



Envolvimento da PGC-1 α e os receptores de PPAR γ na prevenção da dor muscular crônica pelo exercício físico: Adaptações de protocolos

Palavras-Chave: Dor, Músculo, PPAR gama

Thamires da Silva Santos, FCA/UNICAMP, Emanuele de Oliveira Dorta, FCA/UNICAMP, Hayla Lourenço Rodrigues, FCA/UNICAMP, Beatriz Gomes Botasso, FCA/UNICAMP, Profa. Dra. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira, FCA/UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As dores agudas e crônicas representam um importante problema de saúde mundial. Especificamente as dores musculares acometem grande parte da população, dificultando a movimentação funcional para atividades diárias e, em 80% dos casos, podem perdurar a vida toda (Manchikanti et al., 2009).

Recentemente nosso grupo de pesquisa esclareceu alguns mecanismos relacionados ao processo de cronificação da dor muscular e sua prevenção pelo exercício em camundongos SWISS. Demonstrou-se que a hiperalgesia muscular aguda e crônica são caracterizadas por aumento tecidual de macrófagos com fenótipo pró-inflamatório e que o exercício físico regular através de natação previne esse aumento e/ou induz aumento de macrófagos com fenótipo anti-inflamatório através de receptores PPAR γ (de Azambuja et al., 2021). Além disso, a concentração tecidual de IL-1 β aumentou na fase aguda da hiperalgesia muscular, o que também foi prevenido pelo exercício via ativação de receptores PPAR γ . Finalmente, a natação aumentou a concentração tecidual de IL-10 tanto na fase aguda quanto crônica da dor muscular, mas somente na crônica, através de receptores PPAR γ (de Azambuja et al., 2021). É interessante ressaltar que os receptores PPAR γ parecem não estar expressos em macrófagos (de Azambuja et al., 2021), sugerindo uma comunicação dentro da célula muscular esquelética, via PGC-1 α /PPAR γ , e a consequente liberação de substâncias ativas que possam modular os macrófagos teciduais.

Considerando o exposto acima, o objetivo geral do presente estudo foi avançar na investigação sobre os mecanismos envolvidos no processo de cronificação da dor muscular de origem inflamatória, assim como nos mecanismos envolvidos na sua prevenção pelo exercício físico. Especificamente, o objetivo era identificar, tanto em animais sedentários quanto exercitados, em qual (is) célula(s) do tecido muscular os receptores PPAR γ estão localizados. Além disso, avaliar se a expressão da PGC-1 α e dos receptores PPAR γ é aumentada com o exercício.

METODOLOGIA:

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 4 semanas de idade, obtidos do CEMIB/UNICAMP (5973-1/2022). O modelo de dor muscular utilizado foi induzido através da administração de Carragenina (Cg/100 μ g) no ventre do músculo gastrocnêmio direito para indução da hiperalgesia muscular aguda e, 10 dias depois, no mesmo local, foi administrada Prostaglandina E₂ (PGE₂/1 μ g) para evidenciar a hiperalgesia crônica. A quantificação da hiperalgesia muscular foi realizada pelo teste de Randall & Selitto entre o período de 0 e 17 dias (Dina et al., 2008). Dois

protocolos de exercício físico foram utilizados: natação e corrida em esteira. O protocolo de natação foi realizado após 6 dias de adaptação em meio líquido, com incremento no tempo de exposição e profundidade da água.

Após a adaptação iniciou-se os treinamentos. O protocolo completo de natação foi realizado por 15 dias, separados em três etapas, com cinco dias cada. Em cada etapa, as pausas para descanso foram progressivamente diminuindo. O volume total de cada dia de treinamento foi de 50 minutos, conforme tabela 1 (de Azambuja et al., 2021).

Tabela 1 – Protocolo de natação

	Dias	Sessão diária	Pausas (passivas; minutos)	Séries	Volume treino (minutos)	Total (minutos)
Etapa 1	1	5 x 10	10	5	50	90
	2	5 x 10	10	5	50	90
	3	3 x 10 / 1 x 20	10	4	50	80
	4	2 x 15 / 2 x 10	10	4	50	80
	5	2 x 15 / 2 x 10	10	4	50	80
Etapa 2	6	1 x 20 / 1 x 20 / 1 x 10	7	3	50	70
	7	1 x 20 / 1 x 20 / 1 x 10	7	3	50	70
	8	1 x 25 / 1 x 25	7	2	50	60
	9	1 x 25 / 1 x 25	7	2	50	60
	10	1 x 25 / 1 x 25	7	2	50	60
Etapa 3	11	1 x 30 / 1 x 20	4	2	50	60
	12	1 x 30 / 1 x 20	4	2	50	60
	13	1 x 40 / 1 x 10	4	2	50	60
	14	1 x 40 / 1 x 10	4	2	50	60
	15	1 x 40 / 1 x 10	4	2	50	60
Etapa 4	16	1 x 50	0	1	50	50
	17	1 x 50	0	1	50	50
	18	1 x 50	0	1	50	50
	19	1 x 50	0	1	50	50
	20	1 x 50	0	1	50	50

O protocolo de corrida em esteira iniciou-se com um período de adaptação que durou uma semana. Os animais permaneceram na esteira por 10 minutos cada dia. No sexto dia, todos os animais foram submetidos ao Teste de Exaustão. Após o teste de exaustão, foi iniciado o treinamento na esteira. O mesmo foi realizado por 3 semanas com sessões de 50 minutos e aumento progressivo da intensidade de treino no início de cada semana, conforme tabela 2 (Xianshengjie et al., 2020).

Tabela 2 – Protocolo de corrida em esteira

Semana de treino	Aquecimento/ Desaceleração	Treino
1	5 min a 40% da velocidade máxima	40 min a 50% da velocidade máxima percorrida durante o Teste de Exaustão
2	5 min a 40% da velocidade máxima	15 min a 50% da velocidade máxima percorrida durante o Teste de Exaustão 10 min 60% da velocidade máxima percorrida durante o Teste de Exaustão 15 min a 50% da velocidade máxima percorrida durante o Teste de Exaustão
3	5 min a 40% da velocidade máxima	15 min a 60% da velocidade máxima percorrida durante o Teste de Exaustão 10 min 50% da velocidade máxima percorrida durante o Teste de Exaustão 15 min a 60% da velocidade máxima percorrida durante o Teste de Exaustão

Após o término de cada protocolo, foi realizada a administração das drogas para a indução da hiperalgesia muscular e quantificação do limiar hiperalgésico.

A análise qualitativa da fibra muscular, macrófagos não diferenciados e dos receptores PPAR gama foi realizada por imunofluorescência. Para isso, os animais foram perfundidos com solução de paraformaldeído a 4% e sacarose 10% após 24h e 48h da administração de Carragenina no tecido muscular. Posteriormente a perfusão, os músculos gastrocnêmios foram coletados, adequadamente tratados e cortados em criostato para análise em microscópio de fluorescência. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: fibras do músculo esquelético (rabbit anti-mouse Laminina Sigma Aldrich, USA), macrófagos (rat anti-mouse F4/80 AbD Serotec, USA) e PPAR γ (rabbit anti-mouse PPAR- γ Cell Signaling, USA). Anticorpos secundários conjugados a fluorocromos Alexa Fluor® (Jackson Immuno Research, USA) e o marcador nuclear com DAPI também foram utilizados. Os cortes foram examinados usando um microscópio de fluorescência marca Leica, modelo DMI 4000B. A análise estatística dos experimentos comportamentais foi realizada através de Two Way ANOVA, com pós teste de Tukey e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de natação, conforme previamente realizado pelo nosso grupo de pesquisa em animais Swiss (de Azambuja et al., 2021). Surpreendentemente, diferente dos resultados anteriores, o exercício físico de natação reduziu a hiperalgesia muscular aguda em apenas alguns períodos quando comparada ao grupo carragenina sedentário ($p < 0,05$, Two way e One Way ANOVA, Figuras 1A e 1B) e não foi eficiente em prevenir a hiperalgesia muscular crônica ($p > 0,05$, Two way e One Way ANOVA, Figuras 1A e 1C).

Figura 1

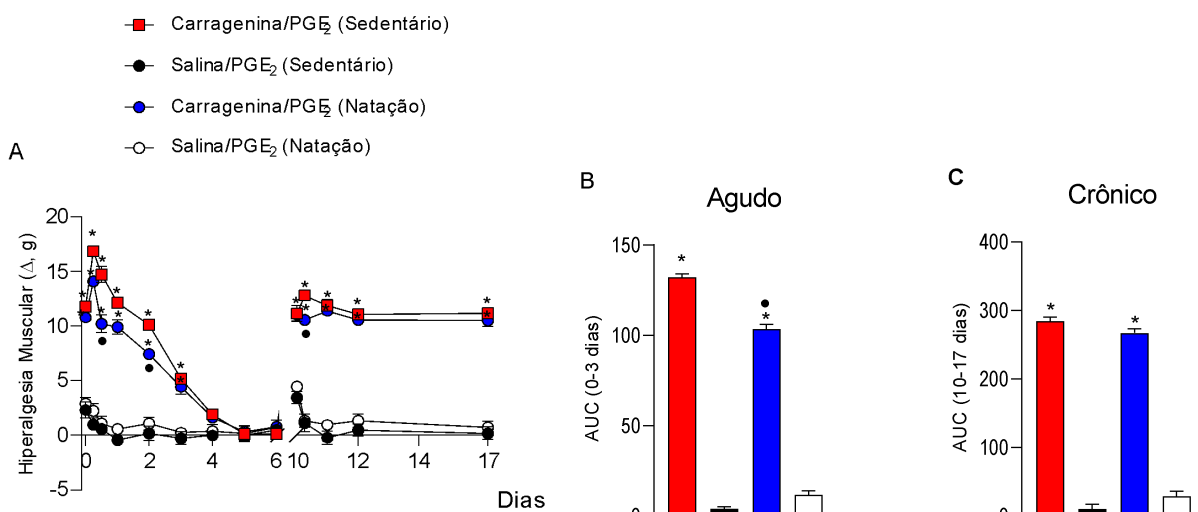


Fig 1. Protocolo de natação em animais C57/BL6 – (A) Gráfico de linha e (B e C) Gráfico de Área sob a Curva (AUC) demonstrando que o exercício físico de natação reduziu a hiperalgesia muscular aguda ($p < 0,05$, Two way ANOVA, pós teste de Tukey), mas não foi eficiente em prevenir a hiperalgesia muscular crônica ($p > 0,05$, Two way ANOVA, pós teste de Tukey). Os símbolos “*” indicam diferença com os grupos salina sedentário e natação, os símbolos “•” indicam diferença com o grupo carragenina sedentário.

Sabe-se que há algumas diferenças inerentes às linhagens de camundongos que podem afetar diretamente o processo de neuroinflamação (Noristani et al., 2018). Tal fato pode justificar as diferenças nos resultados em camundongos C57/BL6 e Swiss.

Uma vez que a base do presente estudo é a prevenção da dor muscular crônica de origem inflamatória pelo exercício, alteramos o protocolo de exercício, mantendo os parâmetros básicos, como exercício de intensidade leve a moderada e realizada pelo mesmo período. O protocolo escolhido foi a corrida em esteira. Os animais submetidos ao protocolo de corrida em esteira apresentaram redução na hiperalgesia muscular aguda ($p < 0,05$, Two way ANOVA, pós teste de Tukey, Figuras 2A e 2B) e

prevenção da hiperalgesia muscular crônica ($p < 0.05$, Two way ANOVA, pós teste de Tukey, Figuras 2A e 2C).

Figura 2

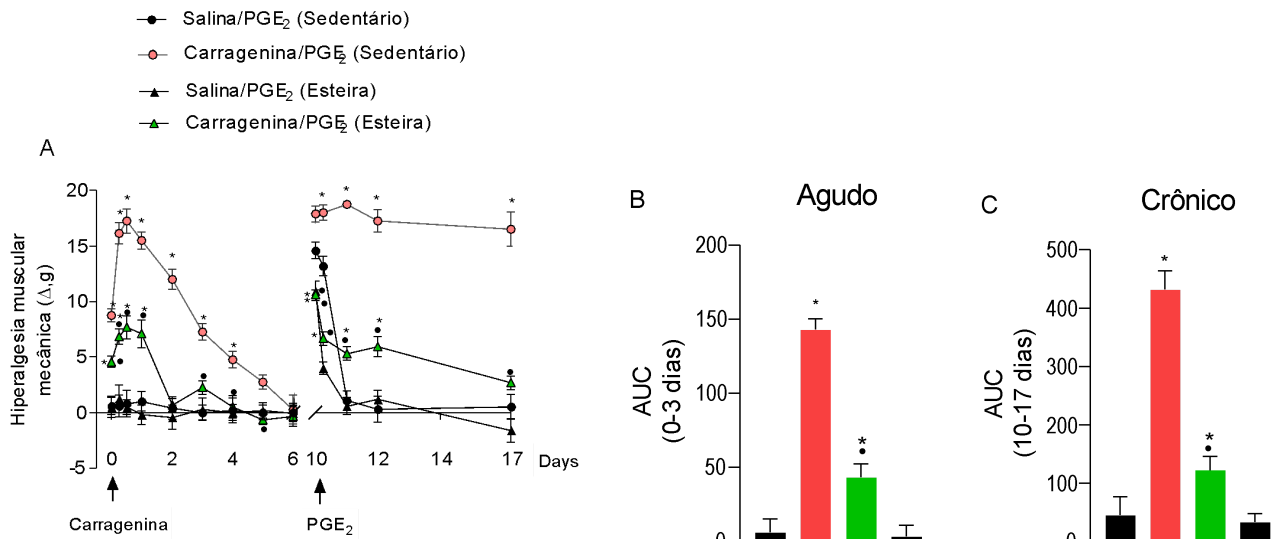


Fig 2- Protocolo de corrida em esteira em animais C57/BL6. (A) Gráfico de linha e (B e C) Gráfico de Área sob a Curva (AUC) demonstrando que o exercício físico de corrida em esteira foi eficiente em prevenir a hiperalgesia muscular aguda e crônica ($p > 0.05$, Two way ANOVA, pós teste de Tukey). Os símbolos “*” indicam diferença com os grupos salina, os símbolos “•” indicam diferença com o grupo carragenina sedentário.

Como o padrão de redução da dor muscular crônica foi semelhante aos resultados previamente publicados (de Azambuja et al., 2021), decidimos que esse protocolo seria utilizado para suportar os próximos experimentos.

A próxima etapa foi a imunofluorescência do tecido muscular de animais sedentários e treinados previamente sensibilizados pela carragenina no tempo de 24h pós injeção. Os resultados iniciais demonstraram que, semelhante ao exercício, o protocolo de imunofluorescência no tecido muscular de animais C57BL/6 precisaria de adaptações. Isso porque, utilizando o protocolo já estabelecido no laboratório, não foi possível identificar adequadamente as marcações para F4/80 (macrófagos) e receptores PPAR γ . Apenas a marcação das fibras musculares se mostrou adequada para o primeiro teste (Figura 3A).

Figura 3

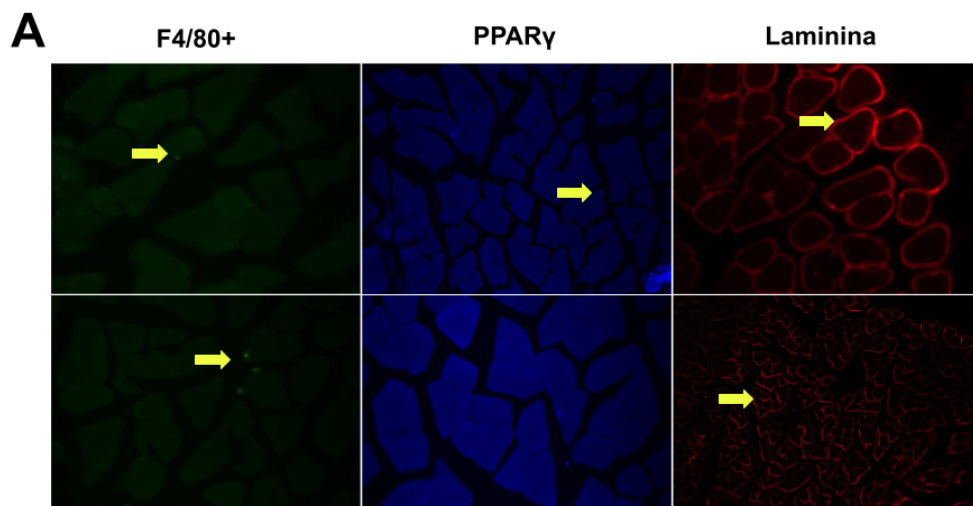


Fig 3. Ensaio de imunofluorescência– (A) Imagens representativas do marcador F4/80+ (verde, destacados pelas setas amarelas, 1:500), PPAR γ (azul, destacados pela seta amarela, 1:400) e laminina (vermelho, destacados pelas setas amarelas, 1:400). Imagens com escala de 50 μ m e aumento de 20x.

Em seguida, uma nova análise foi realizada com outras amostras, utilizando apenas os anticorpos que não apresentaram boa marcação no primeiro teste - F4/80 e PPAR γ . Nesse teste, usamos o mesmo protocolo de imunofluorescência, mas com concentrações de anticorpos primários e secundários diferentes, onde utilizamos de anticorpo primário a 1:250 para F4/80 e 1:200 para PPAR γ . Também alteramos o tempo de exposição ao anticorpo primário, que passou de 12h para 16h. O novo teste foi mais eficiente nas marcações, entretanto observamos marcações inespecíficas que precisam ser minimizadas (Figura 4B).

Figura 4

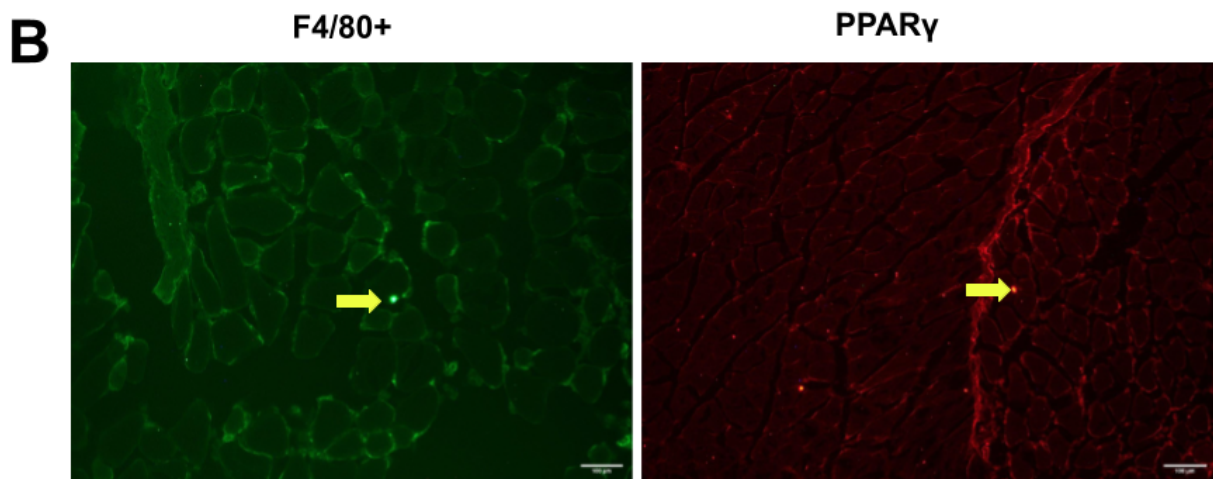


Fig 4. Ensaio de imunofluorescência– (B) Imagens representativas do marcador F4/80+ (verde, destacados pelas setas amarelas, 1:250) e PPAR γ (vermelho, destacados pelas setas amarelas, 1:200). Imagens com escala de 100 μ m e aumento de 10x.

CONCLUSÕES:

O presente estudo demonstrou que o treinamento regular de natação em camundongos C57BL/6, diferentemente dos camundongos Swiss, não previne a dor muscular crônica de origem inflamatória. Já o treinamento de corrida em esteira, pelo mesmo período e com intensidade semelhante, previne. Esse resultado é bastante interessante e sugere que a plasticidade muscular frente ao exercício é um fenômeno dependente da linhagem dos camundongos. Em função do tempo utilizado com as alterações de protocolos de exercício e de imunofluorescência do tecido muscular, o presente estudo não avançou na identificação da localização dos receptores PPAR γ e no padrão de expressão em animais treinados. De qualquer maneira, todas as coletas foram realizadas e os experimentos serão concluídos em breve.

BIBLIOGRAFIA

- de Azambuja G, Jorge CO, Gomes BB, Lourenço HR, Simabuco FM, Oliveira-Fusaro MCG. Brain Behav Immun. (2021) Jul;95:462-476;
Dina OA, Levine JD, Green PG (2008). J Pain 9:457–462
Manchikanti L, et al., American Society of Interventional Pain Physicians (2009) Pain Physician 12:E35-70
Noristani HN et al., doi:10.3389/fncel.2018.00173
Xianshengjie, L et al., doi:10.1016/j.brainresbull.2020.09.015.