

Tátilla de Souza Barcala

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ESTIMULAÇÃO
MANUAL DO ACUPONTO GB34 (YANGLINGQUAN) NO
MODELO EXPERIMENTAL DE DOR MUSCULAR DE INÍCIO
TARDIO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barcala, Tátilla de Souza
EFEITO ANTI-NOCICEPTIVO DA ESTIMULAÇÃO MANUAL DO
ACUPONTO GB34 (YANGLINGQUAN) NO MODELO EXPERIMENTAL DE DOR
MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO EM CAMUNDONGOS / Tátilla de Souza
Barcala ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos -
Florianópolis, SC, 2014.
84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Acupuntura. 3. Dor . 4. Lesão
Muscular. 5. Analgesia. I. Santos, Adair Roberto Soares
dos . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

TÁTILA DE SOUZA BARCALA

**“EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ESTIMULAÇÃO
MANUAL DO ACUPONTO GB34 (YANGLINGQUAN) NO
MODELO EXPERIMENTAL DE DOR MUSCULAR DE
INÍCIO TARDIO EM CAMUNDONGOS”**

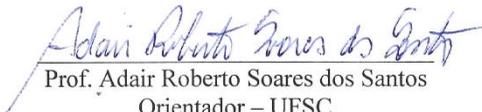
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 25 de junho de 2014.



Prof. Rodrigo Bairy Leal
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



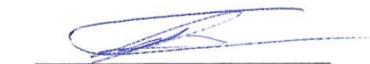
Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC



Prof. Carlos Amilcar Parada
Membro externo à UFSC



Prof. Everson Araújo Nunes
Membro - UFSC



Prof. Luiz Fernando F. Royes
Membro externo à UFSC



Prof. Luiz G. A. Guglielmo
Membro - UFSC

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Barcala (*in memorian*) e Maria Jandira de Souza Barcala, pela educação e pelos valores a mim ensinados.

À minha grande família, pela torcida e por compreender a minha distância e minhas ausências.

À minha “família adotiva” que sempre me acolheu com carinho aqui em Florianópolis.

Aos amigos do LANDI que participaram direta ou indiretamente desta pesquisa, pelo apoio, paciência, amizade, conhecimento e muito mais. Sem vocês esse trabalho não seria possível!

Ao professor Adair por permitir a realização deste trabalho no laboratório e a todos os professores da pós-graduação em Neurociências por compartilharem seus conhecimentos e contribuírem com a minha formação.

Ao professor Jocemar por toda atenção e colaboração para a realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e UFSC pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A acupuntura é uma modalidade terapêutica comumente utilizada no tratamento da dor e vem despertando grande interesse e aceitação no ocidente nas últimas décadas. Estudos clínicos e pré-clínicos nos moldes atuais vêm demonstrando a eficácia e efetividade desta terapia em diversas condições patológicas, entretanto, seus mecanismos neurobiológicos ainda não foram completamente elucidados. O presente estudo investigou o efeito antinociceptivo da estimulação do acuponto GB34 (Yanglingquan) no modelo de dor muscular de início tardio (DOMS) induzido por exercício excêntrico em camundongos. Inicialmente, foi estabelecido o modelo experimental de lesão muscular induzida por exercício excêntrico em esteira. Para isto, grupos distintos de animais realizaram o exercício em declive (20°) a uma velocidade de 14,99 m/min por um período de tempo de 130, 110 ou 90 min. A hiperalgesia mecânica foi observada em todos os grupos pela redução significativa dos níveis de força no teste de agarrar 7 h após o exercício e permaneceu por até 72 h. Para a realização dos demais experimentos optou-se pelo protocolo com o menor tempo de exercício necessário para produzir a hiperalgesia (90 min). A lesão muscular foi constatada pelo nível elevado da atividade da enzima creatina cinase (CK) no plasma sanguíneo 1 h após o exercício. Posteriormente, foi investigado o efeito antinociceptivo da estimulação manual do acuponto GB34 sendo o melhor efeito obtido no período de 1 h após a sessão. Tal efeito não foi observado por meio da estimulação do ponto sham (falso ponto de acupuntura). Além disso, o efeito antinociceptivo produzido pela estimulação do acuponto GB34, depende da ativação dos sistemas opioidérgico, serotoninérgico e adenosinérgico, visto que o antagonista de receptor opióide naloxona, o inibidor da síntese de serotonina PCPA e o antagonista adenosinérgico A1 (DPCPX) foram capazes de reduzir significativamente a anti-hiperalgesia promovida pela estimulação do acuponto GB34, bem como pela morfina e pelo CHA (utilizados como controle positivo). Assim, os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a estimulação manual do acuponto GB34 produz efeito antinociceptivo no modelo de dor muscular induzida por exercício excêntrico. Ademais, este efeito é dependente da ativação de sistemas endógenos como o opioidérgico, serotoninérgico e adenosinérgico. O conjunto destes dados fornece subsídios para o uso da acupuntura no tratamento da dor muscular de

origem tardia frequentemente encontrada na clínica e no ambiente desportivo.

Palavras-chave: Acupuntura, dor muscular, hiperalgesia mecânica.

|

|

ABSTRACT

Acupuncture is a therapeutic modality commonly used to treat pain and is attracting great interest and acceptance in the West in recent decades. Clinical and pre-clinical studies in current patterns have demonstrated the efficacy and effectiveness of this therapy in several pathological conditions; however, its neurobiological mechanisms have not been totally elucidated. The present study investigated the antihyperalgesic effect of the stimulation of the acupoint GB34 (Yanglingquan) in a delayed onset muscle soreness (DOMS) model induced by eccentric exercise in mice. Initially, the experimental model of muscle injury induced by eccentric exercise treadmill was established. For this, different groups of animals performed the exercise on downhill (20) at a speed of 14.99 m / min for a period of time of 130, 110 or 90 min. The mechanical hyperalgesia was observed in all groups by the significant reduction of strength in grip force test 7 h after exercise and remained for up to 72 h. For the realization of other experiments, it was chosen the protocol with the lowest exercise time required to produce hyperalgesia (90 min). The muscle injury was confirmed by the high level of the enzyme creatine kinase (CK) in blood plasma 1 h after exercise session. Subsequently, the antihyperalgesic effect of manual stimulation of the acupoint GB34 was investigated, being the best effect obtained within 1 h after the session. This effect was not observed by stimulating the sham point (false acupuncture point). Moreover, the anti-nociceptive effect produced by stimulation of the acupoint GB34, depends on the activation of opioid, serotonergic and adenosinergic systems, since the opioid antagonist receptor naloxone, the serotonin synthesis inhibitor PCPA and adenosinergic A1 antagonist (DPCPX) were significantly able to reduce the antinociception promoted by stimulation of the acupoint GB34, as well as morphine and the CHA (used as positive control). Therefore, the results presented here demonstrate that manual stimulation of the acupoint GB34 produces antihyperalgesic effect on muscle pain induced by eccentric exercise model and this effect is dependent on the activation of endogenous systems like opioid, serotonergic and adenosinergic. Together these data provide insights into the use of acupuncture in the treatment of muscular pain of late origin often found in clinical and sporting environment.

Keywords: Acupuncture, muscle pain, mechanical hyperalgesia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático de um mecanismo hipotético através do qual o disco Z é interrompido.....	20
Figura 2 - Quadro teórico para a dor muscular após ações excêntricas.	23
Figura 3 - Fibras aferentes e vias de informação nociceptivas.....	25
Figura 4 - Representação de uma Unidade Neural da Acupuntura (UNA).	32
Figura 5 - A modulação da dor explicada pela hipótese do controle do portão.....	35
Figura 6 - Camundongos Swiss sendo submetidos ao protocolo de exercício excêntrico na esteira.	45
Figura 7 - Sistema de avaliação de força utilizado no teste de prensão plantar para avaliação da hiperalgesia mecânica.	46
Figura 8 - Camundongo Swiss sendo submetido ao teste de prensão plantar para avaliação da hiperalgesia mecânica.	46
Figura 9 - Decurso temporal da hiperalgesia mecânica induzida pelo exercício excêntrico.....	48
Figura 10 - Análise da atividade da enzima creatina cinase.....	49
Figura 11 - Dispositivo auxiliar utilizado para aplicar agulhas de acupuntura.	50
Figura 12 - Aplicação de uma agulha de acupuntura no acuponto GB34.	51
Figura 13 - Camundongos Swiss submetidos ao tratamento com acupuntura.	51

Figura 14 - Camundongo Swiss recebendo tratamento com acupuntura Sham.	52
Figura 15 - Decurso temporal do efeito antinociceptivo após uma sessão de acupuntura.	55
Figura 16 - Decurso temporal do efeito antinociceptivo da acupuntura no período de 6 dias.	56
Figura 17 - Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34.	57
Figura 18 - Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34.	58
Figura 19 - Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de Adenosina
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
AMP	Monofosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
B2	Receptor de Bradicینina tipo 2
BK	Bradicینina
BL57	Acuponto Bexiga 57
BL60	Acuponto Bexiga 60
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFA	Adjuvante Completo de Freund
c-FOS	Proteína Oncogênica
CK	Creatina Cinase
DNIC	Controle Inibitório Nocivo Difuso
DOMS	Dor Muscular de Início Tardio
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
ECM	Matrix Extracelular
EIMD	Lesão Muscular Induzida por Exercício
EPM	Erro Padrão da Média
ELISA	Imuno Ensaio de Absorção Enzimática
ERK	Proteína Cinase Ativada por Mitógeno

fMRI	Imagens de Ressonância Magnética Funcional
GB34	Acuponto Vesícula Biliar 34
HPA	Hipófise-Pituitária-Adrenal
5-HT	5-Hidroxitriptamina; Serotonina
IL-1β	Interleucina 1- beta
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-1Ra	Antagonista do Receptor de Interleucina 1
IL-1α	Interleucina 1 – alfa
IL-6	Interleucina 6
i.p	Intraperitoneal
LANDI	Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
LC	Locus Coeruleus
LI3	Acuponto Intestino Grosso 3
M1	Macrófagos tipo 1, classicamente ativados
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NAC	N-Acetilcisteína
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NAU	Unidade Neural da Acupuntura
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
PAG	Substância Cinzenta Periquedutal

PCPA	ρ -Clorofenilalanina Metil Éster
PGE2	Prostaglandina E2
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
s.c	Subcutânea
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SNC	Sistema Nervoso Central
SP6	Acuponto Baço-pâncreas 6
ST36	Acuponto Estômago 36
Th1	T helper tipo 1; tipo de linfócito T
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
VG26	Acuponto Vaso Governador 26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EXERCÍCIO.....	19
1.2 DOR MUSCULAR E DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO.....	21
1.3 PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	27
1.4 ACUPUNTURA E O ACUPONTO GB34 (YANGLINGQUAN).....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	39
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 METODOLOGIA E RESULTADOS.....	43
4.1 ANIMAIS.....	43
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	43
4.3.1 Estabelecimento do modelo experimental de lesão muscular induzida por exercício excêntrico.....	44
4.3.1.1 Indução da lesão por exercício excêntrico.....	44
4.3.1.2 Avaliação da função sensório-motora (Força de Agarrar).....	45
4.3.1.3 Atividade da enzima creatina cinase (CK) no plasma sanguíneo.....	47
4.3.1.4 Resultados.....	47
4.3.1.4.1 <i>Hiperalgesia muscular induzida por exercício excêntrico</i>	47
4.3.1.4.2 <i>Atividade da enzima creatina cinase</i>	48
4.3.2 Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura e a participação de sistemas endógenos.....	49
4.3.2.1 Indução da lesão por exercício excêntrico.....	49

4.3.2.2	Tratamentos - Acupuntura e Sham	50
4.3.2.3	Avaliação da função sensório-motora (Força de Agarrar)	52
4.3.2.4	Avaliação dos sistemas endógenos envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura.....	53
4.3.2.4.1	<i>Participação do sistema opioide</i>	53
4.3.2.4.2	<i>Participação do sistema serotoninérgico</i>	53
4.3.2.4.3	<i>Participação do sistema adenosinérgico</i>	54
4.3.2.5	Resultados.....	54
4.3.2.5.1	<i>Determinação do decurso temporal do efeito antinociceptivo após uma sessão de acupuntura</i>	54
4.3.2.5.2	<i>Efeito antinociceptivo da acupuntura no decurso temporal de 6 dias</i>	55
4.3.2.5.3	<i>Envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34</i>	56
4.3.2.5.4	<i>Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34</i>	57
4.3.2.5.5	<i>Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34</i>	58
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EXERCÍCIO

Na literatura científica, os sintomas de dor e perda de força que ocorrem após o exercício intenso, têm sido atribuídos a danos na estrutura muscular e são referidos coletivamente como "lesão muscular induzida por exercício" (do inglês, *Exercise-Induced Muscle Damage - EIMD*) (HYLDAHL e HUBAL, 2013).

Hough (1900) propôs pela primeira vez que a dor após o exercício era resultado de microlesões no músculo. Essa idéia foi corroborada por outros autores baseados na evidência de proteínas musculares específicas presentes no sangue após exercício físico (ARMSTRONG, OGILVIE e SCHWANE, 1983; NEWHAM, JONES e EDWARDS, 1983; SCHWANE *et al.*, 1983).

Segundo Hyldahl e Hubal (2013), mais de 400 estudos sobre dor e lesão muscular relacionada ao exercício foram publicados na última década, com uma variedade de aplicações científicas pré-clínicas e clínicas.

Apesar de estudos cada vez mais sofisticados e a busca constante pela compreensão dos mecanismos envolvidos na lesão muscular, Hyldahl e Hubal (2013) afirmam que a biologia da EIMD é muito mais complexa do que se pensava.

Várias hipóteses foram sugeridas para explicar a etiologia da lesão, entretanto, os mecanismos exatos que fundamentam as fases iniciais desta não são completamente compreendidos (FRIDEN e LIEBER, 2001; HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008; CARMICHAEL *et al.*, 2010; HYLDAHL e HUBAL, 2013).

Independente da compreensão do mecanismo exato é geralmente aceito entre a maioria dos autores que o declínio de força inicial é produzido por danos mecânicos. Clarkson e Sayers (1999) apontam os fatores mecânicos e consequente ruptura de sarcômeros como o episódio inicial, seguido por distúrbios na homeostase do cálcio, resposta inflamatória e síntese de proteínas relacionadas ao estresse.

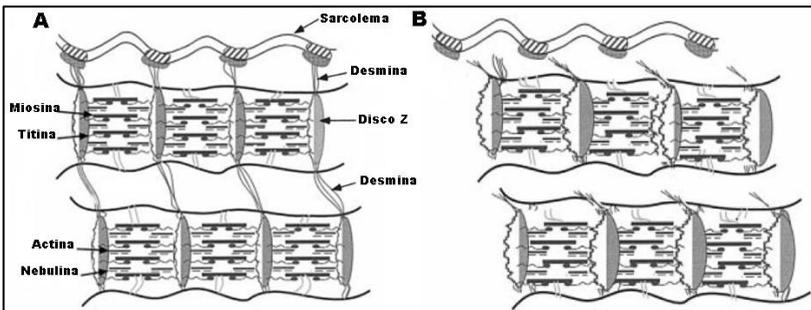
Para Friden e Lieber (2001), fatores mecânicos como o comprimento do músculo, força e velocidade da contração, parecem desempenhar papéis decisivos neste processo. Dentro deste contexto, exercícios que incluem um elevado componente excêntrico apresentam maior potencial lesivo devido ao alongamento do músculo enquanto exerce força (CLARKSON e SAYERS, 1999; MCHUGH *et al.*, 1999;

CARMICHAEL *et al.*, 2005; DAVIS *et al.*, 2007; CARMICHAEL *et al.*, 2010).

A tensão gerada durante a ação excêntrica é maior do que para qualquer uma das outras ações, visto que um número menor de unidades motoras são recrutadas para suportar a mesma carga quando comparada à contração concêntrica (ADAMS, DUVOISIN e DUDLEY, 1992; ENOKA, 1996; POTVIN, 1997).

Foi proposto por diversos autores que esta tensão aumentada sobre as miofibrilas levaria à distensão e ruptura de sarcômeros com consequente degradação de proteínas estruturais e perda da integridade da linha Z, como mostrado na Figura 1 (MORGAN, 1990; FRIDEN e LIEBER, 2001; MORGAN e PROSKE, 2004; PROSKE e ALLEN, 2005).

Figura 1 - Diagrama esquemático de um mecanismo hipotético através do qual o disco Z é interrompido.



Filamentos de miosina são deslocados para um dos lados do sarcômero de acordo com a desigualdade de força distribuída entre eles. (A) Disposição miofibrilar normal. (B) Deslocamento miofibrilar. O disco Z mais largo comparado com a figura A representa o disco Z anormal como evidenciado pelo “borramento” do disco Z observado no microscópio eletrônico. Fonte: Adaptado de Friden e Lieber (2001).

No entanto, análises de biópsias de músculos humanos submetidos a exercícios excêntricos, têm evidenciado resultados discrepantes entre experimentos animais e pesquisas com humanos (YU, MALM e THORNELL, 2002; MALM e YU, 2012; YU *et al.*, 2013). Cramer e colaboradores (2007) afirmam que discordâncias entre resultados podem ocorrer em parte devido a diferenças entre os protocolos de contração muscular dos modelos utilizados.

Os processos que se seguem a fase primária da lesão parecem ser iniciados por uma perturbação da homeostase do Ca^{+2} intracelular (HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008). O influxo de Ca^{+2} inicia uma cascata de eventos que gera a degradação da membrana celular e leva a danos ainda maiores na estrutura do músculo esquelético (BYRD, 1992; REID *et al.*, 1994; GISSEL e CLAUSEN, 2001; PROSKE e ALLEN, 2005).

A perda da integridade da membrana permite o extravasamento de proteínas intramusculares que podem ser detectadas no sangue por muitos dias pós-exercício (WARREN, LOWE e ARMSTRONG, 1999). Dentre as proteínas musculares comumente avaliadas encontram-se a creatina cinase (CK), a mioglobina de cadeia pesada, a troponina, a miosina e a desmina (INGALLS, WARREN e ARMSTRONG, 1998; SORICHTER, PUSCHENDORF e MAIR, 1999; BEATON, TARNOPOLSKY e PHILLIPS, 2002; HAUBOLD *et al.*, 2003).

Apesar de uma variedade de proteínas específicas serem reconhecidas como marcadores indiretos de dano muscular após o exercício, a atividade da CK tem sido, de longe, a mais utilizada na literatura, possivelmente devido ao seu elevado pico de concentração depois da atividade física em comparação com outras proteínas, além do seu custo moderado para a mensuração (HYLDAHL e HUBAL, 2013).

Entretanto, o pico de atividade da CK no plasma pode variar quanto à magnitude e resposta temporal, dependendo do tipo de exercício, da espécie animal e dos músculos envolvidos (MOMKEN *et al.*, 2005; DAVIS *et al.*, 2007; MEADOR e HUEY, 2011; HYLDAHL e HUBAL, 2013).

1.2 DOR MUSCULAR E DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO

A prevalência de dor muscular não é muito clara na literatura. Estima-se que a dor muscular crônica é encontrada em 47% da população adulta (CIMMINO, FERRONE e CUTOLO, 2011) e corresponde a 36% dos atendimentos em enfermarias de medicina interna (BUSKILA *et al.*, 2001). Um estudo epidemiológico realizado no Japão entrevistou 20.407 pessoas e constatou que 12,4% dos entrevistados relatavam dor muscular crônica e 2,1% apresentavam sintomas consistentes com a fibromialgia (NAKAMURA *et al.*, 2014).

No Brasil, algumas pesquisas vêm sendo conduzidas em populações específicas. Glina e Rocha (2003) relacionam a presença de dor musculoesquelética com exigências do trabalho e sintomas de

estresse em estagiários do setor bancário e observam que 46,3% dos avaliados apresentam quadro algico associado ao estresse. Cardoso *et al.* (2009) avaliaram a prevalência de dor musculoesquelética em 4.496 professores do ensino fundamental da rede municipal de Salvador e descobriram que 55% deles apresentavam sintomas algicos com incidência maior entre as mulheres.

No ambiente desportivo, os sintomas dolorosos são frequentemente decorrentes de lesões musculares (COHEN e ABDALLA, 2003). Em Florianópolis, Torres (2004) traçou um perfil epidemiológico das lesões nos atletas atendidos pelo Projeto de Extensão Atendimento Fisioterápico à Comunidade (Fisioterapia Desportiva) da Clínica de Prevenção, Avaliação e Reabilitação Física CEFID/UDESC, no período de janeiro de 2002 a julho de 2003. Neste estudo, dentre os 188 atletas, de diferentes modalidades desportivas, foi observado que a lesão de maior incidência foi a muscular, com 54,09% num total de 220 lesões constatadas.

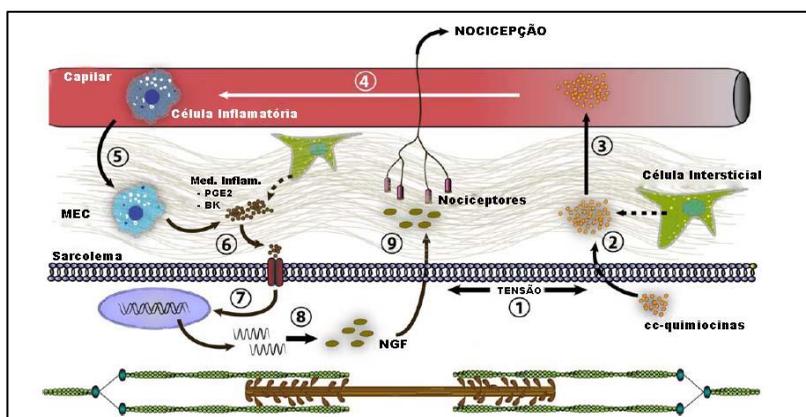
A maioria das pessoas já deve ter experimentado algum tipo de dor ou desconforto relacionado ao desempenho de uma atividade inusitada (HYLDAHL e HUBAL, 2013). De acordo com Lewis, Ruy e Bush-Joseph (2012), o atleta, de categoria iniciante ou elite, está familiarizado com o desconforto muscular pós-exercício conhecido como dor muscular de início tardio (do inglês, *Delayed Onset Muscle Soreness* - DOMS). Embora de comum ocorrência, os autores afirmam que a maioria dos pacientes não procura por atendimento, a menos que os sintomas sejam de natureza progressiva.

A dor manifesta-se usualmente entre 6 a 12 horas após o exercício e apresenta picos entre 24 e 72 horas, permanecendo por um período de 4 a 7 dias após a lesão (CARMICHAEL *et al.*, 2005; HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008; MUNEHIRO *et al.*, 2012). De acordo com Hyldahl e Hubal (2013), tal sintoma não apresenta relação com a extensão da lesão física observada através da biópsia e apresenta-se com grande variabilidade entre os indivíduos em resposta ao mesmo exercício, tanto em relação ao decurso temporal quanto à magnitude do pico.

Uma particularidade da DOMS é a ausência dos sintomas algicos em repouso. A hiperalgesia, aumento da percepção da dor provocada por um estímulo nocivo (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010), é evocada pela contração muscular e pela palpação, em contraste com a dor espontânea induzida por outros estímulos (ARENDRT-NIELSEN e GRAVEN-NIELSEN, 2008).

Atualmente, não existe um mecanismo que possa ser atribuído à cascata de acontecimentos associados à dor muscular tardia. Contudo, Hyldahl e Hubal (2013), sugerem que os eventos propostos por Armstrong (1984) possivelmente atuem em conjunto para produzir a dor muscular após o exercício excêntrico: lesão da estrutura muscular, perturbações na homeostase do Ca^{2+} e/ou a sensibilização de terminações nervosas livres por metabólitos derivados da invasão de células inflamatórias. Os possíveis mecanismos para a dor muscular tardia após o exercício excêntrico estão resumidos na Figura 2.

Figura 2 - Quadro teórico para a dor muscular após ações excêntricas.



Em resposta a uma tensão (1) gerada por ações excêntricas, cc-quimiocinas e outras proteínas de sinalização são produzidas e liberadas (2) a partir de fibras musculares danificadas. Outra fonte potencial de liberação de quimiocinas pode ser proveniente de células intersticiais que residem na matriz extracelular (linha pontilhada). Quimiocinas entram na circulação (3) e recrutam células inflamatórias (4). Infiltrado de células inflamatórias no músculo esquelético (5) liberam mediadores químicos tais como bradicininas (BK) e prostaglandinas (PGE2) (6) que podem atuar diretamente sobre os nociceptores musculares para a produção de dor muscular, ou ligar-se a receptores extracelulares (7) e aumentar a expressão de proteínas (isto é, do fator de crescimento do nervo - NGF), (8) que são excretados a partir da fibra muscular e atuam sobre nociceptores musculares produzindo dor (9). Mediadores químicos também podem ser liberados a partir de células intersticiais que residem na matriz extracelular (ECM). Fonte: Adaptado de Hyldahl e Hubal (2013).

A resposta inflamatória inicial é mediada pela invasão do local da lesão por neutrófilos, seguida pela ativação de macrófagos residentes

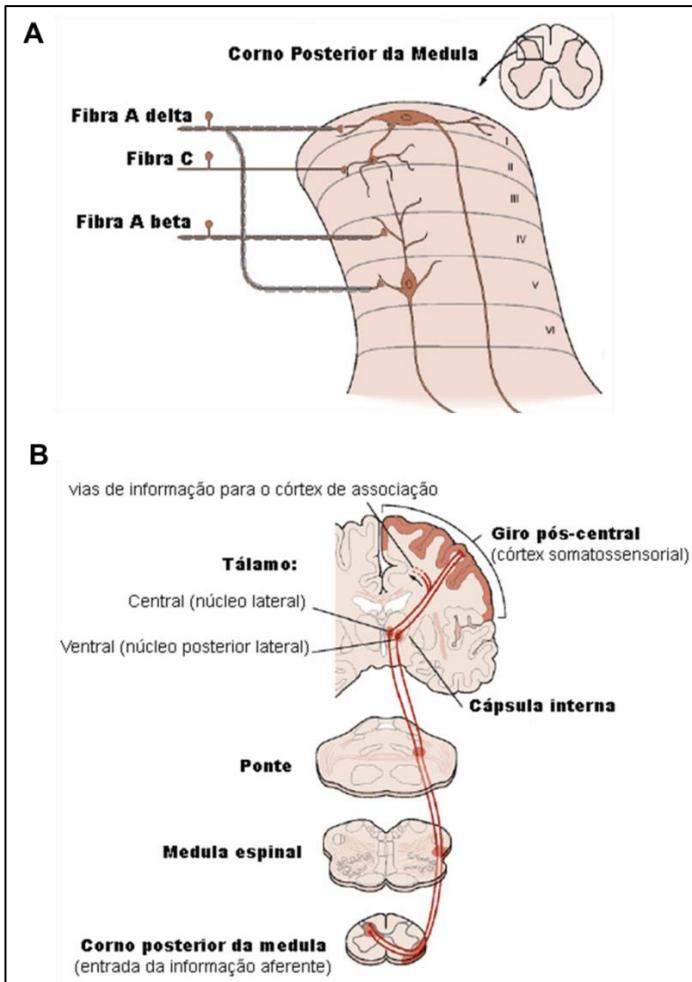
no tecido muscular (TIDBALL, 2005; TIDBALL e VILLALTA, 2010; TIDBALL, 2011; KHARRAZ *et al.*, 2013). Uma resposta Th1 é desencadeada por macrófagos M1 através da liberação de citocinas inflamatórias [fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6)] produzindo maior dano muscular e a liberação de óxido nítrico, que resulta na ativação de terminações nervosas livres e consequente nocicepção (TIDBALL e VILLALTA, 2010; MANN *et al.*, 2011; TIDBALL, 2011; RADAK *et al.*, 2012; HYLDAHL e HUBAL, 2013; KHARRAZ *et al.*, 2013).

As terminações nervosas livres são estruturas presente nas fibras aferentes do grupo III (fibras A δ , pouco mielinizadas) ou do grupo IV (fibras C, não mielinizadas) que estão em contato direto com o líquido intersticial e possuem expansões axonais contendo neuropeptídeos além de outras substâncias endógenas (MENSE, 1993; GRAVEN-NIELSEN e MENSE, 2001; GRAVEN-NIELSEN e ARENDT-NIELSEN, 2002).

A liberação de neuropeptídeos por terminações nervosas livres pode levar à sensibilização de neurônios sensoriais periféricos (nociceptores) especializados na codificação e transdução de estímulos nocivos (nocicepção) que são transmitidos a centros cerebrais superiores (LOESER e TREEDE, 2008; DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010).

As informações sobre dor geradas pela ativação das fibras aferentes A δ e C são conduzidas até a medula espinal e então para o encéfalo pelo trato espinotalâmico. Os axônios dos neurônios de segunda ordem que compõem essa via decussam imediatamente após penetrarem no corno dorsal da medula espinal e ascendem ao longo da superfície ventral até o tálamo. A partir do tálamo, as informações projetam-se para várias áreas do córtex cerebral (Figura 3 A e B) (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008).

Figura 3 - Fibras aferentes e vias de informação nociceptivas.



Neurônios de projeção na lâmina I recebem informações diretas de fibras aferentes nociceptivas pouco mielinizadas (fibras A δ) e informações indiretas de fibras aferentes nociceptivas amielínicas (fibras C) via interneurônios celulares na lâmina II. Neurônios na lâmina V recebem informações de mecanorreceptores de baixo limiar das fibras mielinizadas (A β) bem como informações diretas e indiretas a partir de fibras aferentes nociceptivas (A δ e C) (A). As informações de fibras nociceptivas ascendem da medula espinal para centros de processamento superior através do trato espino-talâmico (B). Fonte: Adaptado de Kandel, Schwartz e Jessell (2000).

A sensibilização de nociceptores produz a hiperalgesia e sensibilização central no corno dorsal da medula gerando descargas neuronais prolongadas. Como consequência desse processo, ocorrem o aumento das respostas a estímulos nocivos e não-nocivos bem como a expansão do campo receptivo (MENSE, 1993; GRAVEN-NIELSEN e ARENDT-NIELSEN, 2002; ARENDT-NIELSEN, FERNANDEZ-DE-LAS-PENAS e GRAVEN-NIELSEN, 2011).

Ao contrário do que se pensava, Graven-Nielsen e Arendt-Nielsen (2002) relatam que a sensibilização não é um processo inespecífico, este fenômeno é produzido por substâncias endógenas ligadas à moléculas receptoras altamente específicas na membrana do terminal nociceptivo.

Relativamente pouco se sabe sobre a ativação de nociceptores musculares devido às múltiplas entradas que influenciam a sensação muscular, incluindo fusos musculares e receptores presentes nos tecidos tendinoso, articular e cutâneo, bem como o processamento desses estímulos pelo sistema nervoso central. A complexidade destas informações dificulta o processo de elucidação dos mecanismos envolvidos na transmissão e na modulação da dor relacionada ao sistema músculo-esquelético (GRAVEN-NIELSEN e ARENDT-NIELSEN, 2002; KEHL e FAIRBANKS, 2003).

Por outro lado, o processo de sensibilização por trauma ou lesão inflamatória é provavelmente o mecanismo periférico melhor estabelecido para explicar a hiperalgesia muscular (GRAVEN-NIELSEN e ARENDT-NIELSEN, 2002). Tal processo é resultado da ativação de nociceptores polimodais (MENSE, 1993; GRAVEN-NIELSEN e ARENDT-NIELSEN, 2002) que podem ser excitados por substâncias endógenas e/ou estímulos mecânicos (GRAVEN-NIELSEN e MENSE, 2001).

Existem receptores moleculares para muitas substâncias algícas que estão presentes no tecido muscular e são liberados durante a estimulação dolorosa ou alterações patológicas (GRAVEN-NIELSEN e MENSE, 2001). Pesquisas com animais e humanos demonstram que a bradicinina (BK) (MURASE *et al.*, 2010), a serotonina (5-HT)(LIN *et al.*, 2011), a prostaglandina E2 (PGE2)(ALVAREZ, LEVINE e GREEN, 2010), o trifosfato de adenosina (ATP)(MARIDAKIS *et al.*, 2007; JANKOWSKI *et al.*, 2013; POLLAK *et al.*, 2014), ácidos (FUJII *et al.*, 2008; POLLAK *et al.*, 2014), glutamato (CHUN *et al.*, 2008), o fator de crescimento do nervo (NGF) (QUEME *et al.*, 2013), bem como a interleucina 6 (IL-6) (MANJAVACHI *et al.*, 2010), encontram-se envolvidos na hiperalgesia muscular.

Contudo, até o presente momento, os metabólitos que evocam e os mecanismos moleculares que levam a detecção e as sensações de dor muscular são ainda desconhecidos (POLLAK *et al.*, 2014).

Embora a dor músculo-esquelética seja mais importante e mais frequente clinicamente, a maioria dos estudos de dor experimental e de imagem, predominantemente privilegiam a investigação da dor cutânea (GRAVEN-NIELSEN e ARENDT-NIELSEN, 2002; ZIMMERMANN *et al.*, 2012).

Diversas pesquisas têm demonstrado características sensoriais e motoras distintas entre a dor muscular e cutânea, bem como a ativação de diferentes áreas centrais (NIDDAM *et al.*, 2002; KUPERS, SVENSSON e JENSEN, 2004; SCHRECKENBERGER *et al.*, 2005; HENDERSON *et al.*, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2011).

Para investigar a hipótese de que existem regiões específicas do cérebro ativadas preferencialmente pela dor muscular, Takahashi *et al.* (2011) analisaram imagens de ressonância magnética em humanos submetidos a estimulação elétrica dolorosa do músculo e da pele e compararam os padrões de atividade cerebral entre os dois grupos. Os autores demonstraram que as regiões cerebrais que responderam aos estímulos dolorosos de ambos (pele e músculo) foram: o tálamo, o córtex cingulado anterior, a ínsula, os córtices somatossensorial primário e secundário e o cerebelo. Além disto, foi demonstrando que as regiões do cérebro especificamente ativadas pela estimulação muscular foram o mesencéfalo, a amígdala, o núcleo caudado, o córtex orbitofrontal, o hipocampo, o parahipocampo e o córtex temporal superior. Com exceção do mesencéfalo, a maioria das regiões mostrou preferência contralateral (TAKAHASHI *et al.*, 2011).

Posteriormente, Zimmermann *et al.* (2012) observaram os padrões de ativação cortical durante a evocação da dor em humanos que apresentavam DOMS induzida por contrações excêntricas. Os autores compararam as áreas ativadas em resposta ao estímulo físico (pressão mecânica sobre o músculo doloroso) ou contração voluntária e concluíram que ambos os estímulos ativam o córtex somatossensorial primário e córtex motor de forma generalizada para além das áreas correspondentes somatotopicamente. Outras áreas ativadas foram o córtex cingulado, o córtex pré-motor, o córtex insular e os núcleos talâmicos.

1.3 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

Apesar da alta incidência de dor muscular tardia, os mecanismos, o tratamento e o impacto sobre o desempenho atlético ainda permanecem incertos (CHEUNG, HUME e MAXWELL, 2003).

Numerosas estratégias de tratamento têm sido utilizadas na tentativa de aliviar a dor muscular tardia e restaurar a função máxima dos músculos, tão rapidamente quanto possível (CHEUNG, HUME e MAXWELL, 2003; HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008; LEWIS, RUBY e BUSH-JOSEPH, 2012). Embora existam várias práticas para o tratamento desta dor, poucas têm suporte científico (CONNOLLY, SAYERS e MCHUGH, 2003).

Dentre a variedade de intervenções usadas de forma profilática e/ou terapêutica estão incluídas: estratégias nutricionais e farmacológicas, terapias elétricas, manuais, crioterapia e exercícios (HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008).

De acordo com Lewis, Ruby e Bush-Joseph (2012), a prevenção eficaz da dor muscular tardia é difícil, pois trata-se de uma resposta fisiológica à atividade. A profilaxia mais eficaz para a dor seria abster-se de exercícios físicos intensos e/ou prolongados. No entanto, os autores salientam que uma boa preparação física e alguns cuidados nutricionais podem minimizar os sintomas decorrentes do exercício físico.

Embora exista algum indício de que o alongamento e a massagem possam reduzir a dor muscular, poucas evidências comprovam seus eventuais benefícios (HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008).

Cheung, Hume e Maxwell (2003) defendem a hipótese de que a prevenção da dor muscular através do alongamento está apoiada nas propriedades visco elásticas do tecido e na capacidade de relaxamento do músculo. Para Herbert, De Noronha e Kamper (2011), a redução da dor muscular tardia pode ser maximizada com o alongamento antes e depois da atividade, no entanto, Henschke e Lin (2011) afirmam não encontrar tais efeitos.

Em relação à massagem, os resultados de pesquisas clínicas são contraditórios (HART, SWANIK e TIERNEY, 2005; ZAINUDDIN *et al.*, 2005; FREY LAW *et al.*, 2008; NELSON, 2013). Como sugerido por Cheung, Hume e Maxwell (2003), esta variabilidade de resultados pode ser atribuída ao momento da aplicação bem como ao tipo de técnica de massagem utilizada.

Outra estratégia sugerida por diversos autores para manter a demanda muscular e recrutamento é a utilização de suplementos nutricionais.

Howatson e Van Someren (2008) sugerem que a suplementação à longo prazo com antioxidantes ou o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) parece proporcionar um efeito profilático na redução da lesão muscular, assim como a ingestão de proteína antes e depois do exercício.

De fato, suplementações com carboidratos e proteínas são vistas como benéficas, porém, Cockburn *et al.* (2010), McBrier *et al.* (2010) e Cockburn *et al.* (2012), recomendam o consumo após a atividade física. Em um estudo duplo-cego Matsumoto *et al.* (2009) demonstram que a suplementação proteica durante um programa de treino intensivo reduz eficazmente a dor muscular e a sensação de fadiga, além disso, sugerem que as modificações perceptíveis podem ser atribuídas a atenuação do dano muscular e do processo inflamatório.

Todavia, a suplementação com vitamina C não tem apresentado resultados eficazes na redução dos sintomas decorrentes do exercício físico (CLOSE *et al.*, 2006; CONNOLLY *et al.*, 2006).

Quanto à utilização de AINEs, embora a administração destes medicamentos possa reduzir a lesão e a dor (CANNAVINO *et al.*, 2003; SCHOENFELD, 2012), também reduz a capacidade adaptativa do tecido muscular, portanto, devem ser prescritos de forma cautelosa para o tratamento a longo prazo (HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008; LEWIS, RUBY e BUSH-JOSEPH, 2012).

Recomendações sobre o uso da crioterapia, eletroterapia, homeopatia e ultra-som apresentam efeitos limitados no tratamento tanto da lesão, quanto dos sintomas associados a ela. No entanto, inconsistências na dose e frequência destas e outras intervenções podem ser responsáveis pela falta de consenso em relação à sua eficácia (CHEUNG, HUME e MAXWELL, 2003; HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008; LEWIS, RUBY e BUSH-JOSEPH, 2012).

Tem sido sugerido que a modalidade mais eficaz para tratar a dor muscular é a manutenção do exercício. O princípio básico que suporta tal hipótese é o aumento do fluxo sanguíneo local e a liberação de endorfinas que produzem efeitos analgésicos subsequentes. Contudo, apesar de eficaz, o atleta encontra-se mais susceptível à lesão muscular neste período (CHEUNG, HUME e MAXWELL, 2003; LEWIS, RUBY e BUSH-JOSEPH, 2012).

Diante do exposto anteriormente, intervenções que possam evitar ou reduzir os sintomas da dor muscular tardia e facilitar a regeneração tecidual após o exercício intenso são de grande interesse na prestação de cuidados de saúde e de suma importância no ambiente desportivo (BARNETT, 2006).

Hubscher *et al.* (2008) afirmam que a acupuntura pode ser uma opção de tratamento para a dor muscular tardia. Pesquisas recentes fornecem evidências quanto a eficácia da acupuntura no tratamento da dor (CHOI *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2014), inflamação (CHOI *et al.*, 2012) e disfunções músculo-esqueléticas (CAO *et al.*, 2013; DEARE *et al.*, 2013).

Contudo, algumas pesquisas com seres humanos vêm apresentando resultados contraditórios quanto a eficácia da acupuntura no tratamento da DOMS. Lin e Yang (1999) demonstram reduções significativas na sensibilidade muscular através da acupuntura, entretanto, em um estudo realizado por Barlas *et al.* (2000), tal método apresentou resultados insignificantes no controle algico. Por outro lado, Hubscher *et al.* (2008), relatam que o tratamento com acupuntura parece não apresentar efeitos sobre o limiar de dor mecânica e função muscular, mas reduz a percepção da dor avaliada através da escala análoga visual.

Embora existam algumas evidências para suportar o efeito analgésico da acupuntura em estudos pré-clínicos, mais pesquisas são necessárias para investigar os resultados desta terapia no tratamento da dor músculo-esquelética.

1.4 ACUPUNTURA E O ACUPONTO GB34 (YANGLINGQUAN)

A origem exata do uso da acupuntura na China é incerta; entretanto, sabe-se que foi um dos primeiros tratamentos utilizados na antiguidade (FILSHIE; ZARNEGAR, (2005). Após a sua origem, expandiu-se para o Japão, Coréia e para as demais regiões da Ásia (XIA *et al.*, 2010). Foi introduzida na Europa no início do século XVII e espalhou-se para mais de 160 países e regiões (ZHAO, 2008). Atualmente é considerada um dos tratamentos mais populares em todo o mundo e vem despertando grande interesse e aceitação no ocidente nas últimas décadas (MACPHERSON e ASGHAR, 2006; ZHAO, 2008, XIA *et al.*, 2010).

Devido à sua fundamentação pautada em um raciocínio empírico, causal e não científico (SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA, 2010), a acupuntura tem sido alvo de críticas e ceticismo (ZHAO, 2008; XIA *et al.*, 2010; ZHANG, WANG e MCALONAN, 2012). Porém, estudos clínicos e pré-clínicos nos moldes atuais vêm demonstrando a eficácia e efetividade desta terapia em diversas condições patológicas (STUX; HAMMERSCHALG, 2005; XIA *et al.*, 2010; HAN, 2011).

O termo “acupuntura” deriva de duas palavras latinas, “acus” (agulha) e “pungere” (perfurar). Essa técnica milenar consiste na inserção de agulhas finas em locais específicos do corpo, denominados acupontos, localizados em tecidos profundos com rica inervação sensorial (GOLDMAN *et al.*, 2010; ZYLKA, 2010; ZHANG, WANG e MCALONAN, 2012).

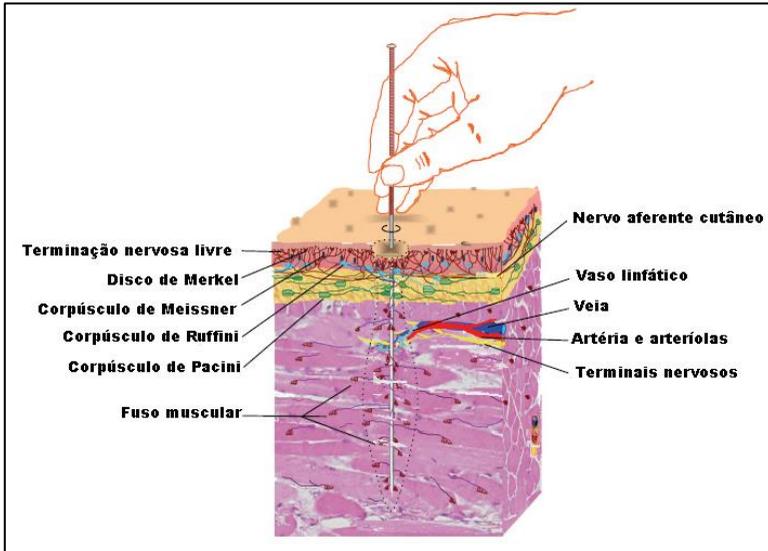
Estudos em animais e autópsias em humanos revelaram que a maioria dos pontos de acupuntura contém terminações nervosas livres, receptores cutâneos encapsulados (Merkel, Meissner, Ruffini, e corpúsculos de Pacini), receptores musculares (fusos musculares e órgãos tendinosos de Golgi), e suas fibras aferentes (ZHANG, WANG e MCALONAN, 2012).

Abraham, Chen e Ma (2011) analisaram a distribuição do receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1) e da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na pele e tecido conjuntivo dérmico de ratos e descobriram que os pontos de acupuntura contém um número significativamente maior de fibras nervosas contendo o TRPV1 (que são fibras A δ e C) e a nNOS em comparação com outros locais denominados não acupontos.

Contudo, a efetividade da acupuntura parece depender de outros aspectos além da variedade dos componentes neurais encontrados sob a pele dos acupontos. A influência da localização destes pontos, o modo de estimulação e profundidade do agulhamento, bem como a densidade de vasos sanguíneos e linfáticos distribuídos na pele, músculo e tecido conjuntivo ao redor da agulha inserida tem sido extensivamente investigada na literatura (CHO *et al.*, 2006; ZHAO, 2008; ZHANG, WANG e MCALONAN, 2012; BAI *et al.*, 2013).

Zhang, Wang e Mcalonan (2012), definem o conjunto destes componentes como uma unidade neural de acupuntura (do inglês, *Neural Acupuncture Unit* - NAU) (Figura 4) e sugerem que a especificidade funcional atribuída ao acuponto pode estar relacionada, em parte, às diferenças anatômicas encontradas entre os pontos de acupuntura e outros locais do corpo.

Figura 4 - Representação de uma Unidade Neural da Acupuntura (UNA).



A UNA possui componentes neurais e neuroativos envolvidos na resposta à estimulação manual de uma agulha de acupuntura que, quando estimulados pela rotação manual produz diferentes efeitos nos receptores localizados no tecido cutâneo e muscular. Fonte: Zhang, Wang e Mcalonan (2012).

Apesar das muitas descobertas nas últimas décadas, os mecanismos pelos quais a acupuntura exerce seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios não foram completamente elucidados (CHO *et al.*, 2006; ZHAO, 2008; GOLDMAN *et al.*, 2010; HAN, 2011; PARK *et al.*, 2014).

Quando uma agulha filiforme é inserida em um acuponto e estimulação mecânica (manipulação manual) ou elétrica é gerada, ocorre a ativação de receptores polimodais e a liberação de neuromoduladores que estão envolvidos na resposta fisiológica e terapêutica da acupuntura (ZHANG, WANG e MCALONAN, 2012).

Segundo Wang *et al.* (2013), pesquisas preliminares sugerem que a adenosina e a histamina, que é liberada pela ativação de mastócitos, são biomoléculas eficazes nos efeitos locais da acupuntura. Zhang, Wang e Mcalonan (2012), acrescentam que, além dos mastócitos, outras células, incluindo macrófagos, fibroblastos, linfócitos, plaquetas e queratinócitos também estão envolvidas na modulação de sinais locais e aferentes da NAU.

Utilizando modelos de dor neuropática ou inflamatória, Goldman *et al* (2010) mostraram que os mecanismos locais envolvidos no efeito analgésico da acupuntura são mediados pela liberação de adenosina e ativação de receptores A1 em camundongos. Posteriormente, os mesmos efeitos foram encontrados em humanos e observados somente com a estimulação manual do acuponto ST36, enquanto a inserção da agulha sem rotação ou sobre um local denominado “não acuponto”, não produziram aumento da concentração de adenosina no terminal nociceptivo (TAKANO *et al.*, 2012).

Paralelamente à elevação da concentração local de adenosina, o estímulo gerado pela rotação manual resulta em microlesões nos tecidos profundos (particularmente no músculo) ao redor da agulha (ZHAO, 2008). Como consequência da lesão tecidual, ocorre a degranulação de mastócitos e uma cascata de eventos bioquímicos que modulam a sinalização das fibras aferentes (LANGEVIN, CHURCHILL e CIPOLLA, 2001; WANG *et al.*, 2013).

Tais evidências foram demonstradas pela correlação positiva entre a taxa de degranulação de mastócitos e os efeitos analgésicos produzidos pela acupuntura manual (ZHANG *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2013). Após a ativação, mastócitos expressam histamina, leucotrienos, prostaglandinas, substância P, citocinas e quimiocinas (METCALFE, BARAM e MEKORI, 1997; CRIVELLATO *et al.*, 2003). Esses mediadores são responsáveis pela gênese da resposta inflamatória local (KRISHNASWAMY, AJITAWI e CHI, 2006; ZHANG, WANG e MCALONAN, 2012; WANG *et al.*, 2013).

Concomitantemente aos efeitos locais, os mediadores inflamatórios produzidos pela inserção da agulha estimulam as fibras nociceptivas que transmitem impulsos à medula espinal e centros superiores envolvidos no processamento e modulação da dor.

Sabe-se que impulsos nociceptivos de aferentes sensoriais são modulados por inibição descendente de centros supra-espinais, um fenômeno denominado controle inibitório nocivo difuso (do inglês, *Diffuse Noxious Inhibitory Control* – DNIC). Anatomicamente, o DNIC é composto por vias ascendentes do quadrante ventrolateral da medula espinal para os centros superiores e pelas projeções descendentes dos centros superiores ao longo do funículo dorsolateral para o corno dorsal da medula (LE BARS *et al.*, 1992). O DNIC é acionado quando dois estímulos nocivos são aplicados heterotopicamente, processo que envolve os receptores polimodais associados a fibras Aδ e C (LE BARS, 2002; MOONT *et al.*, 2010; POPESCU *et al.*, 2010; LEUNG, 2012).

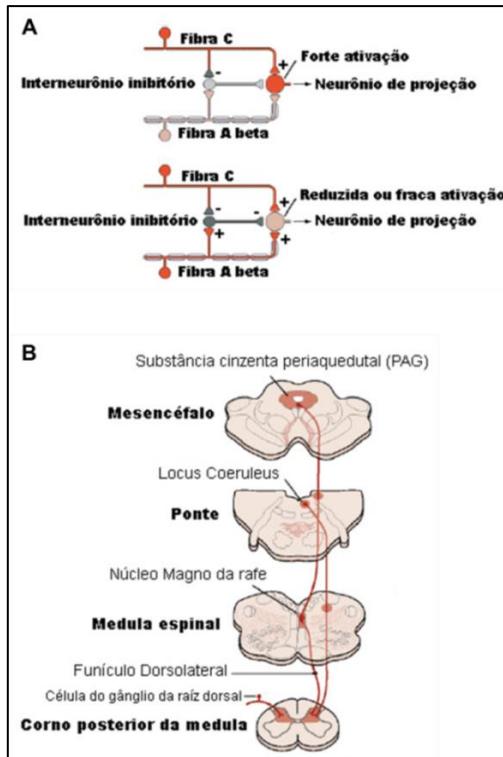
Em recente estudo, Tobaldini *et al.* (2014) afirmam que o controle ascendente contribui para o efeito antinociceptivo da acupuntura. Tal efeito foi comprovado pelo bloqueio farmacológico de vias ascendentes na medula espinal, núcleo acumbens e na porção rostro-ventral da medula que impediram a analgesia produzida pela estimulação do acuponto ST36 em um modelo de dor aguda induzida em ratos.

Além do controle inibitório difuso, a dor provocada pela ativação de nociceptores pode ser reduzida pela atividade simultânea de mecanorreceptores de baixo limiar mediados por fibras A β . Tal fenômeno é explicado pela teoria do portão da dor sugerida por Melzack e Wall nos anos 1960 (MELZACK e WALL, 1965; BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008) (Figura 5 A).

A inserção, seguida pela manipulação da agulha em pontos de acupuntura, desencadeia estímulos mecânicos que são transduzidos como sinais neurais ao longo das fibras A β . Estes sinais ascendem o trato dorsolateral da medula espinal e ativam os centros superiores envolvidos no processamento da dor como por exemplo, o núcleo da rafe, locus coeruleus, substância cinzenta periaquedutal (PAG), córtex pré-frontal, ínsula, córtex cingulado, núcleo caudado e amígdala (LEUNG, 2012).

Eventos subsequentes ocorrem, quer isoladamente ou concorrentemente: a modulação da noradrenalina e do sistema de sinalização de serotonina (5-HT), a produção de neuropeptídeos endógenos que atuam sobre receptores opióides, a produção de somatostatina e outras neurotrofinas, que em conjunto contribuem para a inibição da nocicepção via controle descendente sobre os aferentes espinais (LEUNG, 2012) (Figura 5 B).

Figura 5 - A modulação da dor explicada pela hipótese do controle do portão.



Esta hipótese se concentra na interação entre quatro classes de neurônios no corno dorsal da medula espinal: 1) aferentes nociceptivos não mielinizados (fibras C), 2) aferentes não nociceptivos mielinizados (fibras A β), 3) neurônios de projeção e 4) interneurônios inibitórios. O neurônio de projeção é estimulado por neurônios nociceptivos (fibras C) e não nociceptivos (fibras A β) e o saldo desses impulsos determina a intensidade da dor (A). Uma via descendente regula os neurônios nociceptivos na medula espinal. A via inicia na substância cinzenta periaquedual (PAG) no mesencéfalo e projeta-se para o núcleo Magno da rafe e outros núcleos serotoninérgicos (não mostrado), em seguida, através do funículo dorsolateral dirige-se para o corno dorsal da medula espinal. Projeções adicionais da medula espinal surgem a partir dos grupos de células noradrenérgicas da ponte e do núcleo paragigantocelular, que também recebe a entrada da PAG (B). Na medula espinal essas vias descendentes inibem neurônios de projeção nociceptivos através de conexões diretas, bem como por meio de inter-neurônios nas camadas superficiais do corno dorsal da medula. Fonte: Adaptado de Kandel, Schwartz e Jessell (2000).

Evidências mostram o envolvimento de opióides endógenos e seus receptores no efeito analgésico da acupuntura. Este fato deve-se à reversão da analgesia pela administração sistêmica de naloxona, um antagonista opióide (HAN, 2004; LIN e CHEN, 2008; CIDRAL-FILHO *et al.*, 2011; HESSELINK e KOPSKY, 2011). No estudo de Emmel (2008), a naloxona reverteu o efeito antinociceptivo obtido pela acupuntura manual no acuponto BL60 no modelo de nocicepção induzida por ácido acético em camundongos e a administração do antagonista 5HT1A bloqueou o efeito antinociceptivo da acupuntura manual no teste de contorção abdominal, porém, a administração dos antagonistas dos receptores 5HT2A/2C e 5HT3 não reverteu o efeito analgésico da acupuntura.

Da Silva (2013), verificou que a administração prévia dos antagonistas de receptores kappa (K) opióides, colinérgicos (muscarínico e nicotínico), dopaminérgicos (D2) e adenosinérgicos (A1 periféricamente), preveniu o efeito antinociceptivo pela acupuntura manual no acuponto SP6 no modelo do ácido acético em camundongos e observou também que, após a acupuntura manual, houve maior atividade da proteína cFos em áreas do encéfalo envolvidas na dor como o locus coeruleus (LC), a substância cinzenta periaquetal (PAG), o núcleo magno da rafe, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o hipocampo e a amígdala central.

Além do controle descendente inibitório da dor, Cho *et al.* (2006), suportados pela hipótese de que a acupuntura ativa o eixo hipotálamo-hipófise (pituitária)-adrenal (HPA), sugerem a existência de um possível mecanismo anti-inflamatório em conjunto com um suporte neuroimune dependente de mecanismos colinérgicos anti-inflamatórios.

No modelo de peritonite induzida por carragenina, a acupuntura manual no SP6 reduziu o número total de leucócitos, o número de neutrófilos, a atividade da mieloperoxidase, a permeabilidade capilar e restabeleceu os níveis de interleucina (IL10) na cavidade peritoneal de camundongos, de acordo com Da Silva (2013), este efeito foi em parte dependente de glicocorticóides endógenos.

Outro tema de grande interesse e crescente discussão em pesquisas com acupuntura é a especificidade funcional atribuída aos acupontos (ZHANG *et al.*, 2004; NA *et al.*, 2009; ZHANG, BIAN e LIN, 2010). Apesar de nenhum trabalho ter demonstrado comprovadamente essa teoria, alguns autores sugerem que mecanismos segmentares na medula espinal contribuem para essa possível especificidade (ZHAO, 2008; ZHANG, BIAN e LIN, 2010).

Entretanto, Zhang *et al.* (2004), através da estimulação dos pontos Yanglingquan (GB34) e Chengshan (BL57), localizados no mesmo segmento espinal, observaram distintos padrões de resposta cerebrais.

Análises de imagens de ressonância magnética funcional (fMRI) em indivíduos saudáveis demonstraram que a acupuntura manual no GB34 produz uma resposta significativa na modulação cortical de áreas somatomotoras (JEUN *et al.*, 2005).

Na *et al.* (2009), observou que a eletroestimulação do referido acuponto e um ponto “sham” (falso ponto de acupuntura), localizados no mesmo segmento da coluna vertebral, induziu padrões específicos de respostas cerebrais.

De acordo com este estudo, a eletroestimulação do GB34 no membro inferior esquerdo ativou especificamente do lado direito o putâmen, o claustrum, e bilateralmente o corpo caudado, o tálamo e o cerebelo. Todavia, o mesmo estímulo realizado no ponto sham à esquerda ativou contralateralmente o giro frontal superior, o lóbulo parietal inferior e o giro pré-frontal, enquanto o cerebelo foi ativado ipsilateralmente e o tálamo bilateralmente.

A ativação destas regiões cerebrais sugerem as indicações da estimulação do GB34, para o tratamento de condições clínicas como hemiplegias e vários distúrbios musculares (NA *et al.*, 2009).

De acordo com Bai *et al.* (2013) a acupuntura no Yanglingquan pode melhorar a recuperação de sequelas de acidente vascular cerebral, devido às influências entre o córtex motor ipsilesional e contralesional.

Em modelos animais de doença de Parkinson, os testes comportamentais mostraram que a estimulação dos acupontos GB34 e LI3 melhoram a disfunção motora em 87,7% dos animais (PARK *et al.*, 2003). Associados às mudanças comportamentais, a estimulação destes mesmos pontos inibiu a neurotoxicidade em neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (PARK *et al.*, 2003), diminuiu a ativação microglial e as respostas inflamatórias (KANG *et al.*, 2007) e reduziu as mudanças na expressão gênica no tálamo induzidas pelo MPTP (YEO *et al.*, 2013).

Além das influências motoras, os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios da acupuntura também têm sido investigados através da estimulação do acuponto GB34. Em um modelo de dor neuropática crônica induzida por lesão da medula espinal em ratos, a estimulação dos acupontos GB34 e VG26 produziu efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos ao reduzir a ativação microglial na medula (CHOI *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2012). Em modelos de dor inflamatória induzida por formalina e adjuvante completo de Freund (CFA), a acupuntura

atenua o comportamento nociceptivo e a alodinia mecânica e tais efeitos são resultado da fosforilação de ERK (PARK *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

A lesão muscular despertou grande interesse na ciência do exercício nos últimos anos e, particularmente a dor muscular de início tardio, tem sido um tema recorrente na literatura científica (PAULSEN *et al.*, 2012).

Algumas pesquisas sugerem que a hiperalgesia tardia e prolongada induzida pelo exercício excêntrico provavelmente tem mecanismos semelhantes a condições patológicas dolorosas, como a síndrome de dor miofascial e fibromialgia (GRAVEN-NIELSEN e ARENDT-NIELSEN, 2002; SLATER *et al.*, 2003; MURASE *et al.*, 2010).

Hyldahl e Hubal (2013), afirmam que a evocação da lesão muscular e auto-reparação em indivíduos saudáveis pode auxiliar na compreensão dos ciclos normais de degeneração/regeneração necessários para a reparação muscular saudável e ajudar a entender anormalidades nestes processos em pacientes com doenças neuromusculares, como a distrofia muscular.

No entanto, grandes variações em resposta a contrações excêntricas entre modelos humanos e animais e entre as várias condições experimentais são observadas na literatura (HYLDAHL e HUBAL, 2013). Tais variações de resultados vão desde descrições de poucos sinais de dano direto sob a miofibrila (YU, MALM e THORNELL, 2002; CRAMERI *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2013) à inflamação generalizada e necrose da fibra muscular (LAURITZEN *et al.*, 2009). Além disso, modelos animais experimentais que dependem de estimulação elétrica para induzir ações excêntricas podem não ser fisiologicamente representativos de danos induzidos por contrações voluntárias em seres humanos (CRAMERI *et al.*, 2007).

Embora os modelos de exercícios excêntricos sejam frequentemente utilizados para dissecar os processos de lesão muscular/reparação, uma lacuna significativa ainda permanece na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à resposta do dano inicial e posterior adaptação ao exercício excêntrico (HYLDAHL e HUBAL, 2013).

De acordo com Lewis, Ruby e Bush-Joseph (2012) e Radak *et al.* (2012), várias hipóteses foram sugeridas para explicar os mecanismos etiológicos da DOMS, contudo, apesar de extensivamente estudados, tais mecanismos continuam desconhecidos.

Além da dificuldade em se identificar as causas da lesão, observa-se também a ausência de terapias eficazes no tratamento e

resolução dos sintomas, o que retarda o processo de regeneração bem como o retorno às atividades desportivas (HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008).

Devido à ineficácia dos tratamentos convencionais, a procura pela acupuntura para o tratamento da dor e doenças músculo-esqueléticas tem aumentado significativamente (AMEZAGA URRUELA e SUAREZ-ALMAZOR, 2012).

A acupuntura tem sido amplamente utilizada para o tratamento de pacientes com dor aguda, ou crônica tais como: a síndrome da dor miofascial (CHOU, KAO e LIN, 2012) e a fibromialgia (DEARE *et al.*, 2013).

Sabe-se que a estimulação pela acupuntura regula a via neuronal responsável pela supressão da dor (ZHAO, 2008) e promove efeitos benéficos em diversas condições inflamatórias (KANG *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2011).

Sendo assim, a elaboração deste trabalho justifica-se pela convicção de que estudos desta natureza possam contribuir com a compreensão dos mecanismos envolvidos na dor muscular bem como na elaboração de protocolos eficazes no tratamento de lesões e desordens músculo-esqueléticas através da acupuntura.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar se o estímulo do acuponto GB34 produz efeito antinociceptivo na hiperalgesia muscular decorrente do exercício excêntrico em camundongos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um modelo de lesão muscular induzida por exercício excêntrico em esteira em camundongos Swiss;

- Avaliar o efeito antinociceptivo do tratamento com o acuponto GB34 na hiperalgesia muscular decorrente do exercício excêntrico por meio do teste de agarrar;

- Verificar se existe participação dos sistemas opioidérgico, serotoninérgico e adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no modelo proposto.

4 METODOLOGIA E RESULTADOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados camundongos Swiss machos (35 a 45 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, aclimatados à 22 ± 2 °C, no ciclo claro – escuro de 12 h, com acesso à ração e água *ad libitum*. Os animais foram homoganeamente distribuídos entre os grupos e ambientizados no laboratório de experimentação por 1 h antes dos testes. Todos os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação do protocolo PP00745 pelo CEUA - UFSC (Comitê de ética no uso de Animais – Universidade Federal de Santa Catarina) e realizados de acordo com o guia de cuidados em animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram o mínimo necessário para demonstrar o consistente efeito ao tratamento recebido.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para a mensuração da função sensório-motora no estabelecimento do modelo experimental de lesão muscular induzida por exercício excêntrico e na avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura foi empregada a Análise de Variância ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações. Para análise estatística dos grupos experimentais em relação aos parâmetros bioquímicos e mensuração da função sensório-motora na avaliação dos sistemas endógenos envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura foi utilizada a Análise de Variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman Keuls. Em todas as análises, valores de *P* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise estatística utilizou-se o software Graph Pad Prism para Windows versão 5.01 (2007).

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram conduzidos em duas etapas: na primeira etapa foi realizado o estabelecimento do modelo experimental

de lesão muscular induzida por exercício excêntrico e na segunda etapa foram investigados o possível efeito antinociceptivo da acupuntura e a participação de sistemas endógenos envolvidos neste efeito.

4.3.1 Estabelecimento do modelo experimental de lesão muscular induzida por exercício excêntrico

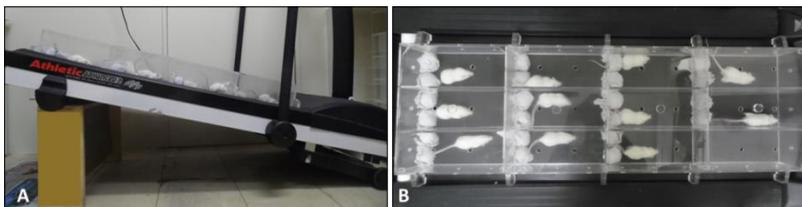
Para verificar se o protocolo de exercício proposto foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica bem como o decurso temporal desta, os animais foram avaliados quanto à função sensorio-motora através do teste de preensão plantar. Para a análise da atividade da enzima creatina cinase (CK), optou-se pelo menor tempo de exercício necessário para produzir a hiperalgesia, sendo então estabelecido o modelo experimental de lesão muscular induzida por exercício excêntrico que foi determinado como padrão para a próxima etapa de experimentos.

4.3.1.1 Indução da lesão por exercício excêntrico

A lesão muscular foi induzida em esteira ergométrica de uso humano (Athletic, Advanced 2, Brasil) adaptada para camundongos, com 12 raia individuais (25 x 10 x 9,5 cm) de acrílico (Figura 6).

Os animais foram previamente familiarizados com a esteira rolante por um período de 10 minutos a uma velocidade de 9,99 m/min em superfície plana. O início das exposições ocorreu três dias antes da execução do protocolo com o objetivo de ambientar os animais à esteira, sendo realizada uma exposição por dia. No quarto dia, os animais foram colocados em esteira estacionária em declive com 20° de inclinação por aproximadamente 20 min e após esse período de familiarização, foram submetidos ao exercício em esteira rolante com a execução da corrida a 14,99 m/min (Figura 6A). Visando o maior conforto dos animais e a prevenção de outras lesões, duas bolas de papel toalha, confeccionadas manualmente (5 folhas por unidade com diâmetro aproximado de 6 cm) foram colocadas em cada raia, entre o animal e a face posterior do acrílico (Figura 6B). Os camundongos foram ocasionalmente incentivados através de delicado toque manual para manter o status de execução do movimento durante todo o período.

Figura 6 - Camundongos Swiss sendo submetidos ao protocolo de exercício excêntrico na esteira.



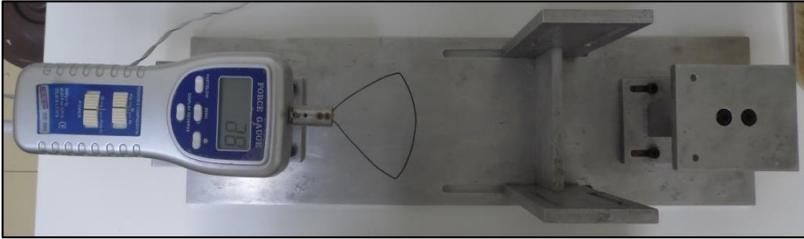
Visão lateral (A) e superior (B). Fonte: Foto produzida no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI).

Para determinar o tempo de atividade necessário para produzir hiperalgesia mecânica nos camundongos, utilizou-se o protocolo adaptado de Carmichael *et al.* (2010). Os animais foram divididos em 4 grupos denominados: 1) NE: não realizaram exercícios; 2) EX1: foram submetidos ao protocolo de corrida por um período de 130 minutos, sendo os primeiros 20 minutos de esteira realizados com aumento gradativo da velocidade a cada 5 minutos de exercício partindo de 9,99 m/min até atingir a velocidade de 14,99 m/min mantida até o final do período; 3) EX2: foram submetidos ao protocolo de corrida por um período de 110 minutos; 4) EX3: foram submetidos ao protocolo de corrida por um período de 90 minutos.

4.3.1.2 Avaliação da função sensório-motora (Força de Agarrar)

A avaliação por meio da força de preensão plantar foi utilizada para determinar a hiperalgesia muscular (KEHL e FAIRBANKS, 2003). A mensuração da força máxima compressiva exercida pelas quatro patas foi realizada sobre um aro de arame acoplado a um sistema de avaliação de força (Force Gauge, Instrutherm, Brasil) como mostrado na Figura 7.

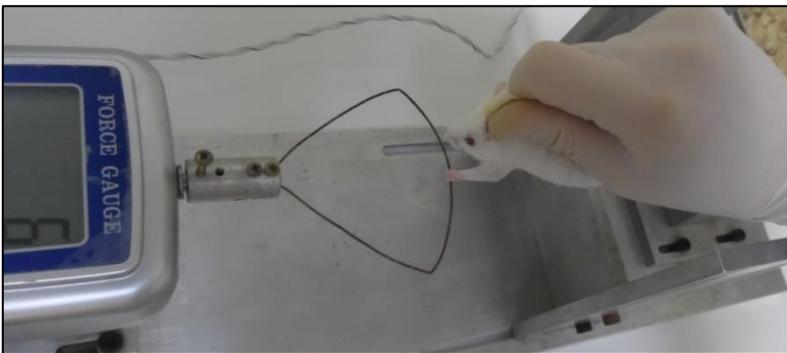
Figura 7 - Sistema de avaliação de força utilizado no teste de prensão plantar para avaliação da hiperalgesia mecânica.



Fonte: Foto produzida no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI).

Durante o teste, cada animal foi gentilmente contido de forma que pudesse agarrar, somente com um dos membros, a malha de arame (10 × 12 cm) conectada a um medidor de tensão capaz de quantificar (em gramas) a força exercida pelo animal. O animal foi movido lentamente em direção rostro-caudal até exercer a força compressiva máxima. Cada animal foi testado três vezes, com intervalos de 2-3 minutos obtendo-se a média total da força entre os quatro membros (Figura 8).

Figura 8 - Camundongo Swiss sendo submetido ao teste de prensão plantar para avaliação da hiperalgesia mecânica.



Fonte: Foto produzida no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI)

A hiperalgesia mecânica foi avaliada um dia antes da indução da lesão para caracterização da resposta basal e nos tempos de 1, 3, 5, 7, 9, 24, 48, 72, 96 e 120 h após o exercício visando avaliar o decurso temporal da hiperalgesia muscular no estabelecimento do modelo.

4.3.1.3 Atividade da enzima creatina cinase (CK) no plasma sanguíneo

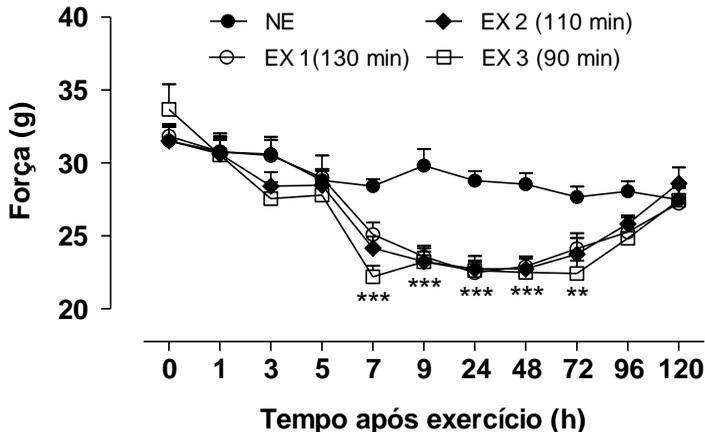
Para a avaliação da atividade da enzima creatina cinase (CK), os animais foram anestesiados com isoflurano (2-3% a 100% de oxigênio), o sangue foi coletado do plexo orbital em capilar heparinizado (1, 6 e 24 h após exercício) e centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (plasma) foi separado e armazenado a -80°C até a realização do ensaio. A atividade da CK foi mensurada utilizando-se um Kit comercial (CK-Nac Liquiform, Labtest, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante e calculada pela taxa de aumento da absorbância a 340 nm devido à formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). A taxa de absorbância foi medida por meio de espectofotometria realizada através do ativador cinético N-acetil Cisteína, utilizando-se um leitor de microplacas (Infinite® M200 TECAN). A atividade da creatina cinase foi expressa em unidades por litro (DAVIS *et al.*, 2007).

4.3.1.4 Resultados

4.3.1.4.1 Hiperalgesia muscular induzida por exercício excêntrico

Os resultados expostos na Figura 9 demonstram que os diferentes tempos de exercício na esteira produziram hiperalgesia mecânica observada através da redução significativa dos níveis de força no teste de agarrar. A hiperalgesia mecânica teve início 7 h após o exercício nos grupos EX2 (24,18 g \pm 0,78) e EX3 (22,20 g \pm 0,74) e permaneceu até 72 h (EX2 = 23,76 g \pm 1,09; EX3 = 22,42 g \pm 0,88), enquanto no grupo EX1 tal comportamento manifestou-se entre 9 h (23,58 g \pm 0,58) e 48 h (22,92 g \pm 0,69) após o exercício. Todos os grupos foram significativamente diferentes ($P < 0,01/0,001$) quando comparados ao grupo NE, isento de exercício (7 h = 28,43 g \pm 0,46; 9 h = 29,82 g \pm 1,11; 48 h = 28,55 g \pm 0,76; 72 h = 27,68 g \pm 0,71).

Figura 9 - Decurso temporal da hiperalgesia mecânica induzida pelo exercício excêntrico.

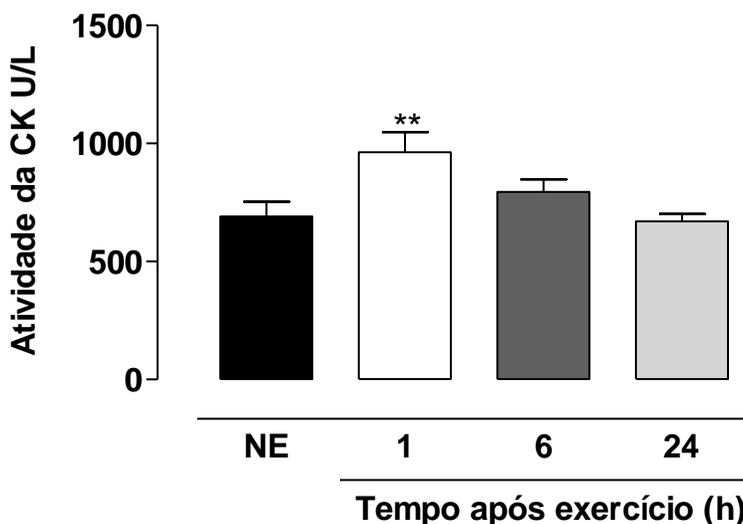


Avaliação do decurso temporal da hiperalgesia mecânica produzida por diferentes protocolos de exercício excêntrico avaliada pela redução da força no teste de preensão em camundongos Swiss. Cada ponto representa a média de 9 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo não exercitado, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.1.4.2 Atividade da enzima creatina cinase

Para avaliar a eficácia do protocolo de exercício em produzir lesão muscular, a atividade da enzima creatina cinase (CK) no plasma sanguíneo foi mensurada e comparada entre os grupos que realizaram exercício e o grupo não exercitado. Conforme observado na Figura 10, a atividade desta enzima estava significativamente elevada ($P < 0,01$) no grupo exercitado somente 1 h ($963,80 \text{ U/l} \pm 84,74$) após o exercício, retornando ao nível basal após 24 h ($669,44 \text{ U/l} \pm 32,99$) quando comparada ao grupo não exercitado ($691,50 \text{ U/l} \pm 61,78$).

Figura 10 - Análise da atividade da enzima creatina cinase.



Elevação da atividade da enzima CK no plasma de camundongos Swiss após 90 min de exercício excêntrico em esteira. Cada coluna representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo não exercitado, ** $p < 0,01$.

4.3.2 Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura e a participação de sistemas endógenos

Nesta etapa, os grupos experimentais foram avaliados quanto à hiperalgesia mecânica, visando a investigação do efeito antinociceptivo do tratamento com acupuntura no acuponto GB34 no modelo de lesão muscular induzida por exercício excêntrico e a avaliação dos sistemas endógenos envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura.

4.3.2.1 Indução da lesão por exercício excêntrico

A lesão muscular foi induzida em esteira ergométrica conforme descrito na primeira etapa de experimentos (item 4.3.1.1). Os animais foram familiarizados com a esteira plana três dias antes da execução da corrida que foi realizada em esteira inclinada pelo período de 90 min.

4.3.2.2 Tratamentos - Acupuntura e Sham

Para a realização dos tratamentos foram utilizadas agulhas de acupuntura esterilizadas Dongbang (0,25 mm x 7 mm). Uma agulha foi inserida unilateralmente com o auxílio de um aplicador (Figura 11) até 3 mm de profundidade no membro posterior direito do animal e estimuladas em rotação a uma taxa de duas rotações por segundo durante 15 segundos e, após o estímulo, permaneceram retidas por um período de 10 minutos (Silva *et al.*, 2011).

Figura 11 - Dispositivo auxiliar utilizado para aplicar agulhas de acupuntura.

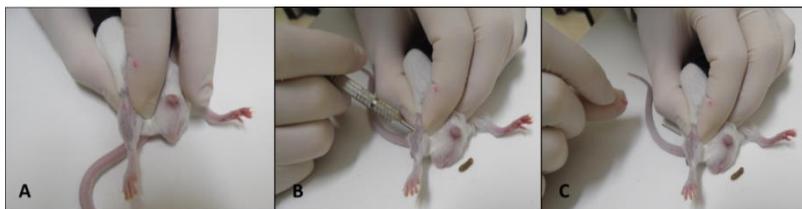


Fonte: Imagem ilustrativa disponível em: www.universodaacupuntura.com.br/produtos/auriculoterapia-acessorios/aplicador-com-mola-para-agulha-7-mm/

No grupo denominado GB34, os animais foram contidos cuidadosamente em um cilindro de polietileno (7 cm x 2,5 cm) com as patas posteriores para fora do cilindro, sendo o membro direito imobilizado pelo avaliador para a inserção da agulha no acuponto GB34, localizado no ponto de intersecção das linhas a partir das bordas

anterior e inferior à cabeça da fíbula como descrito por YU *et al.* (2010) (Figura 12).

Figura 12 - Aplicação de uma agulha de acupuntura no acuponto GB34.



Contenção do animal num cilindro de polietileno e imobilização do membro posterior direito (A), inserção da agulha com auxílio do aplicador (B), agulha inserida no acuponto GB34 (C). Fonte: Fotos produzidas no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI).

Logo após a aplicação das agulhas, os camundongos foram mantidos deambulando livremente sobre a bancada num espaço delimitado de 101,50 x 59,50 cm para reduzir o estresse do animal devido à contenção durante o período de tratamento (Figura 13). A cada sessão, foram tratados apenas quatro animais simultaneamente, sendo o tempo de cada animal marcado por diferentes cronômetros para garantir a manutenção do tratamento pelo mesmo período de tempo em todos eles.

Figura 13 - Camundongos Swiss submetidos ao tratamento com acupuntura.

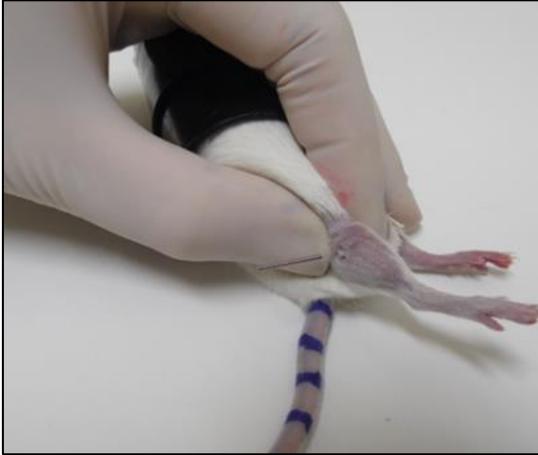


Fonte: Foto produzida no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI).

Para o controle foi realizada a inserção da agulha em um falso ponto de acupuntura, localizado na intersecção das linhas a partir das

bordas posterior e inferior à cabeça da fíbula. Os grupos que receberam este tipo de tratamento foram denominados de Sham (“falsa acupuntura”). As agulhas foram inseridas e manipuladas em rotação da mesma forma e permaneceram no local pelo mesmo tempo em que o estímulo da acupuntura no acuponto GB34 (Figura 14).

Figura 14 - Camundongo Swiss recebendo tratamento com acupuntura Sham.



Fonte: Foto produzida no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI).

Os tratamentos foram realizados 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h após a execução do protocolo de exercício para a análise do efeito antinociceptivo da acupuntura. Para a avaliação dos sistemas endógenos envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura os tratamentos foram realizados somente nos tempos de 6 e 24 h após a lesão. Todos os tratamentos (GB34 ou Sham) foram realizados 1 h antes dos testes comportamentais.

4.3.2.3 Avaliação da função sensório-motora (Força de Agarrar)

Nesta etapa de experimentos, após terem sido determinados o período de início e o pico da hiperalgesia, foi determinado o decurso temporal do efeito antinociceptivo da acupuntura após uma sessão por meio do teste de prensão realizado um dia antes para caracterização da

resposta basal e nos tempos de 1, 3 e 6 h após a sessão de acupuntura que foi realizada 6 h após a corrida.

Na avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura durante o período de 6 dias, o teste de prensão plantar foi aplicado um dia antes da indução da lesão e 7, 24, 48, 72, 96 e 120 h após o exercício.

Ao investigar a participação dos sistemas endógenos envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura, o teste de prensão foi realizado somente nos períodos de um dia antes da lesão e 24 h após o exercício.

4.3.2.4 Avaliação dos sistemas endógenos envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura

Com o intuito de avaliar as possíveis vias endógenas pelas quais a acupuntura, por meio da estimulação manual do acuponto GB34, exerce seu efeito antinociceptivo no modelo de lesão muscular induzida por exercício, foi avaliado o envolvimento dos seguintes sistemas: opioidérgico, serotoninérgico e adenosinérgico.

Para esta avaliação foram utilizadas ferramentas farmacológicas específicas para cada um dos sistemas em estudo.

4.3.2.4.1 *Participação do sistema opioidérgico*

Os camundongos foram submetidos ao protocolo de exercício e tratados com acupuntura após 6 h. Os tratamentos com morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 2,5 mg/kg, via s.c.) ou veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg, via s.c.), foram administrados 6,5 h depois da corrida. No dia seguinte (24 h após a lesão), os animais foram pré-tratados pela via intraperitoneal com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, via i.p.), ou veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg, via i.p.). Após 20 minutos receberam os tratamentos com acupuntura, morfina ou veículo. A resposta nociceptiva ao exercício foi avaliada 30 minutos após a administração de morfina ou veículo e 1 h após a acupuntura por meio do teste de prensão plantar.

4.3.2.4.2 *Participação do sistema serotoninérgico*

Os camundongos foram pré-tratados com PCPA (inibidor da síntese de serotonina, 100 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg, i.p.) por um período de 4 dias. O protocolo de exercício foi realizado no terceiro dia do tratamento, 20 min após a administração do

PCPA ou veículo. Os tratamentos com acupuntura foram realizados 6 h após a corrida, enquanto os animais que receberam morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 2,5 mg/kg, via s.c.) ou veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg, via s.c.) foram tratados 6,5 h depois. No dia seguinte (24 h após a lesão), os animais receberam PCPA ou veículo 20 min antes dos respectivos tratamentos com acupuntura, morfina ou veículo. O teste de prensão plantar foi realizado 30 min após a administração de morfina ou veículo e 1 h após a acupuntura.

4.3.2.4.3 Participação do sistema adenosinérgico

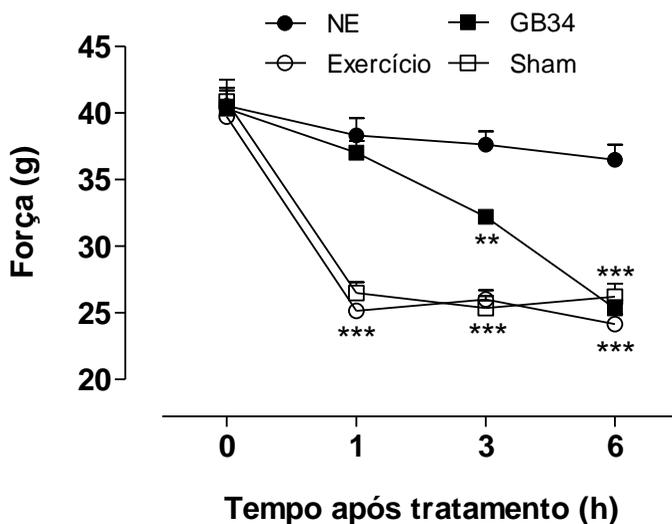
Os camundongos foram submetidos ao protocolo de exercício e tratados com acupuntura 6 h depois. Os tratamentos com CHA (agonista seletivo dos receptores adenosinérgicos A1, 1 mg/kg, via i.p.), ou veículo (salina 0,9%, 10 ml/kg, via i.p.), foram administrados 6,5 h após a corrida. No dia seguinte (24 h após a lesão), os animais foram pré-tratados pela via intraperitoneal com DPCPX (antagonista seletivo dos receptores adenosinérgicos A1, 1 mg/kg, via i.p.) ou veículo (salina 0,9% + DMSO 0,1%, 10 ml/kg, via i.p.). Após 20 minutos receberam os tratamentos com acupuntura, CHA ou veículo. A resposta nociceptiva ao exercício foi avaliada 30 minutos após a administração de CHA ou veículo e 1 h após a acupuntura por meio do teste de prensão plantar.

4.3.2.5 Resultados

4.3.2.5.1 Determinação do decurso temporal do efeito antinociceptivo após uma sessão de acupuntura

Os dados apresentados na Figura 15 mostram a redução dos níveis de força no teste de prensão plantar após o exercício e o melhor efeito antinociceptivo encontrado para o tratamento com acupuntura obtido no período de 1 h ($37,02 \text{ g} \pm 0,88$) após a sessão. Nos períodos de 3 h ($32,20 \text{ g} \pm 0,32$) e 6 h ($25,34 \text{ g} \pm 0,60$) após, o tratamento com o acuponto GB34 não foi capaz de reverter a hiperalgesia mecânica quando comparado ao grupo não exercitado (1 h = $38,33 \text{ g} \pm 1,28$; 3 h = $37,63 \text{ g} \pm 0,97$; 6 h = $36,49 \text{ g} \pm 1,12$). O grupo tratado com acupuntura Sham não apresentou efeito antinociceptivo (1 h = $26,50 \text{ g} \pm 0,79$; 3 h = $25,36 \text{ g} \pm 0,90$; 6 h = $26,22 \text{ g} \pm 0,96$).

Figura 15 - Decurso temporal do efeito antinociceptivo após uma sessão de acupuntura.



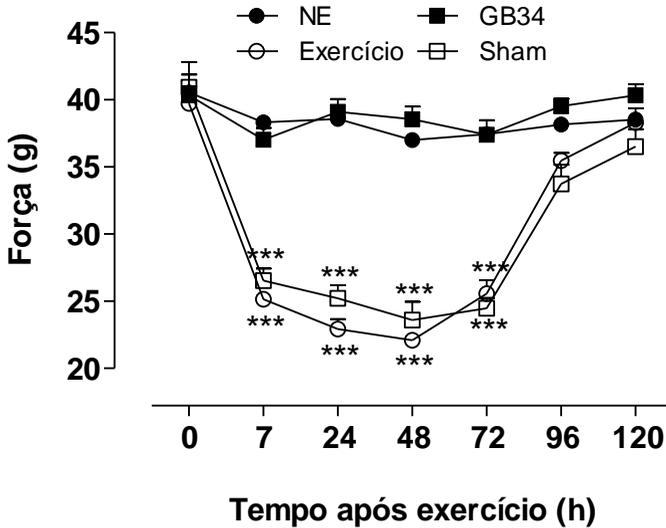
Avaliação do decurso temporal do efeito antinociceptivo após uma sessão de acupuntura no acuponto GB34 avaliada pela redução da força no teste de preensão em camundongos Swiss. Cada ponto representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo não exercitado, ** $p < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.3.2.5.2 Efeito antinociceptivo da acupuntura no decurso temporal de 6 dias

Avaliando o tratamento com acupuntura num período de 6 dias após o exercício físico (Figura 16), foi observado que a hiperalgesia teve início 7 h após a corrida e permaneceu até 72 h, tanto no grupo Exercício (7 h = 25,15 g \pm 0,33; 72 h = 25,57 g \pm 0,98), que não recebeu nenhum tipo de tratamento, quanto no grupo submetido ao tratamento Sham (7 h = 26,53 g \pm 0,90; 72 h = 24,48 g \pm 0,76). Entretanto, no grupo submetido ao tratamento com o GB34, foi observado que a força no teste de preensão foi significativamente aumentada quando comparada aos animais submetidos ao exercício sem tratamento, ou aos do grupo Sham. Os níveis de força no teste de preensão no grupo GB34

foram semelhantes ao grupo não exercitado em todos os tempos avaliados.

Figura 16 - Decurso temporal do efeito antinociceptivo da acupuntura no período de 6 dias.



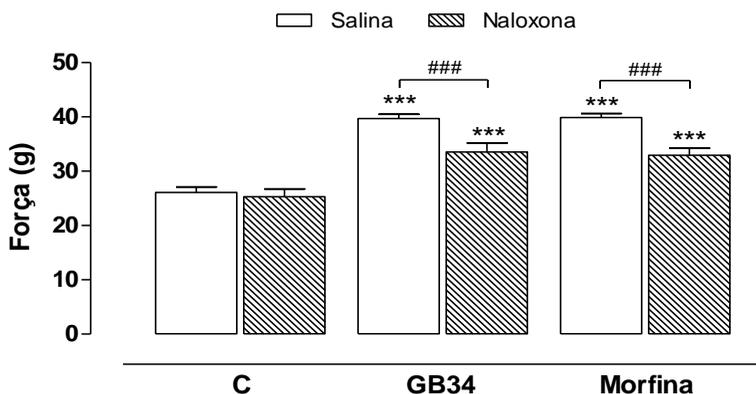
Avaliação do decurso temporal do efeito antinociceptivo de acupuntura no acuponto GB34 no período de 6 dias avaliada pela redução da força no teste de prensão em camundongos Swiss. Cada ponto representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo não exercitado, *** $P < 0,001$.

4.3.2.5.3 *Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34*

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que a hiperalgesia muscular induzida pelo protocolo de exercício proposto é prevenida pelo tratamento com o GB34 bem como pela administração do agonista opióide, morfina (2,5 mg/kg). Este efeito antinociceptivo é observado pela comparação dos níveis de força no teste de prensão plantar entre os grupos tratados com GB34 (39,70 g \pm 0,80) ou morfina (39,88 g \pm 0,72) e o grupo controle (26,07 g \pm 1,04). Contudo, quando

administrado um antagonista de receptor opióide não seletivo, naloxona (1 mg/kg) a resposta ao teste de preensão foi estatisticamente diferente dos outros grupos, mostrando uma redução do efeito antinociceptivo tanto nos animais tratados com acupuntura (GB34 + nal = 33,54 g \pm 1,68) quanto nos animais tratados com morfina (morfina + nal = 32,95 g \pm 1,26).

Figura 17 - Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34.



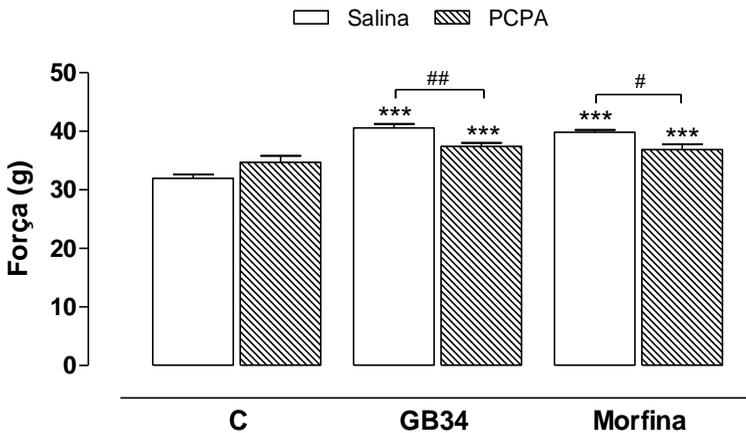
Avaliação do envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34 avaliada pela redução da força no teste de preensão em camundongos Swiss. Cada coluna representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle, ***P<0,001. Os sustentados representam os níveis de significância entre os grupos tratados com GB34 ou Morfina, ###P<0,001.

4.3.2.5.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34

Na Figura 18 observa-se a participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura. Os resultados mostram que a hiperalgesia muscular induzida pelo protocolo de exercício proposto é prevenida pelo tratamento com o GB34 bem como pela administração do agonista opióide, morfina (2,5 mg/kg). Este efeito antinociceptivo é observado pela comparação dos níveis de força no

teste de prensão plantar entre os grupos tratados com GB34 ($40,60 \text{ g} \pm 0,69$) ou morfina ($39,83 \text{ g} \pm 0,40$) e o grupo controle ($31,94 \text{ g} \pm 0,65$). Entretanto, nos animais pré-tratados com o inibidor da síntese de serotonina PCPA e submetidos posteriormente aos tratamentos com acupuntura ou morfina, o efeito antinociceptivo foi significativamente reduzido (PCPA+GB34 = $37,44 \text{ g} \pm 0,58$; PCPA+Morfina = $36,87 \text{ g} \pm 0,94$).

Figura 18 - Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34.



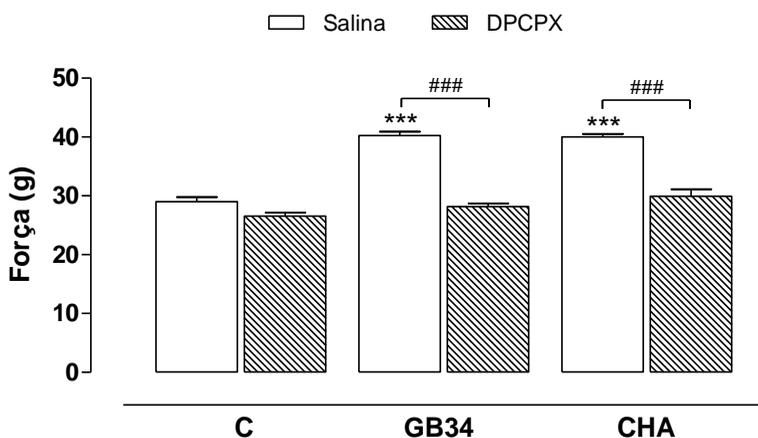
Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34 avaliada pela redução da força no teste de prensão em camundongos Swiss. Cada coluna representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle, *** $P < 0,001$. Os sustentados representam os níveis de significância entre os grupos tratados com GB34 ou Morfina, ## $P < 0,01$; # $P < 0,1$.

4.3.2.5.5 *Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34*

Conforme apresentado na figura 19, a hiperalgesia muscular induzida pelo protocolo de exercício proposto é prevenida pelo tratamento com o acuponto GB34 bem como pela administração do CHA (agonista adenosinérgico para o receptor A1). Este efeito

antinociceptivo é observado pela comparação dos níveis de força no teste de preensão plantar entre os grupos tratados com GB34 ($40,26 \text{ g} \pm 0,64$) ou CHA ($40,01 \text{ g} \pm 0,532$) e o grupo controle ($29,03 \text{ g} \pm 0,74$). No entanto, a administração do DPCPX (antagonista adenosinérgico para o receptor A1) reverteu completamente o efeito antinociceptivo da acupuntura (DPCPX+GB34 = $28,15 \text{ g} \pm 0,58$) e do CHA (DPCPX+CHA = $29,94 \text{ g} \pm 1,19$).

Figura 19 - Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34



Avaliação do envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto GB34 avaliada pela redução da força no teste de preensão em camundongos Swiss. Cada coluna representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados com o grupo controle, *** $P < 0,001$. Os sustenidos representam os níveis de significância entre os grupos tratados com GB34 ou CHA, ### $P < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

A dor muscular de início tardio (DOMS) é um evento comum na vida diária (MURASE *et al.*, 2010) e tem sido atribuída a danos na estrutura muscular (FRIDEN e LIEBER, 2001). Além disso, a dor musculoesquelética é um grande problema clínico, muitas vezes tratada insuficientemente (ARENDDT-NIELSEN e GRAVEN-NIELSEN, 2008).

Os mecanismos neurobiológicos envolvidos na dor muscular são difíceis de identificar a partir de estudos clínicos devido à alta variabilidade entre os pacientes (ARENDDT-NIELSEN e GRAVEN-NIELSEN, 2008). Uma análise objetiva deste tipo de dor em indivíduos saudáveis é frequentemente difícil em estudos humanos e, segundo Munehiro *et al.* (2012) poucos relatos estão disponíveis na literatura sobre os sintomas da DOMS em modelos animais.

Kehl e Fairbanks (2003) sugerem um refinamento nos modelos animais e métodos para avaliar o limiar da dor muscular em condições variadas, bem como uma avaliação do impacto do exercício no limiar da dor e a eficácia de tratamentos analgésicos em pesquisas pré-clínicas.

No presente estudo, optou-se pela utilização do modelo de DOMS induzida por exercício excêntrico, pois este mimetiza os componentes fisiopatológicos presentes na clínica e no ambiente desportivo (CRAMERI *et al.*, 2007). Inicialmente, foi proposto o estabelecimento de um modelo de lesão muscular induzida por exercício excêntrico em esteira visto que não foram encontrados na literatura protocolos realizados com camundongos Swiss.

Baseado em pesquisas realizadas com camundongos C57BL/6 os camundongos Swiss foram inicialmente submetidos ao protocolo sugerido por Carmichael *et al.* (2010) com algumas adaptações quanto à velocidade e inclinação da esteira. Para reduzir o estresse dos animais optou-se também pela redução no tempo de exercício, sendo então avaliado o comportamento nociceptivo por meio do teste da força de agarrar.

A escolha do teste da força de agarrar para avaliar a hiperalgesia mecânica parte do conhecimento prévio acerca da evocação deste tipo de dor pela contração muscular (ARENDDT-NIELSEN e GRAVEN-NIELSEN, 2008; ZIMMERMANN *et al.*, 2012). Além disso, Kehl e Fairbanks (2003) demonstram uma redução de força no teste de agarrar em ratos submetidos ao exercício excêntrico que é revertida pelo agonista opióide levorfanol. De acordo com os autores, como opióides não são conhecidos por aumentar a força muscular, a reversão da força

observada pelo teste é consistente com um efeito analgésico e não o resultado do aumento da produção de força muscular.

A hiperalgesia mecânica produzida por diferentes tempos de exercício foi confirmada pela redução significativa dos níveis de força no teste de agarrar. Tal comportamento teve início entre 7 e 9 h após o exercício, cursando com picos entre 24 e 72 h e duração de 4 dias. Estes dados são compatíveis com os resultados descritos em pesquisas anteriores (CARMICHAEL *et al.*, 2005; HOWATSON e VAN SOMEREN, 2008; MUNEHIRO *et al.*, 2012).

A eficácia do protocolo de exercício em produzir lesão muscular foi confirmada pela mensuração da atividade da enzima creatina cinase (CK) no plasma sanguíneo. A atividade da CK tem sido extensivamente utilizada na literatura, sendo reconhecida como um marcador indireto de lesão muscular, apesar da grande variação quanto ao pico de atividade e à magnitude da resposta temporal (MOMKEN *et al.*, 2005; DAVIS *et al.*, 2007; MEADOR e HUEY, 2011; HYLDAHL e HUBAL, 2013). Dados da literatura sugerem que a lesão induzida pela corrida em declive evoca uma resposta rápida e de menor plenitude em relação ao pico de CK, variando tipicamente entre 100 a 1000 UI no período de algumas horas a um dia após o exercício, tanto em animais (ARMSTRONG, OGILVIE e SCHWANE, 1983; CARMICHAEL *et al.*, 2005; DAVIS *et al.*, 2007) quanto em humanos (SCHWANE *et al.*, 1983; BYRNES *et al.*, 1985).

Em conjunto, tais resultados corroboram com a proposta do estabelecimento de um modelo de lesão muscular induzida por exercício excêntrico em esteira em camundongos Swiss e fornecem subsídios para a realização de outros estudos que possam contribuir com a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos neste tipo de lesão bem como a elaboração de tratamentos eficazes da lesão muscular e dor muscular tardia.

A ausência de fármacos ideais para o tratamento de sintomas musculoesqueléticos (CURATOLO e BOGDUK, 2001; GRAVEN-NIELSEN e ARENDT-NIELSEN, 2002) além da preocupação com os efeitos colaterais relatados com uso de anti-inflamatórios e analgésicos, tem aumentado a procura por outras terapias para o alívio a dor e a restauração da função máxima dos músculos, tão rapidamente quanto possível (SUN *et al.*, 2008; AMEZAGA URRUELA e SUAREZ-ALMAZOR, 2012).

Dentre as medidas não farmacológicas para o tratamento da dor, a acupuntura tem se mostrado um método eficaz, seguro, com baixos índices de efeitos colaterais e custo-efetivo (WITT *et al.*, 2009;

CIDRAL-FILHO *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2014). Adicionalmente, Hubscher *et al.* (2008) afirmam que a acupuntura pode ser uma opção de tratamento para a dor muscular tardia.

Neste contexto, o presente estudo investigou se a acupuntura realizada por meio da estimulação manual do acuponto GB34 produz efeito antinociceptivo na hiperalgesia muscular decorrente do exercício excêntrico.

Embora alguns autores afirmem que o efeito da acupuntura não é específico, outras pesquisas desenvolvidas neste laboratório sugerem que a escolha dos pontos tem um papel importante no tratamento com acupuntura manual (DA SILVA, 2013). A escolha do acuponto GB34 para este estudo foi baseada na especificidade funcional atribuída a este em pesquisas com animais e seres humanos.

Análises de imagens de ressonância magnética funcional mostraram que, tanto a acupuntura manual (JEUN *et al.*, 2005; BAI *et al.*, 2013) quanto a eletroestimulação do acuponto GB34 (NA *et al.*, 2009), produzem uma resposta significativa na modulação cortical de áreas somatomotoras. Em modelos animais de dor neuropática (CHOI *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2012) e inflamatória (PARK *et al.*, 2014) a estimulação deste mesmo acuponto promoveu a melhora do controle motor além de atenuar o comportamento nociceptivo e a alodinia mecânica.

O efeito antinociceptivo da acupuntura manual na hiperalgesia muscular induzida por exercício excêntrico foi confirmado neste trabalho pela manutenção dos níveis de força obtidos no teste de agarrar após o tratamento. Além disso, observou-se que o uso de um falso ponto de acupuntura (denominado sham) não produz efeito antinociceptivo no modelo proposto. O uso do ponto sham é importante para mostrar que o efeito antinociceptivo da acupuntura não se deve ao estresse sofrido pelo animal para a colocação da agulha além de sugerir que, por algum motivo ainda desconhecido, a acupuntura parece ter efeito apenas quando a agulha é inserida em pontos específicos.

Esses dados estão de acordo com experimentos em roedores e humanos, nos quais a estimulação de pontos sham não produz o mesmo efeito que a estimulação dos acupontos (NA *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2011; TANAHASHI *et al.*, 2011; TAKANO *et al.*, 2012; YEO *et al.*, 2013). Em humanos, comparações entre a inserção de agulhas em acupontos com a inserção de agulhas em pontos sham usando tomografia por emissão de pósitrons mostrou a ativação de regiões do cérebro que são associadas à expectativa, tais como o córtex pré-frontal dorsolateral, córtex cingulado anterior e mesencéfalo, tanto na

estimulação de acupontos quanto de pontos sham. No entanto, na estimulação dos acupontos verdadeiros, além dessas áreas, ocorreu a ativação da ínsula, uma região que se acredita estar ligada a modulação da dor (QIU, 2005; NA *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2012).

Quanto aos mecanismos neurobiológicos da acupuntura envolvidos no controle da dor, há uma extensa literatura que demonstra a influência desta terapia em diversos sistemas endógenos, entretanto, tais mecanismos não foram completamente elucidados (GOLDMAN *et al.*, 2010; CIDRAL-FILHO *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2011; HAN, 2011; PARK *et al.*, 2014).

Um dos objetivos propostos por este estudo foi investigar a participação dos sistemas opioide, serotoninérgico e adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura no modelo de lesão muscular induzida por exercício. Para a realização deste, foram utilizadas ferramentas farmacológicas específicas para cada um dos sistemas em estudo.

Os opióides, substâncias com efeito similar a morfina e antagonizados por naloxona, estão entre os fármacos mais usados no controle da dor. Estas substâncias induzem a analgesia em humanos e antinociceção em animais atuando em receptores específicos e alterando a resposta orgânica a estímulos nocivos (FOLEY; INTURISSI, 1987; YAKSH, 1999). O efeito analgésico produzido pela eletroacupuntura em humanos e animais em diferentes acupontos está associado ao aumento de opióides endógenos no SNC (HAN, 2003; ZHAO, 2008). Vários estudos mostram que a analgesia por acupuntura é mediada por peptídeos opióides, pois a analgesia produzida pela acupuntura é prevenida pelo uso de naloxona (CHENG; POMERANZ, 1980; MAYER; PRICE; RAFFI, 1977). Pesquisas anteriores realizadas neste laboratório demonstram o envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura em modelos de dor inflamatória e neuropática (EMMEL, 2008; CIDRAL-FILHO *et al.*, 2011; DA SILVA, 2013).

A participação da via opioide no efeito antinociceptivo da acupuntura no modelo de dor muscular tardia foi confirmada neste estudo. A administração do agonista do receptor opióide morfina preveniu a hiperalgesia muscular induzida pelo exercício e tal efeito foi reduzido pela administração do antagonista não seletivo de receptores opióides naloxona. Quando tratados com a acupuntura, os animais submetidos ao exercício físico apresentaram comportamento antinociceptivo, o qual não foi observado na presença do antagonista naloxona, sugerindo que o efeito antinociceptivo do acuponto GB34 na

hiperalgesia induzida pelo exercício excêntrico ocorre por um mecanismo dependente da via opioidegérica.

Além dos opióides, a serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) são os principais substratos endógenos da via de modulação descendente da dor e competem pela inibição das respostas neuronais no corno dorsal da medula a estímulos nocivos (MILLAN, 2002; SHEN *et al.*, 2013). A serotonina está particularmente bem estudada e tem demonstrado ampla participação em vias de dor, desempenhando um papel importante na mediação da ação analgésica produzida pela morfina (NEMMANI e MOGIL, 2003; FANG, ZHANG e KU, 2005; OZDEMIR, GURSOY e BAGCIVAN, 2012). É bem aceito que os opióides estabelecem parte de seu efeito analgésico através da estimulação do sistema serotoninérgico (ARENDS *et al.*, 1998; OZDEMIR, GURSOY e BAGCIVAN, 2012).

Com o objetivo de avaliar a participação da via serotoninérgica na redução da hiperalgesia induzida pela acupuntura no acuponto GB34 no modelo proposto, os animais foram pré-tratados com o inibidor da síntese de serotonina PCPA e posteriormente tratados com morfina ou acupuntura. Foi confirmado que a estimulação do receptor opióide com seu agonista morfina previne a nocicepção muscular induzida pelo exercício, efeito este, reduzido na presença do PCPA. Os animais submetidos ao exercício físico e tratados com a acupuntura apresentaram comportamento antinociceptivo, o qual foi significativamente reduzido pelo tratamento com PCPA. Estes resultados sugerem que o efeito antinociceptivo do acuponto GB34 ocorre por um mecanismo dependente também da liberação de serotonina endógena.

De acordo com Wen *et al.*, 2010, a acupuntura manual é capaz de influenciar a liberação, síntese, recaptação e a degradação dos neurotransmissores e moduladores centrais, incluindo monoaminas como por exemplo, a serotonina, noradrenalina e dopamina. Emmel (2008) verificou o envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 e também observou que a depleção dos níveis neuronais de serotonina através da administração de PCPA reverteu parcialmente o efeito da acupuntura.

A participação da via adenosinérgica no efeito antinociceptivo do acuponto GB34 no modelo de DOMS também foi investigada. A estimulação do receptor adenosinérgico (A1) por meio da administração do seu agonista CHA preveniu a hiperalgesia muscular e o efeito antinociceptivo do CHA foi completamente revertido na presença do antagonista do receptor adenosinérgico DPCPX. O efeito antinociceptivo da acupuntura foi confirmado pela manutenção nos

níveis de força do teste da agarrar, o qual não foi observado na presença do antagonista DPCPX. Estes resultados sugerem que o efeito do acuponto GB34 na redução da hiperalgesia induzida pelo exercício excêntrico ocorre por um mecanismo dependente da via adenosinérgica, em especial pela ativação do receptor A1.

Sabe-se que a analgesia e/ou antinocicepção alcançada com a acupuntura manual depende de receptores A1 adenosinérgicos (GOLDMAN *et al.*, 2010). Ao inserir uma agulha no ponto de acupuntura, ocorre a liberação de ATP por células locais. Esse ATP pode ser metabolizado em adenosina extracelular por ectonucleotidases, as quais catalisam a hidrólise de ADP e AMP em adenosina. Assim, a acupuntura pode induzir a ativação de receptores A1, produzindo um efeito de inibição da dor (SAWYNOK; REID; POON, 1998; GOLDMAN *et al.*, 2010).

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a estimulação manual do acuponto GB34 produz efeito antinociceptivo no modelo de dor muscular induzida por exercício excêntrico que é dependente da participação dos sistemas opioidérgico, serotoninérgico e adenosinérgico. Além disso, tal efeito ocorre, em especial, por um mecanismo dependente da ativação do receptor A1. O conjunto destes dados fornece subsídios para o uso da acupuntura no tratamento da dor muscular de origem tardia frequentemente encontrada na clínica e no ambiente desportivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, T. S.; CHEN, M. L.; MA, S. X. TRPV1 expression in acupuncture points: response to electroacupuncture stimulation. **J Chem Neuroanat**, v. 41, n. 3, p. 129-36, Apr 2011.

ADAMS, G. R.; DUVOISIN, M. R.; DUDLEY, G. A. Magnetic resonance imaging and electromyography as indexes of muscle function. **J Appl Physiol** (1985), v. 73, n. 4, p. 1578-83, Oct 1992.

ALVAREZ, P.; LEVINE, J. D.; GREEN, P. G. Eccentric exercise induces chronic alterations in musculoskeletal nociception in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 32, n. 5, p. 819-25, Sep 2010.

AMEZAGA URRUELA, M.; SUAREZ-ALMAZOR, M. E. Acupuncture in the treatment of rheumatic diseases. **Curr Rheumatol Rep**, v. 14, n. 6, p. 589-97, Dec 2012.

ARENDS, R. H. et al. Cotreatment with racemic fenfluramine inhibits the development of tolerance to morphine analgesia in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 286, n. 2, p. 585-92, Aug 1998.

ARENDR-NIELSEN, L.; FERNANDEZ-DE-LAS-PENAS, C.; GRAVEN-NIELSEN, T. Basic aspects of musculoskeletal pain: from acute to chronic pain. **J Man Manip Ther**, v. 19, n. 4, p. 186-93, Nov 2011.

ARENDR-NIELSEN, L.; GRAVEN-NIELSEN, T. Muscle pain: sensory implications and interaction with motor control. **Clin J Pain**, v. 24, n. 4, p. 291-8, May 2008.

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

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

BAI, L. et al. Acupuncture de qi in stable somatosensory stroke patients: relations with effective brain network for motor recovery. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 197238, 2013.

BARLAS, P. et al. Lack of effect of acupuncture upon signs and symptoms of delayed onset muscle soreness. **Clin Physiol**, v. 20, n. 6, p. 449-56, Nov 2000.

BARNETT, A. Using recovery modalities between training sessions in elite athletes: does it help? **Sports Med**, v. 36, n. 9, p. 781-96, 2006.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PRADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Tradução: Carla dalmaz et al. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BEATON, L. J.; TARNOPOLSKY, M. A.; PHILLIPS, S. M. Contraction-induced muscle damage in humans following calcium channel blocker administration. **J Physiol**, v. 544, n. Pt 3, p. 849-59, Nov 1 2002.

BUSKILA, D. et al. The prevalence of musculoskeletal pain and fibromyalgia in patients hospitalized on internal medicine wards. **Semin Arthritis Rheum**, v. 30, n. 6, p. 411-7, Jun 2001.

BYRD, S. K. Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. **Med Sci Sports Exerc**, v. 24, n. 5, p. 531-6, May 1992.

BYRNES, W. C. et al. Delayed onset muscle soreness following repeated bouts of downhill running. **J Appl Physiol (1985)**, v. 59, n. 3, p. 710-5, Sep 1985.

CANNAVINO, C. R. et al. Efficacy of transdermal ketoprofen for delayed onset muscle soreness. **Clin J Sport Med**, v. 13, n. 4, p. 200-8, Jul 2003.

CAO, H. et al. Acupoint Stimulation for Fibromyalgia: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 362831, 2013.

CARDOSO, J.P. et al. Prevalência de dor musculoesquelética em professores. **Rev Bras Epidemiol**, v.12, n.4, p. 604-14, 2009.

CARMICHAEL, M. D. et al. Recovery of running performance following muscle-damaging exercise: relationship to brain IL-1beta. **Brain Behav Immun**, v. 19, n. 5, p. 445-52, Sep 2005.

CARMICHAEL, M. D. et al. Role of brain macrophages on IL-1beta and fatigue following eccentric exercise-induced muscle damage. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 4, p. 564-8, May 2010.

CHENG, R. S. S.; POMERANZ, B. H. Electroacupuncture analgesia is mediated by stereospecific opiate receptors and is reversed by antagonists of type 1 receptors. **Life Sci**, v. 26, p. 631-638, 1980.

CHEUNG, K.; HUME, P.; MAXWELL, L. Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. **Sports Med**, v. 33, n. 2, p. 145-64, 2003.

CHO, Z. H. et al. Neural substrates, experimental evidences and functional hypothesis of acupuncture mechanisms. **Acta Neurol Scand**, v. 113, n. 6, p. 370-7, Jun 2006.

CHOI, D. C. et al. Inhibition of ROS-induced p38MAPK and ERK activation in microglia by acupuncture relieves neuropathic pain after spinal cord injury in rats. **Exp Neurol**, v. 236, n. 2, p. 268-82, Aug 2012.

CHOI, D. C. et al. Acupuncture-mediated inhibition of inflammation facilitates significant functional recovery after spinal cord injury. **Neurobiol Dis**, v. 39, n. 3, p. 272-82, Sep 2010.

CHOU, L. W.; KAO, M. J.; LIN, J. G. Probable mechanisms of needling therapies for myofascial pain control. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 705327, 2012.

CHUN, Y. H. et al. Peripheral AMPA receptors contribute to muscle nociception and c-fos activation. **Neurosci Res**, v. 62, n. 2, p. 97-104, Oct 2008.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuroscience**, v. 193, p. 370-6, Oct 13 2011.

CIMMINO, M. A.; FERRONE, C.; CUTOLO, M. Epidemiology of chronic musculoskeletal pain. **Best Practice & Research in Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 2, p. 173-183, Apr 2011.

CLARKSON, P. M.; SAYERS, S. P. Etiology of exercise-induced muscle damage. **Can J Appl Physiol**, v. 24, n. 3, p. 234-48, Jun 1999.

CLOSE, G. L. et al. Ascorbic acid supplementation does not attenuate post-exercise muscle soreness following muscle-damaging exercise but may delay the recovery process. **Br J Nutr**, v. 95, n. 5, p. 976-81, May 2006.

COCKBURN, E. et al. Effect of volume of milk consumed on the attenuation of exercise-induced muscle damage. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 9, p. 3187-94, Sep 2012.

COCKBURN, E. et al. Effect of milk-based carbohydrate-protein supplement timing on the attenuation of exercise-induced muscle damage. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 35, n. 3, p. 270-7, Jun 2010.

COHEN, M.; ABDALA, R.J. **Lesões no esporte: diagnóstico, prevenção e tratamento**. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

CONNOLLY, D. A. et al. The effects of vitamin C supplementation on symptoms of delayed onset muscle soreness. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 46, n. 3, p. 462-7, Sep 2006.

CONNOLLY, D. A.; SAYERS, S. P.; MCHUGH, M. P. Treatment and prevention of delayed onset muscle soreness. **J Strength Cond Res**, v. 17, n. 1, p. 197-208, Feb 2003.

CRAMERI, R. M. et al. Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. **J Physiol**, v. 583, n. Pt 1, p. 365-80, Aug 15 2007.

CRIVELLATO, E. et al. The mast cell: a multifunctional effector cell. **Adv Clin Path**, v. 7, n. 1, p. 13-26, Jan 2003.

CURATOLO, M.; BOGDUK, N. Pharmacologic pain treatment of musculoskeletal disorders: current perspectives and future prospects. **Clin J Pain**, v. 17, n. 1, p. 25-32, Mar 2001.

DA SILVA, M. D. et al. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 217946, 2011.

DA SILVA, M. D. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da acupuntura no acuponto Spleen 6 (SP6) em camundongos: análise dos seus mecanismos neurobiológicos**. 214 f. Tese (Doutorado em Neurociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2013.

DAVIS, J. M. et al. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 6, p. R2168-73, Jun 2007.

DEARE, J. C. et al. Acupuncture for treating fibromyalgia. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 5, p. CD007070, 2013.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3760-72, Nov 2010.

EMMEL, V. G. **Avaliação do efeito antinociceptivo causado pela estimulação do acuponto BL60 (kulun) em camundongos**. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

ENOKA, R. M. Eccentric contractions require unique activation strategies by the nervous system. **J Appl Physiol (1985)**, v. 81, n. 6, p. 2339-46, Dec 1996.

FANG, L. H.; ZHANG, Y. H.; KU, B. S. Fangchinoline inhibited the antinociceptive effect of morphine in mice. **Phytomedicine**, v. 12, n. 3, p. 183-8, Mar 2005.

FILSHIE, J.; ZARNEGAR, R. Acupuncture. In: HOLDCROFT, Anita; JAGGAR, Siân. **Core topics in Pain**. Cambridge:Cambridge University Press, p. 247-254, 2005.

FOLEY, K. M.; INTURRISI, C. E. Analgesic drug therapy in cancer pain: principles and practice. **Med Clin North Am**, v. 71, p. 207-232, 1987.

FREY LAW, L. A. et al. Massage reduces pain perception and hyperalgesia in experimental muscle pain: a randomized, controlled trial. **J Pain**, v. 9, n. 8, p. 714-21, Aug 2008.

FRIDEN, J.; LIEBER, R. L. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. **Acta Physiol Scand**, v. 171, n. 3, p. 321-6, Mar 2001.

FUJII, Y. et al. TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness. **Pain**, v. 140, n. 2, p. 292-304, Nov 30 2008.

GISSEL, H.; CLAUSEN, T. Excitation-induced Ca²⁺ influx and skeletal muscle cell damage. **Acta Physiol Scand**, v. 171, n. 3, p. 327-34, Mar 2001.

GLINA, D. M. R.; ROCHA, L. E. Exigências do trabalho, prevalência de dor muscular e de sintomas de estresse em estagiários do setor de cobrança de um banco internacional. **Rev. Ter. Ocup.**, v. 14, n. 1, p. 10-8, jan./abr., 2003.

GOLDMAN, N. et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 883-8, Jul 2010.

GRAVEN-NIELSEN, T.; ARENDT-NIELSEN, L. Peripheral and central sensitization in musculoskeletal pain disorders: an experimental approach. **Curr Rheumatol Rep**, v. 4, n. 4, p. 313-21, Aug 2002.

GRAVEN-NIELSEN, T.; MENSE, S. The peripheral apparatus of muscle pain: evidence from animal and human studies. **Clin J Pain**, v. 17, n. 1, p. 2-10, Mar 2001.

HAN, J.S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends Neurosci**, v. 26, p. 17-22, 2003.

HAN, J. S. Acupuncture and endorphins. **Neurosci Lett**, v. 361, n. 1-3, p. 258-61, May 2004.

HAN, J. S. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy. **Pain**, v. 152, n. 3 Suppl, p. S41-8, Mar 2011.

HART, J. M.; SWANIK, C. B.; TIERNEY, R. T. Effects of sport massage on limb girth and discomfort associated with eccentric exercise. **J Athl Train**, v. 40, n. 3, p. 181-5, Jul-Sep 2005.

HAUBOLD, K. W. et al. Loss of desmin leads to impaired voluntary wheel running and treadmill exercise performance. **J Appl Physiol** (1985), v. 95, n. 4, p. 1617-22, Oct 2003.

HENDERSON, L. A. et al. Distinct forebrain activity patterns during deep versus superficial pain. **Pain**, v. 120, n. 3, p. 286-96, Feb 2006.

HENSCHKE, N.; LIN, C. C. Stretching before or after exercise does not reduce delayed-onset muscle soreness. **Br J Sports Med**, v. 45, n. 15, p. 1249-50, Dec 2011.

HERBERT, R. D.; DE NORONHA, M.; KAMPER, S. J. Stretching to prevent or reduce muscle soreness after exercise. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 7, p. CD004577, 2011.

HESELINK, J. M.; KOPSKY, D. J. Enhancing acupuncture by low dose naltrexone. **Acupunct Med**, v. 29, n. 2, p. 127-30, Jun 2011.

HOUGH, T. Ergographic Studies in Muscular Fatigue and Soreness. **J Boston Soc Med Sci**, v. 5, n. 3, p. 81-92, Nov 20 1900.

HOWATSON, G.; VAN SOMEREN, K. A. The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. **Sports Med**, v. 38, n. 6, p. 483-503, 2008.

HUBSCHER, M. et al. Effects of acupuncture on symptoms and muscle function in delayed-onset muscle soreness. **J Altern Complement Med**, v. 14, n. 8, p. 1011-6, Oct 2008.

HYLDAHL, R. D.; HUBAL, M. J. Lengthening our perspective: Morphological, cellular, and molecular responses to eccentric exercise. **Muscle Nerve**, Sep 13 2013.

INGALLS, C. P.; WARREN, G. L.; ARMSTRONG, R. B. Dissociation of force production from MHC and actin contents in muscles injured by eccentric contractions. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 19, n. 3, p. 215-24, Apr 1998.

JANKOWSKI, M. P. et al. Comprehensive phenotyping of group III and IV muscle afferents in mouse. **J Neurophysiol**, v. 109, n. 9, p. 2374-81, May 2013.

JEUN, S. S. et al. Acupuncture stimulation for motor cortex activities: a 3T fMRI study. **Am J Chin Med**, v. 33, n. 4, p. 573-8, 2005.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. Principles of Neural Science. 4ed. New York: McGraw-Hill. 2000.

KANG, J. M. et al. Acupuncture inhibits microglial activation and inflammatory events in the MPTP-induced mouse model. **Brain Res**, v. 1131, n. 1, p. 211-9, Feb 2 2007.

KEHL, L. J.; FAIRBANKS, C. A. Experimental animal models of muscle pain and analgesia. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 31, n. 4, p. 188-94, Oct 2003.

KHARRAZ, Y. et al. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 491497, 2013.

KRISHNASWAMY, G.; AJITAWI, O.; CHI, D. S. The human mast cell: an overview. **Methods Mol Biol**, v. 315, p. 13-34, 2006.

KUPERS, R. C.; SVENSSON, P.; JENSEN, T. S. Central representation of muscle pain and mechanical hyperesthesia in the orofacial region: a

positron emission tomography study. **Pain**, v. 108, n. 3, p. 284-93, Apr 2004.

LANGEVIN, H. M.; CHURCHILL, D. L.; CIPOLLA, M. J. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. **FASEB J**, v. 15, n. 12, p. 2275-82, Oct 2001.

LAURITZEN, F. et al. Gross ultrastructural changes and necrotic fiber segments in elbow flexor muscles after maximal voluntary eccentric action in humans. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 6, p. 1923-34, Dec 2009.

LE BARS, D. The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurones. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 40, n. 1-3, p. 29-44, Oct 2002.

LE BARS, D. et al. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in animals and in man. **Patol Fiziol Eksp Ter**, n. 4, p. 55-65, Jul-Aug 1992.

LEUNG, L. Neurophysiological basis of acupuncture-induced analgesia--an updated review. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 5, n. 6, p. 261-70, Dec 2012.

LEWIS, P. B.; RUBY, D.; BUSH-JOSEPH, C. A. Muscle soreness and delayed-onset muscle soreness. **Clin Sports Med**, v. 31, n. 2, p. 255-62, Apr 2012.

LIN, J. G.; CHEN, W. L. Acupuncture analgesia: a review of its mechanisms of actions. **Am J Chin Med**, v. 36, n. 4, p. 635-45, 2008.

LIN, J. G.; YANG, S. H. Effects of acupuncture on exercise-induced muscle soreness and serum creatine kinase activity. **Am J Chin Med**, v. 27, n. 3-4, p. 299-305, 1999.

LIN, S. Y. et al. Serotonin receptor 5-HT_{2B} mediates serotonin-induced mechanical hyperalgesia. **J Neurosci**, v. 31, n. 4, p. 1410-8, Jan 26 2011.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 31 2008.

MACPHERSON, H.; ASGHAR, A. Acupuncture needle sensations associated with De Qi: a classification based on experts' ratings. **J Altern Complement Med**, v. 12, n. 7, p. 633-7, Sep 2006.

MALM, C.; YU, J. G. Exercise-induced muscle damage and inflammation: re-evaluation by proteomics. **Histochem Cell Biol**, v. 138, n. 1, p. 89-99, Jul 2012.

MANJAVACHI, M. N. et al. Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 345-55, Nov 2010.

MANN, C. J. et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skelet Muscle**, v. 1, n. 1, p. 21, 2011.

MARIDAKIS, V. et al. Caffeine attenuates delayed-onset muscle pain and force loss following eccentric exercise. **J Pain**, v. 8, n. 3, p. 237-43, Mar 2007.

MATSUMOTO, K. et al. Branched-chain amino acid supplementation attenuates muscle soreness, muscle damage and inflammation during an intensive training program. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 49, n. 4, p. 424-31, Dec 2009.

MAYER, D. J.; PRICE, D. D.; RAFFI, A. Antagonism of acupuncture analgesia in man by the narcotic antagonist naloxone. **Brain Res**, v. 121, p. 368-372, 1977.

MCBRIER, N. M. et al. Cocoa-based protein and carbohydrate drink decreases perceived soreness after exhaustive aerobic exercise: a pragmatic preliminary analysis. **J Strength Cond Res**, v. 24, n. 8, p. 2203-10, Aug 2010.

MCHUGH, M. P. et al. Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. **Sports Med**, v. 27, n. 3, p. 157-70, Mar 1999.

MEADOR, B. M.; HUEY, K. A. Statin-associated changes in skeletal muscle function and stress response after novel or accustomed exercise. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 6, p. 882-9, Dec 2011.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-9, Nov 19 1965.

MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. **Pain**, v. 54, n. 3, p. 241-89, Sep 1993.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol Rev**, v. 77, n. 4, p. 1033-79, Oct 1997.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355-474, Apr 2002.

MOMKEN, I. et al. Impaired voluntary running capacity of creatine kinase-deficient mice. **J Physiol**, v. 565, n. Pt 3, p. 951-64, Jun 15 2005.

MOONT, R. et al. 'Pain inhibits pain' mechanisms: Is pain modulation simply due to distraction? **Pain**, v. 150, n. 1, p. 113-20, Jul 2010.

MORGAN, D. L. New insights into the behavior of muscle during active lengthening. **Biophys J**, v. 57, n. 2, p. 209-21, Feb 1990.

MORGAN, D. L.; PROSKE, U. Popping sarcomere hypothesis explains stretch-induced muscle damage. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 8, p. 541-5, Aug 2004.

MUNEHIRO, T. et al. Establishment of an animal model for delayed-onset muscle soreness after high-intensity eccentric exercise and its application for investigating the efficacy of low-load eccentric training. **J Orthop Sci**, v. 17, n. 3, p. 244-52, May 2012.

MURASE, S. et al. Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed-onset muscle soreness). **J Neurosci**, v. 30, n. 10, p. 3752-61, Mar 10 2010.

NA, B. J. et al. An fMRI study of neuronal specificity of an acupoint: electroacupuncture stimulation of Yanglingquan (GB34) and its sham point. **Neurosci Lett**, v. 464, n. 1, p. 1-5, Oct 16 2009.

NAKAMURA, I. et al. An Epidemiological Internet Survey of Fibromyalgia and Chronic Pain in Japan. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, Jan 8 2014.

NELSON, N. Delayed onset muscle soreness: is massage effective? **J Body Mov Ther**, v. 17, n. 4, p. 475-82, Oct 2013.

NEMMANI, K. V.; MOGIL, J. S. Serotonin-GABA interactions in the modulation of mu- and kappa-opioid analgesia. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 3, p. 304-10, Mar 2003.

NEWHAM, D. J.; JONES, D. A.; EDWARDS, R. H. Large delayed plasma creatine kinase changes after stepping exercise. **Muscle Nerve**, v. 6, n. 5, p. 380-5, Jun 1983.

NIDDAM, D. M. et al. Event-related functional MRI study on central representation of acute muscle pain induced by electrical stimulation. **Neuroimage**, v. 17, n. 3, p. 1437-50, Nov 2002.

OZDEMIR, E.; GURSOY, S.; BAGCIVAN, I. The effects of serotonin/norepinephrine reuptake inhibitors and serotonin receptor agonist on morphine analgesia and tolerance in rats. **J Physiol Sci**, v. 62, n. 4, p. 317-23, Jul 2012.

PARK, H. J. et al. Acupuncture prevents 6-hydroxydopamine-induced neuronal death in the nigrostriatal dopaminergic system in the rat Parkinson's disease model. **Exp Neurol**, v. 180, n. 1, p. 93-8, Mar 2003.

PARK, J. Y. et al. From peripheral to central: the role of ERK signaling pathway in acupuncture analgesia. **J Pain**, Feb 10 2014.

PAULSEN, G. et al. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? **Exerc Immunol Rev**, v. 18, p. 42-97, 2012.

POLLAK, K. A. et al. Exogenously applied muscle metabolites synergistically evoke sensations of muscle fatigue and pain in human subjects. **Exp Physiol**, v. 99, n. 2, p. 368-80, Feb 2014.

POPESCU, A. et al. Gender differences in pain modulation by diffuse noxious inhibitory controls: a systematic review. **Pain**, v. 150, n. 2, p. 309-18, Aug 2010.

POTVIN, J. R. Effects of muscle kinematics on surface EMG amplitude and frequency during fatiguing dynamic contractions. **J Appl Physiol** (1985), v. 82, n. 1, p. 144-51, Jan 1997.

PROSKE, U.; ALLEN, T. J. Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 33, n. 2, p. 98-104, Apr 2005.

QIU J. Yin and Yang of acupuncture. **Res. highlights**. 6:498, 2005.

QUEME, F. et al. Muscular heat and mechanical pain sensitivity after lengthening contractions in humans and animals. **J Pain**, v. 14, n. 11, p. 1425-36, Nov 2013.

RADAK, Z. et al. Nitric oxide: is it the cause of muscle soreness? **Nitric Oxide**, v. 26, n. 2, p. 89-94, Feb 15 2012.

REID, W. D. et al. Diaphragm injury and myofibrillar structure induced by resistive loading. **J Appl Physiol** (1985), v. 76, n. 1, p. 176-84, Jan 1994.

SAWYNOK, J.; REID, A.; POON, A. Peripheral antinociceptive effect of an adenosine kinase inhibitor, with augmentation by an adenosine deaminase inhibitor, in the rat formalin test. **Pain**, v. 74, p. 75-81, 1998.

SCHOENFELD, B. J. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for exercise-induced muscle damage: implications for skeletal muscle development. **Sports Med**, v. 42, n. 12, p. 1017-28, Dec 1 2012.

SCHRECKENBERGER, M. et al. The unpleasantness of tonic pain is encoded by the insular cortex. **Neurology**, v. 64, n. 7, p. 1175-83, Apr 12 2005.

SCHWANE, J. A. et al. Delayed-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running. **Med Sci Sports Exerc**, v. 15, n. 1, p. 51-6, 1983.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V.; BECHARA, G. H.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Effect of various acupuncture treatment protocols upon sepsis in Wistar rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1026, p. 251-256, 2004.

SHEN, F. et al. Relative contributions of norepinephrine and serotonin transporters to antinociceptive synergy between monoamine reuptake inhibitors and morphine in the rat formalin model. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74891, 2013.

SLATER, H. et al. Experimental deep tissue pain in wrist extensors--a model of lateral epicondylalgia. **Eur J Pain**, v. 7, n. 3, p. 277-88, 2003.

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

STUX, G.; HAMMERSCHALG, R. **Acupuntura Clínica - Bases Científicas**. São Paulo: Manole. 2005.

SUN, Y. et al. Acupuncture and related techniques for postoperative pain: a systematic review of randomized controlled trials. **Br J Anaesth**, v. 101, n. 2, p. 151-60. 2008.

TAKAHASHI, K. et al. Painful muscle stimulation preferentially activates emotion-related brain regions compared to painful skin stimulation. **Neurosci Res**, v. 70, n. 3, p. 285-93, Jul 2011.

TAKANO, T. et al. Traditional acupuncture triggers a local increase in adenosine in human subjects. **J Pain**, v. 13, n. 12, p. 1215-23, Dec 2012.

TANAHASHI, N. et al. Effects of manual acupuncture at GB34 on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 4, n. 4, p. 214-9, Dec 2011.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 2, p. R345-53, Feb 2005.

TIDBALL, J. G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. **Compr Physiol**, v. 1, n. 4, p. 2029-62, Oct 2011.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 5, p. R1173-87, May 2010.

TOBALDINI, G. et al. Ascending nociceptive control contributes to the anti-nociceptive effect of acupuncture in a rat model of acute pain. **J Pain**, Jan 9 2014.

TORRES, S. F. **Perfil epidemiológico de lesões no esporte**. 2004. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.

WANG, Y. et al. The Research of Acupuncture Effective Biomolecules: Retrospect and Prospect. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 608026, 2013.

WARREN, G. L.; LOWE, D. A.; ARMSTRONG, R. B. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. **Sports Med**, v. 27, n. 1, p. 43-59, Jan 1999.

WEN, G. et al. Effect of acupuncture on neurotransmitters/modulators. In *Acupuncture Therapy for Neurological Diseases*. **Springer Berlin Heidelberg**, p. 120-142. 2010.

WITT, C. M. et al. Safety of acupuncture: results of a prospective observational study with 229,230 patients and introduction of a medical information and consent form. **Forsch Komplementmed**, v. 16, n. 2, p. 91-7. 2009.

XIA, Y.; WU, G. **Acupuncture therapy for neurological diseases: a neurobiological view**. Springer Verlag. 2010.

YAKSH, T. L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends Pharmacol Sci**, v. 20, p. 329-337, 1999.

YANG, J. et al. A PET-CT study on the specificity of acupoints through acupuncture treatment in migraine patients. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 123, 2012.

YEO, S. et al. Neuroprotective changes of thalamic degeneration-related gene expression by acupuncture in an MPTP mouse model of parkinsonism: microarray analysis. **Gene**, v. 515, n. 2, p. 329-38, Feb 25 2013.

YU, J. G. et al. Re-evaluation of sarcolemma injury and muscle swelling in human skeletal muscles after eccentric exercise. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62056, 2013.

YU, J. G.; MALM, C.; THORNELL, L. E. Eccentric contractions leading to DOMS do not cause loss of desmin nor fibre necrosis in human muscle. **Histochem Cell Biol**, v. 118, n. 1, p. 29-34, Jul 2002.

YU, Y. P. et al. Acupuncture inhibits oxidative stress and rotational behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rat. **Brain Res**, v. 1336, p. 58-65, Jun 8 2010.

ZAINUDDIN, Z. et al. Effects of massage on delayed-onset muscle soreness, swelling, and recovery of muscle function. **J Athl Train**, v. 40, n. 3, p. 174-80, Jul-Sep 2005.

ZHANG, D. et al. Role of mast cells in acupuncture effect: a pilot study. **Explore (NY)**, v. 4, n. 3, p. 170-7, May-Jun 2008.

ZHANG, H.; BIAN, Z.; LIN, Z. Are acupoints specific for diseases? A systematic review of the randomized controlled trials with sham acupuncture controls. **Chin Med**, v. 5, p. 1, 2010.

ZHANG, W. T. et al. Evidence from brain imaging with fMRI supporting functional specificity of acupoints in humans. **Neurosci Lett**, v. 354, n. 1, p. 50-3, Jan 2 2004.

ZHANG, Z. J.; WANG, X. M.; MCALONAN, G. M. Neural acupuncture unit: a new concept for interpreting effects and mechanisms of acupuncture. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 429412, 2012.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Prog Neurobiol**, v. 85, n. 4, p. 355-75, Aug 2008.

ZIMMERMANN, K. et al. Central projection of pain arising from delayed onset muscle soreness (DOMS) in human subjects. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47230, 2012.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-10, Jun 1983.

ZYLKA, M. J. Needling adenosine receptors for pain relief. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 783-4, Jul 2010.