



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

LARISSA RESENDE OLIVEIRA

**EFEITOS DA ATIVIDADE FÍSICA REGULAR NO MODELO ANIMAL DE DOR
MUSCULAR CRÔNICA DIFUSA E NA ATIVAÇÃO DE NEURÔNIOS CORTICAIS
E DA AMIGDALA EM CAMUNDONGOS**

SÃO CRISTÓVÃO

2017

LARISSA RESENDE OLIVEIRA

**EFEITOS DA ATIVIDADE FÍSICA REGULAR NO MODELO ANIMAL DE DOR
MUSCULAR CRÔNICA DIFUSA E NA ATIVAÇÃO DE NEURÔNIOS CORTICAIS
E DA AMIGDALA EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutora
em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josimari Melo de Santana

SÃO CRISTÓVÃO

2017

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48e	Oliveira, Larissa Resende Efeitos da atividade física regular no modelo animal de dor muscular crônica difusa e na ativação de neurônios corticais e da amígdala em camundongos / Larissa Resende Oliveira ; orientadora Josimari Melo de Santana. – São Cristóvão, 2017. 44 f. : il. Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2017. 1. Fibromialgia. 2. Dor crônica. 3. Hiperalgesia. 4. Córtex cerebral. 5. Exercícios físicos. I. Santana, Josimari Melo de, orient. II. Título. CDU 616.8-009.621:796
------	--

LARISSA RESENDE OLIVEIRA

**EFEITOS DA ATIVIDADE FÍSICA REGULAR NO MODELO ANIMAL DE DOR
MUSCULAR CRÔNICA DIFUSA E NA ATIVAÇÃO DE NEURÔNIOS CORTICAIS
EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutora
em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Josimari Melo de Santana

Presidente da banca: Profa. Dra. Josimari Melo de Santana

2º Examinador: Prof. Dr. Abrahão Fontes Baptista

3º Examinador: Prof. Dr. Luis Felipe Souza da Silva

4º Examinador: Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho

5º Examinador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo, companheiro de todas as horas, pelo apoio incondicional e constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me conceder saúde e discernimento para correr atrás de meus sonhos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Josimari Melo de Santana, pela parceria e amizade que já cursam oito anos!!! Além de mentora, uma mãe-científica. Sua paixão pela ciência e sua dedicação foram grandes lições e inspirações durante minha vida acadêmica e pessoal. É indescritível a admiração, respeito e, acima de tudo, carinho que tenho por você. Agradeço por toda a paciência e colaboração ao longo dos anos, em especial durante o doutorado.

À minha coorientadora, Kathleen, por ter proporcionado uma experiência de vida e de aprendizado singular, com grande contribuição para este trabalho.

A meu primeiro orientador, Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho, por ter sido uma influência decisiva para o meu ingresso no mundo da pós-graduação. Obrigada por ser inspiração de trabalho, dedicação e sabedoria. E por sempre dar aquele “empurrãozinho” para eu poder enfrentar os desafios acadêmicos.

Aos professores do PROCFIS, por todos os ensinamentos e conhecimento ao longo desses seis anos, que inspiram o amor à fisiologia. Obrigada por fazerem acontecer esse programa e por toda a dedicação para que se mantenha no seu melhor, mesmo frente às dificuldades.

Ao pessoal da secretaria do PROCFIS, em especial a Renivan, por toda a atenção, sempre muito educado e solícito para ajudar a qualquer hora. Obrigada pelas divertidas conversas (ainda que recheadas de boas e más notícias).

Aos amigos de pós-graduação, obrigado por dividirem comigo tantas alegrias, conhecimentos e, claro, experimentos, fazendo com que toda a travessia fosse mais leve e prazerosa. Em especial a Lívia, Patrícia, Renan, Michel, e também aqueles que seguem comigo desde o início: Vítor, Fabrício, Kamilla Cruz e Elisama.

À família Lapene, que já levo para o resto da vida por ter sido a minha segunda casa nos últimos anos. Muito obrigada pelas parcerias, cooperação e, principalmente, pela amizade firmada. Foram (e continuam a ser) muitos encontros, discussões científicas (e outras não tão científicas rsrs). Um agradecimento especial a Nanda, Lucas, Belinha, Thiago, Solano, Sílvia, Paulinha, Simone e Camila.

Aos amigos do Sluka lab, Lynn, Sandra, e Jing (muchacha rsrs), Ericka, Shin e Reshma. Obrigada pelos ensinamentos e por toda paciência.

Aos amigos de Iowa City, Abby, Vica, Serena, Maria Cláudia, Cláudio, Bruno, por me receberem tão bem, por todo apoio que me deram, e todos os momentos inesquecíveis.

Aos meus tios, especialmente tia Marli, tia Geilda, e tia Natália, que são como uma segunda mãe sempre me apoiando. E também à minha cunhada Camila, que me recebe sempre com um sorriso e está sempre disposta a me ajudar. Amo vocês. Me desculpem pela ausência, muito obrigado por tudo!

Aos meus pais e meu irmão. A família é a primeira universidade da vida e são eles os maiores responsáveis por ter me tornado quem sou. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui. Obrigada pelo amor de vocês. Amo vocês imensuravelmente.

Ao meu esposo, Fernando, que está comigo desde o início dessa trajetória na pós-graduação. Por todo apoio e amor incondicional, por não medir esforços para estar comigo, incentivando a realização desse trabalho (e sonho) mesmo à distância, suportando a saudade, e meus momentos de estresse, dúvidas e dificuldades, para celebrar comigo minhas vitórias. Te amo!

A CAPES, por ter viabilizado os recursos que fizeram possível a execução deste trabalho.

Aos animais que, como parte do processo da pesquisa, contribuem com o desenvolvimento de evidências científicas para a melhoria da vida dos seres humanos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram, incentivaram e me apoiaram neste projeto.

Muito obrigada!!

RESUMO

Efeitos da atividade física regular no modelo animal de dor muscular crônica difusa e na ativação de neurônios corticais e da amígdala em camundongos. Larissa Resende Oliveira, São Cristóvão, 2017.

A dor muscular crônica difusa (DMCD) é um problema de saúde pública com alto ônus social e econômico e parece estar relacionada com alterações do funcionamento de áreas corticais do sistema nervoso central. A atividade física, se praticada regularmente, pode beneficiar pessoas com DMCD, e possivelmente prevenir o desenvolvimento desta. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da atividade física regular no tratamento e na prevenção da hiperalgesia no modelo animal de DMCD, bem como na expressão de neurônios corticais. Setenta e nove camundongos machos e fêmeas da espécie C57BL/6 (25-30 g) ficaram alocados separadamente em caixas com livre acesso à roda de corrida, água e comida (animais fisicamente ativos) ou somente com água e comida (animais sedentários). Para indução da DMCD, os animais receberam duas injeções intramusculares de solução salina pH 4,0. Foi avaliada a hiperalgesia mecânica primária no músculo gastrocnêmio (Tweezer) e secundária, na pata (filamentos de von Frey). O delineamento experimental foi dividido em quatro protocolos, com seus respectivos grupos: 1) 2 semanas de atividade física após indução da hiperalgesia, com os grupos de animais fisicamente ativos (AFT) (n=8) e sedentários (SDT) (n=8); 2) 2 semanas de atividade física após indução da hiperalgesia + exercício adicional, com o grupo de animais fisicamente ativos (AFT+EA) (n=8) e animais sedentários (SDT+EA) (n=8); 3) 2 semanas de atividade física antes da indução da hiperalgesia, com o grupo de animais saudáveis e fisicamente ativos (AFP2) (n=7) e o grupo saudáveis e sedentários (SDP2) (n=7) e 4) 4 semanas de atividade física antes da indução da hiperalgesia, com o grupo saudáveis e fisicamente ativos (AFP4) (n=14) e saudáveis e sedentários (SDP4) (n=14). Os testes comportamentais foram realizados nos seguintes tempos: antes e após indução da hiperalgesia, e após 48 h, 96 h, 1 semana e 2 semanas de exercício (para os protocolos 1 e 2) e antes e depois de 2 ou 4 semanas de exercício, e durante 1 semana pós-exercício (para os protocolos 3 e 4). Para avaliar os mecanismos de ação do exercício na prevenção da hiperalgesia, foi realizada dupla imunofluorescência para proteína ligante ao elemento de resposta ao cAMP (CREB) e CREB fosforilado (pCREB), para marcação de neurônios nas seguintes áreas cerebrais: córtex cingulado anterior (CCA), córtex insular (CI), e amígdala (ACe). Os resultados mostraram que 2 semanas de atividade física voluntária ou 2 semanas de atividade física voluntária + exercício adicional não reverteram a hiperalgesia primária e secundária em modelo de DMCD. Porém, 2 ou 4 semanas de atividade física voluntária preveniu significativamente o aumento das respostas da pata (hiperalgesia secundária) bilateralmente ($p<0,05$) nos animais dos grupos AFP2 e AFP4, e manteve esta resposta por até 4 (AFP2) ou 5 dias (AFP4) após a indução do modelo ($p<0,05$), comparado com os grupos (SDP2) e (SDP4), respectivamente. Ademais, foi observado um número de neurônios marcados positivamente para CREB e pCREB significativamente menor no grupo AFP4, quando comparado ao grupo SDP4, nas seguintes áreas capturadas: CCA ($p<0,0001$), CI ($p<0,0001$), e ACe ($p=0,0007$). Nossos achados indicam que atividade física de curta duração não é efetiva no tratamento da DMCD. Porém, atividade física regular é efetiva para prevenir o aumento da hiperalgesia, mostrando que a inatividade física é um fator de risco para o desenvolvimento da mesma e, ainda, que mudanças na atividade de neurônios corticais sensoriais podem ser, pelo menos em parte, responsáveis por essas respostas.

Descritores: fibromialgia, dor crônica, hiperalgesia, exercício, córtex cerebral.

ABSTRACT

Effects of regular physical activity on animal model of chronic muscle widespread pain (CMWP) and on activation of cortical neurons in mice. Larissa Resende Oliveira, São Cristóvão, 2017.

Chronic muscle widespread pain (CMWP) is a public health problem with high social and economic burden and appears to be related with changes in the functioning of cortical areas of the central nervous system. Physical activity, if practiced regularly, can benefit people with CMWP, and possibly prevent its development. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of regular physical activity on the treatment and prevention of hyperalgesia on an animal model of CMWP as well as on the expression of cortical neurons. Seventy-nine male and female C57BL/6 mice (25-30 g) were housed separately in their home cages with free access to the running wheel, water and food (physically active animals) or only with water and food (sedentary animals). For induction of CMWP, animals received two intramuscular injections of pH 4.0 saline solution. We tested the mechanical hyperalgesia of the gastrocnemius muscle (Tweezer), and of the paw (von Frey filaments). The experimental design was divided into 4 protocols, with their respective groups: 1) 2 weeks of physical activity after induction of hyperalgesia, with groups of physically active animals (n = 8) and sedentary animals (n = 8); 2) 2 weeks of physical activity prior to induction of hyperalgesia, with healthy and physically active animals (AFP2) (n = 8) and the healthy and sedentary group (SDP2) (n = 8); 3) 2 weeks of physical activity after induction of hyperalgesia + additional exercise, with the group of animals physically active (AFT + EA) (n = 8) and sedentary animals (SDT + EA) (n = 8) and 4 weeks of physical activity before the induction of hyperalgesia, with the healthy and physically active group (AFP4) (n = 14) and healthy and sedentary (SDP4) (n = 14). Behavioral tests were performed at the following times: before and after induction of hyperalgesia, and after 48h, 96h, 1 week and 2 weeks of exercise (for protocols 1 and 2) and before and after 2 or 4 weeks of exercise, and during 1 week post exercise (for protocols 3 and 4). In order to evaluate the mechanisms of action of the exercise in the prevention of hyperalgesia, double immunofluorescence for cAMP (CREB) and phosphorylated CREB response element (pCREB) was used to label neurons in the following cerebral areas: anterior cingulate cortex, insular cortex (IC), and central amygdala (ACe). The results showed that 2 weeks of voluntary physical activity or 2 weeks of voluntary physical activity + additional exercise did not revert the primary or secondary hyperalgesia of the CMWP model. However, 2 or 4 weeks of voluntary physical activity significantly prevented the increase of paw responses (bilateral hyperalgesia) bilaterally ($p < 0.05$) in the animals of the AFP2 and AFP4 groups, and maintained this response by up to 4 (AFP2) or 5 Day (AFP4) after model induction ($p < 0.05$), compared to the groups (SDP2) and (SDP4), respectively. In addition, a number of neurons were positively labeled for CREB and pCREB significantly lower in the AFP4 group when compared to the SDP4 group, in the following captured areas: CCA ($p < 0.0001$), CI ($p < 0.0001$), and ACe ($p = 0.0007$). Our findings indicate that short-term physical activity is not effective in the treatment of CMWP. However, regular physical activity is effective to prevent the increase of hyperalgesia, showing that physical inactivity is a risk factor for its development, and that changes in the sensory cortical neurons activity may be, at least in part, responsible for these results.

Key words: fibromyalgia, chronic pain, hyperalgesia, exercise, cerebral cortex.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1- Tweezer utilizado para mensuração da sensibilidade muscular	17
Figura 2- Mensuração da sensibilidade cutânea da pata com filamento de von Frey.....	18
Figura 3- Delineamento experimental do protocolo 1: duas semanas de atividade física após indução da hiperalgesia.....	20
Figura 4- Delineamento experimental do protocolo 2: duas semanas de atividade física antes da indução da hiperalgesia.....	21
Figura 5- Delineamento experimental do protocolo 3: duas semanas de atividade física mais exercício adicional após indução da hiperalgesia.....	22
Figura 6- Delineamento experimental do protocolo 4: quatro semanas de atividade física antes da indução da hiperalgesia.....	22
Figura 7- Resposta comportamental da sensibilidade mecânica da pata e limiar de retirada do músculo do protocolo 1.....	25
Figura 8- Resposta comportamental da sensibilidade mecânica da pata e limiar de retirada do músculo do protocolo 2.....	26
Figura 9- Resposta comportamental da sensibilidade mecânica da pata e limiar de retirada do músculo do protocolo 3.....	27
Figura 10-. Resposta comportamental da sensibilidade mecânica da pata e limiar de retirada do músculo do protocolo 4.....	28
Tabela 1- Diferenças sexuais no desenvolvimento da DMCD e na atividade física.....	29
Figura 11- Diferença no volume de atividade física dos diferentes protocolos.....	30
Figura 12- Diferença sexuais no volume de atividade física.....	31
Figura 13- Número de neurônios marcados para CREB e pCREB em dupla-imunofluorescência.....	32
...	
Figura 14- Fotomicrografias de imunofluorescência de células neuronais marcadas com CREB e pCREB.	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACe	Amígdala Central
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AF	Atividade física
AFR	Atividade física regular
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ASIC	Canais de íons sensíveis a ácido
CCA	Córtex Cingulado Anterior
CFA	Adjuvante de Freund Completo
CI	Córtex Insular
CPF	Córtex Pré-frontal
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
DMCD	Dor muscular crônica difusa
EPM	Erro Padrão da Média
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
FM	Fibromialgia
fMRI	Imagem de Ressonância Magnética Funcional
M1	Macrófago classicamente ativado
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PBS	Tampão fosfato-salina
pCREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc fosforilada
PKA	Proteína quinase A
RVM	Bulbo Rostral Ventromedial
S1	Córtex Somatosensorial 1
S2	Córtex Somatosensorial 2
SC	Sensibilização Central
SNC	Sistema Nervoso Central
TNFα	Fator de necrose tumoral
UFS	Universidade Federal de Sergipe

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 Dor Crônica Generalizada.....	04
2.1.1 Fibromialgia.....	04
2.1.2 Dor crônica e córtex cerebral.....	06
2.1.3 Modelo animal de dor muscular crônica difusa.....	07
2.2 Atividade Física.....	09
2.2.1 Atividade física regular.....	09
2.2.2 Atividade física e dor crônica.....	09
2.3 Proteína de ligação ao elemento de resposta AMPc (CREB).....	12
2.3.1 CREB e hiperalgesia.....	13
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Animais.....	16
4.2 Atividade Física Regular e Voluntária.....	16
4.3 Modelo de dor muscular crônica difusa	16
4.4 Testes de Nocicepção.....	17
4.5 Imunofluorescência.....	18
4.6 Delineamento experimental.....	19
4.7 Análise estatística.....	22
5 RESULTADOS.....	24
5.1 Resposta comportamental.....	24
5.2 Volume de atividade física.....	29
5.3 Imunofluorescência.....	30
6 DISCUSSÃO.....	35

6.1 Atividade física voluntária no tratamento da dor crônica.....	35
6.2 Atividade física voluntária na prevenção da dor crônica.....	38
6.3 Ativação cortical e dor crônica.....	40
6.4 Componente afetivo da dor crônica.....	41
7 CONCLUSÃO.....	43
8 REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o *American College of Rheumatology* (ACR), a dor muscular crônica difusa (DMCD) é uma condição definida como dor musculoesquelética com duração de três meses ou mais, localizada axialmente (coluna cervical, coluna torácica, tórax anterior ou lombar), acima e abaixo da cintura, e nos lados esquerdo e direito do corpo (Wolfe et al. 1990). Além disso, é frequentemente associada a outros sintomas físicos, como fadiga, dificuldades psicológicas e distúrbios do sono e do humor (Clauw and Crofford 2003).

A DMCD se faz presente na Fibromialgia (FM), uma síndrome complexa que afeta milhões de pessoas em todo o mundo (Wolfe et al. 2013; Queiroz 2013), diagnosticada pela presença de dor crônica difusa e sintomas somáticos associados, tais como fadiga e comprometimento cognitivo (Wolfe et al. 2010), os quais não podem ser explicados adequadamente com base no grau de dano ou inflamação observado em tecidos periféricos. A dor da fibromialgia se caracteriza como sendo anormal e não protetora, desproporcional ao incidente excitador (Bengtsson 2002). Assim, a FM é o termo atualmente preferido para dor muscular crônica difusa para a qual nenhuma causa pode ser identificada (Sluka and Clauw 2016).

A DMCD é reconhecida como um problema de saúde pública, com importantes consequências físicas e psicológicas, com alto ônus social e econômico (Azevedo et al. 2012). Apresenta prevalência na população bastante diversificada, mas a maioria das estimativas de estudos de baixo-risco indicam que a DMCD acomete, em média, 10-15% da população em geral. No Brasil, estudo aponta índice de 24% em população de baixa condição socioeconômica. Acomete duas vezes mais mulheres do que os homens e a prevalência aumenta em pessoas com mais de 40 anos (Mansfield et al. 2016; Gran 2003).

Embora os mecanismos que mantêm a dor na FM sejam desconhecidos, evidências apontam para uma desregulação do sistema nervoso central (SNC) no processamento da dor, com aumento da sensibilidade a estímulos sensoriais, respostas cerebrais exageradas a estímulos dolorosos e não dolorosos e deficiências na modulação da dor (Staud 2009; Clauw and Crofford 2003; Sluka and Clauw 2016). Além disso, a redução da atividade nos interneurônios inibitórios gabaérgicos também pode contribuir para a sensibilização central (Casasola et al. 2004).

Ainda, estudos de neuroimagem funcional mostram que os pacientes com fibromialgia apresentam alterações de hiperexcitabilidade cortical (Gracely and Ambrose 2011; Guedj 2009; Kim et al. 2015; Mhalla et al. 2010). Tem sido claramente evidenciado, tanto clinicamente como

em modelos experimentais, que regiões corticais envolvidas no estímulo nociceptivo, dentre elas o córtex cingulado anterior (CCA), córtex insular (CI) e a amígdala, desempenham importante papel no processamento da dor crônica. Entretanto, ainda não são claras as evidências que mostrem se ocorrem mudanças corticais em modelo de DMCD.

Na tentativa de melhor estudar essa síndrome, foi desenvolvido um modelo animal de fibromialgia que é caracterizado por hiperalgesia mecânica difusa de longa duração, sem distúrbios motores ou dano tecidual significativo (Sluka et al. 2001). A hiperalgesia é muscular (primária), cutânea (secundária) e visceral (secundária) (Sluka et al. 2001; Miranda et al. 2004). Este modelo apresenta aumento da excitabilidade em neurônios espinais, caracterizada por um aumento bilateral do campo receptivo, aumento bilateral da fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) (Hoeger-Bement and Sluka 2003) e aumento da liberação de glutamato na medula espinhal e no tronco cerebral (Radhakrishnan and Sluka 2009; Skyba et al. 2005).

Em pacientes com fibromialgia, a melhor estratégia para o controle da dor é aquela que combina o uso das terapias farmacológica e não-farmacológica (Schmidt-Wilcke and Clauw 2011; Clauw 2014). A terapia medicamentosa é embasada no uso de analgésico, anti-inflamatórios não-esteroidais, relaxantes musculares, corticosteroides e, principalmente, antidepressivos (Sauer et al. 2011). Em relação ao tratamento não-farmacológico, as principais terapias utilizadas incluem educação ao paciente (Nijs et al. 2014; Geneen et al. 2015; Clarke et al. 2011), psicoterapia (Bernardy et al. 2010; Bawa et al. 2015), estimulação sensorial (acupuntura, massagem) (Yang et al. 2014) e terapias com movimento (tai-chi, exercício físico) (Sauer et al. 2011; Brosseau et al. 2008).

A inatividade física ou um estilo de vida sedentário é reconhecido como um fator de risco para o desenvolvimento de dor crônica (Booth et al. 2012). A atividade física regular (AFR), por outro lado, não apenas melhora a dor em pessoas com DMCD (Nijs et al. 2012), mas também previne o desenvolvimento da dor em sujeitos saudáveis (Tsujii et al. 2013). De maneira similar, estudos experimentais com camundongos mostram que a atividade física (AF) na roda de corrida durante oito semanas previne o desenvolvimento de DMCD, o que não acontece se a duração da AF for de cinco dias somente (Sluka et al. 2013; Leung et al. 2015; Sabharwal et al. 2015). O exercício, incluindo a AFR, ativa receptores opióides e serotoninérgicos no SNC (Stagg et al. 2011), e também aumenta a expressão de receptores gabaérgicos (Maddock et al. 2016; Hill et al. 2010) e glutamatérgicos (Maddock et al. 2016), reduzindo a excitabilidade neuronal central para resultar em analgesia (Sluka et al. 2013).

Tanto em pessoas saudáveis quanto naquelas com fibromialgia, o exercício pode modificar a atividade cortical (Flodin et al. 2015; Schneider et al. 2010; Ichesco et al. 2014; Nishiguchi et al. 2015). Por exemplo, após única sessão de exercício agudo que produz analgesia em pacientes com DMCD, ocorre redução de excitabilidade corticomotora (Hoeger Bement et al. 2014). Estudos de imagem mostram que o exercício aeróbico reduz a atividade do CCA e provoca mudanças na atividade CI e córtex pré-frontal (CPF) em sujeitos saudáveis (Ohmatsu et al. 2014; Kubesch et al. 2003; Lamb et al. 2007; Tsujii et al. 2013).

Estudos com animais mostram que o exercício não só reduz a hiperalgesia, como também produz neurogênese, melhora o processo de aprendizagem e memória, e reduz os comportamentos de ansiedade e depressão (Wang et al. 2013; Kao et al. 2011; Bekinschtein et al. 2011). Entretanto, ainda não se sabe se a atividade física altera a atividade cortical em áreas que processam a nocicepção.

A proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) é um fator de transcrição cuja atividade é regulada por fosforilação (pCREB), sendo distribuído por todo o SNC, e sua fosforilação ativa os "genes da dor" (Carlezon et al. 2005; Mayr and Montminy 2001). Estudos prévios mostram que ocorre aumento da imunorreatividade para pCREB paralelamente à hiperalgesia em modelos de dor neuropática, dor inflamatória ou de DMCD (Bement and Sluka 2007; Descalzi et al. 2012). A regulação negativa de CREB com a injeção de um antisense reduz espontaneamente os comportamentos de dor em animais com dor neuropática (Ma et al. 2003; Bo et al. 2014), mostrando, assim, uma função nociceptiva para CREB. No córtex cerebral, aumentos da expressão de CREB ocorrem em modelos de depressão, ansiedade e estresse, e estes estão correlacionados com os resultados comportamentais (Imbe et al. 2014; Freitas et al. 2013). No entanto, não está claro se os aumentos de CREB ou pCREB ocorrem em regiões cerebrais nociceptivas em modelos animais de dor, e se estas alterações são moduladas pelo exercício.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dor muscular crônica difusa

2.1.1 Fibromialgia

A dor musculoesquelética crônica é um dos distúrbios clínicos mais difíceis enfrentados pelos clínicos e pelos pacientes. Historicamente, a primeira referência a dor musculoesquelética data do século 16, sendo chamada de “reumatismo muscular” (Ruhman 1940). Desde então, várias formas de reumatismo muscular sob diferentes nomenclaturas foram descritas, sendo as primeiras definições vagas e quase impossível de se distinguir entre tipos generalizados e regionais/localizados. Em 1904, Gowers introduziu o termo fibrosite, o qual foi descrito como inflamação do tecido fibroso dos músculos, com dor espontânea e sensibilidade assintomática à compressão mecânica, fadiga e distúrbios do sono (Gowers 1904). Estudos posteriores com pacientes diagnosticados com *fibrositis* identificaram ausência de inflamação ou degeneração muscular, e uma associação com depressão e estresse, levando os pesquisadores a sugerir o nome reumatismo psicogênico (Halliday 1937; Travell J 1942).

Somente cerca de 70 anos depois, ocorreu a introdução ao termo fibromialgia e sua primeira descrição moderna: dor generalizada e presença de múltiplos pontos de tensão em locais específicos (Moldofsky et al. 1975). Em 1990, então, o Colégio Americano de Reumatologia definiu critérios diagnósticos para a fibromialgia, os quais foram atualizados dez anos mais tarde, enfatizando a importância dos sintomas somáticos associados à FM (Wolfe et al. 2010; DeSantana and Sluka 2008). Assim, a síndrome da fibromialgia passa a ser caracterizada pela presença de dor musculoesquelética crônica difusa (DMCD) de longa data, ou seja, dor no lado esquerdo e direito do corpo, acima e abaixo da cintura e dor esquelética axial por pelo menos 3 meses, e alterações psicossomáticas tais como fadiga, distúrbios do sono, depressão e ansiedade (Wolfe et al. 1990; Wolfe et al. 2010).

A FM pode ocorrer isoladamente, mas com maior frequência ocorre concomitante com outras condições (por exemplo, síndrome do intestino irritável, cistite intersticial e cefaleia tensional) (Wolfe et al. 1990) ou como comorbidade em indivíduos com doenças caracterizadas por dano periférico em curso ou inflamação (por exemplo, doenças autoimunes e osteoartrite) (Clauw 2014).

Apesar do aumento substancial do número de publicações sobre a fibromialgia nos últimos 30-40 anos (figura 1) (Wolfe and Walitt 2013), ainda não se sabe exatamente o que

causa essa síndrome. Os pacientes não apresentam alterações estruturais ou funcionais consistentes no tecido muscular, mas os mecanismos de processamento da dor no sistema nervoso central (SNC) são disfuncionais (Srikuea et al. 2013). Não obstante, alguns estudos recentes utilizando análises mais sofisticadas tem explorado componentes periféricos para a geração da DMCD (Staud et al. 2014; Oaklander et al. 2013), como alteração de nociceptores e do sistema imune.

Em indivíduos com fibromialgia, estudos mostram número reduzido de fibras nervosas epidérmicas após biópsia cutânea (Oaklander et al. 2013) e maior atividade e sensibilização de fibras C a estímulos mecânicos (Serra et al. 2014). Em animais, canais de íons sensíveis a ácido (ASICs) ou fator de crescimento nervoso (NGF) nos neurônios sensoriais do músculo contribuem para o desenvolvimento de DMCD (Leung et al. 2015; Gregory et al. 2016; Murase et al. 2010; Chen et al. 2014).

Além disso, a inflamação sistêmica crônica tem sido sugerida para exercer papel na patologia dessa síndrome (Mendieta et al. 2016; Bote et al. 2014). De acordo com revisão sistemática, pessoas com fibromialgia apresentam aumentos consistentes em IL-1, IL-6 e IL-8 no soro sanguíneo (Uceyler et al. 2011). Em animais, macrófagos localizados no músculo contribuem para o desenvolvimento de DMCD. Por exemplo, a remoção de macrófagos no local da injeção de ácido, utilizando um bloqueador de infiltração tecidual de macrófagos, previne o desenvolvimento de hiperalgesia induzida pelo exercício (Leung et al. 2015; Gong et al. 2016). Os macrófagos classicamente ativados (M1) caracterizam-se pela sua capacidade de secretar altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Assim, citocinas pró-inflamatórias, interleucinas (IL-1b, IL-6) e fator de necrose tumoral (TNFa), podem ativar e sensibilizar nociceptores (Mosser and Edwards 2008).

Esses mecanismos periféricos com alteração da excitabilidade dos nociceptores refletem uma sensibilização periférica, importante para indução de hiperalgesia (aumento da dor para estímulos normalmente dolorosos) em humanos e animais. Nos indivíduos com dor crônica, além da hiperalgesia no local da lesão (primária), é comum a presença de dor exacerbada fora do local da lesão (hiperalgesia secundária) e alodinia (dor para estímulos normalmente não dolorosos). Isso acontece porque, uma vez que a sensibilização nos nociceptores se perpetua, pode levar a mudanças plásticas nos neurônios do SNC, o que caracteriza o processo de sensibilização central (SC) (Pelletier et al. 2015). Assim, a SC é uma amplificação no SNC

resultando em percepção mais intensa da dor, atuando na manutenção da dor crônica (Zhuo 2005).

Evidências suportam a importância clínica da SC em pacientes com dor musculoesquelética crônica (Sterling et al., 2003; Jull et al., 2007; Coombes et al., 2012; Smart et al., 2012). Clinicamente, além de hiperalgesia secundária e alodinia, a SC é caracterizada por sintomas "centrais", como dificuldades de concentração e fadiga, intolerância ao estresse e hipersensibilidade sensorial. Em termos neurofisiológicos, a SC reflete os seguintes processos: 1) aumento da somação temporal (aumento da dor a uma estimulação repetida para os mesmos estímulos nocivos) (Staud et al. 2008), 2) redução da modulação condicionada da dor (disfunção dos mecanismos descendentes de inibição da dor) (Staud 2009) e 3) potencialização a longo prazo (PLP) das sinapses cerebrais (estado prolongado de excitação neuronal que gera um pico anormal da atividade cerebral, mesmo após cessado estímulo sensorial periférico) (Zhuo 2014). Esse último fenômeno tem sido estudado mais especificamente no córtex cerebral. Logo, a dor crônica ocorre devido a mudanças plásticas nas vias nociceptivas e essas mudanças não ocorrem apenas em nociceptores periféricos e no corno dorsal da medula, mas também em regiões corticais das vias somatossensoriais relacionadas à nocicepção (Cagnie et al. 2014).

2.1.2 Dor crônica e córtex cerebral

As regiões corticais envolvidas no estímulo nociceptivo desempenham um importante papel no processamento da dor crônica (Apkarian et al. 2011). As áreas cerebrais mais comumente ativadas por estímulos nocivos em estudos de imagem de cérebro humano são o córtex somatossensorial primário (S1) e somatossensorial secundário (S2), córtex cingulado anterior (CCA), córtex insular (CI), córtex pré-frontal (CPF), tálamo, cerebelo, núcleo accumbens, amígdala e substância cinzenta periaquedutal (PAG) (Apkarian et al. 2005; Becerra et al. 2001; Dunckley et al. 2005).

Estudos com imagens por ressonância magnética funcional (fMRI) apontam achados de sensibilização central em sujeitos com fibromialgia, com alterações de hiperexcitabilidade cortical (Guedj 2009; Gracely et al. 2002; Cagnie et al. 2014; Pujol et al. 2014). Gracely et al. (2002) foram os primeiros a realizar exames com fMRI em pacientes com fibromialgia, mostrando maiores quantidades de ativação cortical em áreas de processamento da nocicepção, quando comparados aos sujeitos controle, após receberem estímulo doloroso por pressão (Gracely et al. 2002). Em outros estudos com fMRI, indivíduos com dor lombar crônica e

osteoartrose apresentam atividade anormal no CCA, amígdala, CI, núcleo accumbens, e áreas do CPF (Apkarian et al. 2011)

Enquanto as áreas somatossensoriais do córtex estão mais estritamente relacionadas com a intensidade da dor, inclusive na dor crônica, estudos identificaram que o CCA, o CI, CPF e a amígdala central (ACe) estão envolvidos nos aspectos cognitivos afetivos da dor e lesão, incluindo a resposta comportamental a estes, o processamento do medo, emoções, condicionamento negativo e atenção (Bushnell et al. 2013; Leknes and Tracey 2008; Rainville et al. 1997). Em pacientes com fibromialgia, a magnitude de ativações neuronais induzidas pela dor em regiões cerebrais de processamento da dor afetiva (amígdala e CI anterior) estão associadas a sintomas de depressão (Giesecke et al. 2005). Neurônios do CCA podem ser ativados em condições emocionais relacionadas à dor, tais como evitação de estímulos nocivos, sensação desagradável e tristeza (Navratilova et al. 2015; Zhuo 2008; Fuchs et al. 2014). Assim, componentes emocionais e de atenção influenciam na percepção da dor.

Em animais, tem sido examinado que após inflamação periférica ocorre uma alteração na subunidade NR2B de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) no CCA, com aumento das respostas mediadas por esse receptor (Zhao et al. 2005). Além disso, aumento generalizado da atividade glial em áreas corticais que processam estímulos nociceptivos (córtices somatossensorial, motor, pré-frontal, cingulado e insular) persistem no animal adulto após lesão tecidual induzida em período neonatal (Sanada et al. 2014). Assim, modelos animais permitem não só investigar alterações do estado mental, a partir de mudanças no comportamento dos mesmos, como também são utilizados para compreender os mecanismos celulares e moleculares da dor crônica e testar novos potenciais tratamentos.

2.1.3 Modelo animal de DMCD

A ciência básica vem desenvolvendo modelos de dor musculoesquelética inflamatória e não-inflamatória de longa duração, com o intuito de mimetizar desordens como a FM (Yokoyama et al. 2007; Sluka 2002). No entanto, modelos inflamatórios não simulam os processos hiperalgésicos sem ocorrência de lesão tecidual. Em humanos, a infusão intramuscular de uma solução ácida (pH 5,2) no músculo tibial anterior da perna produz dor muscular no local da injeção e dor referida no tornozelo (Frey Law et al., 2008), mostrando que a infusão de ácido pode produzir dor primária e secundária.

Um modelo animal de hiperalgesia muscular crônica difusa foi desenvolvido e caracterizado, induzido por duas injeções de solução salina ácida (pH 4.0) no mesmo músculo

gastrocnêmio, produzindo hiperalgesia generalizada do músculo (primária), da pele e vísceras (secundária) de longa duração (4 semanas), sem danos ou inflamações observáveis nos tecidos (Sluka et al., 2001; Miranda et al., 2004; Yokoyama et al., 2007b; Sharma et al., 2009). Além disso, este modelo está associado a comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão em 50-60% dos animais após a indução do modelo (Liu et al., 2014).

Neste modelo de DMCD, a indução da hiperalgesia envolve mecanismos periféricos, espinais e supraespinais (DeSantana et al. 2013). Periféricamente, a ativação de ASIC3 em fibras aferentes musculares é necessária para a indução do modelo, uma vez que camundongos knockout para ASIC3 não desenvolvem hiperalgesia (Sluka et al. 2003). Além disso, superexpressão de neurotrofina (NT) 3 no músculo previne a hiperalgesia secundária crônica simultâneo à prevenção da expressão aumentada de c-fos na medula espinhal (Gandhi et al. 2004). Assim, a ativação de aferentes musculares inicia a hiperalgesia e são críticas para o desenvolvimento de mudanças centrais.

Centralmente, este modelo apresenta aumento da excitabilidade em neurônios da medula espinhal e do tronco encefálico, caracterizada por aumentos nas concentrações de glutamato, aumento bilateral na fosforilação do fator de transcrição CREB e na fosforilação da subunidade NR1 do receptor de NMDA em neurônios do trato espinotalâmico e do núcleo rostral ventromedial (RVM) (Bement and Sluka 2007; Skyba et al. 2002; Da Silva et al. 2010). Sobre as áreas corticais neste modelo, apenas uma evidência mostra aumento na fosforilação de ERK e na transmissão excitatória pós-sináptica a partir do núcleo parabraquial para o núcleo central da amígdala (Cheng et al. 2011).

Ademais, a hiperalgesia nesse modelo é revertida por agonistas opióides administrados intratecal, bem como por pregabalina sistêmica, antagonistas de NMDA, agonistas de canal de potássio e por antagonistas dos canais de sódio (Sluka 2002). Por fim, sabe-se que exercícios aeróbios ativam os receptores centrais de opióides e serotonina (Bobinski et al. 2015) e reduz a excitabilidade de neurônio central (Sluka et al. 2013) para produzir analgesia. Assim, este modelo animal de DMCD imita a apresentação clínica de sinais e sintomas observados em fibromialgia com hiperalgesia generalizada, alterações no processamento nociceptivo central, maior hiperalgesia nas fêmeas e são sensíveis às mesmas terapias farmacológicas e não-farmacológicas.

2.2 Atividade física

2.2.1 Atividade física regular (AFR)

Atividade física é definida como qualquer movimento corporal, realizado com a participação da musculatura esquelética, envolvendo um gasto energético maior, quando comparado com os níveis de repouso (*US Centers for Disease Control and Prevention*). Segundo Caspersen et al, (1985) a AF é realizada por meio de exercícios físicos, ou seja, movimentos corporais repetitivos, estruturados e planejados, resultando em uma melhora de um ou mais componentes da aptidão física (Caspersen et al. 1985).

A AFR é definida como atividade física realizada regularmente, pelo menos uma vez por semana durante pelo menos 30 minutos. É uma importante prática na promoção do bem-estar físico e emocional, além de proporcionar melhorias na qualidade de vida (WHO 2002). Ao contrário, a inatividade física está associada a um aumento considerável do risco de desenvolvimento de uma série de doenças degenerativas e crônicas (Booth et al. 2012). Apesar da importância da AF para a saúde, a maioria das pessoas tem um estilo de vida sedentário. Um relatório global de 2000 indicou que 17,7% da população global (com idade igual ou superior a 15 anos) não estava envolvida em nenhum tipo de atividade física, e que quase 58% não alcançaram a quantidade recomendada de atividade de intensidade moderada para serem considerados fisicamente ativos (2,5 h / semana) (WHO 2002).

Em animais, a AFR pode ser simulada com a introdução de rodas de corrida na caixa dos animais. A maioria dos roedores corre facilmente em rodas de corrida, tornando-se uma medida de AF simples e facilmente quantificável (Sherwin 1998). A corrida na roda é uma atividade voluntária que se opõe a outros modelos de exercícios experimentais em camundongos, que dependem de estímulos aversivos para forçar o movimento ativo (Droste et al. 2003). Estes incluem a natação e a corrida na esteira, os quais por um lado tem a vantagem de controlar a velocidade e distância reproduzíveis do exercício, mas podem não ser totalmente consistentes com o comportamento normal do camundongo (Moraska et al. 2000). Assim, ao contrário dos estressores incontroláveis, como o choque inescapável, a corrida é uma forma voluntária de estresse para os roedores.

2.2.2 Atividade física e dor crônica

Os benefícios da atividade física aeróbia para indivíduos com fibromialgia tem sido bem documentados em revisões e meta-análises de alta qualidade (Busch et al. 2011; Hauser et al. 2010; Nuesch et al. 2013). No entanto, a evidência atual é equívoca com alguns estudos

mostrando uma diminuição na sensibilidade à dor com exercício, enquanto outros mostram que não há mudança ou, ainda, que pode haver aumento da dor.

Existe uma hipótese de que o exercício é capaz de dessensibilizar o SNC, levando a analgesia induzida pelo exercício, e dentre alguns mecanismos envolvidos nesse processo está a liberação de opióides endógenos e a ativação de mecanismos supraespinhais inibitórios da dor (Koltyn 2000; Mazzardo-Martins et al. 2010). Entretanto, em pacientes com DMCD, o exercício de intensidade moderada ou vigorosa, ou o aumento súbito da AF, pode levar à uma exacerbação dos sintomas imediatamente após o exercício (Ellingson, Shields et al. 2012). Este aumento da dor induzida pelo exercício leva essa população a desenvolver medo de praticar atividade física e, conseqüentemente, adotam um estilo de vida sedentário que só piora sua condição dolorosa (Ellingson et al. 2012). Nesse sentido, foi identificado que pessoas com dor crônica apresentam uma disfunção da modulação descendente inibitória da dor (perda da modulação condicionada da dor) (Staud 2009), o que parcialmente explica o aumento da dor em resposta ao exercício agudo, ou ainda, a ausência de efeito ao exercício.

Por outro lado, a AFR pode desempenhar um papel importante na prevenção da dor crônica. Em indivíduos saudáveis, tanto o exercício aeróbico como o resistido resulta em aumento da tolerância à dor generalizada, durante e após o exercício. Em estudo recente, Naugle et al. (2017) observaram que idosos saudáveis que praticavam mais frequentemente AF moderada à vigorosa apresentaram redução no teste de somação temporal (menor facilitação da dor); enquanto que aqueles que fizeram AFR de baixa intensidade apresentaram maior modulação condicionada da dor (melhor inibição da dor) (Naugle et al. 2016). Esse e outros estudos clínicos evidenciam que a AF praticada regularmente é capaz de induzir alterações na modulação central da dor, com redução da facilitação da dor e aumento da inibição.

Embora os estudos em animais não permitam investigar adequadamente os benefícios psicológicos da atividade ou do exercício, eles são mais adequados para abordar o componente biológico em várias dimensões. No que diz respeito a alterações periféricas, em modelo animal de DMCD, a AFR estimula o músculo do animal a secretar fatores tais como prótons, lactato e ATP que levam a alterações nas populações de macrófagos musculares residentes para favorecer o fenótipo de macrófagos regulatórios e conseqüente aumento de citocinas anti-inflamatórias (Leung et al. 2015).

Uma recente revisão (Lima et al. 2017) discutiu evidências sobre os possíveis mecanismos centrais subjacentes da analgesia induzida pela AFR. Os estudos mostram que o exercício aeróbico produz analgesia em parte através da ativação de vias opioidérgicas e que o exercício regular em animais saudáveis está associado à ativação de receptor opióide. Vários

estudos mostraram que a administração de antagonista opióide naloxona, sistêmica ou supraspinal, bloqueia a analgesia induzida por exercício em diferentes modelos animais de dor (Stagg et al. 2011; Mazzardo-Martins et al. 2010; Martins et al. 2016; Galdino et al. 2010). Além disso, a fosforilação normalmente aumentada da subunidade NR1 do receptor NMDA (Da Silva et al. 2010) em modelo animal de DMCD é reduzida pela atividade física regular, sendo ainda proposto que essa fosforilação é controlada tonicamente pelos receptores opióides no RVM durante condições regulares de AF e que, em condições sedentárias, esse controle tônico é removido (Sluka et al. 2013).

Trabalhos mostram que a serotonina também tem sido implicada na analgesia induzida pela AFR, com aumento na liberação de serotonina supraespinal, e redução no transportador de serotonina induzidos pela AFR (Bobinski et al. 2015). Além disso, é provável que os mecanismos opióides e serotoninérgicos interajam para promover analgesia após AF. Lima et al, 2016 mostraram que cinco dias nas rodas de corrida impediu o aumento no transportador de serotonina no RVM induzido pelo insulto muscular com duas injeções de salina ácida, em camundongos. No entanto, em animais knockout para mu-opióides, a corrida não teve efeito sobre a expressão aumentada do transportador de serotonina (Lima et al. 2016).

Ademais, a ativação de receptores endocanabinóides no SNC também parece contribuir na analgesia induzida por AFR (Sparling et al. 2003; Koltyn et al. 2014). Em um estudo com animais, Hill et al (2010) verificaram que oito dias de livre acesso às rodas de corrida induz analgesia e aumenta os níveis de endocanabinóides endógenos no hipocampo. Em animais saudáveis, há um aumento na expressão de receptores canabinóides 1 no cérebro, inclusive no PAG, após exercício aeróbio (Galdino et al. 2014), e o bloqueio farmacológico de receptores canabinóides centrais e periféricos inibe a analgesia (Fuss et al. 2015).

Uma vez que a maioria dos estudos se concentrou em investigar os mecanismos da AF no PAG e no RVM, existe um número reduzido de evidências que tenha examinado o papel da AF sobre outras áreas de processamento da dor, como no córtex cerebral.

A atividade física tem sido associada com mudanças na atividade cortical e melhor funcionamento do cérebro (Flodin et al. 2015; Kao et al. 2011; Hoeger Bement et al. 2014). Em modelo animal de Parkinson, o exercício aeróbio em longo prazo melhorou a função motora e mostrou hiperativação de áreas límbicas durante a caminhada, incluindo amígdala, hipocampo e ínsula (Wang et al. 2013). Além disso, em modelo animal de depressão, a atividade física regular reverteu comportamentos de ansiedade e depressão através da transdução de sinal de cAMP/ PKA/ CREB mediada pelo receptor serotoninérgico 5HT1A no hipocampo (Kim and Leem 2014).

2.3 Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB)

A proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) foi descoberta em 1987 como membro de uma família de proteínas que funcionam como fator de transcrição responsivo ao AMPc (Montminy e Bilezikjian, 1987). Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam a uma sequência específica do DNA (elementos de resposta), ativando ou reprimindo a transcrição de determinados genes (Mayr and Montminy 2001). CREB media a ativação de genes de respostas ao AMPc pela sua ligação como dímero (reconhece sequências do DNA sem que a dupla fita precise se abrir) a uma sequência no DNA denominada CRE (elemento de resposta ao AMPc), que contém a sequência de nucleotídeos de consenso TGACGTCA (Hagiwara et al. 1993). Localizados dentro do núcleo, fatores de transcrição como CREB são ativados para a transmissão de eventos que ocorrem a partir das membranas celulares e levam a alterações na expressão gênica (Yamamoto et al. 1988; Carlezon et al. 2005).

A família CREB inclui as proteínas CREM e ATF-1, além do fator de transcrição mais conhecido de sua família, a proteína CREB (Brindle et al. 1993). A sua estrutura primária revela um domínio de dimerização zíper leucina (bZIP) localizado carboxi-terminalmente, e um domínio indutível por quinase (KID), onde está presente o resíduo de serina 133 (ser 133) (Chrivia et al. 1993). Esse resíduo, por sua vez, é um alvo para a fosforilação por várias quinases, incluindo a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), crítico para a ativação de CREB mediada por estímulos extracelulares (Chrivia et al. 1993). CREB foi o primeiro fator de transcrição cuja atividade foi mostrada pra ser regulada por fosforilação e, como seu nome indica, é ativada por fosforilação em resposta a, entre outros sinais, AMPc. Especificamente, a fosforilação ocorre a partir do acúmulo intracelular de AMPc, em resposta ao estímulo de adenilato ciclase, que se liga às subunidades regulatórias da PKA e libera suas subunidades catalíticas, as quais passivamente se difundem para o núcleo e fosforilam CREB no resíduo de serina 133 (Wu et al. 1998).

De fato, além dos receptores acoplados à proteína G, outros receptores de membrana (receptores AMPA, NMDA) podem desencadear cascatas de sinalização intracelular que, por meio de cálcio intracelular, ativam adenilato ciclase e PKA e culminam na fosforilação de CREB na ser 133 (Carlezon et al. 2005). Assim, o resíduo de serina 133 da CREB se comporta como um ponto de convergência de diversas cascatas de sinalização iniciadas por neurotransmissores, neurotrofinas e hormônios (Lonze and Ginty 2002).

CREB vem sendo bastante estudada no sistema nervoso porque é amplamente encontrada nos circuitos neurais de diferentes regiões do cérebro (Carlezon et al. 2005; Tanimizu et al. 2017). Além disso, a ativação de CREB tem sido relacionada com diversas

condições patológicas ou processos fisiológicos, a depender da região cerebral envolvida (Zhao et al. 2005). Por exemplo, a fosforilação de CREB (pCREB) pela PKA pode levar a plasticidade sináptica de longa duração no hipocampo (Tanimizu et al. 2017), um mecanismo fundamental no processo de aprendizagem e consolidação da memória. Similarmente, esse mecanismo acontece em vias sensoriais do corno dorsal da medula espinhal e em áreas corticais importantes na percepção da dor, uma vez que a indução de “genes da dor” dependentes da ativação de CREB pode aumentar a expressão de receptores e proteínas sinal relacionados com a dor, desempenhando um papel importante na conversão de lesões nociceptivas agudas para estados de dor persistentes (Zhuo 2014).

2.3.1 CREB e hiperalgesia

Em estudos de plasticidade nos neurônios do CCA, sabe-se que sob diferentes condições fisiológicas e patológicas, incluindo condicionamento do medo ou lesão do nervo, vários genes de ativação imediata e seus produtos relacionados, incluindo CREB, são ativados. A estimulação repetida dos neurônios sensoriais nociceptivos adquirem e transferem sinais até o córtex para formar memória a longo prazo e emoções negativas de dor, a memória da dor, e a via de sinalização AMP/PKA/CREB pode estar envolvida nesse processo.

A via de sinalização de AMP/PKA/CREB tem demonstrado desempenhar um papel importante na modulação da dor (Sorensen et al. 1998). A ativação espinhal da via de AMPc produz hiperalgesia mecânica e aumenta a resposta dos neurônios do trato espinotalâmico a estímulos mecânicos nocivos, mas não inócuos (Dolan and Nolan 2001; Sluka 2002). Em ratos que não possuem adenilato ciclase 1 e 8, a hiperalgesia não se desenvolve após a injeção de carragenina intramuscular (Vadakkan et al. 2006). Além disso, o bloqueio de adenilato ciclase ou proteína quinase A (PKA) previne a hiperalgesia mecânica e a alodinia produzidas por injeção intradérmica, intramuscular ou intra-articular de capsaicina e injeções intramusculares de solução salina intramuscular repetidas (Sluka 2002; Bement and Sluka 2007).

Após injeções intramusculares repetidas de solução salina ácida, ocorre aumento de CREB e pCREB bilateralmente no corno dorsal da medula espinhal, porém o bloqueio da via do AMPc impede o aumento de pCREB (Hoeger-Bement and Sluka 2003). Os aumentos em pCREB após repetidas injeções de ácido são dependentes do tempo, de modo que os aumentos ocorrem 24 horas, mas não 1 semana, após a indução da hiperalgesia (Hoeger-Bement and Sluka 2003). Da mesma forma, os efeitos do bloqueio da via de AMPc também são dependentes do tempo, de modo que a hiperalgesia é revertida 24 horas, mas não 1 semana, após a indução de hiperalgesia de tecido profundo (Sluka 2002). Assim, a ativação da via de AMPc após lesão

de tecido profundo ocorre de maneira dependente do tempo para desenvolver a hiperalgesia de longo prazo potencialmente através da ativação da transcrição de genes por pCREB.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os efeitos da atividade física regular e voluntária no modelo de dor muscular crônica difusa (DMCD) e na ativação de neurônios do córtex cerebral em camundongos.

3.2 Específicos

Avaliar se a atividade física regular reverte a hiperalgesia mecânica primária (do músculo) e secundária (da pata) em modelo animal de DMCD.

Analisar se diferentes periodizações (duas ou quatro semanas) de atividade física regular previne o desenvolvimento da hiperalgesia primária e secundária em modelo animal de DMCD.

Investigar a duração do efeito protetor da atividade física regular, quando da prevenção da DMCD em camundongos.

Avaliar as diferenças sexuais no desenvolvimento da hiperalgesia primária e secundária após a indução de DMCD em animais sedentários e fisicamente ativos.

Comparar o volume de corrida (distância diária percorrida) dos animais entre os diferentes protocolos de atividade física, bem como entre camundongos machos e fêmeas.

Examinar a expressão da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) e CREB fosforilado (pCREB) em neurônios do córtex cingulado anterior (CCA), córtex insular (CI) e amígdala central (ACe) em camundongos com DMCD.

Verificar se a atividade física de quatro semanas previne a expressão de CREB e pCREB em neurônios do CCA, CI e ACe em camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 79 camundongos machos e fêmeas da espécie C57BL/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EUA, <http://www.jax.org/>). Todos os experimentos foram revisados e aprovados pelo *University of Iowa Animal Care and Use Committee* (Comitê de Cuidados e Uso de Animais na Universidade de Iowa), sob número (5071459), e foram conduzidos de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos. Os animais foram alocados na Unidade de Cuidados com Animais, mantidos num ciclo claro-escuro de 12 h (todos os testes foram feitos durante o ciclo claro), a uma temperatura de 22°C e tiveram livre acesso a água e comida ao longo do período experimental. Animais sedentários e fisicamente ativos ficaram alojados individualmente durante todo o experimento. Um conjunto separado de animais machos e fêmeas foi testado quanto a diferenças de sexo em relação à indução de DMCD e à atividade física.

4.2 Atividade física e volume de corrida

Os camundongos fisicamente ativos ficaram alojados individualmente em caixas contendo uma roda de corrida, para a qual os animais tinham livre acesso. Para calcular o volume de corrida de cada animal, cada roda tinha um sensor magnético acoplado e conectado a um software, o qual permitiu registrar digitalmente o número de revoluções da roda por dia, e a distância diária (em metros) percorrida por cada animal foi calculada multiplicando o número de revoluções pela circunferência da roda (0,3 m). Uma vez que as rodas de corrida permitem ao animal escolher o tempo e a velocidade de exercício, adotamos as rodas de atividade ao invés das esteiras de corrida (*running treadmill*) para evitar qualquer estresse eventual (Binder et al. 2004). O estresse pode modular a nocicepção para melhorar ou reduzir o comportamento da dor e confundir a interpretação (Chen et al. 2011; Yesilyurt et al. 2015). Para o grupo sedentário, os animais foram mantidos em caixas sem rodas de corrida, durante o mesmo tempo de duas ou quatro semanas.

4.3 Modelo de dor muscular crônica difusa (DMCD)

Para indução do modelo de DMCD, os animais foram anestesiados com isoflurano (4%) e induzidos com duas injeções de salina ácida pH 4,0 (20 µL) no músculo gastrocnêmio esquerdo no dia 0 (injeção 1) e, novamente, no dia 5 (injeção 2). Esse procedimento produziu

hiperalgesia mecânica no músculo (primária) e na pata (secundária), bilateralmente, por um período de até 4 semanas (Sluka et al. 2001).

4.4 Testes de nocicepção

4.4.1 Sensibilidade mecânica muscular

Para avaliar a sensibilidade do músculo injetado com salina ácida, foi examinado o limiar de retirada muscular através da compressão contínua do músculo gastrocnêmio com uma pinça calibrada, até o animal retirar a pata. A força aplicada no momento da retirada pelo animal foi registrada como limiar mecânico de retirada muscular. Uma diminuição no limiar foi interpretada como hiperalgesia mecânica primária, ou seja, resposta nociceptiva no lugar do insulto (Walder et al. 2010). Foi medida a sensibilidade em ambos os músculos, ipsilateral e contralateral.



Figura 1. Tweezer utilizado para mensuração do limiar de retirada por pressão (arquivo LAPENE).

4.4.2 Sensibilidade mecânica cutânea

A sensibilidade mecânica cutânea da pata foi testada bilateralmente nos camundongos, com um filamento de von Frey (North Coast™, Morgan Hill, CA, EUA) de força 0,4 mN que foi aplicado na superfície plantar da pata 10 vezes, e o número de retiradas foi avaliado. Os dados foram apresentados como uma porcentagem de resposta, com 100% sendo 10/10 e 0% sendo 0/10 respostas. Aumento significativo no número de respostas foi interpretado como hiperalgesia mecânica secundária (Gopalkrishnan and Sluka 2000).



Figura 2. Filamento de von Frey (arquivo LAPENE).

4.5 Imunofluorescência

A análise imuno-histoquímica foi realizada para examinar a expressão da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) e CREB fosforilado (pCREB) em neurônios do córtex cerebral. Os animais (n=15) foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (150 mg/kg) e perfundidos intracardialmente com solução de NaCl 0,9% heparinizada, seguido por paraformaldeído a 4%. Os cérebros foram removidos, crioprotetidos com 30% de sacarose durante 48 horas, congelados rapidamente em gelo seco e armazenados a -80°C até a sua utilização. As secções coronais foram cortadas em um criostato a 20 µm para incluir regiões do córtex cingulado anterior (CCA), córtex insular (CI) e amígdala central (ACe), bilateralmente. A coloração de Nissl foi realizada para assegurar que as áreas de interesse foram analisadas. Para marcação com imunofluorescência dupla, as secções foram primeiramente bloqueadas com soro de cabra a 3% durante 30 min. Depois disso, as secções foram lavadas em tampão fosfato-salina (PBS) e depois foram incubadas durante a noite numa mistura de anti-CREB de camundongo (Thermo Fisher Scientific®, Rockford, IL, EUA, 1:1000) e anti-p-CREB de coelho (Millipore®, Bedford, MA, EUA, 1:350), com 1 % de NGS e 0,5 % de Triton X-100 em PBS.

No segundo dia, as secções foram lavadas em PBS e, depois, incubadas com anti-camundongo 568 de cabra biotilado (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA, 1:1000) e com anti-coelho 488 de cabra biotilado (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA, 1:1000) em NGS a 1% durante 2h a temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas utilizando *Vectashield* (Vector Laboratories™, Burlingame, CA, EUA). As secções cerebrais para cada grupo foram coradas simultaneamente para evitar variabilidade entre as marcações ao longo dos dias. Foi mostrado previamente um aumento tempo-dependente da imunorreatividade de pCREB no corno dorsal da medula espinhal que se correlaciona com o limiar de retirada mecânica em modelo de

hiperalgesia induzida por injeções de salina ácida intramuscular (Hoeger-Bement and Sluka 2003).

As secções coradas foram examinadas por um único investigador, que era mascarado para a identidade do grupo, com um microscópio de fluorescência (Olympus BX-51®, Olympus, Tokyo, Japão), e as imagens foram tomadas para análise off-line. Todas as imagens foram tomadas com a mesma configuração no microscópio, para fins de comparação. Para uma resolução suficiente para contar células CREB e pCREB-positivas, as imagens foram tiradas com uma objetiva de 20x. As secções foram identificadas em Bregma 1,98 mm (CCA), 1,10 mm (CI) e -1,34 mm (ACe) do atlas de Paxinos e Franklin (Paxinos G 2012). Para cada coloração, foram utilizadas, em média, cinco secções de cada região cerebral de interesse, de cada animal, sendo digitalizadas e armazenadas para análise posterior. As células foram quantificadas por contagem meio de manual, com uma área padrão de 10.804 μm^2 , utilizando o programa computacional Image J® (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA). Para análise quantitativa, foram contados neurônios marcados positivamente que eram pelo menos 50% mais escuros do que o nível médio de cinza de cada imagem. As células foram contadas se tivessem sido positivamente coradas para CREB e para CREB e pCREB (merge) simultaneamente.

4.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi dividido em quatro protocolos, com seus respectivos grupos: 1) 2 semanas de atividade física após indução da hiperalgesia, que continha os grupos de animais (hiperalgésicos) ativos (AFT) (n=8) e sedentários (SDT) (n=8); 2) 2 semanas de atividade física após indução da hiperalgesia + exercício adicional, com o grupo de animais hiperalgésicos ativos (AFT+EA) (n=8) e grupo hiperalgésicos sedentários (SDT+EA) (n=8) 3) 2 semanas de atividade física antes da indução da hiperalgesia, com os grupos de animais (saudáveis) ativos (AFP2) (n=7) e sedentários (SDP2) (n=7); e 4) 4 semanas de atividade física antes da indução da hiperalgesia, com o grupo saudáveis e fisicamente ativos (AFP4) (n=14) e saudáveis e sedentários (SDP4) (n=14).

O protocolo 1 (Figura 3) examinou os efeitos da atividade física regular e voluntária no tratamento da sensibilidade cutânea e muscular no modelo animal de DMCD. Os animais foram aclimatados por dois dias (-D2 e -D1) e, então, foram realizadas avaliações comportamentais da sensibilidade cutânea e da sensibilidade muscular para aquisição de valores basais (D0). Em sequência, foi administrada a primeira injeção de salina ácida (D0). Cinco dias

após (D5), foi administrada a segunda injeção de salina ácida, e 24h após (D6) foram realizadas novamente as avaliações comportamentais, para verificar se houve o desenvolvimento das hiperalgesias primária e/ou secundária. Após a avaliação, nesse mesmo dia, os camundongos do grupo fisicamente ativos foram colocados nas caixas com as rodas de corrida.

A partir do dia seguinte (1ºD), os animais foram avaliados quanto a sensibilidade cutânea e muscular nos seguintes dias, até completar duas semanas de atividade física: primeiro (1ºD), terceiro (3ºD), sétimo (7ºD) e décimo quarto (14ºD) dia após a indução do modelo e início da atividade física.

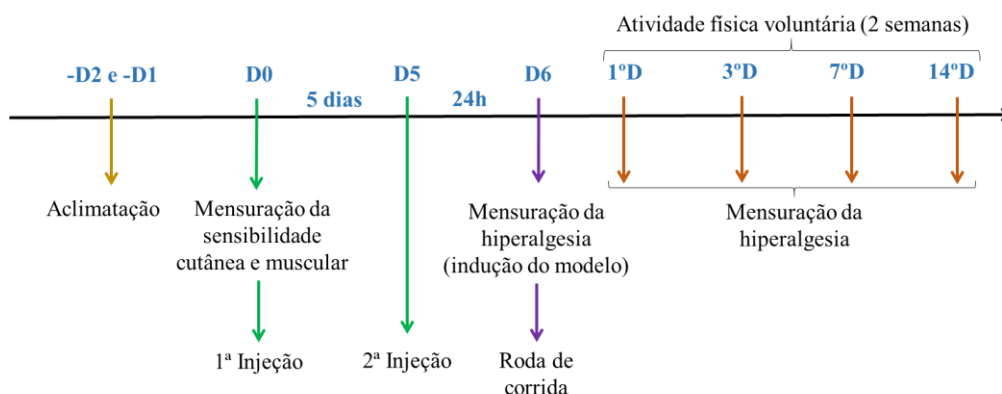


Figura 3. Delineamento experimental do protocolo de duas semanas de atividade física após indução da hiperalgesia. D: dia.

Uma vez identificado que os animais do protocolo 1 (hiperalgésicos) realizaram um volume de AF (distância diária percorrida) duas vezes menor do que a média padrão de volume para camundongos C57BL/6 saudáveis (Lightfoot et al. 2004), o protocolo 2 testou a adição de exercício não-espontâneo à atividade física voluntária (Figura 4), com o objetivo de aumentar a quantidade de atividade física dos animais após indução da hiperalgesia. Esse protocolo se assemelha ao protocolo 1 até o dia da segunda injeção (D5). A partir do D6, e durante as duas semanas subsequentes, além do livre acesso à roda de corrida na caixa, os animais realizaram atividade física não-espontânea. Todos os dias, os animais foram retirados de suas caixas por um tempo pré-determinado (60 minutos), colocados individualmente em uma roda de corrida semelhante às da caixa, porém fechadas (de forma a evitar a fuga do animal) e foram estimulados a correr a partir de um leve toque provocado pelo investigador na roda; o tempo foi cronometrado, e as rotações por minuto foram registradas de forma automática em aparelho eletrônico acoplado à roda. Se os animais parassem de correr por um instante maior que 5 segundos, o estímulo era aplicado novamente à roda. O tempo de 60 minutos diários de atividade física não-espontânea, durante duas semanas, foi determinado como necessário para o animal realizar um maior volume de atividade física sem induzir fadiga muscular.

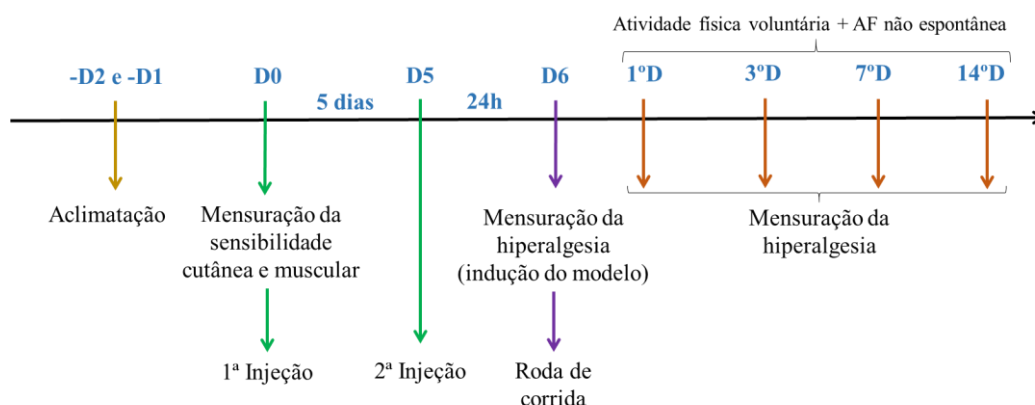


Figura 4. Delineamento experimental do protocolo de duas semanas de atividade física mais atividade física não espontânea após indução da hiperalgesia. D: dia.

O protocolo 3 (Figura 5) testou se a atividade física voluntária desenvolvida em duas semanas poderia prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia primária e/ou secundária. Imediatamente antes dos camundongos terem acesso à roda de corrida por duas semanas, foram realizadas avaliações comportamentais da sensibilidade cutânea e muscular para aquisição de valores basais (B). Ao término de duas semanas da atividade física, o registro das rodas de corrida foi pausado automaticamente pelo software, e as rodas foram retiradas das caixas dos animais (fisicamente ativos). No mesmo dia (D0), foram realizadas as avaliações comportamentais antes da indução da hiperalgesia. Em sequência, foi administrada a primeira injeção de salina ácida (D0). Cinco dias após (D5), foi administrada a segunda injeção de salina ácida, e 24 h após (D6) foram realizadas novamente as avaliações comportamentais, com o intuito de avaliar se houve o desenvolvimento ou a prevenção das hiperalgesias primária e/ou secundária. Por fim, a partir desse dia (D6) os camundongos foram avaliados quanto a sensibilidade cutânea e muscular todos os dias subsequentes (D7, D8, D9, D10, D11, D12) até completar uma semana após a segunda injeção, afim de avaliar a duração do efeito protetor da atividade física.

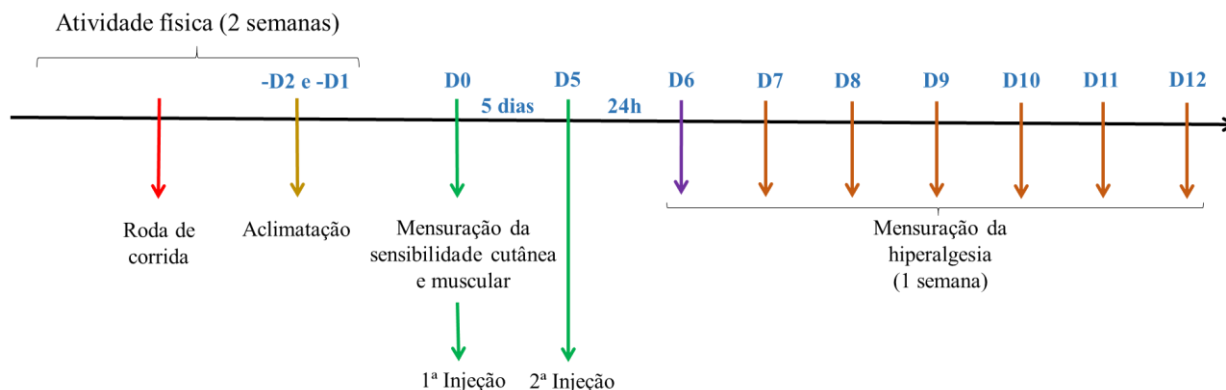


Figura 5. Delineamento experimental do protocolo de duas semanas de atividade física antes da indução da hiperalgesia. D: dia.

O protocolo 4 (Figura 6) testou os efeitos de 4 semanas de atividade física voluntária na prevenção do desenvolvimento da DMCD. Esse protocolo é semelhante ao protocolo 3, diferindo apenas que nesse protocolo os animais fisicamente ativos (AFP4) realizaram quatro semanas de atividade física, ao invés de duas. Além disso, 24h após a segunda injeção (D6), uma parte dos animais de cada grupo (n=5/cada) foi submetida ao protocolo de perfusão intracardíaca para retirada do tecido cerebral e posterior realização do protocolo de imunofluorescência.

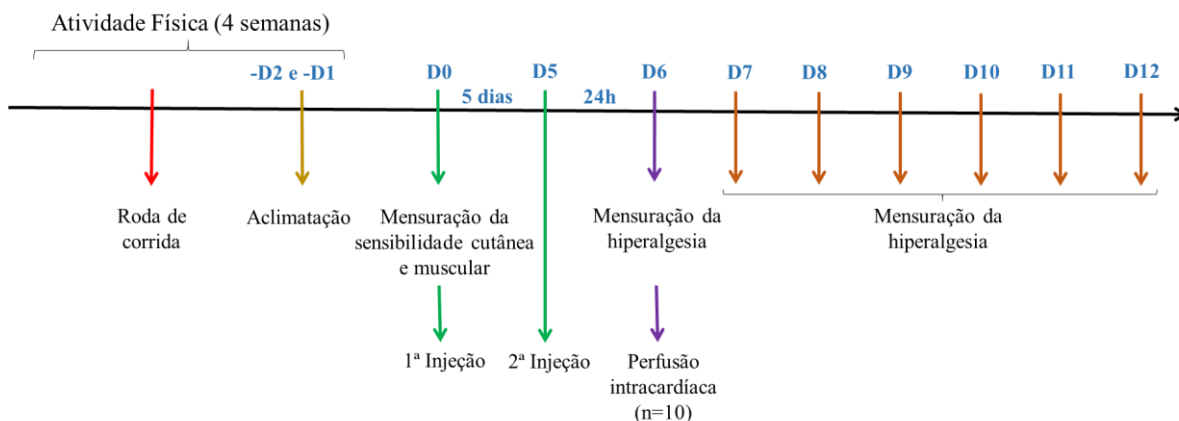


Figura 6. Delineamento experimental do protocolo de quatro semanas de atividade física antes da indução da hiperalgesia. D: dia.

4.8 Análise Estatística

Os dados obtidos nesse estudo foram analisados utilizando o programa *Graph Pad Prism 6.0®* (San Diego, CA, EUA). A normalidade das amostras foi avaliada usando o teste de Shapiro-Wilk. Para os testes de frequência de resposta da pata e do limiar de retirada do

músculo, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas para comparações entre os grupos (sedentários e ativos) ao longo do tempo, seguido do pós-teste de Tukey e, para as comparações entre os sexos (machos e fêmeas) ao longo do tempo (antes e depois). Para analisar os resultados de distância diária percorrida, foi utilizada a ANOVA de uma via para as diferenças entre grupos e ANOVA duas vias para diferenças entre machos e fêmeas ao longo do tempo, seguido de pós-teste de Tukey. ANOVA de uma via testou as diferenças entre grupos para as alterações de marcação de CREB e pCREB. Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Resposta Comportamental

No protocolo 1, foi avaliado o efeito de duas semanas de atividade física voluntária no tratamento da DMCD. Houve aumento significativo da frequência de resposta das patas e diminuição significativa do limiar de retirada do músculo, bilateralmente, dos animais sedentários (SDT) e ativos (AFT) 24 h após a segunda injeção de salina ácida (D6) em comparação ao momento basal (D0) ($p < 0,0001$), indicando que ocorreu a indução da DMCD (Fig. 7). Porém, após duas semanas de atividade física (2 semanas), não houve alteração da frequência de resposta das patas dos animais do grupo AFT (ipsi: $43,7 \pm 5,0\%$; IC 95%: 31,7-55,7/ contra: $41,6 \pm 4,8\%$; IC 95%: 30,1-53,1) quando comparado ao momento pré-tratamento (D6) (ipsi: $50,2 \pm 2,9\%$; IC 95%: 43,3-57,2/ contra: $44,5 \pm 3,2\%$; IC 95%: 36,7-57,2/ $p > 0,05$) (Fig. 7A e 7B).

De maneira similar, não houve alteração significativa do limiar de retirada do músculo do grupo AFT no momento pós-atividade física (14^oD) (ipsi: 1212 ± 70 mN; IC 95%: 1045-1379/ contra: 1274 ± 77 mN; IC 95%: 1091-1476) em relação à fase pré-tratamento (D6) (ipsi: 1247 ± 57 mN; IC 95%: 1112-1382/ contra: 1184 ± 57 mN; IC 95%: 1048-1319/ $p > 0,9$) (Fig. 5C e 5D). Além disso, não houve diferença significativa da frequência de respostas das patas (ipsi SDT: $45,8 \pm 5,1\%$; IC 95%: 36,7-58/ AFT: $43,7 \pm 5,0\%$) (contra SDT $36,6 \pm 5,8\%$; IC95%: 22,7-50,5/ AFT: $41,6 \pm 4,8\%$) ($p > 0,9$) e nem do limiar de retirada do músculo (ipsi SDT: 1149 ± 52 mN; IC 95%: 1026-1272/ AFT: 1212 ± 70 mN) (contra SDT 1189 ± 63 mN; IC 95%: 1038-1340/ AFT: 1274 ± 77 mN) ($p > 0,81$) entre os animais SDT e AFT, após duas semanas de atividade física (14^oD) (Figura 7).

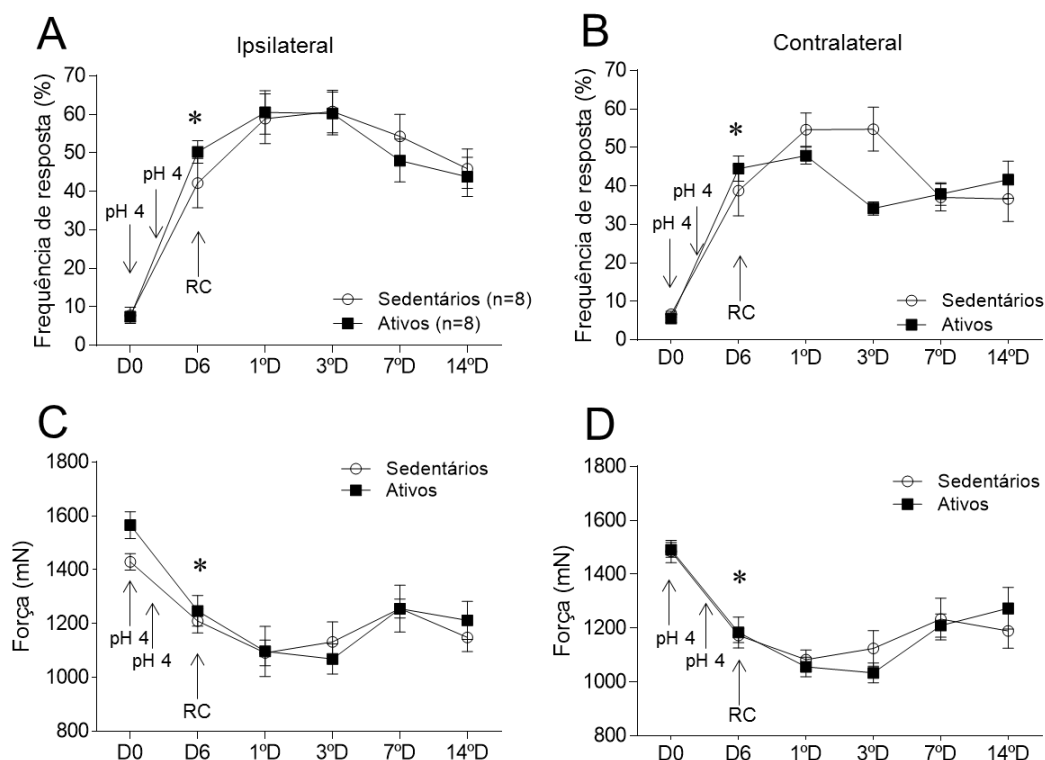


Figura 7. Sensibilidade mecânica da pata (A e B) e limiar de retirada do músculo (C e D) de animais sedentários ou fisicamente ativos (Ativos), expressos em porcentagem (%) de frequência de resposta e em força (mN), respectivamente, em tempos sequenciais durante duas semanas de atividade física. D0= basal, antes da primeira injeção; D6= 24h após a segunda injeção, antes da atividade física; 1ºD, 3ºD, 7ºD, 14ºD= 1, 3, 7 e 14 dias, respectivamente, após a indução do modelo e início da atividade física; pH 4= injeção de salina ácida; RC= início da atividade física na roda de corrida. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. *Diferente do basal (D0) (em ambos os grupos ativos e sedentários), $p < 0,05$. ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey.

No protocolo 2, verificou-se o efeito de duas semanas de atividade física voluntária mais exercício adicional no tratamento da DMCD. Vinte e quatro horas após a segunda injeção de salina ácida (D6), houve aumento significativo da frequência de resposta das patas e diminuição significativa do limiar de retirada do músculo, bilateralmente, dos animais sedentários (SDT) e ativos (AFT+EA) em comparação ao momento basal (D0) ($p < 0,0001$), indicando que ocorreu a indução da DMCD (Fig. 8). Porém, duas semanas (14ºD) após atividade física mais EA, não houve alteração significativa da frequência de resposta das patas (ipsi: $53,5 \pm 17,1\%$; contra: $52,5 \pm 23,2\%$) e nem do limiar de retirada do músculo (ipsi: $1058 \pm 122,3$ mN; contra: $1077 \pm 114,2$ mN) dos animais do grupo AFT+EA quando comparado ao momento pré-tratamento (D6) (ipsi: $51,2 \pm 11,7\%$; contra: $52,5 \pm 19,2\%$; $p > 0,05$) (Fig. 8A e 8B) (ipsi: 1106 ± 139 mN; contra: 1193 ± 533 mN) (Fig. 8C e 8D).

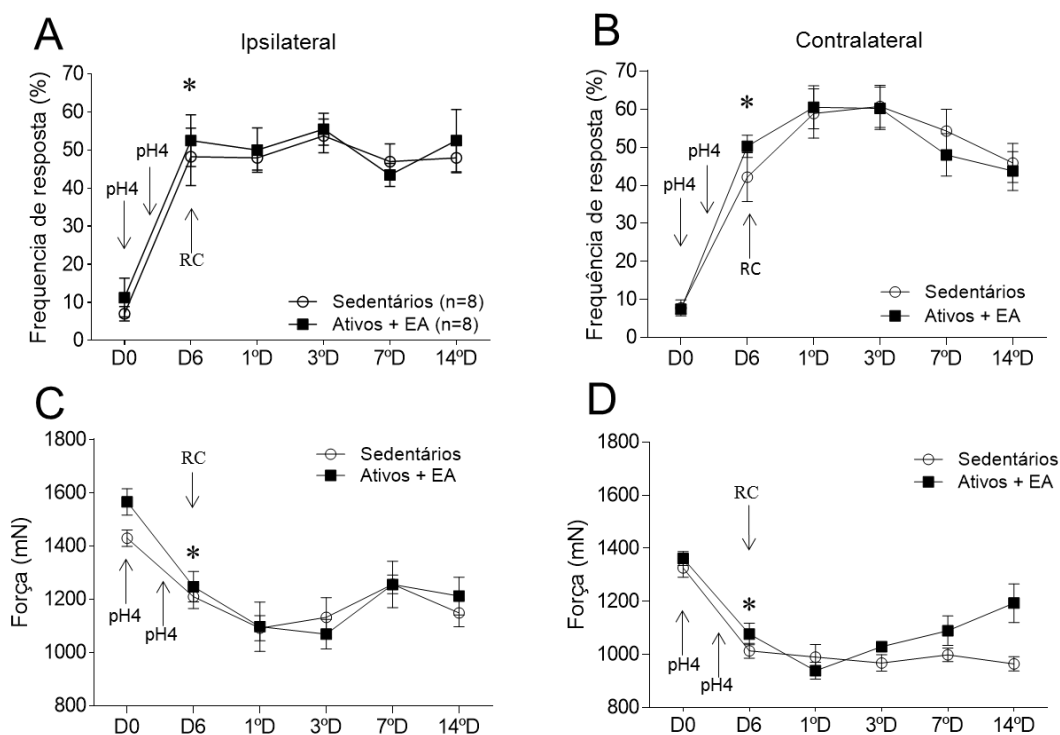


Figura 8. Sensibilidade mecânica da pata (A e B) e limiar de retirada do músculo (C e D) de animais sedentários ou fisicamente ativos (Ativos + EA), expressos em porcentagem (%) de frequência de resposta e em Força (mN), respectivamente, em tempos sequenciais durante duas semanas de atividade física mais exercício adicional. D0= basal, antes da primeira injeção; D6= 24h após a segunda injeção, antes da atividade física; 1ºD, 3ºD, 7ºD, 14ºD= 1, 3, 7 e 14 dias, respectivamente, após a indução do modelo e início da atividade física. pH 4= injeção de salina ácida; RC= início da atividade física na roda de corrida. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. *Diferente do basal (D0) (em ambos os grupos ativos e sedentários), $p < 0,05$. ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey.

No protocolo 3, foi avaliado o efeito de duas semanas de atividade física voluntária na prevenção do desenvolvimento da DMCD. 24 horas após a segunda injeção de salina ácida (D6), houve um aumento significativo da frequência de resposta das patas dos animais sedentários (SDP2) (ipsi: $39,1 \pm 11\%$; contra: $46 \pm 11,7\%$), mas não dos animais ativos (AFP2) (ipsi: $12,5 \pm 9\%$; contra: $20,8 \pm 10,7\%$), em comparação ao momento pós-atividade física, porém antes da indução do modelo (D0) (SDP2 ipsi: $8,4 \pm 8,1\%$; contra: $10 \pm 6\%$; $p < 0,0001$) (AFP2 ipsi: $2,5 \pm 0,5\%$; contra: $4,7 \pm 2,4\%$; $p = 0,56$) (Fig. 9A e 9B), indicando que o desenvolvimento da DMCD foi prevenido nos animais ativos. Além disso, a frequência de resposta das patas ao estímulo nocivo foi significativamente menor nos animais que fizeram atividade física, bilateralmente, quando comparado aos animais do grupo SDP2 (ipsi: $p = 0,004$ / contra: $p = 0,03$). Esse efeito preventivo durou por até 3 (D8/ 8 dias após interromper a AF) e 4 dias (D9/ 9 dias

após interromper a AF) após a segunda injeção, na pata ipsilateral ($p<0,005$) e contralateral ($p<0,01$), respectivamente (Fig. 9A e 9B).

Quanto ao limiar de retirada do músculo, ocorreu diminuição significativa em ambos os grupos SDP2 e AFP2 24 horas após a segunda injeção de salina ácida (D6), quando comparado ao momento pós-atividade física, antes da indução do modelo (D0) ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos AFP2 (ipsi: 1421 ± 258 mN/ contra: 1421 ± 258 mN) e SDP2 (ipsi: 1328 ± 216 mN/ contra: 1223 ± 196 mN) ($p=0,13$) 24 horas após segunda injeção (D6) (Fig. 9C e 9D).

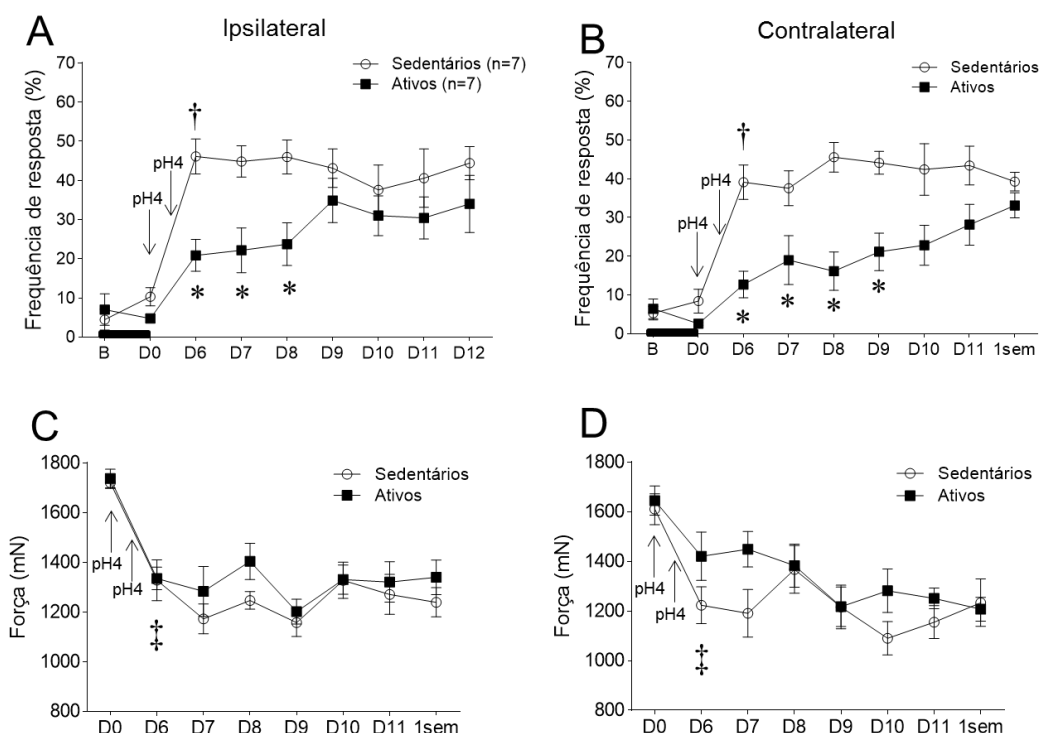


Figura 9. Sensibilidade mecânica da pata (A e B) e limiar de retirada do músculo (C e D) de animais sedentários ou fisicamente ativos, expressos em porcentagem (%) Frequência de resposta e em Força (mN), respectivamente, em tempos sequenciais durante 1 semana após indução do modelo (13 dias após interrupção da atividade física). B= basal, antes da atividade física; D0= depois da atividade física, antes da primeira injeção; D6, D7, D8, D9, D10, D11, 1sem= 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias, respectivamente, após a segunda injeção. pH 4= injeção de salina ácida. Dados apresentados como média±erro padrão da média. *Diferente do D0 (sedentários), $p<0,05$. †Diferente do grupo sedentário, $p<0,02$. ‡ Diferente do D0 para ambos os grupos, $p<0,05$ ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey.

No protocolo 4, o grupo de animais fisicamente ativos por quatro semanas (AFP4) apresentou, 24 horas após a segunda injeção de salina ácida, frequência de respostas ao estímulo mecânico da pata significativamente menor, bilateralmente (ipsi: $17 \pm 13\%$; contra: $23 \pm 21\%$), quando comparado ao grupo controle SDP4 ($n=8$) (ipsi: $41 \pm 19\%$ / contra: $48 \pm 21\%$; $p<0,05$), (Fig. 10A e 10B). Em contrapartida, não houve diferença no limiar de retirada do músculo entre os grupos AFP4 (ipsi: 1095 ± 104 mN/ contra: 1064 ± 143 mN) e SDP4 (ipsi: 1024 ± 76 mN/ contra: 1050 ± 135 mN; $p>0,083$), (Fig. 10C e 10D). Além disso, quatro semanas de atividade na roda de corrida preveniu o aumento da frequência de respostas da pata por até 5 dias (D10) após a indução da hiperalgesia, em ambas as patas (ipsi: $p<0,02$ / contra: $p<0,01$) (Fig. 10A e 10B).

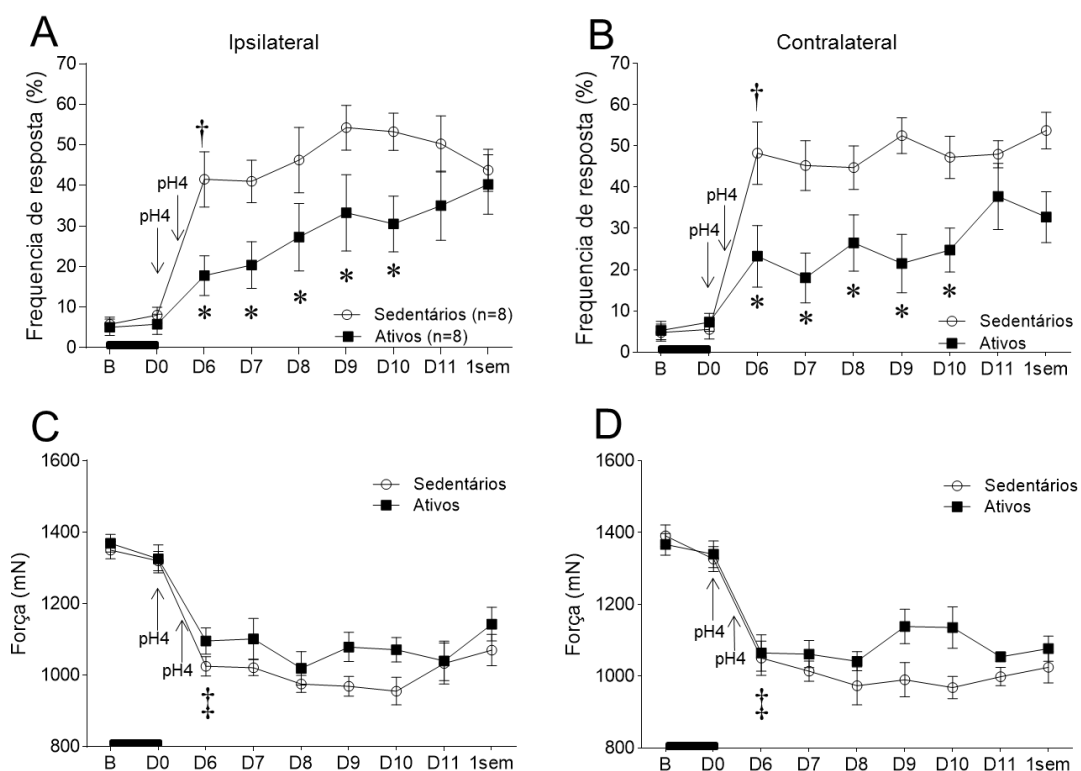


Figura 10. Curso temporal do efeito de 4 semanas de atividade física regular na sensibilidade mecânica da pata (A e B) e no limiar de retirada do músculo (C e D) de animais sedentários ou fisicamente ativos, expressos respectivamente em porcentagem (%) de frequência de resposta e em Força (mN), antes e após indução do modelo dor muscular crônica. B= basal, antes da atividade física; D0= depois da atividade física, antes da primeira injeção; 24h, D7, D8, D9, D10, D11, 1sem= 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias, respectivamente, após a indução do modelo. Dados apresentados como média±erro padrão da média. *Diferente do D0 (sedentários), $p<0,05$. †Diferente do grupo sedentário, $p<0,02$. ‡ Diferente do D0 para ambos os grupos, $p<0,05$ ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey.

5.1.1 Diferenças sexuais na resposta comportamental

Na tabela 1, verifica-se que não houve diferença entre camundongos machos e fêmeas no que diz respeito ao desenvolvimento da hiperalgesia mecânica primária e secundária após a indução de DMCD, tanto em animais sedentários como em fisicamente ativos. Vinte e quatro horas após a segunda injeção (D6), os camundongos sedentários de ambos os sexos apresentaram, de forma similar, aumento significativo no número de respostas da pata ($p < 0,05$, ipsilateral e contralateral) e uma diminuição significativa no limiar de retirada do músculo ($p < 0,05$, ipsilateral e contralateral), enquanto que os animais fisicamente ativos machos e fêmeas apresentaram similarmente prevenção significativa do aumento das respostas da pata ($p < 0,05$) ao estímulo mecânico nocivo, sem alterações significativas do limiar de retirada do músculo, em relação ao momento basal. Não houve diferença significativa entre os sexos. Ainda, 24 horas após a segunda injeção (D6), a frequência de respostas da pata de camundongos sedentários foi significativamente maior comparada aos animais ativos ($p > 0,05$). Da mesma maneira, não houve efeito significativo para o sexo.

Tabela 1. Frequência de resposta da pata e limiar de retirada do músculo à estimulação mecânica nociceptiva antes (Basal) e 24h após a indução de dor muscular crônica difusa (D6), em camundongos sedentários ou fisicamente ativos machos, em comparação a fêmeas.

Medida de desfecho	Lado	Sedentários		Ativos	
		Macho (n=7)	Fêmea (n=7)	Macho (n=7)	Fêmea (n=7)
Basal: frequência de resposta da pata (número de respostas 0-10)	Ipsilateral	1,08 ± 0,76	0,65 ± 0,56	0,65 ± 0,65	0,22 ± 0,29
	Contralateral	0,65 ± 0,80	0,62 ± 0,52	0,74 ± 0,63	0,34 ± 0,23
Basal: limiar de retirada do músculo (mN)	Ipsilateral	1369 ± 66,0	1302 ± 61,3	1349 ± 62,5	1274 ± 109
	Contralateral	1323 ± 106	1340 ± 84,2	1393 ± 71,3	1254 ± 105
D6: frequência de resposta da pata (número de respostas 0-10)	Ipsilateral	3,51 ± 1,90	4,28 ± 1,69	1,97 ± 1,33	1,51 ± 1,21
	Contralateral	3,80 ± 1,90	5,48 ± 0,18	2,71 ± 1,53	1,97 ± 1,53
D6: limiar de retirada do músculo (mN)	Ipsilateral	1077 ± 158	1062 ± 94,8	1212 ± 143	1140 ± 153
	Contralateral	1038 ± 120	1041 ± 135	1254 ± 136	1173 ± 134

Valores expressos em média ± EPM.

5.2 Volume de Atividade Física

Para cada protocolo, foi calculada a média da distância diária percorrida (em metros) pelos animais, na roda de corrida (figura 11). Os animais do grupo AFT (hiperalgésicos), que realizaram duas semanas de atividade física após indução da hiperalgesia, correram uma distância diária significativamente menor ($1,977 \pm 576$ m; IC 95%: 615-3340) que os animais saudáveis dos grupos AFP2 ($4,936 \pm 555$ m; IC 95%: 3578-6294 / $p < 0,02$) e AFP4 ($5,751 \pm 771$ m; IC 95%: 3927-7575 / $p < 0,001$); porém, não houve diferença significativa quando comparados aos animais hiperalgésicos que realizaram atividade física por 2 semanas + exercício adicional (AFT+EA) ($3,528 \pm 691$; IC 95%: 1894-5162/ $p > 0,05$).

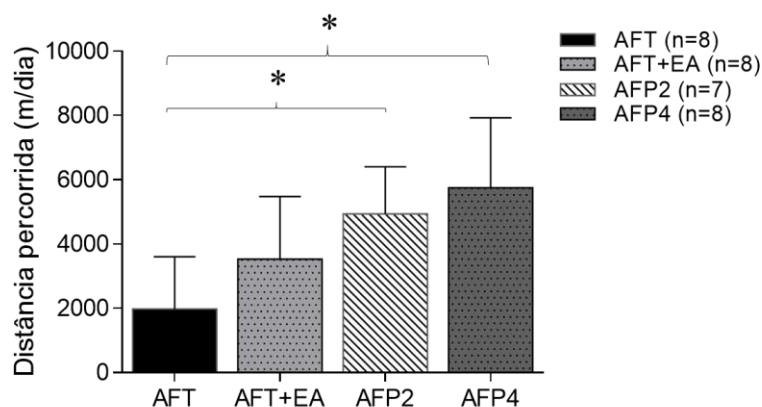


Figura 11. Distância diária percorrida pelos animais dos diferentes protocolos de atividade física, expressa em metros (m/dia). AFT= duas semanas de atividade física após indução de DMCD; AFT+EA= duas semanas de atividade física mais exercício adicional após indução de DMCD; AFP2= duas semanas de atividade física antes da indução de DMCD; AFP4= quatro semanas de atividade física antes da indução. Dados apresentados como média±erro padrão da média. *Diferente do grupo AFT, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey.

No que diz respeito às diferenças entre machos e fêmeas no volume de corrida, a figura 12 mostra que, ao longo de quatro semanas, os camundongos saudáveis fêmeas percorreram distância diária significativamente maior na primeira (6750 ± 626 ; IC 95%: 5141-8360), segunda (7661 ± 838 ; IC 95%: 5506-9816) e quarta semana (8008 ± 495 ; IC 95%: 6734-9282), quando comparados aos machos saudáveis (7 dias: 3236 ± 669 ; IC 95%: 1515-4957; $p = 0,004$ / 14 dias: 4715 ± 910 ; IC 95%: 2375-7054; $p = 0,01$ / 28 dias: 4186 ± 391 ; IC 95%: 3180-5191; $p = 0,002$) (figura 12).

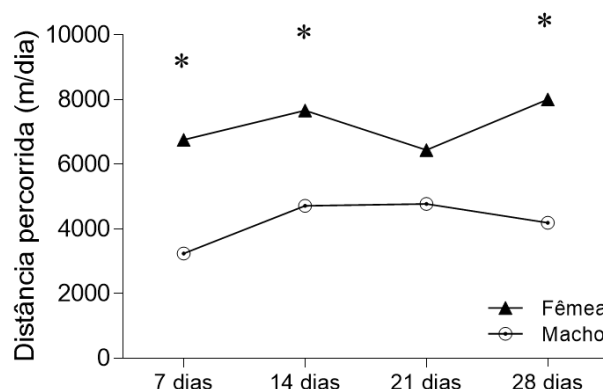


Figura 12. Distância diária percorrida por animais saudáveis machos e fêmeas, expressa em metros (m/dia), durante quatro semanas de atividade física. 7, 14, 21 e 28 dias = primeira, segunda, terceira e quarta semana de atividade física. Dados apresentados como média±erro padrão da média. *Diferente do grupo de machos, $p < 0,05$. ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey.

5.3 Imunofluorescência

A dupla-imunofluorescência para CREB e CREB fosforilado foi realizada nos grupos SDP4 ($n=5$), AFP4 ($n=5$) e em um grupo *naive* ($n=5$), 24h após indução do modelo, para examinar: 1) áreas corticais envolvidas com o desenvolvimento do modelo de DMCD e 2) modulação da atividade neuronal do córtex cerebral pela atividade física. Os animais sedentários (SDP4) com DMCD tiveram número significativamente maior de neurônios positivos para CREB/pCREB ($p < 0,03$) em todas as áreas analisadas, bilateralmente, quando comparados aos animais *naive* (Figura 13).

Quando comparados aos sedentários, os animais fisicamente ativos apresentaram quantidade significativamente menor de neurônios marcados com CREB/pCREB, bilateralmente, no CCA ($p=0,001$), CI ($p < 0,001$) e na amígdala esquerda ($p=0,04$) 24 h após indução do modelo de DMCD (Figura 13). O número de neurônios positivos para CREB/pCREB nos animais fisicamente ativos (Figura 14C, 14F e 14I) foi menor comparado ao grupo SDP4 (Figura 14B, 14E e 14H), porém significativamente mais alto quando comparado ao grupo *naive* ($p < 0,05$) (Figura 14A, 14D, 14G). Assim, a atividade física regular impediu o aumento da expressão de CREB e a fosforilação de CREB que ocorreu em animais sedentários em resposta à indução de dor muscular crônica.

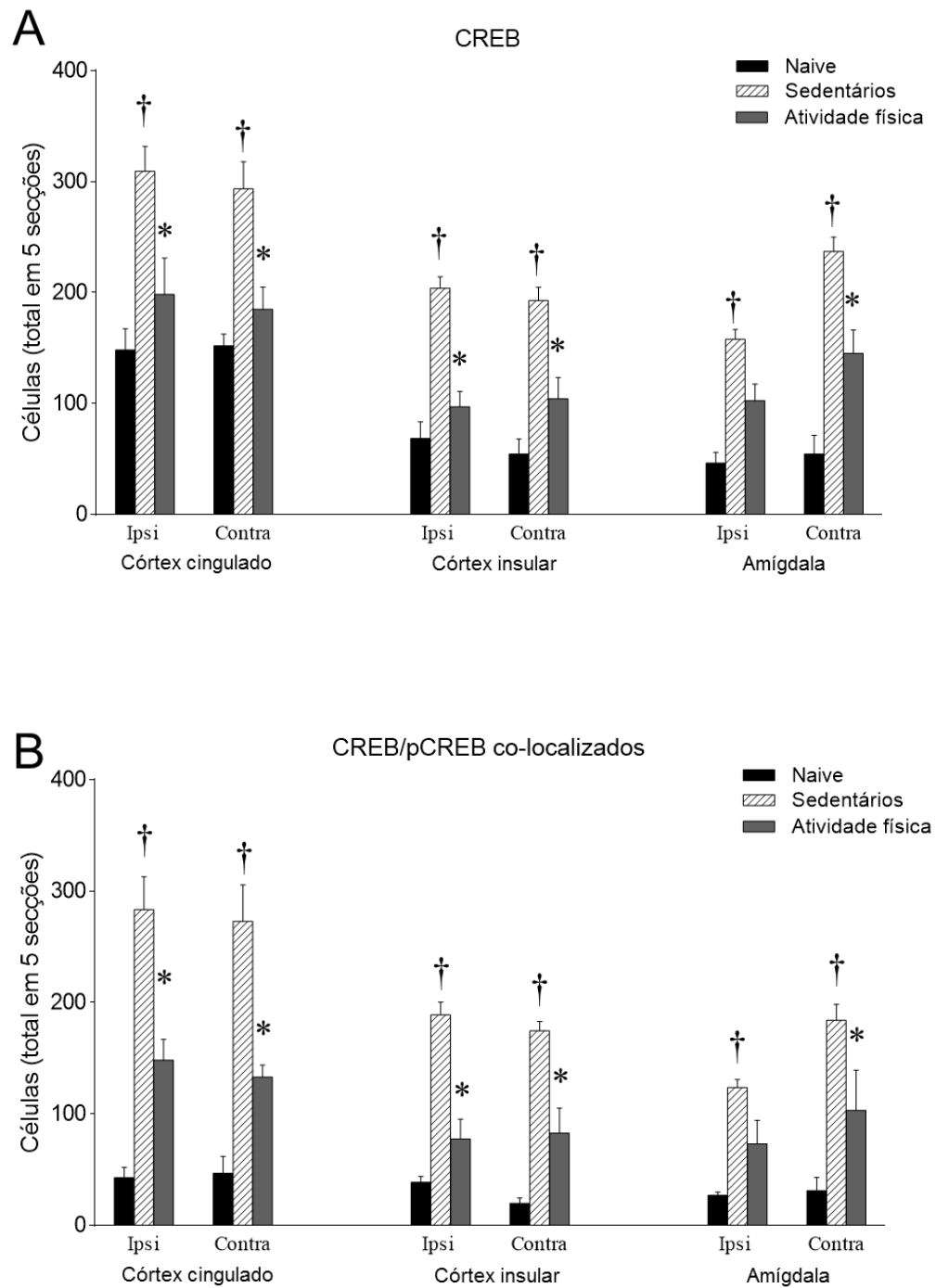
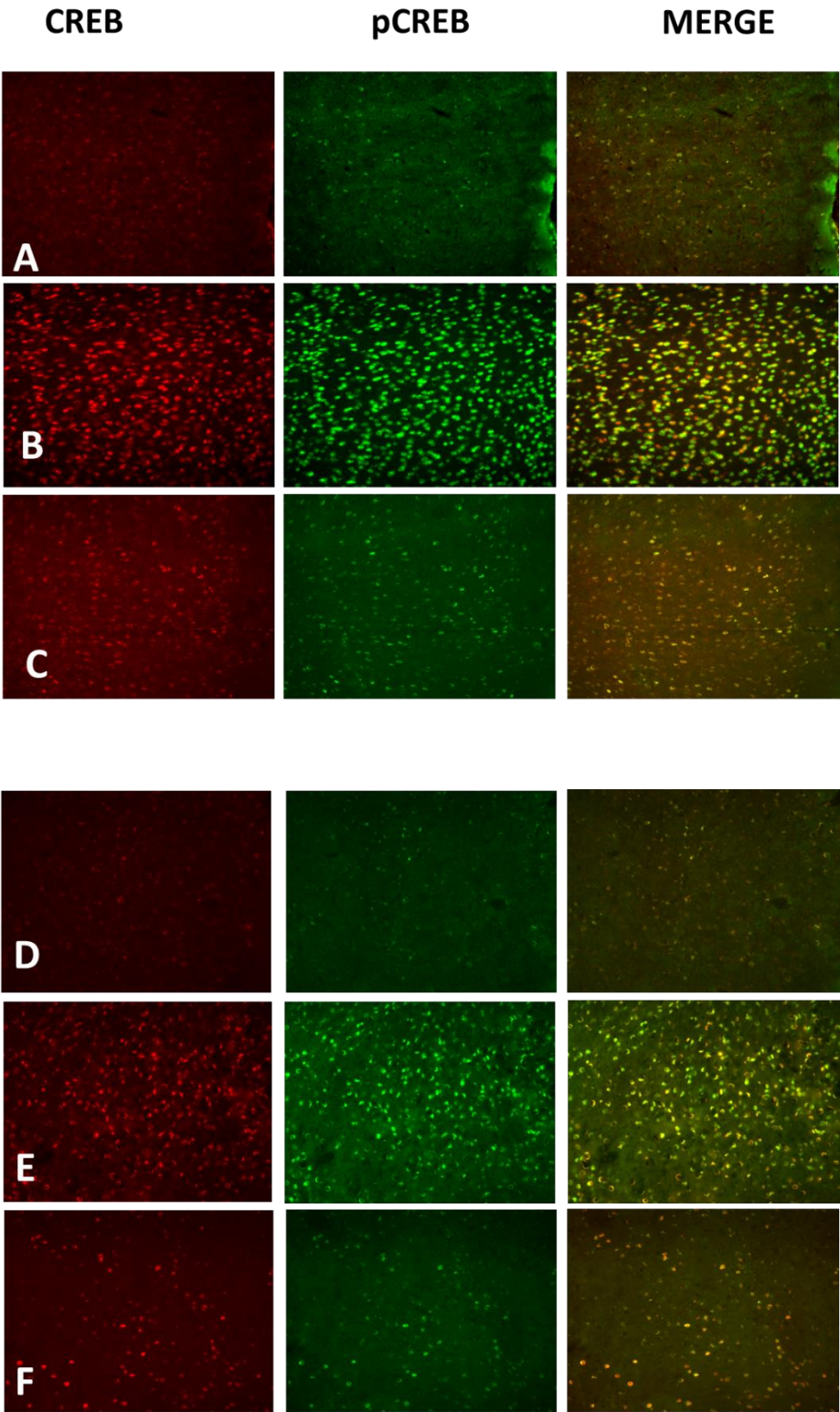


Figura 13. Imunofluorescência para CREB e CREB fosforilado. Os gráficos mostram o número médio de células em cinco secções expressando A) CREB e B) CREB/pCREB co-localizados nas seguintes áreas cerebrais: córtex cingulado anterior - CCA, córtex insular-CI e amígdala central – ACe. Ipsi: ipsilateral a solução salina pH 4,0 (córtex direito). Contra: contralateral a solução salina pH 4 (córtex esquerdo). *Indica diferença em relação ao grupo Sedentário ($p < 0,05$). †Indica diferença em comparação ao grupo Naive ($p < 0,05$). Os dados são médias $\pm$ EPM.



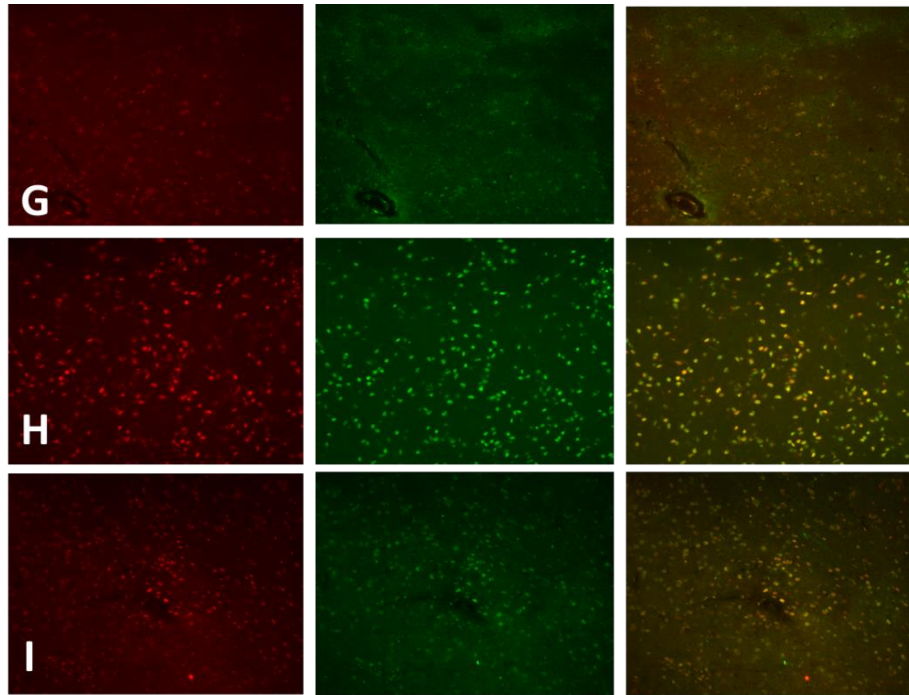


Figura 14. Fotomicrografias representativas de imunomarcção de CREB (vermelho), pCREB (verde) e merge (CREB + pCREB) das células do córtex cingulado anterior (A, B e C), córtex insular (D, E e F) e amígdala central (G, H e I). Note-se que os níveis de CREB e pCREB são significativamente alterados pela atividade física (C, F e I), em comparação com o grupo sedentário (B, E e H). A, D e G: grupo naïve. Bar = 0 μ m.

6 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo, duas semanas de atividade física (AF) nas rodas de corrida ou duas semanas de atividade física + exercício não-espontâneo não reverteram ou diminuíram a hiperalgesia primária e/ou secundária em modelo de dor muscular crônica difusa (DMCD). Por outro lado, duas ou quatro semanas de AF voluntária nas rodas de corrida preveniu o aumento das respostas nociceptivas à estimulação mecânica da pata (hiperalgesia secundária), sem alterações na hiperalgesia primária. Esse efeito protetor da atividade física durou por até 4-5 dias após a indução do modelo (10-11 dias após a interrupção da AF).

Ademais, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, a ativação de regiões corticais específicas envolvidas em estímulos nociceptivos após a indução de DMCD. Especificamente, houve aumento da expressão de CREB e de CREB fosforilado (p CREB) nos córtices cingulado anterior (CCA), insular (CI) e amígdala central (ACe). Mostramos, ainda, que a AF de quatro semanas impede o aumento de CREB e pCREB em locais corticais normalmente observados em animais sedentários com DMCD. Assim, de acordo com estes dados, a dor muscular crônica ativa os neurônios corticais e este aumento da atividade neuronal é impedido pela AFR.

6.1) Atividade física voluntária no tratamento da dor crônica

Em estudos com humanos, os resultados da atividade física terapêutica (ie, iniciada após lesão) nas populações com dor crônica são mistos, principalmente devido às diferenças no tipo de dor, no tipo de exercício e na intensidade ou duração do exercício (Fingleton et al. 2017; Nijs et al. 2012; Koltyn 2000). Por outro lado, estudos com animais mostram expressivos efeitos analgésicos do exercício no tratamento de diferentes modelos de dor crônica e usando variadas durações de exercício (Bement and Sluka 2005; Bobinski et al. 2011; Cobiachi et al. 2010; Chen et al. 2015). No presente trabalho, no entanto, duas semanas de atividade física voluntária nas rodas de corrida não reverteu ou diminuiu a hipersensibilidade mecânica do músculo (hiperalgesia primária) e/ou da pata (hiperalgesia secundária) em modelo de DMCD.

Poucos estudos investigaram os efeitos da atividade física voluntária no tratamento da dor persistente (Grace et al. 2016; Koltyn 2000; Mathes and Kanarek 2006; Sheahan et al. 2015; Smith and Yancey 2003). Sheahan et al. (2015) mostraram que duas semanas de atividade voluntária foi incapaz de reverter a hipersensibilidade mecânica em modelos animais de dor neuropática e dor aguda induzida por formalina, corroborando nossos resultados (Sheahan et

al. 2015). Em contrapartida, Smith e Yancey (2003) e Mathes e Kanarek (2006) mostraram que a AF na roda de 3-6 semanas reduziu hiperalgesia térmica, porém nesses estudos, foram utilizados animais saudáveis (Mathes and Kanarek 2006; Smith and Yancey 2003).

A AF na roda de corrida tem mostrado induzir adaptações fisiológicas semelhantes ao exercício forçado (corrida na esteira, natação) que são eficazes na atenuação da dor. Exemplos destas adaptações incluem aumento da expressão de opióides endógenos, bem como expressão alterada de fatores de crescimento (Stagg et al. 2011; Bement and Sluka 2005; Hoffmann et al. 1990; Almeida et al. 2015). Diferente de grande parte da literatura existente, optamos por utilizar o exercício voluntário em oposição ao exercício forçado. Em modelos animais de dor, exercícios de corrida na esteira e exercícios de natação aumentam latência térmica e limiar mecânico (Terman et al. 1986; Cobiañchi et al. 2010; Stagg et al. 2011; Abdelhamid and Sluka 2015). Contudo, é possível que os efeitos analgésicos observados nesses tipos de exercícios forçados sejam, pelo menos em parte, mediados por mecanismos analgésicos induzidos pelo estresse (Cook et al. 2013; McLoughlin et al. 2011; Koltyn 2000) como a ativação dos sistemas serotoninérgicos e opióides endógenos (Yesilyurt et al. 2015).

Em modelo animal de dor crônica inflamatória induzido por injeção intra-articular de Adjuvante de Freund Completo (CFA), a AF na roda de corrida reduziu a hipersensibilidade térmica das patas e diminuiu o comportamento de estresse dos animais, concomitantemente à redução dos níveis plasmáticos de corticosterona (Pitcher et al. 2017). Além disso, em modelo de DMCD, a corrida voluntária na roda não induziu aumentos nos marcadores de estresse crônico: hipertrofia da glândula adrenal ou aumento do conteúdo de catecolamina no ventrículo esquerdo do coração (Rupp 1989). Assim, uma vez que a AF é pensada para não causar estresse, o efeito analgesia-induzida por estresse deve ser amenizado nesse tipo de exercício (Binder et al. 2004).

Pesquisas clínicas (Fingleton et al. 2017; Koltyn et al. 2013; Groover et al. 2013) mostram que a falta de efeito do exercício em pacientes com dor crônica pode estar relacionada com perda da modulação condicionada da dor e aumento da somação temporal comum nessa população, o que significa falta de inibição e aumento de excitabilidade nos mecanismos centrais de modulação da dor. De fato, no modelo animal de DMCD, a hiperalgesia é mantida por aumento na liberação de aminoácidos excitatórios na medula espinhal e na região rostral ventromedial do bulbo (RVM) (Skyba et al., 2002; da Silva et al., 2010 a,b), redução da liberação de serotonina e expressão aumentada do transportador de serotonina no tronco cerebral (Bobinski et al. 2015). Além disso, em animais com dor neuropática, a analgesia

induzida por exercício é evitada pela diminuição de serotonina (Bobinski et al. 2015). Assim, esse desequilíbrio na magnitude de excitação e inibição no sistema nociceptivo do SNC talvez possa implicar na ausência de respostas da AF na hiperalgesia.

É possível que a AF de duração maior que duas semanas seja necessária para induzir mudanças plásticas que reduzam a hiperexcitabilidade central desse modelo e, conseqüentemente, a hiperalgesia mecânica após a injeção de salina ácida. O exercício voluntário por duas semanas nas rodas de corrida não teve efeito na reversão de dor neuropática em camundongos (Sheahan et al. 2015). Groover et al. (2014) observaram que a hipersensibilidade mecânica e visceral induzida por neuropatia pré-diabética foi revertida após 8 semanas de exercício voluntário da roda (Groover et al. 2013). Porém, uma vez que o modelo animal do presente estudo dura apenas quatro semanas e começa a apresentar diminuição espontânea da hiperalgesia a partir da terceira semana após a sua indução, aumentar a duração da AF nesse modelo pode confundir a interpretação dos resultados da hiperalgesia mecânica. De forma interessante, estudos mostram que a atividade física voluntária na roda de 4-6 semanas de duração produz tolerância cruzada entre agonista mu-opiídeo e dependência física, efeitos semelhantes aos resultantes do uso crônico de opióides (Smith and Yancey 2003; Kadetoff and Kosek 2007).

No presente estudo, os animais que foram expostos à roda de atividade física após indução da hiperalgesia (protocolo 1) realizaram volume significativamente menor de atividade física, ou seja, correram distância diária menor dentro do mesmo intervalo de tempo (2 semanas) do que os animais saudáveis que correram na roda (protocolo 3). Em modelo animal de dor inflamatória, houve uma diminuição da corrida na roda após injeções subcutâneas de CFA nas patas traseiras (bilaterais), provavelmente refletindo a dor evocada pelo uso dos membros afetados (Grace et al. 2014). No nosso estudo, o modelo animal utilizado é caracterizado por dor não-inflamatória, o que sugere que o desempenho do animal durante a atividade de corrida pode estar sendo interferido pela hiperalgesia secundária (mantida centralmente).

O aumento do volume de AF pela adição de exercício não-espontâneo (protocolo 2) também não induziu alterações na hiperalgesia primária e/ou secundária. Em um modelo de dor neuropática, cinco semanas de corrida na esteira com diferentes frequências e intensidades reverteram a hiperalgesia de maneira intensidade-dependente (Stagg et al. 2011). Apesar disso, estudo recente verificou, utilizando análise de regressão linear, que não há relação significativa entre quantidade de atividade física voluntária e grau de melhoria na dor (hipersensibilidade

térmica) em modelo animal de dor inflamatória (Sheahan et al. 2015), corroborando os nossos resultados. Assim, é possível que fosse necessária mudança em outros parâmetros de exercício, como aumento da duração (semanas) da atividade física, para induzir alterações de longo prazo na sensibilização central, revertendo a hiperalgesia nesse modelo de DMCD.

6.2) Atividade física voluntária na prevenção da dor crônica

Grandes estudos populacionais mostram que as pessoas que são mais fisicamente ativas têm menor risco de desenvolvimento de dor musculoesquelética crônica (Mork et al. 2014; Landmark et al. 2013; Clauw 2014). No presente estudo com modelo animal de DMCD, duas ou quatro semanas de atividade física regular preveniu o aumento das respostas nociceptivas à estimulação mecânica das patas (hiperalgesia secundária) por até 4-5 dias após a indução do modelo, sem alterações no desenvolvimento do limiar de retirada do músculo (hiperalgesia primária).

Estudos prévios investigaram o efeito dependente da duração da atividade na roda de corrida na prevenção da dor. A atividade física de oito semanas preveniu o desenvolvimento de hiperalgesia primária e secundária em modelo de DMCD (Sluka et al. 2013; Sabharwal et al. 2015), e seis semanas de AF preveniu o desenvolvimento de alodinia (hiperalgesia secundária) durante aproximadamente três meses da lesão em modelo de dor neuropática (Grace et al. 2016). No presente estudo, duas ou quatro semanas de atividade física nas rodas de corrida impediram parcialmente a hiperalgesia secundária (impediu o aumento das respostas da pata ao estímulo nocivo), mas não teve efeito na hiperalgesia primária. Em contrapartida, o exercício voluntário de cinco dias nas rodas de corridas não teve efeito na prevenção da DMCD (Sluka et al. 2013). Desta forma, apesar de maior tempo de exercício levar a melhores resultados na prevenção da dor, evidencia-se que um tempo moderado (de duas ou quatro semanas) de atividade física regular parece ser suficiente para induzir efeitos preventivos contra a dor central (secundária).

Nesse modelo animal de DMCD, potenciais mecanismos de ação modulam a sensibilidade periférica do músculo nesses animais, tais como ativação de canais de íons sensíveis a ácido (ASIC) 3 e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Gregory et al. 2016). Estudo de Leung et al. (2016) mostrou que oito semanas de AF preveniu o desenvolvimento de hiperalgesia primária e secundária, juntamente ao aumento da expressão de macrófago

muscular de fenótipo regulatório (M2) e aumento de interleucina-10, uma citocina anti-inflamatória que reduz a sensibilização de nociceptores. Por outro lado, não foi observada redução da porcentagem de macrófagos de fenótipo clássico (M1) (pró-inflamatórios). Ainda, nesse mesmo estudo, o período de cinco dias de exercício não foi capaz de induzir nenhuma dessas alterações (Leung et al. 2015). No presente estudo, duas ou quatro semanas de AF nas rodas não preveniu o desenvolvimento da hiperalgesia primária (muscular), completa ou parcialmente, indicando que talvez seja necessário um tempo maior capaz de induzir adaptações fenotípicas no local da lesão e prevenir a hiperalgesia primária em modelo animal de dor muscular crônica.

No presente estudo, também foi verificado que após quatro semanas de AF voluntária, os camundongos fêmeas correm volume maior de corrida do que os machos. Apesar disso, não houve diferença entre os sexos no desenvolvimento da hiperalgesia primária e secundária após a indução de DMCD, tanto para os animais fisicamente ativos como para os sedentários.

Quando avaliada a influência do sexo na AF, estudos mostram que as fêmeas são mais ativas do que os roedores do sexo masculino. É bem estabelecido que o hormônio sexual estrogênio rege a atividade na roda de corrida em roedores. As fêmeas gonadalmente intactas mostram maior atividade física durante o proestro, quando os níveis plasmáticos de estrogênio são elevados. Especificamente, estudos apontam os efeitos do receptor de estrogênio alfa (Garey et al. 2001; Ogawa et al. 2003) como mecanismo desta regulação, e a sua via de sinalização parece modular vários neurotransmissores, incluindo dopamina e/ou serotonina (Morgan et al. 2004; Quinlan et al. 2013). Além disso, a interrupção de estrogênio através de inibição farmacológica ou ovariectomia resulta em déficits de comportamentos de prazer dopamina-dependentes (Quinlan et al. 2013). Assim, distúrbios do receptor de estrogênio alfa ou das vias de sinalização de estrogênio em fêmeas podem suprimir a sinalização de dopamina e resultar em condições de inatividade física, uma vez que a AF é modulada pela liberação de endorfinas e outros opióides endógenos. Lightfoot et al. (2004) observaram que camundongos fêmeas tiveram volume de AF em média 20% maior do que os machos (Lightfoot et al. 2004), corroborando nossos resultados que mostram maior quantidade de AF realizada pelas fêmeas, quando comparadas aos machos.

6.3) Ativação cortical e dor crônica

Estudos clínicos utilizando ressonância magnética funcional (fMRI) ou tomografia por emissão de pósitrons mostram a excitabilidade cortical aumentada em condições de dor crônica

(Mhalla et al. 2010; Castillo Saavedra et al. 2014). Hsieh et al 1995 encontraram atividade neuronal aumentada no CI anterior, assim como no CCA, em pacientes com dor neuropática crônica (Hsieh et al. 1995).

Aumento da atividade do receptor de glutamato, mGluR5, na amígdala induz hipersensibilidade mecânica tanto na ausência de lesão como em um modelo de dor visceral (Kolber et al. 2010; Crock et al. 2012). Em um modelo de dor de artrite, mudanças plásticas do receptor de glutamato mGluR1, na amígdala, induz dor persistente (Ji and Neugebauer 2014). Além disso, aumento generalizado da atividade glial em áreas corticais que processam estímulos nociceptivos (córtices somatossensorial, motor, pré-frontal, cingulado e insular) persistem no animal adulto após lesão tecidual induzida em período neonatal (Sanada et al. 2014).

No presente estudo, foi verificada a ativação do CCA, CI e da ACe em modelo animal de DMCD, avaliada pela maior expressão de CREB e pCREB. Estudos anteriores mostram aumento da imunorreatividade para o p-CREB na medula espinhal que é paralelo à hiperalgesia neuropática (Song et al. 2005), inflamatória (Sluka 2002), e em modelo de DMCD (Hoeger-Bement and Sluka 2003). Estudo utilizando camundongos transgênicos mostra que superexpressão de CREB dominante em regiões corticais, incluindo amígdala e hipocampo, contribui para alodinia comportamental em modelos animais de dor inflamatória ou neuropática crônica (Descalzi et al. 2012). Em modelo de DMCD, as aferências nociceptivas aumentam os níveis de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) fosforiladas na amígdala central e nos neurônios do tálamo paraventricular, para aumentar a transmissão pós-sináptica (Chen et al. 2010). Zhuo (2014) e Yang (2015) mostraram que a regulação de receptores de glutamato nos neurônios do CCA e a subsequente ativação dos genes de expressão imediata ERK/CREB modula a dor neuropática em animais (Yang et al. 2015) (Zhuo 2014). Isto está de acordo com o estudo atual, indicando que a ativação da via de sinalização de CREB em áreas corticais pode parcialmente explicar a modulação de sensibilização central e dor crônica em animais.

Enquanto as áreas somatossensoriais do córtex estão mais estritamente relacionadas com a intensidade da dor, inclusive na dor crônica, estudos identificaram que o CCA, o CI e a amígdala estão envolvidos nos componentes afetivos da dor (Bushnell et al. 2013; Leknes and Tracey 2008; Rainville et al. 1997). Em pacientes com fibromialgia, a magnitude de ativações neuronais induzidas pela dor em regiões cerebrais de processamento da dor afetiva (amígdala e insula anterior contralateral) estão associadas a sintomas de depressão (Giesecke et al. 2005).

Além disso, respostas cerebrais a estímulos sensoriais em regiões envolvidas com aspectos emocionais da experiência da dor, como o CPF, CCA e CI, estão aumentadas na fibromialgia.

No estado de dor crônica, a amígdala, especialmente seu núcleo central (ACe), contribui para o aumento da intensidade de dor, ou seja, hiperalgesia, mas também para os sintomas de ansiedade e depressão resultantes da experiência de dor persistente (Veinante et al. 2013; Neugebauer et al. 2004). Já os neurônios do CCA podem ser ativados em condições emocionais relacionadas à dor, tais como evitação de estímulos nocivos, sensação desagradável e tristeza (Navratilova et al. 2015; Zhuo 2008; Fuchs et al. 2014). Por outro lado, lesões do córtex somatossensorial revertem a hipersensibilidade mecânica das patas posteriores em camundongos, mas não previnem os comportamentos de evasão-evitação em modelo animal (Uhelski et al. 2012). No presente estudo, observamos aumento da ativação de áreas do sistema límbico no modelo de dor crônica, o que sugere, pelo menos em parte, que as áreas corticais afetivo-cognitivas podem modular a dor muscular crônica neste modelo.

6.4) Atividade física e ativação cortical

A AF tem sido associada com mudanças na atividade cortical e melhor funcionamento do cérebro (Flodin et al. 2015; Kao et al. 2011; Hoeger Bement et al. 2014). Estudo sugere que atividade física aeróbia de moderada intensidade reduz atividade de CCA através da ativação do sistema serotoninérgico (Ohmatsu et al. 2014). Em animais, programa regular de exercícios iniciado na meia-idade previne prejuízos na função sináptica e preserva vias neuroprotetoras no córtex cerebral de rato (Di Loreto et al. 2014; Falone et al. 2012). Em um modelo animal de Parkinson, o exercício aeróbio em longo prazo melhorou a função motora e mostrou hiperativação de áreas límbicas durante a caminhada, incluindo amígdala, hipocampo e ínsula (Wang et al. 2013). No presente estudo, a atividade física de 4 semanas nas rodas de corrida está associada à diminuição da ativação do CCA, CI e ACe, analisada pela menor expressão de CREB e pCREB nos neurônios dessas regiões.

Estudo experimental prévio mostra que a AFR previne o desenvolvimento de hiperalgesia em modelo de DMCD por mecanismos centrais, reduzindo a fosforilação da subunidade NR1 do receptor NMDA em áreas de tronco encefálico (Sluka et al. 2013). Nesse mesmo modelo animal, a ativação da via AMPc/PKA/CREB na medula espinal é crítica para o desenvolvimento de hiperalgesia após lesão muscular, e o bloqueio da PKA reduz a hiperalgesia (DeSantana and Sluka 2008).

Estudo mostrou que o bloqueio específico da atividade de PKA no hipocampo de rato resulta em redução na fosforilação de CREB com uma correspondente deficiência na potencialização a longo prazo do hipocampo (Matsushita et al. 2001), processo implicado na plasticidade sináptica e regulação da aprendizagem, memória e dor persistente (Abel and Nguyen 2008; Zhuo 2014, 2005; L.-H. Hang 2013). Além disso, as cascatas AMPc-PKA-CREB parecem estar envolvidas nos mecanismos de memória da dor e a eletroacupuntura reduz os níveis de ativação e coexpressão de cAMP / PKA e PKA / CREB no CCA de modelo animal de memória de dor (Shao et al. 2016). Em modelo animal de depressão, a AFR reverteu comportamentos de ansiedade e depressão através da transdução de sinal de cAMP/ PKA/ CREB mediada pelo receptor serotoninérgico 5HT1A no hipocampo (Kim and Leem 2014).

Ainda, Martins et al. (2016) mostraram que o exercício de natação de alta intensidade diminuiu a nocicepção induzida por glutamato através da ativação de receptores acoplados à proteína G que inibem a PKA fosforilada (Martins et al. 2016). No presente estudo, mostramos que o exercício prolongado na roda impediu a hiperalgesia secundária concorrente com a diminuição da expressão de CREB fosforilado. Assim, nossos achados indicam que a inatividade física pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da dor crônica e que as mudanças na atividade dos neurônios corticais podem ser, pelo menos em parte, responsáveis por essas respostas.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que os protocolos de atividade física regular utilizados no presente estudo apresentam efeito profilático, mas não terapêutico, reduzindo a sensibilização nociceptiva central em modelo animal de fibromialgia. É possível ainda sugerir que mudanças na atividade de neurônios corticais sensoriais observadas nesse modelo podem ser, pelo menos em parte, responsáveis por esse efeito protetor. Portanto, a inatividade física pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da dor muscular crônica difusa. Novos estudos são necessários a fim de identificar os parâmetros ideais de exercício físico para diferentes condições dolorosas, como também as vias e os mecanismos pelos quais a atividade física pode modular a dor crônica.

8 REFERÊNCIAS

- Abdelhamid, R. E., and K. A. Sluka. 2015. ASICs Mediate Pain and Inflammation in Musculoskeletal Diseases. *Physiology (Bethesda)* 30 (6):449-459.
- Abel, T., and P. V. Nguyen. 2008. Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Prog Brain Res* 169:97-115.
- Almeida, C., A. DeMaman, R. Kusuda, F. Cadetti, M. I. Ravanelli, A. L. Queiroz, T. A. Sousa, S. Zanon, L. R. Silveira, and G. Lucas. 2015. Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* 156 (3):504-513.
- Apkarian, A. V., M. C. Bushnell, R. D. Treede, and J. K. Zubieta. 2005. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9 (4):463-484.
- Apkarian, A. V., J. A. Hashmi, and M. N. Baliki. 2011. Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain* 152 (3 Suppl):S49-64.
- Azevedo, L. F., A. Costa-Pereira, L. Mendonca, C. C. Dias, and J. M. Castro-Lopes. 2012. Epidemiology of chronic pain: a population-based nationwide study on its prevalence, characteristics and associated disability in Portugal. *J Pain* 13 (8):773-783.
- Bawa, F. L., S. W. Mercer, R. J. Atherton, F. Clague, A. Keen, N. W. Scott, and C. M. Bond. 2015. Does mindfulness improve outcomes in patients with chronic pain? Systematic review and meta-analysis. *Br J Gen Pract* 65 (635):e387-400.
- Becerra, L., H. C. Breiter, R. Wise, R. G. Gonzalez, and D. Borsook. 2001. Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. *Neuron* 32 (5):927-946.
- Bekinschtein, P., C. A. Oomen, L. M. Saksida, and T. J. Bussey. 2011. Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Semin Cell Dev Biol* 22 (5):536-542.
- Bement, M. K., and K. A. Sluka. 2005. Low-intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner. *Arch Phys Med Rehabil* 86 (9):1736-1740.
- . 2007. Co-localization of p-CREB and p-NR1 in spinothalamic neurons in a chronic muscle pain model. *Neurosci Lett* 418 (1):22-27.
- Bengtsson, A. 2002. The muscle in fibromyalgia. *Rheumatology (Oxford)* 41 (7):721-724.
- Bernardy, K., N. Fuber, V. Kollner, and W. Hauser. 2010. Efficacy of cognitive-behavioral therapies in fibromyalgia syndrome - a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *J Rheumatol* 37 (10):1991-2005.
- Binder, E., S. K. Droste, F. Ohl, and J. M. Reul. 2004. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. *Behav Brain Res* 155 (2):197-206.
- Bo, J., W. Zhang, X. Sun, Y. Yang, X. Liu, M. Jiang, Z. Ma, and X. Gu. 2014. The cyclic AMP response element-binding protein antisense oligonucleotide induced anti-nociception and decreased the expression of KIF17 in spinal cord after peripheral nerve injury in mice. *Int J Clin Exp Med* 7 (12):5181-5191.
- Bobinski, F., T. A. Ferreira, M. M. Cordova, P. A. Dombrowski, C. da Cunha, C. C. Santo, A. Poli, R. G. Pires, C. Martins-Silva, K. A. Sluka, and A. R. Santos. 2015. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. *Pain* 156 (12):2595-2606.
- Bobinski, F., D. F. Martins, T. Bratti, L. Mazzardo-Martins, E. C. Winkelmann-Duarte, L. G. Guglielmo, and A. R. Santos. 2011. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience* 194:337-348.
- Booth, F. W., C. K. Roberts, and M. J. Laye. 2012. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol* 2 (2):1143-1211.

- Bote, M. E., J. J. Garcia, M. D. Hinchado, and E. Ortega. 2014. An exploratory study of the effect of regular aquatic exercise on the function of neutrophils from women with fibromyalgia: role of IL-8 and noradrenaline. *Brain Behav Immun* 39:107-112.
- Brindle, P., S. Linke, and M. Montminy. 1993. Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature* 364 (6440):821-824.
- Brosseau, L., G. A. Wells, P. Tugwell, M. Egan, K. G. Wilson, C. J. Dubouloz, L. Casimiro, V. A. Robinson, J. McGowan, A. Busch, S. Poitras, H. Moldofsky, M. Harth, H. M. Finestone, W. Nielson, A. Haines-Wangda, M. Russell-Doreleyers, K. Lambert, A. D. Marshall, and L. Veilleux. 2008. Ottawa Panel evidence-based clinical practice guidelines for aerobic fitness exercises in the management of fibromyalgia: part 1. *Phys Ther* 88 (7):857-871.
- Busch, A. J., S. C. Webber, M. Brachaniec, J. Bidonde, V. D. Bello-Haas, A. D. Danyliw, T. J. Overend, R. S. Richards, A. Sawant, and C. L. Schachter. 2011. Exercise therapy for fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep* 15 (5):358-367.
- Bushnell, M. C., M. Ceko, and L. A. Low. 2013. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 14 (7):502-511.
- Cagnie, B., I. Coppieters, S. Denecker, J. Six, L. Danneels, and M. Meeus. 2014. Central sensitization in fibromyalgia? A systematic review on structural and functional brain MRI. *Semin Arthritis Rheum* 44 (1):68-75.
- Carlezon, W. A., Jr., R. S. Duman, and E. J. Nestler. 2005. The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28 (8):436-445.
- Casasola, C., T. Montiel, E. Calixto, and S. Brailowsky. 2004. Hyperexcitability induced by GABA withdrawal facilitates hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 126 (1):163-171.
- Caspersen, C. J., K. E. Powell, and G. M. Christenson. 1985. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 100 (2):126-131.
- Castillo Saavedra, L., M. Mendonca, and F. Fregni. 2014. Role of the primary motor cortex in the maintenance and treatment of pain in fibromyalgia. *Med Hypotheses* 83 (3):332-336.
- Chen, W. K., I. Y. Liu, Y. T. Chang, Y. C. Chen, C. C. Chen, C. T. Yen, H. S. Shin, and C. C. Chen. 2010. Ca(v)3.2 T-type Ca²⁺ channel-dependent activation of ERK in paraventricular thalamus modulates acid-induced chronic muscle pain. *J Neurosci* 30 (31):10360-10368.
- Chen, W. N., C. H. Lee, S. H. Lin, C. W. Wong, W. H. Sun, J. N. Wood, and C. C. Chen. 2014. Roles of ASIC3, TRPV1, and NaV1.8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia. *Mol Pain* 10:40.
- Chen, X., P. G. Green, and J. D. Levine. 2011. Stress enhances muscle nociceptor activity in the rat. *Neuroscience* 185:166-173.
- Chen, Y. W., C. C. Chiu, P. L. Hsieh, C. H. Hung, and J. J. Wang. 2015. Treadmill training combined with insulin suppresses diabetic nerve pain and cytokines in rat sciatic nerve. *Anesth Analg* 121 (1):239-246.
- Cheng, S. J., C. C. Chen, H. W. Yang, Y. T. Chang, S. W. Bai, C. C. Chen, C. T. Yen, and M. Y. Min. 2011. Role of extracellular signal-regulated kinase in synaptic transmission and plasticity of a nociceptive input on capsular central amygdaloid neurons in normal and acid-induced muscle pain mice. *J Neurosci* 31 (6):2258-2270.
- Chrivia, J. C., R. P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy, and R. H. Goodman. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365 (6449):855-859.

- Clarke, C. L., C. G. Ryan, and D. J. Martin. 2011. Pain neurophysiology education for the management of individuals with chronic low back pain: systematic review and meta-analysis. *Man Ther* 16 (6):544-549.
- Clauw, D. J. 2014. Fibromyalgia: a clinical review. *JAMA* 311 (15):1547-1555.
- Clauw, D. J., and L. J. Crofford. 2003. Chronic widespread pain and fibromyalgia: what we know, and what we need to know. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17 (4):685-701.
- Cobianchi, S., S. Marinelli, F. Florenzano, F. Pavone, and S. Luvisetto. 2010. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 168 (1):273-287.
- Cook, M. D., S. A. Martin, C. Williams, K. Whitlock, M. A. Wallig, B. D. Pence, and J. A. Woods. 2013. Forced treadmill exercise training exacerbates inflammation and causes mortality while voluntary wheel training is protective in a mouse model of colitis. *Brain Behav Immun* 33:46-56.
- Crock, L. W., B. J. Kolber, C. D. Morgan, K. E. Sadler, S. K. Vogt, M. R. Bruchas, and R. W. Gereau. 2012. Central amygdala metabotropic glutamate receptor 5 in the modulation of visceral pain. *J Neurosci* 32 (41):14217-14226.
- Da Silva, L. F., R. Y. Walder, B. L. Davidson, S. P. Wilson, and K. A. Sluka. 2010. Changes in expression of NMDA-NR1 receptor subunits in the rostral ventromedial medulla modulate pain behaviors. *Pain* 151 (1):155-161.
- DeSantana, J. M., K. M. da Cruz, and K. A. Sluka. 2013. Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Res Ther* 15 (6):222.
- DeSantana, J. M., and K. A. Sluka. 2008. Central mechanisms in the maintenance of chronic widespread noninflammatory muscle pain. *Curr Pain Headache Rep* 12 (5):338-343.
- Descalzi, G., H. Fukushima, A. Suzuki, S. Kida, and M. Zhuo. 2012. Genetic enhancement of neuropathic and inflammatory pain by forebrain upregulation of CREB-mediated transcription. *Mol Pain* 8:90.
- Di Loreto, S., S. Falone, A. D'Alessandro, S. Santini, Jr., P. Sebastiani, M. Cacchio, and F. Amicarelli. 2014. Regular and moderate exercise initiated in middle age prevents age-related amyloidogenesis and preserves synaptic and neuroprotective signaling in mouse brain cortex. *Exp Gerontol* 57:57-65.
- Dolan, S., and A. M. Nolan. 2001. Biphasic modulation of nociceptive processing by the cyclic AMP-protein kinase A signalling pathway in sheep spinal cord. *Neurosci Lett* 309 (3):157-160.
- Droste, S. K., A. Gesing, S. Ulbricht, M. B. Muller, A. C. Linthorst, and J. M. Reul. 2003. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 144 (7):3012-3023.
- Dunckley, P., R. G. Wise, M. Fairhurst, P. Hobden, Q. Aziz, L. Chang, and I. Tracey. 2005. A comparison of visceral and somatic pain processing in the human brainstem using functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 25 (32):7333-7341.
- Ellingson, L. D., M. R. Shields, A. J. Stegner, and D. B. Cook. 2012. Physical activity, sustained sedentary behavior, and pain modulation in women with fibromyalgia. *J Pain* 13 (2):195-206.
- Falone, S., A. D'Alessandro, A. Mirabilio, G. Petrucci, M. Cacchio, C. Di Ilio, S. Di Loreto, and F. Amicarelli. 2012. Long term running biphasically improves methylglyoxal-related metabolism, redox homeostasis and neurotrophic support within adult mouse brain cortex. *PLoS One* 7 (2):e31401.
- Fingleton, C., K. M. Smart, and C. M. Doody. 2017. Exercise-induced Hypoalgesia in People With Knee Osteoarthritis With Normal and Abnormal Conditioned Pain Modulation. *Clin J Pain* 33 (5):395-404.

- Flodin, P., S. Martinsen, K. Mannerkorpi, M. Lofgren, I. Bileviciute-Ljungar, E. Kosek, and P. Fransson. 2015. Normalization of aberrant resting state functional connectivity in fibromyalgia patients following a three month physical exercise therapy. *Neuroimage Clin* 9:134-139.
- Freitas, A. E., D. G. Machado, J. Budni, V. B. Neis, G. O. Balen, M. W. Lopes, L. F. de Souza, A. L. Dafre, R. B. Leal, and A. L. Rodrigues. 2013. Fluoxetine modulates hippocampal cell signaling pathways implicated in neuroplasticity in olfactory bulbectomized mice. *Behav Brain Res* 237:176-184.
- Fuchs, P. N., Y. B. Peng, J. A. Boyette-Davis, and M. L. Uhelski. 2014. The anterior cingulate cortex and pain processing. *Front Integr Neurosci* 8:35.
- Fuss, J., J. Steinle, L. Bindila, M. K. Auer, H. Kirchherr, B. Lutz, and P. Gass. 2015. A runner's high depends on cannabinoid receptors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (42):13105-13108.
- Galdino, G., T. R. Romero, J. F. Silva, D. C. Aguiar, A. M. de Paula, J. S. Cruz, C. Parrella, F. Piscitelli, I. D. Duarte, V. Di Marzo, and A. C. Perez. 2014. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology* 77:313-324.
- Galdino, G. S., I. D. Duarte, and A. C. Perez. 2010. Participation of endogenous opioids in the antinociception induced by resistance exercise in rats. *Braz J Med Biol Res* 43 (9):906-909.
- Gandhi, R., J. M. Ryals, and D. E. Wright. 2004. Neurotrophin-3 reverses chronic mechanical hyperalgesia induced by intramuscular acid injection. *J Neurosci* 24 (42):9405-9413.
- Garey, J., M. A. Morgan, J. Frohlich, B. S. McEwen, and D. W. Pfaff. 2001. Effects of the phytoestrogen coumestrol on locomotor and fear-related behaviors in female mice. *Horm Behav* 40 (1):65-76.
- Geneen, L. J., D. J. Martin, N. Adams, C. Clarke, M. Dunbar, D. Jones, P. McNamee, P. Schofield, and B. H. Smith. 2015. Effects of education to facilitate knowledge about chronic pain for adults: a systematic review with meta-analysis. *Syst Rev* 4:132.
- Giesecke, T., R. H. Gracely, D. A. Williams, M. E. Geisser, F. W. Petzke, and D. J. Clauw. 2005. The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort. *Arthritis Rheum* 52 (5):1577-1584.
- Gong, W. Y., R. E. Abdelhamid, C. S. Carvalho, and K. A. Sluka. 2016. Resident Macrophages in Muscle Contribute to Development of Hyperalgesia in a Mouse Model of Noninflammatory Muscle Pain. *J Pain* 17 (10):1081-1094.
- Gopalkrishnan, P., and K. A. Sluka. 2000. Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. *Arch Phys Med Rehabil* 81 (7):984-990.
- Gowers, W. R. 1904. A Lecture on Lumbago: Its Lessons and Analogues: Delivered at the National Hospital for the Paralyzed and Epileptic. *Br Med J* 1 (2246):117-121.
- Grace, P. M., T. J. Fabisiak, S. M. Green-Fulgham, N. D. Anderson, K. A. Strand, A. J. Kwilasz, E. L. Galer, F. R. Walker, B. N. Greenwood, S. F. Maier, M. Fleshner, and L. R. Watkins. 2016. Prior voluntary wheel running attenuates neuropathic pain. *Pain* 157 (9):2012-2023.
- Grace, P. M., K. A. Strand, S. F. Maier, and L. R. Watkins. 2014. Suppression of voluntary wheel running in rats is dependent on the site of inflammation: evidence for voluntary running as a measure of hind paw-evoked pain. *J Pain* 15 (2):121-128.
- Gracely, R. H., and K. R. Ambrose. 2011. Neuroimaging of fibromyalgia. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25 (2):271-284.

- Gracely, R. H., F. Petzke, J. M. Wolf, and D. J. Clauw. 2002. Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis Rheum* 46 (5):1333-1343.
- Gran, J. T. 2003. The epidemiology of chronic generalized musculoskeletal pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17 (4):547-561.
- Gregory, N. S., R. G. Brito, M. C. Fusaro, and K. A. Sluka. 2016. ASIC3 Is Required for Development of Fatigue-Induced Hyperalgesia. *Mol Neurobiol* 53 (2):1020-1030.
- Groover, A. L., J. M. Ryals, B. L. Guilford, N. M. Wilson, J. A. Christianson, and D. E. Wright. 2013. Exercise-mediated improvements in painful neuropathy associated with prediabetes in mice. *Pain* 154 (12):2658-2667.
- Guedj, E. 2009. Neuroimaging findings in fibromyalgia: what clinical impact? *Joint Bone Spine* 76 (3):224-226.
- Hagiwara, M., P. Brindle, A. Harootunian, R. Armstrong, J. Rivier, W. Vale, R. Tsien, and M. R. Montminy. 1993. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* 13 (8):4852-4859.
- Halliday, J. L. 1937. Psychological Factors in Rheumatism, Part I. *Br Med J* 1 (3969):213-217.
- Hauser, W., P. Klose, J. Langhorst, B. Moradi, M. Steinbach, M. Schiltenswolf, and A. Busch. 2010. Efficacy of different types of aerobic exercise in fibromyalgia syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Arthritis Res Ther* 12 (3):R79.
- Hill, L. E., S. K. Droste, D. J. Nutt, A. C. Linthorst, and J. M. Reul. 2010. Voluntary exercise alters GABA(A) receptor subunit and glutamic acid decarboxylase-67 gene expression in the rat forebrain. *J Psychopharmacol* 24 (5):745-756.
- Hoeger-Bement, M. K., and K. A. Sluka. 2003. Phosphorylation of CREB and mechanical hyperalgesia is reversed by blockade of the cAMP pathway in a time-dependent manner after repeated intramuscular acid injections. *J Neurosci* 23 (13):5437-5445.
- Hoeger Bement, M. K., A. D. Weyer, T. Yoon, and S. K. Hunter. 2014. Corticomotor excitability during a noxious stimulus before and after exercise in women with fibromyalgia. *J Clin Neurophysiol* 31 (1):94-98.
- Hoffmann, P., L. Terenius, and P. Thoren. 1990. Cerebrospinal fluid immunoreactive beta-endorphin concentration is increased by voluntary exercise in the spontaneously hypertensive rat. *Regul Pept* 28 (2):233-239.
- Hsieh, J. C., M. Belfrage, S. Stone-Elander, P. Hansson, and M. Ingvar. 1995. Central representation of chronic ongoing neuropathic pain studied by positron emission tomography. *Pain* 63 (2):225-236.
- Ichesco, E., T. Schmidt-Wilcke, R. Bhavsar, D. J. Clauw, S. J. Peltier, J. Kim, V. Napadow, J. P. Hampson, A. E. Kairys, D. A. Williams, and R. E. Harris. 2014. Altered resting state connectivity of the insular cortex in individuals with fibromyalgia. *J Pain* 15 (8):815-826.e811.
- Imbe, H., A. Kimura, T. Donishi, and Y. Kaneoke. 2014. Repeated forced swim stress enhances CFA-evoked thermal hyperalgesia and affects the expressions of pCREB and c-Fos in the insular cortex. *Neuroscience* 259:1-11.
- Ji, G., and V. Neugebauer. 2014. CB1 augments mGluR5 function in medial prefrontal cortical neurons to inhibit amygdala hyperactivity in an arthritis pain model. *Eur J Neurosci* 39 (3):455-466.
- Kadetoff, D., and E. Kosek. 2007. The effects of static muscular contraction on blood pressure, heart rate, pain ratings and pressure pain thresholds in healthy individuals and patients with fibromyalgia. *Eur J Pain* 11 (1):39-47.

- Kao, T., J. S. Shumsky, E. B. Knudsen, M. Murray, and K. A. Moxon. 2011. Functional role of exercise-induced cortical organization of sensorimotor cortex after spinal transection. *J Neurophysiol* 106 (5):2662-2674.
- Kim, J., M. L. Loggia, C. M. Cahalan, R. E. Harris, F. Beissner, R. G. Garcia, H. Kim, R. Barbieri, A. D. Wasan, R. R. Edwards, and V. Napadow. 2015. The somatosensory link in fibromyalgia: functional connectivity of the primary somatosensory cortex is altered by sustained pain and is associated with clinical/autonomic dysfunction. *Arthritis Rheumatol* 67 (5):1395-1405.
- Kim, M. H., and Y. H. Leem. 2014. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus. *J Exerc Nutrition Biochem* 18 (1):97-104.
- Kolber, B. J., M. C. Montana, Y. Carrasquillo, J. Xu, S. F. Heinemann, L. J. Muglia, and R. W. t. Gereau. 2010. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 in the amygdala modulates pain-like behavior. *J Neurosci* 30 (24):8203-8213.
- Koltyn, K. F. 2000. Analgesia following exercise: a review. *Sports Med* 29 (2):85-98.
- Koltyn, K. F., A. G. Brellenthin, D. B. Cook, N. Sehgal, and C. Hillard. 2014. Mechanisms of exercise-induced hypoalgesia. *J Pain* 15 (12):1294-1304.
- Koltyn, K. F., M. T. Knauf, and A. G. Brellenthin. 2013. Temporal summation of heat pain modulated by isometric exercise. *Eur J Pain* 17 (7):1005-1011.
- Kubesch, S., V. Bretschneider, R. Freudenmann, N. Weidenhammer, M. Lehmann, M. Spitzer, and G. Gron. 2003. Aerobic endurance exercise improves executive functions in depressed patients. *J Clin Psychiatry* 64 (9):1005-1012.
- L.-H. Hang, J.-P. Y., D.-H. Shao, Z. Chen, and H. Wang, . 2013. Involvement of spinal PKA/CREB signaling pathway in the development of bone cancer pain. *Pharmacological Reports* vol. 65 (no. 3):pp. 710–716.
- Lamb, K., K. Gallagher, R. McColl, D. Mathews, R. Querry, and J. W. Williamson. 2007. Exercise-induced decrease in insular cortex rCBF during postexercise hypotension. *Med Sci Sports Exerc* 39 (4):672-679.
- Landmark, T., P. R. Romundstad, P. C. Borchgrevink, S. Kaasa, and O. Dale. 2013. Longitudinal associations between exercise and pain in the general population--the HUNT pain study. *PLoS One* 8 (6):e65279.
- Leknes, S., and I. Tracey. 2008. A common neurobiology for pain and pleasure. *Nat Rev Neurosci* 9 (4):314-320.
- Leung, A., N. S. Gregory, L. H. Allen, and K. A. Sluka. 2015. Regular physical activity prevents chronic pain by altering resident muscle macrophage phenotype and increasing IL-10 in mice. *Pain*.
- Lightfoot, J. T., M. J. Turner, M. Daves, A. Vordermark, and S. R. Kleeberger. 2004. Genetic influence on daily wheel running activity level. *Physiol Genomics* 19 (3):270-276.
- Lima, L., J. DeSantana, L. Rasmussen, and K. Sluka. 2016. (483) Short-duration physical activity prevents the development of exercise-enhanced hyperalgesia through opioid mechanisms. *J Pain* 17 (4s):S95.
- Lima, L. V., T. S. S. Abner, and K. A. Sluka. 2017. Does exercise increase or decrease pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. *J Physiol*.
- Lonze, B. E., and D. D. Ginty. 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35 (4):605-623.
- Ma, W., C. Hatzis, and J. C. Eisenach. 2003. Intrathecal injection of cAMP response element binding protein (CREB) antisense oligonucleotide attenuates tactile allodynia caused by partial sciatic nerve ligation. *Brain Res* 988 (1-2):97-104.

- Maddock, R. J., G. A. Casazza, D. H. Fernandez, and M. I. Maddock. 2016. Acute Modulation of Cortical Glutamate and GABA Content by Physical Activity. *J Neurosci* 36 (8):2449-2457.
- Mansfield, K. E., J. Sim, J. L. Jordan, and K. P. Jordan. 2016. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of chronic widespread pain in the general population. *Pain* 157 (1):55-64.
- Martins, D. F., A. Siteneski, D. D. Ludtke, D. Dal-Secco, and A. R. Santos. 2016. High-Intensity Swimming Exercise Decreases Glutamate-Induced Nociception by Activation of G-Protein-Coupled Receptors Inhibiting Phosphorylated Protein Kinase A. *Mol Neurobiol*.
- Mathes, W. F., and R. B. Kanarek. 2006. Chronic running wheel activity attenuates the antinociceptive actions of morphine and morphine-6-glucuronide administration into the periaqueductal gray in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 83 (4):578-584.
- Matsushita, M., K. Tomizawa, A. Moriwaki, S. T. Li, H. Terada, and H. Matsui. 2001. A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation. *J Neurosci* 21 (16):6000-6007.
- Mayr, B., and M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (8):599-609.
- Mazzardo-Martins, L., D. F. Martins, R. Marcon, U. D. Dos Santos, B. Speckhann, V. M. Gadotti, A. R. Sigwalt, L. G. Guglielmo, and A. R. Santos. 2010. High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. *J Pain* 11 (12):1384-1393.
- McLoughlin, M. J., A. J. Stegner, and D. B. Cook. 2011. The relationship between physical activity and brain responses to pain in fibromyalgia. *J Pain* 12 (6):640-651.
- Mendieta, D., D. L. De la Cruz-Aguilera, M. I. Barrera-Villalpando, E. Becerril-Villanueva, R. Arreola, E. Hernandez-Ferreira, S. M. Perez-Tapia, G. Perez-Sanchez, M. E. Garces-Alvarez, L. Aguirre-Cruz, M. A. Velasco-Velazquez, and L. Pavon. 2016. IL-8 and IL-6 primarily mediate the inflammatory response in fibromyalgia patients. *J Neuroimmunol* 290:22-25.
- Mhalla, A., D. C. de Andrade, S. Baudic, S. Perrot, and D. Bouhassira. 2010. Alteration of cortical excitability in patients with fibromyalgia. *Pain* 149 (3):495-500.
- Miranda, A., S. Peles, C. Rudolph, R. Shaker, and J. N. Sengupta. 2004. Altered visceral sensation in response to somatic pain in the rat. *Gastroenterology* 126 (4):1082-1089.
- Moldofsky, H., P. Scarisbrick, R. England, and H. Smythe. 1975. Musculoskeletal symptoms and non-REM sleep disturbance in patients with "fibrositis syndrome" and healthy subjects. *Psychosom Med* 37 (4):341-351.
- Moraska, A., T. Deak, R. L. Spencer, D. Roth, and M. Fleshner. 2000. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279 (4):R1321-1329.
- Morgan, M. A., J. Schulkin, and D. W. Pfaff. 2004. Estrogens and non-reproductive behaviors related to activity and fear. *Neurosci Biobehav Rev* 28 (1):55-63.
- Mork, P. J., K. L. Vik, B. Moe, R. Lier, E. M. Bardal, and T. I. Nilsen. 2014. Sleep problems, exercise and obesity and risk of chronic musculoskeletal pain: the Norwegian HUNT study. *Eur J Public Health* 24 (6):924-929.
- Mosser, D. M., and J. P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8 (12):958-969.
- Murase, S., E. Terazawa, F. Queme, H. Ota, T. Matsuda, K. Hirate, Y. Kozaki, K. Katanosaka, T. Taguchi, H. Urai, and K. Mizumura. 2010. Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed-onset muscle soreness). *J Neurosci* 30 (10):3752-3761.

- Naugle, K. M., K. E. Naugle, and J. L. Riley, 3rd. 2016. Reduced Modulation of Pain in Older Adults After Isometric and Aerobic Exercise. *J Pain* 17 (6):719-728.
- Navratilova, E., J. Y. Xie, D. Meske, C. Qu, K. Morimura, A. Okun, N. Arakawa, M. Ossipov, H. L. Fields, and F. Porreca. 2015. Endogenous opioid activity in the anterior cingulate cortex is required for relief of pain. *J Neurosci* 35 (18):7264-7271.
- Neugebauer, V., W. Li, G. C. Bird, and J. S. Han. 2004. The amygdala and persistent pain. *Neuroscientist* 10 (3):221-234.
- Nijs, J., E. Kosek, J. Van Oosterwijck, and M. Meeus. 2012. Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? *Pain Physician* 15 (3 Suppl):Es205-213.
- Nijs, J., M. Meeus, B. Cagnie, N. A. Roussel, M. Dolphens, J. Van Oosterwijck, and L. Danneels. 2014. A modern neuroscience approach to chronic spinal pain: combining pain neuroscience education with cognition-targeted motor control training. *Phys Ther* 94 (5):730-738.
- Nishiguchi, S., M. Yamada, T. Tanigawa, K. Sekiyama, T. Kawagoe, M. Suzuki, S. Yoshikawa, N. Abe, Y. Otsuka, R. Nakai, T. Aoyama, and T. Tsuboyama. 2015. A 12-Week Physical and Cognitive Exercise Program Can Improve Cognitive Function and Neural Efficiency in Community-Dwelling Older Adults: A Randomized Controlled Trial. *J Am Geriatr Soc* 63 (7):1355-1363.
- Nuesch, E., W. Hauser, K. Bernardy, J. Barth, and P. Juni. 2013. Comparative efficacy of pharmacological and non-pharmacological interventions in fibromyalgia syndrome: network meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 72 (6):955-962.
- Oaklander, A. L., Z. D. Herzog, H. M. Downs, and M. M. Klein. 2013. Objective evidence that small-fiber polyneuropathy underlies some illnesses currently labeled as fibromyalgia. *Pain* 154 (11):2310-2316.
- Ogawa, S., J. Chan, J. A. Gustafsson, K. S. Korach, and D. W. Pfaff. 2003. Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. *Endocrinology* 144 (1):230-239.
- Ohmatsu, S., H. Nakano, T. Tominaga, Y. Terakawa, T. Murata, and S. Morioka. 2014. Activation of the serotonergic system by pedaling exercise changes anterior cingulate cortex activity and improves negative emotion. *Behav Brain Res* 270:112-117.
- Paxinos G, F. K. 2012. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4 ed. San Diego: Academic Press.
- Pelletier, R., J. Higgins, and D. Bourbonnais. 2015. Is neuroplasticity in the central nervous system the missing link to our understanding of chronic musculoskeletal disorders? *BMC Musculoskelet Disord* 16:25.
- Pitcher, M. H., F. Tarum, I. Z. Rauf, L. A. Low, and C. Bushnell. 2017. Modest Amounts of Voluntary Exercise Reduce Pain- and Stress-Related Outcomes in a Rat Model of Persistent Hind Limb Inflammation. *J Pain*.
- Pujol, J., D. Macia, A. Garcia-Fontanals, L. Blanco-Hinojo, M. Lopez-Sola, S. Garcia-Blanco, V. Poca-Dias, B. J. Harrison, O. Contreras-Rodriguez, J. Monfort, F. Garcia-Fructuoso, and J. Deus. 2014. The contribution of sensory system functional connectivity reduction to clinical pain in fibromyalgia. *Pain* 155 (8):1492-1503.
- Queiroz, L. P. 2013. Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep* 17 (8):356.
- Quinlan, M. G., A. Almey, M. Caissie, I. LaChappelle, G. Radiotis, and W. G. Brake. 2013. Estradiol and striatal dopamine receptor antagonism influence memory system bias in the female rat. *Neurobiol Learn Mem* 106:221-229.

- Radhakrishnan, R., and K. A. Sluka. 2009. Increased glutamate and decreased glycine release in the rostral ventromedial medulla during induction of a pre-clinical model of chronic widespread muscle pain. *Neurosci Lett* 457 (3):141-145.
- Rainville, P., G. H. Duncan, D. D. Price, B. Carrier, and M. C. Bushnell. 1997. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science* 277 (5328):968-971.
- Ruhman. 1940. The earliest book on rheumatism. *Br J Rheumatol* 2:140–162.
- Rupp, H. 1989. Differential effect of physical exercise routines on ventricular myosin and peripheral catecholamine stores in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 65 (2):370-377.
- Sabharwal, R., L. Rasmussen, K. A. Sluka, and M. W. Chapleau. 2015. EXERCISE PREVENTS DEVELOPMENT OF AUTONOMIC DYSREGULATION AND HYPERALGESIA IN A MOUSE MODEL OF CHRONIC MUSCLE PAIN. *Pain*.
- Sanada, L. S., K. L. Sato, N. L. Machado, C. Carmo Ede, K. A. Sluka, and V. P. Fazan. 2014. Cortex glial cells activation, associated with lowered mechanical thresholds and motor dysfunction, persists into adulthood after neonatal pain. *Int J Dev Neurosci* 35:55-63.
- Sauer, K., C. Kemper, and G. Glaeske. 2011. Fibromyalgia syndrome: prevalence, pharmacological and non-pharmacological interventions in outpatient health care. An analysis of statutory health insurance data. *Joint Bone Spine* 78 (1):80-84.
- Schmidt-Wilcke, T., and D. J. Clauw. 2011. Fibromyalgia: from pathophysiology to therapy. *Nat Rev Rheumatol* 7 (9):518-527.
- Schneider, S., C. D. Askew, T. Abel, A. Mierau, and H. K. Struder. 2010. Brain and exercise: a first approach using electrotomography. *Med Sci Sports Exerc* 42 (3):600-607.
- Serra, J., A. Collado, R. Sola, F. Antonelli, X. Torres, M. Salgueiro, C. Quiles, and H. Bostock. 2014. Hyperexcitable C nociceptors in fibromyalgia. *Ann Neurol* 75 (2):196-208.
- Shao, X. M., J. Sun, Y. L. Jiang, B. Y. Liu, Z. Shen, F. Fang, J. Y. Du, Y. Y. Wu, J. L. Wang, and J. Q. Fang. 2016. Inhibition of the cAMP/PKA/CREB Pathway Contributes to the Analgesic Effects of Electroacupuncture in the Anterior Cingulate Cortex in a Rat Pain Memory Model. *Neural Plast* 2016:5320641.
- Sheahan, T. D., B. A. Copits, J. P. Golden, and R. W. t. Gereau. 2015. Voluntary Exercise Training: Analysis of Mice in Uninjured, Inflammatory, and Nerve-Injured Pain States. *PLoS One* 10 (7):e0133191.
- Sherwin, C. M. 1998. Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Anim Behav* 56 (1):11-27.
- Skyba, D. A., E. W. King, and K. A. Sluka. 2002. Effects of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptor antagonists on the development and maintenance of hyperalgesia induced by repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain* 98 (1-2):69-78.
- Skyba, D. A., T. L. Lisi, and K. A. Sluka. 2005. Excitatory amino acid concentrations increase in the spinal cord dorsal horn after repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain* 119 (1-3):142-149.
- Sluka, K. A. 2002. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. *J Neurosci* 22 (13):5687-5693.
- Sluka, K. A., and D. J. Clauw. 2016. Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Neuroscience* 338:114-129.
- Sluka, K. A., A. Kalra, and S. A. Moore. 2001. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* 24 (1):37-46.
- Sluka, K. A., J. M. O'Donnell, J. Danielson, and L. A. Rasmussen. 2013. Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. *J Appl Physiol (1985)* 114 (6):725-733.

- Sluka, K. A., M. P. Price, N. M. Breese, C. L. Stucky, J. A. Wemmie, and M. J. Welsh. 2003. Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain* 106 (3):229-239.
- Smith, M. A., and D. L. Yancey. 2003. Sensitivity to the effects of opioids in rats with free access to exercise wheels: mu-opioid tolerance and physical dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 168 (4):426-434.
- Song, X. S., J. L. Cao, Y. B. Xu, J. H. He, L. C. Zhang, and Y. M. Zeng. 2005. Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats. *Acta Pharmacol Sin* 26 (7):789-798.
- Sorensen, J., T. Graven-Nielsen, K. G. Henriksson, M. Bengtsson, and L. Arendt-Nielsen. 1998. Hyperexcitability in fibromyalgia. *J Rheumatol* 25 (1):152-155.
- Sparling, P. B., A. Giuffrida, D. Piomelli, L. Roskopf, and A. Dietrich. 2003. Exercise activates the endocannabinoid system. *Neuroreport* 14 (17):2209-2211.
- Srikuea, R., T. B. Symons, D. E. Long, J. D. Lee, Y. Shang, P. J. Chomentowski, G. Yu, L. J. Crofford, and C. A. Peterson. 2013. Association of fibromyalgia with altered skeletal muscle characteristics which may contribute to postexertional fatigue in postmenopausal women. *Arthritis Rheum* 65 (2):519-528.
- Stagg, N. J., H. P. Mata, M. M. Ibrahim, E. J. Henriksen, F. Porreca, T. W. Vanderah, and T. Philip Malan, Jr. 2011. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology* 114 (4):940-948.
- Staud, R. 2009. Abnormal pain modulation in patients with spatially distributed chronic pain: fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am* 35 (2):263-274.
- Staud, R., C. E. Bovee, M. E. Robinson, and D. D. Price. 2008. Cutaneous C-fiber pain abnormalities of fibromyalgia patients are specifically related to temporal summation. *Pain* 139 (2):315-323.
- Staud, R., E. E. Weyl, E. Bartley, D. D. Price, and M. E. Robinson. 2014. Analgesic and anti-hyperalgesic effects of muscle injections with lidocaine or saline in patients with fibromyalgia syndrome. *Eur J Pain* 18 (6):803-812.
- Tanimizu, T., J. W. Kenney, E. Okano, K. Kadoma, P. W. Frankland, and S. Kida. 2017. Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory. *J Neurosci* 37 (15):4103-4116.
- Terman, G. W., M. J. Morgan, and J. C. Liebeskind. 1986. Opioid and non-opioid stress analgesia from cold water swim: importance of stress severity. *Brain Res* 372 (1):167-171.
- Travell J, R. S., Herman M. 1942
Pain and disability of the shoulder and arm: treatment by intramuscular infiltration with procaine hydrochloride. *JAMA* 120:417-434.
- Tsujii, T., K. Komatsu, and K. Sakatani. 2013. Acute effects of physical exercise on prefrontal cortex activity in older adults: a functional near-infrared spectroscopy study. *Adv Exp Med Biol* 765:293-298.
- Uceyler, N., W. Hauser, and C. Sommer. 2011. Systematic review with meta-analysis: cytokines in fibromyalgia syndrome. *BMC Musculoskelet Disord* 12:245.
- Uhelski, M. L., M. A. Davis, and P. N. Fuchs. 2012. Pain affect in the absence of pain sensation: evidence of asomaesthesia after somatosensory cortex lesions in the rat. *Pain* 153 (4):885-892.
- Vadakkan, K. I., H. Wang, S. W. Ko, E. Zastepa, M. J. Petrovic, K. A. Sluka, and M. Zhuo. 2006. Genetic reduction of chronic muscle pain in mice lacking calcium/calmodulin-stimulated adenylyl cyclases. *Mol Pain* 2:7.
- Veinante, P., I. Yalcin, and M. Barrot. 2013. The amygdala between sensation and affect: a role in pain. *J Mol Psychiatry* 1 (1):9.

- Walder, R. Y., L. A. Rasmussen, J. D. Rainier, A. R. Light, J. A. Wemmie, and K. A. Sluka. 2010. ASIC1 and ASIC3 play different roles in the development of Hyperalgesia after inflammatory muscle injury. *J Pain* 11 (3):210-218.
- Wang, Z., K. G. Myers, Y. Guo, M. A. Ocampo, R. D. Pang, M. W. Jakowec, and D. P. Holschneider. 2013. Functional reorganization of motor and limbic circuits after exercise training in a rat model of bilateral parkinsonism. *PLoS One* 8 (11):e80058.
- WHO. 2002. The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life. . *World Health Organization, Geneva*.
- Wolfe, F., E. Brahler, A. Hinz, and W. Hauser. 2013. Fibromyalgia prevalence, somatic symptom reporting, and the dimensionality of polysymptomatic distress: results from a survey of the general population. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 65 (5):777-785.
- Wolfe, F., D. J. Clauw, M. A. Fitzcharles, D. L. Goldenberg, R. S. Katz, P. Mease, A. S. Russell, I. J. Russell, J. B. Winfield, and M. B. Yunus. 2010. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 62 (5):600-610.
- Wolfe, F., H. A. Smythe, M. B. Yunus, R. M. Bennett, C. Bombardier, D. L. Goldenberg, P. Tugwell, S. M. Campbell, M. Abeles, P. Clark, and et al. 1990. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 33 (2):160-172.
- Wolfe, F., and B. Walitt. 2013. Culture, science and the changing nature of fibromyalgia. *Nat Rev Rheumatol* 9 (12):751-755.
- Wu, X., C. Spiro, W. G. Owen, and C. T. McMurray. 1998. cAMP response element-binding protein monomers cooperatively assemble to form dimers on DNA. *J Biol Chem* 273 (33):20820-20827.
- Yamamoto, K. K., G. A. Gonzalez, W. H. Biggs, 3rd, and M. R. Montminy. 1988. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334 (6182):494-498.
- Yang, B., G. Yi, W. Hong, C. Bo, Z. Wang, Y. Liu, Z. Xue, and Y. Li. 2014. Efficacy of acupuncture on fibromyalgia syndrome: a meta-analysis. *J Tradit Chin Med* 34 (4):381-391.
- Yang, J. X., L. Hua, Y. Q. Li, Y. Y. Jiang, D. Han, H. Liu, Q. Q. Tang, X. N. Yang, C. Yin, L. Y. Hao, L. Yu, P. Wu, C. J. Shao, H. L. Ding, Y. M. Zhang, and J. L. Cao. 2015. Caveolin-1 in the anterior cingulate cortex modulates chronic neuropathic pain via regulation of NMDA receptor 2B subunit. *J Neurosci* 35 (1):36-52.
- Yesilyurt, O., M. Seyrek, S. Tasdemir, S. Kahraman, M. S. Deveci, E. Karakus, Z. Halici, and A. Dogrul. 2015. The critical role of spinal 5-HT7 receptors in opioid and non-opioid type stress-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 762:402-410.
- Yokoyama, T., Y. Maeda, K. M. Audette, and K. A. Sluka. 2007. Pregabalin reduces muscle and cutaneous hyperalgesia in two models of chronic muscle pain in rats. *J Pain* 8 (5):422-429.
- Zhao, M. G., H. Toyoda, Y. S. Lee, L. J. Wu, S. W. Ko, X. H. Zhang, Y. Jia, F. Shum, H. Xu, B. M. Li, B. K. Kaang, and M. Zhuo. 2005. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 47 (6):859-872.
- Zhuo, M. 2005. Canadian Association of Neuroscience review: Cellular and synaptic insights into physiological and pathological pain. EJLB-CIHR Michael Smith Chair in Neurosciences and Mental Health lecture. *Can J Neurol Sci* 32 (1):27-36.
- . 2008. Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci* 31 (4):199-207.
- . 2014. Long-term potentiation in the anterior cingulate cortex and chronic pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369 (1633):20130146.

