

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITOS DO DICLOFENACO SOBRE MARCADORES
INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS
SUBMETIDOS A CONSECUTIVOS SETS EXAUSTIVOS**

TESE DE DOUTORADO

Flávia Mariel Steckling

Orientador: Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

Santa Maria, RS, Brasil 2021

**EFEITOS DO DICLOFENACO SOBRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS A CONSECUTIVOS SETS
EXAUSTIVOS**

Flávia Mariel Steckling

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

Santa Maria, RS,

Brasil 2021

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Steckling, Flávia Mariel
EFEITOS DO DICLOFENACO SOBRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS A CONSECUTIVOS SETS
EXAUSTIVOS/ Flávia Mariel Steckling - 2021
89 p.; 30cm

Orientador: Félix Alexandre Antunes Soares
Coorientador: Luiz Fernando Freire Royes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2015

1. Exercício agudo 2. Exaustão 3. Diclofenaco 4.
Estresse Oxidativo 5. Inflamação I. Soares, Félix
Alexandre Antunes II. Royes, Luiz Fernando Freire
III. Título.

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**EFEITOS DO DICLOFENACO SOBRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS A CONSECUTIVOS SETS
EXAUSTIVOS**

elaborada por
Flávia Mariel Steckling

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora:

**Félix Alexandre Antunes Soares, Dr.
(Presidente/Orientador)**

Cristina Wayne Nogueira, Dr^a. (UFSM)

Alvaro Reischak de Oliveira, Dr. (UFRGS)

Mauro Schneider de Oliveira, Dr. (UFSM)

Leonardo Magno Rambo, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 07 de julho de 2021.

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Poderia ser uma narrativa de um caminho tranquilo, cheio de alegria e flores, mas não foi. Foi difícil, duro e me colocou a prova inúmeras vezes. Foi por mim, mas foi muitas vezes mais por eles do que por mim.

A minha mãe, obrigada por não medir esforços, por abrir mão de tanto pelo meu bem estar. Por ser porto seguro, acalento e calma. Aos meus irmãos, obrigada por segurar as pontas, por desatar nós, por facilitar a jornada e pelo carinho. A lembrança fraterna do meu Pai que sempre me fortaleceu. Foi por vocês, inúmeras vezes só por vocês! Dinda, Thaly, Adri obrigada pelo incentivo, por expressarem orgulho pelo que faço, vocês me fizeram ver um lado que eu não reconhecia. A Lia, minha irmã de alma, amiga obrigada por segurar as pontas, pelas conversas sem fim, pelas comidinhas quentes, por sempre estar aqui!

Aos colegas de laboratório: Tássia e Dani obrigada por me tratarem com respeito, apesar de todos os pesares. Aos queridos do BIOEX: Will, Rafa, Judit, Leandro, Godinho, Alexandre, Gabriel (aos ICs Mari e Eduardo) obrigada por toda troca de conhecimento, por me permitirem sentir parte de algo, pelas risadas e principalmente pela paciência. Agradecimento especial ao prof Luiz Fernando (Nando) pelas orientações, acessibilidade e por todo conhecimento compartilhado. E a prof Michele por tanto carinho e ajuda e sensibilidade, obrigada pelas aulas de estatística, levarei vocês como referência de profissionais e de seres humanos.

Ao BIOEX também agradeço por colocar no meu caminho dois amigos que fizeram parte da minha formação e espero que sejam parte para o resto da vida. Juliano, obrigada por tanto, por ler e reler cada versão dos textos, por me tratar com respeito, pelo carinho e incentivo. Fred (cabeção), sempre disposto a fazer qualquer coisa para ajudar, tu é o cara! E do BIOEX também veio meu amor, Vida obrigada por tanto, obrigada pela paciência nos experimentos, por todo conhecimento compartilhado, pelas madrugadas nadando rato, por fazer as coisas darem certo. Obrigada por todo amor nesse tempo, obrigada por ser um porto, por acalmar minha loucura, te amo mais que tudo!

Essa história toda poderia começar por aqui, por agradecer a duas pessoas que não me deixaram desistir. Se hoje tenho o prazer de encerrar esse ciclo, se deve ao Silvio e ao prof Félix. Lembro das conversas como se fosse hoje, o Silvio me dizendo com todo carinho que sim, as pessoas vão querer te derrubar, mas que eu poderia ser mais forte, que não preciso provar nada a ninguém e que deveria tentar mil vezes se preciso fosse até conseguir! Ao meu orientador, coube aquela outra conversa no banco, obrigada por literalmente pegar na minha mão e mandar (sim, o senhor é desses) que não desistisse. Eu ainda não entendo o que o senhor

viu na guria que saiu de Iraceminha, que não sabe pipetar e não sabia nada de bioquímica. Obrigada por abrir a porta do laboratório, por me permitir crescer, por me conduzir nesse mundo, por me tirar da zona de conforto. Não me tornei uma cientista, mas sou uma pessoa muito melhor depois de vocês.

EPÍGRAFE

“A causa da derrota não está nos obstáculos, ou no rigor das circunstâncias, está na falta de determinação e na desistência da própria pessoa.”

Buda

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica Universidade
Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS DO DICLOFENACO SOBRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS A CONSECUTIVOS SETS EXAUSTIVOS

AUTOR: Flávia Mariel Steckling

ORIENTADOR: Félix Aleandre Antunes Soares

Local e data da defesa: Santa Maria, 7 de julho de 2021.

Sessões de exercício físico representam um estresse por alterar a homeostase corporal. O elevado consumo de oxigênio durante o exercício físico aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e proteínas pró-inflamatórias, resultando em um quadro de estresse oxidativo e inflamação de caráter agudo e transitório. Atualmente, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), incluindo o diclofenaco, têm sido amplamente usados em competições esportivas. Considerando que atletas participam de provas consecutivas de alta intensidade e curta duração e que essas podem levar à sensação de dor e processo inflamatório, muitos competidores usam AINEs como recursos ergogênicos ou até mesmo para evitar perdas de *performance* durante suas provas. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do uso de diclofenaco nos tecidos durante consecutivos *sets* exaustivos de natação. Levando em consideração a especificidade do esporte, a maioria dos estudos associam exercício físico e músculo esquelético, embora as respostas adaptativas ao exercício físico não sejam restritas ao tecido muscular. Considerando o importante papel do fígado durante o exercício, um objetivo desta tese foi analisar os efeitos do diclofenaco sobre marcadores hepáticos, e em um segundo momento, sobre marcadores musculares, de estresse oxidativo, dano tecidual e inflamação em ratos sedentários submetidos a consecutivos *sets* de nado forçado. No artigo, destacamos o papel do diclofenaco em modular as respostas de estresse oxidativo e inflamação e adaptações causadas pelo exercício de alta intensidade em fígado. O protocolo experimental foi realizado com 4 grupos distintos: sedentário-salina, sedentário- diclofenaco, exaustão-salina e exaustão-diclofenaco. Os animais dos grupos exercício foram submetidos a 3 sets consecutivos de natação, separados com 48 horas de intervalo entre eles e os grupos tratados receberam diclofenaco (10 mg/kg) ao longo do protocolo. Identificamos aumentos significativas nos níveis de TBARS e na razão GSH/GSSG, e um aumento nos níveis dos marcadores inflamatórios TLR4, MyD88, IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF- γ após exercício exaustivo. Todas essas alterações foram revertidas pelo tratamento com diclofenaco. No manuscrito, destacamos o papel modulador do diclofenaco sobre as respostas de dano, estresse oxidativo, e inflamação gerada por exercício no músculo esquelético. O protocolo consistiu nos mesmos 3 sets consecutivos de natação, separados por 48 horas, em ratos tratados com salina ou diclofenaco (10 mg/kg) (grupos: sedentário-salina, exaustão-salina, sedentário-diclofenaco, exaustão-diclofenaco). Após o exercício, foi identificado um aumento nos níveis de TBARS, DCFH-DA e diminuição na razão de GSH/GSSG, e aumentos nos níveis dos marcadores COX-2, TLR4, MyD88, NF κ B, IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF- γ e aumento na expressão gênica iNOS. Essas respostas geradas pelo exercício exaustivo foram atenuadas pelo tratamento com diclofenaco. Os dados obtidos nos permitem concluir que o diclofenaco interfere nos marcadores oxidativos/inflamatórios em respostas adaptativas geradas pelo exercício físico no tecido muscular e hepático, adiando a fadiga e paralelamente alterando os mecanismos necessários para adaptação dos tecidos frente ao exercício físico de natação.

Palavras-chave: Natação, AINEs, Estado Redox, Inflamação, Fígado, Músculo.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Biology Science: Toxicological
Biochemistry Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF DICLOFENAC ON INFLAMMATORY MARKERS AND OXIDATIVE STRESS IN RATS SUBJECTED TO CONSECUTIVE EXHAUSTIVE SETS

AUTHOR: Flávia Mariel Steckling
ADVISOR: Félix Aleandre Antunes Soares
Place and date of defense: Santa Maria, July 7th, 2021.

Physical exercise sessions represent some stress due to the fact that it alters body homeostasis. High oxygen consumption during exercise increases the production of reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory proteins, resulting in oxidative stress and transient acute inflammation. Currently, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including diclofenac, have been widely used in athletic competition. Considering that athletes participate in consecutive competitions of high intensity and short duration and that these can lead to a sensation of pain and an inflammatory process, many competitors use NSAIDs as ergogenic resources or even to avoid performance losses during their competitions. However, little is known about the effects of using diclofenac on tissues during consecutive exhaustive swimming sets. Taking into account the sport specificity, most studies refer to the association of physical exercise and skeletal muscle, although, adaptive responses to physical exercise are not restricted to muscle tissue. Considering the important role of the liver during exercise, an objective of this thesis was to analyze the effects of diclofenac on liver markers, and in a second moment on muscle markers, oxidative stress, tissue damage and inflammation in sedentary rats submitted to consecutive sets of forced swimming. In the article, we highlight the role of diclofenac in modulating oxidative stress responses and inflammation and adaptation caused by high-intensity exercise in the liver. The experimental protocol was carried out with 4 distinct groups: sedentary-saline, sedentary-diclofenac, exhaustion-saline and exhaustion-diclofenac. The exercise groups were submitted to 3 consecutive sets of swimming, 48 hours apart, and the treated groups were pre-treated with diclofenac (10 mg/kg) throughout the protocol. We identified significant changes in the levels of TBARS and the GSH/GSSG ratio and an increase in the levels inflammatory markers TLR4, MyD88, IL-1 β , IL-6, TNF- α and INF- γ after exhaustive exercise. All these changes were reversed by treatment with diclofenac. In the manuscript, we highlight the modulatory role of diclofenac on damage responses, oxidative stress, inflammation generated by exercise in skeletal muscle. The protocol consisted of the same 3 consecutive swimming sets, 48 hours apart, in rats treated with saline or diclofenac (10 mg/kg) (groups: sedentary-saline, saline-exhaustion, sedentary-diclofenac, and diclofenac-exhaustion). After exercise, an increase in the levels of TBARS, DCFH-DA and a decrease in the GSH/GSSG ratio, and increases in the levels of markers COX-2, TLR4, MyD88, NF κ B, IL-1 β , IL-6, TNF were identified - α and INF- γ and increased iNOS gene expression. These responses generated by exhaustive exercise were attenuated by treatment with diclofenac. The data obtained allow us to conclude that diclofenac interferes with oxidative/inflammatory markers in adaptive responses generated by physical exercise in muscle and liver tissue, postponing fatigue and, in parallel, changing the mechanisms which are necessary for tissue adaptation to physical exercise of swimming.

Keywords:Swimming, NSAIDs, Redox Status, Inflammation, Liver, Muscle

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Exercício físico	12
1.1.1 Aspectos gerais.....	12
1.1.2 Exercício físico e tecido muscular	15
1.1.3 Exercício físico e tecido hepático.....	17
1.2 INFLAMAÇÃO	19
1.2.1 Via dos TLRs e cascata inflamatória.....	21
1.2.2 Inflamação e exercício.....	24
1.3 ANTI-INFLAMATÓRIOS	27
1.3.1 Mecanismo de ação dos AINEs	28
1.3.2 Diclofenaco e exercício	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
2.2.1 Objetivos específicos do Artigo	34
2.2.2 Objetivos específicos do Manuscrito.....	34
3. DESENVOLVIMENTO.....	35
3.1 Resultados.....	35
4. ARTIGO 1: DICLOFENACO PREVINE DANOS AO FÍGADO ATRAVÉS DA VIA TLR4 EM RATOS SUBMETIDOS A REPETIDOS SETS DE NATAÇÃO EXAUSTIVA.....	36
5. MANUSCRITO 1: O DICLOFENACO REDUZ AS RESPOSTAS PRÓ-OXIDANTES E PRÓ-INFLAMATÓRIAS DA VIA TLR4 NO MUSCULO INDUZIDAS PELA NATAÇÃO EXAUSTIVA	66
6. DISCUSSÃO.....	91
7. CONCLUSÃO.....	99
8. PERSPECTIVAS	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Exercício físico

1.1.1 Aspectos gerais

A inatividade física pode levar ao aparecimento ou agravamento de diversas doenças. Existem inúmeras evidências que reconhecem a inatividade física como prejudicial à saúde, reduzindo a capacidade funcional da maioria dos sistemas de órgãos em humanos e roedores (Booth *et al.*, 2012).

O treinamento físico, por outro lado, pode ser definido com um efetivo e não-invasivo método de promoção de saúde. O mesmo depende diretamente de uma boa organização, estruturação e controle para que resulte em melhoramento do desempenho físico (Gomes, 2003). Desde 2500 a.C, na China, há registros de treinamentos físicos organizados para promover a saúde (Lee e Skerrett, 2001). Na época greco-romana, Hipócrates (460 –370a.C) e depois Galen (129–210d.C), reconheceram a necessidade do exercício físico para o benefício da saúde e como profilaxia para atletas (Speed e Jaques, 2011). Foi na Grécia que surgiu a ideia da beleza humana, o que pode ser facilmente observado em obras de arte. A Grécia também é considerada o berço dos Jogos Olímpicos, que ocorreram por 12 séculos perfazendo um total de 293 eventos (776 a.C - 393 d.C), demonstrando a importância do exercício físico. Pode-se colocar, também, que na Roma antiga o exercício físico era parte da preparação militar dos soldados e dos gladiadores para o combate (Lee e Skerrett, 2001; Speed e Jaques, 2011).

Já nos tempos modernos, Jeremiah Morris é reconhecido como a pessoa que primeiro utilizou a atividade física em epidemiologia (Blair *et al.*, 2010). Em 1953, Morris e colaboradores compararam os motoristas de ônibus, que eram sedentários em sua ocupação, com os motoristas de ônibus fisicamente ativos, que estavam constantemente subindo e descendo ônibus de dois andares para coletar tarifas em Londres. Os condutores fisicamente ativos tiveram uma taxa de incidência de doença cardíaca coronariana 30% menor do que os motoristas de ônibus fisicamente inativos (Morris *et al.*, 1953). Além disso, mesmo os condutores fisicamente ativos que desenvolveram doença cardíaca com a idade estavam em melhor situação, apresentando doença menos grave e menores taxas de mortalidade do que os motoristas de ônibus inativos (Morris *et al.*, 1953). Apesar desse estudo não ter avaliado o volume máximo de oxigênio (VO_{2max}), outros mostraram que trabalhadores em ocupações fisicamente ativas têm maior capacidade aeróbia que seus pares inativos (Hammermeister *et al.*, 2001). O relatório de Morris de 1953 (Morris *et al.*, 1953) é um marco, por ser a publicação

inicial que documenta a inatividade física diária associada ao aumento da morbidade e mortalidade (Blair *et al.*, 2010).

A prática regular de exercícios físicos está consolidada na sociedade em consequência da sua gama de benefícios à saúde (Nieman, 2003), pois evidências incontestáveis apontam que a atividade física regular contribui para a prevenção primária e secundária de várias doenças crônicas e está associada a um risco reduzido de morte prematura. Parece haver uma relação linear graduada entre o volume de atividade física e o estado de saúde, de modo que as pessoas mais ativas fisicamente correm o menor risco (Warburton *et al.*, 2006). O exercício regular contribui para a melhora e prevenção de doenças crônicas pulmonares e cardiovasculares, doenças metabólicas (diabetes tipo 2, dislipidemia, obesidade, resistência à insulina), doenças musculares, em ossos e articulações (artrite reumatoide, fibromialgia, síndrome da fadiga crônica, osteoporose), bem como, câncer e depressão (Warburton *et al.*, 2006; Pedersen e Saltin, 2015).

Dos diferentes tipos de treinamento disponíveis, destaca-se o treino de *endurance* ou como também é conhecido como treino aeróbico. O treinamento aeróbico promove aumento do VO_{2max} , ou seja, há um aprimoramento do sistema cardiorrespiratório e músculo-esquelético em decorrência do treinamento (Radak *et al.*, 2013). O treinamento aeróbico é responsável por aumentar a densidade capilar e a quantidade de mitocôndrias nas células musculares (Gavin, 2009), em consequência do aumento das enzimas oxidativas mitocondriais (Wibom *et al.*, 1992), bem como geração elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são moduladores importantes da contração muscular, proteção antioxidante e reparação de danos oxidativos, que em níveis moderados geram respostas fisiológicas adaptativas (Radak *et al.*, 2013).

Em trabalho de 1984, os autores descreveram os três principais fatores responsáveis pela variação interindividual no desempenho de resistência aeróbia: consumo máximo de oxigênio, limiar de lactato, e economia do trabalho (Pate e Kriska, 1984). Para alcançar tal objetivo, pode-se utilizar o treinamento intervalado, o de longa distância e baixa intensidade ou o contínuo de alta intensidade (Billat, 2001b).

O treinamento intervalado se caracteriza por períodos de trabalho e recuperação alternados e com intensidades e durações diferentes. Deve-se notar que a terminologia pode parecer equívoca, uma vez que são realizados repetidos esforços de alta intensidade em alguns tipos específicos de protocolo, ao passo que em outros protocolos pode-se atingir esforços máximos ou supra-máximos (Buchheit e Laursen, 2013). O exercício intervalado de esforço máximo ou supra-máximo (vem recebendo maior atenção nos últimos anos) tem sido usado por

fisiologistas para estudar a regulação das vias metabólicas, e para lançar luz sobre a etiologia da fadiga (incapacidade para sustentar uma determinada potência) durante o exercício de alta intensidade (Bogdanis *et al.*, 1996; Billat, 2001a). As variáveis que devem ser levadas em consideração no planejamento de um trabalho intervalado são a quantidade, a intensidade, os intervalos e o número de repetições (Buchheit e Laursen, 2013).

O treinamento de longa distância, que utiliza uma faixa de 55% do VO_{2max} e 70% da frequência cardíaca máxima (FC_{max}), utiliza um volume de trabalho maior do que as distâncias de competição (Billat, 2001b). Apesar dos treinos de baixa intensidade e longa duração serem indicados e apresentarem benefícios para a saúde em praticantes obesos e com outras comorbidades associadas (Garber *et al.*, 2011), evidências vêm mostrando que o exercício intervalado de alta intensidade representa um protocolo alternativo e por vezes mais eficiente do que o treinamento contínuo de intensidade moderada na melhoria de condicionamento geral (Group, 2014; Piepoli *et al.*, 2014), possivelmente por esse método possibilitar a realização de uma intensidade absoluta ou relativa maior com um menor volume de trabalho e com uma recuperação parcial.

Outro tipo de treinamento é o exercício contínuo de alta intensidade, o qual se caracteriza pelo uso de uma faixa de 80 a 90% do VO_{2max} , durante um período de 25 a 50 minutos em uma taxa de trabalho pouco acima do limiar de lactato, e que pode gerar um aumento significativo da capacidade aeróbica (Billat *et al.*, 1999; Esteve-Lanao *et al.*, 2005).

Essas mudanças progressivas refletem a ativação e/ou repressão de vias de sinalização específicas que regulam a transcrição e tradução gerando adaptação ao treinamento físico. Estímulos moderados repetidos que apresentam a dose (volume e intensidade), a frequência (sessões por semana), e o tipo adequados (aeróbio ou de força) são potentes para adaptação fisiológica e respostas adaptativas como: maleabilidade na adaptação funcional e remodelação em resposta à atividade contrátil (Coffey *et al.*, 2007), mudanças na quantidade, função de proteínas contráteis e função mitocondrial (Spina *et al.*, 1996), regulação metabólica (Green, 1992), sinalização intracelular (Benziane *et al.*, 2008) e transcricional (Pilegaard *et al.*, 2002). Por outro lado, estímulos por meio de exercícios intensos podem causar danos no tecido muscular, aumentando a produção de EROs e marcadores pró-inflamatórios (Aoi *et al.*, 2004; Fisher-Wellman e Bloomer, 2009).

Esse processo de maneira não controlada culmina na indução de um estado de estresse oxidativo/inflamatório exacerbado (Urso e Clarkson, 2003; Bloomer, 2008), que pode causar microlesões teciduais (Clarkson e Hubal, 2002), induzir um processo de inflamação subclínica (Armstrong, 1984), causar dor muscular e, conseqüentemente, a diminuição do desempenho

esportivo também conhecido como fadiga (Noakes, 2012). Por isso, existe um consenso na literatura que o exercício físico exaustivo é estressor para o organismo (Radak *et al.*, 2016).

1.1.2 Exercício físico e tecido muscular

O músculo esquelético compreende 40% da massa corporal total em mamíferos e é responsável por 30% da taxa metabólica de repouso em humanos adultos (Zurlo *et al.*, 1990). Possui um papel no controle glicêmico e homeostase metabólica, sendo o local predominante (80%) de captação de glicose sob condições estimuladas por insulina (DeFronzo *et al.*, 1981). Adicionalmente, o músculo esquelético é o maior órgão de armazenamento do glicogênio, contendo 4 vezes a capacidade do fígado. Uma característica fisiológica marcante do músculo esquelético é a capacidade de modular rapidamente a taxa de produção de energia, fluxo sanguíneo e utilização de substrato em resposta ao exercício.

No músculo esquelético, a contração se dá através do deslizamento da actina-miosina, a interação entre esses dois filamentos de proteínas nos sarcômeros. A cabeça da miosina empurra os filamentos de actina, gerando a contração muscular. Em condições de relaxamento, este ponto de conexão entre os filamentos está ocupado por uma terceira proteína, a tropomiosina, que envolve filamentos de actina. Assim, para uma contração ocorrer, a tropomiosina deve liberar o ponto de ligação entre a actina e a miosina (Podolsky e Arata, 1988). A hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) pela miosina ATPase fornece a fonte de energia imediata para esse deslizamento acontecer, mas também é consumido em grande parte pela dinâmica do sódio-potássio e troca de cálcio necessária para a contração. O músculo é o principal contribuinte para as mudanças induzidas pelo exercício no metabolismo (Egan e Zierath, 2013).

O exercício físico atua como agente estressor no músculo esquelético, promovendo adaptações moleculares que dependem da intensidade e tipo de exercício realizado (Egan e Zierath, 2013; Radak *et al.*, 2016). O exercício extenuante tem sido estudado principalmente devido à intensa demanda de energia muscular. Sessões intensas (~90 a 120% do VO_{2max}) de exercícios com reparo suficiente em indivíduos treinados podem induzir adaptações metabólicas positivas (Zychowska *et al.*, 2017) e melhoria da capacidade oxidativa (Egan e Zierath, 2013). No entanto, as mesmas sessões de exercícios intensos realizadas por indivíduos sedentários ou durante o treinamento intenso com período de recuperação inadequado, podem causar inflamação, dano celular oxidativo, degradação de proteínas e até mesmo lesão muscular (Peake *et al.*, 2005; Baumert *et al.*, 2016).

O exercício físico excêntrico é reconhecido por provocar danos teciduais, como estiramentos nos sarcômeros das miofibrilas e danos ao sistema de acoplamento excitação-

contração, resultando em dor muscular tardia (Proske e Morgan, 2001). O processo de reparo do músculo esquelético após microtrauma causado pelo exercício excêntrico pode ser dividido em quatro fases inter-relacionadas e dependentes do tempo: 1) necrose/degeneração, 2) inflamação, 3) reparo e 4) formação de tecido cicatricial (fibrose) (Hurme *et al.*, 1991; Huard *et al.*, 2002).

Nos primeiros minutos após a lesão, a área é invadida por células inflamatórias, como células mononucleares, macrófagos ativados e linfócitos T. A secreção subsequente de fatores de crescimento e citocinas promove ainda mais o aumento do fluxo sanguíneo para a área e intensifica o processo inflamatório. A regeneração muscular começa assim que as células fagocíticas inflamatórias eliminam o tecido necrótico (Ambrosio *et al.*, 2009). Uma resposta inflamatória excessivamente elevada ao dano muscular limitaria a recuperação, evitando o reparo do tecido danificado, promovendo o desgaste muscular e, em última análise, prejudicando a regeneração da função muscular (Rosa Neto *et al.*, 2011; Howard *et al.*, 2020). Uma variedade de alterações no ambiente circundante da célula satélite, incluindo fatores mecânicos e de crescimento, bem como a sinalização hormonal, podem regular a ativação e proliferação das células satélites (Snow, 1977). A replicação das células satélite é iniciada em resposta à secreção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (Yin *et al.*, 2013). O fator de crescimento de hepatócitos, assim como outros mediadores como o TNF- α e o IFN- γ por atuar no NF- κ B (Guttridge *et al.*, 2000; Bakkar *et al.*, 2008), podem promover inibição de fatores reguladores miogênicos, como MyoD (Miller *et al.*, 2000). MyoD é um fator de transcrição e marcador para células satélites ativadas, e está envolvido principalmente na ativação e regulação dessas células que culminam em hipertrofia muscular e são essenciais para a regeneração muscular (Howard *et al.*, 2020).

Todos esses fatores envolvidos na fisiologia do músculo esquelético em resposta ao estresse causado pelo exercício agudo, como expressão de genes, proteínas, ativação de cascatas de sinalização, processo inflamatório (Egan e Zierath, 2013; Pacheco *et al.*, 2018), atuam na regulação de vias metabólicas específicas e são fundamentais para remodelação do músculo esquelético (Macneil *et al.*, 2010). Entende-se que a liberação de determinados mediadores da inflamação culmina na dor em diferentes tecidos, principalmente no músculo esquelético (Zelenka *et al.*, 2005). Neste sentido, os relatos mais comuns de dor em atletas têm etiologia mecânica, que pode estar relacionada a microlesões teciduais (Alaranta *et al.*, 2008). No entanto, muitos aspectos da regulação da regeneração muscular permanecem obscuros e provavelmente envolvem moléculas que ainda não foram definidas. Como exemplo, as prostaglandinas (PGs) foram implicadas em vários estágios da miogênese e são sintetizadas

pelo músculo em regeneração (McLennan, 1991; Trappe *et al.*, 2001). Além de seus papéis na miogênese, as PGs também são moduladoras potentes da inflamação, como evidenciado pela capacidade dos inibidores da síntese de PG, conhecidos como AINEs, na redução da dor e inflamação após lesão muscular e outros tipos de dano ao tecido (Bondesen *et al.*, 2004).

Na tentativa de evitar a queda de rendimento, os atletas lançam mão de recursos analgésicos que podem alterar a capacidade de realização de exercício bem como retardar o aparecimento da fadiga. A fadiga é caracterizada por uma redução do desempenho ligada a um aumento na dificuldade real ou percebida de superar uma tarefa e/ou exercício (Enoka e Duchateau, 2016). A fadiga também pode ser dividida em fadiga periférica, quando se concentra no nervo periférico, junção neuromuscular e no músculo, e a fadiga central, quando os processos acontecem na medula espinhal e no cérebro (Wan *et al.*, 2017).

1.1.3 Exercício físico e tecido hepático

Na última década, o músculo esquelético vem sendo reconhecido como um órgão secretor, que por sua vez, é altamente metabólico, e durante o exercício, comunica-se com outros órgãos pela produção/liberação de miocinas, podendo exercer efeitos parácrinos, autócrinos e endócrinos (Pedersen, 2019). As adaptações metabólicas do exercício não estão restritas ao músculo e fígado em atividade, uma vez que este constitui um esforço generalizado para outros órgãos como o músculo cardíaco, estômago, fígado e cérebro (Veneroso *et al.*, 2009; Cakir *et al.*, 2010).

O exercício físico é considerado um grande desafio para todos os outros órgãos, especialmente para o fígado, devido ao seu papel central na manutenção da glicemia e homeostase lipídica e por sustentar o metabolismo energético durante a perturbação por exercício físico intenso, sendo sua função principal fornecer energia para o músculo em atividade (Kjaer, 1998; Fritsche *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010). Assim como o músculo, o fígado também é um órgão metabólico (Sunami *et al.*, 2012), podendo desempenhar papel central no processo inflamatório. Por ser innervado e ativado pelo sistema nervoso central, ele pode alterar a resposta imune através de mediadores inflamatórios (Thyagarajan e Priyanka, 2012).

O treinamento físico induz notáveis mudanças no metabolismo (Liu, J. *et al.*, 2000; Gul *et al.*, 2002) e no status oxidante/antioxidante do fígado (Radak *et al.*, 2000; Botezelli *et al.*, 2011). Essas mudanças estão relacionadas a maior sensibilização à insulina pelo fígado em humanos, o que pode estar relacionado à redução de gordura do fígado e ao efeito anti-

inflamatório do exercício. Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que o treinamento físico causa adaptações oxidativas favoráveis no tecido hepático, potencializando o status antioxidante do tecido (Hoene e Weigert, 2010; Lima *et al.*, 2013).

Apesar de todos os benefícios do treinamento físico no tecido hepático, o exercício físico agudo pode provocar uma resposta diferente neste tecido. Diferentes estudos demonstram que o exercício extenuante altera a função mitocondrial com a formação de EROs, devido à alta taxa de consumo de oxigênio durante o exercício intenso, e que isto está intimamente relacionado aos danos teciduais (Radak *et al.*, 2000; Rasmussen *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2010), aumentos de inflamação crônica (Peake *et al.*, 2005) e dano a membranas lipídicas (Radak *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo e a inflamação compartilham vias de sinalização comuns e sobrepostas. Ao danificar macromoléculas, as EROs podem iniciar a inflamação (Ungvari *et al.*, 2010), bem como EROs também são produtos do processo inflamatório. Pela alta demanda respiratória durante o exercício físico intenso, ocorre o aumento da formação de ERN via NADPH oxidase e iNOS e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Cannon *et al.*, 1990). Da mesma forma, os tecidos lesados (como músculo) também podem liberar citocinas pró-inflamatórias que ativam enzimas geradoras de EROs, como lipoxigenase, NADPH oxidase, mieloperoxidase e xantina oxidase (Flohe *et al.*, 1997). A superprodução de EROs ativa fatores de transcrição redox-sensíveis, incluindo fator nuclear κ B (NF- κ B), através de quinases de estresse como quinases reguladas por sinal extracelular e quinase ativada por mitogênio (MAPK). Isso leva ao aumento da expressão de proteínas-alvo inflamatórias, como metaloproteinase-9, moléculas de adesão, iNOS, ciclooxigenase-2 (COX-2) e fosfolipase A2 (PLA2) citosólica (Luo *et al.*, 2009).

O exercício intenso por aumentar a formação de EROs induz a produção de citocinas, acredita-se que em decorrência dos aumentos nos níveis de PLA2 (Boots *et al.*, 2008; Eberlein *et al.*, 2008; Santos-Soto *et al.*, 2013), sugerindo ainda que o exercício poderia mediar a remodelação celular através da interação de EROs e citocinas. A maioria das enzimas da família da PLA2 são reconhecidas por gerar estresse oxidativo e peroxidação lipídica durante a síntese de PG a partir do ácido araquidônico (Adibhatla e Hatcher, 2008) e mediadores pró-inflamatórios como o gene TNF- α (Liu, H. *et al.*, 2000). Muitas dessas proteínas inflamatórias ou seus produtos, como NOS, COX e PGE2, são fontes importantes de ERN (Wolin, 1996), e isso cria um ciclo de autoativação que alimenta o ciclo vicioso de inflamação e estresse oxidativo (Davis *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011).

Apesar de alguns estudos interessantes sobre adaptações hepáticas em resposta ao

exercício realizados nos últimos anos (Lima *et al.*, 2013; Pillon Barcelos *et al.*, 2017), a grande maioria dos estudos disponíveis tem como objetivo responder questões acerca de estresse oxidativo e fígado. Até o momento, no entanto, o estresse inflamatório hepático após o exercício não está totalmente claro - especialmente os mecanismos de dano inflamatório durante repetidos *sets* exaustivos.

1.2 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um fenômeno fisiológico relevante na manutenção da homeostase, o corpo humano está constantemente exposto a ambientes externos e estímulos nocivos. Ao longo de seu processo evolutivo, desenvolveu múltiplos mecanismos para detectar, responder e reparar com o objetivo de manter a homeostase (Varela *et al.*, 2018). Os indutores de vias inflamatórias podem ser organismos infecciosos, bactérias e outros marcadores de estresse, enquanto os sensores são moléculas especializadas ativadas pelos indutores que desencadeiam a produção de mediadores. Os mediadores são produtos químicos endógenos que podem induzir a sensação de dor, podem promover ou inibir a inflamação e reparo de tecidos, e também podem ativar os efetores – tecidos e células. Esse conjunto multifatorial dá origem a muitas rotas alternativas no processo inflamatório a qual o caminho tomado é dependente do estímulo (Medzhitov, 2008).

Quando ocorre inflamação, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o sítio de agressão celular, mobilizados rapidamente pela corrente sanguínea (Alves-Filho *et al.*, 2010). A migração de neutrófilos do compartimento intravascular para o extravascular ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares. Este mecanismo é mediado por uma combinação de processos: mecânico, químico e molecular (Seely *et al.*, 2003). Nesse sentido, citocinas e quimiocinas estão incluídas como importantes mediadores para a migração leucocitária (Langer e Chavakis, 2009).

Os sistemas imunológicos inato (natural) e adquirido (adaptativo) são responsáveis por fornecer a defesa primária contra patógenos. O sistema imune inato é o principal contribuinte para a inflamação aguda induzida por infecção microbiana ou dano ao tecido (Akira *et al.*, 2006). Embora as células imunes inatas como macrófagos e células dendríticas desempenhem papéis importantes, células endoteliais e fibroblastos também contribuem para a imunidade inata. Estímulos patogênicos são estruturas microbianas conservadas e são classificadas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Quando eles invadem os tecidos e/ou o sistema circulatório, os PAMPs podem iniciar uma resposta inflamatória mediada por células

da imunidade inata, com a consequente liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). DAMPs são estímulos endógenos que podem ser células danificadas (detritos) ou moléculas liberadas durante a morte celular, como o ATP, que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a danos ou estresse (Takeuchi e Akira, 2010).

Os PAMPs ou DAMPs regulam positivamente a transcrição de genes envolvidos em respostas inflamatórias. Esses genes codificam citocinas pró-inflamatórias, interferons tipo I (IFNs) e quimiocinas. A resposta inflamatória é orquestrada por citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) -1 e IL-6. Essas citocinas são proteínas pleiotrópicas que regulam a morte celular de tecidos inflamatórios, por modificar a permeabilidade vascular endotelial, recrutar células sanguíneas para tecidos inflamados e induzir a produção de proteínas de fase aguda. As citocinas são liberadas após a estimulação desses receptores. Exemplos de citocinas incluem TNF- α , IL-1, IL-6, entre outros, que induzem alterações no endotélio, permitindo a passagem de células imunes através das junções entre células endoteliais (Medzhitov, 2010; Mills, 2011).

As citocinas são pequenos peptídeos secretados que possuem um papel específico nas interações e comunicações entre as células. As citocinas podem ser divididas pelas suas funções específicas: linfocina (citocinas produzidas por linfócitos), monocina (citocinas produzidas por monócitos), quimiocina (citocinas com atividades quimiotáticas) e interleucina (citocinas produzidas por um leucócito e atuando em outros leucócitos) (Zhang e An, 2007). As citocinas podem atuar nas células que as secretam (ação autócrina), nas células próximas (ação parácrina) ou, em alguns casos, em células distantes (ação endócrina), sendo moléculas mensageiras produzidas, não somente pelas células do sistema imunológico, mas também produzidas no músculo esquelético, tecido adiposo e tecidos do sistema endócrino (Keller *et al.*, 2001; Zhang e An, 2007). A sequência de liberação de citocinas em sepse é composta pelo Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- α), Interleucina 1-beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6), receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) e receptores solúveis de TNF- α (sTNF- α) (Dinarello, 1991; Akira *et al.*, 1993).

As principais citocinas pró-inflamatórias são a IL-1 β e o TNF- α , sendo consideradas citocinas de alarme, pois são secretadas em resposta a eventos relacionados diretamente à lesão do tecido como a produção de PG e EROs (Smith, 2000; Bassel-Duby e Olson, 2006). Elas são liberadas por macrófagos, células do endotélio e células musculares lisas e esqueléticas (Bassel-Duby e Olson, 2006) e sua função é facilitar a migração de monócitos e neutrófilos para o local da inflamação (Moldoveanu *et al.*, 2001; Paulsen *et al.*, 2012).

Das citocinas anti-inflamatórias, a IL-6 é considerada a maior reguladora, produzida pelo músculo e pelos leucócitos, e liberada em resposta à IL-1 β e TNF- α e ERO, e está

diretamente relacionada à intensidade e duração do exercício físico (Petersen e Pedersen, 2005). O músculo esquelético durante a contração é o único capaz de produzir IL-6 independente de TNF- α , sugerindo que a IL-6 tem um papel mais metabólico do que inflamatório, pois ela apresenta ação paradoxal, podendo ser classificada tanto como pró-inflamatória quanto como anti-inflamatória dependendo da sua fonte de liberação e essa diferenciação ocorre possivelmente pelo mecanismo de sinalização (Pedersen e Febbraio, 2008; Balducci *et al.*, 2010; Benatti e Pedersen, 2014). Descrita como citocina pró-inflamatória, pelo fato de estar aumentada no plasma em sepse e trauma e por estar envolvida na estimulação da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, oriundas de diferentes fontes (Wilund, 2007), por outro lado, a IL-6 derivada da contração muscular tem função anti-inflamatória. Sugere-se que a IL-6 seja o centro de mediação dos efeitos agudos provocados pelo exercício, sinalizando uma cascata de ativação de outras citocinas, sendo sucedido pelo aumento nos níveis circulatórios de IL-1ra e IL-10, tendo-se assim o efeito anti-inflamatório (Nieman e Pedersen, 1999; Gleeson *et al.*, 2011; Benatti e Pedersen, 2014). Tanto a IL-10 quanto a IL-1ra são secretadas por monócitos e macrófagos, bem como outras fontes, no entanto, a IL-1ra é inibida pela ação pró-inflamatória da IL-1 β e pela produção de TNF- α . Contudo, independentemente do tecido, a IL-10 parece estar intimamente relacionada com a mimetização da inflamação induzida por dano tecidual, exercendo um fundamental papel anti-inflamatório (Petersen e Pedersen, 2005; Balducci *et al.*, 2010; Gleeson *et al.*, 2011).

1.2.1 Via dos TLRs e cascata inflamatória

Os mecanismos de sinalização e de reconhecimento de patógenos pelo sistema imune inato têm sido foco de muitos estudos. Um dos principais receptores mais extensivamente estudados é a família dos TLRs. Os TLRs possuem papéis fundamentais na iniciação e indução de respostas tanto do sistema imune inato quanto do adquirido (Muzio e Mantovani, 2000; Takeda e Akira, 2005). Historicamente, a proteína TLR foi identificada na *Drosophila melanogaster* como um receptor necessário para o estabelecimento da polaridade dorso-ventral durante o desenvolvimento do embrião e posteriormente foi identificada como crucial na defesa desta mosca adulta contra fungos. Estes estudos levaram à identificação de homólogos da proteína Toll em humanos e camundongos, passando então à denominação de TLRs (Kawai e Akira, 2010). Atualmente, 11 membros da família TLRs foram identificados em humanos e 13 membros dessa família foram identificados em camundongos (Poltorak *et al.*, 1998). Cada TLR tem afinidade por um ligante específico, está relacionado à identificação de estruturas

específicas na membrana celular de diferentes patógenos (Kawai e Akira, 2010). Eles são expressos em neutrófilos, macrófagos células dendríticas e linfócitos (Muzio e Mantovani, 2000). É interessante ressaltar que os TLRs podem estar localizados em diferentes regiões celulares, os TLRs 1, 2, 4, 5, 6 e 11 são expressos sobre a superfície celular, na membrana plasmática, enquanto os TLRs 3, 7, 8 e 9 são expressos no endossomo (Kumar *et al.*, 2009), enquanto o TLR2 e o TLR4 já foram identificados em diferentes tecidos: adiposo, hepático e muscular (Lin *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2003).

Os TLRs são glicoproteínas transmembranas do tipo I expressas em diferentes tipos celulares de resposta imune inata, em fibroblastos e em células epiteliais (Uematsu e Akira, 2006). Cada TLR em particular é capaz de reconhecer um amplo grupo de PAMPs de diferentes tipos de microorganismos (Kumar *et al.*, 2009). Os TLRs desempenham um papel importante neste grupo de receptores do hospedeiro, a pouca diversidade entre os PAMPs o permite que, mesmo estando em número menor, os TLRs reconheçam uma gama de patógenos (Zhang *et al.*, 2007). Os TLRs são compostos por um domínio extracelular contendo uma grande quantidade de leucina para a ligação e um domínio citoplasmático que é homólogo ao do receptor da IL-1. Após a ligação receptor-ligante, a transdução de sinal dá início a uma complexa cascata de reações, que leva à produção de uma ampla gama de moléculas efetoras (Nie *et al.*, 2018). Os TLRs medeiam o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e possuem um papel importante nas respostas imune e anti-inflamatória (Gleeson *et al.*, 2006).

Dentre todos os TLRs, o TLR4 é o que responde a diferentes tipos de protocolos de exercício (Cristi-Montero *et al.*, 2012; Fernandez-Gonzalo *et al.*, 2012). O TLR4 tem sua expressão aumentada em tecido adiposo nos indivíduos obesos e no músculo após exercício (Frisard *et al.*, 2010). A expressão nesses tecidos sugere que o TLR4 não é apenas um componente comum da imunidade inata, mas também talvez um modulador dos sistemas metabólicos. Frost e colaboradores estão entre os primeiros a mostrar que o TLR4 está presente no músculo esquelético e, quando ativado, induz uma resposta inflamatória local (Lang *et al.*, 2003; Frost *et al.*, 2006). A partir da ativação do TLR4 pelo patógeno, diferentes vias de sinalização podem ser ativadas. A transdução dos sinais é mediada inicialmente pela família de moléculas adaptadoras, que, ao menos em parte, determinam a especificidade da resposta inflamatória que será induzida. Ocorrem mudanças conformacionais no receptor TLR4 que leva à aproximação do domínio *toll/IL-1 receptor domain* (TIR), fato que permite o recrutamento de outras moléculas sinalizadoras (O'Neill e Bowie, 2007).

Há vários ligantes endógenos de TLRs que podem ter um papel na regulação da expressão desses receptores ou permitirem que o sistema imune responda ao dano ou a sinais

de dano (Kilmartin e Reen, 2004). O reconhecimento de antígenos pelos TLRs dispara uma sinalização intracelular (Akira *et al.*, 2001) que resulta na indução de um conservado programa de defesa que inclui a produção de citocinas (Alexopoulou *et al.*, 2001). Frente a um estímulo, o TLR recruta adaptadores como o *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) e o *Toll/interleukin-1 receptor domain containing adapter protein* (TIR-AP) (WEST; KOBLANSKY; GHOSH, 2006). A cascata de sinalização leva à ativação de *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs), proteína quinase C (PKC), ativação de fatores de transcrição como o NFκB e PGC-1 e de fatores pró-inflamatórios (Abdelsadik e Trad, 2011). Em relação ao TLR4, é o que mais utiliza quatro diferentes moléculas adaptadores sendo: MyD88, TIRAP, *TIR-domain-containing adaptor molecule 1* (TICAM1) e *TIR-domain-containing adaptor molecule 2* (TICAM2), estão envolvidas na transdução dos sinais (O'Neill e Bowie, 2007). A ativação do TLR4 pode gerar duas vias de sinalização, sendo uma dependente de MyD88 (via Mal- MyD88) e outra independente de MyD88 (via TRAM-TRIF) (Kagan *et al.*, 2008). Na via dependente de MyD88, a partir da ativação do TLR4 pelo PAMP, a MyD88 se associa com a parte citoplasmática do *interleukin-1 receptor* (IL-1R). Ocorre então o recrutamento da *TAK1 binding protein 2* (TAB2) e *TAK1 binding protein 3* (TAB3) para TAK1 formando um complexo que pode ativar duas vias (WANG *et al.*, 2001). Uma das vias é mediada pela ativação do *I-κB kinase complex* (IKK). Este complexo IKK é composto por duas quinases estruturalmente relacionadas, IKKα e IKKβ, e um componente regulatório, o IKKγ. A ativação deste complexo IKK resulta na fosforilação do *inhibitor of κB* (IκB). O IκB passa a ser degradado para ativar a translocação do NF-κB para o núcleo, que é ativado e promove indução de genes pró-inflamatórios (Hacker *et al.*, 2006).

A ativação do NF-κB é controlada pela sua associação ao IκB no citoplasma da célula, que impede sua translocação para o núcleo, permanecendo inativo. Contudo, ante ao estímulo pró-inflamatório, ocorre fosforilação e degradação do IκB, que permite a translocação do NF-κB para o núcleo e consequente ativação (Glezer *et al.*, 2003). Além disso, as subunidades de NFκB, p50 e p65, formam o mais frequente heterodímero de NFκB (McFarlin *et al.*, 2006). A ativação de NFκB, tanto pela via dependente ou independentede MyD88, leva o recrutamento da sua subunidade p50 no citoplasma e a translocação da subunidade p65 para o núcleo (Kawai e Akira, 2011). Uma das mais importantes vias de sinalização ativada durante um exercício envolve o NFκB. Este fator de transcrição faz uma ligação entre múltiplas vias de sinalização que orquestram diversos processos em diferentes tipos celulares (Barcelos *et al.*, 2016). A translocação da subunidade p65 do NFκB ao núcleo altera diretamente a produção de um grande número de genes, incluindo aqueles que geram citocinas, receptores apresentadores e

reguladores do status redox, proteínas de resposta de fase aguda, apoptose e atrofia (Pahl, 1999). Muitos dos genes ativados por NFκB são conhecidos por serem pró-inflamatórios (Hoffmann e Baltimore, 2006). Estes genes, incluindo a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a COX-2, são induzidos nas células inflamatórias e seus produtos trabalham em conjunto para causar inflamação tecidual por diversos mecanismos, incluindo a ativação e produção de prostanoíde pró-inflamatórios como a PGE2 (Cipollone *et al.*, 2001).

Os TLRs têm um importante papel nos efeitos anti-inflamatórios associados a uma vida fisicamente ativa (Mcfarlin *et al.*, 2006), sendo que diversos TLRs interagem com uma combinação diferente de domínios TIR. Sabe-se que indivíduos fisicamente ativos têm uma menor expressão de TLR4 na superfície celular e menor capacidade de produção de citocinas inflamatórias de monócitos que os sujeitos fisicamente inativos (Gleeson *et al.*, 2006; Mcfarlin *et al.*, 2006). Há alguns anos, foi demonstrado que um programa de treinamento de 12 semanas tanto de exercício de *endurance* ou de força reduz a expressão de mRNA de TLR4, TNF-α e de IL-6 no músculo esquelético de pacientes obesos (Lambert *et al.*, 2008). Os exatos mecanismos pelos quais a expressão de TLR4 é reduzida pelo treinamento físico são ainda desconhecidos; no entanto, várias hipóteses já foram propostas (Mcfarlin *et al.*, 2006).

Por outro lado, a regulação dos TLRs como fator chave na resposta inflamatória mediada pelo exercício físico agudo tem recebido grande interesse da comunidade científica (Gleeson *et al.*, 2006; Mcfarlin *et al.*, 2006). Estudos envolvendo exercício excêntrico destacam o impacto desse tipo de exercício na resposta inflamatória (Peake *et al.*, 2005). Uma sessão de exercício excêntrico induz uma resposta pró-inflamatória marcante, enquanto que um programa de treinamento com exercício excêntrico atenua a ativação de diferentes vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2008; Fernandez-Gonzalo *et al.*, 2012). No geral, os dados na literatura com relação a expressão dos TLR após o exercício são bastante controversos. Alguns indicam que há uma diminuição da expressão de TLR4 após uma modificação (Mcfarlin *et al.*, 2006) ou ainda mostram um aumento na expressão de TLR4 (Rosa *et al.*, 2011; Fernandez-Gonzalo *et al.*, 2012).

1.2.2 Inflamação e exercício

A resposta inflamatória sistêmica é orquestrada pela função imunológica quando ocorre um desequilíbrio homeostático decorrente de estímulos internos e/ou externos (Teixeira *et al.*, 2014). A maioria das pesquisas de ciência do esporte de alto rendimento é direcionada para ganhos ou atenuação da perda de *performance* (Kanda *et al.*, 2014), sendo que os temas alvo

são os efeitos do exercício sobre retardo ou aparecimento de dor muscular, reparo de microlesões teciduais e a resposta inflamatória causadas pelo exercício (Nieman, 2003; Pedersen *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2009; Sugama *et al.*, 2012). As microlesões teciduais são chamados de micro traumas adaptativos, e são importantes para o aumento da *performance* (Smith, 1991; Byrne *et al.*, 2004) e estão ligadas diretamente à intensidade ou o tipo de exercício realizado.

As microlesões podem acarretar o rompimento do sarcolema, edema ou o rompimento do sistema tubular do retículo sarcoplasmático, comprometimento do aparelho contrátil e danos ao citoesqueleto. Apesar do dano, nosso tecido muscular é capaz de manutenção e reparo contínuos (Cooper e Head, 2015), mas que não impede o praticante de experienciar diminuição na produção de força (Kehl *et al.*, 2000), extravasamento de proteínas para o sangue, como a mioglobina, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase e creatina quinase (Paulsen *et al.*, 2012) e dor (Armstrong, 1984).

O músculo esquelético pode sofrer trauma mecânico através de exercícios excêntricos, como corrida *downhill* e exercícios de força, e também por exercícios extenuantes associados a estresse oxidativo. Ambos resultarão em dano tecidual, processo no qual citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda irão infiltrar o tecido lesado com o objetivo de fazer a varredura do local e iniciar a fase de regeneração do tecido (Clarkson e Hubal, 2002; Macintosh e Shahi, 2011). As primeiras populações de células inflamatórias a chegar ao local do tecido lesado são os neutrófilos, podendo apresentar um pico de infiltração de 60 minutos e perdurar até 5 dias, sendo responsáveis por retirar o tecido lesado por fagocitose (Bondesen *et al.*, 2004; Tidball, 2005), gerando também EROs. Os monócitos são a segunda população a migrar para o tecido lesado e, quando passam da circulação para o tecido, são chamados de macrófagos, tendo por objetivo a remoção e regeneração do tecido lesado e sua migração tem um pico em 24 horas, mas podendo permanecer no tecido entre 9 e 14 dias (Tidball e Wehling-Henricks, 2007).

A infiltração dessas células no tecido lesado é organizada por várias proteínas, dentre elas estão as citocinas (Pyne, 1994; Fernandez-Lazaro *et al.*, 2020), responsáveis pelos eventos inflamatórios e seus efeitos, as citocinas sinalizam além do músculo lesionado, tecidos como cérebro e fígado ocasionando, assim, a resposta inflamatória sistêmica (Smith, 2000; Egan e Zierath, 2013). Estudos mostram que essa resposta esteja relacionada a alguns pontos negativos como: dor, regeneração muscular deficiente, e déficits de desempenho (Smith, 2000; Luti *et al.*, 2020). Entretanto, ainda são necessários estudos sobre a produção e liberação de citocinas no fígado e no músculo após exercício exaustivo e a sua relação com a diminuição do desempenho esportivo.

Além da sinalização inflamatória gerada pelo estresse mecânico provocado pelo exercício excêntrico, alterações metabólicas podem estar ligadas ao aumento de mediadores inflamatórios no fígado após o exercício. As respostas inflamatórias no fígado independem de dano tecidual induzido pelo exercício, e podem estar mais atreladas à intensidade do exercício (carga fisiológica/estresse metabólico) (Luti *et al.*, 2020). Exercícios de *endurance* como a natação são reconhecidos por induzir a liberação sistêmica de marcadores inflamatórios como: fator estimulador de colônias de granulócitos, macrófagos, IL-8 e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) que culminam na ativação de TLRs (O'mahony *et al.*, 2008) e EROs (Luti *et al.*, 2020), independente de dano mecânico tecidual, em resposta ao estresse metabólico caudado pela intensidade do exercício.

A natação é um exercício reconhecido por apresentar o componente excêntrico insignificante, no entanto, ainda ocorre o aumento do processo inflamatório em decorrência da infiltração de neutrófilos, o que justificaria o aumento de citocinas pro-inflamatórias no fígado após exercício agudo (Schneider e Tiidus, 2007). Até o momento, poucos estudos relataram o efeito agudo do exercício sobre as vias inflamatórias no fígado. Em um desses trabalhos, Huang *et al.* 2013 utilizaram exercícios exaustivos para induzir inflamação hepática em ratos. Os resultados mostram elevado processo inflamatório devido ao aumento da sinalização do receptor de citocinas no fígado, com supra regulação de quimiocinas ligantes, receptor de IL-11 e IL-1 (Huang *et al.*, 2013). Neste sentido, nosso grupo de pesquisa encontrou resultados similares, ou seja, aumentos nas citocinas IL-6 e IL-1b em homogenato de fígado após uma sessão de exercício em ratos (Barcelos *et al.*, 2016).

Em geral, a resposta da citocina ao exercício e à sepse difere em relação ao TNF- α . Diferente da sepse, os aumentos de citocinas circulantes induzidos por exercício não são precedidos de TNF- α plasmático. Durante a sepse, há um acentuado e rápido aumento do TNF- α que é seguido por um aumento na IL-6. Em contraste, durante o exercício, o aumento acentuado de IL-6 não é precedido por aumento no TNF- α . Exercício aumenta IL-6 plasmática, e é seguido pelo aparecimento de IL-1ra e IL-10 (Pedersen e Febbraio, 2008). Concentrações das quimiocinas, IL-8, proteína inflamatória de macrófago e estão aumentados após exercícios extenuantes (Ostrowski *et al.*, 1999). Dentro a maioria dos estudos de exercício, TNF- α não muda. Apenas exercícios muito extenuantes e prolongados, como a maratona, resultam em um pequeno aumento na concentração plasmática de TNF- α (Smith, 2000; Suzuki *et al.*, 2000).

Às vezes, devido a manipulações de variáveis como intensidade e duração, níveis aumentados de citocinas circulantes são evidentes após exercício exaustivo. Elas podem desempenhar um papel principal na coordenação da inflamação sistêmica, evidenciando assim

uma possível comunicação entre o fígado e músculo esquelético durante o exercício, a fim de orquestrar a modulação inflamatória.

1.3 ANTI-INFLAMATÓRIOS

Em um elegante estudo de 2007, Rainsford reuniu um apanhado de dados da evolução dos anti-inflamatórios. Historicamente, os anti-inflamatórios foram descobertos por acaso, derivados de plantas e seus extratos sendo aplicados para o alívio da dor, febre e inflamação, quando, em meados do século XIX os salicilatos foram descobertos como os componentes ativos de *Willow Spp*. Isso permitiu que esses compostos fossem sintetizados e, a partir disso, o ácido acetilsalicílico, popularmente conhecido como aspirina, foi desenvolvido. Houve dois períodos marcantes na história dos AINEs, o primeiro após a 2ª Guerra Mundial, que foi o período pré-prostaglandina e, posteriormente, até a última parte do século passado, em que seus efeitos na produção de PG fizeram parte do rastreamento no processo de descoberta de novas drogas (Rainsford, 2007).

Essas drogas desenvolvidas até o final dos anos 1980 e 1990 foram amplamente descobertas empiricamente, após a triagem de atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas em modelos de animais de laboratório. Alguns foram desenvolvidos com baixa incidência de efeitos colaterais gastrointestinais (a principal reação adversa observada com AINEs) do que os observados com seus predecessores (por exemplo: aspirina, indometacina, fenilbutazona)(Zarghi e Arfaei, 2011).

Na década de 1990, uma importante descoberta foi feita a partir de elegantes estudos biológicos moleculares e celulares de que existem dois sistemas de enzimas COX, que controlam a produção de prostanóides PGs e TxA2: COX-1 que produz PGs e TxA2 que regulam as funções gastrointestinais, renais, vasculares e outras funções fisiológicas, e COX-2 que regula a produção de PGs envolvidos na inflamação, dor e febre. Na década de 1990, a descoberta e o desenvolvimento de drogas para controlar seletivamente a COX-2 não agindo na COX-1, que é fundamental para os processos fisiológicos e cuja inibição foi considerada um fator importante no desenvolvimento de reações adversas, incluindo aquelas no trato gastrointestinais. Na virada deste século, houve um enorme desenvolvimento comercial após a introdução de dois novos inibidores de COX-2 altamente seletivos, conhecidos como coxibes (celecoxibe e rofecoxibe), que alegaram ter efeitos colaterais de baixo gastrointestinais. Embora tenha cumprido esses objetivos em parte, uma série alarmante de eventos ocorreu no final de

2004, quando o rofecoxibe foi retirado em todo o mundo por causa de eventos cardiovasculares graves e outros coxibes foram subsequentemente suspensos por apresentarem essa reação adversa, embora em grau variável (Rainsford, 2007; Zarghi e Arfaei, 2011).

As aplicações dos AINEs e dos coxibes na prevenção e tratamento dessas condições, bem como da aspirina e outros análogos na prevenção de doenças tromboembólicas, constituem agora um dos principais desenvolvimentos terapêuticos deste século. Além disso, novos medicamentos anti-inflamatórios estão sendo desenvolvidos. Com base em seus efeitos na transdução de sinal e como agentes anti-citocinas, esses medicamentos são anunciados como as novas terapias para controlar asdoenças neurodegenerativas e processos inflamatórios crônicos em que as citocinas e outros componentes como PG são manifestas. Em menor grau, a aplicação mais segura de corticosteroides e as aplicações de novos sistemas de liberação de drogas para uso com essas drogas, bem como com AINEs, também representam os desenvolvimentos tecnológicos mais recentes do século XXI. O que começou como droga para controlar a inflamação, dor e febre nos últimos dois séculos, agora emergiu para revelar uma enorme gama e tipos de agentes anti-inflamatórios e a descoberta de novos alvos terapêuticos para tratar toda uma gama de condições que nunca foram imaginadas (Rainsford, 2007).

1.3.1 Mecanismo de ação dos AINEs

Milhões de pessoas em todo o mundo relatam a ingestão diária de Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs), seu uso é comum especialmente entre atletas e praticantes de exercícios de alta intensidade. Os AINEs fornecem efeitos analgésicos, e por isso, são administrados rotineiramente para aliviar os sintomas associados a dor muscular tardia e restaurar as funções físicas normais após o exercício físico intenso (Lilja *et al.*, 2018). No entanto, apesar dos AINEs estarem entre as drogas mais amplamente consumidas no mundo, nossa compreensão dos efeitos dos AINEs nas adaptações musculares e hepáticas em resposta ao exercício físico ainda é limitada.

A aspirina dominou o mercado farmacêutico por mais de 50 anos. Desde sua síntese em 1899 (Deeks *et al.*, 2002), o cenário começou a mudar no início de 1950, quando outros AINEs começaram a chegar às farmácias e a questão da escolha de um determinado medicamento começou a ganhar importância. Em 2017, mais de 100 diferentes tipos de AINEs já haviam sido testados clinicamente e mais de 50 existiam no mercado mundial, sendo que quase 35 milhões de pessoas consumiam diariamente (Buttgereit *et al.*, 2001). Os AINEs são os medicamentos mais usados na medicina e suas vendas anuais no mundo são superiores a 6 bilhões de dólares

(Buttgereit *et al.*, 2001). Estima-se que 70 milhões de prescrições para o uso de AINEs são anualmente feitas e que destas, aproximadamente 30 milhões de compras são feitas sem prescrição. Ressalta-se que o uso sem receita é considerado sete vezes maior do que o uso com prescrição (Elnachef *et al.*, 2008).

Em 2011, estudos sobre o uso de AINEs em competições de nível internacional foram conduzidos a fim de demonstrar o consumo desta classe de medicamentos entre esportistas profissionais de diferentes modalidades. Os dados foram alarmantes, já que uma das pesquisas mostrou que durante uma competição esportiva de alto nível, dos 1.261 atletas participantes, cerca de 62,8% se declararam usuários de uma ou mais drogas não banidas pela WADA, sendo os AINEs os mais frequentemente usados (mais de 65%) (Da Silva *et al.*, 2011; Harle *et al.*, 2018). Nas Copas do Mundo de Futebol da FIFA entre 2002 e 2006, o uso de cerca de 10.384 substâncias foram documentadas, sendo constatado que apenas 19,7% dos atletas não consumiam nenhum tipo de medicação. Na média de duas Copas do Mundo (2002 e 2006), os AINEs foram as substâncias mais prescritas (46,5% e 47,7%, respectivamente), onde evidenciou-se que mais de 30% dos atletas usaram AINEs previamente à partida. Dentre os diferentes princípios ativos dos AINEs, o diclofenaco foi o mais relatado (2002=48,2% e 2006= 55,2%) (Tscholl *et al.*, 2008). Um estudo mais recente durante a Copa do Mundo FIFA 2018, mostrou que a ingestão de medicamentos permaneceu alta, com 50% dos jogadores tomando pelo menos um tipo de medicamento antes de uma partida, sendo que destes, os AINEs foram os medicamentos de primeira escolha (38,6%, n = 820), e o diclofenaco continua sendo o AINE mais frequentemente consumido (49,1%, n = 403) (Oester *et al.*, 2019).

O uso de medicamentos e suplementos é bastante difundido no esporte profissional. Alguns estudos têm evidenciado o uso excessivo de medicamentos por atletas de elite (Huang *et al.*, 2006; Thuyne e Delbeke, 2008; Oester *et al.*, 2019). Esse consumo excessivo acontece na tentativa de atenuar a diminuição de performance que ocorre gradualmente devido a uma rotina diária de treinos e competições com alta demanda física/energética e recuperação insuficiente, que é responsável por causar danos musculares, inflamação e dor tardia (Mchugh *et al.*, 1999). O consumo excessivo de AINEs por atletas profissionais tornou esta classe de medicamentos uma das mais utilizadas no meio esportivo e entre esportistas profissionais de diferentes modalidades (Elnachef *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2011). Os efeitos do uso crônico de diferentes tipos de AINEs mostram distintos resultados na literatura. Apesar desses medicamentos serem vendidos sem receita médica, a *Food and Drug Administration* recomenda que o uso regular de AINEs por mais de dez dias consecutivos seja acompanhado por uma consulta com um profissional de saúde (Aminoshariae *et al.*, 2016).

Os AINEs alteram vias de sinalização no músculo esquelético e no fígado através do metabolismo de proteínas em resposta ao exercício devido ao seu efeito inibidor nas enzimas COX que regulam a síntese de PG, podendo assim modular as respostas adaptativas de curto e de longo prazo (Barcelos *et al.*, 2014; Lilja *et al.*, 2018). Os AINEs podem ter um efeito benéfico no sistema muscular em adultos mais velhos. Um estudo demonstrou que altas doses de ibuprofeno (1.200 mg) podem atenuar os aumentos induzidos por exercícios de força na síntese de proteínas, enquanto outros estudos mostraram que o ibuprofeno pode inibir a atividade das células satélites por até 8 dias após o exercício e respostas de sinalização translacional contundentes durante as primeiras horas após o exercício. Enquanto que, no único estudo em indivíduos jovens, não houve efeito negativo de uma dose relativamente baixa (400 mg por dia de treinamento) de ibuprofeno no crescimento ou força muscular (Trappe *et al.*, 2011). Essas descobertas foram contrárias às crenças iniciais sobre os efeitos dos AINEs nas adaptações do sistema muscular ao treinamento de resistência. Por outro lado, um estudo recente realizado com pessoas jovens, indica que doses máximas de AINEs comprometem os aumentos induzidos por exercícios de força no tamanho e força muscular. Os ganhos no tamanho do músculo foram atenuados pelo ibuprofeno, independentemente do tipo de treinamento realizado (Lilja *et al.*, 2018).

Se por um lado os estudos divergem quanto aos níveis hipertróficos no músculo esquelético, no geral, considerando o efeito dos mesmos na diminuição da dor e a negativa associação entre dor e desempenho físico, estas drogas poderiam estar sendo usadas para o aumento do desempenho em cenários de competição esportiva. Importante ressaltar que, considerando a reação inflamatória como parte do processo necessário para a regeneração do tecido lesado, um retardo na cura de lesões associado ao consumo de AINEs têm sido ugerido por alguns autores (Peterson *et al.*, 2003; Urso, 2013).

Durante a fase aguda da inflamação ocorre um aumento na permeabilidade vascular, permitindo que neutrófilos e outras células imunológicas se movam pelo plasma para as células lesadas. Por meio de fagocitose, essas células produzem radicais livres, liberam proteases, citocinas e quimiocinas, assim a resposta imediata dá lugar a geração de mastócitos, leucotrienos e PG (Selders *et al.*, 2017). A produção de PG é geralmente muito baixa em tecidos não-inflamados, no entanto, durante uma resposta inflamatória, tanto o nível quanto o perfil da produção de PG mudam drasticamente. As PG e o tromboxano A₂ (TXA₂), coletivamente denominados prostanóides, são formados quando o ácido araquidônico (AA) é liberado da membrana plasmática por fosfolipases (PLAs) e metabolizado pelas ações sequenciais da prostaglandina G/H sintase, mais conhecidas como COX, enzimas bifuncionais que contém

atividade COX e peroxidase e consistem em três isoformas: COX-1, COX-2 e COX-3 (Bondesen *et al.*, 2004; Ricciotti e Fitzgerald, 2011; Zarghi e Arfaei, 2011).

As COXs causam oxidação do ácido araquidônico, liberado da membrana celular pela ação da fosfolipase 2 (PLA₂) em resposta a estímulos térmicos, mecânicos e/ou químicos (Hanna e Hafez, 2018), tendo como produto final as PGs. A COX-1, expressa constitutivamente na maioria das células, tem uma concentração relativamente estável, e está relacionada com papéis como normalização da função plaquetária, regulação do fluxo sanguíneo renal e citoproteção da mucosa do epitélio gástrico via produção da prostaglandina I₂ (Dubois *et al.*, 1994; Vane *et al.*, 1994). A expressão de COX-2 pode ser aumentada em resposta a estímulos inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento e é uma importante fonte de fatores inflamatórios em doenças proliferativas e inflamatórias, como o câncer. A COX-2 também age em locais de inflamação na indução da reação inflamatória pela produção de PG, tromboxanos e leucotrienos (Dubois *et al.*, 1994; Vane e Botting, 1996). A COX-3 foi a última a ser identificada na busca pelo mecanismo de ação do paracetamol (Botting, 2000).

Dentre todas as PGs, a prostaglandina E₂ (PGE₂) em especial possui capacidade pró-inflamatória e está relacionada com a dor, e por isso, medicamentos que diminuam a formação desta prostaglandina são bastante usados na clínica (Ricciotti e Fitzgerald, 2011). Dessa forma, as enzimas COX-1 e COX-2 são importantes alvos dos AINEs, drogas inibidoras seletivas. Os anti-inflamatórios são classificados baseando-se na seletividade frente à inibição causada na COX-1 e COX-2 (tradicional, AINEs não específicos) ou inibição preferencial à COX-2 (inibidores seletivos de COX-2) (Zarghi e Arfaei, 2011).

1.3.2 Diclofenaco e exercício

Assim como muitos AINEs, o diclofenaco possui ação analgésica, anti-inflamatória e antipirética. O diclofenaco é o AINE mais prescrito mundialmente e desde o início de sua comercialização, vem sendo usado por mais de 1 bilhão de pessoas, sendo que mais de 10 milhões de prescrições de medicamentos diclofenaco foram dispensadas nos EUA em 2012 (Gan, 2010). Desde a sua introdução em 1973, várias formulações de diclofenaco têm sido disponibilizadas ou estão sob investigação clínica, ressaltando o crescimento nas prescrições de AINEs (Altman *et al.*, 2015). Esses novos produtos têm propriedades farmacocinéticas e regimes de dosagem variados e são indicados para o tratamento de uma variedade de condições de dor aguda e/ou crônica (Todd e Sorokin, 1988; Derry *et al.*, 2009). Comercialmente, o diclofenaco pode ser encontrado nas formulações oral, intravenosa, supositório, adesivo ou

gel. O desenvolvimento de medicamentos com diclofenaco demonstra como a tecnologia farmacêutica pode ser usada para impulsionar a inovação, criando medicamentos com eficácia, segurança e utilidade clínica aprimoradas,

A descoberta do mecanismo de ação dos AINEs resultou no desenvolvimento de uma ampla gama de novos AINEs, incluindo derivados de ácido propiônico (por exemplo: ibuprofeno) e derivados do ácido fenâmico (por exemplo: ácido mefenâmico). Estas características físico-químicas foram antecipadas para garantir o transporte eficiente através de membranas e para promover forte inibição da oxidação dependente da COX e consequentemente sua cascata de ativação (Brune, 1974; Sallmann, 1986). O diclofenaco é um ácido fenilacético com uma constante de acidez de 4, considerado um ácido fraco, está disponível em formulação oral na forma de sais de sódio, potássio ou sódio/misoprostol. O diclofenaco sódico (Voltaren*) é um medicamento com revestimento entérico, de liberação lenta (Gan, 2010).

O diclofenaco pertence a um grupo de AINEs que inibem ambas enzimas COX-1 e COX-2. A ligação do diclofenaco as isozimas COXs inibe a síntese de prostanóides (PGE₂, PGD₂, PGF₂, prostaciclina, e tromboxano A₂) (Ku *et al.*, 1986; Patrono *et al.*, 2001). PGE₂ é o prostanóide dominante na produção de processo inflamatório, e a inibição de sua síntese por AINEs é considerada o principal mecanismo das potentes propriedades analgésicas e anti-inflamatórias desses agentes (Patrono *et al.*, 2001; Grosser *et al.*, 2006). Embora o diclofenaco seja comumente referido como um AINE tradicional na literatura, alguns estudos já demonstram que o diclofenaco possui uma maior seletividade para COX-2 do que para COX-1, em contraste com a maioria dos AINEs tradicionais (Ricciotti e Fitzgerald, 2011). Warner e colaboradores (1999) observaram que apesar do diclofenaco possuir uma seletividade 4 vezes maior para a COX-2, em níveis terapêuticos, 70% da COX-1 também é inibida (Warner *et al.*, 1999). O grau de seletividade da COX-2 demonstrado para o diclofenaco é comparável ao do celecoxibe (Grosser *et al.*, 2006). O diclofenaco está entre os mais efetivos inibidores da síntese de PGE₂ e é reportado ser de 3 a 1000 vezes mais potente quando comparado a outros AINEs em sua capacidade de inibir a atividade da COX (Ku *et al.*, 1986). O diclofenaco também possui uma vantagem em relação a outros AINEs devido a relativa baixa toxicidade para o trato gastrointestinal, e quando comparado aos inibidores seletivos de COX-2, mostra menor toxicidade cardiovascular e efeitos mínimos na atividade hepática e renal (Gan, 2010).

Os AINEs estão associados a um risco aumentado de danos no trato gastrointestinal, cardiovascular e com efeitos colaterais renais (Brater, 2002; Kuo *et al.*, 2010; Mcgettigan e Henry, 2013). AINEs com maior seletividade de inibição para COX-1 apresentam maior

probabilidade de associação a um risco aumentado de toxicidade gastrointestinal (Warner *et al.*, 1999). Além disso, estudos também demonstram que altas doses de diclofenaco (150 mg por dia) podem estar relacionadas a eventos trombóticos (Patrignani *et al.*, 2011). Após a administração oral, a absorção sistêmica do diclofenaco é geralmente rápida e diretamente proporcional à dose (Davies e Anderson, 1997). A taxa de absorção de diclofenaco pode variar dependendo da forma de sal, composição farmacêutica, e tempo de administração em relação à ingestão de alimentos.

AINEs circulam pela corrente sanguínea ligados às proteínas plasmáticas, principalmente albumina. O diclofenaco, semelhante aos outros AINEs, concentra-se não apenas na circulação sistêmica, mas também nos tecidos inflamados, aumentando assim a fração livre da droga e facilitando a difusão de diclofenaco nos espaços intracelulares onde pode exercer seu efeito terapêutico (Altman *et al.*, 2015). Por causa de sua meia-vida biológica curta (~2h) (Riess *et al.*, 1978; Davies e Anderson, 1997) e taxa de eliminação rápida (meia-vida de eliminação média 1,2-1,8 h) (Willis *et al.*, 1979; Davies e Anderson, 1997) às vezes não é escolhido como primeira opção no tratamento, no entanto, apesar da meia-vida farmacológica relativamente curta do diclofenaco, ela pode ser estendida, uma vez que, doses terapêuticas, a C_{max} (Altman *et al.*, 2015) é maior do que o necessário para inibir a COX-2 em 80% (Warner *et al.*, 1999), indicando que a eficácia pode ser alcançada com doses mais baixas de diclofenaco.

Alguns resultados do nosso grupo de pesquisa sugerem que o ibuprofeno (Lima *et al.*, 2016) e o diclofenaco podem aumentar o tempo para a exaustão, ou seja, retardar a perda da performance após repetidos sets de natação exaustiva, por diminuir significativamente marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em ratos treinados e também em ratos sedentários (Lima *et al.*, 2016). Além disso, demonstramos que o fígado pode ser considerado como um órgão central nesse processo (Barcelos *et al.*, 2016; Pillon Barcelos *et al.*, 2017). Alguns estudos mostram dados sobre a resposta do tecido muscular ao exercício e ao treinamento, pouco se sabe sobre o fígado durante e após o exercício físico (Hoene e Weigert, 2010; Pillon Barcelos *et al.*, 2017).

Considerando o notável papel metabólico do fígado e do músculo esquelético durante o exercício físico, bem como o uso indiscriminado de AINEs no âmbito esportivo, torna-se importante o entendimento de como o diclofenaco pode influenciar na via do TLR4 em músculo e fígado no sentido de adiar os efeitos deletérios da realização de exercício repetidos de alta intensidade e curta duração.

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do diclofenaco sobre marcadores inflamatórios e estresse oxidativo em ratos submetidos a consecutivos sets exaustivos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Objetivos específicos do Artigo

- Verificar o efeito de repetidos sets exaustivos de natação nos conteúdos de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ (interferon gama), IL-10, COX-2, TLR-4 e MyD88, e na geração de EROs em fígado de ratos.

- Verificar o efeito da administração de diclofenaco de sódio nos conteúdos de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-10, COX-2, TLR-4 e MyD88, e na geração de EROs em fígado de ratos submetidos a repetidos sets exaustivos de natação

- Verificar os efeitos da administração de diclofenaco no tempo a exaustão de ratos submetidos a repetidos sets exaustivos de natação.

2.2.2 Objetivos específicos do Manuscrito

- Verificar o efeito de repetidos sets exaustivos de natação nos conteúdos proteicos de COX-2, TLR4, MyD88, NF κ B, IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF- γ , expressão gênica da iNOS, na geração de EROs, em gastrocnêmio de ratos.

- Verificar o efeito da administração de diclofenaco de sódio nos conteúdos proteicos de COX-2, TLR4, MyD88, NF κ B, IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF- γ , e na expressão gênica de iNOS, na geração de EROs em gastrocnêmio de ratos submetidos a repetidos sets exaustivos de natação.

- Verificar os efeitos da administração de diclofenaco no tempo a exaustão de ratos sedentários submetidos repetidos sets exaustivos de natação.

- Verificar os efeitos do protocolo de natação no conteúdo proteico de MyoD em gastrocnêmio de ratos submetidos repetidos sets exaustivos de natação.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Resultados

Os resultados da presente tese estão apresentados neste item sob a forma de um artigo publicado e um manuscrito. Os estudos que envolveram diclofenaco e exercício físico em ratos (Artigo 1 e Manuscrito 1) têm o projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria com o número de protocolo 5995140415/2015.

4. ARTIGO 1: DICLOFENACO PREVINE DANOS AO FÍGADO ATRAVÉS DA VIA TLR4 EM RATOS SUBMETIDOS A REPETIDOS SETS DE NATAÇÃO EXAUSTIVA

Título original

Diclofenac prevents liver damage through TLR4 pathway in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts.

Autores

Flávia Mariel Steckling, Frederico Diniz Lima, Juliano Boufleur Farinha, PamelaCarvalho Rosa, Luiz Fernando Freire Royes, Maria José Cuevas, Guilherme Bresciani, Félix Alexandre Antunes Soares, Javier González-Gallego, Rômulo Pillon Barcelos.

Periódico e ano de publicação:

Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, 2019

DOI: 10.1111/sms.13579

*Autor correspondente:
Rômulo Pillon Barcelos
Programa de Pós-graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo
Passo Fundo, Brazil
Phone: +55 55 9 9131-6601
romulo1604@hotmail.com

Diclofenac attenuates inflammation through TLR4 pathway and improves exercise performance after exhaustive swimming

Flávia M. Steckling¹ | Frederico D. Lima² | Juliano B. Farinha³ |
 Pamela Carvalho Rosa¹ | Luiz Fernando Freire Royes² | Maria J. Cuevas⁴ |
 Guilherme Bresciani⁵ | Félix Alexandre Soares¹ | Javier González-Gallego⁴ |
 Rômulo P. Barcelos^{1,6}

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

²Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Dança, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Santa Maria, Brazil

⁴Institute of Biomedicine (IBIOMED) and Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERehd), University of León, León, Spain

⁵Grupo de Investigación en Rendimiento Físico y Salud (IRyS), Escuela de Educación Física, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

⁶Programa de Pós-graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil

Correspondence

Rômulo Pilon Barcelos, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária: Bioexperimentação, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo (UPF), 99052-900 – BR 285, São José, Passo Fundo – RS, Brazil.
 Email: romulo1604@hotmail.com

Funding information

PRONEM/CNPq/FAPERGS, Grant/Award Number: 16/25510000248-7; CAPES/PROEX, Grant/Award Number: 23038.005848/2018-31

Background: The use of NSAIDs has become a common practice to counteract the pro-inflammatory acute effects of exercise, in order to improve sports performance. The liver, due to its central role in energy metabolism, may be involved primarily in the process of ROS generation and consequently inflammation after exhaustive exercise.

Objective: To analyze the influence of diclofenac on the liver TLR4 pathway and time to exhaustion in rats submitted to repeated exhaustive swimming.

Methods: An exhaustive test was performed in order to mimic athletes' routine, and inflammatory status and oxidative stress markers were evaluated in the liver. Animals were divided into sedentary and exhaustion groups, with this last performing three exhaustive swimming bouts. At the same time, diclofenac or saline was pre-administered once a day for nine days.

Results: Data showed significantly increased COX-2, TLR4, and MyD88 protein content in the liver after exhaustive swimming bouts. The levels of pro-inflammatory cytokines also increased after exhaustive exercise, while these effects were attenuated in the group treated with diclofenac plus exhaustive swimming bouts. The anti-inflammatory modulation provoked by diclofenac treatment was associated with an increased time to exhaustion in the exercise bouts. The exhaustive exercise increased TBARS formation, but diclofenac treatment blunted this elevation, while GSH/GSSG ratios in both exhaustion-saline and exhaustion-diclofenac-treated groups were lower than in the sedentary-saline group.

Conclusions: Our findings suggest that diclofenac may improve exercise performance and represent an effective tool to ameliorate the pro-inflammatory status in liver when associated with exhaustive exercise, and the liver may be a possible therapeutic target.

KEYWORDS

exhaustive swimming, inflammation, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, TLR4 pathway

1 | INTRODUCTION

Regular exercise is an effective way for prevention and treatment of several diseases.¹ However, acutely exercise can cause muscle damage, as well as increases in reactive oxygen species (ROS) generation, depending on both exercise intensity and duration.² Although not as much energy-dependent as the skeletal muscle, the liver is also a highly demanding metabolic organ.³ In this sense, the relationship among energy metabolism, redox biochemistry, and ROS generation is highly relevant.³ Studies showed that a low level of aerobic capacity translates into a liver phenotype that is more susceptible to the deleterious consequences of metabolic-related complications.^{4,5} In addition, increases on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, a key mediator of the inflammatory signaling, are also associated with cellular damage mediated by ROS, mainly through the formation of peroxynitrite.⁶ Indeed, the initial lipid peroxidation caused by free radical generation might lead to inflammation process⁷ because lipid peroxidation releases arachidonic acid from the cell membrane, which, in turn, activates cyclooxygenase-2 (COX-2).^{6,7}

In this line, liver has been also shown to play an important role in redox and inflammatory status.⁸ Otherwise, acute exercise is responsible for exacerbated ROS production, increasing inflammation mediators,⁹ which have been implicated in metabolic disruption linked to toll-like receptor (TLR)/myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) signaling.^{10,11} In this regard, TLRs signaling leads to phosphorylation and translocation of the transcription factor NF- κ B,¹¹ and consequently, to pro-inflammatory mediators' secretion.¹²

The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) has become a common practice among athletes and non-athletes to counteract the pro-inflammatory and soreness effects of exercise.^{13,14} There is emerging evidence in humans and rodents that NSAIDs can significantly improve important endurance parameters as well as aspects of neuromuscular performance, possibly through increased pain tolerance,^{15,16} delaying the onset of fatigue. NSAIDs exhibit anti-inflammatory mechanisms via inhibition of COX and, therefore, may attenuate ROS production, as well as suppression of phagocyte migration, aggregation, and other functions.¹⁷ In some countries, diclofenac has been the most commonly prescribed NSAID over the past decade.¹⁸ Furthermore, recent results of our research group demonstrate that acute eccentric exercise increased TLR4-mediated NF- κ B activation in liver from rats pretreated with diclofenac and leads to an augmented expression of different pro-inflammatory genes, highlighting the role of TLR4 as a target for anti-inflammatory interventions in liver diseases.¹⁹ The present study aimed to verify the effects of diclofenac administration on time to exhaustion and liver inflammatory and redox markers in rats submitted to consecutive and exhaustive swimming bouts.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals and ethics statement

Twenty-four male Wistar rats weighting 200-280 g were obtained from our own breeding colony and kept in plastic boxes containing a maximum of five animals per cage under controlled environment conditions (12:12h light-dark cycle, with onset of light phase at 7:00, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% relative humidity) with standard food (Guabi) and water ad libitum. All experiments were conducted in accordance with national and international legislation: Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the US Public Health Service's Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals-PHS Policy and with the approval of the local Ethics Committee (#5995140415/2015).

2.2 | Experimental design

One week before the swimming tests, animals were initially acclimated to the water to reduce stress and to familiarize with exercise environment. The adaptation consisted in keeping the animals in shallow water (5 cm in depth) at $31 \pm 1^\circ\text{C}$ between 9 and 11 hours am in a tank of 80 cm in length, 50 cm in width, and 90 cm in depth.¹⁸ A total of 24 animals were randomly allocated and divided into sedentary-saline ($n = 4$) and sedentary-diclofenac ($n = 4$) groups to verify diclofenac per se effects, and to test the effects of diclofenac on exhaustive exercise bouts we subdivided the animals into exhaustion-saline ($n = 7$) and exhaustion-diclofenac ($n = 7$) groups. Rats from both groups performed three repeated exhaustive swimming bouts with each bout separated by a 72-h time period. Rats were sacrificed by decapitation after the last bout, liver samples were immediately excised, precooled with liquid nitrogen, and stored at -80°C for biochemical assays. Figure 1 depicts the study design.

2.3 | Exhaustive test protocol

The exhaustive test protocol was carried out according to de Araujo et al.,²⁰ with few modifications. The protocol consisted in three repeated exhaustive swimming bouts: the first bout

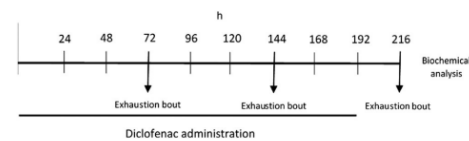


FIGURE 1 Timeline of the swimming exhaustive protocol data collection

took place 72 hours after the start of the protocol; the second bout at 144 hours after; and the third 216 hours after (Figure 1). Animals of the exhaustive group (saline and diclofenac) swam individually in the tank with an overload of 13% of body weight until exhaustion in order to determine the time to exhaustion. Exhaustion was characterized by the moment at which animals were no longer able to maintain themselves in the water surface, reaching 10 seconds submerged.²⁰

2.4 | Diclofenac administration

Diclofenac was purchased from Sigma-Aldrich. Diclofenac was dissolved in warmed saline and was administered via intragastric gavage, at a dose of 10 mg/kg daily²¹ for nine days. Before the first exhaustion bout, animals were pretreated for three days, which was maintained until the last protocol day. The non-treated animals received saline during the same treatment period. The selected dose is that prescribed in clinical practice and does not cause adverse effects.²²

2.5 | Statistical analyses

The Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Ins, EUA version 17) was used for all analyses. All data are expressed as means \pm SEM for each experimental group. Data were analyzed using a 2 (diclofenac and saline treatments) \times 2 (sedentary and exhaustion) analysis of variance (ANOVA). When appropriate, significant differences among means were tested using Sidak's post-hoc test. Differences between groups were considered to be significant at $P < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Time to exhaustion

In the present study, results revealed a clear increase on time to exhaustion after diclofenac administration (Figure 2). The diclofenac-treated group was able to swim about 23.5 seconds longer than the non-treated group after the third bout of exhaustive exercise ($P < .05$) and about 34 seconds longer than the first swimming bout ($P < .001$).

3.2 | Oxidative stress markers

Table 1 reports DFC, TBARS levels, and GSH/GSSG ratio. The results of the two-factor ANOVA revealed no significant treatment effect [$F(1,16) = 0.067$, $P = .790$], exercise effect [$F(1,16) = 11.09$, $P = .062$], or interaction effect [$F(1,16) = 1.005$, $P = .331$] on DCF levels. Exhaustive

exercise increased TBARS formation [$F(1,16) = 26.07$, $P = .001$], but diclofenac treatment had an inhibitory effect [$F(1,16) = 11.23$, $P = .004$], and a significant interaction effect was also detected [$F(1,16) = 9.384$, $P = .007$]. The GSH/GSSG ratios in both exhaustion-saline and exhaustion-diclofenac treated groups were lower than the ratio observed in the sedentary-saline group, with significant exercise effect [$F(1,12) = 18.64$, $P = .001$ and treatment effect [$F(1,12) = 4.98$, $P = .050$], but no interaction effect [$F(1,12) = 1.895$, $P = .194$].

3.3 | Cytokine levels

Diclofenac per se did not alter IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels, as depicted in Figure 3. The exhaustion protocol [$F(1,17) = 70.82$, $P < .001$; Figure 3A] and diclofenac [$F(1,17) = 6.067$, $P = .025$] increased levels of IL-1 β , with no interaction effect [$F(1,16) = 0.0212$, $P = .886$]. The same was seen in IL-6 levels, with significant exercise effect [$F(1,22) = 33.32$, $P < .001$; Figure 3B] and treatment effect [$F(1,22) = 6.626$, $P = .017$], but no significant interaction [$F(1,22) = 1.696$, $P = .206$]. INF- γ : exercise [$F(1,18) = 239.2$, $P < .001$; Figure 3C], treatment [$F(1,18) = 38.18$, $P < .001$] interaction [$F(1,18) = 1.84$, $P = .192$] and TNF- α , exercise [$F(1,17) = 133.3$, $P < .001$; Figure 3D], treatment [$F(1,17) = 6.543$, $P = .020$], interaction [$F(1,17) = 0.832$, $P = .374$]. Pro-inflammatory responses induced by exhaustion exercise were accompanied by significant changes in IL-10 levels [$F(1,22) = 22.93$; $P < .001$; Figure 4], and there was a significant effect of diclofenac [$F(1,22) = 102.6$, $P < .001$] with no interaction effect [$F(1,22) = 1.921$, $P = .180$].

3.4 | Inflammatory pathway

The protein content and mRNA level of COX-2 are shown in Figure 5. Diclofenac decreased COX-2 protein

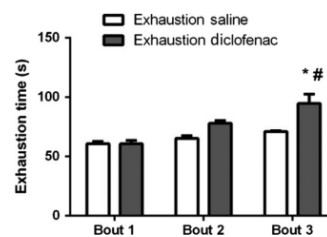
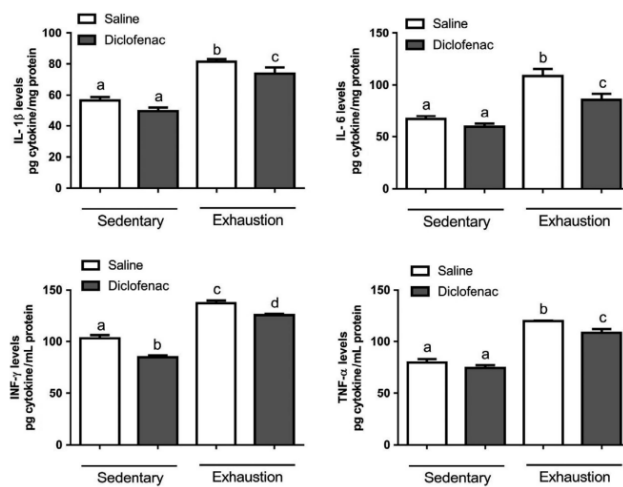


FIGURE 2 Effects of exercise bouts or diclofenac intake on time to exhaustion in the bouts of the exhaustive protocol. Data are presented as means \pm SEM. * $P < .05$ compared to non-treated group with third bout of exhaustive. # $P < .001$ when compared with the first bout

TABLE 1 Effects of the exhaustion bouts and diclofenac intake on liver oxidative stress markers

	Saline		Diclofenac	
	Sedentary	Exhaustion	Sedentary	Exhaustion
DCF (nmol/mg protein)	1.015 ± 0.064 ^a	1.511 ± 0.144 ^a	1.148 ± 0.110 ^a	1.454 ± 0.181 ^a
GSH/GSSG ratio	2.326 ± 0.237 ^a	1.736 ± 0.057 ^b	1.952 ± 0.093 ^{ab}	1.647 ± 0.029 ^b
TBARS (nmol MDA/mg)	2.751 ± 0.165 ^a	4.372 ± 0.237 ^b	2.694 ± 0.205 ^a	3.099 ± 0.133 ^a

Note: Data are presented as means ± SEM. 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF); reduced glutathione (GSH); oxidized glutathione (GSSG); thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS). Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < .05$).

**FIGURE 3** Effects of exercise bouts and/or diclofenac intake on IL (interleukin)-1 β , IL-6, IFN- γ (interferon-gamma), and TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) levels in liver of rats. Data are presented as means ± SEM. Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < .05$)

both in rest and after the exhaustive bouts of exercise [$F(1,38) = 23.86$; $P < .001$; Figure 5A], with no interaction effect [$F(1,17) = 0.579$, $P = .451$]. No difference was found for COX-2 mRNA levels (Figure 5B). Exhaustive exercise increased the protein content of TLR4 [$F(1,26) = 34.16$; $P < .001$, Figure 6A], and diclofenac treatment decreased its expression [$F(1,26) = 3.269$; $P = .003$], with no interaction effects [$F(1,26) = 3.383$; $P = .773$]. The protein content of MyD88 also increased after the exhaustive bouts of exercise [$F(1,30) = 8.76$; $P < .001$; Figure 6B], with an inhibitory effect of diclofenac [$F(1,30) = 11.34$, $P = .002$] and no interaction effect [$F(1,30) = 0.233$, $P = .633$].

4 | DISCUSSION

Here, we showed that parameters related to the inflammatory and redox status increased in the liver after exhaustive swimming bouts and that these effects were attenuated by diclofenac treatment. Moreover, this anti-inflammatory effect

of diclofenac was associated with an increased time to exhaustion in the exercise bouts.

Diclofenac was administered for nine days (10 mg/kg daily) and removed 24 hours before the last exhaustive bout because there is no evidence about side effect, and this period would not be enough to stop a possible therapeutic effect.²³ Interestingly, pre-treatment with diclofenac proved effective in increasing the time to exhaustion, which has not yet been demonstrated in humans.¹⁵ This may occur due to differences in muscle glycogen that has a more central role in glucose homeostasis in humans (threefold to eightfold more muscle glycogen than liver glycogen when compared to mice).²⁴ Moreover, rodent liver is enriched in natural killer cells, which can constitute up to 10% of the leukocyte fraction²⁵ and are major contributors to the hepatic TLR and cytokine-mediated inflammatory signaling, contributing to explain differences between rodents and humans.²⁶

Due to its central metabolic role in detoxification, synthesis, and distribution of biomolecules, liver is remarkably important during exercise outcomes, including modulation of ROS and inflammatory mediators.²¹ In fact, considering that

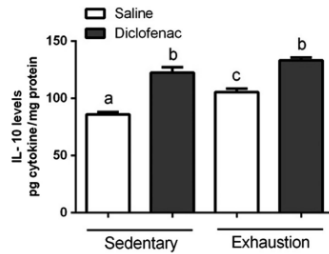


FIGURE 4 Effects of exercise bouts and/or diclofenac intake on interleukin-10 (IL-10) expression in liver of rats. Cytokine levels were measured by ELISA. Data are presented as means \pm SEM. Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < .05$)

90% of the circulating GSH levels are produced in hepatic tissue, this organ plays an important role in the general redox status.^{27,28} Our results demonstrated that GSH/GSSG ratio levels are reduced in those livers from the exhaustive-exercised

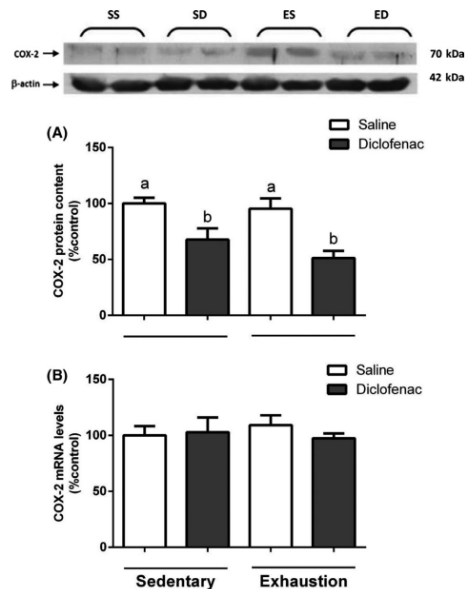


FIGURE 5 Effects of exercise bouts and/or diclofenac intake on COX-2 (cyclooxygenase-2) protein content (A) and mRNA levels (B) in liver of rats. Levels of mRNA were analyzed by RT-PCR assays and normalized to GAPDH. Densitometry quantification and representative Western blots are shown. Equal loading of proteins is illustrated by β -actin bands. Data are presented as means \pm SEM. Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < .05$)

rats. This is a remarkable finding because GSH depletion in cells is involved in metabolic limitations, such as lower exercise capacity and cell membrane disruption/apoptosis.²⁹ Therefore, the understanding of the effects of acute exercise and its interaction with diclofenac upon the liver and how this major metabolic organ adapts to these stimuli are important for a better knowledge of exercise-related health and performance benefits. In our study, the exhaustive exercise in rats treated with diclofenac did not reduce the GSH/GSSG ratio in comparison to the exercised-non-treated animals, and changes were not found concerning DCF levels among groups. However, we could see that the increased amount of TBARS formation by the exhaustive exercise was blunted by diclofenac treatment. The decrease in TBARS levels added to the attenuation of DCF levels indicates that diclofenac treatment may be effective in preventing lipid peroxidation and consequently the increase in ROS. We have previously found a similar effect following ibuprofen administration.²³

As already reported, diclofenac treatment interferes in the synthesis of inflammatory markers in different organs, including the liver.³⁰ The production of these molecules is mediated by nuclear transcription factors, which, in turn, might be activated by these cytokines in a physiological feedforward.²¹ Our previous study reported an activation of the NF- κ B-dependent inflammatory pathway by an intensive and aggressive eccentric exercise protocol, and that diclofenac treatment blunted this effect.²¹ Here, we showed for the first time an increase in pro-inflammatory cytokines in the liver of rats subjected to exhaustive bouts of swimming, corroborating the inflammatory steps previously demonstrated. These results are surprising because swimming does not present as main component the eccentric damage to the tissues. In fact, several hepatic adaptations are expected during exercise due to the liver major metabolic roles.¹¹ The cumulative effects of several acute exhaustive swimming bouts can induce a temporary downregulation of the immune system, and studies have associated intense exercise with increased infections within two weeks after performance¹² which could be accompanied by fatigue and tissue injury. Furthermore, acutely, intense exercise alters the systemic balance of cytokines, which are cell mediators highly related to oxidative stress and inflammation.³⁰ NSAIDs exhibit anti-inflammatory effects via inhibition of prostaglandin and, in a way, can act secondarily reducing ROS production.¹⁴ This evidence suggests that diclofenac could improve performance in high-intensity endurance exercise due to its effects on glycogenolysis/glycolysis stimulation and inhibition of gluconeogenesis, because glycolysis is the sole source of energy in the eukaryotic cell under anaerobic conditions.³¹ The literature has already found a close relationship between circulating cytokine levels and glycogen depletion as a possible mechanism related to fatigue, because muscle glycogen and blood glucose are the main sources of substrates for oxidative metabolism, and immune depletion coincides with glycogen depletion.^{16,24}

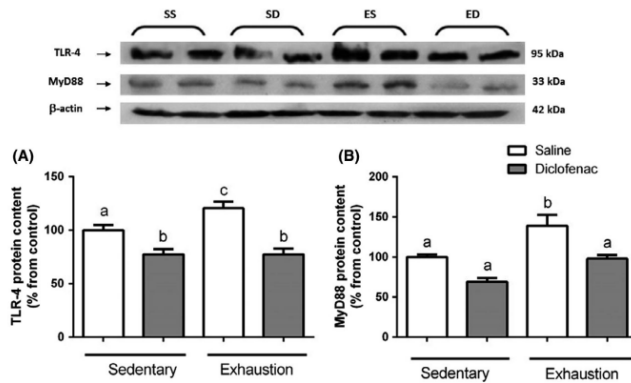


FIGURE 6 Effects of exercise bouts and/or diclofenac intake on TLR4 (toll-like receptor 4) (A) and MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) (B) protein content in liver of rats. Densitometry quantification and representative Western blots are shown. Equal loading of proteins is illustrated by β -actin bands. Data are presented as means \pm SEM. Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < .05$)

Exercise-induced oxidative stress activates signaling pathways that increase the expression of antioxidants in liver and are also responsible for the process of exercise-induced adaptation. This adaptation is influenced by various factors, including training volume, intensity, frequency, and the mode of exercise.³² However, in acute phase response, exercise may induce an increase in multiple circulating cytokines and chemokines, such as IL-1, IL-6, and TNF- α . Exhaustive exercise can produce inflammatory cell infiltration in rats, and acute exercise induces cytokine/cytokine receptor signaling in the liver, with upregulation of chemokine ligands, IL-1 β receptor, and IL-1 β in rodent models.³³ Here, we showed that diclofenac treatment caused a decrease of inflammatory cytokines and this may be related to the delay of fatigue onset. Although this inflammatory status has been attributed to several pathways, recent data point to TLRs as key exercise-related inflammatory receptors, considering their role in the activation and expression of COX-2.^{21,34,35}

In sports, the role of COX-1 and COX-2 inhibition on muscle damage has been recently studied due to NSAIDs' effects upon inflammation and pain sensitization.³⁶ As previously mentioned, NSAID's anti-inflammatory mechanism is based on the inhibition of COXs, selectively or not. The consequence is a decrease in cytokines secretion by macrophages at the injury site, which reduces the inflammatory response and related pain sensitization.¹⁹ However, studies regarding the regulation of COX-2 expression after muscle damage are still incipient and controversial. While some studies reported upregulation,^{37,38} others demonstrated that COX-2 expression remains unaltered.^{39,40} We demonstrate that diclofenac inhibited COX-2 and consequently such effects, given that the formation of prostaglandins may not only regulate pain and inflammation,¹⁵ but also modulate the protein turnover machinery controlling tissue remodeling for the adaptive responses to exercise and resulting in the decreased TLR4 protein content detected.

Moreover, consecutive and exhaustive exercise bouts increased TLR4 and MyD88 protein content, and cytokine levels in the liver; whereas diclofenac intake blunted these effects in a similar manner to previous studies adopting only one eccentric exercise bout.²¹ MyD88 is considered the first protein involved in the TLR4 pathway, and it was overexpressed after the eccentric exercise protocol; whereas diclofenac treatment blunted its expression to baseline levels in the liver after swimming exhaustion. This indicates that the TLR4-dependent pathway plays an important role in hepatic inflammatory signaling induced by exhaustive exercise swimming. The use of diclofenac has additional effects, allowing animals to swim for a longer time; however, more studies are needed to understand if only this modulation of inflammation is enough to increase the performance.

In summary, our study describes the effects of an exhaustive protocol of swimming upon a canonical inflammatory pathway in the liver and the effects of a classical NSAID in this pathway, demonstrating for the first time that diclofenac might exert antioxidant and anti-inflammatory effects in the liver upon consecutive and exhaustive bouts of exercise. Results obtained indicate that diclofenac decreases the production of pro-inflammatory cytokines, which was accompanied by a blunted expression of TLR4 and MyD88 protein content in the liver. Interestingly, the anti-inflammatory effect triggered by diclofenac treatment was associated with increased time to exhaustion in the diclofenac exercise group, suggesting that attenuation of inflammation can be related to the delay of fatigue onset and to an increase in performance.

5 | LIMITATIONS

The relatively small number of animals studied and the fact that the researchers were aware of which animals were treated with diclofenac or placebo are limitations of the study.

However, more animals were not used due to ethical considerations, and the beneficial effects of diclofenac were clear. The assessment of hepatic glycogen content would bring more insights to understand the mechanisms responsible for our findings. We recognize the lack of information about the mechanisms of how anti-inflammatory drugs can benefit exercise performance (not related to pain relief). More studies are needed to differentiate the acute (eg, one exhaustive session), subacute (eg, three exhaustive sessions), and chronic (several exhaustive sessions) effects of diclofenac on liver responses and their relationship with exercise performance. Finally, although the results herein described have shown interesting effects of diclofenac on exercise to exhaustion in rodents, caution should be taken when extrapolating those to human performance.

6 | PERSPECTIVE

Current literature demonstrates that NSAIDs can improve performance and decrease muscle inflammation. Our results indicate that diclofenac positively modulates the TLR4 pathway in the liver, favoring an anti-inflammatory profile, which may be linked to the attenuation of performance loss during short-term athletic competitions. However, a risk/benefit analysis of its use is required.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the PRONEM/CNPq/FAPERGS 16/25510000248-7 and CAPES/PROEX 23038.005848/2018-31 research grants. FAAS received a fellowship from CNPQ. FMS and PCR received a fellowship from CAPES. CIBERehd is funded by Instituto de la Salud Carlos III, Spain.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ORCID

Flávia M. Steckling  <https://orcid.org/0000-0002-6527-9837>
 Frederico D. Lima  <https://orcid.org/0000-0002-3298-2833>
 Juliano B. Farinha  <https://orcid.org/0000-0003-4589-256X>
 Pamela Carvalho Rosa  <https://orcid.org/0000-0002-4827-7063>
 Luiz Fernando Freire Royes  <https://orcid.org/0000-0003-4045-4827>
 Maria J. Cuevas  <https://orcid.org/0000-0002-9122-8443>
 Guilherme Bresciani  <https://orcid.org/0000-0003-1526-5573>
 Félix Alexandre Soares  <https://orcid.org/0000-0002-6453-7902>
 Javier González-Gallego  <https://orcid.org/0000-0002-4386-9342>
 Rômulo P. Barcelos  <https://orcid.org/0000-0002-6366-6366>

REFERENCES

- Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - Evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25(Suppl 3):1-72.
- Zbinden-Foncea H, Raymackers JM, Deldicque L, Renard P, Francaux M. TLR2 and TLR4 activate p38 MAPK and JNK during endurance exercise in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44:1463-1472.
- Sunami Y, Leithauser F, Gul S, et al. Hepatic activation of IKK/NF-kappaB signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation. *Hepatology*. 2012;56:1117-1128.
- Ascensao A, Martins MJ, Santos-Alves E, et al. Modulation of hepatic redox status and mitochondrial metabolism by exercise: therapeutic strategy for liver diseases. *Mitochondrion*. 2013;13:862-870.
- Santos-Alves E, Marques-Aleixo I, Coxito P, et al. Exercise mitigates diclofenac-induced liver mitochondrial dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2014;44:668-677.
- Huang GJ, Bhaskar Reddy MV, Kuo PC, et al. A concise synthesis of viscolin, and its anti-inflammatory effects through the suppression of iNOS, COX-2, ERK phosphorylation and pro-inflammatory cytokines expressions. *Eur J Med Chem*. 2012;48:371-378.
- Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
- Pillon-Barcelos R, Freire-Royes LF, Gonzalez-Gallego J, Bresciani G. Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise. *Free Rad Res*. 2017;51:222-236.
- Brown WM, Davison GW, McClean CM, Murphy MH. A Systematic review of the acute effects of exercise on immune and inflammatory indices in untrained adults. *Sports Med Open*. 2015;1:35.
- Kwon OS, Tanner RE, Barrows KM, et al. MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;309:E11-21.
- Mazur-Bialy AI, Pochee E, Zarawski M. Anti-inflammatory properties of irisin, mediator of physical activity, are connected with TLR4/MyD88 signaling pathway activation. *Intern J Mol Sci*. 2017;18:701.
- Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. 2007;13:460-469.
- Gorski T, Cadore EL, Pinto SS, et al. Use of NSAIDs in triathletes: prevalence, level of awareness and reasons for use. *Br J Sports Med*. 2011;45:85-90.
- Morelli KM, Brown LB, Warren GL. Effect of NSAIDs on recovery from acute skeletal muscle injury: A systematic review and meta-analysis. *Am J Sports Med*. 2018;46:224-233.
- Lundberg TR, Howatson G. Analgesic and anti-inflammatory drugs in sports: Implications for exercise performance and training adaptations. *Scand J Med Sci Sports*. 2018;28:2252-2262.
- Reid N, Healy GN, Gianoudis J, et al. Association of sitting time and breaks in sitting with muscle mass, strength, function, and inflammation in community-dwelling older adults. *Osteoporos Int*. 2018;29:1341-1350.
- Ziltener JL, Leal S, Fournier PE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for athletes: an update. *Ann Phys Rehabil Med*. 2010;53:278-282.
- Schreijenberg M, Luijsterburg PA, VanTrier YD, et al. Efficacy of paracetamol, diclofenac and advice for acute low back pain in

- general practice: design of a randomized controlled trial (PACE Plus). *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18:56.
19. Barcelos RP, Bresciani G, Rodriguez-Miguel P, et al. Diclofenac pretreatment effects on the toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B-mediated inflammatory response to eccentric exercise in rat liver. *Life Sci*. 2016;148:247-253.
 20. de Araujo GG, Papoti M, Manchado FeB, de Mello MA and Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol Part A, Mol Integr Physiol*. 2007;148:888-892.
 21. Barcelos RP, Bresciani G, Cuevas MJ, Martinez-Florez S, Soares FAA, Gonzalez-Gallego J. Diclofenac pretreatment modulates exercise-induced inflammation in skeletal muscle of rats through the TLR4/NF-kappaB pathway. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017;42:757-764.
 22. Ramm S, Mally A. Role of drug-independent stress factors in liver injury associated with diclofenac intake. *Toxicology*. 2013;312:83-96.
 23. Lima FD, Stamm DN, Della Pace ID, et al. Ibuprofen intake increases exercise time to exhaustion: A possible role for preventing exercise-induced fatigue. *Scand J Med Sci Sports*. 2016;26:1160-1170.
 24. Trefts E, Williams AS, Wasserman DH. Exercise and the regulation of hepatic metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;135:203-225.
 25. Shi FD, Ljunggren HG, La Cava A, VanKaer L. Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:658-671.
 26. Chen L, Deng H, Cui H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9:7204-7218.
 27. Jones TW, Howatson G, Russell M, French DN. Effects of strength and endurance exercise order on endocrine responses to concurrent training. *Eur J Sport Sci*. 2017;17:326-334.
 28. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kourtas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med*. 2008;38:579-606.
 29. Leeuwenburgh C, Ji LL. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316:941-949.
 30. Horl WH. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the kidney. *Pharmaceuticals*. 2010;3:2291-2321.
 31. Ivy JL. Role of carbohydrate in physical activity. *Clin Sports Med*. 1999;18:469-484.
 32. Georgakouli K, Manthou E, Fatouros IG, et al. Effects of acute exercise on liver function and blood redox status in heavy drinkers. *Exp Therap Med*. 2015;10:2015-2022.
 33. Huang CC, Huang WC, Yang SC, Chan CC, Lin WT. *Ganoderma tsugae* hepatoprotection against exhaustive exercise-induced liver injury in rats. *Molecules*. 2013;18:1741-1754.
 34. Gleeson M, McFarlin B, Flynn M. Exercise and Toll-like receptors. *Exerc Immunol Rev*. 2006;12:34-53.
 35. Rodriguez-Miguel P, Fernandez-Gonzalo R, Almar M, et al. Role of Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways on the inflammatory response to resistance training in elderly subjects. *Age*. 2014;36:9734.
 36. Phillips K, Clauw DJ. Central pain mechanisms in the rheumatic diseases: future directions. *Arthritis Rheum*. 2013;65:291-302.
 37. Bondesen BA, Mills ST, Pavlath GK. The COX-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290:C1651-C1659.
 38. Weinheimer EM, Jemiolo B, Carroll CC, et al. Resistance exercise and cyclooxygenase (COX) expression in human skeletal muscle: implications for COX-inhibiting drugs and protein synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R2241-R2248.
 39. Mikkelsen UR, Langberg H, Helmark IC, et al. Local NSAID infusion inhibits satellite cell proliferation in human skeletal muscle after eccentric exercise. *J Appl Physiol*. 2009;107:1600-1611.
 40. Trappe TA, Carroll CC, Dickinson JM, et al. Influence of acetaminophen and ibuprofen on skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300:R655-R662.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Steckling FM, Lima FD, Farinha JB, et al. Diclofenac attenuates inflammation through TLR4 pathway and improves exercise performance after exhaustive swimming. *Scand J Med Sci Sports*. 2019;00:1-8. <https://doi.org/10.1111/sms.13579>

**5. MANUSCRITO 1: O DICLOFENACO REDUZ AS RESPOSTAS PRÓ-
OXIDANTES E PRÓ-INFLAMATÓRIAS DA VIA TLR4 NO MUSCULO
INDUZIDAS PELA NATAÇÃO EXAUSTIVA**

Título original

*Diclofenac reduces muscle pro-oxidant and proinflammatory responses
byTLR4 pathway activated by exhaustive swimming*

Autores

Flávia Mariel Steckling¹, Juliano Boufleur Farinha², Willian Link Papalia¹, Frederico Diniz Lima¹, Judit Borrás Bertomeu², Alexandre Seixas Nascimento², Susana Martínez Flórez³, Marta Maria MedeirosFrescuraDuarte⁴, Luiz Fernando Freire Royes², Félix Alexandre Antunes Soares^{1*}, Rômulo Pillon Barcelos^{1,5}

Diclofenac reduces muscle pro-oxidant and proinflammatory responses in exhaustive swimming protocol by TLR4 pathway.

Flávia Mariel Steckling¹, Juliano Boufleur Farinha², Willian Link Papalia¹, Frederico Diniz Lima¹, Judit Borrás Bertomeu², Alexandre Seixas Nascimento², Susana Martínez Flórez³, Marta Maria Medeiros FrescuraDuarte⁴, Luiz Fernando Freire Royes², Félix Alexandre Antunes Soares^{1*}, Rômulo Pillon Barcelos^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Centro de Educação Física e Desportos (CEFD), Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

³Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, Campus Universitario, León, Spain

⁴Universidade Luterana do Brasil, Brazil.

⁵Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil.

*Corresponding Author:

Félix Alexandre Antunes Soares, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

felix@ufsm.br

ABSTRACT:

Aim: This study analyzes the influence of diclofenac on the TLR-NF- κ B pathway in skeletal muscle of rats submitted to consecutive exhaustive exercise.

Material and Methods: Rats were divided into sedentary and exhaustion groups, with this last performing three exhaustive swimming bouts. Diclofenac was given by intragastric gavage, at a daily dose of 10 mg/kg for nine days. Nociception and strength tests were performed throughout the protocol. Immediately after the last bout, rats were euthanized in order to analyze oxidative stress markers, while inflammatory markers were evaluated through ELISA, and TLR4, MyD88, MyoD, COX-2, NF κ B levels were evaluated through protein content in muscle gastrocnemius.

Results: Rats from exhaustion-saline group presented an increased pain threshold when compared to sedentary-saline and exhaustion-diclofenac groups. Diclofenac intake per se lowered proinflammatory cytokines and increased IL-10 levels and GSH/GSSG ratio in control groups. Moreover, this anti-inflammatory modulation caused by diclofenac increased time to exhaustion in exhaustion-diclofenac group. Data obtained showed that consecutive bouts of exhaustive exercise significantly increased muscle oxidative stress markers (DCFH-DA and TBARS). Similarly, the expression of proinflammation-related markers also increased after the exhaustive exercise. However, these effects were attenuated in the exercise + diclofenac group. TLR4, MyD88, NF κ B and COX-2 contents were also upregulated after the consecutive bouts of exhaustive exercise and the anti-inflammatory drug blunted this effect.

Conclusion: As a conclusion, we demonstrate that after repeated exhaustive swimming bouts, diclofenac pretreatment can increase time to exhaustion and modulate muscle response to oxidative stress, pain, and inflammation, suggesting a possible role for diclofenac in performance and muscle adaptation to exercise through an attenuation of the TLR4-NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS

COX-2, Exhaustive swimming, inflammation, muscle, NSAIDs.

1. INTRODUCTION

Physical exercise promotes many benefits for health in those who practice it regularly [1]. On the other hand, a strenuous exercise aimed to achieve the best athletic performance may result in muscular microtrauma, soreness, and inflammation [2, 3] through metabolic and mechanical stress. However, uncontrolled ROS and proinflammatory responses are both connected to impaired recovery and performance deterioration. In an attempt to improve physical performance, athletes and coaches make use of several actions, such as nutritional strategies, appropriate exercise training, and enough resting [4], despite the invariable influence of genetic background.

High-intensity eccentric exercise causes muscular microtrauma [5]. Intramuscular inflammatory signaling plays a critical role in mediating the regenerative response to muscle fiber damage and must be finely regulated, given the fact that inflammatory cytokine expression is capable of promoting muscle growth and muscle loss [6]. In response to muscle injury after loading, satellite cells fuse with damaged and undamaged myofibers as part of the repair process [7] and an increase in MyoD (myoblast determination protein), a key protein in the muscle regeneration [8, 9], is observed.

Damage-associated molecular patterns (DAMPs) are important molecular signals released by damaged tissue after exercise, in order to activate the immune system. Muscle tissue that has been damaged by acute injury secretes DAMPs to activate Toll-like receptor (TLR) signaling, which in turn, induces the expression of inflammatory genes for mediating tissue repair [8]. Subsequently, muscle cytokines and chemokines are released into plasma through activator protein 1 (AP-1) and the early phase of nuclear factor-kappa β (NF- κ β) transcription factors. These secreted cytokines and chemokines mediate the recruitment of monocytes from the bone marrow to the injured site. An atypical injury–regeneration event is characterized by the superimposition of the inflammatory response and recurring injury that perturbs the resolution of repair in the muscle [9].

In this sense, there are many legal strategies used to improve athletic performance (directly or indirectly); and among those, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) exert a central role. A large number of medicines have these properties, including opioids (narcotics), NSAIDs, and paracetamol. While opioids require a prescription and are banned within sports competitions, NSAIDs (such as ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, naproxen, acetylsalicylic acid, and diclofenac) are easily commercialized and currently not classified as doping agents [10]. NSAIDs consumption is much higher in Olympic athletes than in non-

athletes [10, 11].

The major problems are the narrowed breaks between competition, because athletes need an efficient recovery in a short period of time that can optimize sports success. For instance, in order to accelerate muscle repair, decrease neuromuscular fatigue and postpone exhaustion, almost 55% of the players participating in the FIFA World Cups between 2002 and 2014 used NSAIDs at least once during the championship, and up to one-third used these substances before every match [11]. Athletes use NSAIDs to reduce pain and inflammation associated with training, competition, or soft tissue injuries, or to gain a competitive advantage [10]. Among drugs sold over-the-counter and those not prohibited by the Worldwide Anti-Doping Agency, diclofenac has been used to increase pain tolerance and reduce inflammation aiming to minimize susceptibility to exercise-induced fatigue [11]. On the other hand, it appears that higher consumption of NSAIDs leads to diminished physiological adaptations to resistance training in young and healthy individuals [11]. However, its real impact on exercise performance requires more investigation. Thus, this study aimed to analyze the effects of diclofenac pre-administration on consecutive and exhaustive exercise bouts in the inflammatory pathway and exercise performance.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals and ethics statement

Male Wistar rats (250-300 g, about 60 days old) were kept in plastic boxes containing four animals per box. The environment conditions were controlled (12:12 h light-dark cycle, with the onset of light phase at 7:00, 25 ± 1 °C, and 55% relative humidity). Animals were fed with standard food (Guabi, Santa Cruz, Brazil) and water *ad libitum*. All experiments were carried out according to the national and international legislation: Brazilian College of Animal Experimentation and the U.S. Public Health Service's Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals, with the approval of the local Ethics Committee (#5995140415/2015).

2.2 Experimental design

Rats were acclimated to water before swimming bouts in order to reduce stress and to familiarize animals with the locomotion involved in the exercise experiments. For the adaptation of the animals, rats were kept in shallow water (5 cm in depth) at 31 ± 1 °C between 9 am to 11:00 am for 20 minutes during three days, in a tank of 80 cm in length, 50 cm in width,

and 90 cm in depth [12]. Then, animals were randomly divided into four groups: sedentary-saline (SS), sedentary-diclofenac (SD), exhaustion-saline (ES), and exhaustion-diclofenac (ED). Animals from ES and ED groups performed three repeated exhaustive swimming bouts with each bout separated by 72-hour period. Nociception (for ten days) and strength test (every two days - for seven days) were measured throughout the protocol. Rats were sacrificed by decapitation immediately after the last set of swimming exhaustion and muscle samples were removed and stored at -80 °C for further analysis. **Figure 1** depicts the study design.

2.3 Exhaustive swimming bouts

The exhaustive test protocol was carried out as previously described by de Araújo *et al.* [13], with few modifications. The protocol consisted of three repeated exhaustive swimming bouts: the first bout took place 72 h after the beginning of treatment with diclofenac; the second bout at 144 h after; and the third 216 h after (**Fig. 1**). Exhaustion was characterized by the moment at which animals were no longer able to maintain themselves on the water surface, reaching 10s submerged [13].

2.4 Diclofenac administration

Diclofenac was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and dissolved in warmed saline. Diclofenac was administered via intragastric gavage, at a daily dose of 10 mg/kg [14, 15] for nine days. This prescribed dose in clinical practice does not cause adverse effects in a few days [16]. The animals received the first dose of diclofenac three days before the first exhaustive test, and this dose was maintained until the last day of the protocol. The control group received saline during the same protocol period.

2.5 Nociception assessment and grip test

Mechanical allodynia was considered an indicator of nociception [12] and the Von Frey hairs test detected mechanical sensitivity. Animals were placed in boxes (9cm × 7cm × 11cm) with elevated metal mesh floor for 30 min before testing, to access the ventral surface of the hind paws that were in contact with one of seven von Frey hairs (6–100 g). Von Frey hairs were applied perpendicularly to the paw's surface to cause a slight buckling for approximately 2s. The 50% withdrawal threshold was determined using the up and down method of Dixon (1980) [12, 17]. In these conditions, nociception assessment was initiated with the 15g von Frey hair.

Stimuli were continuously consecutive, whether ascending or descending. Paw withdrawal thresholds were verified during the protocol [12].

A grasping protocol test was used to evaluate muscular strength, as previously reported by Chaplan *et al.* (1994) [18], with few modifications. A wire grid (2.5 mm diameter) was fixed to a plate from an ordinary electronic scale, and then, rats could grasp the wire grid while being lifted by the tail with increasing firmness until they loosened their grip. Rats were tested three times, with 1 min of rest between them, and the mean value of performance was calculated. Grasping test was performed daily from the first to the seventh day before exhaustive swimming.

2.6 Tissue preparation

Just after the last exhaustion bout, animals were immediately euthanized, and gastrocnemius samples were removed and frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C for further analysis. Tissues were homogenized, centrifuged, and then, supernatant fractions were used for different biochemical assays.

2.7 Biochemical analysis

2.7.1 Oxidative stress variables

Lipid peroxidation was estimated by measuring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) levels, as Ohkawa reported [19]. TBARS were determined spectrophotometrically at 532 nm, and absorbance of the samples was compared to the standard curve using malondialdehyde.

The substrate 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was utilized to measure the intracellular formation of ROS in muscle, according to Myhre *et al.* [20]. Aliquots (50 µL) of muscle supernatants (S1) were added to a medium containing Tris-HCl buffer (10 mM; pH 7.4) and DCFH-DA (1 mM), and incubation was continued for 60 min in the dark. Fluorescence was measured using 488 nm for excitation and 525 nm for emission and the standard curve of oxidized dichlorofluorescein was used to analyze the results expressed in nmol of oxidized DCFH-DA/mg protein.

GSH and GSSG levels were measured in muscle as previously described for Hissin 1976 [21]. In brief, 250 mg of tissue was homogenized in 3.75 mL of phosphate EDTA buffer (pH 8) plus 1 mL of H₃PO₄ (25%). Homogenates were centrifuged at 4 °C at 13,000 g for 30 min, and the supernatants were separated into two different aliquots of 500 µL each for the

measurement of GSH and GSSG. For GSH determination, 100 μ L of the supernatant was diluted in 1.8 mL of phosphate buffer and 100 μ L of *O*-phthalaldehyde (OPT) (1 μ g/ μ L). The mixtures were incubated at room temperature for 15 min, and their fluorescent signals were recorded on a spectrofluorometer (RF-5301 PC Shimadzu, Kyoto, Japan) at 420 nm emission and 350 nm excitation wavelengths. For the measurement of GSSG levels, 250 μ L of the supernatant (S2) was incubated with 100 μ L of N-ethylmaleimide (NEM) (0.04 M) for 30 min at room temperature. After that, 140 μ L of the mixture was added to 1.76 mL of NaOH (0.1 M) buffer, followed by the addition of 100 μ L of OPT and then incubated for 15 min using the procedure outlined above for the GSH assay. GSH and GSSG levels were determined from comparisons with linear GSH and GSSG standard curves, respectively. Results were expressed as GSH/GSSG ratio.

2.7.2 Inflammatory parameters

TNF- α , interferon-gamma (IFN- γ), interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 96 well microplates were sensitized with the primary antibody at room temperature for 30 min and then samples were added and incubated at 37°C temperature for 30 min. After the washing steps, a peroxidase-conjugated secondary antibody was added. Finally, the concentrations of the cytokines were determined by spectrometry in a microplate reader.

2.7.3 Western blotting assay

Western blot analyses were performed on cytosolic extracts of muscle. Briefly, 100 mg of tissue were homogenized in 5×10^{-4} L of buffer A (0.01 M HEPES- KOH pH 7.9, 250 g/L glycerol, 0.420 M NaCl, 0.0015 M MgCl₂, 20 mM EDTA, 50 mM DTT, 20 mM PMSF) and a phosphatase inhibitor cocktail (Roche) was used to disrupt extracellular matrix and cellular membranes. Homogenates were centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in 25 mL of buffer B (0.02 M NaCl HEPES- KOH pH 7.9, 250 g/L glycerol, 0.42 M NaCl, 150 mM MgCl₂, 20 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 mM PMSF) homogenized and incubated at 4°C for 30 min. Cellular debris was removed by centrifugation at 14,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant fraction containing DNA binding proteins was recollected and stored at -80°C in aliquots until use. Cytosolic extracts were prepared by physical disrupted after suspended 25 mg of hepatic samples on 150 mL of 0.25 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The

homogenate was centrifuged at 4°C for 30 min at 13,000 g. The supernatant fraction was recollected and stored at -80°C in aliquots until use. Samples of the cytosolic and nuclear fraction containing 40 µg of protein were fractionated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis with polyacrylamide gels and then transferred to a PVDF membrane by a Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad®, Hercules, USA). Non-specific binding was blocked by pre-incubation of PVDF membranes in PBS containing 5% non-fat milk for one hour. Then, the membranes were incubated overnight at 4°C with the corresponding antibodies. Antibody against TLR4 were purchased from ABCam (ab13556), dilution 1/800. MyoD (Sc-304), dilution 1/1000, COX-2 (Sc-19999), dilution 1/250, NF-κβ p65 (F-6) (Sc-8008), dilution 1/1000 and Goat anti-rabbit IgG-HRP (Sc-2357), dilution 1/5000; 1/8000 were purchased from Santa Cruz. Goat Anti Mouse IgG (Fab specific- FITC) was purchased from Sigma (F5262), dilution 1/8000, 1/5000. After washing with TBST, membranes were incubated for one hour at room temperature with secondary HRP conjugated antibody (Dako, Glostrup, Denmark) and visualized using an ECL detection kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Blots were stripped and probed again for anti-β-actin (42 kDa) antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to verify equal protein loading [22]. The density of the specific bands was quantified with an imaging densitometer (Scion Image J Software 1.46a, Bethesda, USA).

2.8 Statistical analysis

Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Inc, Chicago, USA version 17) was used for all analyses. All data are expressed as means ± SEM for each experimental group. Data were analyzed using a 2 (diclofenac and saline treatments) x 2 (sedentary and exhaustion groups) analysis of variance (ANOVA). When appropriate, significant differences among means were localized using Sidak's posthoc test. Differences between groups were considered to be significant at P<0.05.

3. RESULTS

3.1 Physical conditioning of rats during the exhausting protocol

In the present study, results revealed a clear increase in time to exhaustion after the third exhaustive bout in rats pretreated diclofenac (**Fig. 2** p<0.001).

3.2 Nociception and strength along with swimming bouts

Rats from ES presented an increased nociception threshold when compared to SS and ED groups (**Fig. 3A**). In this study, ES rats increased the nociception threshold on day 6 (before

the second bout) and on day 10 (before the last swimming bouts) when compared to the ED group [$F(3,20) = 16.10$, $P = 0.001$; **Fig. 3A**]. In addition, ED did not show any difference along to exhaustive bouts. We did not observe changes in muscular strength values between groups (**Fig. 3B**).

3.3 Oxidative stress markers

As observed in **Table 1**, DCFH-DA and TBARS levels increased in ES, whereas diclofenac intake attenuated this increasing of DCFH-DA levels [$F(1,16) = 5.69$, $P = 0.02$], but exhibit just a decreasing tendency at TBARS levels [$F(1,14) = 11.58$, $P = 0.001$]. Swimming exhaustive bouts also decreased GSH/GSSG ratio, while diclofenac pretreatment prevented the GSH/GSSG ratio depletion in ED group [$F(1,12) = 12.14$, $P = 0.05$].

3.4 Cytokines levels

Diclofenac *per se* decreased TNF- α [$F(1,22) = 0.3175$, $P = 0.001$; **Fig. 4A**], IFN- γ [$F(1,22) = 6.323$, $P = 0.001$; **Fig. 4B**], IL-1 β [$F(1,22) = 16.1$, $P = 0.05$; **Fig. 4C**] and IL-6 [$F(1,22) = 2.063$, $P = 0.001$; **Fig. 4D**], and increased IL-10 [$F(1,22) = 30.64$, $P = 0.001$; **Fig. 4E**] levels as described in Figure 3. Rats from ES exhibited higher TNF- α [$F(1,22) = 0.3175$, $P = 0.001$; **Fig. 4A**], IFN- γ [$F(1,22) = 6.323$, $P = 0.001$; **Fig. 4B**], IL-1 β [$F(1,22) = 16.1$, $P = 0.05$; **Fig. 4C**] and IL-6 [$F(1,22) = 2.063$, $P = 0.001$; **Fig. 4D**] levels when compared to SS, corroborating the acute proinflammatory response after all-out efforts. However, animals from ED presented lower TNF- α [$F(1,22) = 0.3175$, $P = 0.001$; **Fig. 4A**], and IFN- γ [$F(1,22) = 6.323$, $P = 0.001$; **Fig. 4B**] concentrations when compared to ES group. Pro-inflammatory responses induced by exhaustion exercise were accompanied by significant changes in IL-10 levels [$F(1,22) = 30.64$, $P = 0.001$; **Fig. 4E**] and there was a significant effect of diclofenac pretreatment [$F(1,22) = 30.64$, $P = 0.001$; **Fig. 4E**]. Regarding IL-1 β [$F(1,22) = 16.1$, $P = 0.05$; **Fig. 4C**] and IL-6 [$F(1,22) = 2.063$, $P = 0.001$; **Fig. 4D**], no differences were found between ES and ED groups.

3.5 Inflammatory pathway

The protein content of COX-2 and iNOS are shown in figure 5. While the saline-exhaustion group showed an increase in COX2 content after exhaustive swimming bouts, diclofenac pretreatment decreased COX-2 protein in both in rest and after the exhaustive bouts of exercise [$F(1,25) = 49.52$; $P < 0.001$; **Fig. 5A**] with no interaction effects [$F(1,25) = 0.1266$; $P = .7250$]. No difference was found for iNOS content after exhaustive swimming

bouts, diclofenac pretreatment decreased iNOS protein in both in rest and after the exhaustive bouts of exercise [$F(3,13) = 55.10$; $P < 0.001$; **Fig. 5B**] with no interaction effects [$F(3,13) = 0.04536$; $P = .8346$].

Exhaustive exercise increased the protein content of TLR4 [$F(1,11) = 2.726$; $P < .05$, **Fig. 6A**], and diclofenac treatment decreased its expression [$F(1,11) = 3.476$; $P = .0892$], and increase the expression of $\text{NF}\kappa\beta$ [$F(1,14) = 22.03$; $P < .05$; **Fig. 6B**], with an inhibitory effect of diclofenac [$F(1,14) = 3.609$, $P = .0003$] and no interaction effect [$F(1,14) = 5.795$, $P = .0304$], and content of MyD88 also increased after the exhaustive bouts of exercise [$F(1,11) = 11.12$; $P < .0067$; **Fig. 6C**], with an inhibitory effect of diclofenac [$F(1,11) = 2.062$, $P = .002$]. The protein content of MyoD did not change [**Fig. 7C**].

4. DISCUSSION

Acute eccentric exercise is recognized to cause tissue damage, stretches in sarcomeres in myofibrils and damage to the excitation-contraction coupling system, resulting in delayed pain [23]. As expected, there was reduced nociception caused by diclofenac administration, but no muscle strength differences. Our results demonstrate that diclofenac-treated animals present a reduction in the nociception and when subjected to repeated swimming sets increased their time to exhaustion when compared to untreated rats. This way, this result suggests that diclofenac reduces nociception and possibly it has an association with longer swimming time in the pre-treated with diclofenac group. Corroborating previous studies, our results also indicate that diclofenac pretreatment reduces skeletal muscle inflammation associated with local soreness [14].

In addition, although forced swimming in order to induce fatigue is considered an exhaustive exercise, exhaustive swimming is not enough to cause significant tissue damage (data not shown). After the injury tissue, quiescent satellite cells are activated by inflammatory cells and upregulate members of myogenic regulatory factors, such as MyoD, and myogenin expression, aiming to regulate repair process [24]. During the muscle repair/regeneration process, various substances, including prostaglandins (PGs), are released as a product of fiber degeneration [25, 26]. After muscle injury, COX-2 expression is induced in early stages of muscle repair to activate satellite cell myoblast proliferation and increased myoD expression [26]. However, although our results demonstrate an increased COX-2-dependent TLR4 pathway, we did not observe differences in the expression of MyoD in muscle tissue (fig.7), indicating that this inflammatory process may occur regardless of tissue damage. This may be

an indication that the increase in inflammatory markers after exhaustive swimming exercise may be due to metabolic stress and not just mechanical damage. Our group previously demonstrated, in a similar protocol, that exhaustive swimming exercise was able to increase inflammatory markers in the liver of rats [27].

Diclofenac is a drug worldwide used by athletes to reduce exercise-related pain and inflammation in order to accelerate recovery and improve results. Even, its chronic intake may influence muscle-training adaptations, similar to the data demonstrated previously [28]. The high-intensity exercise is responsible for causing micro tissue injuries that are associated with pain and inflammation. On the other hand, NSAIDs used by athletes to alleviate symptoms of muscle damage and delayed onset muscle soreness suppress the inflammatory response in skeletal muscle. In the past decade, diclofenac was the most commonly prescribed NSAID [29], with the aim of reducing pain, inflammation and improving performance [15]. However, in general, the benefits of taking analgesics to reduce exercise-induced pain seem to be very limited, and the risk of potential unwanted side-effects appears to be high, mainly when doses are higher and prolonged [11]. The rationale behind NSAIDs intake is possible postponed exhaustion via decreased skeletal muscle pain and a faster recovery between training sessions or athletic events through an attenuated phagocyte migration and ROS formation [30].

Here we demonstrated that diclofenac intake attenuates oxidative stress markers and enhanced the anti-inflammatory status on muscle of sedentary rats submitted to repeat swimming bouts. Noteworthy, exhaustive exercise bouts increase muscle ROS generation variables (DCFH-DA and TBARS), cytokines, and COX-2 protein content levels in muscle, while diclofenac treatment blunted these increases. Besides, these inflammatory pathways are recognized to form ROS, such as superoxide radicals and hydrogen peroxide (H_2O_2) [31]. In this way, exhaustive swimming bouts led to increased DCFH-DA and TBARS levels, while diclofenac treatment attenuates these effects. Fatigue is accompanied by the overproduction of ROS, mainly produced by migrating leukocytes and upregulation of the antioxidant defense system to counteract the muscle damage extension [32, 33]. Moreover, increased intracellular ROS caused by injury stimulates PGE_2 production in a time-dependent manner via the activation of COX-2 [34].

In addition, it is well established in the literature that eccentric exercises are responsible for an overexpression of proinflammatory markers [35, 36]. Our results demonstrate that exhaustive swimming promotes overexpression of inflammatory markers, despite having a smaller eccentric component. This increase in inflammatory status has been attributed to several pathways, recent data point to TLRs as key inflammation-related receptors after exercise,

considering their role in the activation and expression of COX and iNOS [14, 36]. The increase in proteins related to the TLR4 pathway is directly linked to the increased production of mediators related to inflammation, such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β [36]. These cytokines were found elevated in this study after the exhaustive exercise. However, we show that the pretreatment with diclofenac decreases muscle TNF- α and IFN- γ levels, and IL-10 concentration after the swimming exhaustion protocol when compared to control group.

NSAIDs affect the classic inflammatory pathway reducing the formation of PGs due to COX inhibition [11]. Besides, we have previously shown that downhill running session increases muscle COX-2 protein content, proinflammatory cytokines levels, and NF- κ β activation, while diclofenac pretreatment blunted these effects [15]. Here, we observed that diclofenac pretreatment blocked TLR4, MyD88 and NF- κ β activation, well-known inflammatory responses triggered by exhaustive exercise. The TLR4 function in the MyD88-dependent pathway is to activate NF- κ β , which induces the expression of proinflammatory genes, and adhesion molecules [37]. TLR4 recruit IL-1 receptor type 1-associated protein kinases via adaptors, such as the MyD88 [38]. MyD88 is considered the first protein involved in the TLR4 pathway, and it is overexpressed after exercise. In unstimulated cells, NF- κ β remains in the cytoplasm as a complex with inhibitory I κ β proteins that mask their nuclear localization signal. Upon cell activation, I κ β is phosphorylated and degraded, resulting in the translocation of NF- κ β to the nucleus [39]. Subsequently, TNF- α , IL-1 β and other cytokines are overexpressed, leading to an increase in tissue inflammation.

In this sense, it is well known that exercises activate cascades leading to transcription of NF- κ β , which controls the expression and release of inflammatory mediators such as TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and prooxidant markers [33, 40] and COX-2 to facilitate post-exercise regenerative responses in the damaged tissue [41]. In this study, diclofenac seems to reduce the TLR4-MyD88-NF- κ β activation pathway, which could be related with a decrease in COX-2 protein synthesis and consequently a decrease in cytokines production and inflammation. The data presented here indicate that exhaustive swimming-induced COX-2 signaling in skeletal muscle is diclofenac-sensitive. Because exercise activates an inflammatory pathway through COX-2 activation by PGs binding to their EP (E-type prostanoid) receptors, producing an autocrine and paracrine effect, including protein kinases activation, leading to a phosphorylating of transcription factors such as NF- κ β , and its translocation to the nucleus, which controls the expression and releasing of inflammatory mediators. On the other hand, diclofenac reduced skeletal muscle COX-2 and TNF- α content, consequently impairing the production of cytokines and possibly interfering in pain awareness. Our data indicate the role

of diclofenac in exercise performance, training and muscle adaptations.

Our previous data [27, 42] and the data presented here create a body of evidence that diclofenac can be effective in attenuating the loss of physical performance, through the reduction of inflammatory markers in TLR4 pathway, regardless the type of exercise. In conclusion, the NSAIDs interfere with healing and recovery mechanism in the muscle reducing oxidative stress markers and exercise-related inflammation due to an inhibition in the TLR4-MyD88-NF- κ B-COX-2 pathway. The highlight presented here is that diclofenac avoided performance loss between exhaustive exercises bouts, which can culminate in performance gain. Moreover, news studies in order to evaluate the impact of diclofenac intake on human performances, inflammation status, and possible side effects must be developed.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The work was supported by the PRONEM/CNPq/FAPERGS 16/2551-0000248-7 and CAPES/PROEX 88882.182153/2018-01 research grants. FAAS received a fellowship from CNPQ. FMS and PCR received a fellowship from CAPES. CIBERehd is funded by Instituto de la Salud Carlos III, Spain. Ministry of Citizenship, Special Secretariat for Sport, project n: 58000.0019/2018-45.

Figure capture

Table 1. Effects of repeated exhaustive swimming bouts and/or diclofenac intake on muscle redox status and oxidative stress parameters

Tissue	Parameters	Animals			
		Saline		Diclofenac	
		Sedentary (n=5)	Exhaustion (n=7)	Sedentary (n=5)	Exhaustion (n=7)
MUSCLE	DCF (nmol/mg protein)	0.553 ± 0.092 ^a	2.367 ± 0.236 ^b	0.632 ± 0.088 ^a	1.872 ± 0.216 ^c
	GSH/GSSG ratio	0.495 ± 0.017 ^a	0.382 ± 0.025 ^b	0.273 ± 0.031 ^c	0.295 ± 0.053 ^c
	TBARS (nmol MDA/mg)	0.522 ± 0.095 ^a	1.834 ± 0.573 ^b	0.556 ± 0.176 ^a	1.681 ± 0.143 ^b

The data are presented as means ± S.E.M (n = 5–7) and the significance was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls Multiple Comparison Test. 2'-7'-Dichlorofluorescein (DCF); glutathione reduced (GSH) and oxidized (GSSG); Thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS). ^ap < 0.05 comparing sedentary diclofenac and exhaustion diclofenac groups. ^bp < 0.05 comparing saline exhaustion with the sedentary diclofenac group. ^cp < 0.05 comparing with sedentary saline group.

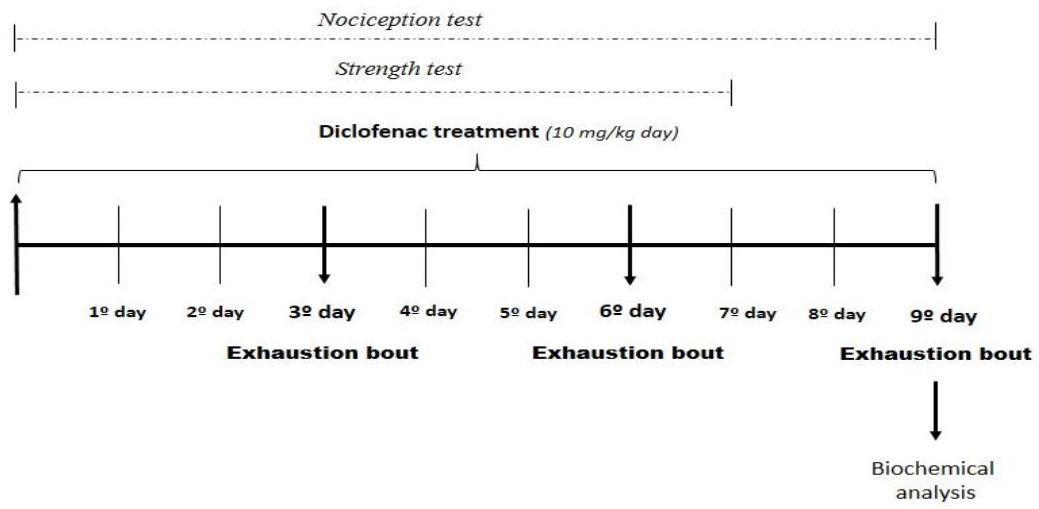


Figure 1. Timeline of the exhaustive protocol test data collection.

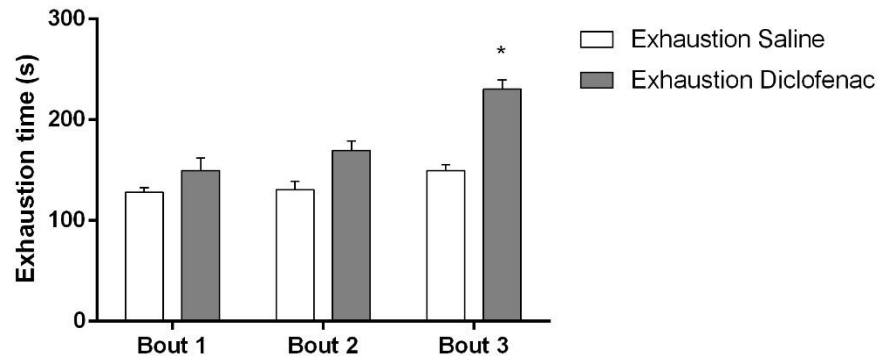


Figure 2. Effects of exercise bouts or diclofenac intake on time to exhaustion in the bouts of the exhaustive protocol. Data are presented as means \pm SEM. * $P < 0.001$ compared to non-treated group with the third bout of exhaustive.

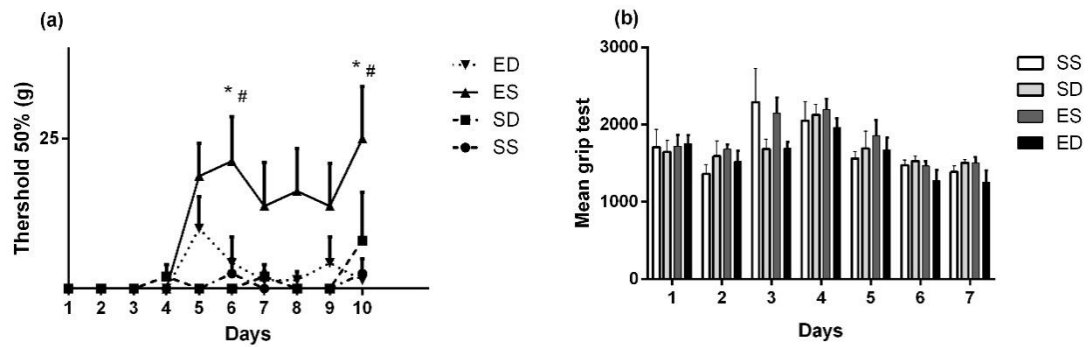


Figure 3. Nociception assessment tests (A) and muscular strength test (B) daily during the protocol. $n = 6-8$ in each group. Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < 0.05$).

#Denotes $P < 0.05$ when compared to the SS group.

* Denotes $P < 0.05$ when compared to the ED group

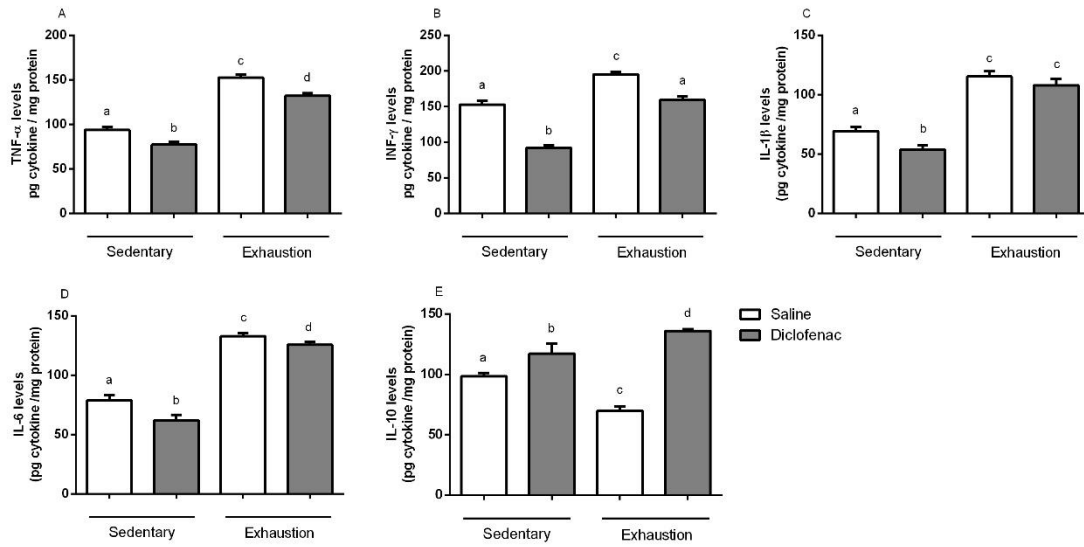


Figure 4. Effects of repeated exhaustive swimming bouts and/or diclofenac intake on muscle levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) (A), interferon- γ (IFN- γ) (B), interleukin-1 beta (IL-1 β) (C), interleukin-6 (IL-6) (D) and interleukin-10 (IL-10) (E). Data are presented as means \pm S.E. (n = 5-7). Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < 0.05$).

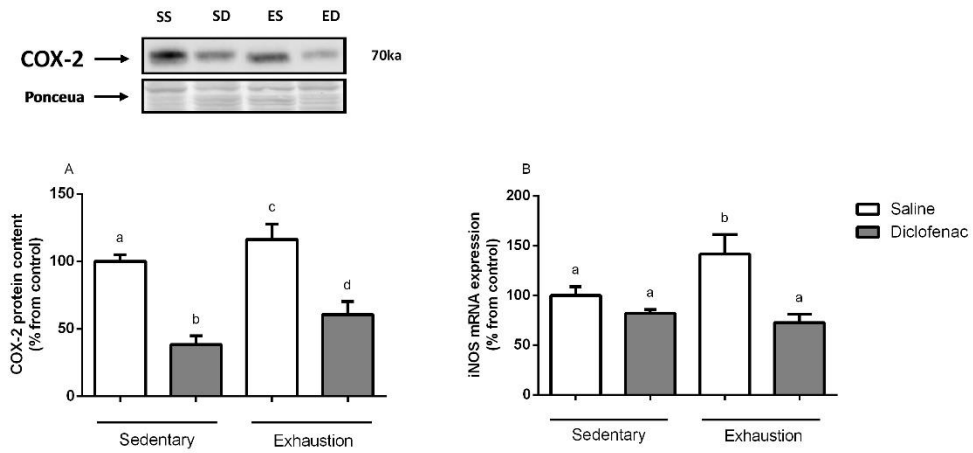


Figure 5. Effects of repeated exhaustive swimming bouts and diclofenac intake on the protein content of cyclooxygenase-2 (COX-2) A and mRNA on inducible nitric oxide synthase (iNOS) B. Data are presented as mean \pm S.E. (n = 7-9). Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < 0.05$).

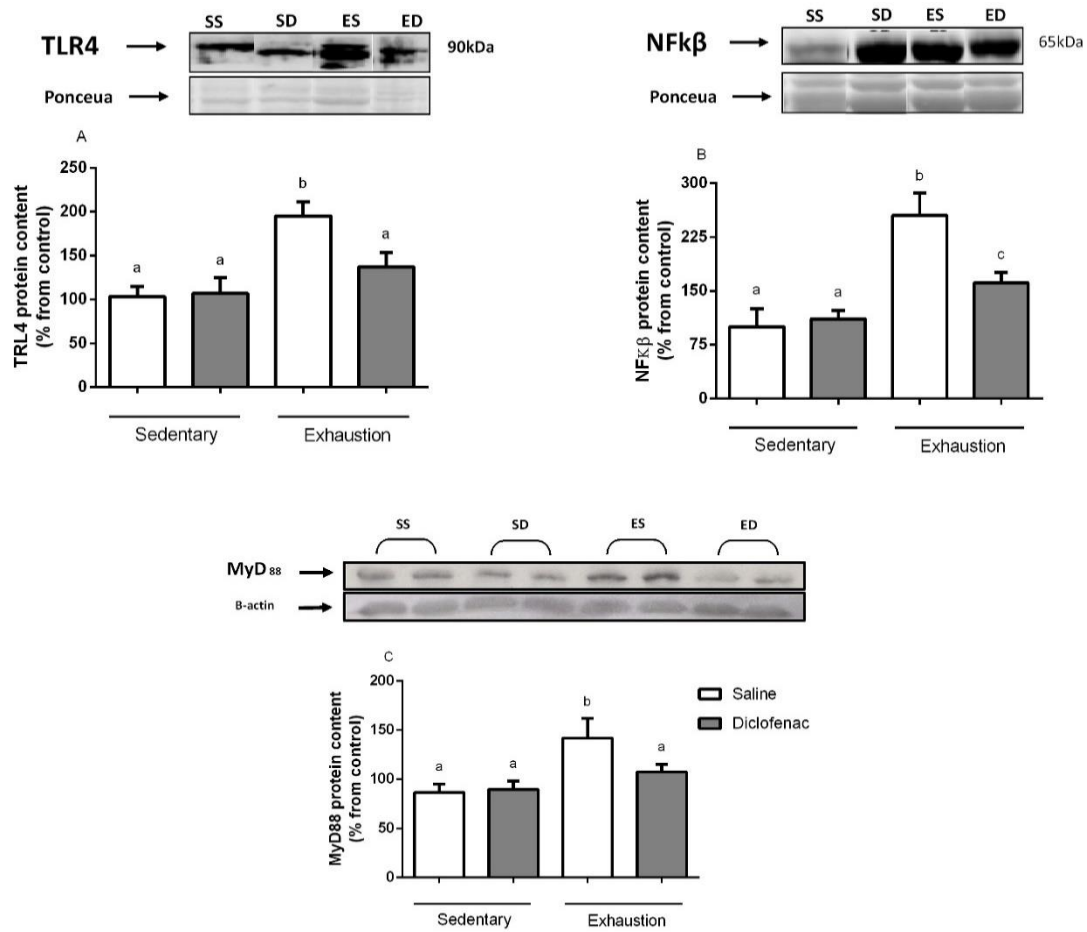


Figure 6. Effects of repeated exhaustive swimming bouts and diclofenac intake on the protein content of toll-like receptor 4 A, nuclear factor- κ B (NF κ B) B and myeloid differentiation protein (MyD88) C. Data are presented as mean \pm S.E. (n = 4-6). Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < 0.05$).

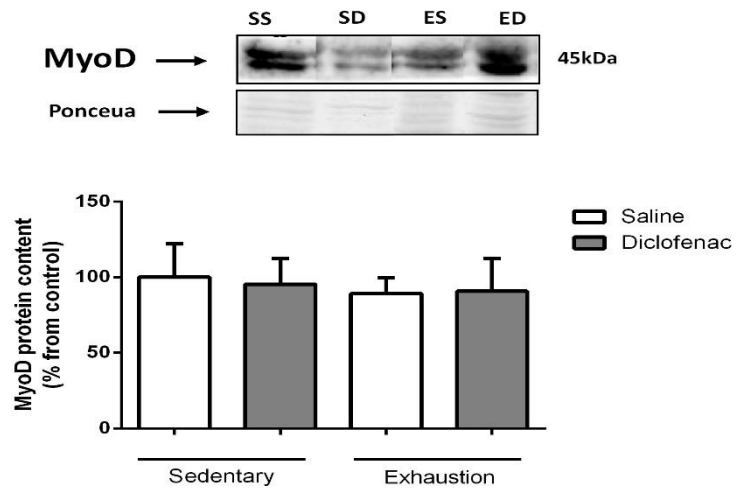


Figure 7. Effects of repeated exhaustive swimming bouts and diclofenac intake on the protein content of myoblast determination protein (MyoD). Data are presented as mean \pm S.E. (n = 4-5). Means for a variable with superscripts without a common letter differ ($P < 0.05$).

REFERENCES

1. Pedersen, B.K. and B. Saltin, *Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease*. Scand J Med Sci Sports, 2006. **16 Suppl 1**: p. 3-63.
2. Willoughby, D.S., B. McFarlin, and C. Bois, *Interleukin-6 expression after repeated bouts of eccentric exercise*. Int J Sports Med, 2003. **24**(1): p. 15-21.
3. Takekura, H., et al., *Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle*. J Physiol, 2001. **533**(Pt 2): p. 571-83.
4. Garber, C.E., et al., *American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise*. Med Sci Sports Exerc, 2011. **43**(7): p. 1334-59.
5. Clarkson, P.M. and M.J. Hubal, *Exercise-induced muscle damage in humans*. Am J Phys Med Rehabil, 2002. **81**(11 Suppl): p. S52-69.
6. Dogra, C., et al., *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis inhibits skeletal myogenesis through sustained activation of nuclear factor-kappaB and degradation of MyoD protein*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10327-36.
7. Adams, G.R., *Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy*. Appl Physiol Nutr Metab, 2006. **31**(6): p. 782-90.
8. Cornelison, D.D. and B.J. Wold, *Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells*. Dev Biol, 1997. **191**(2): p. 270-83.
9. Cooper, R.N., et al., *In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 17): p. 2895-901.
10. Alaranta, A., H. Alaranta, and I. Helenius, *Use of prescription drugs in athletes*. Sports Med, 2008. **38**(6): p. 449-63.
11. Lundberg, T.R. and G. Howatson, *Analgesic and anti-inflammatory drugs in sports: implications for exercise performance and training adaptations*. Scand J Med Sci Sports, 2018.
12. Lima, F.D., et al., *Ibuprofen intake increases exercise time to exhaustion: A possible role for preventing exercise-induced fatigue*. Scand J Med Sci Sports, 2016. **26**(10): p. 1160-70.
13. de Araujo, G.G., et al., *Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007. **148**(4): p. 888-92.
14. Barcelos, R.P., et al., *Diclofenac pretreatment effects on the toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B-mediated inflammatory response to eccentric exercise in rat liver*. Life Sci, 2016. **148**: p. 247-53.
15. Barcelos, R.P., et al., *Diclofenac pretreatment modulates exercise-induced inflammation in skeletal muscle of rats through the TLR4/NF-kappaB pathway*. Appl Physiol Nutr Metab, 2017. **42**(7): p. 757-764.
16. Ramm, S. and A. Mally, *Role of drug-independent stress factors in liver injury associated with diclofenac intake*. Toxicology, 2013. **312**: p. 83-96.
17. Dixon, W.J., *Efficient analysis of experimental observations*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980. **20**: p. 441-62.
18. Bertelli, J.A. and J.C. Mira, *The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat*. J Neurosci Methods, 1995. **58**(1-2): p. 151-5.
19. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, *Assay for lipid peroxides in animal tissues by*

- thiobarbituric acid reaction*. Anal Biochem, 1979. **95**(2): p. 351-8.
20. Myhre, O., et al., *Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(10): p. 1575-82.
 21. Hissin, P.J. and R. Hilf, *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. Anal Biochem, 1976. **74**(1): p. 214-26.
 22. Crespo, I., et al., *Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin*. J Pineal Res, 2010. **49**(2): p. 193-200.
 23. Proske, U. and D.L. Morgan, *Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications*. J Physiol, 2001. **537**(Pt 2): p. 333-45.
 24. Shi, X. and D.J. Garry, *Muscle stem cells in development, regeneration, and disease*. Genes Dev, 2006. **20**(13): p. 1692-708.
 25. Gilroy, D.W., et al., *Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 698-701.
 26. Prisk, V. and J. Huard, *Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation*. Histol Histopathol, 2003. **18**(4): p. 1243-56.
 27. Steckling, F.M., et al., *Diclofenac attenuates inflammation through TLR4 pathway and improves exercise performance after exhaustive swimming*. Scand J Med Sci Sports, 2019.
 28. Pillon Barcelos, R., et al., *Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise*. Free Radic Res, 2017. **51**(2): p. 222-236.
 29. Schreijenberg, M., et al., *Efficacy of paracetamol, diclofenac and advice for acute low back pain in general practice: design of a randomized controlled trial (PACE Plus)*. BMC Musculoskelet Disord, 2017. **18**(1): p. 56.
 30. Ziltener, J.L., S. Leal, and P.E. Fournier, *Non-steroidal anti-inflammatory drugs for athletes: an update*. Ann Phys Rehabil Med, 2010. **53**(4): p. 278-82, 282-8.
 31. Zuo, L., et al., *Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 2004. **97**(2): p. 661-8.
 32. Fisher, G., et al., *Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise*. J Appl Physiol (1985), 2011. **110**(3): p. 730-7.
 33. Mohr, M., et al., *Muscle damage, inflammatory, immune and performance responses to three football games in 1 week in competitive male players*. Eur J Appl Physiol, 2016. **116**(1): p. 179-93.
 34. Hu, Y.P., et al., *Reactive Oxygen Species Mediated Prostaglandin E2 Contributes to Acute Response of Epithelial Injury*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 4123854.
 35. Peake, J., K. Nosaka, and K. Suzuki, *Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans*. Exerc Immunol Rev, 2005. **11**: p. 64-85.
 36. Fernandez-Gonzalo, R., et al., *Effects of eccentric exercise on toll-like receptor 4 signaling pathway in peripheral blood mononuclear cells*. J Appl Physiol (1985), 2012. **112**(12): p. 2011-8.
 37. Akira, S., *TLR signaling*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 1-16.
 38. Akira, S. and S. Sato, *Toll-like receptors and their signaling mechanisms*. Scand J Infect Dis, 2003. **35**(9): p. 555-62.
 39. Baldwin, A.S., Jr., *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 649-83.
 40. Michailidis, Y., et al., *Thiol-based antioxidant supplementation alters human skeletal muscle signaling and attenuates its inflammatory response and recovery after intense*

- eccentric exercise*. Am J Clin Nutr, 2013. **98**(1): p. 233-45.
41. Kramer, H.F. and L.J. Goodyear, *Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(1): p. 388-95.
 42. de Castro, M.R.T., et al., *Previous physical exercise alters the hepatic profile of oxidative-inflammatory status and limits the secondary brain damage induced by severe traumatic brain injury in rats*. J Physiol, 2017. **595**(17): p. 6023-6044.

6. DISCUSSÃO

A prática regular de exercícios físicos propicia inúmeros benefícios para seus praticantes (Holloszy, 1993; Petersen e Pedersen, 2005), com expressiva associação entre estilo de vida ativo e menor risco de co-morbidades (Nieman, 2003; Gleeson, 2007). A prática regular de exercícios físicos moderados é reconhecida por promover: combate e prevenção de hipertensão arterial, obesidade, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e pulmonares, problemas musculares, depressão (Pedersen e Saltin, 2015), além de promover melhorias de humor (Wewege *et al.*, 2018), ação sobre o sistema cardiovascular e o metabolismo (Booth *et al.*, 2002)

Considerando a alta prevalência do sedentarismo, aliada ao seu significativo risco referente às doenças crônico-degenerativas, o aumento no nível de atividade física geral da população contribui decisivamente para a saúde pública, com forte impacto na redução dos custos com tratamentos, inclusive hospitalares, uma das razões de seus consideráveis benefícios sociais (Watson *et al.*, 2002).

Se por um lado, o exercício físico moderado realizado regularmente promove diversos benefícios à saúde, uma sessão de exercício intenso pode culminar na produção exacerbada de marcadores de EROs, as quais representam um estresse que perturba a homeostase (Mastorakos e Pavlatou, 2005) e a função do músculo esquelético, o qual é diretamente afetado durante a sua prática (Hoene *et al.*, 2010). Dados da literatura mostram que o exercício físico intenso pode induzir dano às células musculares (Malaguti *et al.*, 2009), produção de biometabólitos (como o lactato) (Gobatto *et al.*, 2001) e geração de espécies reativas de oxigênio (Davies *et al.*, 1982).

O exercício físico exaustivo é capaz de induzir sintomas de dor tardia, edema muscular, bem como respostas inflamatórias, estresse oxidativo e dano tecidual (Suzuki *et al.*, 2002). O aumento na concentração de marcadores pró-inflamatórios e dano oxidativo está associado à diminuição do desempenho esportivo (Mastaloudis *et al.*, 2004). Frente a isso, tanto na rotina diária de exercício quanto no período competitivo observam-se os efeitos agudos da prática de exercícios de alta intensidade que podem comprometer o desempenho. Na intenção de minimizar a magnitude dessas respostas e, conseqüentemente atenuar a perda de desempenho, muitos atletas fazem uso de agentes estimulantes (Swart *et al.*, 2009), como a cafeína (Hogervorst *et al.*, 2008), analgésicos (Mauger *et al.*, 2010) e anti-inflamatórios do tipo AINE (Da Silva *et al.*, 2011), que podem alterar a capacidade de realização de exercício ou melhoram a capacidade de recuperação dos indivíduos.

Neste contexto, foi observado nos Jogos Olímpicos de Sidney em 2000 que 20% dos

atletas fizeram uso de algum tipo de medicamento (Corrigan e Kazlauskas, 2003), nas Copas do Mundo de 2002 e 2006, mais de 40% dos atletas utilizaram AINEs (Tscholl *et al.*, 2009) e nos Jogos pan-americanos de 2007, 18,3% dos atletas selecionados para os exames *antidoping* utilizaram AINEs antes da competição e 81,7% durante a competição (Da Silva *et al.*, 2011). A alta frequência do uso de AINEs por atletas sugere que os mesmos podem ser usados como auxílio ergogênico, entretanto, não existem evidências de que o seu uso aumente o desempenho esportivo em atletas (Da Silva *et al.*, 2011). Pouco se sabe sobre os efeitos de episódios repetidos de exercício sobre vias do sistema inflamatório e as respostas desenvolvidas pelo fígado e músculo. Assim, no presente estudo, destacamos os efeitos do diclofenaco na performance de ratos submetidos a consecutivos sets de exercício exaustivo referente aos processos oxidativos e inflamatórios no tecido hepático e muscular.

Nos exercícios de alta intensidade com períodos limitados de recuperação, os atletas costumam apresentar declínio de desempenho e subsequentemente aumento da fadigabilidade central e sistêmica (Margonis *et al.*, 2007). O teste exaustivo de exercício com natação forçada tem sido amplamente aplicado para examinar danos fisiológicos após exercícios de alta intensidade (Dos Reis *et al.*, 2018), incluindo estudos objetivando avaliar performance até a depressão (Yankelevitch-Yahav *et al.*, 2015). No teste de exercício exaustivo com natação forçada, a intensidade do exercício pode ser graduada através da adição de uma carga anexada ao corpo do animal a fim de promover aumento na sobrecarga ao exercício (McCardle e Montoye, 1966). O nosso trabalho objetivou utilizar sets exaustivos de natação a fim de mimetizar uma competição esportiva, onde a intensidade do exercício é alta e sua recuperação é parcial, pois acreditamos que o resultado destes esforços (acúmulo de subprodutos metabólicos) podem influenciar os resultados de desempenho.

Os dados experimentais apresentados nos trabalhos dessa tese revelaram que a administração prévia do diclofenaco durante o protocolo de exaustão aumentou o tempo de nado dos animais tratados quando comparados com os animais não tratados. Esses resultados foram obtidos através de animais não treinados previamente. Já outro trabalho do nosso grupo demonstra que mesmo com treinamento prévio de 6 semanas, animais pré tratados com ibuprofeno também levaram mais tempo para chegar à exaustão (Lima *et al.*, 2016). Entendendo a relevância do processo adaptativo ao exercício, esses dados nos chamam a atenção, um vez que observamos que ratos não treinados tratados com AINEs parecem suportar o mesmo tempo de nado (manuscrito 1) que animais treinados previamente (Lima *et al.*, 2016).

A manutenção da performance mesmo em animais não treinados pode ser uma das justificativas para o uso de AINEs. Os AINEs são utilizados como agentes ergogênicos no meio

esportivo por reduzirem substancialmente a sensação de dor. Diante da experiência dolorosa aguda promovida por determinados tipos de exercício, parece haver um consenso entre atletas e treinadores de que a dor limita o desempenho em determinadas modalidades esportivas. Neste sentido, fortes evidências relatam que o efeito analgésico dos medicamentos é capaz de alterar a sensação subjetiva de esforço dos atletas, reduzindo o desconforto promovido pelo exercício (Garcin *et al.*, 2005; Amman, 2009). Corroborando com essas informações, os resultados apresentados no manuscrito desta tese estão de acordo com a literatura, e revelaram que o protocolo de exercícios exaustivos repetitivos induziu uma resposta nociceptiva e a ingestão de diclofenaco na dose de 10 mg/kg suprimiu a dor muscular. O que, por outro lado, requer cautela e maior investigação para respostas a longo prazo, pois entendemos que a inibição de importantes vias de sinalização que influenciam na sensação de dor são as mesmas que influenciam a performance.

A dor é uma das consequências dos microtraumas musculares causados pelo exercício. Após a lesão do tecido, as células satélites quiescentes são ativadas por células inflamatórias e regulam positivamente a expressão de fatores reguladores miogênicos, a fim de regular o processo de reparo (Shi e Garry, 2006). Durante o processo de reparação/regeneração muscular, várias substâncias, incluindo PG, são liberadas como produto da degeneração das fibras (Gilroy *et al.*, 1999). Após a lesão muscular, a expressão de COX-2 é induzida nos estágios iniciais do reparo muscular para ativar a proliferação de mioblastos de células satélites e aumentar a expressão de MyoD (Prisk e Huard, 2003). O exercício excêntrico é reconhecido por ativar essas vias, mesmo após uma única sessão (Barcelos *et al.*, 2016), no entanto, embora nossos resultados demonstrem sinalização da via da COX-2 (aumento nos marcadores TLR4, NF- κ B e citocinas), não observamos diferenças na expressão de MyoD no tecido muscular, indicando que esse processo inflamatório pode estar ocorrendo independentemente do dano tecidual. Isso pode ser um indício de que o aumento dos marcadores inflamatórios após o exercício exaustivo de natação pode ser devido ao estresse metabólico e não apenas a danos mecânicos.

Tomados em conjunto, o aumento da sensação de dor e a falha na geração de força podem levar a declínios na performance. O processo inflamatório é responsável pela regeneração e reparo das estruturas danificadas em tecido muscular. Entretanto, embora seja uma reação desejável, quando não bem regulada, pode ser uma das causas de inflamações agudas devido ao aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios e PG, levando à indução e à intensificação de processo inflamatório seguido ou precedido pelo aumento da produção de ERO (Mastaloudis *et al.*, 2004). Considerando todos esses fatores, investigamos o efeito da administração de diclofenaco durante o protocolo de exaustão sobre o estado redox dos

animais submetidos a repetidos sets exaustivos.

Os resultados bioquímicos obtidos neste estudo revelaram que repetidos sets exaustivos alteraram a produção de EROs. A geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no fígado e músculo foram monitoradas quantitativamente pela DCFH-DA. Nossos resultados revelaram que o exercício físico de alta intensidade não altera os níveis de DCFH-DA no fígado, ao passo que aumenta a oxidação DCFH-DA no músculo (manuscrito 1) em ratos submetidos a repetidos sets exaustivos (grupo exaustão salina). Por outro lado, o tratamento com diclofenaco atenuou os níveis de DCFH-DA (manuscrito 1) no músculo sem provocar mudanças no fígado (artigo 1).

Sabe-se que o exercício físico intenso aumenta de 100 a 200 vezes a captação de oxigênio, induzindo a formação excessiva de EROs associada ao metabolismo energético (Radak *et al.*, 2013). Além disso, outros mecanismos importantes de formação de EROs podem ser ativadas em exercício, como: NADPHoxidase e isquemia-reperfusão via xantina-oxidase. O aumento de H_2O_2 pode provocar respostas celulares, uma vez que é considerado oxidante e um segundo mensageiro de sinalização (Granger e Kvietys, 2015). No cenário de isquemia, o ATP é catabolizado em hipoxantina e a forma desidrogenase de xantina oxireductase é convertida, por meio de proteólise limitada e oxidação de sulfidrila, na forma oxidase. Após a reperfusão, notecido restaurado, o O_2 reage com hipoxantina (ou xantina) e xantina oxidase para gerar ambos superóxido (O_2^-) e H_2O_2 , que pode conseqüentemente interagir para produzir espécies secundárias mais reativas (Granger *et al.*, 1981; Mccord, 1985).

Além disso, a oxidação de grupos sulfidrila celulares e a formação de glutathiona oxidada (GSSG) também foram reconhecidas como evidências de estresse oxidativo e desequilíbrio redox após isquemia-reperfusão em diferentes tecidos (Granger e Kvietys, 2015). Paralelo as alterações nos níveis de DCFH-DA, observou-se uma diminuição na razão glutathiona reduzida/oxidada (GSH/GSSG), acompanhado do aumento nas TBARS. O diclofenaco protegeu contra o aumento da formação hepática de TBARS induzido pelo protocolo de exaustão utilizado. O fígado desempenha um papel chave no estresse oxidativo induzido pelo exercício, sendo considerado um órgão essencial na síntese de glutathiona, uma vez que é responsável pelo fornecimento de 90% do GSH circulante (Martensson e Meister, 1991). Além disso, o diclofenaco foi mais efetivo no músculo esquelético, protegendo contra formação de DCFH-DA e prevenindo a queda da razão GSH/GSSG. Apesar da extensa literatura investigando o papel do estresse oxidativo em diferentes tipos e intensidade de exercício físico, até onde sabemos, este é um dos poucos trabalhos que revela uma resposta subaguda e acumulativa de estresse oxidativo em fígado e músculo de ratos submetidos a repetidos sets de

natação intensa.

Há muito se sabe que exercícios de alta intensidade em indivíduos não treinados desencadeiam várias vias relacionadas à inflamação no músculo esquelético (Pedersen, 2019). A maioria dos estudos envolvendo respostas ao exercício físico acaba centrando suas análises no tecido muscular, no entanto, o fígado também demonstrou desempenhar um papel importante no estado redox e na modulação inflamatória durante o exercício. As alterações sistêmicas e locais pós-exercício se assemelham às respostas da fase aguda ao trauma, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, mobilização e migração para o músculo a fim de mediar a infiltração de leucócitos (Moldoveanu *et al.*, 2001). Embora o status inflamatório elevado tenha sido atribuído a diversas vias, dados recentes apontam os TLRs como possível via central na inflamação induzida por exercício, considerando seu envolvimento na ativação e expressão de COX e iNOS (Gleeson *et al.*, 2006; Fernandez-Gonzalo *et al.*, 2012; Barcelos *et al.*, 2016).

O aumento da atividade da via da COX também está relacionado com o aumento da produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2008). Embora nossos resultados demonstrem que a COX-2 não alterou em tecido hepático após exercício exaustivo, as citocinas pró-inflamatórias estavam elevadas após o exercício, enquanto o tratamento com diclofenaco foi capaz de diminuir o conteúdo de proteína desses marcadores. Embora pareça ser um efeito positivo, as consequências devem ser mais estudadas, considerando o papel das citocinas na modulação e regeneração inflamatória do músculo esquelético (Markworth *et al.*, 2014). Já está bem documentado que o exercício, particularmente excêntrico, induz alterações em muitos componentes do sistema imune (Akimoto *et al.*, 2002), incluindo elevados níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no tecido muscular (Ostrowski *et al.*, 1999). Estas citocinas são conhecidas por estarem envolvidas na regulação da resposta imune e inflamação e são consideradas críticas para o sistema de defesa do organismo (Meksawan *et al.*, 2004). Neste contexto, trabalhos mostram que o exercício físico intenso tem um papel importante na indução da ativação do NF κ B pelo TLR4, através das vias dependentes e independentes de MyD88 (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2008; Fernandez-Gonzalo *et al.*, 2012). No entanto, mostramos pela primeira vez (artigo 1) o aumento nas citocinas pró-inflamatórias no fígado de ratos submetidos a consecutivas sessões exaustivas de natação, confirmando a inflamação com aumento do processo inflamatório e cascata de ativação do TLR4. Esses resultados chamaram nossa atenção, pois a natação não apresenta como componente principal o dano excêntrico aos tecidos, apesar de se esperar alterações hepáticas induzidas pelo exercício uma vez que o fígado possui papéis metabólicos.

Corroborando com esses dados, apesar de não alterar a concentração proteica de COX-2, vimos um aumento da rota inflamatória através da via do TLR4 (artigo 1), passando por um aumento na síntese proteica desde o próprio TLR4 e MyD88, culminando no aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β e INF- γ) em fígado. Apesar de muitos estudos terem demonstrado a ativação dessa rota em células sanguíneas e músculo esquelético, pouco se sabe sobre essa rota no fígado. Pode-se relacionar esses dados ao fato de que apesar de o exercício exaustivo gerar uma resposta pró-inflamatória local, há também uma resposta sistêmica firmemente atribuída às citocinas anti-inflamatórias e caracterizada pela alteração nos receptores de leucócitos circulantes e sua atividade funcional (Peake *et al.*, 2005), levando a inflamação e alterações moleculares no fígado. Constatamos que o pré-tratamento com o AINE bloqueou quase a totalidade dos efeitos pró-inflamatórios induzidos pelo exercício exaustivo, mostrando que o diclofenaco *per se* diminui a expressão de COX-2. De fato, o pré-tratamento com diclofenaco diminui a expressão de TLR4, MyD88, COX-2, IL-6, TNF- α , IL-1 β e INF- γ aumentados pelo exercício físico, ou seja, diminuindo a inflamação via rota do TLR4. Nós encontramos resultados similares quando analisamos o músculo esquelético de ratos submetidos ao mesmo protocolo de exaustão (Manuscrito 1). Diferente do que encontramos no fígado, a concentração proteica de COX-2 aumentou no tecido muscular após consecutivos sets de natação exaustiva, assim como aumentou a síntese proteica TLR4, NF κ β e MyD88, culminando no aumento da síntese de proteínas e enzimas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β e INF- γ e iNOS). Assim como no fígado, o diclofenaco *per se* diminui a expressão de COX-2 no músculo. Constatamos que o pré-tratamento com o AINE inibiu quase a totalidade dos efeitos pró-inflamatórios induzidos pelo exercício exaustivo, o diclofenaco *per se* diminui a expressão de COX-2. De fato, o pré-tratamento com diclofenaco diminui a expressão de TLR4, MyD88, NF κ β , COX-2, IL-6, TNF- α e INF- γ aumentados pelo exercício físico, ou seja, diminuindo a inflamação via rota do TLR4.

Em ambos os tecidos (artigo 1 e manuscrito 1), observamos que o exercício induz uma resposta inflamatória, aumentando a formação de citocinas pró-inflamatórias e diminuindo a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. A IL-10 exerce vários efeitos metabólicos e compartilha mecanismos na adaptação ao exercício, melhorando as defesas do sistema imunológico (Scheffer e Latini, 2020). Assim, o aumento da expressão dessa citocina no fígado e no músculo representa um processo anti-inflamatório (Pilegaard *et al.*, 2002). Por outro lado, o pré-tratamento com diclofenaco *per se* aumentou a expressão de IL-10 no fígado e músculo de ratos controle, e impediu a diminuição nos animais que foram submetidos à natação exaustiva.

A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora que tem o objetivo de eliminar o agente indutor do dano (que pode ser um microrganismo, estímulo físico, agente químico, etc.), bem como, crítica para a regeneração de fibras musculares após o dano (Tidball, 2005). A ausência de uma inflamação adequada em uma célula/tecido lesado poderá fazer com que o dano às células/tecidos não seja cessado. Por isso, a inflamação pode ser tanto benéfica quanto potencialmente danosa (Ellulu *et al.*, 2017). A nível molecular, a ativação do fator de transcrição NFκB nas células danificadas induz uma resposta pró-inflamatória, marcada pelo aumento de IL-1β, TNF-α, IL-6, iNOS e COX-2 (Ji *et al.*, 2004).

Há vários exemplos da importância significativa da inflamação na modelação e adaptação do músculo esquelético em resposta ao exercício físico, bem como a interferência de tratamentos com anti-inflamatórios. Por exemplo, o tratamento local com anti-inflamatórios atrasa a regeneração muscular após a sessão de exercício em animais jovens (Monda *et al.*, 2009), bloqueia a proliferação de células-tronco em humanos (Mikkelsen *et al.*, 2006), diminui a hipertrofia em ratos (Novak *et al.*, 2009) e retarda a recuperação da força muscular (Mishra *et al.*, 1995). Estes dados sugerem que a modulação inflamatória tem um papel crucial na adaptação muscular ao exercício físico e que o tratamento com anti-inflamatórios interfere de maneira significativa no músculo esquelético (Pillon Barcelos *et al.*, 2017).

Os dados apresentados nesta tese reforçam o envolvimento de processos inflamatórios no aparecimento da fadiga e sugerem que o efeito anti-inflamatório exercido pelo diclofenaco, especificamente em tecidos periféricos, possa ter efeito benéfico na redução do tempo de retorno à competição por atletas. Cabe salientar que os AINEs, considerados pela Agência Mundial *Antidoping* (AMA) como substâncias de uso permitido, são amplamente utilizados com a finalidade de redução das manifestações excessivas do processo inflamatório decorrente da lesão, como exemplo o controle da dor muscular tardia (Ciocca, 2005).

7. CONCLUSÃO

Demostramos que o diclofenaco interfere na modulação das respostas antioxidantes e inflamatórias em fígado e músculo induzidas pelo exercício físico exaustivo. O uso de diclofenaco prévio foi responsável por aumentar o tempo de natação dos animais tratados. Além disso, o uso de diclofenaco prévio a sets exaustivos consecutivos diminui a inflamação hepática e muscular gerada por este tipo de exercício físico. Nossos dados apontam claramente para a participação de fatores inflamatórios ativados pela rota TLR4- NFκB-citocinas.

Baseado no conjunto de resultados obtidos, pode-se afirmar que o diclofenaco, concomitantemente ao exercício físico exaustivo, pode limitar a modulação natural do organismo ao estresse de cunho oxidativo/inflamatório gerado por diferentes tipos de exercícios físicos.

O presente estudo torna-se relevante considerando a quantidade e frequência do consumo de diclofenaco mundialmente. Com isso, pode-se concluir que a administração de diclofenaco na dose de 10mg/kg pode adiar o aparecimento da sensação de fadiga em ratos. Além disso, as adaptações geradas pelo uso agudo de diclofenaco causa adaptações no fígado e músculo, o que não causou nenhum prejuízo na realização dos testes exaustivos, demonstrando a importância destes no desempenho esportivo. Entretanto, mais estudos se fazem necessários para estabelecer o real papel dos AINEs na realização de exercícios de alta intensidade e de curta duração.

8. PERSPECTIVAS

Até o momento, nosso grupo de pesquisa uniu esforços para investigar o envolvimento dos AINEs no mecanismo de fadiga. Dada a importancia dos resultados obtidos, surge o interesse em investigar dois pontos principais: o primeiro se refere aos efeitos de um set de natação na via dos TLR4 ao longo do tempo, para compreendermos o processo adaptativo do acúmulo de sets repetidos. E o segundo se refere a uma possível via metabólica de ativação do processo inflamatório causado pelo acúmulo de repetidos sets de natação exaustiva (via receptores β -adrenérgicos).

REFERÊNCIAS

- ABDELSADIK, A.; TRAD, A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. **Hum Immunol**, v. 72, n. 12, p. 1188-93, Dec 2011. ISSN 1879-1166 (Electronic) 0198-8859 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920397>>.
- ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. **Subcell Biochem**, v. 49, p. 241-68, 2008. ISSN 0306-0225 (Print) 0306-0225 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18751914>>.
- AKIMOTO, T. et al. Increased plasma concentrations of intercellular adhesion molecule-1 after strenuous exercise associated with muscle damage. **Eur J Appl Physiol**, v. 86, n. 3, p. 185-90, Jan 2002. ISSN 1439-6319 (Print) 1439-6319 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990724>>.
- AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. **Adv Immunol**, v. 54, p. 1-78, 1993. ISSN 0065-2776 (Print) 0065-2776 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8379461>>.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat Immunol**, v. 2, n. 8, p. 675-80, Aug 2001. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477402>>.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 24 2006. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588>>.
- ALARANTA, A.; ALARANTA, H.; HELENIUS, I. Use of prescription drugs in athletes. **Sports Med**, v. 38, n. 6, p. 449-63, 2008. ISSN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18489193>>.
- ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, n. 6857, p. 732-8, Oct 18 2001. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11607032>>.
- ALTMAN, R. et al. Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. **Drugs**, v. 75, n. 8, p. 859-77, May 2015. ISSN 1179-1950 (Electronic) 0012-6667 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963327>>.
- ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock**, v. 34 Suppl 1, p. 15-21, Sep 2010. ISSN 1540-0514 (Electronic) 1073-2322 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714263>>.
- AMBROSIO, F. et al. The effect of muscle loading on skeletal muscle regenerative potential: an update of current research findings relating to aging and neuromuscular pathology. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 88, n. 2, p. 145-55, Feb 2009. ISSN 1537-7385 (Electronic)

0894-9115 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169178>>.

AMINOSHARIAE, A.; KULILD, J. C.; DONALDSON, M. Short-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and adverse effects: An updated systematic review. **J Am Dent Assoc**, v. 147, n. 2, p. 98-110, Feb 2016. ISSN 1943-4723 (Electronic)

0002-8177 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26562732>>.

AMMAN, M. Reduced skeletal muscle recruitment does not explain the lactate paradox - part I. **J Appl Physiol** (1985), v. 106, n. 2, p. 739-40, Feb 2009. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19244607>>.

AOI, W. et al. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 4, p. 480-7, Aug 15 2004. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256219>>.

ARMSTRONG, R. B. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 16, n. 6, p. 529-38, Dec 1984. ISSN 0195-9131 (Print)

0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6392811>>.

BAKKAR, N. et al. IKK/NF-kappaB regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis. **J Cell Biol**, v. 180, n. 4, p. 787-802, Feb 25 2008. ISSN 1540-8140 (Electronic)

0021-9525 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18299349>>.

BALDUCCI, S. et al. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 20, n. 8, p. 608-17, Oct 2010. ISSN 1590-3729 (Electronic)

0939-4753 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695853>>.

BARCELOS, R. P. et al. Diclofenac pretreatment effects on the toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B-mediated inflammatory response to eccentric exercise in rat liver. **Life Sci**, v. 148, p. 247-53, Mar 1 2016. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26854180>>.

BARCELOS, R. P. et al. Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. **Life Sci**, v. 96, n. 1-2, p. 40-5, Feb 6 2014. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24334002>>.

BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 19-37, 2006. ISSN 0066-4154 (Print)

0066-4154 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756483>>.

BAUMERT, P. et al. Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. **Eur J Appl Physiol**, v. 116, n. 9, p. 1595-625, Sep 2016. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294501>>.

BENATTI, F. B.; PEDERSEN, B. K. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic

diseases-myokine regulation. **Nat Rev Rheumatol**, Nov 25 2014. ISSN 1759-4804 (Electronic)
1759-4790 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422002>>.

BENZIANE, B. et al. Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 6, p. E1427-38, Dec 2008. ISSN 0193-1849 (Print)
0193-1849 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827172>>.

BILLAT, L. V. Interval training for performance: a scientific and empirical practice. Special recommendations for middle- and long-distance running. Part I: aerobic interval training. **Sports Med**, v. 31, n. 1, p. 13-31, 2001a. ISSN 0112-1642 (Print)
0112-1642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11219499>>.

_____. Interval training for performance: a scientific and empirical practice. Special recommendations for middle- and long-distance running. Part II: anaerobic interval training. **Sports Med**, v. 31, n. 2, p. 75-90, Feb 2001b. ISSN 0112-1642 (Print)
0112-1642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11227980>>.

BILLAT, V. L. et al. Interval training at VO₂max: effects on aerobic performance and overtraining markers. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, n. 1, p. 156-63, Jan 1999. ISSN 0195-9131 (Print)
0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927024>>.

BLAIR, S. N. et al. A tribute to Professor Jeremiah Morris: the man who invented the field of physical activity epidemiology. **Ann Epidemiol**, v. 20, n. 9, p. 651-60, Sep 2010. ISSN 1873-2585 (Electronic)
1047-2797 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696405>>.

BLOOMER, R. J. Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. **Adv Clin Chem**, v. 46, p. 1-50, 2008. ISSN 0065-2423 (Print)
0065-2423 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004186>>.

BOGDANIS, G. C. et al. Contribution of phosphocreatine and aerobic metabolism to energy supply during repeated sprint exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 80, n. 3, p. 876-84, Mar 1996. ISSN 8750-7587 (Print)
0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8964751>>.

BONDESEN, B. A. et al. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 2, p. C475-83, Aug 2004. ISSN 0363-6143 (Print)
0363-6143 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084473>>.

BOOTH, F. W.; CHAKRAVARTHY, M. V.; SPANGENBURG, E. E. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 2, p. 399-411, Sep 1 2002. ISSN 0022-3751 (Print)
0022-3751 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12205177>>.

BOOTH, F. W.; ROBERTS, C. K.; LAYE, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Compr Physiol**, v. 2, n. 2, p. 1143-211, Apr 2012. ISSN 2040-4603 (Electronic)

2040-4603 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23798298>>.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol**, v. 585, n. 2-3, p. 325-37, May 13 2008. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417116>>.

BOTEZELLI, J. D. et al. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. **Diabetol Metab Syndr**, v. 3, p. 35, Dec 19 2011. ISSN 1758-5996 (Electronic)

1758-5996 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22182600>>.

BOTTING, R. M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? **Clin Infect Dis**, v. 31 Suppl 5, p. S202-10, Oct 2000. ISSN 1058-4838 (Print)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113024>>.

BRATER, D. C. Anti-inflammatory agents and renal function. **Semin Arthritis Rheum**, v. 32, n. 3 Suppl 1, p. 33-42, Dec 2002. ISSN 0049-0172 (Print)

0049-0172 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12528072>>.

BRUNE, K. How aspirin might work: a pharmacokinetic approach. **Agents Actions**, v. 4, n. 4, p. 230-2, Oct 1974. ISSN 0065-4299 (Print)

0065-4299 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4447065>>.

BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle. Part II: anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. **Sports Med**, v. 43, n. 10, p. 927-54, Oct 2013. ISSN 1179-2035 (Electronic)

0112-1642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23832851>>.

BUTTGEREIT, F.; BURMESTER, G. R.; SIMON, L. S. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2-specific inhibitors. **Am J Med**, v. 110 Suppl 3A, p. 13S-9S, Feb 19 2001. ISSN 0002-9343 (Print)

0002-9343 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11173045>>.

BYRNE, C.; TWIST, C.; ESTON, R. Neuromuscular function after exercise-induced muscle damage: theoretical and applied implications. **Sports Med**, v. 34, n. 1, p. 49-69, 2004. ISSN 0112-1642 (Print)

0112-1642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715039>>.

CAKIR, B. et al. Stress-induced multiple organ damage in rats is ameliorated by the antioxidant and anxiolytic effects of regular exercise. **Cell Biochem Funct**, v. 28, n. 6, p. 469-79, Aug 2010. ISSN 1099-0844 (Electronic)

0263-6484 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803705>>.

CANNON, J. G. et al. Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. **Am J Physiol**, v. 259, n. 6 Pt 2, p. R1214-9, Dec 1990. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2175569>>.

CIOCCA, M. Medication and supplement use by athletes. **Clin Sports Med**, v. 24, n. 3, p.

719-38, x-xi, Jul 2005. ISSN 1556-228X (Electronic)

0278-5919 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16004927>>.

CIPOLLONE, F. et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. **Circulation**, v. 104, n. 8, p. 921-7, Aug 21 2001. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514380>>.

CLARKSON, P. M.; HUBAL, M. J. Exercise-induced muscle damage in humans. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 81, n. 11 Suppl, p. S52-69, Nov 2002. ISSN 0894-9115 (Print)

0894-9115 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409811>>.

COFFEY, V. G. et al. Effect of high-frequency resistance exercise on adaptive responses in skeletal muscle. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 12, p. 2135-44, Dec 2007. ISSN 0195-9131 (Print)

0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046184>>.

COOPER, S. T.; HEAD, S. I. Membrane Injury and Repair in the Muscular Dystrophies.

Neuroscientist, v. 21, n. 6, p. 653-68, Dec 2015. ISSN 1089-4098 (Electronic)

1073-8584 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25406223>>.

CORRIGAN, B.; KAZLAUSKAS, R. Medication use in athletes selected for doping control at the Sydney Olympics (2000). **Clin J Sport Med**, v. 13, n. 1, p. 33-40, Jan 2003. ISSN 1050-642X (Print)

1050-642X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12544162>>.

CRISTI-MONTERO, C. et al. [Effect of an acute exercise bout on Toll-like receptor 4 and inflammatory mechanisms in rat heart]. **Rev Med Chil**, v. 140, n. 10, p. 1282-8, Oct 2012. ISSN 0717-6163 (Electronic)

0034-9887 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23559285>>.

DA SILVA, E. R. et al. Non-steroidal anti-inflammatory use in the XV Pan-American Games (2007). **Br J Sports Med**, v. 45, n. 2, p. 91-4, Feb 2011. ISSN 1473-0480 (Electronic)

0306-3674 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19955164>>.

DAVIES, K. J. et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 107, n. 4, p. 1198-205, Aug 31 1982. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6291524>>.

DAVIES, N. M.; ANDERSON, K. E. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. **Clin Pharmacokinet**, v. 33, n. 3, p. 184-213, Sep 1997. ISSN 0312-5963 (Print)

0312-5963 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9314611>>.

DAVIS, J. M.; MURPHY, E. A.; CARMICHAEL, M. D. Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. **Curr Sports Med Rep**, v. 8, n. 4, p. 206-13, Jul-Aug 2009. ISSN 1537-8918 (Electronic)

1537-890X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584608>>.

- DEEKS, J. J.; SMITH, L. A.; BRADLEY, M. D. Efficacy, tolerability, and upper gastrointestinal safety of celecoxib for treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review of randomised controlled trials. **BMJ**, v. 325, n. 7365, p. 619, Sep 21 2002. ISSN 1756-1833 (Electronic) 0959-8138 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242171>>.
- DEFRONZO, R. A. et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes**, v. 30, n. 12, p. 1000-7, Dec 1981. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7030826>>.
- DERRY, P. et al. Single dose oral diclofenac for acute postoperative pain in adults. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 2, p. CD004768, Apr 15 2009. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19370609>>.
- DINARELLO, C. A. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. **Curr Opin Immunol**, v. 3, n. 6, p. 941-8, Dec 1991. ISSN 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1665333>>.
- DOS REIS, I. G. M. et al. Forced Swim Reliability for Exercise Testing in Rats by a Tethered Swimming Apparatus. **Front Physiol**, v. 9, p. 1839, 2018. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30618844>>.
- DUBOIS, R. N. et al. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. **J Clin Invest**, v. 93, n. 2, p. 493-8, Feb 1994. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8113389>>.
- EBERLEIN, M. et al. Anti-oxidant inhibition of hyaluronan fragment-induced inflammatory gene expression. **J Inflamm (Lond)**, v. 5, p. 20, Nov 5 2008. ISSN 1476-9255 (Electronic) 1476-9255 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18986521>>.
- EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metab**, v. 17, n. 2, p. 162-84, Feb 5 2013. ISSN 1932-7420 (Electronic) 1550-4131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395166>>.
- ELLULU, M. S. et al. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. **Arch Med Sci**, v. 13, n. 4, p. 851-863, Jun 2017. ISSN 1734-1922 (Print) 1734-1922 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28721154>>.
- ELNACHEF, N. et al. Changing perceptions and practices regarding aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and cyclooxygenase-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs among US primary care providers. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 28, n. 10, p. 1249-58, Nov 15 2008. ISSN 1365-2036 (Electronic) 0269-2813 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18729848>>.
- ENOKA, R. M.; DUCHATEAU, J. Translating Fatigue to Human Performance. **Med Sci**

Sports Exerc, v. 48, n. 11, p. 2228-2238, Nov 2016. ISSN 1530-0315 (Electronic) 0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27015386>>.

ESTEVE-LANAO, J. et al. How do endurance runners actually train? Relationship with competition performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 37, n. 3, p. 496-504, Mar 2005. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741850>>.

FERNANDEZ-GONZALO, R. et al. Effects of eccentric exercise on toll-like receptor 4 signaling pathway in peripheral blood mononuclear cells. **J Appl Physiol** (1985), v. 112, n. 12, p. 2011-8, Jun 2012. ISSN 1522-1601 (Electronic) 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461445>>.

FERNANDEZ-LAZARO, D. et al. Modulation of Exercise-Induced Muscle Damage, Inflammation, and Oxidative Markers by Curcumin Supplementation in a Physically Active Population: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 12, n. 2, Feb 15 2020. ISSN 2072-6643 (Electronic) 2072-6643 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32075287>>.

FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R. J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dyn Med**, v. 8, p. 1, Jan 13 2009. ISSN 1476-5918 (Electronic) 1476-5918 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144121>>.

FLOHE, L. et al. Redox regulation of NF-kappa B activation. **Free Radic Biol Med**, v. 22, n. 6, p. 1115-26, 1997. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034250>>.

FRISARD, M. I. et al. Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 5, p. E988-98, May 2010. ISSN 1522-1555 (Electronic) 0193-1849 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179247>>.

FRITSCHÉ, L. et al. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 13, p. 1316-29, 2008. ISSN 0929-8673 (Print) 0929-8673 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537611>>.

FROST, R. A.; NYSTROM, G. J.; LANG, C. H. Multiple Toll-like receptor ligands induce an IL-6 transcriptional response in skeletal myocytes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 3, p. R773-84, Mar 2006. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254126>>.

GAN, T. J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. **Curr Med Res Opin**, v. 26, n. 7, p. 1715-31, Jul 2010. ISSN 1473-4877 (Electronic) 0300-7995 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470236>>.

GARBER, C. E. et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 7, p. 1334-59, Jul 2011. ISSN 1530-0315 (Electronic)

0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21694556>>.

GARCIN, M. et al. Influence of acetaminophen consumption on perceived exertion at the lactate concentration threshold. **Percept Mot Skills**, v. 101, n. 3, p. 675-83, Dec 2005. ISSN 0031-5125 (Print)

0031-5125 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491671>>.

GAVIN, T. P. Basal and exercise-induced regulation of skeletal muscle capillarization. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 37, n. 2, p. 86-92, Apr 2009. ISSN 1538-3008 (Electronic)

0091-6331 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19305200>>.

GILROY, D. W. et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nat Med**, v. 5, n. 6, p. 698-701, Jun 1999. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10371510>>.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 103, n. 2, p. 693-9, Aug 2007. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303714>>.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 9, p. 607-15, Sep 2011. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21818123>>.

GLEESON, M.; MCFARLIN, B.; FLYNN, M. Exercise and Toll-like receptors. **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 34-53, 2006. ISSN 1077-5552 (Print)

1077-5552 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201071>>.

GLEZER, I. et al. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 8, p. 1120-9, Dec 2003. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614955>>.

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 130, n. 1, p. 21-7, Aug 2001. ISSN 1095-6433. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11672680>>.

GOMES, A. C. **Treinamento desportivo, estruturação e periodização**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox Biol**, v. 6, p. 524-551, Dec 2015. ISSN 2213-2317 (Electronic)

2213-2317 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26484802>>.

GRANGER, D. N.; RUTILI, G.; MCCORD, J. M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. **Gastroenterology**, v. 81, n. 1, p. 22-9, Jul 1981. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6263743>>.

GREEN, M. R. Gene regulation. Transcriptional transgressions. **Nature**, v. 357, n. 6377, p. 364-5, Jun 4 1992. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1594041>>.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J Clin Invest**, v. 116, n. 1, p. 4-15, Jan 2006. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16395396>>.

GROUP, J. C. S. J. W. Guidelines for rehabilitation in patients with cardiovascular disease (JCS 2012). **Circ J**, v. 78, n. 8, p. 2022-93, 2014. ISSN 1347-4820 (Electronic) 1346-9843 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25047729>>.

GUL, M. et al. Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Scand J Med Sci Sports**, v. 12, n. 3, p. 163-70, Jun 2002. ISSN 0905-7188 (Print) 0905-7188 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135449>>.

GUTTRIDGE, D. C. et al. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. **Science**, v. 289, n. 5488, p. 2363-6, Sep 29 2000. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009425>>.

HACKER, H. et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 204-7, Jan 12 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306937>>.

HAMMERMEISTER, J. et al. Occupational physical activity as an indicator of health and fitness. **Percept Mot Skills**, v. 92, n. 1, p. 121-7, Feb 2001. ISSN 0031-5125 (Print) 0031-5125 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322575>>.

HANNA, V. S.; HAFEZ, E. A. A. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **J Adv Res**, v. 11, p. 23-32, May 2018. ISSN 2090-1232 (Print) 2090-1224 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30034873>>.

HARLE, C. A. et al. Analgesic Management of Pain in Elite Athletes: A Systematic Review. **Clin J Sport Med**, v. 28, n. 5, p. 417-426, Sep 2018. ISSN 1536-3724 (Electronic) 1050-642X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30156573>>.

HOENE, M. et al. Activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway in the liver of mice is related to plasma glucose levels after acute exercise. **Diabetologia**, v. 53, n. 6, p. 1131-41, Jun 2010. ISSN 1432-0428. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20195842>>.

HOENE, M.; WEIGERT, C. The stress response of the liver to physical exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 16, p. 163-83, 2010. ISSN 1077-5552 (Print) 1077-5552 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839498>>.

HOFFMANN, A.; BALTIMORE, D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. **Immunol Rev**, v. 210, p. 171-86, Apr 2006. ISSN 0105-2896 (Print) 0105-2896 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16623771>>.

HOGERVORST, E. et al. Caffeine improves physical and cognitive performance during exhaustive exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 10, p. 1841-51, Oct 2008. ISSN 1530-0315 (Electronic)

0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18799996>>.

HOLLOSZY, J. O. Exercise increases average longevity of female rats despite increased food intake and no growth retardation. **J Gerontol**, v. 48, n. 3, p. B97-100, May 1993. ISSN 0022-1422 (Print)

0022-1422 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8482812>>.

HOWARD, E. E. et al. Divergent Roles of Inflammation in Skeletal Muscle Recovery From Injury. **Front Physiol**, v. 11, p. 87, 2020. ISSN 1664-042X (Print)

1664-042X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32116792>>.

HUANG, C. C. et al. Ganoderma tsugae hepatoprotection against exhaustive exercise-induced liver injury in rats. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1741-54, Jan 29 2013. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434860>>.

HUANG, C. C. et al. Metabolomics investigation of exercise-modulated changes in metabolism in rat liver after exhaustive and endurance exercises. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, n. 3, p. 557-66, Feb 2010. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19865828>>.

HUANG, S. H.; JOHNSON, K.; PIPE, A. L. The use of dietary supplements and medications by Canadian athletes at the Atlanta and Sydney Olympic Games. **Clin J Sport Med**, v. 16, n. 1, p. 27-33, Jan 2006. ISSN 1050-642X (Print)

1050-642X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377972>>.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F. H. Muscle injuries and repair: current trends in research. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84, n. 5, p. 822-32, May 2002. ISSN 0021-9355 (Print)

0021-9355 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12004029>>.

HURME, T. et al. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. **Med Sci Sports Exerc**, v. 23, n. 7, p. 801-10, Jul 1991. ISSN 0195-9131 (Print)

0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1921672>>.

JL, L. L. et al. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. **FASEB J**, v. 18, n. 13, p. 1499-506, Oct 2004. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466358>>.

JIMENEZ-JIMENEZ, R. et al. Eccentric training impairs NF-kappaB activation and over-expression of inflammation-related genes induced by acute eccentric exercise in the elderly. **Mech Ageing Dev**, v. 129, n. 6, p. 313-21, Jun 2008. ISSN 0047-6374 (Print)

0047-6374 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18377953>>.

KAGAN, J. C. et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. **Nat Immunol**, v. 9, n. 4, p. 361-8, Apr 2008. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18297073>>.

KANDA, K. et al. Evaluation of serum leaking enzymes and investigation into new biomarkers for exercise-induced muscle damage. **Exerc Immunol Rev**, v. 20, p. 39-54, 2014. ISSN 1077-5552 (Print)
1077-5552 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974720>>.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373-84, May 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404851>>.

_____. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-50, May 27 2011. ISSN 1097-4180 (Electronic)
1074-7613 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21616434>>.

KEHL, L. J.; TREMPER, T. M.; HARGREAVES, K. M. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. **Pain**, v. 85, n. 3, p. 333-343, Apr 2000. ISSN 0304-3959 (Print)
0304-3959 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781907>>.

KELLER, C. et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **FASEB J**, v. 15, n. 14, p. 2748-50, Dec 2001. ISSN 1530-6860 (Electronic)
0892-6638 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687509>>.

KILMARTIN, B.; REEN, D. J. HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 7, p. 2041-51, Jul 2004. ISSN 0014-2980 (Print)
0014-2980 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15214052>>.

KJAER, M. Hepatic glucose production during exercise. **Adv Exp Med Biol**, v. 441, p. 117-27, 1998. ISSN 0065-2598 (Print)
0065-2598 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781319>>.

KU, E. C. et al. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. **Am J Med**, v. 80, n. 4B, p. 18-23, Apr 28 1986. ISSN 0002-9343 (Print)
0002-9343 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3085488>>.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochem J**, v. 420, n. 1, p. 1-16, Apr 28 2009. ISSN 1470-8728 (Electronic)
0264-6021 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19382893>>.

KUO, H. W. et al. Analgesic use and the risk for progression of chronic kidney disease. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v. 19, n. 7, p. 745-51, Jul 2010. ISSN 1099-1557 (Electronic)
1053-8569 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20582905>>.

LAMBERT, C. P. et al. Exercise but not diet-induced weight loss decreases skeletal muscle inflammatory gene expression in frail obese elderly persons. **J Appl Physiol (1985)**, v. 105, n. 2, p. 473-8, Aug 2008. ISSN 8750-7587 (Print)
0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18535122>>.

- LANG, C. H. et al. Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. **Shock**, v. 19, n. 6, p. 538-46, Jun 2003. ISSN 1073-2322 (Print) 1073-2322 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12785009>>.
- LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 7, p. 1211-20, Jul 2009. ISSN 1582-4934 (Electronic) 1582-1838 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538472>>.
- LEE, I. M.; SKERRETT, P. J. Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation? **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 6 Suppl, p. S459-71; discussion S493-4, Jun 2001. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427772>>.
- LEE, K. W.; BODE, A. M.; DONG, Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 3, p. 211-8, Mar 2011. ISSN 1474-1768 (Electronic) 1474-175X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326325>>.
- LILJA, M. et al. High doses of anti-inflammatory drugs compromise muscle strength and hypertrophic adaptations to resistance training in young adults. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 222, n. 2, Feb 2018. ISSN 1748-1716 (Electronic) 1748-1708 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28834248>>.
- LIMA, F. D. et al. Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55668, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23405192>>.
- LIMA, F. D. et al. Ibuprofen intake increases exercise time to exhaustion: A possible role for preventing exercise-induced fatigue. **Scand J Med Sci Sports**, v. 26, n. 10, p. 1160-70, Oct 2016. ISSN 1600-0838 (Electronic) 0905-7188 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26589249>>.
- LIN, Y. et al. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 275, n. 32, p. 24255-63, Aug 11 2000. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823826>>.
- LIU, H. et al. TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. **J Immunol**, v. 164, n. 8, p. 4277-85, Apr 15 2000. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10754326>>.
- LIU, J. et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J Appl Physiol (1985)**, v. 89, n. 1, p. 21-8, Jul 2000. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904031>>.
- LUO, S. F. et al. Activation of ROS/NF-kappaB and Ca²⁺/CaM kinase II are necessary for

VCAM-1 induction in IL-1 β -treated human tracheal smooth muscle cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 237, n. 1, p. 8-21, May 15 2009. ISSN 1096-0333 (Electronic) 0041-008X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281832>>.

LUTI, S.; MODESTI, A.; MODESTI, P. A. Inflammation, Peripheral Signals and Redox Homeostasis in Athletes Who Practice Different Sports. **Antioxidants (Basel)**, v. 9, n. 11, Oct 30 2020. ISSN 2076-3921 (Print) 2076-3921 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33143147>>.

MACINTOSH, B. R.; SHAHI, M. R. A peripheral governor regulates muscle contraction. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 36, n. 1, p. 1-11, Feb 2011. ISSN 1715-5312 (Print) 1715-5312 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326373>>.

MACNEIL, L. G. et al. Eccentric exercise activates novel transcriptional regulation of hypertrophic signaling pathways not affected by hormone changes. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10695, May 18 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20502695>>.

MALAGUTI, M. et al. Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats. **J Appl Physiol**, v. 107, n. 4, p. 1028-36, Oct 2009. ISSN 1522-1601. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19713431>>.

MARGONIS, K. et al. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 6, p. 901-10, Sep 15 2007. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17697935>>.

MARKWORTH, J. F. et al. Ibuprofen treatment blunts early translational signaling responses in human skeletal muscle following resistance exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 117, n. 1, p. 20-8, Jul 1 2014. ISSN 1522-1601 (Electronic) 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833778>>.

MARTENSSON, J.; MEISTER, A. Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 11, p. 4656-60, Jun 1 1991. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2052548>>.

MASTALOUDIS, A. et al. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 10, p. 1329-41, May 15 2004. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15110397>>.

MASTORAKOS, G.; PAVLATOU, M. Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes. **Horm Metab Res**, v. 37, n. 9, p. 577-84, Sep 2005. ISSN 0018-5043. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175498>>.

MAUGER, A. R.; JONES, A. M.; WILLIAMS, C. A. Influence of acetaminophen on performance during time trial cycling. **J Appl Physiol (1985)**, v. 108, n. 1, p. 98-104, Jan 2010. ISSN 1522-1601 (Electronic)

0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910336>>.

MCARDLE, W. D.; MONTOYE, H. J. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. **J Appl Physiol**, v. 21, n. 4, p. 1431-4, Jul 1966. ISSN 0021-8987 (Print) 0021-8987 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5916692>>.

MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **N Engl J Med**, v. 312, n. 3, p. 159-63, Jan 17 1985. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2981404>>.

MCFARLIN, B. K. et al. Physical activity status, but not age, influences inflammatory biomarkers and toll-like receptor 4. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 61, n. 4, p. 388-93, Apr 2006. ISSN 1079-5006 (Print) 1079-5006 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611706>>.

MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. **PLoS Med**, v. 10, n. 2, p. e1001388, 2013. ISSN 1549-1676 (Electronic) 1549-1277 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23424288>>.

MCHUGH, M. P. et al. Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. **Sports Med**, v. 27, n. 3, p. 157-70, Mar 1999. ISSN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10222539>>.

MCLENNAN, I. S. E and F alpha series prostaglandins in developing muscles. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 43, n. 2, p. 77-82, Jun 1991. ISSN 0952-3278 (Print) 0952-3278 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1886910>>.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, Jul 24 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650913>>.

_____. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-6, Mar 19 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303867>>.

MEKSAWAN, K. et al. Effect of dietary fat intake and exercise on inflammatory mediators of the immune system in sedentary men and women. **J Am Coll Nutr**, v. 23, n. 4, p. 331-40, Aug 2004. ISSN 0731-5724 (Print) 0731-5724 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15310737>>.

MIKKELSEN, U. R. et al. Excitation-induced cell damage and beta2-adrenoceptor agonist stimulated force recovery in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 2, p. R265-72, Feb 2006. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210418>>.

MILLER, K. J. et al. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, n. 1, p.

- C174-81, Jan 2000. ISSN 0363-6143 (Print)
0363-6143 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10644525>>.
- MILLS, K. H. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 12, p. 807-22, Nov 18 2011. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094985>>.
- MISHRA, D. K. et al. Anti-inflammatory medication after muscle injury. A treatment resulting in short-term improvement but subsequent loss of muscle function. **J Bone Joint Surg Am**, v. 77, n. 10, p. 1510-9, Oct 1995. ISSN 0021-9355 (Print)
0021-9355 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593059>>.
- MOLDOVEANU, A. I.; SHEPHARD, R. J.; SHEK, P. N. The cytokine response to physical activity and training. **Sports Med**, v. 31, n. 2, p. 115-44, Feb 2001. ISSN 0112-1642 (Print)
0112-1642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11227979>>.
- MONDA, M. et al. Inhibition of prostaglandin synthesis reduces the induction of MyoD expression in rat soleus muscle. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 30, n. 3-4, p. 139-44, 2009. ISSN 1573-2657 (Electronic)
0142-4319 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19526318>>.
- MORRIS, J. N. et al. Coronary heart-disease and physical activity of work. **Lancet**, v. 262, n. 6796, p. 1111-20; concl, Nov 28 1953. ISSN 0140-6736 (Print)
0140-6736 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13110075>>.
- MUZIO, M.; MANTOVANI, A. Toll-like receptors. **Microbes Infect**, v. 2, n. 3, p. 251-5, Mar 2000. ISSN 1286-4579 (Print)
1286-4579 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758401>>.
- NIE, L. et al. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. **Front Immunol**, v. 9, p. 1523, 2018. ISSN 1664-3224 (Print)
1664-3224 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30034391>>.
- NIEMAN, D. C. Current perspective on exercise immunology. **Curr Sports Med Rep**, v. 2, n. 5, p. 239-42, Oct 2003. ISSN 1537-890X (Print)
1537-890X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12959703>>.
- NIEMAN, D. C.; PEDERSEN, B. K. Exercise and immune function. Recent developments. **Sports Med**, v. 27, n. 2, p. 73-80, Feb 1999. ISSN 0112-1642 (Print)
0112-1642 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10091272>>.
- NOAKES, T. D. Fatigue is a Brain-Derived Emotion that Regulates the Exercise Behavior to Ensure the Protection of Whole Body Homeostasis. **Front Physiol**, v. 3, p. 82, 2012. ISSN 1664-042X (Electronic)
1664-042X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22514538>>.
- NOVAK, M. L. et al. COX-2 inhibitor reduces skeletal muscle hypertrophy in mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 4, p. R1132-9, Apr 2009. ISSN 0363-6119 (Print)
0363-6119 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176887>>.

- O'MAHONY, D. S. et al. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. **Int J Med Sci**, v. 5, n. 1, p. 1-8, Jan 4 2008. ISSN 1449-1907 (Electronic) 1449-1907 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18219369>>.
- O'NEILL, L. A.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 5, p. 353-64, May 2007. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17457343>>.
- OESTER, C.; WEBER, A.; VASO, M. Retrospective study of the use of medication and supplements during the 2018 FIFA World Cup Russia. **BMJ Open Sport Exerc Med**, v. 5, n. 1, p. e000609, 2019. ISSN 2055-7647 (Print) 2055-7647 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31548910>>.
- OSTROWSKI, K. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol**, v. 515 (Pt 1), p. 287-91, Feb 15 1999. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925898>>.
- PACHECO, C. et al. A compendium of physical exercise-related human genes: an 'omic scale analysis. **Biol Sport**, v. 35, n. 1, p. 3-11, Mar 2018. ISSN 0860-021X (Print) 0860-021X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30237656>>.
- PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853-66, Nov 22 1999. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602461>>.
- PATE, R. R.; KRISKA, A. Physiological basis of the sex difference in cardiorespiratory endurance. **Sports Med**, v. 1, n. 2, p. 87-98, Mar-Apr 1984. ISSN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6567230>>.
- PATRIGNANI, P. et al. Managing the adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v. 4, n. 5, p. 605-21, Sep 2011. ISSN 1751-2441 (Electronic) 1751-2433 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22114888>>.
- PATRONO, C.; PATRIGNANI, P.; GARCIA RODRIGUEZ, L. A. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. **J Clin Invest**, v. 108, n. 1, p. 7-13, Jul 2001. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435450>>.
- PAULSEN, G. et al. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? **Exerc Immunol Rev**, v. 18, p. 42-97, 2012. ISSN 1077-5552 (Print) 1077-5552 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876722>>.
- PEAKE, J.; NOSAKA, K.; SUZUKI, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. **Exerc Immunol Rev**, v. 11, p. 64-85, 2005. ISSN 1077-5552 (Print)

1077-5552 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385845>>.

PEDERSEN, B. K. Physical activity and muscle-brain crosstalk. **Nat Rev Endocrinol**, v. 15, n. 7, p. 383-392, Jul 2019. ISSN 1759-5037 (Electronic)
1759-5029 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30837717>>.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1379-406, Oct 2008. ISSN 0031-9333 (Print)
0031-9333 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923185>>.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scand J Med Sci Sports**, v. 25 Suppl 3, p. 1-72, Dec 2015. ISSN 1600-0838 (Electronic)
0905-7188 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26606383>>.

PEDERSEN, B. K. et al. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. **Pflugers Arch**, v. 446, n. 1, p. 9-16, Apr 2003. ISSN 0031-6768 (Print)
0031-6768 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690457>>.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, Apr 2005. ISSN 8750-7587 (Print)
0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772055>>.

PETERSON, J. M. et al. Ibuprofen and acetaminophen: effect on muscle inflammation after eccentric exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 6, p. 892-6, Jun 2003. ISSN 0195-9131 (Print)
0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783034>>.

PIEPOLI, M. F. et al. Secondary prevention in the clinical management of patients with cardiovascular diseases. Core components, standards and outcome measures for referral and delivery: a policy statement from the cardiac rehabilitation section of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation. Endorsed by the Committee for Practice Guidelines of the European Society of Cardiology. **Eur J Prev Cardiol**, v. 21, n. 6, p. 664-81, Jun 2014. ISSN 2047-4881 (Electronic)
2047-4873 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22718797>>.

PILEGAARD, H. et al. Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. **J Physiol**, v. 541, n. Pt 1, p. 261-71, May 15 2002. ISSN 0022-3751 (Print)
0022-3751 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015434>>.

PILLON BARCELOS, R. et al. Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise. **Free Radic Res**, v. 51, n. 2, p. 222-236, Feb 2017. ISSN 1029-2470 (Electronic)
1029-2470 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28166653>>.

PODOLSKY, R. J.; ARATA, T. Force generating mechanisms in striated muscle. **Adv Exp Med Biol**, v. 226, p. 319-30, 1988. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3407519>>.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-8, Dec 11 1998. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851930>>.

PRISK, V.; HUARD, J. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. **Histol Histopathol**, v. 18, n. 4, p. 1243-56, Oct 2003. ISSN 0213-3911 (Print) 0213-3911 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12973691>>.

PROSKE, U.; MORGAN, D. L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. **J Physiol**, v. 537, n. Pt 2, p. 333-45, Dec 1 2001. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731568>>.

PYNE, D. B. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. **Aust J Sci Med Sport**, v. 26, n. 3-4, p. 49-58, Sep-Dec 1994. ISSN 0813-6289 (Print)

0813-6289 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665277>>.

RADAK, Z. et al. Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle. **Arch Biochem Biophys**, v. 383, n. 1, p. 114-8, Nov 1 2000. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11097183>>.

RADAK, Z. et al. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. **Free Radic Biol Med**, v. 98, p. 187-196, Sep 2016. ISSN 1873-4596 (Electronic)

0891-5849 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26828019>>.

RADAK, Z. et al. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 10, p. 1208-46, Apr 1 2013. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22978553>>.

RAINSFORD, K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. **Subcell Biochem**, v. 42, p. 3-27, 2007. ISSN 0306-0225 (Print)

0306-0225 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612044>>.

RASMUSSEN, U. F. et al. The effect of high-intensity exhaustive exercise studied in isolated mitochondria from human skeletal muscle. **Pflugers Arch**, v. 443, n. 2, p. 180-7, Nov 2001. ISSN 0031-6768 (Print)

0031-6768 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713642>>.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, May 2011. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508345>>.

RIESS, W. et al. Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent Voltaren. **Scand J Rheumatol Suppl**, n. 22, p. 17-29, 1978. ISSN 0301-3847 (Print)

0301-3847 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/98834>>.

ROSA, J. C. et al. Exhaustive exercise increases inflammatory response via Toll like receptor-4 and NF-kappaBp65 pathway in rat adipose tissue. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 6, p. 1604-7, Jun 2011. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945364>>.

ROSA NETO, J. C. et al. Acute exhaustive exercise regulates IL-2, IL-4 and MyoD in skeletal muscle but not adipose tissue in rats. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 97, Jun 13 2011. ISSN 1476-511X (Electronic) 1476-511X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21668966>>.

SALLMANN, A. R. The history of diclofenac. **Am J Med**, v. 80, n. 4B, p. 29-33, Apr 28 1986. ISSN 0002-9343 (Print) 0002-9343 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3085489>>.

SANTOS-SOTO, I. J. et al. Voluntary running in young adult mice reduces anxiety-like behavior and increases the accumulation of bioactive lipids in the cerebral cortex. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81459, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24349072>>.

SCHEFFER, D. D. L.; LATINI, A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1866, n. 10, p. 165823, Oct 1 2020. ISSN 1879-260X (Electronic) 0925-4439 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32360589>>.

SCHNEIDER, B. S.; TIIDUS, P. M. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? **Sports Med**, v. 37, n. 10, p. 837-56, 2007. ISSN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17887810>>.

SEELY, A. J.; PASCUAL, J. L.; CHRISTOU, N. V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Crit Care**, v. 7, n. 4, p. 291-307, Aug 2003. ISSN 1364-8535 (Print) 1364-8535 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930553>>.

SELDERS, G. S. et al. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. **Regen Biomater**, v. 4, n. 1, p. 55-68, Feb 2017. ISSN 2056-3418 (Print) 2056-3426 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28149530>>.

SHI, X.; GARRY, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes Dev**, v. 20, n. 13, p. 1692-708, Jul 1 2006. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818602>>.

SMITH, L. K. Exercise training in patients with impaired left ventricular function. **Med Sci Sports Exerc**, v. 23, n. 6, p. 654-60, Jun 1991. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1886473>>.

SMITH, L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 2, p. 317-31, Feb 2000. ISSN 0195-9131 (Print)

0195-9131 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694113>>.

SNOW, M. H. The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. **Cell Tissue Res**, v. 185, n. 3, p. 399-408, Dec 19 1977. ISSN 0302-766X (Print) 0302-766X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/597854>>.

SPEED, C.; JAQUES, R. High-performance sports medicine: an ancient but evolving field. **Br J Sports Med**, v. 45, n. 2, p. 81-3, Feb 2011. ISSN 1473-0480 (Electronic) 0306-3674 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870811>>.

SPINA, R. J. et al. Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. **J Appl Physiol** (1985), v. 80, n. 6, p. 2250-4, Jun 1996. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8806937>>.

SUGAMA, K. et al. IL-17, neutrophil activation and muscle damage following endurance exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 18, p. 116-27, 2012. ISSN 1077-5552 (Print) 1077-5552 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876724>>.

SUNAMI, Y. et al. Hepatic activation of IKK/NFkappaB signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation. **Hepatology**, v. 56, n. 3, p. 1117-28, Sep 2012. ISSN 1527-3350 (Electronic) 0270-9139 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407857>>.

SUZUKI, K. et al. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. **Exerc Immunol Rev**, v. 8, p. 6-48, 2002. ISSN 1077-5552 (Print) 1077-5552 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690937>>.

SUZUKI, K. et al. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. **Eur J Appl Physiol**, v. 81, n. 4, p. 281-7, Mar 2000. ISSN 1439-6319 (Print) 1439-6319 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10664086>>.

SWART, J. et al. Exercising with reserve: evidence that the central nervous system regulates prolonged exercise performance. **Br J Sports Med**, v. 43, n. 10, p. 782-8, Oct 2009. ISSN 1473-0480 (Electronic) 0306-3674 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052141>>.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int Immunol**, v. 17, n. 1, p. 1-14, Jan 2005. ISSN 0953-8178 (Print) 0953-8178 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585605>>.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-20, Mar 19 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872>>.

TEIXEIRA, B. C. et al. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. **J Vasc Bras**, v. Abr.-Jun, n. 13(2), p. 108-115, 2014.

THUYNE, W. V.; DELBEKE, F. T. Declared use of medication in sports. **Clin J Sport Med**,

- v. 18, n. 2, p. 143-7, Mar 2008. ISSN 1050-642X (Print)
1050-642X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18332689>>.
- THYAGARAJAN, S.; PRIYANKA, H. P. Bidirectional communication between the neuroendocrine system and the immune system: relevance to health and diseases. **Ann Neurosci**, v. 19, n. 1, p. 40-6, Jan 2012. ISSN 0972-7531 (Print)
0972-7531 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25205962>>.
- TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 2, p. R345-53, Feb 2005. ISSN 0363-6119 (Print)
0363-6119 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637171>>.
- TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. **J Physiol**, v. 578, n. Pt 1, p. 327-36, Jan 1 2007. ISSN 0022-3751 (Print)
0022-3751 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038433>>.
- TODD, P. A.; SORKIN, E. M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 35, n. 3, p. 244-85, Mar 1988. ISSN 0012-6667 (Print)
0012-6667 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3286213>>.
- TRAPPE, T. A. et al. Influence of acetaminophen and ibuprofen on skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 3, p. R655-62, Mar 2011. ISSN 1522-1490 (Electronic)
0363-6119 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160058>>.
- TRAPPE, T. A. et al. Skeletal muscle PGF(2)(alpha) and PGE(2) in response to eccentric resistance exercise: influence of ibuprofen acetaminophen. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 10, p. 5067-70, Oct 2001. ISSN 0021-972X (Print)
0021-972X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600586>>.
- TSCHOLL, P. et al. The use and abuse of painkillers in international soccer: data from 6 FIFA tournaments for female and youth players. **Am J Sports Med**, v. 37, n. 2, p. 260-5, Feb 2009. ISSN 1552-3365 (Electronic)
0363-5465 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849466>>.
- TSCHOLL, P.; JUNGE, A.; DVORAK, J. The use of medication and nutritional supplements during FIFA World Cups 2002 and 2006. **Br J Sports Med**, v. 42, n. 9, p. 725-30, Sep 2008. ISSN 1473-0480 (Electronic)
0306-3674 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308873>>.
- UCHIDA, M. C. et al. Effect of bench press exercise intensity on muscle soreness and inflammatory mediators. **J Sports Sci**, v. 27, n. 5, p. 499-507, Mar 2009. ISSN 0264-0414 (Print)
0264-0414 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19253084>>.
- UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **J Mol Med (Berl)**, v. 84, n. 9, p. 712-25, Sep 2006. ISSN 0946-2716 (Print)
0946-2716 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924467>>.

UNGVARI, Z. et al. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 65, n. 10, p. 1028-41, Oct 2010. ISSN 1758-535X (Electronic) 1079-5006 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576649>>.

URSO, M. L. Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: benefit or detriment? **J Appl Physiol** (1985), v. 115, n. 6, p. 920-8, Sep 2013. ISSN 1522-1601 (Electronic) 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539314>>.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 41-54, Jul 15 2003. ISSN 0300-483X (Print) 0300-483X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821281>>.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand J Rheumatol Suppl**, v. 102, p. 9-21, 1996. ISSN 0301-3847 (Print) 0301-3847 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8628981>>.

VANE, J. R. et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 6, p. 2046-50, Mar 15 1994. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7510883>>.

VARELA, M. L. et al. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115-1127, Aug 2018. ISSN 1573-2576 (Electronic) 0360-3997 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29404872>>.

VENEROSO, C. et al. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. **J Pineal Res**, v. 47, n. 2, p. 184-91, Sep 2009. ISSN 1600-079X (Electronic) 0742-3098 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19627457>>.

WAN, J. J. et al. Muscle fatigue: general understanding and treatment. **Exp Mol Med**, v. 49, n. 10, p. e384, Oct 6 2017. ISSN 2092-6413 (Electronic) 1226-3613 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28983090>>.

WARBURTON, D. E.; NICOL, C. W.; BREDIN, S. S. Health benefits of physical activity: the evidence. **CMAJ**, v. 174, n. 6, p. 801-9, Mar 14 2006. ISSN 1488-2329 (Electronic) 0820-3946 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16534088>>.

WARNER, T. D. et al. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 13, p. 7563-8, Jun 22 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377455>>.

WATSON, D. J. et al. Lower risk of thromboembolic cardiovascular events with naproxen among patients with rheumatoid arthritis. **Arch Intern Med**, v. 162, n. 10, p. 1105-10, May 27 2002. ISSN 0003-9926 (Print) 0003-9926 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020179>>.

WEWEGE, M. A. et al. Aerobic, resistance or combined training: A systematic review and

meta-analysis of exercise to reduce cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v. 274, p. 162-171, Jul 2018. ISSN 1879-1484 (Electronic) 0021-9150 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29783064>>.

WIBOM, R. et al. Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. **J Appl Physiol** (1985), v. 73, n. 5, p. 2004-10, Nov 1992. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1474078>>.

WILLIS, J. V. et al. The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 16, n. 6, p. 405-10, 1979. ISSN 0031-6970 (Print) 0031-6970 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/527637>>.

WILUND, K. R. Is the anti-inflammatory effect of regular exercise responsible for reduced cardiovascular disease? **Clin Sci (Lond)**, v. 112, n. 11, p. 543-55, Jun 2007. ISSN 1470-8736 (Electronic) 0143-5221 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459004>>.

WOLIN, M. S. Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. **Microcirculation**, v. 3, n. 1, p. 1-17, Mar 1996. ISSN 1073-9688 (Print) 1073-9688 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8846267>>.

YANKELEVITCH-YAHAV, R. et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. **J Vis Exp**, n. 97, Mar 2 2015. ISSN 1940-087X (Electronic) 1940-087X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25867960>>.

YIN, H.; PRICE, F.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 23-67, Jan 2013. ISSN 1522-1210 (Electronic) 0031-9333 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303905>>.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iran J Pharm Res**, v. 10, n. 4, p. 655-83, Fall 2011. ISSN 1735-0328 (Print) 1726-6882 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24250402>>.

ZELENKA, M.; SCHAFERS, M.; SOMMER, C. Intra-neural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 257-263, Aug 2005. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964142>>.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, Spring 2007. ISSN 0020-5907 (Print) 0020-5907 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426506>>.

ZHANG, S. Y. et al. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. **Immunol Rev**, v. 220, p. 225-36, Dec 2007. ISSN 0105-2896 (Print) 0105-2896 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979850>>.

ZURLO, F. et al. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy

expenditure. **J Clin Invest**, v. 86, n. 5, p. 1423-7, Nov 1990. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243122>>.

ZYCHOWSKA, M. et al. Effect of Lower and Upper Body High Intensity Training on Genes Associated with Cellular Stress Response. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 2768546, 2017. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28589135>>.