

# **INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO NO DESENVOLVIMENTO COGNITIVO E NOS SINTOMAS SENSORIAIS EM UM MODELO ANIMAL DE DEFICIÊNCIA DE FERRO PARA A SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS.**

**Palavras-Chave:** exercício físico, sintomas sensoriais, síndrome das pernas inquietas.

**Autores/as:**

**Giovanna Antonella Martineli Rodrigues [UNICAMP]**

**Beatriz da Silva Franco [UNICAMP]**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea Maculano Esteves [UNICAMP]**

---

## **INTRODUÇÃO:**

A Síndrome das Pernas Inquietas (SPI) é uma condição que acomete cerca de 5% da população brasileira (GBE-SPI, 2007). Consiste em uma sensação desconfortável ou necessidade intensa de mover os membros do corpo, principalmente os inferiores, embora também possa se estender aos membros superiores, em alguns casos raros (Aldrich et al., 1995; Ferri et al., 2015). Os sintomas da SPI geralmente iniciam, ou aumentam, no final do dia e à noite, quando o indivíduo está repousando (Montplaisir et al., 2010). Além de causar insônia, geralmente a SPI está relacionada com o Movimento Periódico das Pernas (MPP), um distúrbio do sono que causa despertares durante o repouso, o que compromete a qualidade do sono (Montplaisir et al., 1997).

A causa mais conhecida para o desenvolvimento da SPI é a herança genética, mas também existem fatores de risco como gravidez e deficiência de ferro (GBE-SPI, 2007; Earley et al., 2014). O tratamento mais utilizado é feito à base de dopaminérgicos, sendo estes os mais eficazes, anticonvulsivantes, opióides, benzodiazepínicos e reposição de ferro (Cunha-Melo et al., 2009; Garcia-Borreguero & Cano-Pumarega, 2017). Na literatura existem indícios de que a prática de exercício físico pode auxiliar na redução dos sintomas da SPI, funcionando como um tratamento não farmacológico (Franco et al., 2019).

Diversos estudos relatam a presença de deficiência de ferro em pacientes com SPI (Varandas, 2013; Allen et al., 2013), ao mesmo tempo que o tratamento com suplementação de ferro traz melhorias aos sintomas (O'keeffe, 1994; Allen et al., 2018). O ferro é um nutriente muito importante para o funcionamento normal de processos metabólicos, como a síntese de DNA (Franco, 2019). Sua deficiência pode ocasionar problemas na cognição, além de existirem estudos que mostram sua relação com o aumento da resposta à dor (Dowling et al., 2009; Dowling et al., 2011).

Estudos neuropsicológicos apontam que pacientes com essa síndrome costumam apresentar diminuição das funções cognitivas, como dificuldade na fala e na marcha, além de redução na atenção a curto prazo (Kim et al., 2014; Faria et al., 2014). É possível relacionar a diminuição da cognição com um dos principais sintomas da SPI, que é a perda de sono. Isso porque seus pacientes possuem maior dificuldade nas atividades comandadas pela parte frontal do córtex cerebral, região fortemente ligada à qualidade do sono (Pearson et al., 2006).

Além disso, na SPI ocorre disfunção da dopamina, que causa sintomas semelhantes a transtornos de atenção, como déficit de atenção e hiperatividade (Kim et al., 2014; Estevinho & Soares-Fortunato, 2003). Acredita-se que a dopamina tem relação com esse distúrbio devido à redução dos receptores da dopamina (principalmente D2 e D3), responsáveis pela locomoção (Estevinho & Soares-Fortunato, 2003; Connor et al., 2009) e pelo tratamento com agonistas dopaminérgicos, que melhoram os sintomas da SPI (Alóe & Tavares, 2006; Hogg et al., 2011; García-Borreguero et al., 2012).

A prática de atividade física, principalmente aeróbica, é capaz de diminuir os sintomas da SPI, ao modular funções cerebrais, já que durante o exercício físico há liberação de diversos hormônios, como serotonina e dopamina (Franco et al., 2019; Daubian-Nosé et al., 2018). Estudos demonstram que as alterações ocasionadas pela prática de exercício são semelhantes às modificações causadas pelo tratamento com dopaminérgicos, tendo como semelhança o aumento na expressão de receptores D2 (Coelho et al., 2018; Daubian-Nosé et al., 2018). Um estudo feito com humanos, demonstrou uma melhora dos sintomas do SPI e MPP e da qualidade do sono, após serem submetidos a testes de exercício físico (Esteves et al., 2009).

Existe uma estreita relação entre doenças do sono e dor crônica. Um sono de baixa qualidade é capaz de diminuir o limiar de dor, além de reduzir a tolerância do paciente a esse tipo de estímulo (Goulart et al., 2014). A percepção da dor

ocorre no córtex cerebral, sendo que um neurônio nociceptor periférico conduz o estímulo doloroso do Sistema Nervoso Periférico (SNP) até o tálamo, no Sistema Nervoso Central (SNC) (Varandas, 2013).

Um estudo realizado com pacientes com SPI mostrou que essas pessoas possuem uma disfunção no sistema somatossensorial periférico e central (Schattschneider et al., 2004), podendo essa disfunção estar relacionada com os ramos nervosos periféricos ou no tálamo ou córtex sensorial (Verdugo & Ochoa, 1992; Trenkwalder et al., 2017). Além disso, foi relatado também uma relação à neuropatia nas fibras A e C (nociceptoras) (Polydefkis et al., 2000).

Portanto, a Síndrome das Pernas Inquietas está relacionada com a redução da qualidade do sono, consequentemente com a redução da qualidade de vida, principalmente por causa dos diversos sintomas que esse distúrbio gera, entre eles as alterações cognitivas e a redução do limiar de dor. E o exercício físico possui atividade neuroprotetora e pode ser utilizado para a melhora dos sintomas da SPI. Devido a isso, o presente estudo tem como objetivo principal observar o comportamento de memória de reconhecimento e o limiar de dor no modelo animal de deficiência de ferro para a Síndrome das Pernas Inquietas e os efeitos de um protocolo de exercício físico como tratamento não farmacológico.

## METODOLOGIA:

Para a execução do projeto foram utilizados ratos Wistar e SHR com 21 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (5255-1). Durante o período de estudo, os animais foram mantidos em salas climatizadas (média de 23°C) com ciclo claro-escuro constante (12/12h), com ração e livre acesso à água, acondicionados em gaiolas com 4 animais. Os animais foram divididos em:

- Controle sedentário - CTRL;
- Deficiência de ferro sedentário - DFe;
- Controle Exercício físico - CTRL EX;
- Deficiência de ferro exercício físico - DFe EX.

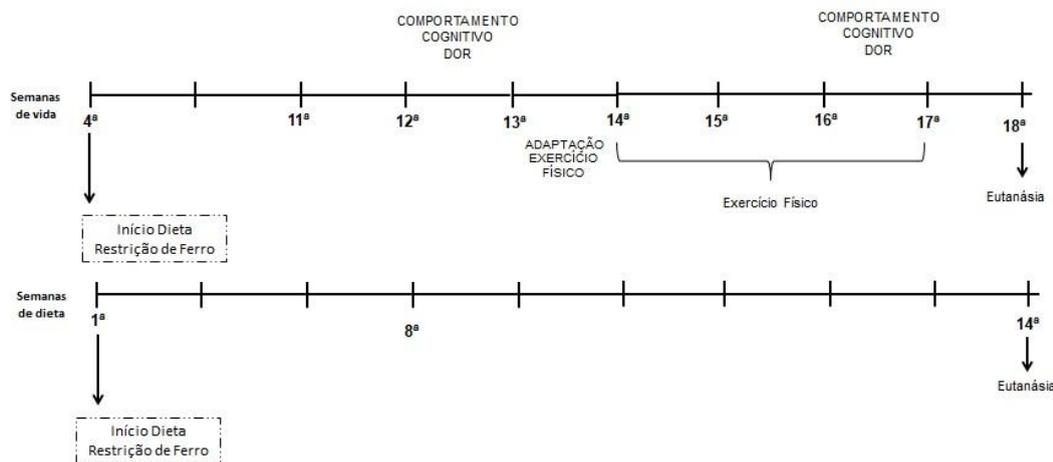


Figura 1: Delineamento experimental do experimento.

**Dieta de ferro:** a dieta foi produzida em parceria com o curso de Nutrição da FCA/Unicamp e feita a partir de ingredientes purificados, seguindo a composição das formulações da AIN93-M (Reeves, 1997). A dieta de restrição de ferro será realizada manipulando o mix mineral de acordo com a % específica que as atenda, ajustando a composição geral do mix pelo veículo (sacarose). A concentração de ferro na dieta de restrição será de 4mg/kg de ração. Os valores apresentados na AIN93-M correspondem às necessidades da dieta do roedor na fase adulta. Os animais iniciaram a dieta com 21 dias de vida.

**Teste de reconhecimento de objetos:** o teste consiste em uma habituação (sem os objetos) na caixa, de 5 minutos, 24h antes do teste oficial. Após as 24h, o teste é realizado em duas etapas, tendo 1 minuto entre uma e outra: 1) a familiarização dos objetos, onde são colocados dois objetos idênticos na caixa, onde o animal precisa completar 20 segundos de exploração nos objetos, e esse tempo não pode passar de 10 minutos (se ultrapassar, o rato deve ser excluído do teste); 2) o teste com objetos diferentes, onde um dos objetos é trocado. O tempo continua sendo 20 segundos de exploração, com no máximo 10 minutos de teste (Ennaceur & Delacour, 1988). É considerado exploração quando o rato fica numa posição com o nariz em direção ao objeto, a uma distância de aproximadamente 2 cm. Escalar ou mastigar o objeto não se enquadra, necessariamente, em exploração. Também considera – se exploração quando o rato cheira ou toca o objeto enquanto olha para ele (momento em que seu nariz fica a uma distância de aproximadamente 2 cm do objeto) (Leger et al., 2013). O teste de reconhecimento de objetos foi realizado na 8ª e na 14ª semana de dieta.

**Teste de limiar de dor:** para a análise de limiar de dor, foi realizado o teste do reflexo de flexão-retirada nociceptiva da pata (Randall & Selitto, 1957). O teste foi realizado por um único experimentador, utilizando o randall-selitto, que aplica uma força

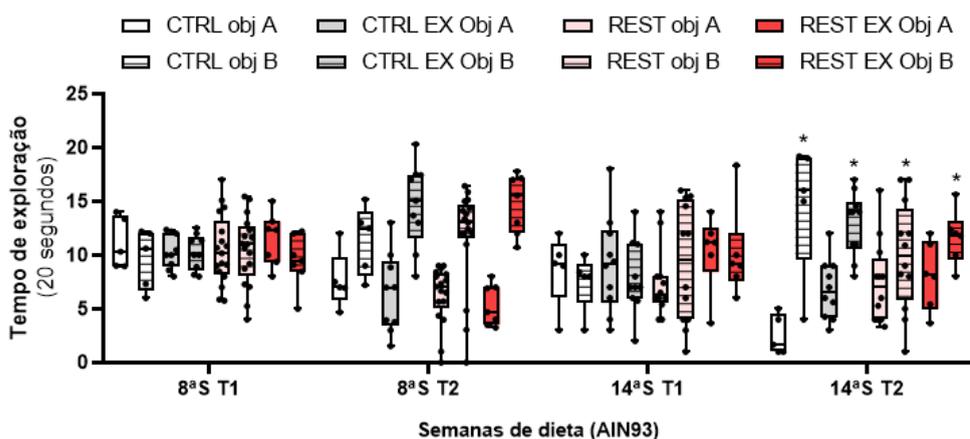
mecânica linearmente crescente ao dorso da pata traseira de rato. Os limiares de retirada relatados são a média de três testes realizados, com intervalos de 5 minutos. O teste de limiar de dor foi realizado na 8ª e na 14ª semana de dieta.

**Exercício Físico:** o exercício físico foi realizado em uma esteira (esteira para ratos – AVS Projetos). Antes do período experimental, a treinabilidade de cada rato foi analisada por meio de uma escala do tipo Likert (1 – 5), nos quais os ratos correram em esteira sem inclinação, a uma velocidade de 15 m/min, durante 5 min e por 6 dias consecutivos. Os animais com uma classificação média  $\geq 3$  foram incluídos no estudo de forma randomizada (Dishman, Armstrong, Delp, Graham, & Dunn, 1988). O protocolo de adaptação e treinamento foi realizado e adaptado de acordo com Arida et al (1999). Durante os 3 primeiros dias de adaptação, foi utilizado o estímulo elétrico e cada sessão de treinamento começou com 5 min de aquecimento a uma velocidade de 12–15 m/min, seguida por 30 min a 16 m/min. Após a adaptação, os animais foram submetidos a um teste de velocidade máxima, para determinar a velocidade de corrida (Rabelo et al., 2017). A velocidade utilizada no treinamento foi de 60% da velocidade de exaustão do teste. Todas as sessões, após o teste de carga incremental, consistiram em 5 min de aquecimento a uma velocidade de 10m/min seguidas por 55 minutos a 60% da velocidade de exaustão (a esteira foi mantida sempre sem inclinação). O programa consistiu em 5 sessões por semana, no horário entre 18 e 20h, durante 30 dias. O protocolo de adaptação e treino foi realizado da 9ª à 14ª semana de dieta (a partir da 12ª semana de vida).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O teste de reconhecimento de objetos foi analisado pelo modelo misto linear. Para a análise foram considerados os momentos T1 e T2 coletados na 6ª, 8ª e 10ª semana de dieta (denominado ‘tempo’ na análise de dados). Na análise da variável Tempo de exploração analisamos em um primeiro momento o tempo e a interação do tempo com o grupo, onde o tempo foi considerado em todos os momentos do teste de reconhecimento de objeto, ou seja, no Teste 1 objeto A, Teste 1 objeto B, Teste 2 objeto A e Teste 2 objeto B. Como o tempo de exploração foi considerado como total de 20 segundo, não foi realizada a análise entre os grupos.

Encontramos diferença para tempo 1 ( $F(3, 268)=21,110, P<0,000$ ). No Teste 1 (8 semanas e 14 semanas), não houve diferença entre o tempo de exploração no objeto A e o objeto B (que eram idênticos). Quando comparado teste 1 com o teste 2, nos dois momentos (8 semanas e 14 semanas de dieta) os animais mostraram menos exploração do objeto A no teste 2 em relação ao objeto A no teste 1 (8s  $p<0,000$ ; 14s  $p<0,000$ ), e maior tempo de exploração no objeto B no teste 2 em relação ao objeto B do teste 1 (8s  $p<0,000$ ; 14s  $p<0,000$ ). No teste 2 os animais exploraram mais o objeto B (diferente) em relação ao objeto A (8s  $p<0,000$ ; 14s  $p<0,000$ ). Esses achados demonstram um desempenho normal dos animais, esperado para esse teste, com aumento na exploração do objeto novidade.



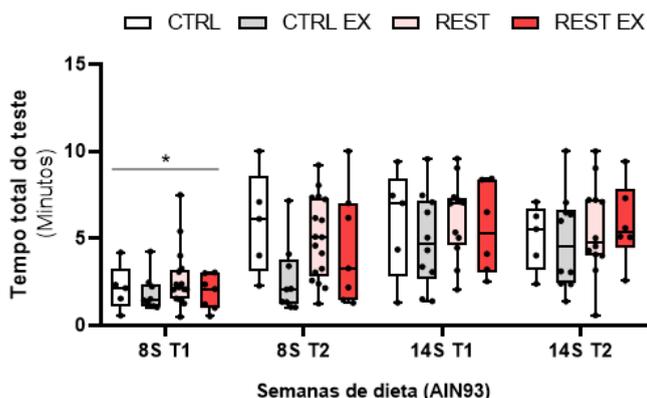
**Figura 2.** Permanência de exploração (segundos) em cada objeto (A e B) nas etapas T1 e T2 (tempo máximo de 20 segundos) no Teste de Reconhecimento de Objetos, às 9-12h (ciclo claro), na 8ª e na 14ª semana de dieta AIN93M. Dados apresentados em valores individuais, com barras de mínimo e máximo, (n=5-17). Os dados foram analisados pelo Modelo Misto, com post hoc Bonferroni ( $p<0,05$ ).

Ainda nos mesmos parâmetros de análise, avaliamos a influência da dieta no exercício e a interação com o tempo. Foi encontrada diferença estatística na interação dieta e tempo ( $F(3, 268)=2,653, P=0,009$ ), onde as mesmas alterações encontradas analisando o tempo, parecem ser influenciadas pela dieta e não pelo exercício. Comparando os resultados entre os grupos Ctrl e DFe, encontramos alterações causadas pela dieta, mas não pelo exercício físico, o que implica que a dieta provavelmente possui efeito sobre esse tipo de teste cognitivo, enquanto o exercício não.

No segundo momento foi realizada a análise do tempo de exploração no objeto B no teste 2, com 8 e 14 semanas de dieta. Não foram encontradas diferenças estatísticas para tempo ( $F(1, 63)=0,497, P=0,487$ ), grupo ( $F(3, 63)=2,520, P=0,079$ ), dieta ( $F(1, 63)=1,906, P=0,178$ ), exercício ( $F(1, 63)=2,757, P=0,108$ ) e interação tempo x grupo ( $F(3, 63)=1,061, P=0,381$ ).

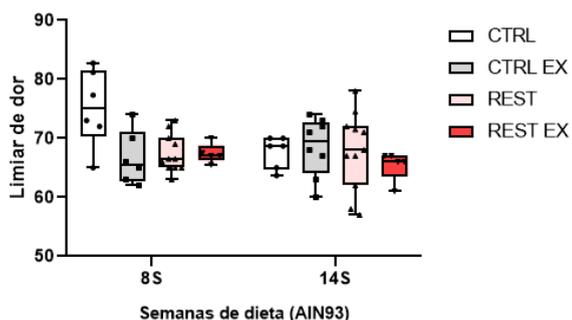
Apesar disso, foi observado que o grupo REST sedentário teve uma média de exploração no objeto B no T2 menor do que os outros grupos.

Analisamos o tempo total no teste 1 e no teste 2 após 8 e 14 semanas de dieta, que o animal utilizou para alcançar 20 segundos de exploração nos objetos. O T1 e T2 na 8s e 14s foram considerados parâmetros para análise para tempo. Encontramos diferença para tempo ( $F(3, 134)=15,444$ ,  $P<0,000$ ), com redução do tempo total no teste 1 na 8ª semana de dieta em relação a todos os outros momentos (T2 8s  $p<0,000$ ; T1 14s  $p<0,000$ ; T2 14s  $p<0,000$ ). Essa redução pode estar relacionada com a repetição do teste, que pode passar a ser familiar ao animal após algumas execuções, causando uma falta de novidade. Outros estudos já mostraram esse efeito a partir da segunda execução do teste (Sgoifo et al., 2002; Sturman et al., 2018). Não encontramos diferenças para dieta e exercício na variável tempo total.



**Figura 3.** Tempo Total gasto para alcançar 20 segundos de exploração no T1 e T2 no Teste de Reconhecimento de Objetos, às 9-12h (ciclo claro), na 8ª e na 14ª semana de dieta AIN93M. Dados apresentados em valores individuais, com barras de mínimo e máximo, (n=5-17). Os dados foram analisados pelo Modelo Misto, com post hoc Bonferroni ( $p<0.05$ ).

O limiar de dor (figura 3) dos animais foi analisado considerando como efeito fixo tempo (8S e 14S), grupo (CTRL, CTRL EX, REST e REST EX) e a interação do tempo com o grupo. Não foi encontrada diferença estatística nessas análises. Posteriormente, foi analisado a influência da dieta (padrão ou restrição) e do exercício (sedentário ou exercício), e encontramos diferença significativa para dieta, com redução no limiar de dor quando os animais se alimentam com dieta restrição de ferro ( $F(1, 51)=4,43$ ,  $P=0,045$ ). Dowling e colaboradores (2011) mostraram resposta alterada à dor aguda ao teste de temperatura com 15 semanas de dieta de restrição de ferro em camundongos. No entanto, a via de dor à temperatura é diferente da via em que a dor mecânica se manifesta, o que pode nos indicar que somente a sensibilidade à temperatura é alterada nos animais com SPI.



**Figura 4.** Teste de Limiar de Dor. Valores absolutos do teste de limiar doloroso durante a 8ª e a 14ª semana de dieta. Dados apresentados em valores individuais, com barras de mínimo e máximo, (n = 5-11). Os dados foram analisados por Modelo Misto Linear, com post hoc Bonferroni, ( $p<0.05$ ). Diferença estatística com redução do limiar de dor para a dieta restrição de ferro.

## CONCLUSÕES:

Esse foi o primeiro estudo feito com o objetivo de mostrar o comportamento cognitivo de animais com deficiência de ferro associada a SPI e a investigar o limiar de dor por meio de um teste mecânico. Todos os animais apresentaram um bom desempenho em relação ao reconhecimento de memória, explorando mais o objeto novidade, e não demonstraram alterações no limiar de dor. Apesar de os resultados não terem mostrado grandes diferenças entre os grupos, acreditamos que sejam necessários mais estudos com diferentes tipos de testes de cognição e de dor para o modelo animal de SPI.

## BIBLIOGRAFIA

Aldrich MS, Allen R, Allen R, Buchholz D, Buchholz D, Coccagna G, Earley C, Earley CJ, Feest TG, Hening W, Kavey N, Lavigne G, Lipinski J, Lugaresi E, Montagna P, Montplaisir J, Mosko SS, Oertel W, Walters AS. Toward a better definition of the Restless Legs Syndrome, Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society. Vol. 10, no. 5, 634-642. 1995.

Allen RP, Auerbach S, Bahrain H, Auerbach M, Earley CJ. The prevalence and impact of restless legs syndrome on patients with iron deficiency anemia. *Am J Hematol* 88:261-4, 2013.

Allen RP, Picchietti DL, Auerbach M, Cho YW, Connor JR, Earley CJ, Garica-Borreguera D, Kotagal S, Manconi M, Ondo W, Ulfberg J, Winkelman J. International Restless Legs Syndrome Study Group (IRLSSG). Evidence-based and consensus clinical practice guidelines for the iron treatment of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease in adults and children: an IRLSSG task force report. *Sleep Med* 41:27-44, 2018.

Alóe F, Tavares SMA. Síndrome das Pernas Inquietas. *Revista Neurociências*. Vol. 14(4). 204-213. 2006.

Arida, R. M., Scorza, F. A., dos Santos, N. F., Peres, C. A., & Cavalheiro, E. A. 1999. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Research*, 37(1): 45-52.

Coelho, CAS et al. Tratamento dopaminérgico em um modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono: sua relação com a atividade locomotora com uma sessão de exercício físico. *Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP*, n. 26, 2018.

Coelho, C. A. S., Esteves, A. M., da Silva Franco, B., dos Santos, N. E., & de Moraes, M. A. Tratamento dopaminérgico em um modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono: sua relação com a atividade locomotora com uma sessão de exercício físico. *Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP*, (26). 2018.

Connor JR, Wang XS, Allen RP, Beard JL, Wiesinger JA, Felt BT, Earley CJ. Altered dopaminergic profile in the putamen and substantia nigra in restless leg syndrome. *Brain : a journal of neurology*. 132(Pt 9):2403-12, 2009.

Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Resolução no 1000, Brasil. Brasília, 11 de maio de 2012. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br>

Cunha-Melo LF, Souza AB, Kummer A, Teixeira AL. Restless legs syndrome. *Revista Brasileira de Medicina*. Vol. 66. 186-193. 2009.

Daubian-nosé, P et al. Efeitos do exercício físico e da suplementação alimentar de ferro na atividade locomotora de um modelo animal de distúrbios do movimento relacionados ao sono. *Effects of physical exercise and iron supplementation on the locomotor activity of an animal model of sleep-related movement disorder*. 2018.

Dishman, R. K., Armstrong, R. B., Delp, M. D., Graham, R. E., & Dunn, A. L. Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. *Physiology & Behavior*, 43(5): 541-546. 1988.

Dowling P, Klinker F, Stadelmann C, Hasan K, Paulus W, Liebetanz D. Dopamine D3 receptor specifically modulates motor and sensory symptoms in iron-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 31(1), 70-77. 2011.

Dowling P, Klinker F, Amaya F, Paulus W, Liebetanz D. Iron deficiency sensitizes mice to acute pain stimuli and formalin-induced nociception. *J Nutr* 139:2087-2092. 2009.

Earley CJ, Connor JR, García-Borreguera D, Jenner P, Winkelman J, Zee PC, Allen R. Altered brain iron homeostasis and dopaminergic function in restless legs syndrome (Willis-Ekbom disease). *Sleep Med* 15:1288-301, 2014.

Ennaceur, A. & Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47-59. 1988.

Esteves, A. M., de Mello, M. T., Pradella-Hallinan, M., & Tufik, S. Effect of acute and chronic physical exercise on patients with periodic leg movements. *Med Sci Sports Exerc*, 41(1), 237-242. doi:10.1249/MSS.0b013e318183bb22. 2009.

Estevinho MF, Soares-Fortunato JM. Dopamina e receptores. *Revista Portuguesa de Psicossomática*, v. 5, n. 1, p. 21-31, 2003.

Faria RP, Foss MP, Eckeli AL, Speciali JG. Neuropsicologia da Síndrome das Pernas Inquietas: Revisão de Literatura. *Revista Neurociências*, v. 22, n. 1, p. 127-133, 2014.

Ferri R, Rundo F, Zucconi M, Manconi M, Bruni O, FeriniStrambi L, Fulda S. An evidence-based analysis of the association between periodic leg movements during sleep and arousals in restless legs syndrome. *Sleep* 38:919- 24, 2015.

Franco BS. Ferro e sua Relação com Distúrbios do Movimento Relacionados ao Sono, Comportamento, Sistema Dopaminérgico e Exercício Físico de Proles Wistar. Universidade Estadual de Campinas. 1 recurso online (81 p.). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação Física, Campinas, SP. 2019.

Franco B, Daubian-Nosé P, De-Mello MT, Esteves AM. Exercise as a favorable non-pharmacologic treatment to Sleep-Related Movement Disorders: a review. *Sleep Sci*. 12(2):116-121, 2019.

García-Borreguera, D, & Cano-Pumarega, I. New concepts in the management of restless legs syndrome. *BMJ*, j104, 2017.

García-Borreguera D, Högl B, Ferini-Strambi L, Winkelman J, Hill-Zabala C, Asharian A, Allen R. Systematic evaluation of augmentation during treatment with ropinirole in restless legs syndrome (Willis-Ekbom disease): results from a prospective, multicenter study over 66 weeks. *Mov Disord*. 27:277-83, 2012.

GBE-SPI, Grupo Brasileiro de Estudos em Síndrome das Pernas Inquietas. Síndrome das Pernas Inquietas: Diagnóstico e Tratamento, Opinião de Especialistas Brasileiros. Arquivo Neuropsiquiátrico. 2007.

Goulart LI, Rodrigues RND, Peres MFP. Restless legs syndrome and pain disorders: what's in common?. *Current pain and headache reports*, 18(11), 461. 2014.

Högl B, García-Borreguera D, Trenkwalder C, Ferini-Strambi L, Hening W, Poewe W, Brenner SS, Fraessdorf M, Busse M, Albrecht S, Allen RP. Efficacy and augmentation during 6 months of double-blind pramipexole for restless legs syndrome. *Sleep Med*. 12:351-60, 2011.

Kim SM, Choi JW, Lee C, Lee BU, Koo YS, Kim KH, Jung KY. Working memory deficit in patients with restless legs syndrome: an event-related potential study. *Sleep medicine*, 15(7), 808-815. 2014.

Leger, M, Quiedeville, A, Bouet, V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, Freret T. Object recognition test in mice. *Nat Protoc* 8, 2531-2537. 2013.

Montplaisir J, Allen RP, Arthur W, Ferini-Strambi L Restless Legs Syndrome and Periodic Limb Movements during Sleep. in *Principles and Practice of Sleep Medicine: Fifth Edition*. Elsevier Inc. 1026-1037. 2010.

Montplaisir J, Boucher S, Poirier G, Lavigne G, Lapierre O, Lesperance P. Clinical, polysomnographic, and genetic characteristics of restless legs syndrome: a study of 133 patients diagnosed with new standard criteria. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 12(1):61-5. 1997.

O'keeffe, S. T.; Gavin, k.; Lavan, J. N. Iron status and restless legs syndrome in the elderly. *Age and ageing*, v. 23, n. 3, p. 200-203, 1994.

Pearson VE, Allen RP, Dean T, Gamaldo CE, Lesage SR, Earley CJ. Cognitive deficits associated with restless legs syndrome (RLS). *Sleep medicine*, 7(1), 25-30. 2006.

Polydefkis M, Allen RP, Hauer P, Earley CJ, Griffin JW, McArthur JC. Subclinical sensory neuropathy in lateonset restless legs syndrome. *Neurology* 55(8):1115-1121. 2000.

Rabelo, P. C., Almeida, T. F., Guimarães, J. B., Barcellos, L. A., Cordeiro, L. M., Moraes, M. M., Coimbra, C. C., Szawka, R. E., & Soares, D. D. Intrinsic exercise capacity is related to differential monoaminergic activity in the rat forebrain. *Brain Research Bulletin*, 112: 7-13. 2015.

Rabelo, P. C. R., Horta, N. A. C., Cordeiro, L. M. S., Poletini, M. O., Coimbra, C. C., Szawka, R. E., & Soares, D. D. Intrinsic exercise capacity in rats influences dopamine neuroplasticity induced by physical training. *Journal of Applied Physiology* 123(6): 1721-1729. 1985.

Rabelo, P. C. R., Horta, N. A. C., Cordeiro, L. M. S., Poletini, M. O., Coimbra, C. C., Szawka, R. E., & Soares, D. D. Intrinsic Exercise Capacity in Rats Influences Dopamine Neuroplasticity Induced by Physical Training. *J Appl Physiol* 117(1): 00506 02017. 2017.

Randall LO, Selitto JJ. A method of measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn*. 111:409-19. 1957.

Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *The Journal of nutrition*. 127(5 Suppl):838S-41S. 1997.

Schattschneider J, Bode A, Wasner G, Binder A, Deuschl G, Baron R. Idiopathic restless legs syndrome: abnormalities in central somatosensory processing. *J Neurol* 251:977-982. 2004.

Sgoifo, A. et al. Intermittent exposure to social defeat and open-field test in rats: acute and long-term effects on ECG, body temperature and physical activity. *Stress*, v. 5, n. 1, p. 23-35, Feb 2002.

Sturman, O.; Germain, P. L.; Bohacek, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, v. 21, n. 5, p. 443-452, Sep 2018.

Trenkwalder, C, Ziegler-Gansberger, W, Ahmedzai, SH, Högl, B. Pain, opioids, and sleep: implications for restless legs syndrome treatment. *Sleep Medicine*, 31, 78-85, 2017.

Varandas CMB. Fisiopatologia da dor (Doctoral dissertation, [sn]). 2013.

Verdugo R, Ochoa JL. Quantitative somatosensory thermotest. A key method for functional evaluation of small calibre afferent channels. *Brain* 115(Pt 3):893-913. 1992.