

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

**PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO E DOS
RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO
VANILOIDE 1 (TRPV 1) NA DOR MUSCULAR TARDIA
APÓS EXERCÍCIO EXCÊNTRICO EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Leandro Thies Retamoso

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO E DOS RECEPTORES
DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILOIDE 1 (TRPV 1) NA
DOR MUSCULAR TARDIA APÓS EXERCÍCIO
EXCÊNTRICO EM RATOS**

Leandro Thies Retamoso

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, do Centro de Educação Física e Desporto, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Educação Física**

Orientador: Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

Retamoso, Leandro Thies

Papel do sistema purinérgico e dos Receptores de Potencial Transitório Vaniloide 1 (TRPV 1) na dor muscular tardia após exercício excêntrico em ratos. / Leandro Thies Retamoso.-2014.

51 p.; 30cm

Orientador: Luiz Fernando Freire Royes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Educação Física e desportos, Programa de Pós-Graduação em Educação Física, RS, 2014

1. Xantina oxidase 2. Downhill 3. Purinas I. Royes, Luiz Fernando Freire II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Leandro Thies Retamoso. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: leandroretamoso@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Educação Física e Desporto
Programa de Pós-graduação em Educação Física**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO E DOS RECEPTORES DE
POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILOIDE 1 (TRPV 1) NA DOR
MUSCULAR TARDIA APÓS EXERCÍCIO EXCÊNTRICO EM RATOS**

elaborada por
Leandro Thies Retamoso

como requisito parcial para a obtenção do grau em
Mestre em Educação Física

COMISSÃO EXAMINADORA:

Luiz Fernando Freire Royes, Dr. (UFSM)
(Presidente/orientador)

Mauren Assis de Souza, Dr.

Leandro Rodrigo Ribeiro, Dr.

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2014.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Educação Física
Universidade Federal de Santa Maria

PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO E DOS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILOIDE 1 (TRPV 1) NA DOR MUSCULAR TARDIA APÓS EXERCÍCIO EXCÊNTRICO EM RATOS

Autor: Leandro Thies Retamoso
Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2014.

O exercício físico crônico tem sido recomendado como estratégia para a prevenção de diversas doenças associadas ao estilo de vida, como doenças cardíacas, hipertensão, osteoporose e diabetes tipo 2. Embora o exercício físico regular traga benefícios para a saúde, todos os praticantes de atividade física e esporte e, até mesmo indivíduos sedentários, já experimentaram alguma vez na vida um episódio de dor muscular tardia (DMT), caracterizada pela sensação de desconforto na musculatura esquelética. Como grande gerador de DMT, destaca-se o exercício excêntrico agudo que induz fadiga, redução de força e perda de desempenho. Apesar de diversos estudos demonstrando a participação das espécies reativas de oxigênio neste quadro, pouco se sabe sobre a participação da degradação das purinas bem como a participação dos receptores de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1) no desenvolvimento da dor muscular tardia. Para tanto, os ratos wistar machos realizaram teste de *downhill* em esteira (exercício excêntrico) até a exaustão. Após foram analisados os danos histológicos nos músculos gastrocnêmio e sóleo, Outro set de animais após a exaustão foram avaliados nos testes de alodinea mecânica na pata traseira direita, teste funcional de força nas pastas dianteiras e análises bioquímicas no músculo gastrocnêmio. Os resultados demonstram aumento na alodinea, na carbonilação protéica, nos níveis de ADP, AMP, ácido úrico, além de elevar os níveis de imunoreatividade do receptor TRPV1 e atividade da xantina oxidase. Esses dados apontam uma possível contribuição das espécies reativas de oxigênio, da degradação de purinas e dos receptores TRPV1 na dor muscular tardia.

Palavras-chave: Xantina oxidase. Downhill. Purinas.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Physical Education
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ROLE OF PURINERGIC SYSTEM AND TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 1 (TRPV1) IN DELAYED ONSET MUSCLE SORENESS AFTER ECCENTRIC EXERCISE IN RATS

Author: Leandro Thies Retamoso

Advisor: Luiz Fernando Freire Royes, PhD

Date and place: Santa Maria, February, 27th, 2014.

Chronic exercise has been recommended as a strategy for preventing several diseases associated with lifestyle such as heart disease, hypertension, osteoporosis and type II diabetes. Although regular physical exercise has benefits for health, all sports practitioners, and even sedentary people, have already feel delayed onset muscle soreness (DOMS) once, characterized by discomfort in skeletal muscle. As the most DOMS generator, acute eccentric exercise induce fatigue, strength reduction and performance impairment. Despite some researches demonstrating reactive oxygen species (ROS) in this context, there are few information about purine degradation as well as transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) on DOMS development. In this context, animals performed a downhill running test (eccentric exercise) on treadmill until exhaustion for histologic evaluation, mechanical allodynea, strength force test and biochemical analysis. The results showed an increase in mechanical allodynea and ADP, AMP, uric acid and TRPV1 immunoreactivity levels. In conclusion, the results support the contribution of ROS and the participation of purine and TRPV1 on delayed onset muscle soreness.

Key words: Xanthine oxidase. Downhill. Purines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
AU	Ácido Úrico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAT	Catalase
DMT	Dor Muscular Tardia
EE	Exercício Excêntrico
ERNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathiona Peroxidase
IL	Interleucina
IMP	Inosina Monofosfato
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NO	Oxido Nítrico
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
TRP	Receptores de Potencial Transitório
TRPV1	Receptores de Potencial Transitório Vaniloide 1

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Figura 1 - Alodínea mecânica.....	44
ANEXO B – Figura 2- Teste funcional de agarrar	45
ANEXO C – Figura 3- Avaliação histológica.....	46
ANEXO D – Figura 4- Degradação de purinas.....	47
ANEXO E – Figura 5- Atividade da xantina oxidase.....	48
ANEXO F – Figura 6- Conteúdo de carbonilação proteica.....	49
ANEXO G – Figura 7- Ativ. das enzimas superóxido dismutase e catalase.....	50
ANEXO H – Figura 8- Imunorreatividade de receptor TPRV1	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos Gerais	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Exercício físico	13
3.1.1 Exercício físico agudo	14
3.1.2 Exercício excêntrico.....	15
3.2 Espécies reativas de oxigênio	16
3.3 Dor	17
3.3.1 Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1	18
3.3.2 Dor muscular tardia.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Desenho experimental	20
4.2 Animais	20
4.3 Protocolo de exercício excêntrico	21
4.4 Alodinea mecânica	21
4.5 Avaliação funcional das patas dianteiras – teste de agarrar	22
4.6 Análises histológicas	22
4.7 Degradação das purinas	23
4.8 Atividade da enzima xantina oxidase	23
4.9 Níveis de carbonilação proteica	24
4.10 Atividade da enzima superóxido dismutase	24
4.11 Atividade da enzima catalase	25
4.12 Western Blot – Receptor Potencial transitório (TRPV1)	25
4.13 Determinação de proteína	26
4.14 Análise estatística	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	43

1. INTRODUÇÃO

A história do exercício físico pode provavelmente ser confundida com a história da humanidade. Para o homem primitivo a atividade física apresentava um caráter utilitário, uma vez que sua importância era evidenciada em atividades de sobrevivência, seja em situações de caça, onde necessitava obter alimento para sobreviver, ou em situações de fuga de predadores, em que a atividade física também se fazia necessária para a sobrevivência. Entretanto, atualmente os seres humanos, diferentemente dos outros animais, não utilizam o exercício físico somente como meio de sobrevivência, mas como um estilo de vida, recreação e, também, como tratamento terapêutico (JI, 1999). Neste sentido, a comunidade científica tem despertado interesse pelo papel do exercício-físico sobre os aspectos psicobiológicos, onde estudos relatam uma forte correlação entre o aumento da capacidade aeróbica e melhora nas funções cognitivas (KRAMER, HIEMKE e FUCHS, 1999). O exercício físico também tem sido recomendado como estratégia para a prevenção de diversas doenças associadas ao estilo de vida, como doença cardíaca, hipertensão, osteoporose, diabetes tipo 2, entre outros (POWELL e PAFFENBARGER, 1985).

Embora o exercício físico regular traga benefícios para a saúde, todos os praticantes de atividade física e esporte e, até mesmo, indivíduos sedentários, já experimentaram alguma vez na vida um episódio de dor muscular tardia (DMT) (MUNEHIRO et al., 2012). A DMT é caracterizada pela sensação de desconforto na musculatura esquelética que ocorre algumas horas após a prática da atividade física, manifestando-se com intensidade maiores após as 12h e alcançando seu máximo de intensidade entre 24 e 72 horas (CLEAK e ESTON, 1992). O relato dessa sensação de desconforto principalmente na musculatura esquelética é maior em pessoas destreinadas, iniciantes e em atletas de elite (CHEUNG, HUME e MAXWELL, 2003). Alguns autores como Mcardle (1998), acreditam que seu surgimento nada mais é do que um processo de adaptação do organismo, tornando o músculo mais resistente ao exercício seguinte.

O exercício excêntrico (EE) foi descrito em diversos trabalhos por ser uma das formas de desenvolvimento de dor muscular tardia (ARMSTRONG, OGILVIE e

SCHWANE, 1983a; LEE et al., 2002; CHEN et al., 2011). Estudos demonstraram uma redução da força muscular (KEHL e FAIRBANKS, 2003; RODRIGUES-FILHO et al., 2003), aumento dos níveis inflamatórios (CROSIER et al., 1996; SLUKA e RASMUSSEN, 2010) e diminuição da performance (LI et al., 2002).

A DMT pode ser causada por vários fatores, sendo os microtraumas mecânicos induzidos pelo exercício físico, com prevalência dos realizados de forma excêntrica, e os fatores fisiológicos os principais deles (SONG, TANG e LIU, 2013). Neste contexto, diversos estudos têm demonstrado que exercícios intensos acima de 50% da contração muscular voluntária máxima causam impedimento do fluxo sanguíneo no local (WILLIAMS et al., 2007). Em exercícios com intensidades próximas ou iguais a 100%, o evento isquêmico impõe impedimento do fluxo sanguíneo para esse tecido. Os metabólitos aláticos e lácticos são intensificados pela isquemia, levando a produção de amônia, lactato e monofostato de inosina (IMP), que é substrato no ciclo de degradação das purinas (BELLINGER et al., 2000). Os intermediários formados neste ciclo são o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (SCHNEIDER, C e OLIVEIRA, A., 2004). O acúmulo destes metabólitos no músculo esquelético formados a partir da degradação do adenosina trifosfato (ATP) pode culminar na formação de hipoxantina, xantina e finalmente urato, os três produtos finais do ciclo das purinas (STATHIS, CAREY e SNOW, 2005). Sob condições aeróbias, o aporte de oxigênio assegura que o ATP seja repostado, primeiramente via fosforilação oxidativa mitocondrial, e que a hipoxantina/xantina seja convertida para ácido úrico (AU), preferencialmente pela xantina desidrogenase ao invés da xantina oxidase. Entretanto o aumento na atividade da enzima xantina oxidase pode ser um importante caminho para produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) quando o músculo apresentar um déficit de adenina dinucleotídeo. Essa situação teoricamente pode acontecer em situação isquêmica como, exercícios excêntricos intensos com déficit de O₂, e nos exercícios com limitação vascular de fluxo sanguíneo (CHEVION et al., 2003). O resultado do excesso na geração de EROS são danos musculares e degradação proteica (AOI et al., 2004), aumento dos níveis de interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (OSTROWSKI et al., 1999; VASSILAKOPOULOS et al., 2003). O conjunto destes eventos pode estar envolvido no desenvolvimento de dor pós-exercício levando à futura perda de desempenho (MUNEHIRO et al., 2012).

A dor fisiológica dificilmente ocorre como um processo isolado. Frequentemente o estímulo nocivo pode apresentar uma caracterização temporal, como dor aguda (ocorrência recente) ou crônica (duração longa) (WOOLF, 2010). Já a detecção da sensação dolorosa é realizada pelos receptores de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1). Cabe ressaltar que os receptores de potencial transitório (TRPs) são canais iônicos considerados excepcionais pelo fato de serem, na sua maioria, receptores polimodais, ou seja, ativam-se por muitos tipos de estímulos diferentes, como, temperatura (calor ou frio), compostos químicos, osmolaridade, estimulação mecânica, lipídios, luminosidade, estresse oxidativo e outros. O referido receptor parece ser um dos principais codificadores de estímulos externos e internos em neurônios sensoriais. Similarmente aos demais receptores TRP, os receptores TRPV1 formam homotetrâmeros ou heterotetrâmeros funcionais, sendo que todos os monômeros contribuem para a formação do poro e seletividade do canal. Dentre os ligantes ^{endógenos} dos receptores TRPV1 (endovanilóides) estão a anandamida, a N-araquidonoildopamina, o 12-S-ácido hidroperoxieicosatetranoico, a oleoiletanolamida e N-oleoildopamina, os prótons (pH < 5.2), as espécies reativas de nitrogênio (ERNS), as EROS, a bradicinina, o ATP, o fator de crescimento do nervo (NGF), o leucotrieno B4 e a tripsina, que podem ativar ou sensibilizar este canal através das vias de segundos mensageiros e, ainda, por modificação da atividade do receptor (fosforilação ou nitrosilação) (CALIXTO et al., 2005; YOSHIDA et al., 2006; JARA-OSEGUERA, SIMON e ROSENBAUM, 2008; BASBAUM et al., 2009; MIYAMOTO et al., 2009; SCHUMACHER, 2010). Entretanto, apesar do receptor TRPV1 participar da produção de dor em diversas patologias, incluindo algumas formas de artrites, seu papel na DMT ainda é pouco conhecido.

Está claro que tipos específicos de atividades físicas, principalmente aquelas com um maior componente excêntrico, podem causar danos às fibras musculares; porque o dano estrutural resulta em dor ou porque a dor é de efeito tardio, ainda não está completamente esclarecido. O dano por si só pode nem sempre resultar em dor, uma vez que numerosas condições de miopatia, nas quais danos musculares são evidentes, não apresentam sinais de dor. Além disso, pouco se sabe sobre o real papel das EROS gerados a partir da degradação de purinas bem como a participação dos receptores TRPV1 no desenvolvimento da DMT.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a participação do sistema purinérgico, do estresse oxidativo e a ativação dos receptores TRPV1 no desenvolvimento da dor muscular tardia pós-exercício excêntrico agudo em ratos.

2.2 Objetivos específicos

Mensurar o decurso temporal da dor após o protocolo de exercício excêntrico agudo.

Investigar a produção de força das patas dianteiras após o protocolo de exercício excêntrico agudo.

Verificar se o presente protocolo induz danos musculares nos músculos gastrocnêmio e sóleo.

Verificar o envolvimento do sistema purinérgico no desenvolvimento da dor muscular tardia após o protocolo de exercício excêntrico agudo no músculo gastrocnêmio.

Verificar a participação do estresse oxidativo caracterizado pela atividade de enzimas pro-oxidantes (Xantina Oxidase) e anti-oxidantes (catálise e superóxido dismutase), bem como na carbonilação proteica no desenvolvimento de dor muscular tardia induzida pelo presente protocolo.

Verificar a quantidade de receptores TRPV1 no músculo gastrocnêmio no decurso temporal após o protocolo de exercício excêntrico agudo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Exercício físico

A evolução da humanidade fez algumas modificações na forma de utilização dos movimentos corporais, afastando-se cada vez mais dos objetivos pré-históricos. Na antiguidade os movimentos corporais, os exercícios físicos eram realizados com objetivos claros de sobrevivência, na busca de alimentos e muitas vezes para defender território e até mesmo para fugir de predadores. Hoje, diferente dos animais silvestres (JI, 1999), utilizamos o exercício físico, como estilo de vida, recreação e como tratamento terapêutico.

Nas últimas décadas os efeitos do exercício físico sobre o sistema nervoso central ganharam ênfase ao demonstrarem eficiência protetora em diversos modelos de doenças do sistema nervoso central como, esclerose múltipla, doença de Huntington, Parkinson e Alzheimer, assim como epilepsia (ARIDA et al., 1999; LAURIN et al., 2001; TILLERSON et al., 2003; KOHL et al., 2007; BENEDETTI et al., 2009). Outros estudos clínicos e em modelos animais, mostram que o exercício aumentou a capacidade de aprendizado e diminuiu o declínio cognitivo decorrente do envelhecimento (KRAMER et al., 1999; COTMAN e BERCHTOLD, 2002).

Alguns trabalhos demonstram que o exercício físico atua na biogênese mitocondrial, atuando também no sistema antioxidante modulando positivamente com o aumento da atividade e/ou aumentando o conteúdo de enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase tanto no músculo quanto no sistema nervoso central (MARUHASHI ET AL., 2007; RAMBO ET AL., 2009; STEINER ET AL., 2011). Para Johnson (2002), um número cada vez maior de doenças parece estar associado com a produção de espécies reativas como fator etiológico ou como um fator que contribui para o desenvolvimento de doenças secundárias.

Outro fator importante modificado pela atividade física é o aumento na expressão de fatores neurotróficos como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e Fator de Crescimento do Nervo (NFG) (GRIESBACH, HOVDA e GOMEZ-

PINILLA, 2009). Esses fatores são de grande importância pela capacidade de promover a sobrevivência e boa função neuronal (KEMPERMANN e GAGE, 2000; KEMPERMANN, VAN PRAAG e GAGE, 2000).

Os efeitos sobre a saúde geral são bem descritos, principalmente sobre o metabolismo e sistema cardiovascular (POWELL e PAFFENBARGER, 1985; BOOTH et al., 2002). Estudos mostraram que 30-50% de todos os casos de diabetes tipo 2, doença cardíaca coronária, e muitos tipos de câncer foram impedidos por 30 minutos de exercícios de intensidade moderada em mulheres de meia idade (COLDITZ, CANNUSCIO e FRAZIER, 1997; MANSON et al., 1999; HU et al., 2001).

Os profissionais da saúde são unânimes ao enumerar os benefícios gerados pelo exercício físico regular, como fator redutor da morbidade (FRIES, 1996) e também a mortalidade (PAFFENBARGER et al., 1993).

3.1.1 Exercício físico agudo

O exercício físico regular traz benefícios para a saúde como demonstrado no item anterior, entretanto a intensidade, a duração e a frequência exercem papel chave na determinação das respostas imunológicas, podendo modular diversas enzimas, positiva ou negativamente.

O exercício quando realizado de forma aguda, praticado esporadicamente, não possui as mesmas características benéficas, podendo causar desequilíbrio em diversas funções, dentre elas aumento do estresse mecânico, aumento da temperatura corporal e taxa metabólica, além de, aumento de substâncias pró-inflamatórias e aumento na produção de EROS (POWERS, JI e LEEUWENBURGH, 1999). Esse aumento da exigência metabólica momentânea e aguda faz com que ocorra aumento do consumo de oxigênio e produção de EROS, o que pode gerar um desequilíbrio entre EROS e as defesas antioxidantes, conhecido como estresse oxidativo. Estudos *in vivo* utilizando tecidos coletados logo após o exercício demonstram taxa de produção de EROS aumentada (BEJMA e JI, 1999).

O aumento das EROS pode gerar degradação proteica e danos musculares (AOI et al., 2004), aumento dos níveis de IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa

(TNF- α) (OSTROWSKI et al., 1999; VASSILAKOPOULOS et al., 2003), estão envolvidos com o desenvolvimento de dor pós-exercício que pode levar a futura perda de desempenho (MUNEHIRO et al., 2012).

3.1.2 Exercício excêntrico

No exercício excêntrico, a contração muscular acontece quando a musculatura produz tensão em alongamento (MARUHASHI et al., 2007), como é o caso da corrida em descidas (*downhill*), a fase negativa do agachamento guiado fase negativa do leg press 45°, dentre outros movimentos. Mesmo o tecido muscular sendo dotado de alta plasticidade, adaptando-se às demandas impostas a fim de otimizar seu desempenho ocorre pequenos danos musculares (BALDWIN e HADDAD, 2002).

Atualmente as pesquisas científicas têm elucidado as características da contração excêntrica e demonstrado que esse tipo de contração tem ampla aplicação em intervenções terapêuticas, sejam estas reabilitativas ou preventivas (LASTAYO et al., 2013). Por exemplo, Maruhashi e colaboradores (2007) demonstraram que o treinamento excêntrico, corrida em *downhill* preveniu o dano muscular causado por um *set* de exercício de alta intensidade excêntrica (MARUHASHI et al., 2007).

A musculatura ao trabalhar excentricamente faz com que as fibras atuem como “amortecedores de choque”, dissipando energia ao desacelerar os segmentos corporais, ou como molas, armazenamento de energia para que este seja utilizado em uma contração subsequente (LASTAYO et al., 2003).

As particularidades do controle neural da contração muscular excêntrica podem ser observadas também no Sistema Nervoso Central onde ocorre início precoce da ativação cortical, bem como uma maior atividade cortical relacionada à preparação e execução da contração muscular excêntrica. Os autores relacionaram com a maior dificuldade de execução e maior susceptibilidade à ocorrência de lesões durante o desempenho dessa contração (FANG et al., 2001).

Apesar de alguns benefícios relacionados com a contração excêntrica, esta é conhecida também por induzir DMT, que não responde a analgésicos comuns e até

mesmo causa dano muscular (MARUHASHI et al., 2007). Além de aumentar a produção de EROS (BEST et al., 1999; CLOSE et al., 2004), ocorre aumento na expressão e concentração de marcadores inflamatórios, como TNF- α que teve aumento na concentração proteica no músculo gastrocnêmio e no vasto lateral em ratos após 2h, 6h e 24h de exercício excêntrico (LIAO et al., 2010). Além disso, é relatado aumentos da atividade da creatina kinase e carbonilação proteica (LEE et al., 2002) gerando aumento dos radicais livres e inibição da enzima Cálcio ATPase (ZAIDI e MICHAELIS, 1999).

3.2 Espécies reativas de oxigênio

O sistema de defesa antioxidante é formado pelo sistema enzimático e não enzimático. O sistema enzimático é formado pelas enzimas, superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx). Já o sistema não enzimático é formado por diversas substâncias como vitamina E (VENDITTI et al., 2014) e vitamina C (WAWRZYNIAK et al., 2013). Esses sistemas agiram contra seus intermediários reativos superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\bullet OH$), dentre outros (CATLING et al., 2005; PRYOR et al., 2006). Devido as suas propriedades, esses intermediários recebem a denominação de EROS, sendo que dessas somente o H_2O_2 não se qualifica como radical livre, porque não possui elétrons desemparelhados na última camada de valência (HALLIWELL, 2006).

As EROS são produzidas fisiologicamente através de processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (macrófagos) que utiliza o peróxido de hidrogênio para combater bactérias e outros elementos estranhos (SCHNEIDER, C e OLIVEIRA, A., 2004).

O exercício agudo é conhecido por gerar este desequilíbrio entre a produção e a eliminação de EROS, provocando aumento em alguns marcadores de dano oxidativo como é o caso da carbonilação proteica e lipoperoxidação. Esse desequilíbrio é devido ao aumento da estimulação mitocondrial da cadeia de transporte de elétrons que irá produzir o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podendo ativar diversas vias de transdução de sinalização celular,

como NF-KB, MAPK, além de regular a expressão de citosinas pro-inflamatórias como interleucina-1 e interleucina-6. Essas duas interleucinas são responsáveis por ativar a expressão gênica de TNF- α formando um círculo vicioso no aumento do sinal inflamatório e no aumento de EROS, pois a TNF- α esta relacionada com a elevação dos níveis de EROS celular e a proteólise muscular (ALLEN e TRESINI, 2000).

3.3 Dor

Segundo a IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor), a dor é descrita como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nestes termos” (LOESER e TREEDE, 2008).

Muitos autores, dentre eles (HUNT e MANTYH, 2001) descrevem a dor como um estímulo necessário à sobrevivência e à manutenção da integridade do organismo, mas quando de forma crônica pode resultar em sintomas secundários tais como ansiedade, depressão e, principalmente, a diminuição da qualidade de vida. Devido a aspectos subjetivos, a sensação denominada por nós de dor, pode ser modulada através das experiências comportamentais, de componentes sensoriais e afetivo-motivacionais, de forma que uma experiência que é dolorosa para um não obrigatoriamente será para o outro (ROMANELLI e ESPOSITO, 2004).

O termo nocicepção se refere à percepção pelo sistema nervoso central de sinais evocados pela ativação de receptores sensoriais especializados, que iniciam a sinalização ao sinal de situação crítica de um tecido, que poderá levá-lo a uma lesão. Por outro lado, a dor seria o caráter sensorial relacionado à atividade gerada em alguns pontos das vias nociceptivas, ou a memória dessa atividade. Então, quando se trata de animais o termo correto a ser utilizado é a nocicepção que está relacionado ao reconhecimento de sinais no sistema nervoso central que lhe é ativado por nociceptores (receptores sensoriais) e que fornece informações relacionadas a possíveis danos teciduais.

3.3.1 Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1

A família TRP é formada por mais de vinte produtos de diferentes genes que estão agrupados em seis famílias baseadas na sequência de aminoácidos e no seu perfil de ativação, os membros da família TRP classificam-se em TRPV (Vanilóide), TRPA (Anquirina), TRPC (Canônico), TRPM (Melastatina), TRPP (Polistina) e TRPML (Mucolipina) (Figura 1). Além disso, as regiões N- e C-terminal localizam-se intracelularmente, sendo que a região formadora do poro encontra-se entre os domínios transmembranas 5 e 6 (NILIUS, VOETS e PETERS, 2005).

Os TRPs são canais iônicos considerados excepcionais pelo fato de serem, na sua maioria, receptores polimodais, ou seja, ativam-se por muitos tipos de estímulos diferentes, como por exemplo, temperatura (calor ou frio), compostos químicos, osmolaridade, estimulação mecânica, lipídios, luminosidade, estresse oxidativo e outros. Estes receptores constituem-se integradores para uma multiplicidade de sinais externos ou internos e por isso, caracterizados como sensores celulares polimodais envolvidos em uma grande variedade de processos celulares (MORAN et al., 2011).

O potencial funcional desses canais é especialmente importante para o entendimento da patogênese de diversas doenças. Destacando o receptor de potencial transitório vanilóide subtipo 1 (TRPV1) por possuir forte relevância em uma ampla gama de patologias, comprovando deste modo, possuir excelente potencial como alvo terapêutico empregado no controle da dor (NILIUS, VOETS e PETERS, 2005; MORAN et al., 2011).

O TRPV1 é membro de uma família constituída por mais 5 receptores (TRPV2 a TRPV6) denominada família vanilóide. A ativação do TRPV1 presentes nas fibras nociceptivas conduz a um aumento na permeabilidade aos íons Ca_2^+ e Na^+ , produzindo uma despolarização das fibras sensoriais peptidérgicas. Este processo causa a liberação de neuropeptídeos como a substância P e o gene relatado da calcitonina (CGRP), os quais são responsáveis por mediar o processo de inflamação neurogênica, uma vez que conduzem a eventos como extravasamento plasmático, vasodilatação e recrutamento de leucócitos (SZALLASI et al., 2007; LOESER e TREEDE, 2008).

Existem evidências que outro receptor da família TRP, o TRPV4 contribui para estimulação de canais iônicos em fibras musculares esqueléticas (HO et al., 2012). Adicionalmente, relata-se o envolvimento do receptor TRPV1 em diversos modelos animais de inflamação associado ao desenvolvimento de hiperalgesia. Também descreve-se o aumento de TRPV1 em diversas doenças dolorosas em seres humanos como, síndrome do intestino irritável, vulvodínia e mastalgia (SZALLASI et al., 2007).

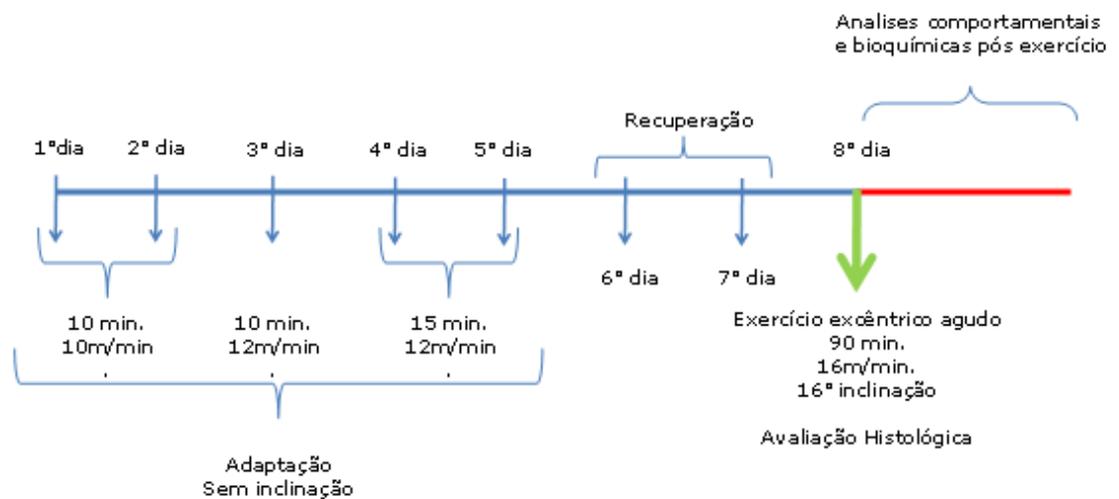
3.3.2 Dor muscular tardia

Apesar da sabida participação dos receptores TRPs na sensação de dor, pouco se sabe da participação dessa família na DMT. Sabe-se que exercícios agudos e/ ou exercícios de alta intensidade causam danos musculares, podendo gerar dor muscular horas após o exercício e não durante e nem imediatamente após. Estudos prévios têm demonstrado que a DMT é induzida principalmente por estresse mecânico, especialmente por contração muscular excêntrica (SORICHTER, PUSCHENDORF e MAIR, 1999). A sequência temporal da DMT segundo (ARMSTRONG, OGILVIE e SCHWANE, 1983a) inicia geralmente 6 -12 horas pós-exercício, ocorrendo os maiores aumentos entre 48 horas e 72 horas pós-exercício, podendo persistir por até 5 a 7 dias. Diferentes protocolos de exercício excêntrico, sejam eles de estimulação elétrica ou esteira com inclinação negativa (descida), relatam danos estruturais e infiltração de fagócitos (AOI et al., 2004; KANO et al., 2008), assim como uma redução na capacidade antioxidante total com a redução da superóxido dismutase (1 dia após exercício excêntrico) e aumento na SOD (MARUHASHI et al., 2007).

Apesar de diversos estudos demonstrarem uma ligação entre estresse oxidativo e DMT (DONNELLY, MAUGHAN e WHITING, 1990; MARUHASHI et al., 2007; MUNEHIRO et al., 2012), os mesmos não deixam claro quais os mecanismos e vias que contribuem para o aparecimento da DMT.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental



4.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, pesando de 200 a 275g, mantidos em condições laboratoriais controladas, com o controle do ciclo claro/escuro de 12-12 horas, alimentação e água *ad libitum*, além do controle de umidade relativa e temperatura (55% e $24\pm 2^{\circ}\text{C}$). Foram utilizados seis sets de animais na seguinte formatação.

1. Avaliações comportamentais.

As avaliações comportamentais consistiram de análise da alodínea mecânica e teste de força das patas dianteiras.

As avaliações bioquímicas consistiram em dois grandes grupos, sendo realizado no primeiro grupo as análises histológicas logo após o exercício excêntrico agudo e outro grande grupo foi analisado diversos marcadores bioquímicos em diferentes tempos após o exercício excêntrico agudo.

2. Danos Histológicos através da morfometria de área muscular.
3. Atividade das enzimas Superóxido dismutase, catalase e os níveis de carbonilação proteica.
4. Atividade da enzima Xantina oxidase.
5. Níveis purinérgicos de ATP, ADP, AMP e AU através do HPLC.
6. Níveis do Receptor TRPV1 através do Western Blot

4.3 Protocolo de exercício excêntrico

Os animais foram adaptados na esteira rolante sem inclinação durante cinco dias consecutivos. 1º e 2º dia com velocidade de 10m/min. durante 10 minutos, 3º dia 12 m/min. durante 10 minutos e nos últimos dois dias (4º e 5º dia) 12 m/min. durante 15 minutos. Após a adaptação os animais permaneceram em repouso por dois dias para realizarem o protocolo de exercício excêntrico agudo ou não, formando assim os grupos de estudo. Alguns animais, cerca de 30% não se adaptaram a esteira rolante e foram removidos da restante dos testes e análises.

O protocolo de exercício excêntrico agudo foi descrito anteriormente por Armstrong (ARMSTRONG, OGILVIE e SCHWANE, 1983b) e adaptado por Lima-Cabello (LIMA-CABELLO et al., 2010), constituído basicamente por 18 sets de 5 minutos de exercício, com o intervalo de 2 minutos, totalizando 90 minutos de exercício a 16m/min. de velocidade e inclinação de 16° (descida).

4.4 Alodinea mecânica

Após o exercício excêntrico agudo, outro set de animais foi colocado em compartimentos elevados de madeira (22x18x14 cm) disposto sobre uma tela metálica. Após ambientação de aproximadamente 30 minutos, a pata posterior direita foi estimulada com um filamento de nylon (filamentos de Von Frey, 15g), até que ao ser pressionado se curvasse. O toque com o filamento foi feito no centro da superfície plantar da pata dianteira e repetido dez vezes em cada animal, tendo cada

toque a duração aproximada de 1 s. O aumento da frequência de retirada da pata foi considerado como aumento da alodinea mecânica. A alodinea foi analisada em diferentes tempos para obtenção da curva de dor muscular tardia.

4.5 Avaliação funcional das patas dianteiras – teste de agarrar

Para essa avaliação foi conectado a uma balança eletrônica uma vara metálica de 2,5 mm. Ao prato da balança foi adicionado 1000g para que os ratos pegassem a barra metálica e, logo após, os animais foram segurados pela cauda e a intensidade foi aumentada progressivamente até que soltassem a barra. O valor registrado no exato momento em que soltassem a barra foi registrado (1000 - registrado).

O teste consistiu em três repetições sendo a maior performance registrada, para reduzir falsas medidas.

Essa avaliação foi adaptada de (BERTELLI e MIRA, 1993; 1995)

4.6 Análises histológicas

Para análise das alterações histológicas, um set de animais realizou o protocolo de exercício excêntrico agudo e logo após a corrida foram eutanasiados e os músculos gastrocnêmio e sóleo foram analisados. As alterações inflamatórias foram verificadas pela ruptura fibrilar, infiltração leucocitária e tumefação celular. Para análise histológica as amostras foram fixadas em formol tamponado e submetidas ao processamento clássico para inclusão em parafina. Os cortes foram seccionados com 6µm de espessura e corados pela Hematoxilina-eosina (HE). Cada lâmina foi fotografada em 5 campos aleatórios e com um *grid* de 15 pontos foram selecionadas as células musculares para morfometria de área segundo (FERREIRA et al., 2013)

4.7 Degradação das purinas

Para a determinação dos níveis de ATP, ADP, AMP e AU no músculo foi realizada por detecção HPLC -UV método modificado de Özogul et al. (2000). Resumidamente, as amostras do músculo foram homogeneizadas em 0,6 M de ácido perclórico e centrifugadas a 2400 x g a 4° C durante 10 min . A fração do sobrenadante foi neutralizado para pH 6-6,5 com 1 M de hidróxido de potássio. As frações neutralizadas foram mantidas em gelo durante 30 minutos para precipitação total de cristais de potássio e filtrada através de uma membrana (0,45 µm de tamanho de poro Millipore ®) antes da injeção para o instrumento de HPLC.

As amostras foram analisadas em um aparelho Shimadzu de HPLC ®. A coluna analítica tinha 5 mM e partículas de um tamanho de poro de 100 Å de Phenomenex ® ODS - 2 coluna C18 de fase reversa (4,6 x 250 mm , Allcrom , BR). A fase móvel foi de 0,04 M de di-hidrogeno- ortofosfato de potássio 0,06 M e ortofosfato de dipotássio hidrogênio dissolvido em água destilada e purificada ajustada ao pH 7 com 0,1 M de hidróxido de potássio . A análise por HPLC foi realizada sob condições isocráticas com um caudal de 1 mL/min com o detector de UV ajustado a 257 nm .

4.8 Atividade da enzima xantina oxidase

A atividade da enzima xantina oxidase foi adaptada a partir de (PRAJDA e WEBER, 1975). Resumidamente, o gastrocnêmio foi homogeneizado em solução tampão de fosfato (PBS 30 mM, pH 7,4) contendo (em mM): 1 de EDTA, 10 de ditioneitol, 1 fenilmetilsulfonilo. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos (4 ° C). Após a centrifugação o sedimento foi descartado e uma alíquota do sobrenadante (0,5 mg / mL) foi adicionado ao ensaio, no meio contendo xantina (0,5 mM). O meio de ensaio foi incubado a 37° C durante 1 hora e a reação foi parada por fervura durante 10 min. Logo após foi adicionado tampão ácido (ácido acético/ acetato de sódio, 80 mM, pH 5,5).

As amostras foram lidas no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 290nm. O ácido úrico foi usado como padrão de referência.

4.9 Níveis de carbonilação proteica

O Teor de proteína carbonil no músculo gastrocnêmio foi determinado pelo método descrito por (LEVINE et al., 1990). Resumidamente, os homogeneizados e alíquotas de 1 ml foram misturados com 0,2 ml de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH, 10 mM) ou 0,2 ml de HCl (2 M). Após incubação, à temperatura ambiente durante 1 h em um ambiente escuro, 0,6 ml de tampão de desnaturação (tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 6,8, contendo 3% de SDS), 2 ml de heptano (99,5%), e 2 ml de etanol (99,8 %) foram adicionados sequencialmente e misturados com agitação em vórtice durante 40 segundos e centrifugada durante 15 min. Em seguida, a proteína isolada a partir da interface foi lavada duas vezes com 1 ml de acetato de etilo / etanol 1:1 (v / v) e suspenso em 1 ml de tampão de desnaturação. As amostras foram lidas no espectrofotômetro a 370nm, sendo a carbonilação total calculada seguindo o descrito por (LEVINE et al., 1990).

4.10 Atividade da enzima superóxido dismutase

Com a finalidade de mensurar a atividade da enzima superóxido dismutase, o músculo gastrocnêmio foi adequadamente diluído com Tris-HCl a pH 7,4 (MISRA e FRIDOVICH, 1972). Resumidamente, a epinefrina é submetida a auto-oxidação a um pH de 10,2 para produzir adrenocromo, um produto colorido, que foi detectada a 480 nm. A adição de amostras (10, 20, 30 µl) contendo SOD inibe a auto-oxidação de epinefrina. A taxa de inibição foi monitorizada durante 180 s. A quantidade de enzima necessária para produzir 50% da inibição foi definida como uma unidade de atividade da enzima.

4.11 Atividade da enzima catalase

Para o ensaio da catalase (CAT), o tecido foi homogeneizado em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 2000 g durante 10 min para obter um sobrenadante que foi utilizado para o ensaio da enzima (NELSON e KIESOW, 1972). A mistura de reação continha tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7), 10 mM de H₂O₂, e 20 µl do sobrenadante. A taxa de reacção de H₂O₂ foi monitorizada a 240 nm durante 2 min à temperatura ambiente, tal como determinado no ensaio de sangue total. A atividade enzimática foi expressa em unidades de mg⁻¹ de proteína (uma unidade de enzima é considerada a quantidade de CAT que decompõe 1 mmol de H₂O₂ por min a pH 7, a 25° C).

4.12 Western Blot – Receptor Potencial transitório (TRPV1)

O conteúdo de VR1 e actina foram avaliadas por Western Blot de acordo com procedimentos normalizados. Resumidamente, uma parte do músculo gastrocnêmio foi rapidamente dissecado e homogeneizado em reagente de extração de proteína de tecido (T-PER, Thermo Scientific Pierce, produto #78510) e suplementado com coquetéis Inibidores de Protease (Roche, ref. 11697498001). Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 x g, a 4° C durante 5 minutos, e o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada utilizando o ácido bicinonínico Kit de ensaio de proteína (Thermo Scientific Pierce, produto # 23225). Uma alíquota (30 µg de proteína) do sobrenadante foi misturada com tampão de carga SDS (Bio - Rad, produto # 161-0747), com 355 mM de 2-mercaptoetanol e fervidas durante 10 min. As proteínas foram então submetidas a uma electroforese em gel de 8 % SDS - poliacrilamida e transferidos para uma membrana de nitrocelulose . As membranas foram bloqueadas com 5 % (p/v) de leite seco não gordo em solução salina tamponada com Tris contendo 0,04 % v/ v) de Tween 20 (TBS-T) durante 1h e incubou-se durante a noite a 4° C com anticorpo de cabra anti - VR1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., número de catálogo

'SC-28759) ou de cabra anti - actina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., número de catálogo SC-1616) 'leite em pó 2,5% diluído em TBS-T. As membranas foram lavadas três vezes em TBS-T e , em seguida, incubadas com anticorpos secundários. Então VR1- membrana foi incubada durante 1h com IgG de coelho biotilado anti-cabra (1:5000, Sigma - Aldrich, Inc., número de catálogo B7014) e a actina de membrana foi incubada com anti-IgG de cabra - HRP (1:25000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., número de catálogo SC-2020) em TBS-T em leite em pó 2,5 %. A membrana de VR1 foi lavada mais três vezes e incubadas durante 1 h com um polímero de estreptavidina peroxidase (1:5000, Sigma-Aldrich, Inc., número de produto S2438) em TBS-T em 2,5 % de leite seco não gordo. As membranas foram lavadas três vezes e manchas foram desenvolvidas utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, secou-se, digitalizados e quantificados com o software ImageJ (RIID: nif - 0000-30467)

4.13 Determinação de proteína

O teor de proteína foi medida colorimetricamente através do método de BRADFORD (1976) utilizando albumina de soro bovino (1 mg/ml) como padrão.

4.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA). A análise *Post Hoc* foi realizada, quando apropriado, pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Valores de *P* e *F* serão apresentados somente se $P < 0,05$. O software utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.00.

5. RESULTADOS

No presente estudo o efeito do exercício físico excêntrico no desenvolvimento da dor tardia foi verificado utilizando a técnica da alodinia mecânica. Para tanto, os animais foram adaptados a esteira rolante (sem inclinação) durante uma semana e após 48 horas de repouso foi realizado o teste de exercício físico excêntrico agudo. Cabe salientar a sensação de dor muscular foi analisada pré-adaptação, pós-adaptação em diversos tempos após o exercício físico excêntrico (1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72h) como demonstrado na figura 1.

Os resultados apresentados no estudo revelaram que não houve diferença entre os períodos pré e pós-adaptação frente ao teste de alodinia mecânica. Entretanto, o protocolo excêntrico de exercício físico aumentou da frequência de retirada da pata quando analisado 24h e 48h após o teste ($F(9,80)=2,98$; $P < 0,05$).

Considerando que aumento da dor pode gerar perda de desempenho físico como demonstrado por (KEHL e FAIRBANKS, 2003), foi analisado a produção de força utilizando-se o teste funcional de agarrar. A figura 2 mostra a redução significativa na geração de força muscular nas patas dianteiras nos tempos 3h, 12h, 48h e 72h após o exercício físico excêntrico ($F(9,81)=4,27$; $P < 0,05$) sugerindo uma possível relação entre a DMT com a perda de força.

No intuito de avaliar se o dano muscular possa estar envolvido na dor tardia e na perda de rendimento, foi analisado o dano histológico após o exercício físico excêntrico. Segundo os resultados obtidos e demonstrado na figura 3, não houve ruptura fibrilar e infiltração de neutrófilos nos músculos gastrocnêmio e sóleo. Embora se saiba que a infiltração de neutrófilos neste tipo de exercício ocorre principalmente após 72h (MARUHASHI et al., 2007) de realização do exercício, o edema celular pode ser um indicador primário de dano muscular.

Partindo do pressuposto investigar a participação da degradação das purinas na DMT, buscou-se quantificar os níveis de ATP, ADP, AMP e Ácido Úrico, contida no músculo gastrocnêmio nos grupos sedentário e pós-exercício, 12h, 24h e 48h. A análise estatística revelou que o protocolo de exercício físico excêntrico não induziu alterações significativas nos níveis de ATP no músculo gastrocnêmico quando analisado 12h, 24h e 48h após o teste. Por outro lado, o presente protocolo induziu

um aumento nos níveis de ADP ($F(3,20)=4,29$; $P<0,05$), AMP ($F(3,20)=4,72$; $P<0,05$) e Ácido Úrico ($F(3,16)=4,51$; $P<0,05$) quando analisado 12h após o término do exercício físico excêntrico (fig.4).

A análise estatística também revelou que o presente protocolo de exercício físico induziu um aumento na atividade da enzima xantina oxidase 12h pós-exercício ($F(3,20)=5,04$; $P<0,05$), demonstrando que a via de degradação das purinas e ativação da enzima xantina oxidase podem estar contribuindo para o aumento das EROS (fig. 5) ($F(3,20)=5,04$; $P<0,05$). De fato, apesar de não alterar a atividade das enzima antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) mostrado na figura 7, nossos dados experimentais revelaram que o presente protocolo aumentou o conteúdo proteína carbonil no músculo gastrocnêmio 12h após o teste demonstrado no figura 6 ($F(3,24)= 3,55$; $P <0,05$). A análise estatística também revelou que o exercício físico excêntrico causou um aumento na imunorreatividade do canal TRPV1 no tecido muscular analisado ($F(3,12)=5,84$) (fig 8).

6. DISCUSSÃO

Os resultados experimentais apresentados nesta dissertação revelaram que a o protocolo excêntrico de exercício físico em esteira aumentou a frequência de retirada da pata no teste de alodinea mecânica e diminuiu a produção da força no teste de agarrar sugerindo uma possível relação entre a dor muscular tardia com a perda de força. Esses achados corroboram os estudos que tem associado componente excêntrico nos exercícios com dores musculares tardia, prejuízo no funcionamento muscular, acarretando redução na força (SHAFAT et al., 2004; MUNEHIRO et al., 2012).

A análise histológica demonstrou que o exercício físico excêntrico não causou ruptura fibrilar e infiltração de neutrófilos no músculo gastrocnêmio e sóleo, resultado esse que ratifica os estudos que demonstram aumento da infiltração de neutrófilos neste tipo de exercício após 72 h da realização do exercício (MARUHASHI et al., 2007). Cabe salientar que a relação entre o exercício, dano muscular e os mecanismos fisiológicos responsáveis pela etiologia da dor muscular tardia ainda não são completamente conhecidos. O dano por si só pode nem sempre resultar em dor, uma vez que numerosas condições de miopatia, nas quais danos musculares são evidentes, não apresentam sinais de dor.

Devido a comprovada participação das EROS da dor muscular tardia (DONNELLY, MAUGHAN e WHITING, 1990; MARUHASHI et al., 2007; MUNEHIRO et al., 2012), outro objeto de estudo da dissertação foi a análise da via de degradação das purinas no desenvolvimento da dor muscular tardia induzida pelo exercício físico excêntrico. Cabe salientar que no processo de isquemia e reperfusão muscular em exercício físico intenso como o excêntrico ocorre um aumento do estresse oxidativo durante e após o exercício, principalmente em razão do catabolismo das purinas com o aumento do consumo de oxigênio (BLOOLMER et al., 2004). Mais especificamente, durante a isquemia tecidual, o ATP é degradado a ADP e AMP, devido à elevada demanda de energia pelo tecido muscular. Uma vez que a disponibilidade de oxigênio durante o processo isquêmico é reduzida, a AMP é continuamente degradado para hipoxantina, que é convertida a xantina e, posteriormente, a ácido úrico pela enzima xantina-oxidase, juntamente com a

redução do O_2 , produzindo radical superóxido ($\cdot O_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No momento em que o tecido é reperfundido, ou seja, durante o relaxamento muscular, o processo de redução do O_2 torna-se elevado, formando também radical hidroxila ($\cdot OH$). Desta forma, o estresse oxidativo induzido pelo aumento exacerbado das espécies reativas de oxigênio representa um dos principais mecanismos na lesão muscular induzido pelo exercício físico excêntrico (ARMSTRONG, 1984; BALNAVE e THOMPSON, 1993; SAXTON, DONNELLY e ROPER, 1994; MCBRIDE et al., 1998).

Entretanto, os resultados apresentados sugerem que a dor muscular tardia evidenciada não seja resultado de uma diminuição nos níveis de ATP, mas sim pelo acúmulo de seus metabolitos uma vez que não foram observadas alterações significativas nos níveis de ATP quando analisado 12 h, 24h e 48 h após o término do protocolo de esforço. Apesar dos níveis de ATP não serem afetados nos tempos de análise, não podemos descartar a hipótese da sua diminuição logo após o exercício tendo em vista sua alta velocidade de ressíntese, através do sistema ATP-CP, glicólise anaeróbia e o sistema que envolve o consumo de oxigênio. Grande parte da reserva de ATP depletada no músculo durante o exercício é restabelecida em poucos minutos após o exercício. A sua diminuição causaria um acúmulo de cálcio na célula muscular, devido ao não retorno do cálcio ao retículo sarcoplasmático através da Calcio ATPase, gerando a ativação de proteólises e fosfolipases, causando assim danos ao sarcolema.

Além disso, é plausível propor que parte do dano físico causado pelo aumento inicial da tensão no aparelho contrátil (estresse mecânico) possa ser seguido de um acúmulo de produtos metabólicos tóxicos (estresse metabólico). O acúmulo de ADP, AMP e Ácido Úrico quando analisado 12 horas após o término do protocolo de exercício físico excêntrico reforçam a hipótese de que a atividade do ciclo de degradação de purinas conhecido por ser considerado importante na indução de danos celulares em órgãos submetidos à isquemia seguida de reperfusão (STATHIS, CAREY e SNOW, 2005). Cabe salientar ainda que em condições aeróbias, o oxigênio suficiente assegura que o ATP seja repostado, primeiramente via fosforilação oxidativa mitocondrial, e que a hipoxantina/ xantina seja convertida para ácido úrico pela xantina desidrogenase mais do que pela xantina oxidase. Entretanto, em condições de esforço intenso a enzima xantina oxidase além de

gerar ácido úrico, representa um importante caminho para produção de espécies reativas ao oxigênio no tecido muscular (MCBRIDE et al., 1998).

De fato, nossos achados experimentais revelaram que o protocolo de exercício físico excêntrico induziu um aumento da atividade da enzima xantina oxidase e no conteúdo de proteínas carboniladas no músculo gastrocnêmico 12 horas após o término do esforço. Esses resultados podem contribuir para a hipótese de que os danos associados ao estresse oxidativo induzidos pelo exercício intenso estão relacionados com a diminuição do desempenho físico, a presença de fadiga muscular e danos musculares e até a síndrome do *overtraining* (KONIG et al., 2001), promovendo alteração do sistema imune (VIDER et al., 2001) e do estado de treinamento dos indivíduos (ALESSIO et al., 2000). Entretanto, sabe-se que a produção de radicais livres durante o exercício depende de alguns fatores, tais como frequência, intensidade e duração do exercício e do tipo de exercício executado. Além disso, a proteção do organismo frente aos efeitos deletérios da utilização do oxigênio é feita por meio de um sistema antioxidante complexo e a atividade de enzimas antioxidantes como CAT e SOD podem variar dentre os diversos músculos e até mesmo em diferentes regiões do mesmo músculo (GATE et al., 1999). Neste contexto, os resultados apresentados revelaram que o protocolo de exercício físico não alterou a atividade das enzimas SOD e catalase quando analisadas 12h, 24h e 48 h após o término do protocolo de esforço. Estes dados sugerem que o desenvolvimento do dor muscular tardia induzida pelo presente protocolo de exercício não seja resultado de uma diminuição nas defesas antioxidantes enzimáticas. Futuros estudos deverão ser realizados no intuito de investigar o real papel das defesas antioxidantes no desenvolvimento da dor muscular tardia induzida por exercício físico excêntrico.

Por fim, foi observado que o protocolo de exercício físico causou um aumento na imunorreatividade do canal TRPV1 no tecido muscular analisado 12 horas após o término do esforço. Similarmente aos demais receptores TRP, os receptores TRPV1 formam homotetrâmeros ou heterotetrâmeros funcionais, sendo que todos os monômeros contribuem para a formação do poro e seletividade do canal. A permeação de íons pelo canal é controlada alostericamente através de interações entre as diferentes subunidades e por ativação do canal na região interna do segmento transmembrana (SZALLASI et al., 2007; JARA-OSQUERA, SIMON e ROSENBAUM, 2008; SCHUMACHER, 2010). Dentre os diversos ligantes

endogénos dos receptores TRPV1 estão as EROS (YOSHIDA et al., 2006; MIYAMOTO et al., 2009). Recentes achados experimentais tem evidenciado que estímulos externos, tais como a capsaicina (agonista TRPV1) ou altas temperaturas, ativam canais TRPV1 localizados no retículo sarcoplasmático de células musculares (LOTTEAU et al., 2013). A ativação destes canais são fisiologicamente relevantes, pois o acúmulo de Ca^{2+} intracelular causado pela ativação dos mesmos pode levar a uma disfunção da célula muscular durante a atividade física.

Desta forma, considerando que a ativação dos receptores TRPV1 levam ao aparecimento da dor muscular tardia (SZALLASI et al., 2007) é possível propor que a produção de espécies reativas via degradação da rota das purinas, bem como o aumento na expressão de receptores TRPV1 sejam eventos sinérgicos que precedam o aparecimento dor muscular tardia (AVERY et al., 2003). De fato, a ativação da rota de degradação de purinas bem como o aumento da atividade da enzima xantina oxidase, do conteúdo de proteínas carbólicas e da expressão dos receptores TRPV1 foi observada antes do aparecimento da dor e da diminuição da força neste protocolo de exercício.

7. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que o protocolo mesmo sem gerar dano tecidual causou redução de força e dor muscular tardia, além de deixar claro a participação purinérgica na ativação dos receptores TRPV 1 através do aumento da carbonilação protéica, aumento da atividade da xantina oxidase e do aumento dos níveis de purina de ATP, AMP e ácido úrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSIO, H. M. et al. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 9, p. 1576-1581, Sep 2000.

ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 3, p. 463-499, Feb 1 2000.

AOI, W. et al. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 4, p. 480-487, Aug 15 2004.

ARIDA, R. M. et al. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Res**, v. 37, n. 1, p. 45-52, Oct 1999.

ARMSTRONG, R. B. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 16, n. 6, p. 529-538, Dec 1984.

ARMSTRONG, R. B.; OGILVIE, R. W.; SCHWANE, J. A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 54, n. 1, p. 80-93, Jan 1983a.

AVERY, N. G. et al. Effects of vitamin E supplementation on recovery from repeated bouts of resistance exercise. **J Strength Cond Res**, v. 17, n. 4, p. 801-809, Nov 2003.

BALDWIN, K. M.; HADDAD, F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 81, n. 11 Suppl, p. S40-51, Nov 2002.

BALNAVE, C. D.; THOMPSON, M. W. Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage. **J Appl Physiol (1985)**, v. 75, n. 4, p. 1545-1551, Oct 1993.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, Oct 16 2009.

BEJMA, J.; JI, L. L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 87, n. 1, p. 465-470, Jul 1999.

BELLINGER, B. M. et al. Oral creatine supplementation decreases plasma markers of adenine nucleotide degradation during a 1-h cycle test. **Acta Physiol Scand**, v. 170, n. 3, p. 217-224, Nov 2000.

BENEDETTI, M. G. et al. Treadmill exercise in early multiple sclerosis: a case series study. **Eur J Phys Rehabil Med**, v. 45, n. 1, p. 53-59, Mar 2009.

BERTELLI, J. A.; MIRA, J. C. Behavioral evaluating methods in the objective clinical assessment of motor function after experimental brachial plexus reconstruction in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 46, n. 3, p. 203-208, Mar 1993.

_____. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 58, n. 1-2, p. 151-155, May 1995.

BEST, T. M. et al. Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. **J Appl Physiol (1985)**, v. 87, n. 1, p. 74-82, Jul 1999.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. **J Appl Physiol (1985)**, v. 93, n. 1, p. 3-30, Jul 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, May 7 1976.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther**, v. 106, n. 2, p. 179-208, May 2005.

CATLING, D. C. et al. Why O₂ is required by complex life on habitable planets and the concept of planetary "oxygenation time". **Astrobiology**, v. 5, n. 3, p. 415-438, Jun 2005.

CHEN, T. C. et al. Comparison in eccentric exercise-induced muscle damage among four limb muscles. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 2, p. 211-223, Feb 2011.

CHEUNG, K.; HUME, P.; MAXWELL, L. Delayed onset muscle soreness : treatment strategies and performance factors. **Sports Med**, v. 33, n. 2, p. 145-164, 2003.

CHEVION, S. et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 9, p. 5119-5123, Apr 29 2003.

CLEAK, M. J.; ESTON, R. G. Delayed onset muscle soreness: mechanisms and management. **J Sports Sci**, v. 10, n. 4, p. 325-341, Aug 1992.

CLOSE, G. L. et al. Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. **Eur J Appl Physiol**, v. 91, n. 5-6, p. 615-621, May 2004.

COLDITZ, G. A.; CANNUSCIO, C. C.; FRAZIER, A. L. Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention. **Cancer Causes Control**, v. 8, n. 4, p. 649-667, Jul 1997.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 295-301, Jun 2002.

CROSIER, P. S. et al. The Dtk receptor tyrosine kinase, which binds protein S, is expressed during hematopoiesis. **Exp Hematol**, v. 24, n. 2, p. 318-323, Feb 1996.

DONNELLY, A. E.; MAUGHAN, R. J.; WHITING, P. H. Effects of ibuprofen on exercise-induced muscle soreness and indices of muscle damage. **Br J Sports Med**, v. 24, n. 3, p. 191-195, Sep 1990.

FANG, Y. et al. Greater movement-related cortical potential during human eccentric versus concentric muscle contractions. **J Neurophysiol**, v. 86, n. 4, p. 1764-1772, Oct 2001.

FERREIRA, A. P. et al. HOE-140, an antagonist of B2 receptor, protects against memory deficits and brain damage induced by moderate lateral fluid percussion injury in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, Nov 8 2013.

FRIES, J. F. Physical activity, the compression of morbidity, and the health of the elderly. **J R Soc Med**, v. 89, n. 2, p. 64-68, Feb 1996.

GATE, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed Pharmacother**, v. 53, n. 4, p. 169-180, May 1999.

GRIESBACH, G. S.; HOVDA, D. A.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. **Brain Res**, v. 1288, p. 105-115, Sep 8 2009.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, Jun 2006.

HO, T. C. et al. Evidence TRPV4 contributes to mechanosensitive ion channels in mouse skeletal muscle fibers. **Channels (Austin)**, v. 6, n. 4, p. 246-254, Jul-Aug 2012.

HU, F. B. et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. **N Engl J Med**, v. 345, n. 11, p. 790-797, Sep 13 2001.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 2, p. 83-91, Feb 2001.

JARA-OSEGUERA, A.; SIMON, S. A.; ROSENBAUM, T. TRPV1: on the road to pain relief. **Curr Mol Pharmacol**, v. 1, n. 3, p. 255-269, Nov 2008.

JI, L. L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 222, n. 3, p. 283-292, Dec 1999.

JOHNSON, P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 133, n. 4, p. 493-505, Dec 2002.

KANO, Y. et al. Histological skeletal muscle damage and surface EMG relationships following eccentric contractions. **J Physiol Sci**, v. 58, n. 5, p. 349-355, Oct 2008.

KEHL, L. J.; FAIRBANKS, C. A. Experimental animal models of muscle pain and analgesia. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 31, n. 4, p. 188-194, Oct 2003.

KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Novartis Found Symp**, v. 231, p. 220-235; discussion 235-241, 302-226, 2000.

KEMPERMANN, G.; VAN PRAAG, H.; GAGE, F. H. Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. **Prog Brain Res**, v. 127, p. 35-48, 2000.

KOHL, Z. et al. Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Brain Res**, v. 1155, p. 24-33, Jun 25 2007.

KONIG, D. et al. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. **Exerc Immunol Rev**, v. 7, p. 108-133, 2001.

KRAMER, A. F. et al. Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 418-419, Jul 29 1999.

KRAMER, M.; HIEMKE, C.; FUCHS, E. Chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in tree shrews: time-dependent behavioral and endocrine effects. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 7, p. 937-947, Nov 1999.

LASTAYO, P. et al. Eccentric Exercise in Rehabilitation: Safety, Feasibility and Application. **J Appl Physiol (1985)**, Jul 3 2013.

LASTAYO, P. C. et al. Eccentric muscle contractions: their contribution to injury, prevention, rehabilitation, and sport. **J Orthop Sports Phys Ther**, v. 33, n. 10, p. 557-571, Oct 2003.

LAURIN, D. et al. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Arch Neurol**, v. 58, n. 3, p. 498-504, Mar 2001.

LEE, J. et al. Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34, n. 3, p. 443-448, Mar 2002.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LI, J. L. et al. Effects of fatigue and training on sarcoplasmic reticulum Ca(2+) regulation in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 92, n. 3, p. 912-922, Mar 2002.

LIAO, P. et al. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor-alpha. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 3, p. R599-607, Mar 2010.

LIMA-CABELLO, E. et al. Eccentric exercise induces nitric oxide synthase expression through nuclear factor-kappaB modulation in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 108, n. 3, p. 575-583, Mar 2010.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, Jul 31 2008.

LOTTEAU, S. et al. Characterization of functional TRPV1 channels in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58673, 2013.

MANSON, J. E. et al. A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women. **N Engl J Med**, v. 341, n. 9, p. 650-658, Aug 26 1999.

MARUHASHI, Y. et al. ROS scavenging activity and muscle damage prevention in eccentric exercise in rats. **J Physiol Sci**, v. 57, n. 4, p. 211-216, Aug 2007.

MCBRIDE, J. M. et al. Effect of resistance exercise on free radical production. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 1, p. 67-72, Jan 1998.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The purification and properties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. **J Biol Chem**, v. 247, n. 11, p. 3410-3414, Jun 10 1972.

MIYAMOTO, T. et al. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7596, 2009.

MORAN, M. M. et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 8, p. 601-620, Aug 2011.

MUNEHIRO, T. et al. Establishment of an animal model for delayed-onset muscle soreness after high-intensity eccentric exercise and its application for investigating the efficacy of low-load eccentric training. **J Orthop Sci**, v. 17, n. 3, p. 244-252, May 2012.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Anal Biochem**, v. 49, n. 2, p. 474-478, Oct 1972.

NILIUS, B.; VOETS, T.; PETERS, J. TRP channels in disease. **Sci STKE**, v. 2005, n. 295, p. re8, Aug 2 2005.

OSTROWSKI, K. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol**, v. 515 (Pt 1), p. 287-291, Feb 15 1999.

PAFFENBARGER, R. S., JR. et al. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. **N Engl J Med**, v. 328, n. 8, p. 538-545, Feb 25 1993.

POWELL, K. E.; PAFFENBARGER, R. S., JR. Workshop on Epidemiologic and Public Health Aspects of Physical Activity and Exercise: a summary. **Public Health Rep**, v. 100, n. 2, p. 118-126, Mar-Apr 1985.

POWERS, S. K.; JI, L. L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, n. 7, p. 987-997, Jul 1999.

PRAJDA, N.; WEBER, G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. **FEBS Lett**, v. 59, n. 2, p. 245-249, Nov 15 1975.

PRYOR, W. A. et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 3, p. R491-511, Sep 2006.

RAMBO, L. M. et al. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. **Neurochem Int**, v. 55, n. 5, p. 333-340, Sep 2009.

RODRIGUES-FILHO, R. et al. Avulsion injury of the rat brachial plexus triggers hyperalgesia and allodynia in the hindpaws: a new model for the study of neuropathic pain. **Brain Res**, v. 982, n. 2, p. 186-194, Aug 29 2003.

ROMANELLI, P.; ESPOSITO, V. The functional anatomy of neuropathic pain. **Neurosurg Clin N Am**, v. 15, n. 3, p. 257-268, Jul 2004.

SAXTON, J. M.; DONNELLY, A. E.; ROPER, H. P. Indices of free-radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 68, n. 3, p. 189-193, 1994.

SCHUMACHER, M. A. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. **Pain Pract**, v. 10, n. 3, p. 185-200, May-Jun 2010.

SHAFAT, A. et al. Effects of dietary supplementation with vitamins C and E on muscle function during and after eccentric contractions in humans. **Eur J Appl Physiol**, v. 93, n. 1-2, p. 196-202, Oct 2004.

SLUKA, K. A.; RASMUSSEN, L. A. Fatiguing exercise enhances hyperalgesia to muscle inflammation. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 188-197, Feb 2010.

SONG, W. H.; TANG, C. F.; LIU, W. F. [The effects of eccentric exercise on the skeletal muscle apoptosis and proliferation in rats]. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**, v. 29, n. 1, p. 86-90, Jan 2013.

SORICHTER, S.; PUSCHENDORF, B.; MAIR, J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. **Exerc Immunol Rev**, v. 5, p. 5-21, 1999.

STATHIS, C. G.; CAREY, M. F.; SNOW, R. J. The influence of allopurinol on urinary purine loss after repeated sprint exercise in man. **Metabolism**, v. 54, n. 10, p. 1269-1275, Oct 2005.

STEINER, J. L. et al. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. **J Appl Physiol**, v. 111, n. 4, p. 1066-1071, Oct 2011.

SZALLASI, A. et al. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 5, p. 357-372, May 2007.

TILLERSON, J. L. et al. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 899-911, 2003.

VASSILAKOPOULOS, T. et al. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. **J Appl Physiol**, v. 94, n. 3, p. 1025-1032, Mar 2003.

VENDITTI, P. et al. Effect of training and vitamin E administration on rat liver oxidative metabolism. **Free Radic Res**, v. 48, n. 3, p. 322-332, Mar 2014.

VIDER, J. et al. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. **Pathophysiology**, v. 7, n. 4, p. 263-270, Mar 2001.

WAWRZYNIAK, A. et al. alpha-Tocopherol, ascorbic acid, and beta-carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress. **Nutr Res**, v. 33, n. 10, p. 868-875, Oct 2013.

WILLIAMS, M. A. et al. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. **Circulation**, v. 116, n. 5, p. 572-584, Jul 31 2007.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3742-3744, Nov 2010.

YOSHIDA, T. et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. **Nat Chem Biol**, v. 2, n. 11, p. 596-607, Nov 2006.

ZAIDI, A.; MICHAELIS, M. L. Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 7-8, p. 810-821, Oct 1999.

ANEXOS

ANEXO A – Figura 1 - Alodínea mecânica

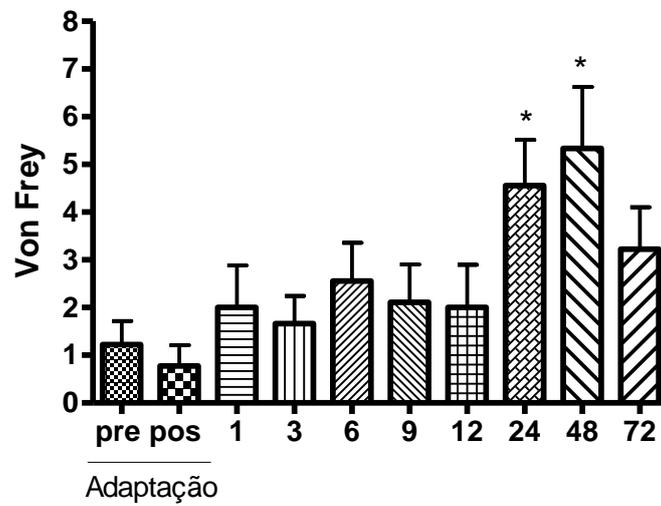


Figura 1: Efeito do exercício excêntrico agudo na alodínea mecânica ao longo do tempo. Os dados representam a média e erro padrão. Foi utilizada ANOVA de uma via para medida repetida e post hoc Student-Newman-Keuls * = $p < 0,05$ em relação ao controle.

ANEXO B – Figura 2- Teste funcional de agarrar

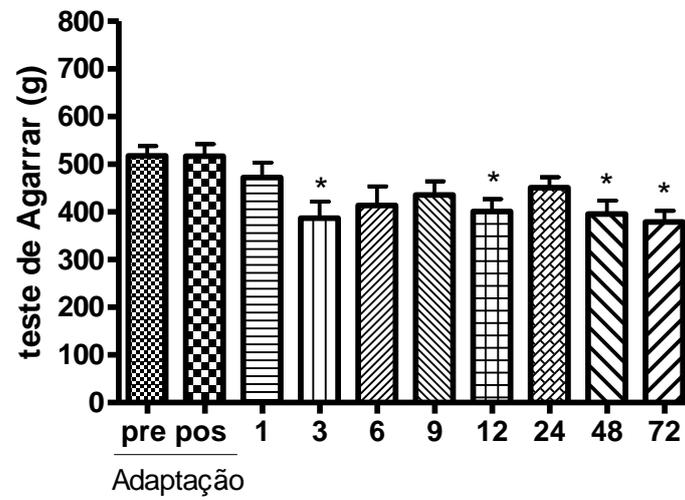


Figura 2: Efeito do exercício excêntrico agudo no teste funcional de agarrar ao longo do tempo. Os dados representam a média e erro padrão. Foi utilizada ANOVA de uma via para medida repetida e post hoc Student-Newman-Keuls * = $p \leq 0,05$ em relação ao controle.

ANEXO C – Figura 3- Avaliação histológica

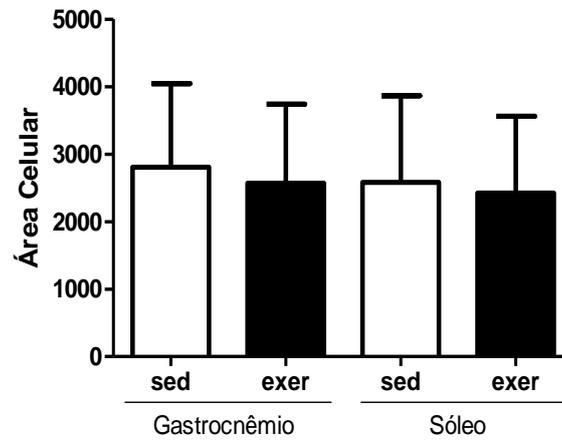


Figura 3: Efeito do exercício excêntrico agudo na avaliação histológica de dano muscular. Os dados representam a média e desvio padrão. Foi utilizada ANOVA de uma via.

ANEXO D – Figura 4- Degradação de purinas

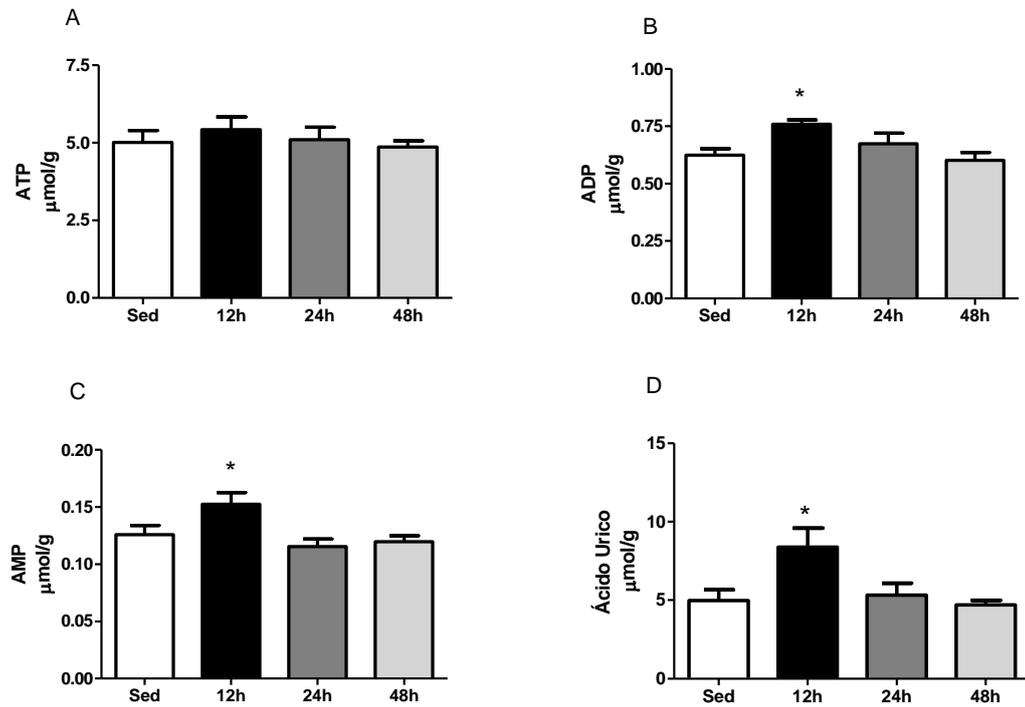


Figura 4: Efeito do exercício excêntrico agudo sobre os níveis de A) Adenosina Trifosfato, B) Adenosina Difosfato, C) Adenosina Monofosfato e em D) Ácido Úrico determinados via HPLC. Os dados representam a média e erro padrão. Foi utilizada ANOVA de uma via e post hoc Student-Newman-Keuls * = $p < 0,05$ em relação ao controle.

ANEXO E – Figura 5- Atividade da xantina oxidase

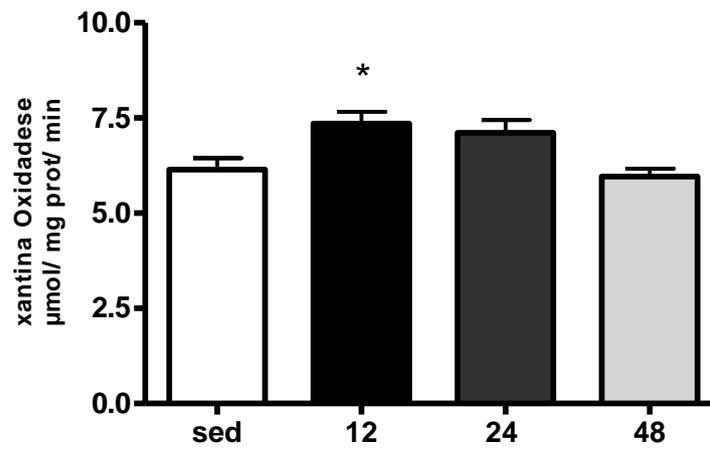


Figura 5: Efeito do exercício excêntrico agudo na atividade da enzima xantina oxidase. Os dados representam a média e erro padrão. Foi utilizada ANOVA de uma via e post hoc Student-Newman-Keuls * = $p < 0,05$ em relação ao controle.

ANEXO F – Figura 6- Conteúdo de carbonilação proteica

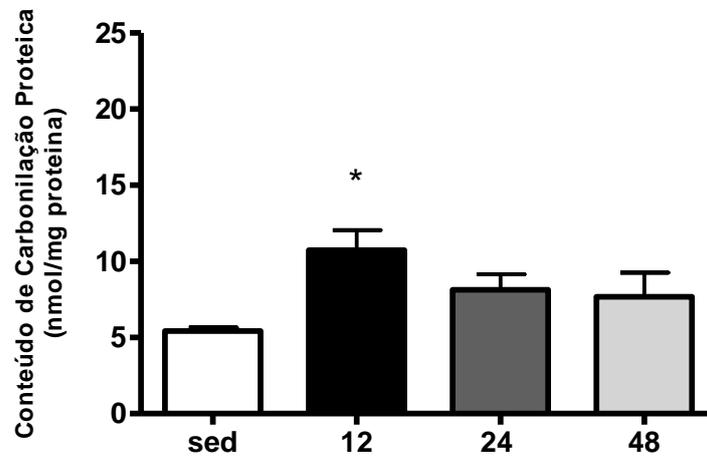


Figura 6: Efeito do exercício excêntrico agudo no conteúdo de carbonilação proteica. Os dados representam a média e erro padrão. Foi utilizada ANOVA de uma via e post hoc Student-Newman-Keuls * = $p < 0,05$ em relação ao controle.

ANEXO G – Figura 7- Ativ. das enzimas superóxido dismutase e catalase

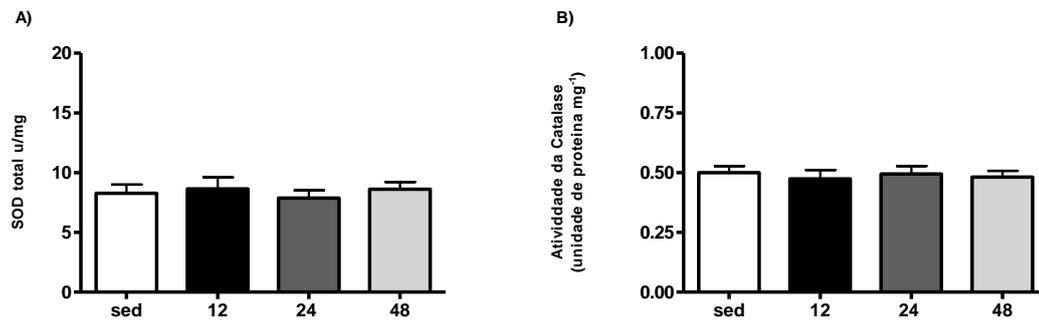


Figura 7: Efeito do exercício excêntrico agudo na A) atividade da superóxido dismutase e em B) atividade da Catalase. Os dados representam a média e erro padrão. Foi utilizada ANOVA de uma via.

ANEXO H – Figura 8- Imunorreatividade de receptor TPRV1

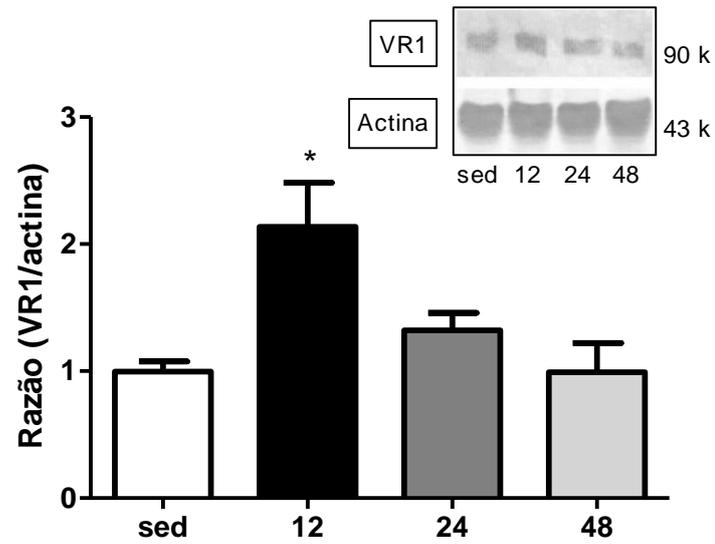


Figura 8: Efeito do exercício excêntrico agudo na imunoreatividade por Western Blot de VR1. Os dados representam a média e erro padrão da razão entre VR1 e actina e acima a imagem representativa. Foi utilizada ANOVA de uma via e post hoc Student-Newman-Keuls * = $p < 0,05$ em relação ao controle.