

Izabela Caroline Sales Lemos

**MÉTODOS MECÂNICOS CAPAZES DE INDUZIR DOR  
MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO EM RATOS**

Belo Horizonte

Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional/UFMG

2014

Izabela Caroline Sales Lemos

# **MÉTODOS MECÂNICOS CAPAZES DE INDUZIR DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO EM RATOS**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Educação Física da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Sales Prado

Belo Horizonte

Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional/UFMG

2014

## RESUMO

Em condições normais, a dor está associada com a atividade elétrica nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos que possuem terminações sensoriais nos tecidos periféricos e são ativados por estímulos de vários tipos: mecânico, térmico e químico. A dor aguda é um sistema de alerta do corpo para a detecção de estímulos nocivos específicos e só é mantida na presença dos mesmos. A dor inflamatória ocorre em resposta à lesão tecidual periférica e a subsequente resposta inflamatória, em que há um aumento na sensibilização dos nociceptores à respostas de dor intensa e à estímulos normalmente não nocivos (hiperalgesia). A dor muscular de início tardio (DMIT) é caracterizada por uma sensação dolorosa experimentada por muitos praticantes de exercício físico após, principalmente, a execução de um padrão de movimento diferente daquele ao qual estão acostumados. Várias propostas foram feitas para explicar o mecanismo da DMIT baseada em achados histológicos, ultra-estrutural e as alterações bioquímicas nos seres humanos e nos animais. O mecanismo mais amplamente suportado é a ocorrência de lesões musculares e o processo inflamatório induzido pela mesma, mas diversas pesquisas vêm sugerindo outras causas. A DMIT normalmente pode ser tolerada sem qualquer tratamento médico, porém ela interfere no desempenho motor de atletas. O objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre os mecanismos envolvidos DMIT e quais os modelos mecânicos utilizados em ratos são capazes de induzi-la. Vários mecanismos de sinalização e manutenção da hiperalgesia muscular mecânica em ratos são citados nesse estudo. Para confirmar se estes mecanismos também se aplicam aos seres humanos, novos experimentos devem ser conduzidos. Se comprovados em seres humanos, esse conhecimento pode ajudar a desenvolver métodos (incluindo medicamentos ou suplementos) para o exercício sem dor muscular tardia.

**Palavras chave:** Dor muscular de início tardio (DMIT). Hiperalgesia mecânica muscular. Contração excêntrica.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1A.....	11
FIGURA 1B.....	14

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AL** - Alongamento Muscular

**ASICs** - Canais iônicos de detecção de acidez

**ATP** - Adenosina trifosfato

**CE** - Contração excêntrica

**c-Fos** - Proteína c-fos

**c-Fos-IR** - Imunorreatividade à c-Fos

**des-Arg 10-HOE 140** - Antagonista do receptor B<sup>1</sup> da bradicinina

**DMIT** - Dor muscular de início tardio

**DRASIC** - Raiz dorsal ASIC

**DRG** - Neurônios do gânglio da raiz dorsal

**ELD** - Músculo extensor longo dos dedos

**HOE 140** - antagonista do receptor B<sup>2</sup> da bradicinina

**IL-6** - Interleucina 6

**MG** - Músculo gastrocnêmio

**NGF** - Fator de crescimento nervoso

**ODN** - "Oligodesoxinucleótido"

**PGE2** - Prostaglandina E2

**PKC $\epsilon$**  - Proteína quinase C $\epsilon$

**RNA<sub>m</sub>** - RNA mensageiro

**TNF $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**TRPV1** - Receptor de potencial transitório vanilloid 1

**TRPV2** - Receptor de potencial transitório vanilloid 2

**VHFs** - Filamentos de *Von Frey*

## INTRODUÇÃO

### 1.1 DOR

A dor é uma condição comum na vida de muitas pessoas no mundo inteiro. De acordo com Brower (2000), só nos EUA por ano, são realizados mais de 40 milhões de consultas médicas relacionadas à dor, há uma perda de 65 bilhões de dólares em produtividade no trabalho e são vendidos, em média, 100 bilhões de medicamentos analgésicos com receita médica e mais 3 bilhões sem receita.

O aumento da expectativa de vida da população eleva também o número de casos de doenças crônicas como, por exemplo, diabetes, doenças cardiovasculares e artrite reumatoide, o que aumenta também a necessidade de se desenvolver medicamentos analgésicos cada vez melhores (BROWER, 2000).

Em condições normais, a dor está associada com a atividade elétrica nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos. Estes nervos possuem terminações sensoriais nos tecidos periféricos e são ativados por estímulos de vários tipos: mecânico, térmico e químico (RANG & DALE, 2003).

Os tipos mais comuns de tratamento da dor estão relacionados ao uso de medicamentos anti-inflamatórios não esteroides, opióides e canabióides, que possuem efeitos indesejáveis como, comprometimento da função plaquetária, hemorragia no trato intestinal, alucinações, dificuldades respiratórias, gastrointestinais e urinárias, entre outros efeitos colaterais (RANG & DALE, 2003).

### 1.2 DOR AGUDA (NOCICEPTIVA)

A dor aguda é um sistema de alerta do corpo para a detecção de estímulos nocivos específicos e só é mantida na presença dos mesmos (por ex.: queimaduras). É mediada por receptores (nociceptores) em terminações nervosas periféricas (BROWER, 2000).

Certas doenças podem gerar estímulos nocivos recorrentes, como no caso da osteoartrite, onde a deformação mecânica dos tecidos ativa o alto limiar dos mecanorreceptores sinoviais (COSTIGAN *et al.*, 2009).

### 1.3 DOR INFLAMATÓRIA

A dor inflamatória ocorre em resposta à lesão tecidual periférica e a subsequente resposta inflamatória (COSTIGAN *et al.*, 2009), em que há um aumento na sensibilização dos nociceptores à respostas de dor intensa e à estímulos normalmente não nocivos (hiperalgesia) (BROWER, 2000).

De acordo com Rocha *et al.*, (2007), estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que estímulos nocivos provocam alterações no sistema nervoso central, modificando os mecanismos desencadeados pelos estímulos aferentes. A estimulação persistente de nociceptores provoca dor espontânea, redução do limiar de sensibilidade e hiperalgesia. Esta pode ser classificada como hiperalgesia primária e secundária. A hiperalgesia primária é conceituada como sendo o aumento da resposta ao estímulo doloroso no local da lesão, enquanto a hiperalgesia secundária é aquela que se estende para áreas adjacentes.

### 1.4 DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO (DMIT)

A dor muscular de início tardio (DMIT) é caracterizada por uma sensação dolorosa experimentada por muitos praticantes de exercício físico e esportes após, principalmente, a execução de um padrão de movimento diferente daquele ao qual estão acostumados (ARMSTRONG, 1984).

O treinamento de força pode promover alterações hormonais e estruturais no músculo esquelético, potencializando a força e hipertrofia que podem ser alcançados através da manipulação e prescrição das variáveis agudas do treinamento (ordem dos exercícios, volume, intensidade de carga). O aumento da sobrecarga imposta ao aparelho locomotor induz dano muscular e resulta em dor (FOSCHINI *et al.*, 2007).

A dor não se manifesta até, aproximadamente, oito horas após o exercício, aumentando progressivamente de intensidade nas primeiras vinte e quatro

horas e alcançando o máximo de intensidade entre vinte e quatro e setenta e duas horas. Após esse período há um declínio progressivo na dor, de modo que cinco a sete dias após a carga de exercício ela desaparece completamente (TRICOLI, 2001).

Os grupos musculares afetados são frequentemente descritos como rígidos e sensíveis ao toque, com uma reduzida capacidade de gerar força e com amplitude de movimento também diminuída (ARMSTRONG, 1991).

A intensidade da atividade física parece ser mais importante que sua duração; contudo, a dor muscular pode ocorrer em indivíduos que momentaneamente aumentam a magnitude e/ou a intensidade da atividade física (APPEL, 1992).

A contração excêntrica é o padrão de ação muscular que provoca maior dano à estrutura muscular esquelética, tanto em seres humanos, como em animais. Em decorrência disso, a intensidade da dor muscular proveniente de contrações excêntricas também é maior. Durante as contrações excêntricas, a quantidade de força desenvolvida é, aproximadamente, duas vezes superior à força desenvolvida durante contrações isométricas; no entanto, o número total de pontes cruzadas ativas é somente 10% maior, resultando em uma tensão elevada na estrutura muscular e em um exercício de alta intensidade (TRICOLI, 2001).

Durante as contrações excêntricas, um número reduzido de unidades motoras é recrutado quando comparado às contrações concêntricas, o que implica um estresse mecânico elevado na fibra muscular, uma vez que a tensão por área de secção transversa ativa é maior. Acredita-se, assim, que a tensão mecânica imposta ao músculo esquelético durante uma ação excêntrica, mais do que os fatores metabólicos, é a responsável pelo dano à célula muscular (TEAGUE, 1995). Entretanto, ainda não está completamente esclarecido como ocorre dano à fibra muscular que resulta na sensação dolorosa e o porque da dor muscular tardia (TRICOLI, 2001).

Várias propostas foram feitas para explicar o mecanismo da dor muscular tardia baseada em achados histológicos, estruturais e as alterações bioquímicas nos seres humanos e animais. Eles incluem o ácido láctico, o

espasmo, os danos do tecido conjuntivo, o dano muscular, inflamação e o stress oxidativo (ARMSTRONG, 1984; SMITH, 1991; CHEUNG *et al.*, 2003, *apud* TRICOLI, 2001). Os mecanismos mais amplamente suportado são lesões musculares e inflamação induzida pela mesma, mas diversas pesquisas vêm sugerindo outras causas (MALM *et al.*, 2004; CRAMERI *et al.*, 2007, *apud* TRICOLI, 2001).

## **OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre os mecanismos envolvidos na dor muscular de início tardio (DMIT) e os modelos mecânicos utilizados em ratos, até a presente data, capazes de induzi-la. Por modelos mecânicos compreende-se metodologias que utilizaram de alguma forma tipos de ação muscular, seja voluntária ou involuntária, induzidas por corrente elétrica e outros.

## **JUSTIFICATIVA**

A DMIT normalmente pode ser tolerada sem qualquer tratamento médico. Porém, ela interfere no desempenho motor de atletas. Ainda existe uma possibilidade de que a DMIT, além de debilitante, possa levar a lesão crônica e resultar em dor crônica/hiperalgesia com alterações plásticas do sistema nervoso central (ZERBA *et al.*, 1990). Por esse motivo, deveriam ser elucidados os mecanismos envolvidos nessa síndrome e seus possíveis tratamentos e prevenções.

## **MÉTODOS**

A revisão de literatura foi realizada no portal de periódicos da CAPES, no período dos meses de fevereiro a maio de 2014, utilizando-se as seguintes palavras chave: *delayed onset muscle soreness; mechanical hyperalgesia; muscle; hyperalgesia; rats; protein kinase c; tumor necrosis factor alpha*.

A busca gerou 146 resultados, nos quais foram aproveitados somente 9 artigos. Os critérios de inclusão de artigos foram: estudos que incluíam modelos de indução de dor muscular de início tardio em ratos; que a

hiperalgesia tivesse sido induzida através de ação muscular; e que tivessem utilizado algum protocolo de aferição comportamental da hiperalgesia mecânica muscular. Os critérios de exclusão de artigos foram: estudos que não se incluíram em todos os três critérios de inclusão; e ou que se encaixaram nos dois primeiros, mas não se encaixaram no terceiro critério. Os artigos selecionados foram publicados entre os anos de 2005 a 2013.

## REVISÃO DE LITERATURA

Neste tópico, serão descritos os métodos, resultados principais e conclusões de cada um dos artigos selecionados para análise, como descrito nos métodos. Em seguida, será realizada uma análise integrando as principais informações obtidas.

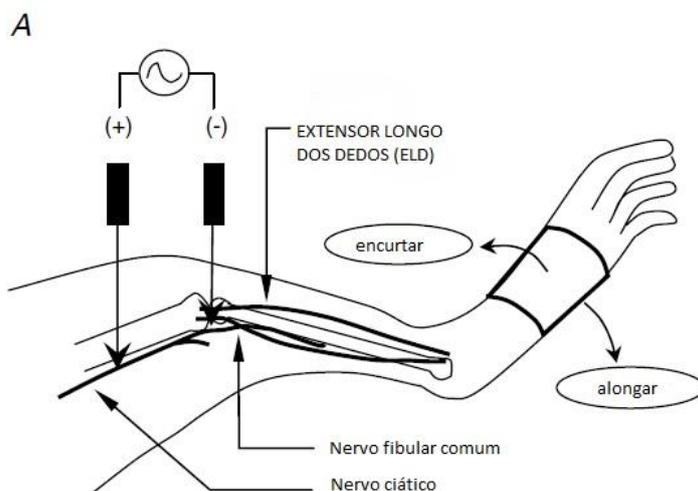
### DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO CAPAZ DE INDUZIR DMIT EM RATOS

O trabalho de Taguchi *et al.*, (2005) teve como objetivo analisar se o músculo exercitado excentricamente era hipersensibilizado à estimulação mecânica. Para avaliar tal hiperalgesia, os autores utilizaram o limiar de retirada de estimulação mecânica nos animais e analisaram a expressão da proteína “c-Fos” no corno dorsal da coluna vertebral. A proteína “c-Fos” é estimulada após excitação neural no sistema nervoso e sua expressão no corno dorsal superficial da medula espinhal tem sido utilizada como um marcador neural da dor.

Segundo os autores, o exercício excêntrico tem sido amplamente utilizado em estudos com humanos e com animais, no entanto, o mecanismo de hiperalgesia mecânica ainda não foi totalmente esclarecido. Até mesmo a existência de hiperalgesia mecânica (sensibilidade) em si, um dos sintomas mais comuns em DMIT, não havia sido confirmado em experimentação animal, até esse presente estudo (TAGUCHI *et al.*, 2005).

O estudo de Taguchi *et al.*, (2005) utilizou cinquenta e quatro ratos machos *Sprague-Dawley* e o seguinte protocolo de exercícios: no dia 0 os animais foram submetidos à contração excêntrica (CE) ou alongamento do

músculo (AL), esse último foi considerado o grupo controle. A temperatura retal foi mantida na faixa fisiológica (37–38°C) com uma almofada de aquecimento durante o período de exercício. Procedimentos para contração e alongamento do músculo são mostrados esquematicamente na Figura 1A. Um par de eletrodos de agulha foram inseridos perto do nervo fibular comum que inerva o músculo extensor longo dos dedos (ELD). A contração repetitiva do ELD foi induzida em ratos do grupo CE, estimulando eletricamente o nervo fibular comum através dos eletrodos. As correntes foram fornecidas através de um isolador conectado a um estimulador elétrico.



**Fig. 1A** Desenho esquemático do procedimento experimental - métodos de aplicação de contração excêntrica para o músculo extensor longo dos dedos (ELD). Um eletrodo foi inserido “transcutâneamente” perto do nervo ciático (pólo +) e o outro perto do nervo fibular comum (- pólo). Contrações repetitivas do músculo foram induzidas por estimulação elétrica cíclica do nervo. A pata posterior foi fixada a uma barra que se encontrava ligada ao motor linear, e que foi puxada (“alongada”), sincronizadamente com a contração do músculo de modo a que o músculo ELD fosse esticado. A intensidade da corrente a estimulação elétrica foi fixada em 3 vezes o limiar para a contração muscular e a frequência foi fixada em 50 Hz para induzir a contração tetânica. A contração foi repetida 500 vezes (1 segundo de contração seguido por 3 segundos de repouso).

Antes de começar o exercício, foram determinadas correntes do limiar de tetania. Se o limite excedesse 100  $\mu$ A, os eletrodos eram reposicionados para se obter um limiar mais baixo. A corrente aplicada durante o exercício no grupo CE foi fixada em um limite de três vezes a contração muscular. O parâmetro de estímulo para induzir a contração tetânica foi uma frequência de 50 Hz com duração de pulso de 1 ms. O músculo ELD foi estendido desde a

posição inicial (cerca de 45 graus de flexão plantar) para flexão plantar máxima (cerca de 90 graus) ao longo de um período de 1 segundo (“alongar” na Fig. 1A) com o uso de um “servomotor” linear e então voltou para a posição inicial após 3 segundos (“encurtar” na Fig. 1A), e sincronizado com o estimulador elétrico para que o músculo fosse movimentado ao mesmo tempo em que o nervo fibular comum fosse ativado.

Este padrão foi repetido a cada 4 segundos para um total de 500 repetições. Os ratos no grupo AL não receberam nenhuma corrente elétrica no nervo fibular comum, ou seja, o ELD não estava ativado durante todo o período de exercício, mas simplesmente esticado conforme descrito acima. Os ratos se comportaram, comeram e beberam normalmente após se recuperarem da anestesia.

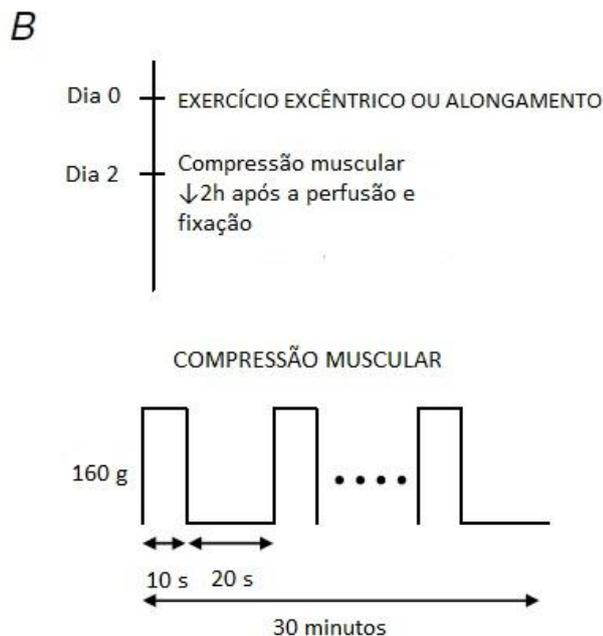
Para se medir o limiar de hiperalgesia mecânica (limiar de retirada) foi utilizado o teste de *Randall-Selitto*: os animais foram contidos em torno do tronco com uma toalha para acalmá-los e tratados suavemente durante os experimentos. Um empurrador cônico com ponta arredondada (diâmetro de 9 mm) foi aplicado no ventre muscular do ELD através da pele raspada. A taxa de aplicação de força foi fixada em 156.8 mN/s e o limite máximo de aplicação de força foi 2450 mN para evitar danos ao tecido. A intensidade da pressão, capaz de causar uma reação de fuga foi definida como o limiar de retirada. Os testes sempre foram feitos entre 12:00 e 15:00 horas para se evitar flutuações circadianas. Sessões de treinamento foram realizadas durante quatro dias consecutivos para aumentar a sensibilidade ao teste (TEIXEIRA *et al.*, 1989, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). As medições foram realizadas dez vezes em intervalos de alguns minutos e a média do valor dos últimos cinco ensaios era tido como o limiar. O experimento foi feito em duplo-velado.

Para garantir que a mudança no limiar de retirada medido pelo aparelho *Randall-Selitto* não era o resultado de hiperalgesia mecânica cutânea, o limiar de hiperalgesia mecânica cutânea foi medido através do teste de filamentos de *Von Frey* (VFHs), porque a tensão mecânica induzida por VFHs dificilmente atinge a camada mais profunda do músculo (TAKAHASHI *et al.*, 2004, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). Os ratos foram contidos com uma toalha, como no

teste de *Randall-Selitto* e cada filamento foi aplicado sobre a pele do músculo exercitado (ELD).

Brevemente, um filamento que se presumia doloroso foi aplicado primeiro. Se um animal retirasse sua pata, filamentos mais fracos seriam aplicados um a um até que o animal não mostrasse a resposta de retirada. Em seguida, um filamento mais forte seria aplicado novamente. Este procedimento foi repetido várias vezes para determinar o limiar de retirada. Um mesmo filamento foi aplicado duas vezes, e se um animal mostrasse a resposta de retirada em pelo menos uma resposta, este resultado seria definido como positivo. Cada filamento foi aplicado em intervalos de poucos segundos. Após a realização dessa série de testes comportamentais de hiperalgesia, os animais utilizados foram eutanasiados.

Para o estudo da proteína “c-Fos” foi utilizado o protocolo de exercício excêntrico e compressão mecânica muscular. Para isso, foi realizada uma compressão mecânica aplicada por meio do aparelho *Randall-Selitto* utilizando uma força de 1568mN durante 10 segundos, seguido por um período de repouso de 20 segundos (Fig. 1B). Esse procedimento foi repetido por 30 minutos sob anestesia. A força de 1568mN é cerca de duas vezes maior que o limiar de retirada em ratos acordados. No segundo dia, os animais dos grupos CE e AL foram divididos em dois subgrupos respectivos, com ou sem compressão mecânica. Assim, havia um total de quatro grupos: grupo AL sem compressão mecânica (AL/SCM), grupo AL com compressão mecânica (AL/CCM, 4), um grupo com contração excêntrica sem compressão mecânica (CE/SCM) e um grupo com contração excêntrica com compressão mecânica (CE/CCM).



**Fig. 1B Desenho esquemático do procedimento experimental - Cronograma do exercício e compressão (painel superior) e o protocolo de compressão (painel inferior) no experimento de c-Fos. Painel superior: no dia 0 os animais foram submetidos a contração excêntrica (CE) ou alongamento do músculo (AL). No dia 2, os animais dos grupos do CE e AL foram divididos em dois subgrupos, com e sem compressão do músculo. Painel inferior: o músculo exercitado (músculo ELD) foi compactado com uma força de 160 g pelo aparato de Randall-Selitto por 10 segundos, com intervalo de 20 segundos antes da próxima compressão. Esta sessão foi repetida 60 vezes.**

Em outra série de experimentos, foi examinado o efeito da morfina na expressão de “c-Fos” (induzida por exercício excêntrico e compressão mecânica) para certificar-se de que essa foi induzida por estímulos nocivos (PRESLEY *et al.*, 1990, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). Os métodos e o intervalo para CE e compressão mecânica eram os mesmos conforme descrito acima. Um grupo recebeu morfina vinte minutos antes da compressão do ELD e outro grupo recebeu somente soro.

A análise imuno-histoquímica foi realizada duas horas após o término da compressão muscular ou dois dias após a sessão de exercício em grupos sem compressão. Os animais foram anestesiados e a medula espinhal (L1–S1) foi rapidamente removida, fixada por vinte e quatro horas e depois crio-protetida em sacarose e solução tampão por dois dias. Foram cortadas e congeladas secções transversais da medula espinhal de L2–L6 (40  $\mu$ m) para análise.

No presente estudo o limiar de hiperalgesia mecânica após CE diminuiu

quando medido com o aparelho *Randall-Selitto*, mas não quando medido com VFHs, porque o diâmetro da ponta dos VFHs é pequeno (0,5 mm) e é pouco provável que o estresse mecânico aplicado à pele possa ser transmitido ao músculo (TAKAHASHI *et al.*, 2004, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005), pode-se concluir então que a VFH mede o limiar de hiperalgesia da pele.

Em contraste, a ponta do aparato *Randall-Selitto* é muito maior do que os filamentos de *Von Frey*, então a força aplicada pode ser transmitida mais profundamente através da pele (TAKAHASHI *et al.*, 2004, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). Portanto, o método de *Randall-Selitto* é considerado eficiente em representar a variação do limiar de hiperalgesia no tecido mais profundo, provavelmente o músculo. Esta mudança foi observada um dia depois o CE e atingiu o menor valor dois dias após o CE, o que é compatível com estudos anteriores sobre dor muscular de início tardio (ARMSTRONG, 1984; NWEHAM, 1988; PROSKE MORGAN, 2001, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005).

Os presentes resultados demonstraram claramente que a expressão de “c-Fos” foi aumentada apenas no grupo de CE com compressão mecânica (CE/CCM). No grupo CE sem compressão mecânica (CE/SCM), foram rotulados alguns neurônios “c-Fos” no corno dorsal na L4, mas o número não diferiu do grupo AL sem compressão mecânica (AL/SCM). Esta observação é consistente com o fato de que a dor espontânea não é proeminente em DMIT dois dias após contração excêntrica (GRAVEN-NIELSEN & ARENDT-NIELSEN, 2003, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005).

Pelo fato de a expressão de “c-Fos” ser conhecida por ser induzida por muitos fatores em vias neurais correspondentes, poderia-se esperar que a contração muscular excêntrica ou alongamento a induzisse. No entanto, os níveis de pico da expressão da proteína “c-Fos-Ir” em neurônios geralmente é cerca de duas horas após excitação neuronal e a expressão desaparece de quatro a dezesseis horas após a excitação (MEN’ETREY *et al.*, 1989, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). No presente estudo os animais foram submetidos ao alongamento muscular ou contração muscular excêntrica pela estimulação elétrica do nervo dois dias antes da perfusão. Portanto, qualquer expressão de “c-Fos” que havia sido induzida por esses estímulos deviam ter desaparecido quando os animais foram perfundidos. No grupo de AL com compressão mecânica (AL/CCM), o número de neurônios rotulados não diferiu do grupo AL sem compressão mecânica (AL/SCM). Este resultado sugere que compressão

muscular em si não foi capaz de induzir hiperalgesia com o rato anestesiado.

Em contraste, o número de neurônios “c-Fos-Ir” no grupo CE com compressão mecânica (CE/CCM), aumentou significativamente, e o aumento foi observado no corno dorsal ipsilateral superficial em L4 quando comparado com os outros três grupos. O corno dorsal superficial é bem conhecido por ser uma região importante onde aferências finamente mielinizadas e amielinizadas da pele (LUZ PERL, 1979; SUGIURA *et al.* 1986, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005), vísceras (CERVERO CONNEL, 1984; MIZUMURA *et al.*, 1993, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005) e músculos (BRUSHART MESULAM, 1980; BRUSHART *et al.*, 1981; MENSE CRAIG, 1988; LING *et al.*, 2003, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005) terminam. Brushart *et al.*, encontraram músculos em ratos com aferências do ramo fibular densamente projetado para a substância gelatinosa (BRUSHART *et al.*, 1981, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). Recentemente Ling *et al.*, demonstraram por injeção intracelular de “*Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*” ao único neurônio C-aferente no gânglio da raiz dorsal amielinizadas (C), as fibras aferentes da cabeça medial do músculo gastrocnêmio correm na superfície do funículo dorsal, desprendendo cauções em lâminas I e II e às vezes em partes da lâmina III (LING *et al.*, 2003, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). Assim, o aumento proeminente de “c-Fos-Ir” no corno dorsal superficial do grupo de CE com compressão mecânica (CE/ CCM) e ausência de aumento no grupo de AL com compressão mecânica (AL/ CCM) sugerem fortemente que o músculo foi debilitado através da estimulação mecânica (existência de sensibilidade aumentada) dois dias depois do trabalho muscular excêntrico. Esta conclusão foi apoiada pelo fato de que o tratamento de morfina diminuiu claramente a imunorreatividade de “c-Fos” no Corno dorsal.

O aumento dos neurônios de “c-Fos-infravermelho-positivos” no grupo de compressão CE foi encontrado principalmente nos segmentos L4 e alguns em L3–L2 da coluna vertebral; nenhum aumento foi encontrado em L5 ou mais caudalmente. Um relatório anterior mostrou que a grande maioria dos neurônios sensoriais que inervam o ELD está localizada no gânglio de raiz dorsal de L4 (PEYRONNARD *et al.*, 1986, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). Terminações espinhais do músculo gastrocnêmio traçada pela técnica de rotulagem intracelular foram encontradas ao nível rostral onde fibras entraram na medula espinhal, mas não ao nível caudal (comunicação pessoal do Dr. Y. Sugiura, departamento de Anatomia da Escola de Medicina da Universidade

Nagoya, Japão). O presente resultado está de acordo com esta observação e pode sugerir que aferências desse músculo se encerram no segmento de entrada e rostral, mas não a nível caudal.

Sensibilidade muscular aumentada induzida por palpação no músculo exercitado em DMIT pode ser transportada em parte por aferências da fibra-C para os neurônios secundários, desde que ela é sentida como uma dor difusa e maçante. Na verdade, existem receptores sensoriais fibra-C no músculo que têm nociceptores com características semelhantes aos nociceptores cutâneos e viscerais, e que respondem aos vários tipos de estímulos nocivos (KUMAZAWA, MIZUMURA, 1977; MENSE, 1977; MENSE MEYER, 1988, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). Além disso, esses receptores são sensibilizados à estimulação mecânica por mediadores inflamatórios como a bradicinina (MENSE MEYER, 1988, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). Também tem sido sugerido que as fibras mielinizadas são envolvidas em DMIT (WEERAKKODY *et al.*, 2001, 2003, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005).

Embora tenha havido disputa sobre se o processo inflamatório está envolvido no mecanismo subjacente de DMIT (SMITH, 1991, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005), não pode ser excluída a possibilidade de que alguns mediadores inflamatórios ou componentes citoplasmáticos lançados como resultado à microlesão no músculo após contração excêntrica podem sensibilizar os nociceptores à estimulação mecânica. Desde que o mecanismo de hiperalgesia à estimulação mecânica em geral são ainda mal compreendidos, estudos eletrofisiológicos das atividades de nociceptores musculares podem lançar alguma luz sobre este campo. Esse estudo preliminar mostrou aumento de resposta mecânica e diminuição limiar mecânico em fibras-C neste modelo (TAGUCHI *et al.*, 2004, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005).

O presente modelo animal parece ser útil na investigação dos mecanismos de DMIT e o mecanismo de hiperalgesia mecânica em geral. O estudo concluiu que, embora havendo uma discussão sobre se o processo inflamatório está envolvido no mecanismo subjacente de DMIT (SMITH, 1991, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005), não pode ser excluída a possibilidade de que alguns mediadores inflamatórios ou componentes citoplasmáticos lançados como resultado à microlesão no músculo após contração excêntrica podem sensibilizar os nociceptores à estimulação mecânica. Desde que o mecanismo

de hiperalgesia à estimulação mecânica em geral é ainda mal compreendido, estudos eletrofisiológicos das atividades de nociceptores musculares podem lançar alguma luz sobre este campo. Esse estudo preliminar mostrou aumento de resposta mecânica e diminuição do limiar mecânico em fibras-C (TAGUCHI *et al.*, 2004, *apud* TAGUCHI *et al.*, 2005). O presente modelo animal parece ser útil na investigação dos mecanismos de DMIT e o mecanismo de hiperalgesia mecânica em geral.

#### A “UPREGULATION” DO FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO (NGF) CAUSADA PELA CONTRAÇÃO EXCÊNTRICA É ALTERADA APÓS A SEGUNDA SESSÃO DE EXERCÍCIOS EM RATOS

De acordo com Urai *et al.*, (2013) a DMIT é atenuada quando o exercício é repetido após um intervalo, o qual é referido como o “efeito de ataque repetido” (*repeated bout effect*) (CLARKSON e DEDRICK, 1988; NOSAKA e CLARKSON, 1995, *apud* URAI *et al.*, 2013). Anteriormente, esse efeito também foi observado quando o músculo foi estimulado eletricamente (SACCO & JONES, 1992, *apud* URAI *et al.*, 2013), o que sugere que o “efeito de ataque repetido” não é mediado centralmente. No entanto, outras pesquisas divergem dessa ideia, já que foi mostrado a eficácia do exercício no músculo contralateral (HOWATSON & VAN SOMEREN, 2007; STARBUCK & ESTON, 2012, *apud* URAI *et al.*, 2013), apoiando a teoria neural central para o “efeito de ataque repetido”.

Tem sido relatado que este fenômeno é induzido não só por contrações excêntricas máximas, mas também por contrações excêntricas submáximas, incluindo contrações de baixa intensidade (CHEN *et al.*, 2007, 2011, *apud* URAI *et al.*, 2013). Várias hipóteses têm sido propostas para essa adaptação: (a) adaptação neural; (b) adaptação mecânica (aumento da rigidez muscular dinâmica ou aumento da rigidez dinâmica passiva); (c) adaptação celular como adição longitudinal de sarcômeros, adaptação das respostas inflamatórias e adaptação para manter o acoplamento E-C; e (d) outros mecanismos, tais como proteínas de choque de calor, remodelação dos sarcômeros e remodelamento da matriz extracelular (ver MCHUGH, 2003 para revisão, *apud* URAI *et al.*, 2013).

Com o objetivo de pesquisar o mecanismo do “efeito de ataque repetido” este estudo examinou se a “*upregulation*” de NGF causada pela contração

excêntrica é alterada após a segunda sessão de exercícios e se a mudança observada foi induzida pela ativação do receptor B<sup>2</sup> da bradicinina.

O protocolo de exercício excêntrico (CE) foi o mesmo que o utilizado por Taguchi *et al.*, (2005). O exercício foi aplicado no dia 0 e repetido no dia 5, houve um intervalo de cinco dias, já que pesquisas anteriores demonstraram que a hiperalgesia mecânica desaparece completamente cinco dias após a sessão de exercício (TAGUCHI *et al.*, 2007; MURASE *et al.*, 2010, *apud* URAI *et al.*, 2013). A medição da hiperalgesia foi realizada seguindo o protocolo de *Randall-Sellito*.

No segundo protocolo de exercício foi examinado no músculo as alterações na expressão de NGF. Para isso, o músculo ELD foi removido sob anestesia, no grupo controle, cinco dias após o primeiro protocolo de exercício excêntrico; doze horas; e vinte e quatro horas após a primeira e a segunda sessão de CE. O tempo para retirada do músculo foi escolhido porque já foi descoberto que o RNAm de NGF sofre uma “*upregulation*” doze horas a dois dias após o CE com o valor mais elevado após doze horas (MURASE *et al.*, 2010, *apud* URAI *et al.*, 2013).

O terceiro protocolo foi realizado para examinar se o bloqueio do antagonista do receptor B<sup>2</sup> da bradicinina, HOE 140, influencia na adaptação após o CE. O limiar de retirada foi medido como descrito anteriormente no grupo controle e no grupo HOE 140 antes e dois dias depois de CE, já que seu efeito é mais consistente após dois dias (TAGUCHI *et al.*, 2005a; MURASE *et al.*, 2010, *apud* URAI *et al.*, 2013).

O presente estudo mostrou que a hiperalgesia mecânica não ocorreu após a segunda sessão de CE, ou seja, houve adaptação na hiperalgesia mecânica, como relatado anteriormente (CLARKSON *et al.*, 1987; NOSAKA & CLARKSON, 1995, *apud* URAI *et al.*, 2013). Muitas pesquisas mostraram que a força de contração é reduzida imediatamente após o CE e se recupera ao longo de mais de uma semana (CHEN *et al.*, 2007; PAULSEN *et al.*, 2010b, *apud* URAI *et al.*, 2013). Portanto, a força do músculo na segunda sessão de CE no experimento poderia ter sido menor do que na primeira sessão, porém não se sabe se a força muscular diminuiu. Mesmo que tenha ocorrido, pode ter sido uma pequena alteração, já que foram decorridos cinco dias entre as

séries. Portanto, a contribuição desta diminuição da força muscular para a diminuição da hiperalgesia mecânica na segunda sessão foi provavelmente pequena.

O presente estudo também mostrou que a “*upregulation*” do RNAm de NGF, que foi mostrado anteriormente por ser um dos agentes causadores da hiperalgesia mecânica após o CE (MURASE *et al.*, 2010, *apud* URAI *et al.*, 2013), não ocorreu na segunda sessão de CE. Este resultado é mais uma prova de uma relação causal entre “*upregulation*” de NGF e hiperalgesia mecânica após o exercício (MURASE *et al.*, 2010, *apud* URAI *et al.*, 2013).

O antagonista do receptor B<sup>2</sup> de bradicinina, HOE 140, injetado apenas uma vez antes da primeira sessão de CE não só bloqueou o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e agiu na “*upregulation*” do RNAm de NGF após a primeira sessão de CE, mas também a reduziu após a segunda sessão de CE. O limiar hiperalgesia basal na segunda sessão foi um pouco maior do que na primeira sessão, mas esta diferença esteve dentro da variação normal entre sessões. Pode também ter havido algum efeito do treinamento do experimentador.

A ausência de hiperalgesia mecânica observada e “*upregulation*” do RNAm de NGF após segundo CE não pode ser devido ao fato de que HOE 140 ainda estaria agindo durante e após a segunda CE, já que seu efeito, supostamente, dura apenas algumas horas (BAO *et al.*, 1991, *apud* URAI *et al.*, 2013). Depois da injeção HOE 140 pode-se considerar que não ocorreu inibição do receptor B<sup>2</sup>, o que não alterou após a primeira sessão de CE. Isso significa que todo o processo que leva à dor muscular tardia não teria sido alterado após a primeira CE. Assim, o segundo CE realizado depois iria ter induzido hiperalgesia mecânica e “*upregulation*” do RNAm de NGF a um nível semelhante àquele após primeiro CE normal. No entanto, nem a hiperalgesia mecânica nem “*upregulation*” de NGF ocorreu.

Alternativamente, a aparente ausência de diferença significativa no RNAm de NGF depois segundo CE pode ter sido induzido pelo baixo número de amostras. No entanto, a ausência de hiperalgesia mecânica sugere que a ausência de “*upregulation*” do RNAm de NGF é verdadeira. A Bradicininina (especificamente, Arg-bradicininina no caso de ratos; HILGENFELDT *et al.*,

2005, *apud* URAI *et al.*, 2013) é declaradamente libertada a partir de células endoteliais vasculares do músculo após estimulação do receptor de adenosina, enquanto que a adenosina é liberada a partir de músculo exercitado (BOIX *et al.*, 2002, *apud* URAI *et al.*, 2013). Portanto, um possível local de adaptação seria no processo de produção ou liberação de adenosina a partir de células musculares, ou a partir de bradicinina de células endoteliais vasculares do músculo esquelético.

As presentes observações sugerem que a adaptação na hiperalgesia mecânica após o exercício ocorre antes da produção da bradicinina. As presentes observações podem ser um passo útil para desmascarar um novo mecanismo de dor muscular tardia e sua adaptação. Os mecanismos de DMIT e a sua adaptação relatados no presente estudo podem funcionar também em seres humanos, já que uma parte desse mecanismo foi demonstrada também em seres humanos, como o efeito hiperalgésico da injeção intramuscular de NGF (ANDERSEN *et al.*, 2008, *apud* URAI *et al.*, 2013). Para confirmar se estes mecanismos também se aplicam aos seres humanos, novos experimentos devem ser conduzidos. Se comprovados em seres humanos, esse conhecimento pode ajudar a desenvolver métodos (incluindo medicamentos ou suplementos) para o exercício sem dor muscular tardia.

#### ENVOLVIMENTO DA BRADICININA E NGF EM DMIT

Muitas substâncias são liberadas devido à contração muscular: o lactato (TEGEDER *et al.*, 2002, *apud* MURASE *et al.*, 2010); a bradicinina e o péptido calidina (BLAIS *et al.*, 1999; BOIX *et al.*, 2002, *apud* MURASE *et al.*, 2010); o ATP (LI *et al.*, 2003, *apud* MURASE *et al.*, 2010); e outras substâncias (TEGEDER *et al.*, 2002, *apud* MURASE *et al.*, 2010). Entre estas substâncias a bradicinina, o glutamato e o ATP são capazes de induzir não só excitação/sensibilização dos nociceptores, mas também mudanças na expressão de neuropeptídeos e canais em diversos tipos de célula (FERREIRA *et al.*, 1993; BAKER, 2005; INOUE *et al.*, 2006, *apud* MURASE *et al.*, 2010).

O NGF (fator de crescimento nervoso) é produzido em tecidos inflamados e no músculo esquelético após a isquemia (TURRINI *et al.*, 2002, *apud* MURASE *et al.*, 2010), lesão nervosa (AMANO *et al.*, 1991, *apud*

MURASE *et al.*, 2010) ou sensibilização dos nociceptores, resultando na hiperalgesia (LEWIN *et al.*, 1993, *apud* MURASE *et al.*, 2010) e também está envolvido em condições de dor patológica (LEWIN e MENDELL, 1993; WOOLF *et al.*, 1994, *apud* MURASE *et al.*, 2010). Recentemente foi relatado que a injeção intramuscular de NGF induz duradoura sensibilidade muscular. (SVENSSON *et al.*, 2003, *apud* MURASE *et al.*, 2010).

Murase *et al.*, (2010), investigaram o envolvimento da bradicinina e NGF em DMIT utilizando o modelo de indução de hiperalgesia mecânica em ratos (TAGUCHI *et al.*, 2005). Os autores supõem que a bradicinina está envolvida no desenvolvimento de hiperalgesia e o NGF atua mantendo a sensibilidade dos receptores das fibras musculares do tipo C para a estimulação mecânica.

O protocolo de exercícios foi o mesmo seguido por Taguchi *et al.* (2005), e a medição da hiperalgesia foi realizada utilizando somente o protocolo de *Randall-Selitto*.

Foi injetado HOE 140 (antagonista do receptor B<sup>2</sup> da bradicinina) e des-Arg 10-HOE 140 (antagonista do receptor B<sup>1</sup> da bradicinina) via subcutânea trinta minutos antes do exercício ou trinta minutos antes da medição do limiar de retirada mecânica no segundo dia após o exercício. HOE 140 também foi injetado em outro grupo de animais trinta minutos após o exercício. Estes antagonistas são específicos do receptor (HOCK *et al.*, 1991, WIRTH *et al.*, 1991, *apud* MURASE *et al.*, 2010) e as dosagens usadas são suficientes para antagonizar bradicinina em um modelo de dor pós-operatória e condições inflamatórias (FOX *et al.*, 2003, MURATANI *et al.*, 2005, *apud* MURASE *et al.*, 2010).

O anticorpo anti-NGF foi injetado no ventre do músculo extensor longo dos dedos (ELD) do membro posterior direito. O anticorpo Anti-IL-6 foi injetado no ventre do músculo ELD dois dias depois do alongamento, de forma semelhante ao anticorpo anti-NGF.

A bradicinina foi injetada no músculo ELD direito ao longo de trinta minutos, utilizando uma bomba de micro-seringa. Um volume equivalente de uma solução de tampão (PBS) foi injetado no músculo ELD direito do grupo

controle. O limiar de retirada foi medido antes da injeção, duas e seis horas após a injeção e um, dois, três, quatro, e cinco dias após a injeção.

Foi demonstrado que a bradicinina liberada durante o exercício desempenha um papel essencial, através de receptores B<sup>2</sup>, na hiperalgesia mecânica muscular após o exercício (DMIT), mostrando que o antagonista B<sup>2</sup> aplicado pouco antes do exercício, mas não trinta minutos após o exercício impediu o desenvolvimento de dor muscular tardia. Diferente dos relatórios anteriores (ARMSTRONG *et al.*, 1983; SMITH, 1991; PYNE, 1994, *apud* MURASE *et al.*, 2010), sinais de danos e inflamação muscular foram mínimos (quase ausente) no modelo de dor muscular tardia, mas a hiperalgesia mecânica foi evidente (FUJII *et al.*, 2008, *apud* MURASE *et al.*, 2010).

A ausência de um efeito de antagonistas do receptor de bradicinina administrados após o desenvolvimento de DMIT mostrou que a bradicinina não é a substância que mantém a hiperalgesia mecânica, o que significa que a bradicinina não é responsável pelo o aumento da sensibilidade mecânica de receptores da fibra C após o exercício excêntrico (TAGUCHI *et al.*, 2005b, *apud* MURASE *et al.*, 2010).

#### ENVOLVIMENTO DAS FIBRAS DO TIPO C NA DMIT

De acordo com o estudo Kubo *et al.* (2012) existe um certo consenso de que a dor muscular, em condições normais, é transmitida por fibras aferentes finas do tipo C (GRAVEM - NIELSEN & MENSE, 2001, *apud* KUBO *et al.*, 2012), mas tem sido sugerido que a DMIT é transmitida por fibras aferentes grossas do tipo A, incluindo os fusos musculares. Em contraste com esta hipótese, Taguchi *et al.*, (2005b, *apud* KUBO *et al.*, 2012) observou uma sensibilização clara da resposta mecânica de fibras aferentes finas do tipo C.

O objetivo do presente estudo foi descobrir se as fibras C estão envolvidas na DMIT. Para isso foi examinado se a DMIT pode ser induzida em animais em que grande parte das fibras aferentes finas do tipo C foram danificadas por injeção de capsaicina no período neonatal. Para ter a certeza de que o efeito observado não foi devido à ausência de “*upregulation*” de NGF

no músculo, também se examinou a expressão de RNAm de NGF no músculo de animais tratados com capsaicina no período neonatal e no grupo controle.

O tratamento com capsaicina foi realizado em um ou dois dias após o nascimento dos ratos. O protocolo de exercícios foi o mesmo seguido por Taguchi *et al.* (2005) e a medição da hiperalgesia foi realizada utilizando o protocolo de *Randall-Selitto*.

O estudo confirmou os relatórios anteriores de que o tratamento com capsaicina neonatal destrói grande parte das fibras aferentes não mielinizadas. O limiar nociceptivo muscular mecânico não foi alterado após o tratamento com capsaicina. Não foi observada hiperalgesia mecânica após o exercício em ratos tratados com capsaicina.

O estudo demonstrou que as fibras não mielinizadas, que foram principalmente sensíveis a capsaicina, são responsáveis pela dor muscular tardia. Atualmente acredita-se que a DMIT é induzida por microlesões de fibras musculares e pela inflamação resultante (SMITH, 1991, *apud* KUBO *et al.*, 2012). No entanto, não foi detectada nenhuma lesão das fibras musculares ao nível microscópico, nem extravasamento de células inflamatórias para o músculo exercitado no modelo utilizado. Cramer *et al.*, (2007, *apud* KUBO *et al.*, 2012) também relatou que o dano muscular não foi essencial para DMIT. No mesmo estudo também foi relatado que a injeção intramuscular de anti-NGF reverteu a hiperalgesia muscular mecânica em ratos, sugerindo que o NGF, produzido pelas células do músculo (MURASE *et al.*, 2012, *apud* KUBO *et al.*, 2012), desempenha um papel crucial para a DMIT.

No presente estudo, a “*upregulation*” de NGF no músculo ELD ocorreu em animais tratados com capsaicina semelhante para os animais tratados com solução de “veículo”. A expressão de RNAm de NGF não foi diferente comparado com o grupo controle. Isto significa que os processos musculares que induzem hiperalgesia foram normais, com apenas a falta do lado aferente em ratos tratados com capsaicina neonatal. Neste estudo, apenas fibras amielínicas foram severamente danificadas, enquanto as fibras mielinizadas permaneceram intactas, e não foi desenvolvida hiperalgesia mecânica após o exercício.

Este resultado sugere que as fibras envolvidas na dor muscular tardia são amielínicas (principalmente sensíveis à capsaicina), em vez de fibras grossas mielinizadas. Houve diminuição do número de fibras não-mielinizadas, mas não houve destruição completa. No entanto, a hiperalgesia mecânica muscular não foi induzida após o exercício. Pode se concluir que o número de fibras remanescentes em animais tratados com capsaicina era muito pequeno para provocar hiperalgesia após contração excêntrica.

Em resumo, o presente estudo demonstrou claramente que a dor muscular tardia após o exercício não apareceu em ratos tratados com capsaicina, que possuem poucas fibras musculares aferentes não mielinizadas, embora a “*upregulation*” de NGF no músculo tenha ocorrido de forma semelhante ao do grupo controle. Isto indica que essas aferências não mielinizadas são responsáveis pela hiperalgesia mecânica no músculo após o exercício.

#### PAPEL DOS CANAIS IÔNICOS NA DMIT

De acordo com estudo de Fujii *et al.* (2008), existem na literatura alguns modelos animais para o estudo de dor muscular inflamatória e não inflamatória, por exemplo: hiperalgesia muscular induzida por uma injeção intramuscular de carragenina que provoca inflamação (KEHL *et al.*, 2000, *apud* FUJI *et al.*, 2008); a injeção de ácido no músculo gastrocnêmio (MG) que resulta em persistente hiperalgesia mecânica cutânea, da pata traseira do rato, sem lesão muscular (SLUKA *et al.*, 2001, *apud* FUJI *et al.*, 2008); e o exercício extenuante, especialmente a contração excêntrica (CE), teria induzido hiperalgesia muscular (TAGUCHI *et al.*, 2005, *apud* FUJI *et al.*, 2008).

Os estímulos nocivos são detectados por nociceptores, os terminais periféricos nociceptivos dos neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) que diferem em seus padrões de expressão de vários canais iônicos, que levam a diversidade funcional na sinalização sensorial.

O receptor de potencial transitório vanilloid 1 (TRPV1) é expresso principalmente em uma subpopulação de neurônios DRG de pequeno porte de fibras C amielínicas, e é ativado (*gated*) por calor (> 43 ° C), por capsaicina,

prótons, anandamida, N-araquidonoil dopamina e assim por diante. Existem estudos que comprovam envolvimento de TRPV1 em dor inflamatória, neuropática, e câncer.

O TRPV2 é expresso em neurônios DRG de médio e grande porte de fibras A mielinizadas, e é ativado por uma temperatura muito alta ( $> 52^{\circ}\text{C}$ ), mas não pela capsaicina e prótons. Além disso, TRPV2 é um candidato a “*mechanosensor*”.

Tem sido relatada na literatura uma correlação positiva entre dor e acidez local. Os canais iônicos de detecção de acidez (ASICs) são ativados por baixo pH e são encontrados em neurônios sensoriais primários. ASIC3, também conhecido como “raiz dorsal ASIC” (DRASIC), é encontrado neurônios sensoriais primários de grande e de pequeno diâmetro.

A extracelular adenosina trifosfato (ATP) tem sido implicada na sinalização nociceptiva em estados de dor normais e patológicas. As ações nociceptivas do ATP são mediadas pela família dos receptores específicos P2X. O receptor P2X3 é restrito para os neurônios sensoriais periféricos, e situa-se, especialmente em pequenos neurônios sensoriais nociceptivos.

A maioria do conhecimento sobre o papel dos canais iônicos na fisiologia da dor é baseada em estudos de tecido cutâneo, mas os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à dor muscular ainda são pouco conhecidos.

Neste estudo, foram investigados dois modelos de dor muscular para melhor compreender os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento de dor muscular e sua nocicepção. Foi examinado o papel dos canais iônicos expressos em neurônios DRG e sua relação com a nocicepção por PCR quantitativa, imuno-histoquímica e farmacologia comportamental.

Os ratos foram injetados com uma substância chamada carragenina ou submetidos à contração excêntrica (CE) do músculo gastrocnêmio (MG). A injeção de carragenina e modelos CE são modelos úteis de dor inflamatória aguda e dor muscular tardia (DMIT), respectivamente, e a evolução e etiologia subjacente podem ser diferentes. Os animais do grupo controle receberam uma injeção de soro fisiológico.

O protocolo de exercícios e de medição da dor foram os mesmos seguidos por Taguchi *et al.*, (2005). Todos os protocolos de dissecação e preparação de tecidos foram realizados após doze horas da injeção de carragenina ou após dois dias de CE.

Os resultados deste estudo confirmam que a injeção de carragenina ou CE reduzem o limiar mecânico de retirada do membro posterior ipsilateral, quando medido por um aparelho de *Randall-Selitto*, mas não pelo teste de filamentos de *Von Frey*.

Neste estudo, a injeção de carragenina no músculo gastrocnêmio resultou em hiperalgesia mecânica muscular sem qualquer hiperalgesia mecânica cutânea aparente entre seis e vinte quatro horas após a injeção. A hiperalgesia mecânica desenvolvida pela contração excêntrica foi mantida durante três dias.

A infiltração de células inflamatórias no músculo gastrocnêmio foi observada em animais injetados com carragenina, mas não nos que submetido à contração excêntrica. Não houve alteração nas expressões de genes e nas proteínas em neurônios sensoriais. A injeção intramuscular de antagonistas TRPV1 mostrou um efeito supressor quase completo sobre a hiperalgesia muscular induzido pelo exercício excêntrico, mas não na hiperalgesia causada pela injeção de carragenina. Antagonistas de canais TRP e ASICs mostraram efeitos supressivos para tanto hiperalgesia muscular induzida por exercício excêntrico quanto para as induzidas por injeções de carragenina. Canais TRP e ASICs estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica no músculo gastrocnêmio.

#### DIFERENÇAS ENCONTRADAS NO LIMIAR NOCICEPTIVO (HIPERALGESIA MECÂNICA) E A IDADE DOS RATOS

Em 2007, Taguchi *et al.*, utilizando o mesmo protocolo já citado, investigaram se a DMIT (hiperalgesia mecânica) apresenta limiares diferentes entre ratos jovens e idosos, já que há indícios na literatura de que os efeitos da DMIT podem ser mais elevados em pessoas/animais idosos e que esses podem apresentar uma recuperação mais lenta.

Foram utilizados ratos jovens (sete semanas de idade) e ratos idosos (cento e trinta semanas de idade). O protocolo de exercício excêntrico (contração excêntrica x alongamento), teste de hiperalgesia mecânica (*Randall Sellito* x Teste de filamentos *Von Frey*) e o estudo “c-Fos” (teste de compressão muscular x teste de imunohistoquímica) foram similares ao estudo anterior (Taguchi *et al.*, 2005).

No grupo dos ratos jovens o limiar de hiperalgesia mecânica medido estava estável antes do exercício em ambas as pernas. Este valor começou a diminuir na pata em que foi realizada a contração excêntrica (CE) um dia após o exercício, e atingiu um valor mínimo dois dias após o exercício. A diminuição do limiar hiperalgesia mecânica, embora menos intensa, ainda foi observada três dias após o exercício. A recuperação completa foi observada quatro dias após o exercício. A alteração no limiar hiperalgesia mecânica do lado CE foi estatisticamente significativo de um a três dias após o exercício em comparação ao limiar de hiperalgesia mecânica medido um dia antes do exercício. O limiar de hiperalgesia mecânica contralateral permaneceu o mesmo durante todo o período experimental. Uma comparação entre o limiar de retirada do lado CE com a do lado contralateral mostrou que o lado de CE foi significativamente mais baixo de um a três dias após o exercício.

Os resultados para o grupo de ratos idosos foi semelhante ao dos ratos jovens, o limiar de hiperalgesia mecânica começou a diminuir no primeiro dia, no entanto, manteve-se reduzindo até o quarto dia. Em comparação com o lado contralateral (pata não exercitada), o valor do limiar de hiperalgesia mecânica do lado CE foi menor no período de um a cinco dias. Quando comparado os dois grupos foi observado uma recuperação mais lenta no grupo de ratos idosos do que no grupo ratos de jovens. Não houve quaisquer alterações encontradas no teste de filamentos *Von Frey* para nenhum dos grupos.

A indução da expressão de “c-Fos” no corno dorsal da medula por compressão do músculo foi examinada apenas nos animais idosos três dias após CE. Números significativamente maiores de neurônios positivos “c-Fos” foi observado no corno dorsal superficial do que os animais do grupo controle (sem tratamento). Este aumento foi observado não só na L4, mas também em

L5, uma distribuição mais ampla do que em animais jovens (apenas L4), resultados encontrados no estudo anterior (TAGUCHI *et al.*, 2005, ).

Em resumo, o presente estudo demonstrou claramente que a CE induziu uma maior hiperalgesia mecânica no músculo e mais ampla distribuição de aumento de “c-Fos-IR” no corno dorsal da medula em ratos idosos (cento e trinta semanas de idade). O último achado pode sugerir uma maior duração da hiperalgesia mecânica em animais idosos.

#### PAPEL DOS NOCICEPTORES IB4(+) EM MODELOS DE DOR MUSCULAR AGUDA E CRÔNICA EM RATOS

Segundo Alvarez *et al.*, 2012, subconjuntos distintos dos nociceptores não estão apenas ligados a diferentes vias anatômicas mas também possuem propriedades funcionais distintas (BRAZ *et al.*, 2005; JOSEPH & LEVINE, 2010; ZYLKA *et al.*, 2005, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012). O subconjunto principal dos nociceptores são aqueles que ligam a lectina a isolectina B4 (IB4) (MOLLIVER *et al.*, 1997, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012). Nociceptores IB4-positivo (IB4(+)) ligam neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) de pequeno para médio diâmetro que se projetam principalmente para a parte média/interna da lâmina II do corno dorsal (SNIDER & MCMAHON, 1998; ZYLKA *et al.*, 2005, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012). Em contraste, os nociceptores IB4(–) se projetam a lâmina I e lâmina externa II (SNIDER & MCMAHON, 1998 *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012). Em seus terminais periféricos na pele, os nociceptores IB4(+) terminam mais superficialmente no “estrato granuloso” (*stratum granulosum*), enquanto os nociceptores IB4(–) encerram-se mais profundamente na “camada espinhosa” (*spinosum dstratum*) (ZYLKA *et al.* 2005 *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012).

Além disso, a maioria dos nociceptores IB4(+) também expressam a enzima resistente a fosfatase ácida (FRAP, também chamada de “*tiamina monophosphatase*”, TMP), que tem sido mostrada recentemente para corresponder a fosfatase ácida prostática (BRADBURY *et al.*, 1998; MOLANDER *et al.*, 1987; TAYLOR-BLAKE & ZYLKA, 2010, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012) e o “*purinoceptor*” P2X3 (BRADBURY *et al.*, 1998; SNIDER & MCMAHON, 1998, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012).

Os neurónios do gânglio da raiz dorsal IB4(+) representam entre 5% a 40% de fibras aferentes musculares (AMBALAVANAR *et al.*, 2003; PIERCE *et al.*, 2006, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012) e outros marcadores deste subconjunto de neurónios sensoriais, tais como TMP (MOLANDER *et al.*, 1987; O'BRIEN *et al.*, 1989, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012) e receptores P2X3 (SHIN *et al.*, 2008, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012) são expressos em aproximadamente 15% dos neurónios do gânglio da raiz dorsal.

A maioria dos estudos indicam uma porcentagem muito maior de nociceptores IB4(+) na pele (AMBALAVANAR *et al.*, 2003; MOLANDER *et al.*, 1987; O'BRIEN *et al.*, 1989; PIERCE *et al.*, 2006; PLENDERLEITHI & SNOW, 1993, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012) o que levanta a possibilidade de que são menos importantes em síndromes de dor muscular.

No presente estudo, foi avaliado o papel dos nociceptores IB4(+) em modelos de dor muscular aguda e crônica em ratos. Para isso, foi administrado isolectina B4 conjugados com a neurotoxina saporina (IB4-saporina) em ratos para destruir seletivamente nociceptores IB4(+) (BOGEN *et al.*, 2008; JOSEPH *et al.*, 2008; NISHIGUCHI *et al.*, 2004; TARPLEY *et al.*, 2004; VULCHANOVA *et al.*, 2001, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012). Em seguida os animais foram submetidos à inflamação ou intervenções ergonômicas que produzem dores musculares agudas e crônicas.

Foram utilizados três métodos para a indução da hiperalgesia mecânica: o protocolo de exercício excêntrico proposto por Taguchi *et al.*, (2005); o método de vibração proposto por Dina *et al.*, (2010); e a injeção de carragenina no ventre do músculo gastrocnêmio. A IB4-saporina foi administrada por via “*intratecal*” 10 dias antes do experimento. O grupo controle consistia em injeção “*intratecal*” de solução salina. O limiar nociceptivo mecânico no músculo gastrocnêmio foi quantificada utilizando um transdutor de força digital *Chatillon*

O modelo de hiperalgesia induzida por injeção de carragenina no músculo leva a um processo inflamatório auto-limitado, que está relacionado com diversas lesões incluindo trauma muscular (DINA *et al.*, 2008, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012). Em estudos anteriores foi mostrado que este modelo resulta em um estado de hiperalgesia-crônica latente, sugerindo que pode ajudar a revelar os processos celulares pelos quais a inflamação muscular

aguda se transforma em dor muscular crônica (DINA *et al.*, 2008, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012).

O modelo de hiperalgesia muscular induzida pelo exercício excêntrico usado neste estudo é susceptível de reproduzir a dor muscular observada após uma série de exercícios desabituaados. Como a maioria dos episódios de dor muscular induzida pelo exercício excêntrico resolve-se entre quatro a cinco dias sem qualquer intervenção médica/farmacológica, geralmente não representam um problema clínico sério. No entanto, estudos anteriores indicam que esse processo pode induzir a um estado de hiperalgesia latente crônica, também sugerindo mecanismos celulares subjacentes induzidos pelo exercício ou trabalho relacionados com síndromes de dor músculo-esquelética crônica (ALVAREZ *et al.*, 2010 DINA *et al.*, 2008, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012).

O modelo de hiperalgesia muscular induzida pela exposição da vibração tende a reproduzir a dor muscular observada após exposição ocupacional à vibração. Está bem estabelecido que a exposição ocupacional a vibrações é uma importante causa de dor músculo-esquelética crônica e aguda. Usando este modelo, os autores identificaram um papel para receptores de citocinas pró-inflamatórias e segundo mensageiros em nociceptores implicados na indução e manutenção da dor crônica muscular em ratos (DINA *et al.*, 2010, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012).

A destruição seletiva dos nociceptores IB4(+) não afetou significativamente o limiar mecânico nociceptivo no músculo gastrocnêmio em ratos. Desde que nociceptores IB4(+) e IB4(-) respondem a estímulos mecânicos (FERRARI *et al.*, 2010; JOSEPH & LEVINE, 2010, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012) a falta de efeito sobre limiar mecânico nociceptivo parece refletir uma redundância adequada tal que qualquer população dos nociceptores adequadamente pode detectar um estímulo nocivo.

Os resultados estão em concordância com estudos anteriores que demonstraram que a destruição de nociceptores IB4 (+) produz pouca ou nenhuma mudança nos limiares nociceptivos térmicos e mecânicos no limiar basal na pele (TARPLEY *et al.*, 2004; JOSEPH *et al.*, 2008, DINA *et al.*, 2008, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012).

A IB4-saporina, no entanto, atenua tanto a duração da hiperalgesia mecânica aguda induzida por intervenções inflamatórias e ergonômicas, como na magnitude da hiperalgesia mecânica induzida pelas intervenções ergonômicas especialmente a induzida por vibração. A IB4-saporina também eliminou o prolongamento da duração de PGE2 hiperalgesia após a recuperação da hiperalgesia aguda induzida por inflamação e intervenções ergonômicas

A hiperalgesia mecânica aguda no músculo gastrocnêmio induzida por intervenções ergonômicas e inflamatórias são modelos das condições de dor que induzem diferentes graus de lesão muscular (ARMSTRONG *et al.*, 1991; DINA *et al.*, 2008; NECKING *et al.*, 2004, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012). Estes resultados fornecem evidências diretas do envolvimento de nociceptores IB4(+) em ambas as síndromes de dor muscular, as agudas e crônicas em ratos, especialmente aqueles associados com lesões ergonômicas (DINA *et al.*, 2008; CARÍCIAS *et al.*, 2004, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012).

O curso de tempo reduzido de hiperalgesia muscular e a inibição da “*priming*” hiperalgesia observada nos animais tratados com IB4-saporina em todos os modelos de dor muscular usados neste estudo sugerem que, independentemente do tipo de lesão muscular, os nociceptores IB4(+) desempenham um papel nas respostas nociceptivas duradouras, uma marca registrada de dor muscular observada na prática clínica.

Enquanto o papel de neurónios IB4 (+) na nocicepção no músculo esquelético tem sido questionada (AMBALAVANAR *et al.*, 2003, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012), esses resultados implicam que eles atuam não apenas em hiperalgesia muscular aguda, mas também tem papel importante na “*priming*” hiperalgesia, um fenómeno que sugere contribuir para a transição da dor aguda para a dor crônica (REICHLING & LEVINE, 2009, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo fornecem suporte para o papel de nociceptores IB4 (+) a diversas formas de dor aguda e para os mecanismos subjacentes à transição da dor aguda para a dor muscular crônica. Estes dados podem conduzir a novas abordagens para a prevenção e tratamento da dor crônica.

## DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA POR VIBRAÇÃO

De acordo com Dina *et al.*, (2010), pouco se sabe sobre os mecanismos celulares subjacentes das síndromes de dor muscular relacionadas ao trabalho e é provável, pelo menos em parte, devido a inflamação, que sensibiliza o alto limiar dos aferentes musculares mecânicos.

O envolvimento de citocinas na inflamação muscular e subsequente dor crônica foi inferida a partir de estudos que mostram que no modelo de dor induzida pelo movimento repetitivo do músculo em ratos, os níveis de citocinas pró -inflamatórias são aumentados no nervo mediano do membro exercitado. Citocinas Pronociceptivas (*Pronociceptive cytokine*) tem sua concentração aumentada no músculo após inflamação ou lesão, por exemplo, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) é aumentado no músculo de pacientes com dor miofascial ativa após o exercício excêntrico.

Recentemente, foi estabelecido um modelo experimental para causar a “*priming*” hiperalgesia mecânica crônica no músculo induzida pela administração intramuscular de carragenina. Após a recuperação basal do limiar nociceptivo, a hiperalgesia produzida pela administração posterior de um mediador inflamatório, a prostaglandina E2 (PGE2), foi marcadamente prolongada. Este melhoramento – crônico e latente de hiperalgesia parece ser dependente, pelo menos em parte, da proteína quinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ), um segundo mensageiro que tem sido implicado em desempenhar um papel crítico na plasticidade de longa duração na função do nociceptor.

Para entender melhor os mecanismos de dor crônica subjacente ao trabalho ergonômico, foi desenvolvido um modelo de dor muscular relacionada com o trabalho produzido pela vibração, que dá origem a hiperalgesia muscular após exposição subsequente a citocinas pró-inflamatórias ou re-exposição à vibração. Este permitiu avaliar a contribuição da citocina inflamatória “*pronociceptive*”, TNF $\alpha$ , que pode ser aumentada em músculos doloridos, caracterizando a hiperalgesia muscular crônica.

O estudo adotou o seguinte protocolo experimental: os membros posteriores dos ratos foram “vibrados” com a *Digital Vortex Genie II*, um

misturador vórtice, que possui um motor de velocidade. Os ratos foram anestesiados e uma perna fixada à plataforma por fita cirúrgica de modo que os ângulos de joelho e tornozelo fossem ambos de aproximadamente 90°, sem torque rotacional na perna. A perna foi vibrada a uma frequência de 60-80 Hz, com 5 mm de pico-a-pico de deslocamento de amplitude. Estas frequências de vibração estão dentro da faixa que a produzida por ferramentas elétricas portáteis (35 - 150 Hz)

Limiars de hiperalgesia mecânicas foram quantificadas utilizando um transdutor de força digitais *Chatillon* que possui as seguintes características e protocolo: os ratos foram contidos em um suporte de acrílico que permitiu acesso fácil para o membro posterior e uma sonda de 6 mm de diâmetro ligada ao transdutor foi aplicada ao músculo gastrocnêmio para proporcionar uma força de compressão crescente. O limiar nociceptivo foi definido como a força, em newtons, em que o rato retirou sua perna. Limiar de retirada da linha de base foi definido como a média de duas leituras feitas a cinco minutos de intervalo.

Doze grupos de animais foram usados para medir mudanças no limiar nociceptivo. Dois grupos foram expostos a diferentes durações de vibração, quinze minutos ou sessenta minutos. Um grupo foi exposto a duas sessões de vibração de quinze minutos. Outro grupo recebeu injeção de PGE2 após exposição prévia a vibração de quinze minutos. Dois grupos receberam injeção de “*oligodesoxinucleótido intratecal*” ODN ou “*antisense*” incompatibilidade de PKC $\epsilon$  antes da vibração de quinze minutos e dois grupos de injeção ODN ou “*antisense*” incompatibilidade de receptor de TNF $\alpha$  seguido por quinze minutos de vibração ou por TNF $\alpha$  intramuscular. Um grupo recebeu ODN PKC $\epsilon$  três dias antes e três dias depois da vibração, e uma semana mais tarde PGE2 foi administrada por via intramuscular para testar a presença de “*priming*”. Os dois últimos grupos receberam injeção intramuscular de TNF $\alpha$  ou veículo e após a recuperação aos limiars nociceptivos normais, foram expostos a vibrações de 15 minutos.

Este estudo mostrou que a vibração dos membros posteriores ou a vibração após a injeção de mediador inflamatório induziu a “*priming*” hiperalgesia.

A vibração muscular produziu tanto hiperalgesia mecânica aguda quanto um realce notavelmente duradouro de um episódio subsequente de hiperalgesia mecânica crônica no músculo. O tratamento ODN PKCε “*antisense*” impediu a hiperalgesia muscular crônica latente produzido pela vibração do membro posterior implicando este segundo mensageiro no desenvolvimento de hiperalgesia muscular crônica.

Observou-se também que a hiperalgesia muscular primária é evitada com o tratamento anti-ODN para 'derrubar' receptores do tipo-1 para TNFα na inervação nociceptora aferente primária no músculo e que a administração de TNFα produz “*priming*” hiperalgesia, mostrado pelo aumento hiperalgesia induzida por vibração.

Outros estudos têm sugerido uma associação entre os níveis de dor e de citocinas no músculo. Em particular, o TNFα tem sido fortemente implicado na patofisiologia da dor muscular, uma sugestão suportada pela descoberta de que a injeção intramuscular de TNFα produz hiperalgesia mecânica primária. O estudo também forneceu evidências de que a “*priming*” hiperalgesia induzida pela vibração muscular é dependente PKCε, similar aos achados anteriores que indicam um papel fundamental para PKCε em “*priming*” hiperalgesia cutânea induzida por TNFα e de hiperalgesia muscular induzida por carragenina.

Clinicamente, bem como economicamente, um dos aspectos mais importantes de síndromes músculo-esqueléticas relacionadas com o trabalho é a dor debilitante crônica. Foi colocada a hipótese de que este processo envolve mecanismos celulares do nociceptor aferente primário diferente daqueles de dor inflamatória aguda, e que após a resolução de um evento inflamatório agudo transiente, um estado duradouro de melhor capacidade de resposta aos estímulos hiperalgésicos subsequentes pode ser produzido. É importante ressaltar que este hiperalgesia muscular crônica latente é significativamente prolongada em comparação com a hiperalgesia inflamatória cutânea, o que sugere que este mecanismo tem um papel ainda mais importante em síndromes de dor muscular crônica. Digno de nota, a dor músculo-esquelética crônica é visto em uma série de distúrbios clínicos e é clinicamente mais importante do que a dor cutânea crônica.

O estudo descreve modelo com importância clínica uma vez que acompanha a transição da dor aguda para a dor crônica muscular, e tem o potencial de revelar os processos celulares pelos quais a inflamação aguda ou trauma muscular podem criar um estado de uma maior susceptibilidade a mediadores inflamatórios ou subsequente estimulação mecânica. Estes resultados, que começam a esclarecer os mecanismos subjacentes a uma síndrome de dor muscular crônica, têm o potencial de fornecer as informações necessárias para o desenvolvimento de estratégias para a prevenção e tratamento da dor musculoesquelética crônica.

#### CONTRIBUIÇÃO PKC $\epsilon$ , FATOR DE NECROSE TUMORAL A (TNF $\alpha$ ) E INTERLEUCINA 6 (IL-6) NA DMIT

A dor muscular pode resultar de atividade repetitiva ou excêntrica e pode persistir por dias (DMIT, por exemplo) ou semanas (por exemplo, mialgias crônicas relacionadas ao trabalho), após a exposição a estas atividades (ALUND *et al.*, 1992, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010). Enquanto os mecanismos celulares subjacentes nestas síndromes de dor não são bem compreendidos, citocinas inflamatórias, que sensibilizam o alto limiar dos mecanoreceptores musculares (DIEHL *et al.*, 1993, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010) são susceptíveis de estarem envolvidas (BARR BARBE, 2002; STAUBER, 2004; SLUKA *et al.*, 2007, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010). Por exemplo, após o exercício excêntrico em humanos (HAMADA *et al.*, 2005, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010) e em um modelo de dor muscular induzida por movimento repetitivo em ratos (BORGES *et al.*, 2003, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010), os níveis de citocinas inflamatórias mostraram-se aumentadas no membro exercitado (AL-SHATTI *et al.*, 2005, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010).

Além disso, foi observado que a administração intramuscular de carragenina (substância pró-inflamatória) induz hiperalgesia mecânica no músculo (DINA *et al.*, 2008, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010). A hiperalgesia produzida pela administração subsequente de um mediador inflamatório, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), reforçou a hiperalgesia e a recuperação ao limiar nociceptivo basal foi marcadamente prolongada. A PGE<sub>2</sub> é uma citocina pró-

inflamatória utilizado para caracterizar “*priming*” hiperalgesia na pele de ratos (JOSÉ *et al.*, 2003; PARADA *et al.*, 2003b, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010).

Para entender melhor os mecanismos subjacentes a dor associada com a atividade extenuante, o estudo de Alvarez *et al.*, (2010) utilizou o modelo de indução de dor muscular por exercício excêntrico em ratos (TAGUCHI *et al.*, 2005). Também foi avaliada a contribuição de PKC $\epsilon$  e duas citocinas inflamatórias que foram implicados na hiperalgesia muscular, e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (SCHAFERS *et al.*, 2003; BEYREUTHER *et al.*, 2007; DINA *et al.*, 2009, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010) e interleucina 6 (IL-6) (GERDLE *et al.*, 2007; DINA *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2008, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010)

O protocolo de exercício utilizado foi o mesmo desenvolvido por Taguchi *et al.*, (2005) e para a medição do limiar de hiperalgesia foi utilizado um transdutor de forças digitais *Chatillon* que utiliza basicamente o mesmo protocolo e critério de medição do aparelho de *Randall-Selitto*.

A injeção intramuscular de PGE2 ou solução de “veículo” foi realizada com os ratos anestesiados, e injetada no ventre do músculo gastrocnêmio. Para atenuar a expressão de PKC $\epsilon$ , do receptor tipo-1 de TNF $\alpha$  e determinar a contribuição de IL6 foram utilizadas três diferentes administrações de “*antisense oligodeoxynucleotide*” (ODN). Antes de injeções de ODN foi administrada em três ou seis dias consecutivos. Os animais controle receberam injeções de incompatibilidade de ODN.

O estudo encontrou os seguintes resultados: o exercício excêntrico produziu uma diminuição no limiar nociceptivo mecânico (hiperalgesia muscular) no músculo gastrocnêmio ipsilateral que foi estatisticamente significativo na primeira medição, seis horas após e atingiu o seu máximo (diminuição de aproximadamente 36% no limiar nociceptivo) de vinte a quarenta e oito horas pós-exercício. A hiperalgesia ainda estava presente noventa e seis horas pós-exercício (diminuição de aproximadamente 20% no limiar nociceptivo), retornando ao limiar basal após cento e vinte horas.

Para determinar se o exercício excêntrico induz “*priming*” hiperalgesia, um membro posterior de cada rato foi exercitado. Após a recuperação do limiar

nociceptivo (cinco dias mais tarde), a citocina PGE2 foi injetada no músculo gastrocnêmio da perna excentricamente exercitada. A PGE2 induziu hiperalgesia com um início rápido, que ainda estava presente, não sendo atenuada, duzentos e quarenta horas após a administração. No membro posterior não exercitado produziu uma diminuição no limiar nociceptivo que retornou ao normal após três horas, que foi significativamente menor do que a duração da hiperalgesia na perna exercitada.

“*Antisense*” ODN ou a incompatibilidade PKC $\epsilon$  foi administrada uma vez por dia durante três dias antes e três dias após o protocolo de exercício excêntrico. Nos membros excentricamente exercitados, a hiperalgesia foi significativamente maior no grupo tratado por incompatibilidade em comparação com ratos tratados com “*antisense*”. No membro posterior não exercitado contralateral, a injeção intramuscular de PGE2 produziu uma curta hiperalgesia com duração menor que quatro horas, semelhante ao que tem sido observado em ratos não exercitados (DINA *et al.*, 2008, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010). Na perna exercitada excentricamente, no entanto, a hiperalgesia induzida por PGE 2 ainda estava presente após duzentos e quarenta horas, o que foi considerado significativo

A hiperalgesia primária causada por exercício (PARADA *et al.*, 2003a, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010) foi prevenida pela administração de ODN “*antisense*” comparado com PKC $\epsilon$ , até cento e vinte horas após a PGE2. No entanto, cento e sessenta e oito, e duzentos e quarenta horas após a PGE2 houve uma hiperalgesia significativamente maior na pata exercitada, provavelmente devido à síntese “*de novo*” PKC $\epsilon$  em todos momentos posteriores. Como a administração “*antisense*” suprime apenas temporariamente a função de PKC $\epsilon$ , sua concentração se recupera em dias, após cessar a administração “*antisense*” (PARADA *et al.*, 2003a, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010)

Foi mostrado que o exercício excêntrico na pata traseira do rato produz tanto hiperalgesia mecânica aguda tanto quanto uma manutenção de uma hiperalgesia induzida por mediadores inflamatórios subsequentes (“*priming*” hiperalgesia) (JOSEPH *et al.*, 2003 *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010)

O pré-tratamento com “*antisense*” PKC $\epsilon$  atenuou a hiperalgesia mecânica aguda induzida por exercício excêntrico bem como o prolongamento da hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub>, mostrando que este segundo mensageiro está envolvido no desenvolvimento de hiperalgesia induzida por exercício excêntrico e “*priming*” hiperalgesia. Estudos anteriores mostraram que PKC $\epsilon$  também estava envolvido no desenvolvimento de “*priming*” hiperalgesia na pele induzida por carragenina ou TNF $\alpha$  (PARADA *et al.*, 2003a; PARADA *et al.*, 2003b, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010).

Outro resultado do presente estudo mostra que a IL-6 está envolvida na hiperalgesia aguda e crônica induzida por exercício muscular, o que vai de acordo com estudos anteriores, que demonstraram a maior concentração da expressão de proteína e do gene de IL-6 no músculo esquelético após exercício excêntrico (TOMIYA *et al.*, 2004; PEDERSEN FEBBRAIO, 2008; BETTS *et al.*, 2009; BUFORD *et al.*, 2009; PEDERSEN, 2009, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010).

Em contraste com o papel da IL-6, o tratamento “*antisense*” ODN para diminuir a expressão do receptor do tipo 1 de TNF $\alpha$  no nociceptor aferente primário, que inerva o músculo gastrocnêmio, não teve efeito sobre a magnitude de hiperalgesia induzida pelo exercício excêntrico e não afetou o desenvolvimento da “*priming*” hiperalgesia.

Isto também contrasta com a observação de um estudo anterior em que a administração intramuscular de TNF $\alpha$  induziu a hiperalgesia no músculo gastrocnêmio e o tratamento “*antisense*” de ODN no receptor tipo 1 de TNF $\alpha$  inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica no músculo. Também contrasta com a constatação de que a indução da “*priming*” hiperalgesia, em outro modelo de dor muscular ergonômica (exposição à vibração do membro posterior) foi impedida pela injeção de “*antisense*” do receptor tipo 1 de TNF $\alpha$  (DINA *et al.*, 2009, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010). Estas diferenças podem estar relacionadas à vibração, produzindo uma maior liberação de TNF $\alpha$  em relação ao exercício excêntrico.

Enquanto TNF $\alpha$  tem sido implicado em várias síndromes de dor crônicas musculares (SCHAFERS *et al.*, 2003; HOHEISEL *et al.*, 2005; ROSENDAL *et al.*, 2005b; SHAH *et al.*, 2005, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010), a literatura

descreve que o efeito do exercício excêntrico sobre concentrações de TNF $\alpha$  no músculo é contraditória. Pesquisas mostram que o aumento (HAMADA *et al.*, 2005; ROSA NETO *et al.*, 2009; LIAO *et al.*, 2010, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010) ou nenhuma mudança (BUFORD *et al.*, 2009; CROFT *et al.*, 2009, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010) na concentração de TNF $\alpha$  no músculo e no plasma não atenua dores musculares induzidas por exercício (RICE *et al.*, 2008, *apud* ALVAREZ *et al.*, 2010).

Em conclusão, observou-se que o exercício excêntrico pode produzir IL-6 que medeia a hiperalgesia muscular aguda e “*priming*” hiperalgesia. Este efeito é mediado pelos receptores no nociceptor aferente primário e é dependente de uma via de sinalização PKC $\epsilon$ .

Este estudo não excluiu a possibilidade de que os neurônios da coluna vertebral ou glia também estão envolvidos. Ao contrário da dor muscular relacionada à exposição a vibrações, TNF $\alpha$  não parece desempenhar um papel na hiperalgesia ou “*priming*” de hiperalgesia em exercício excêntrico extenuante. Estes resultados fornecem uma visão mais aprofundada dos mecanismos subjacentes da dor muscular crônica induzida pelo exercício, o que pode levar a novas abordagens para a prevenção e tratamento de exercício específico ou síndromes de dor músculo-esqueléticas crônicas relacionadas com o trabalho.

## DISCUSSÃO

O estudo de Taguchi *et al.*, (2005) mostrou a existência da hiperalgesia mecânica muscular em ratos após contrações excêntricas (CE), medindo-se o limiar nociceptivo mecânico (hiperalgesia mecânica) do músculo e mostrando a expressão aumentada de “c-Fos” no corno superficial dorsal da medula espinhal, onde informações nocivas são transmitidas para os neurônios de segunda ordem. Em ratos idosos (cento e trinta semanas de idade), a expressão aumentada de “c- Fos” teve distribuição ainda mais ampla se comparada a ratos jovens, sugerindo uma maior duração da hiperalgesia mecânica em animais idosos (TAGUCHI *et al.*, 2007).

Originalmente, mecanismos mais amplamente suportados para se causar DMIT eram o dano e inflamação no músculo, nos tecidos conjuntivos, e ou fáscia induzida por contração excêntrica (SMITH, 1991, *apud* TRICOLI, 2001, FUJI *et al.*, 2008, KUBO *et al.*, 2012), entretanto o estudo de Fuji *et al.*, (2008) não encontrou infiltração de células inflamatórias no músculo gastrocnêmio dos animais submetidos a exercício excêntrico. Achados esses corroborados pelo estudo de Kubo *et al.*, (2012) que também não encontrou nenhuma lesão das fibras musculares ao nível microscópico, nem extravasamento de células inflamatórias para o músculo exercitado. Por outro lado o estudo de Fuji *et al.* (2008), mostrou íntima relação entre os canais iônicos TRP e ASICs e o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica no músculo gastrocnêmio.

No estudo de Murase *et al.*, (2010) foi demonstrado que a bradicinina liberada durante o exercício desempenha um papel essencial, através de receptores B<sup>2</sup>, na hiperalgesia mecânica muscular após o exercício (DMIT), entretanto não é ela a substância que mantém a hiperalgesia mecânica, o que significa que a bradicinina não é responsável pelo o aumento da sensibilidade mecânica de receptores da fibra C após o exercício excêntrico, e já existe um certo consenso na literatura de que a dor muscular, em condições normais, é transmitida por fibras aferentes finas do tipo C, achados corroborados pelo estudo de Kubo *et al.* (2012).

O estudo de Alvarez *et al.* (2012) mostrou que os nociceptores IB4 (+) atuam não apenas em hiperalgesia muscular aguda, mas também tem papel importante na “*priming*” hiperalgesia, um fenômeno que sugere contribuir para a transição da dor aguda para a dor crônica. Os resultados do presente estudo fornecem suporte para o papel de nociceptores IB4 (+) a diversas formas de dor aguda e para os mecanismos subjacentes à transição da dor aguda para a dor muscular crônica. Estes dados podem conduzir a novas abordagens para a prevenção e tratamento da dor crônica.

O estudo de Dina *et al.*, (2010) descreve um modelo inovador para o estudo hiperalgesia mecânica crônica no músculo esquelético produzido pela exposição à vibração, e o papel da PKC $\epsilon$  e TNF $\alpha$  no desenvolvimento de hiperalgesia muscular crônica, em contraste aos resultados desse estudo

Alvarez *et al.*, (2010), utilizando o protocolo de Taguchi *et al.*, (2005), encontrou resultados semelhantes do papel de PKC $\epsilon$ , mostrando que este segundo mensageiro está envolvido no desenvolvimento de hiperalgesia induzida por exercício excêntrico e “*priming*” hiperalgesia, mas que TNF $\alpha$  não teve efeito sobre a magnitude de hiperalgesia induzida pelo exercício excêntrico e não afetou o desenvolvimento da “*priming*” hiperalgesia. Estas diferenças podem estar relacionadas à vibração, produzindo uma maior liberação de TNF $\alpha$  em relação ao exercício excêntrico.

Estes resultados, que começam a esclarecer os mecanismos subjacentes a uma síndrome de dor muscular crônica, têm o potencial de fornecer as informações necessárias para o desenvolvimento de estratégias para a prevenção e tratamento da dor musculoesquelética crônica.

O estudo de Urai *et al.*, (2013) mostrou que a hiperalgesia mecânica não ocorreu após a segunda sessão de exercícios excêntrico (CE), ou seja, houve adaptação na hiperalgesia mecânica. O presente estudo também mostrou que a “*upregulation*” do RNAm de NGF, que foi mostrado anteriormente por ser um dos agentes causadores da hiperalgesia mecânica após o CE (MURASE *et al.*, 2010), não ocorreu na segunda sessão de CE. Este resultado é mais uma prova de uma relação causal entre “*upregulation*” de NGF e hiperalgesia mecânica após o exercício (MURASE *et al.*, 2010).

Os autores concluíram que a adaptação na hiperalgesia mecânica após o exercício ocorre antes da produção da bradicinina. As presentes observações podem ser um passo útil para desmascarar um novo mecanismo de dor muscular tardia e sua adaptação. Os mecanismos de DMIT e a sua adaptação relatados no presente estudo podem funcionar também em seres humanos, já que uma parte desse mecanismo já foi demonstrada, como o efeito hiperalgésico da injeção intramuscular de NGF (ANDERSEN *et al.*, 2008, *apud* URAI *et al.*, 2013).

Para confirmar se estes mecanismos também se aplicam aos seres humanos, novos experimentos devem ser conduzidos. Se comprovados em seres humanos, esse conhecimento pode ajudar a desenvolver métodos (incluindo medicamentos ou suplementos) para o exercício sem dor muscular tardia.

## CONCLUSÕES

O modelo de indução de dor muscular tardia em ratos desenvolvido por Taguchi *et al.*, (2005), mostrou-se uma ferramenta útil e confiável para estudos relacionados aos mecanismos envolvidos na origem e manutenção da DMIT provocados por contração excêntrica e para estudos sobre hiperalgesia mecânica em geral.

Os mecanismos periféricos e centrais envolvidos na DMIT ainda são pouco esclarecidos, não há consenso na literatura sobre quais ou qual mecanismo é responsável pelo seu desenvolvimento e manutenção. Apesar dos avanços nas pesquisas com ratos, novos experimentos devem ser conduzidos para se confirmar se estes mecanismos também se aplicam aos seres humanos.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, P., GEAR, R. W. , GREEN,P. G., LEVINE, J. D. **Eccentric exercise induces chronic alterations in musculoskeletal nociception in the rat.** Eur J Neurosci., .32(5): 819–825, 2010
- ALVAREZ, P., GEAR, R.W., GREEN, P.G., LEVINE, J.D. **IB4-saporin attenuates acute and eliminates chronic muscle pain in the rat.** Exp. Neurol. 233, 859-865, 2012
- APPEL, H.J., SOARES,J.M.C. e DUARTE,J.A.R. **Exercise, muscle damage and fatigue.** Sports Medicine. 13, 108-115, 1992
- ARMSTRONG, R. B. **Mecanismos of exercise- induced delayed onset muscular soreness.** Medicine & Science in Sport & Exercise, v. 16, n. 6, p. 529 - 538, 1984.
- BROWER, V. **New paths to pain relief.** *Nature Biotechnology* 18, 387 – 391, 2000
- COSTIGAN, M., SCHOLZ, J., WOOLF, C. J. **Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage.** *Annu Rev Neurosci.*, 32, 1–32, 2009
- DINA, O.A., JOSEPH, E.K., LEVINE, J.D., GREEN, P.G. **Mechanisms mediating vibration induced chronic musculoskeletal pain analyzed in the rat.** J. Pain 11, 369–377. 2010
- FOSCHINI, D., PRESTES, J., CHARRO, M. A. **Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio.** Revista Brasileira Cineantropom. vol.9, n.1, p. 101-106, 2007.
- FUJI, Y., OZAKI, N., TAGUCHI T., MIZUMURA, K., FURUKAWA, K., SUGIURA, Y. **TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness.** Pain 140, 292–304, 2008
- KUBO, A., KOYAMA, M., TAMURA, R., TAKAGISHI, Y., MURASE, S., MIZUMURA, K. **Absence of mechanical hyperalgesia after exercise**

**(delayed onset muscle soreness) in neonatally capsaicin-treated rats.**

Neuroscience Research 73, 56–60, 2012

MURASE, S., TERAZAWA, E., QUEME, F., OTA, H., MATSUDA, T., HIRATE, K., KOZAKI, Y., KATANOSAKA, K., TAGUCHI, URAI, H., MIZUMURA, K.

**Bradykinin and Nerve Growth Factor Play Pivotal Roles in Muscular Mechanical Hyperalgesia after Exercise (Delayed-Onset Muscle Soreness).**

The Journal of Neuroscience, 30(10), 3752–3761, 2010

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M, MOORE, P.K – **Farmacologia.**

Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, 2003

TAGUCHI, T., MATSUDA, T., TAMURA, R., SATO, J., MIZUMURA, K.

**Muscular mechanical hyperalgesia revealed by behavioural pain test and c-Fos expression in the spinal dorsal horn after eccentric contraction in rats.**

J. Physiol. 564, 259–268, 2005

TAGUCHI, T., MATSUDA, MIZUMURA, K. **Change with age in muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contraction in rats.**

Neuroscience Research 57, 331–338, 2007

TEAGUE, B.N., SCHWANE, J.A. **Effect of intermittent eccentric contractions on symptoms of muscle microinjury.** Medicine and Science in Sports and Exercise. 27, 1378-1384, 1995

TRICOLI, V. **Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia.**

Rev. Bras. Cien. e Mov., v. 9, n. 2, p.39-44, 2001

URAI, H., MURASE, S., MIZUMURA, K. **Decreased nerve growth factor upregulation is a mechanism for reduced mechanical hyperalgesia after the second bout of exercise in rats.**

Scand J Med Sci Sports, 23: e96–e101  
doi: 10.1111/sms.12013, 2013