects of different milk protein supplements in elite soccer players. **Exercise Physiology & Sports Medicine**, v. 30, p. 49–57, 2011.

LONGO, U. G. et al. Tissue Engineered Strategies for Skeletal Muscle Injury. **Stem Cells International**, v. 2012, n. 2012, p.1-9, 2012.

MACEDO, A. C. B. et al. Acute effects of gastrocnemius muscle stretching after contusion in rats. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 21, n. 1, p. 53-59, 2016.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the Immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 521–532, 2005.

MARKOVIC, G.; MIKULIC, P. Neuro-Musculoskeletal and Performance Adaptations to Lower-Extremity Plyometric Training. **Sports Medicine**, v. 40, n. 10, p. 859-895, 2010.

McBRIER, N. M. et al. Reliability and Validity of a Novel Muscle Contusion Device. **Journal of Athletic Training**, v. 44, n. 3, p. 275–278, 2009.

MENSE, S. Muscle Pain: Mechanisms and Clinical Significance. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 105, n. 12, p. 214–219, 2008.

MILLER, F. D.; GAUTHIER, A. S. Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. **Neuron**, v. 54, p. 357–369, 2007.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009.

MINAMOTO, V. B.; BUNHO, S. R.; SALVINI, T. F. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1447-1452, 2001.

MINAMOTO, V. B.; GRAZZIANO, C. R.; SALVINI T. F. Effect of Single and Periodic Contusion on the Rat soleus Muscle at Different Stages of Regeneration. **The Anatomical Record**, v. 254, n. 2, p. 281–287, 1999.

MONTALTI, C. S. et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on injured skeletal muscle. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v.17, n.4, p. 2013

MORRISON, H.; FILOSA, J. A. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 1-20, 2013.

NAKAZATO, K.; OCHI, E.; WAGA, T. Dietary apple polyphenols have preventive effects against lengthening contraction-induced muscle injuries. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 3, p. 364-372, 2010.

NAUGLE, K. M.; FILLINGIM, R. B.; RILEY, J. L. A meta-analytic review of the hypoalgesic effects of exercise. **The Journal of Pain**, v. 13, n. 12, p. 1139–1150, 2012.

NOVAES, R. D. et al. Trypanosoma cruzi infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 4, p. 270–279, 2013.

O'CALLAGHAN, J. P.; SRIRAM, K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 4, n. 3, p. 433-442, 2005.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Cytokines and Pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.6, n.2, p. 255-265, 2011.

OSHAWA, K. et al. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 3073-3084, 2000.

PACHIONI, C. A. S. et al. Stretch Injuries of Skeletal Muscles: Experimental Study in Rats' Soleus Muscle. **International Journal of Morphology**, v. 27, n. 4, p. 1139-1146, 2009.

PANVELOSKI-COSTA, A. C. et al. Respostas lactacidêmicas de ratos ao treinamento intermitente de alta intensidade. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 2, p. 122-125, 2012.

PEREIRA, B. et al. Eccentric Exercise Leads to Glial Activation but not Apoptosis in Mice Spinal Cords. **International Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 5, p. 378–385, 2015.

PEREIRA, M.I.R; GOMES, P.S.C. Muscular strength and endurance tests: reliability and prediction of one repetition maximum - Review and new evidences. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 9, n.5, 2003.

PERRY, V. H.; Gordon, S. Macrophages and the nervous system. **International Review of Cytology**, v. 125, p. 203–244, 1991.

PÍO-HORTEGA, J. The discoveries of microglia and oligodendroglia: Pío del Río-Hortega and his relationships with Achúcarro and Cajal (1914-1934). **Neurosciences and History** 2013, v. 1, n. 4, p. 176-190, 2013.

PORTER, T.; RUSHTON, A. The efficacy of exercise in preventing injury in adult male football: a systematic review of randomised controlled trials. **Sports Medicine**, v. 1, n. 1, 2015.

POSTLE, K.; PAK, D.; SMITH, T. O. Effectiveness of proprioceptive exercises for ankle ligament injury in adults: a systematic literature and meta-analysis. **Manual Therapy**, v. 17, n. 4, p. 285-291, 2012.

PRATT, S. J. P. et al. An in vivo rodent model of contraction-induced injury in the quadriceps muscle. **Injury**, v. 43, n. 6, p. 788-793, 2012.

PULL, M. R.; RANSON, C. Eccentric muscle actions: Implications for injury prevention and rehabilitation. **Physical Therapy in Sport**, v. 8, n. 2, p. 88–97, 2007.

PUNTEL, G. O. et al. Therapeutic cold: an effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. **Free Radical Research**, v. 45, n. 2, p. 125-38, 2011.

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

RAHUSEN, F. T.; WEINHOLD, P. S.; ALMEKINDERS, L. C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury. **American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 8, p. 1856-1859, 2004.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 119–145, 2009.

RANTANEN, J. et al. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. **American Journal of Sports Medicine**, v. 27, n. 1, p. 54-59, 1999.

RING, E.F.J.; Ammer, K. Infrared thermal imaging in medicine. **Physiology Measurement**, v.33, n.3, p. 33 – 44, 2012.

RIVA, D. et al. Proprioceptive Training and Injury Prevention in a Professional Men's Basketball Team: A Six-Year Prospective Study. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 30, n. 2,p. 461-475, 2016.

ROMERO-SANDOVAL, E.; SWEITZER, S. Nonneuronal Central Mechanisms of Pain. *Molecular and Cell Biology of Pain*, **Elsevier**, p. 325–358, 2015.

ROSA, A. et al. Gabapentin decreases microglial cells and reverses bilateral hyperalgesia and allodynia in rats with chronic myositis. **European Journal of Pharmacology**, v. 799, p. 111–117, 2017.

SACHARUK, V. Z. et al. Thermographic evaluation of hind paw skin temperature and functional recovery of locomotion after sciatic nerve crush in rats. **Clinics**, v. 66, n. 7, p. 1259–1266, 2011.

SAKUMA, Y. et al. Muscle injury in rats induces upregulation of inflammatory cytokines in injured muscle and calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia innervating the injured muscle. **Muscle & Nerve**, v. 54, n. 4, p. 776–782, 2016.

SANCHIS-SÁNCHEZ, E. et al. Infrared Thermal Imaging in the Diagnosis of Musculoskeletal Injuries: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Roentgenology**, v. 203, n. 4, p. 875–882, 2014.

SHI, M. et al. Acceleration of Skeletal Muscle Regeneration in a Rat Skeletal Muscle Injury Model by Local Injection of Human Peripheral Blood-Derived CD133-Positive Cells. **Stem Cells**, v. 27, p. 949-960, 2009.

SHU, B. et al. Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 62, p. 329-36, 2012.

SMITH, C. et al. The inflammatory response to skeletal muscle injury: Illuminating complexities. **Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 11, p.947-969, 2008.

SOUZA, J.; GOTTFRIED, C. Muscle injury: Review of experimental models. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 23, p. 1253-1260, 2013.

STAGG, N. et al. Regular Exercise Reverses Sensory Hypersensitivity in a Rat Neuropathic Pain Model. **Anesthesiology**, v. 114, n. 4, p. 940- 948, 2011.

SUNDELL, J.; HULMI, J.; ROSSI, J. Whey protein and creatine as nutritional supplements. **Duodecim**, v. 127, n. 7, p. 700-705, 2011.

SVENSSON, M.; LEXELL, J.; DEIERBORG, T. Effects of Physical Exercise on Neuroinflammation, Neuroplasticity, Neurodegeneration, and Behavior. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 29, n. 6, p. 577–589, 2014.

TAMAKI, T.; UCHIYAMA, S.; NAKANO, S. A. Weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. **Med Sci Sports Exer.** v.24 p., 881-886., 1992.

TAVES, S. et al. Microglia and Spinal Cord Synaptic Plasticity in Persistent Pain. **Neural Plasticity**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

TENA, B. et al. Reproducibility of Electronic von Frey and von Frey Monofilaments Testing. **The Clinical Journal of Pain**, v. 28, n. 4, p. 318–323, 2012.

TENSCHERT, S. et al. Effects of a chronic myositis on structural and functional features of spinal astrocytes in the rat. **Neuroscience Letters**, v.361, n.3, p.196–199, 2004.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, p. 345–353, 2005.

TIPTON, K. G. Nutritional Support for Exercise-Induced Injuries. **Sports Medicine**, v. 45, Suppl 1: S93–S104, 2015.

TJALKENS, R. B.; POPICHAK, K. A.; KIRKLEY, K. A. Inflammatory Activation of Microglia and Astrocytes in Manganese Neurotoxicity. **Advances in Neurobiology**, v. 18, p. 159-181, 2017.

TREMBLAY, M-È. et al. The role of microglia in the healthy brain. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 45, p. 16064–16069, 2011.

TYLER, T. F. et al. The Effectiveness of a Preseason Exercise Program to Prevent Adductor Muscle Strains in Professional Ice Hockey Players. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 30, n. 5, p. 680-683, 2002.

VAN-DER-HOORN, W. et al. Effect of noxious stimulation to the back or calf muscles on gait stability. **Journal of Biomechanics**, v. 48, n.15, p. 4109-4115, 2015.

VAREJÃO, A. S. P. et al. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. **Muscle & Nerve**, v.26, n. 5, p. 630-635, 2002.

WITVROUW, E. et al. Stretching and Injury Prevention An Obscure Relationship. **Sports Medicine**, v. 34, n. 7, p. 443-449, 2004.

ZHANG, F. et al. Selective activation of microglia in spinal cord but not higher cortical regions following nerve injury in adult mouse. **Molecular Pain**, v. 4, article 15, 2008.

ZIMMERMANN, K. et al. Central Projection of Pain Arising from Delayed Onset Muscle Soreness (DOMS) in Human Subjects. **PLoS One**, 2012; v. 7, n. 10, 2012.

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

ZUO, Q. et al. Response of macrophages in rat skeletal muscle after eccentric exercise. **Chinese Journal of Traumatology**, v. 21, n. 2, p. 88–95, 2018.

ZURALES, K. et al. Gait Efficiency on an Uneven Surface Is Associated with Falls and Injury in Older Subjects with a Spectrum of Lower Limb Neuromuscular Function. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 95, n. 2, p. 83–90, 2016.

ANEXO

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG <small>Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063</small>	
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL		

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Contribuição da Whey Protein e da Melatonina para a Modulação das Células da Glia na dor Muscular tardia induzida Exercício Agudo em Ratos", registrada com o nº 19/2018, sob a responsabilidade de Giovane Galdino de Souza, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 28/05/2018 a 10/04/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	168
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 28 de Maio de 2018.


Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299-1003

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 661/2015, sob responsabilidade de Giovane Galvão de Souza, referente ao projeto "Investigação da eficácia dos exercícios de força e da ingestão de Whey Protein em ratos com lesão muscular", está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL) em 09 de julho de 2015.

Alfenas, 10 de julho de 2015.

Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira
Presidente CEUA/UNIFAL