

DIOGO FRANCISCO DA SILVA DOS SANTOS

**“DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MODELO DE
HIPERALGESIA MUSCULAR INDUZIDA POR CONTRAÇÃO
ISOMÉTRICA SUSTENTADA EM RATOS”**

**LIMEIRA
2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

DIOGO FRANCISCO DA SILVA DOS SANTOS

**“DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MODELO DE
HIPERALGESIA MUSCULAR INDUZIDA POR CONTRAÇÃO
ISOMÉTRICA SUSTENTADA EM RATOS”**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Aplicadas
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Nutrição e do
Esporte e Metabolismo, na área de
Biodinâmica do Movimento Humano
e Esporte.

Orientadora: Profa. Dra Maria Claudia Gonçalves de Oliveira Fusaro



Assinatura

LIMEIRA
2014

Ficha catalográfica
 Universidade Estadual de Campinas
 Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
 Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

Sa59d Santos, Diogo Francisco da Silva dos, 1988-
 Desenvolvimento de um novo modelo de hiperalgesia muscular induzida por
 contração isométrica sustentada em ratos / Diogo Francisco da Silva dos Santos.
 – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Claudia Gonçalves de Oliveira Fusaro.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
 Ciências Aplicadas.

1. Contração isométrica. 2. Hiperalgesia. 3. Estimulação elétrica. I. Oliveira-
 Fusaro, Maria Claudia Gonçalves de. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of a new model for study of muscle hyperalgesia in rats

Palavras-chave em inglês:

Isometric contraction

Hyperalgesia

Electrical stimulation

Área de concentração: Biodinâmica do Movimento Humano e Esporte

Titulação: Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Maria Claudia Gonçalves de Oliveira Fusaro [Orientador]

Juliana Trindade Clemente Napimoga

Dionéia Araldi

Data de defesa: 27-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autor(a): Diogo Francisco da Silva dos Santos

Título: Desenvolvimento de um novo modelo de hiperalgesia muscular induzida por contração isométrica sustentada em ratos

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) - UNICAMP

Data da Qualificação: Limeira, 27/02/2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Claudia Gonçalves de Oliveira Fusaro
(Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga



Assinatura

Profa. Dra. Dionéia Araldi



Assinatura

RESUMO

De todas as dores que acometem o ser humano ao longo da sua existência, a dor muscular, especialmente a induzida por contração isométrica sustentada, é uma das mais prevalentes e possui um importante impacto sócio-econômico. Entretanto, apesar da sua relevância clínica, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da dor muscular induzida pela contração isométrica sustentada são pouco conhecidos. Isto se deve, principalmente, à ausência de um modelo experimental mais realístico e com bom grau de predição do controle farmacológico desta dor. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo modelo de hiperalgesia muscular induzido por contração isométrica sustentada em ratos. A contração isométrica sustentada foi realizada por estimulações elétricas aplicadas diretamente no ventre do músculo gastrocnêmio de ratos wistar e os parâmetros foram de 19 milissegundos de duração de pulso, frequência em 50 Hertz, intensidade de 1,6 Volts (V) por um período de 1 hora. A hiperalgesia muscular mecânica foi avaliada com o método Randall Selitto nos tempos de meia hora até 48 horas após o término da contração isométrica sustentada. A contração isométrica sustentada, obedecendo o parâmetros supracitados, induziu hiperalgesia muscular mecânica por 1 hora, regredindo com valores próximos ao basal 2 horas após o término da contração. As respostas com 1,6V por 1 hora, foram significativamente maiores do que as induzidas por estimulações de 1,6V por 15 e 30 minutos; 0,5 e 1,0V por 1h ou sham. Demonstramos ainda que a hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada foi bloqueada pela dexametasona, evidenciando o caráter

inflamatório desse novo modelo, respaldado pela presença de células inflamatórias no tecido muscular, confirmadas pela análise histológica. Juntos, estes dados sugerem que esse novo modelo de hiperalgesia muscular se aproxima de uma condição mais próxima da real encontrada nas dores musculares decorrentes das atividades diárias, além de possuir um grande potencial científico para os estudos dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor muscular relacionada à contração isométrica sustentada.

Palavras-chaves: contração isométrica; hiperalgesia; estimulação elétrica

ABSTRACT

Among the types of pain that affect people throughout their lives, muscle pain, specially the one induced by sustained isometric contraction, is one of the most prevalent and has an important socio-economic impact. However, despite their clinical relevance, the molecular mechanisms involved in the development of muscle pain induced by sustained isometric contraction are unknown. This is mainly due to the absence of a more realistic experimental model that has a good degree of prediction of pharmacological control of pain. Therefore, the aim of this study was to develop a new model of muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction in Wistar rats. The sustained isometric contraction was performed by the electrical stimulation directly to the belly of the gastrocnemius muscle of rats and the parameters were 19 millisecond of pulse duration, frequency of 50Hz, and intensity of 1.6 volts (V) for a period of 1 hour. Randall Selitto method was used to measure muscular hyperalgesia 30 minutes until 48 hours after the finish of sustained isometric contraction. This protocol induced mechanical muscle hyperalgesia for one hour and, after two hours, the responses were similar to the baseline. These responses were significantly higher than those induced by stimulation 1.6V for 15 and 30 minutes, 0.5 and 1.0 V for 1h or sham. We also demonstrated that the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction was blocked by dexamethasone, indicating the inflammatory nature of this new model, supported by the presence of inflammatory cells in muscle tissue, confirmed by histological analysis. Together, these data suggest that this new model of muscle hyperalgesia approaching a condition closest to the actual found in muscle pain resulting from daily activities, besides having a great scientific potential for the study of pathophysiological mechanisms involved in muscle pain related to contraction sustained isometric.

Key-Words: Isometric contraction; hyperalgesia; electrical stimulation

SUMÁRIO

Ficha catalográfica	IV
Folha de aprovação	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Dedicatória	XIII
Agradecimentos	XV
Epígrafe	XVII
Lista de figuras	XVIII
Lista de abreviaturas	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Dor e vias de condução.....	1
1.2. Hiperalgisia.....	3
1.3. Dor muscular e modelos de estudos.....	5
1.4. Dores decorrentes da contração isométrica sustentada.....	8
2. ARTIGO	10
Abstract	12
Introduction	13
Methods	15
Subjects	15
Model of muscle hyperalgisia induced by sustained isometric contraction associated with electrical stimulation.....	15
Quantification of muscle hyperalgisia.....	16
Drugs.....	17
Intramuscular and subcutaneous administration of drugs	18
Histology of muscle tissue	18

Statistical analysis	18
Results	19
Standardization of the model of mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction	19
Involvement of inflammation in the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction	24
Histology of muscle tissue after sustained isometric contraction	26
Discussion	27
References.....	30
3. DISCUSSÃO GERAL.....	34
4. CONCLUSÃO GERAL.....	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
6. ANEXO I	44
6.1. Formulário do comitê de ética no uso de animais	44

Aos meus pais, Tercília e Francisco, que sempre me apoiaram com muito carinho e amor.

Aos meus irmãos Rodrigo e Regiane, sempre parceiros e, aos meus sobrinhos Otavio, Lucas e ao Pequeno Theodoro, por apenas existirem e serem motivos de tantas alegrias.

E a toda comunidade científica, para que de alguma forma esse trabalho possa contribuir para o progresso da ciência.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo, mas principalmente por ter me agraciado com as oportunidades dadas e por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

À professora Dra. Maria Cláudia, pela paciência e por ter sido mais que uma excelente orientadora, ter sido modelo de exemplo a ser seguido.

Ao professor Ms. Claudio Fusaro da Universidade São Francisco por todo ensinamento desde a graduação e por ter acreditado e depositado sua confiança em mim.

Ao professor Dr. Carlos Amílcar Parada por abrir as portas do seu laboratório e proporcionar uma convivência científica enriquecedora.

À Bruna de Melo, companheira e mais que amiga, uma irmã de laboratório, sempre disposta a ajudar e a dividir toda carga de trabalho.

Aos meus amigos do LAFAE (laboratório de fisiologia aplicada ao exercício) pela amizade e companheirismo e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Ms. Jalile Garcia pelos primeiros ensinamentos laboratoriais.

À pesquisadora Juliana Maia do Instituto de Biologia pelo acolhimento e todo auxílio à parte prática do projeto.

Ao professor do curso de engenharia da FCA, Rodrigo Baldo, pelos ensinamentos pertinentes à aferição das correntes elétricas e manuseio dos equipamentos de análise para tal.

A todos os outros professores da FCA que contribuíram com o projeto, abrindo as portas de seus laboratórios e nos fornecendo toda ajuda necessária.

Ao professor Dr. Sergio Line da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e a técnica de laboratório Cida por nos auxiliar na Histologia.

Às minhas amigas de Laboratório Carol, Thaisa, Graciana, Gabriela e Aline, pela convivência e por estarem sempre dispostas a ajudar nos experimentos.

À FCA, seu diretor da FCA, Prof Dr. Peter Alexander Bleinroth Schulz e ao programa de pós graduação denominado “Ciências da nutrição e do esporte e metabolismo” por proporcionar as condições para a elaboração desse projeto.

À minha namorada e conselheira Hatalita, pelo amor, compreensão e apoio à minha vida sempre corrida.

E à minha família que viu o Diogo sair de casa para um dia se tornar professor e que mesmo angustiados, deram todo apoio e amor incondicional.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

Texto:

Figura 1 - Sensibilização do nociceptor térmico

Artigo:

Figura 1 - Analysis of muscle hyperalgesia by Randall Selitto and TEP.

Figura 2 - Analysis of voltage.

Figura 3 - Time course.

Figura 4 - Analysis of the involvement of the subcutaneous and of muscle tissues in the hyperalgesic responses analyzed by Randall Selitto test.

Figura 5 - Effect of dexamethasone in mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction

Figura 6 - Histology of the gastrocnemius muscle of sham group (A) and of the gastrocnemius muscle of rats submitted to the sustained isometric contraction (B).

LISTA DE ABREVIATURAS

μl - Microlitro

μm - Micrômetro

5-HT – Serotonin (Serotonina)

ATP – Adenosine triphosphate (Trifosfato de adenosina)

CFA - Complete Freud's adjuvante (Adjuvante completo de Freud)

CGRP – Calcitonin gene related peptide (Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina)

CINC-1 - Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (Neutrófilo quimioatrativo induzido por citocina)

cm - Centímetros

DOMS – Delayed onset muscle soreness (Dor muscular de início tardio)

Fibra Aδ - Fibra A Delta

GRD - Gânglio da raiz dorsal

h - Hora

Hz - Hertz

IASP - International Association for the Study of Pain (Associação Internacional de Estudos da Dor)

IL-1β - Interleucina 1 Beta

IL-6 - Interleucina 6

K⁺ - Íon Potássio

kg - Quilograma

LPS – Bacterial endotoxin Lipopolysaccharide (Endotoxina bacteriana Lipopolissacarídeo)

m/s - Metros por segundos

mg - Miligrama

ms - Milissegundos

Na⁺ - Íon Sódio

NSAIDs - Non-steroidal anti-inflammatory drug (Antiinflamatórios não esteroidais)

P2X3 Receptor Purinérgico X 3

PGE₂ - Prostaglandina E2

pH - Potencial de hidrogênio

rpm - Rotação por minuto

TEP - Tempo de elevação da pata

TNF α - Tumor necrosis factor alpha (Fator de necrose tumoral alfa)

TTX - Tetrodotoxina

TTX-r - Resistente à tetrodotoxina

V - Volt

λ -carragenina - Carragenina Lambda

1. Introdução

1.1. *Dor e vias de condução*

A dor é crucial à sobrevivência, servindo como função protetora por sinalizar a presença de condições nocivas e lesivas aos tecidos. No entanto, apesar da palavra “dor” ser comumente utilizada, ela não possui uma definição ideal. Segundo o comitê de taxionomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1986), dor pode ser conceituada como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita nesses termos” (1). Sendo assim, devemos entender a dor como uma sensação nociceptiva, levando também em consideração a percepção da dor (experiência emocional).

A nocicepção corresponde à ativação neuronal dos aferentes primários, que encaminham a informação dolorosa para ser interpretada no sistema nervoso central que, em última instância, determina a percepção da dor (2, 3). A percepção leva em consideração as características emocionais, psicológicas, motivacionais e ainda, a história pregressa do indivíduo (1). Portanto, devemos entender a dor como uma percepção desagradável de uma sensação nociceptiva.

Há mais de 100 anos, Sherrington propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário ativado por estímulos capazes de gerar lesões teciduais (4). Estudos eletrofisiológicos seguiram-se demonstrando que esses neurônios (terminações nervosas livres de neurônios pseudo-unipolares) podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa, e produtos químicos irritantes, mas não por estímulos inócuos como o toque suave (5). Considerando esses achados, a dor aguda pode ser caracterizada como uma modalidade sensorial, assim como a visão ou o olfato, onde estímulos específicos são captados por células receptoras especializadas devidamente sintonizadas com o sistema nervoso central (3).

A primeira compreensão a respeito da morfologia das terminações nervosas livres no músculo esquelético foi publicada por Stacey em 1969 (6), no qual foi identificado que a maioria das terminações nervosas nociceptivas ficam na camada adventícia das arteríolas e vênulas. Surpreendentemente, em 1998, Reiner, A., Kaske, A. e Mense, S. descobriram que as próprias fibras musculares são desprovidas de terminações nociceptivas, fato que se correlaciona com doenças degenerativas como a distrofia muscular, onde lentamente há morte das fibras

musculares, sem haver dor a cada morte celular, diferente de quando há um rompimento de um feixe de fibras musculares. Nessa situação, muitas fibras musculares são destruídas simultaneamente e liberam o seu conteúdo, como por exemplo, K^+ e ATP, no meio intersticial e se difundem para as terminações nervosas próximas (7).

No músculo gastrocnêmio de ratos, há menor densidade das fibras nervosas quando comparado ao tecido peritendinoso. Em contraste, os feixes de fibras de colágeno do tecido, são quase livres de terminações nociceptivas. A alta densidade no tecido peritendíneo pode explicar a alta prevalência de sensibilidade ou dor nesse tecido ou no local da inserção muscular. A escassez de terminações nervosas no centro do tendão pode relacionar-se com a observação clínica de que rupturas parciais do tendão podem ocorrer sem dor (7).

Com a microscopia não é possível relacionar características morfológicas das terminações nervosas livres com a função eletrofisiológica. Como já dito, nociceptores musculares são terminações nervosas livres, porém não existem critérios por microscopia eletrônica que os diferenciem dos termorreceptores e mecanorreceptores. A diferenciação entre eles se dá então, pela combinação das moléculas receptoras na membrana da terminação nervosa (7). Fibras nociceptivas apresentam uma característica própria, elas possuem um tipo especial de canais denominados canais de sódio resistentes à tetrodotoxina (TTX) ou canais de sódio TTX-r (7).

As fibras que conduzem os estímulos nociceptivos são de dois tipos: fibras A-delta ($A\delta$), de médio diâmetro, finamente mielinizadas, com velocidade de condução média, entre 12 e 30 m/s (correspondentes a 20% das fibras de dor e responsáveis pela dor rápida, aguda e lancinante), e fibras C não-mielinizadas, de pequeno diâmetro, com velocidade de condução menor (0,5 a 2 m/s) (responsáveis pela dor lenta e difusa) (3).

Estímulos térmicos, mecânicos e químicos intensos, ativam as fibras C e $A\delta$, sendo que fibras $A\delta$ respondem mais comumente a estimulações mecânicas e térmicas, enquanto as fibras do tipo C respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (por este motivo, denominadas de nociceptores polimodais) (3). Em relação ao processo nociceptivo, esses neurônios de primeira ordem possuem três funções: 1) detecção do estímulo nocivo ou potencialmente injuriante (transdução), 2) passagem dessa informação sensorial da periferia para a medula espinal

(condução) e 3) transferência sináptica dessa mesma informação aos neurônios localizados em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal (transmissão) (8).

Ativação dessas fibras por estímulos nociceptivos no tronco ou membros gera potenciais de ação que são conduzidos para o corno dorsal da medula espinhal pelas raízes dorsais dos nervos espinais. Já no caso da dor proveniente da região orofacial, a informação nociceptiva é direcionada para o subnúcleo caudal, do complexo nuclear sensorial trigeminal do tronco cerebral (9).

Constituintes do sistema nervoso periférico, essas fibras possuem seus corpos celulares localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) ou nos gânglios trigeminais, no caso dos neurônios sensoriais que inervam a região orofacial. Destes gânglios saem prolongamentos em direção à medula espinhal (ou tronco encefálico, no caso dos neurônios orofaciais), onde estão localizados os neurônios secundários.

Após ativação do neurônio secundário, a transmissão das informações nociceptivas da medula espinhal são encaminhadas para as estruturas encefálicas por meio de tratos neuronais específicos: espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, espinocervicotalâmico, espinoparabraquial, espinoparabraquio (trigêmio) hipotalâmico, via pós-sináptica da coluna dorsal (2, 9, 10). No encéfalo, esses tratos convergem para o núcleo posterior ventral do tálamo (núcleo ventrobasal) (11) e a informação segue para as áreas regiões corticais envolvidas com o aspecto afetivo-motivacional, onde uma série de características será analisada, tais como qualidade, intensidade, localização, duração e também componentes psicossociais (12).

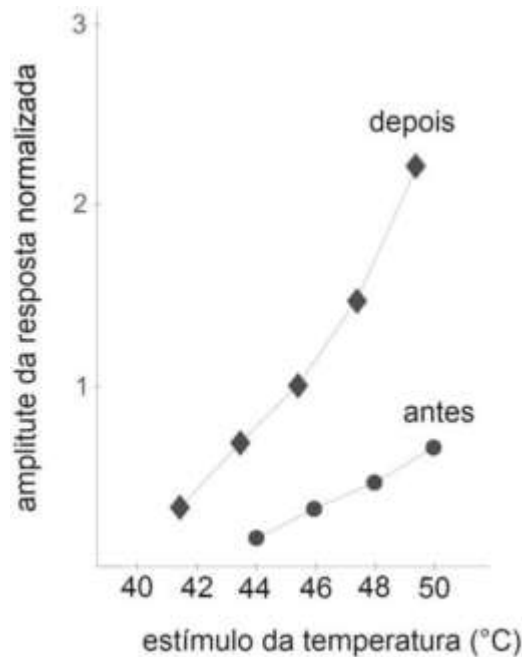
1.2. Hiperalgesia

Em certas condições dolorosas, a dor é acompanhada da hiperalgesia, um sinal clássico da inflamação que, pelo menos em parte, resulta da sensibilização periférica dos nociceptores aferentes primários (13, 14). Esta sensibilização é caracterizada por um aumento na excitabilidade da membrana neuronal, devido a liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão (14, 15), fazendo com que estímulos de intensidade menores se tornam capazes de disparar o potencial de ação (16).

A sensibilização dos nociceptores pode ser mediada por substâncias liberadas no ambiente tecidual, tais como, mastócitos, leucócitos e células lesionadas (17, 18) e por aminas simpatomiméticas (19). Entre essas substâncias estão a bradicinina, acetilcolina, histamina, serotonina, leucotrieno, tromboxano, fator de ativação plaquetário, radicais ácidos, íons potássio, citocinas pró-inflamatórias e as prostaglandinas. Ainda, a atividade do sistema neurovegetativo simpático pode colaborar com a sensibilização neuronal por meio da liberação de noradrenalina e prostaglandinas. Os neurônios nociceptivos podem sofrer ainda, alterações fenotípicas, contribuindo também, para o desenvolvimento da hiperalgesia. Essas alterações incluem o aumento da expressão de canais de sódio voltagem-dependentes (Nav 1.6) (20, 21).

Um exemplo de sensibilização é mostrada na figura 1, onde a sensibilização corresponde ao desvio à esquerda, na curva estímulo/resposta, que diz respeito à magnitude da resposta neural em relação à intensidade do estímulo (calor) (22).

Podemos entender, portanto, a hiperalgesia como um evento diferente da nocicepção (considerado um fenômeno puramente iônico), pois envolve também fenômenos metabólicos, através da liberação de mediadores inflamatórios que modificam metabolicamente as condições normais de uma célula neuronal (3, 23). De forma semelhante à hiperalgesia, há um outro termo denominado “alodinia”, onde a dor pode ser gerada através de estímulos que normalmente não causariam dor, como por exemplo um toque suave. Por essa definição ser muito semelhante à hiperalgesia, a IASP propôs que o termo “hiperalgesia” fosse usado como um “termo guarda-chuva”, abrangendo todos os casos onde há aumento da sensibilidade dolorosa(24)



- Respostas individuais aos estímulos térmicos, obtidos antes da pele ser aquecida
- ◆ Respostas sensibilizadas, obtidas a partir da mesma área, depois da queimadura

Fig.1. Sensibilização do nociceptor térmico. A figura mostra a sensibilização do nociceptor térmico ao estímulo, em uma área da pele aquecida à temperatura indicada.

Fonte: Fein, A. Nociceptores: as células que sentem dor. Ribeirão Preto-SP: Dor On Line; 2011.

1.3. Dor muscular e modelos de estudos

O termo "dor muscular" é usado para dores de origem no músculo estriado esquelético, incluindo a sua fáscia e inserções tendinosas (25). Desordens do sistema músculo-esquelético são as principais causas de incapacidade nas sociedades ocidentais (7), sendo essas desordens divididas em duas categorias: 1) mialgias, que incluem as dores miofasciais e miosites inflamatórias e, 2) as desordens articulares, que incluem todas as artrites.

Em uma pesquisa realizada pelo instituto Pfizer em parceria com o Ibope foi analisado o perfil da dor no Brasil em 2008. Foram entrevistadas 1400 pessoas com mais de 16 anos, em 9 cidades metropolitanas. Entre os resultados, destacam-se as dores na região da coluna vertebral. Segundo a pesquisa, quando o brasileiro pensa nas dores que sentiu ao longo da vida, a frequência nas indicações das dores na região da coluna só fica atrás das dores de cabeça.

O componente periférico da hiperalgesia mecânica muscular também ocorre devido à sensibilização dos nociceptores por mediadores endógenos (26). Os nociceptores musculares podem ser excitados e/ou sensibilizados por diversos mediadores, entre eles a bradicinina (BK), prostaglandina E2 (PGE2), serotonina (5-HT), íons potássio e histamina (25, 27). Além disso, a molécula de ATP também tem sido envolvida na dor muscular do músculo masseter de ratos (28-30). Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa demonstrou o envolvimento da molécula de ATP, via ativação de receptores P2X3, na hiperalgesia muscular (dados não publicados).

Desde o século XIX, modelos animais de dor são utilizados para a compreensão dos processos dolorosos (31). A partir de então, muitos modelos de dor, tanto agudos quanto crônicos, tem sido desenvolvidos para que haja um melhor entendimento sobre o processo da dor em diversas condições de inflamação (32-37). As pesquisas com dor muscular envolvem uma ativação padronizada do sistema nociceptivo e uma avaliação quantitativa das respostas motoras e sensoriais e tentam elucidar os mecanismos causa-efeito (7), no entanto, até o presente momento, os mecanismos que participam da dor musculoesquelética não estão bem esclarecidos.

Na tentativa de melhor compreender essa dor, foram desenvolvidos, nas últimas décadas, alguns modelos para se estudar a dor muscular em animais experimentais. Os modelos mais comuns são caracterizados pela dor muscular induzida por administração local de agentes químicos e pela dor muscular induzida por contração muscular desenvolvida através de exercícios físicos ou estimulação elétrica do ventre muscular. Nos modelos experimentais de dor muscular induzida por agentes químicos, a administração intramuscular de λ -carragenina (38-40) ou salina hipertônica (41, 42) são as mais utilizadas. O modelo da dor inflamatória induzida pela λ -carragenina é amplamente utilizado, já que, de forma semelhante ao processo inflamatório em humanos, ela é reduzida com o uso de antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs) (43, 44). Ela induz hiperalgesia mediada pela liberação de dois mediadores inflamatórios finais, as prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas, que sensibilizam diretamente as fibras aferentes primárias (21, 45). A produção desses mediadores depende da liberação prévia de uma cascata de citocinas, que envolve inicialmente a formação da bradicinina, que por sua vez, induz à liberação da citocina pró-inflamatória TNF α (46). Esta citocina desencadeia a

liberação de duas vias distintas de mediadores, uma mediada pelas IL-1 β e IL-6 que estimulam a síntese da cicloxigenase-2 (COX-2), convertendo o ácido araquidônico em prostaglandinas e outra mediada pela IL-8 (em humanos) ou CINC-1 (em ratos) que estimula a produção das aminas simpatomiméticas (47-49). Esse é um modelo clássico e amplamente utilizado, entretanto, foi demonstrado que a λ -carragenina ativa a imunidade inata via receptores toll like 4/MyD88, de forma semelhante à endotoxina bacteriana Lipopolissacarídeo (LPS) (50), o que sugere que esse modelo não seja exclusivamente inflamatório e talvez envolva um componente característico de patologias infecciosas. Já a administração intramuscular de salina hipertônica, embora induza dor com intensidade semelhante à mialgia postural (Knardahl, 2002), não está acompanhada de um processo inflamatório (39). Em geral, nesse modelo, utiliza-se repetidas injeções de salinas hipertônicas (pH 4.0) afim de obter a diminuição do limiar nociceptivo e tem sido muito utilizado para reproduzir situações que não estão associadas com inflamação, como a fibromialgia, dores crônicas na região da coluna vertebral ou dor miofascial. Os modelos de dor muscular induzida por contração muscular através de exercícios físicos ou estimulação elétrica amplamente utilizados simulam a dor muscular tardia (DOMS – *delayed-onset muscle soreness*), que é a dor referida em músculos após contrações musculares excêntricas extenuantes. No modelo caracterizado por exercícios físicos, os animais são induzidos a caminhar em uma esteira com inclinação em descida por longos períodos de tempo (39). Já no modelo caracterizado pela estimulação elétrica, eletrodos transcutâneos são inseridos nos músculos e estimulações sincronizadas com um servomotor induzem 500 ciclos de repetições, de forma que, durante a estimulação da contração, o músculo esteja na posição alongada (51-53).

Outras estratégias são usadas para tentar reproduzir a dor muscular através da injeção de substâncias exógenas, além da salina hipertônica, como por exemplo, a capsaicina, óleo de mostarda e o CFA (complete Freud's adjuvant)(54). A capsaicina é amplamente utilizada nos estudos da dor cutânea, mas ao ser empregada no músculo da pata de ratos, ela produz hiperalgesia mecânica bilateral com simultânea hipoalgesia ao calor unilateral, tendo um pico em 24 horas, mas com duração de até 4 semanas (55). De forma semelhante, hiperalgesia também pode ser observada após a administração do óleo de mostarda e do CFA (56, 57).

1.4. *Dores decorrentes da contração isométrica sustentada*

As ações musculares podem ser estáticas ou dinâmicas. Nos exercícios estáticos ou isométricos, ocorre a contração muscular mantendo um ângulo fixo na articulação, enquanto que nos exercícios dinâmicos, há um movimento do membro em torno da articulação, chamado de arco de movimento, com variação positiva (atividade concêntrica) ou negativa (atividade excêntrica) (58). Sendo assim, durante o exercício dinâmico o comprimento muscular se modifica, ao contrário do estático, que permanece constante. Sabe-se que as contrações isométricas produzem maior tensão do que as contrações concêntricas, sendo a tensão máxima, desenvolvida quando as fibras musculares estão aproximadamente no seu comprimento de repouso. Isso se deve ao fato dos elementos contráteis e elásticos do músculo, estarem em perfeita distribuição (59).

As dores referidas durante e após as atividades de vida diárias, entre todos os outros tipos de dores, são as mais comuns e têm origem na contração muscular isométrica (60). Sabe-se que as atividades funcionais, realizadas por longos períodos de tempo e potencialmente dolorosas, como a sustentação do peso corporal na postura em pé e permanecer sentado em atividade de digitação, são mantidas principalmente por contração isométrica sustentada (61). Por exemplo: a sustentação de peso corporal na postura em pé é realizada pela contração isométrica sustentada dos músculos de cadeia posterior; já na digitação, existe contração isométrica sustentada dos músculos posteriores da coluna cervical para alinhamento do campo de visão, dos músculos da cintura escapular para sustentação dos braços, e dos músculos torácicos e lombares para sustentação da postura sentada e ereta. Além disso, foi sugerido que a dor referida nas costas após os períodos de sono na posição deitada é causada por contração isométrica dos músculos lombares (62).

Diferentes modelos experimentais realizados em humanos também demonstram que a contração isométrica sustentada induz dor. Há relatos de dores musculares após contrações isométricas sustentadas do músculo masseter ou trapézio, realizadas repetidamente por um determinado período de tempo (63); do músculo quadríceps, na posição de flexão de joelho a 90°, realizada uma única vez até a exaustão, tanto em mulheres saudáveis como nas portadoras de fibromialgia (64). Além disso, foi descrito que a dor no músculo trapézio induzida pela

manutenção do ombro em abdução a 90° está associada ao aumento da concentração local de bradicinina e calidina (60). Entretanto, apesar da sua relevância clínica, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da dor muscular induzida pela contração isométrica sustentada são pouco conhecidos e, portanto, objetivamos desenvolver um novo modelo de hiperalgesia muscular mais realístico e com um bom grau de predição e controle farmacológico da dor.

O presente artigo foi submetido ao periódico *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*

DEVELOPMENT OF A NEW MODEL FOR THE STUDY OF MUSCLE HYPERALGESIA INDUCED BY SUSTAINED ISOMETRIC CONTRACTION

Diogo Francisco da Silva dos Santos^a

Bruna de Melo^a

Carolina Ocanha Jorge^a

Jalile Garcia Schiavuzzo^a

Carlos Amilcar Parada^b

Maria Claudia Gonçalves Oliveira Fusaro^{a*}

a Laboratory of Studies of Pain and Inflammation, School of Applied Sciences -
University of Campinas - UNICAMP

b Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP, Monteiro Lobato
255, 13083-970 Campinas, Sao Paulo, Brazil

Abstract

Among the types of pain that affect people throughout their lives, muscle pain, specially the one induced by sustained isometric contraction, is one of the most prevalent and has an important socio-economic impact. However, despite their clinical relevance, the molecular mechanisms involved in the development of muscle pain induced by sustained isometric contraction are unknown. This is mainly due to the absence of a more realistic experimental model that has a good degree of prediction of pharmacological control of pain. Therefore, the aim of this study was to develop a new model of muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction. The sustained isometric contraction was performed by the electrical stimulation directly to the belly of the gastrocnemius muscle of rats and the parameters were 19 millisecond of pulse duration, frequency of 50Hz, and intensity of 1.6 volts (V) for a period of 1 hour. This protocol induced mechanical muscle hyperalgesia for one hour and, after two hours, the responses were similar to the baseline. These responses were significantly higher than those induced by stimulation 1.6V for 15 and 30 minutes, 0.5 and 1.0 V for 1h or sham. We also demonstrated that the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction was prevented by dexamethasone and that it involves the presence of cells inflammatory. Taken together, these results suggest the potential of this model to the studies of inflammatory muscle pain related to sustained isometric contraction.

Introduction

Since the 19th century, animal models of acute and chronic pain have been developed to understand the mechanisms involved in pain process (1), such as inflammatory (2-7), neuropathic (8-10), cancer (11-15), arthritic (16-20) and muscle (21-30) pain, among others (31). Among all kinds of pain that afflict humans throughout their lives, muscle pain is one of the most prevalent. It affects more than 40% of the population, account for 29% of missing work and, frequently, it limits the movement for functional activities of daily living (32).

Currently, there are several models to study muscle pain in experimental animals. The most common models are characterized by muscle pain induced by local administration of chemical agents and by muscle contraction induced by exercise or electrical stimulation of the muscle. The intramuscular administration of λ carrageenan (33-35) and of hypertonic saline (36, 37) are the most used models of muscle pain induced by chemical agents, since, similar to the inflammatory process in human, it is prevented by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (38, 39). However, it was demonstrated that the λ carrageenan activates innate immunity via toll like receptors 4/MyD88, similar to bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) (40), suggesting that this model may involve an inflammatory component similar to infections. In addition, the intramuscular administration of hypertonic saline is a widely model used to study chronic muscle pain (41), that induces pain with similar intensity of postural myalgia (Knardahl, 2002), however, it doesn't involve an inflammatory process (34).

Models of muscle pain induced by muscle contraction through exercise or electrical stimulation are widely used to study DOMS (delayed onset muscle

soreness), which is referred as pain in muscles after strenuous eccentric muscle contractions. It is interesting to point out that the eccentric muscle contraction induces muscle injuries significantly greater than that induced by concentric and isometric contractions (42-46), however, this kind of muscle pain is not associated with the daily functional activities, therefore, it doesn't have important socioeconomic impact.

Sustained isometric contraction is related to muscle pain during and after the activities of daily life (47). It has been described that to stay standing up or typing, positions that are supported by sustained isometric contraction, for long periods induce muscle pain (48). Also, the muscle pain reported after to sleep in the supine position is caused by isometric contraction of lumbar muscles (49). Different experimental models performed in humans also demonstrate that sustained isometric contraction induces muscle pain. It was demonstrated that the sustained isometric contractions of the masseter, trapezius and quadriceps muscle in different positions induce intense muscle pain (50, 51). It is interesting to point out that the pain in trapezius muscle induced by the maintenance of shoulder in 90° of abduction is associated with increased local concentration of bradykinin and kallidin (47).

Considering the clinical relevance of muscle pain induced by sustained isometric contraction and the scientific and clinical importance of understanding the mechanisms involved in this kind of pain, the aim of this study was to develop a new model of muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction in rats.

Methods

Subjects

Male albino Wistar rats weighing 200–350g were used. Experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP on using laboratory animals (52). All animal experimental procedures and protocols were approved by the Committee on Animal Research of the State University of Campinas – Unicamp. Animals were housed in plastic cages with soft bedding (five/cage) on a 12:12 light cycle (lights on at 06:00 A.M.) with food and water available ad libitum. They were maintained in a temperature-controlled room (± 23 °C) for a 1-h habituation period prior to the test.

Model of muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction associated with electrical stimulation

To develop this model it was used the equipment *Grass[®], S88X Estimulator Model*. The animals remained in a supine position were anesthetized by inhalation of a 2% - 4% of isoflurane. The right hind paw was shaved and the skin was cleaned with Polvidine. The electrodes were inserted into the belly of the gastrocnemius muscle and throughout the procedure of electrical stimulation, the animals remained in the prone position, held on thermal blanket to prevent hypothermia caused by anesthesia.

The initial parameters used were pulse width of 1 ms, intensity of 3V and frequency of 30Hz (63). These parameters were adapted to allow the observation good visual degree of muscle contraction able to maintain of sustained plantar flexion

without any appearance of obvious macroscopic lesions such as burns or inflammatory exudate. Stimulation was performed during 15, 30 and 60 minutes.

For a adequate standardization of the pattern current, we analyze the variables of current through an oscilloscope GW Instek brand, model GDS-1022 and a voltmeter.

Quantification of muscle hyperalgesia

Two classical models of hyperalgesia were used to quantify the behavior responses. The purpose of using two models was to confirm the responses and to evaluate in which model the hyperalgesia would be more evident. We use the paw elevation test (TEP) and Randall Selitto.

Paw elevation test: We evaluated the inability of the rat to walk normally (due to muscle pain) after being subjected to sustained isometric contraction (53). The variable quantified in this test is the Paw Elevation Time (TEP), which is defined as the time, at which, the animal walk without touching the cylinder with the injured muscle hind paw for a period of 60 seconds. TEP is directly proportional to the disability, which is accepted as reflecting hyperalgesia (54). Briefly, prior to contraction of the right gastrocnemius muscle, the animals were placed to walk on a rotating steel drum (30 wide x 50 cm diameter) covered with a mesh stainless wire, which rotates at a speed of 3 rpm. Metal sneakers were placed around the animal's hind paw and the right hind paw was connected to a simple circuit computerized data acquisition in order to obtain control measurements over a period of 60 seconds. Typically, animals show a baseline TEP of about 10 seconds. Obtained control measures, animals should be subjected to muscle contraction procedure and were subsequently submitted to TEP test again for 60 seconds. Evaluations were

performed immediately after full recovery from anesthesia and followed by 1/2, 1, 2, 3 and 6h after the contraction procedure. To minimize variations in estimates of TEP, all animals were introduced to the experimental environment and trained on the machine to get used to the equipment. The test allows obtaining records from three animals per session and gives automatic measurements, which are independent of the subjectivity of the observer (53).

The Randall-Selitto test: The Randall Selitto nociceptive paw-withdrawal flexion reflex test (55) was performed using an analgesimeter (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil), which applies a linearly increasing mechanical force to the gastrocnemius muscle of the rats. The nociceptive threshold was defined as the force in grams, with which the rat withdrew its paw. The baseline paw-withdrawal threshold was defined as the mean of three tests performed at 5 min intervals before test agents were injected or before sustained isometric contraction. Mechanical hyperalgesia was quantified as the change in mechanical nociceptive threshold calculated by subtracting the mean of three mechanical nociceptive threshold measurements taken after injection of the test agent from the mean of the three baseline measurements. The animals were subjected to the TEP, which lasts only one minute, and then to the Randall Selitto.

Drugs

It was used the following drugs: QX-314 2% (68), diluted in saline and dexamethasone 1mg/kg (69), dissolved in ethanol. The drugs were obtained from Sigma-Aldrich (Brazil).

Intramuscular and subcutaneous administration of drugs

Rats were briefly anesthetized by inhalation of isoflurane and the drugs were administered in the belly or in the subcutaneous tissue of the gastrocnemius muscle through a Hamilton syringe and a 30 gauge needle. The final volumes were 50 μ l.

Histology of muscle tissue

Samples of the gastrocnemius muscle of the sham and experimental groups were collected 1 hour after the end of sustained isometric contraction and 1 hour after removal of invasive electrodes the group sham. Samples were stored in 10% formaldehyde for subsequent immersion in paraffin. Sections were 5 μ m and the slides were stained with hematoxylin and eosin.

Statistical analysis

For data shown in Figures 1, 2A and 2B, two-way ANOVA with Bonferroni post test were used to determine the basis of the significant difference ($p < 0.05$). T-test was used on data of figure 4 and for data of other figures, one-way ANOVA, post hoc contrasts, using the Tukey test, were performed to determine the basis of the significant difference. Data are expressed in figures by the decrease in paw-withdrawal threshold and are presented as means \pm SEM.

Results

Standardization of the model of *mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction*

The standardization of the parameter of modulation of the electrical stimulation demonstrated that the repeated pulse, monophasic current, pulse duration of 19 ms, frequency of 50Hz frequency and intensity of 1.6V for 1h induced behavior responses in Randall Selitto and TEP significantly greater than that induced by Sham (needle-type electrode insertion in the muscle belly with current off) ($p < 0.05$, Two Way ANOVA, Bonferroni Fig. 3A and 3B) These behavioral responses were significantly increased after 30 minutes and 1 hour from the end of the isometric contraction; after this time point the behavioral responses decreased and between 2 and 6 h the responses were similar to baseline ($p < 0.05$, Two Way ANOVA, Bonferroni, Fig. 1A and 1B). Importantly, the animals showed no spontaneous nociceptive behavioral responses in any period of measurements of muscle hyperalgesia (data not shown).

Figure 1

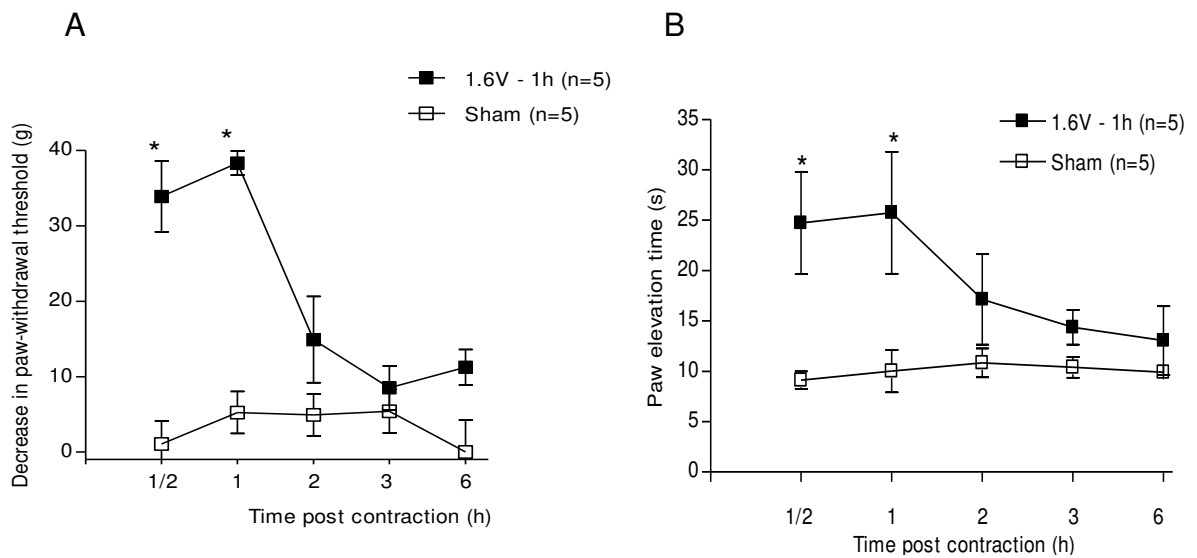


Fig.1. Analysis of muscle hyperalgesia by Randall Selitto (A) and TEP (B). These behavioral responses were significantly increased after 30 minutes and 1 hour from the end of the isometric contraction; after this time point the behavioral responses decreased and between 2 and 6 h the responses were similar to baseline. The symbol "*" indicates behavioral responses significantly greater than those induced Sham groups ($p < 0.05$, two-way ANOVA, Bonferroni)

To determine the voltage able to induce the greatest behavioral responses, we evaluated the behavioral responses induced by 0.5, 1.0 and 1.6V for 1h. The results demonstrated that the sustained isometric contraction performed by currents of 1.6V induced behavioral responses significantly greater than that induced by 0.5 and 1.0V ($p < 0.05$, Two Way ANOVA, Fig 2A and 2B).

Figura 2

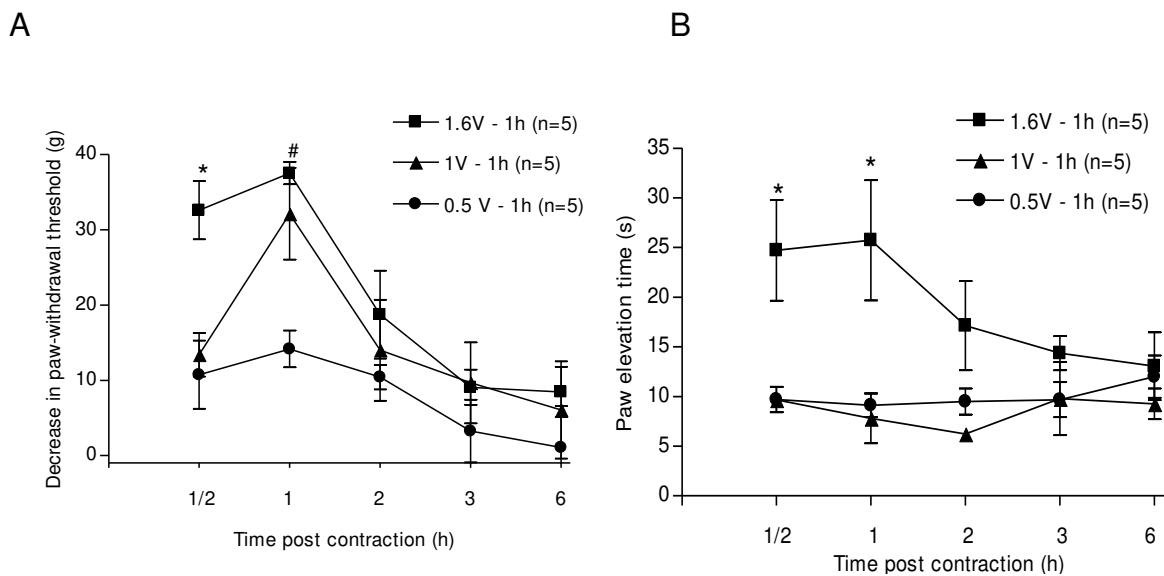


Fig.2. Analysis of voltage. Sustained isometric contraction performed by currents of 1.6V induced behavioral responses significantly greater than that induced by 0.5 and 1.0V. The symbol "*" indicates responses significantly greater than those induced by other groups ($p < 0.05$, two-way ANOVA, Bonferroni). The symbol "#" indicates behavioral responses significantly greater than that induced by 0.5V group ($p < 0.05$, two-way ANOVA, Bonferroni).

To determine the period of time of contraction able to induce the greatest behavioral responses, we evaluated the behavioral responses induced by currents of 1.6V for 15, 30 minutes or 1h. The results demonstrated that the sustained isometric contraction performed by 1h induced behavioral responses significantly greater than that induced by 15 or 30 min. ($p < 0.05$, Two Way ANOVA, Fig 3A and 3B).

Figure 3

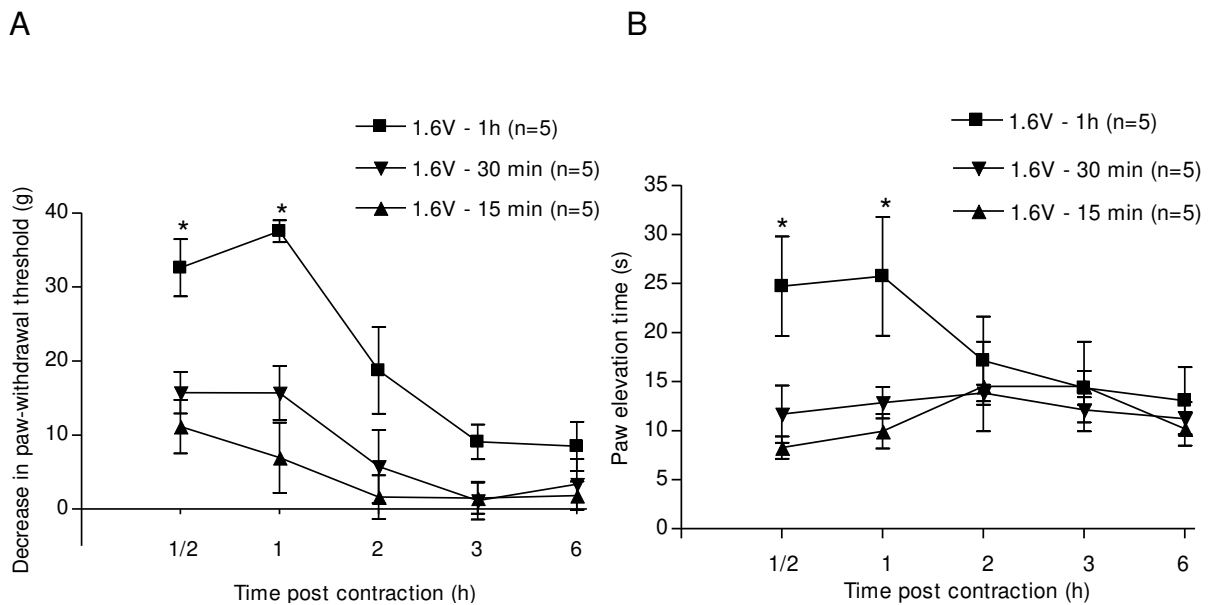


Fig.3. Time course. The symbol sustained isometric contraction performed by 1h induced behavioral responses significantly greater than that induced by 15 or 30 min. "*" indicates responses significantly greater than those induced by other groups ($p < 0.05$, two-way ANOVA, Bonferroni).

To confirm the involvement of muscle tissue and the nociceptive character of behavioral responses induced by sustained isometric contraction, we injected the QX314, a quaternary lidocaine derivate, into the subcutaneous tissue or into the gastrocnemius muscle 5 minutes before analysis of the behavioral responses. The results demonstrated that intramuscular but not subcutaneous ($p > 0.05$, t-test, figure 4) injection of QX314 (2%) blocked the behavioral responses induced by sustained isometric contraction. These data confirmed the involvement of muscle tissue and excluded the involvement of the subcutaneous tissue in these responses. They also demonstrated the nociceptive character of these responses.

Figure 4

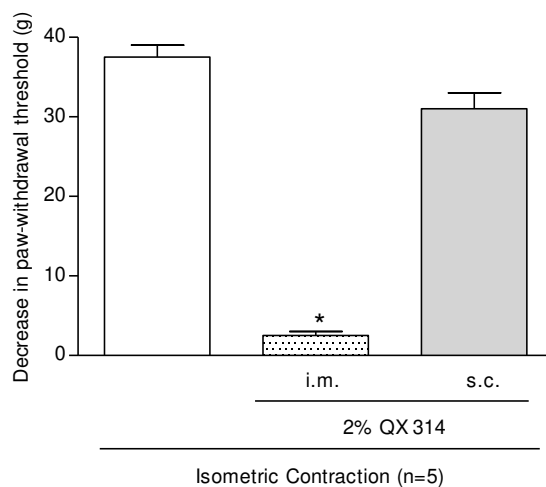


Fig.4. Analysis of the involvement of the subcutaneous and muscle tissues in the hyperalgesic responses analyzed by Randall Selitto test. intramuscular but not subcutaneous injection of QX314 (2%) blocked the behavioral responses induced by sustained isometric contraction. These data confirmed the involvement of muscle tissue and excluded the involvement of the subcutaneous tissue in these responses. The symbol "*" indicates nociceptive behavioral responses significantly lower than that showed by control group (white bar) ($p < 0.05$, t-test).

Involvement of inflammation in the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction.

To evaluate whether the mechanical muscle hyperalgesia induced by isometric contraction was mediated by inflammatory mediators, we used the steroid anti-inflammatory drug, dexamethasone. Pre-treatment with dexamethasone (1mg/kg, but not 0.1 mg/kg, sc) 30 minutes before the isometric contractions prevented the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction ($p < 0.05$, Tukey's test, 6A and 6B). Pretreatment with dexamethasone in the sham group did not alter the behavioral responses ($p > 0.05$, Tukey test).

Figure 5

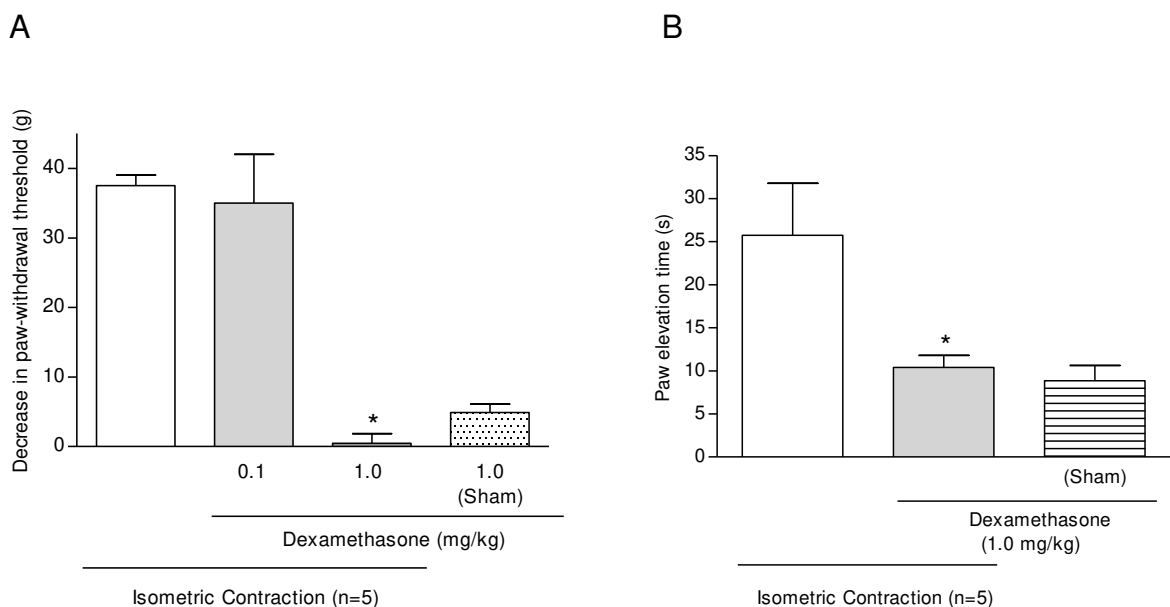


Fig.5. Effect of dexamethasone in mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction. Pre-treatment with dexamethasone (1mg/kg, but not 0.1 mg/kg, sc) 30 minutes before the isometric contractions prevented the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction.

Pretreatment with dexamethasone in the sham group did not alter the behavioral responses. The symbol "***" indicates behavioral responses significantly lower than those induced by control groups ($p < 0.05$, Tukey test).

Histology of muscle tissue after sustained isometric contraction

Histological analysis of the samples of gastrocnemius muscle demonstrated that the sustained isometric contraction (Fig. 6B) induced inflammation with a considerable presence of cells inflammatory when compared to the sham group (Fig. 6A).

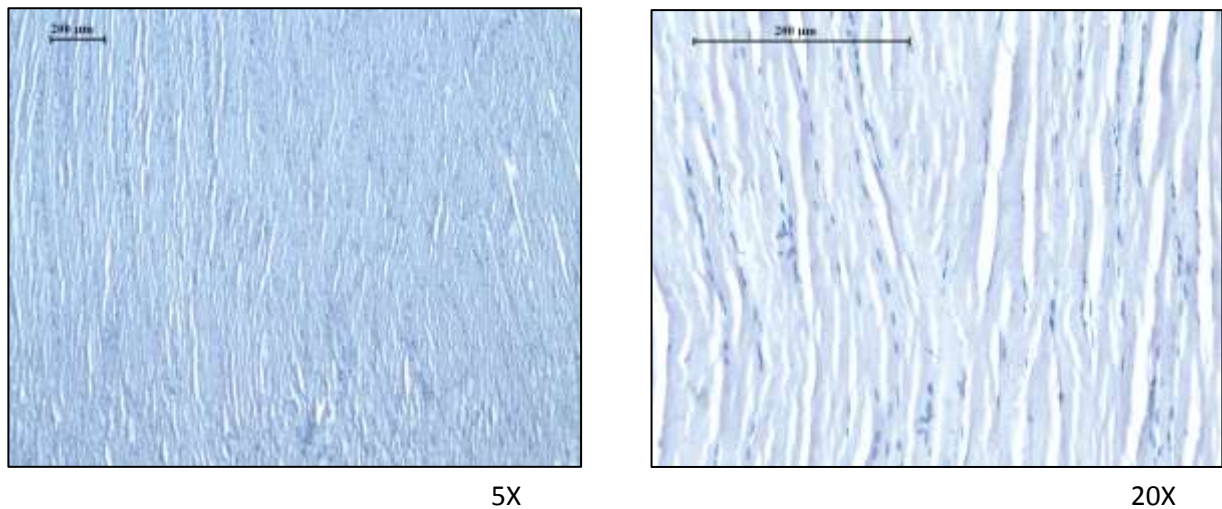


Fig.6A. Histology of the gastrocnemius muscle of sham group.

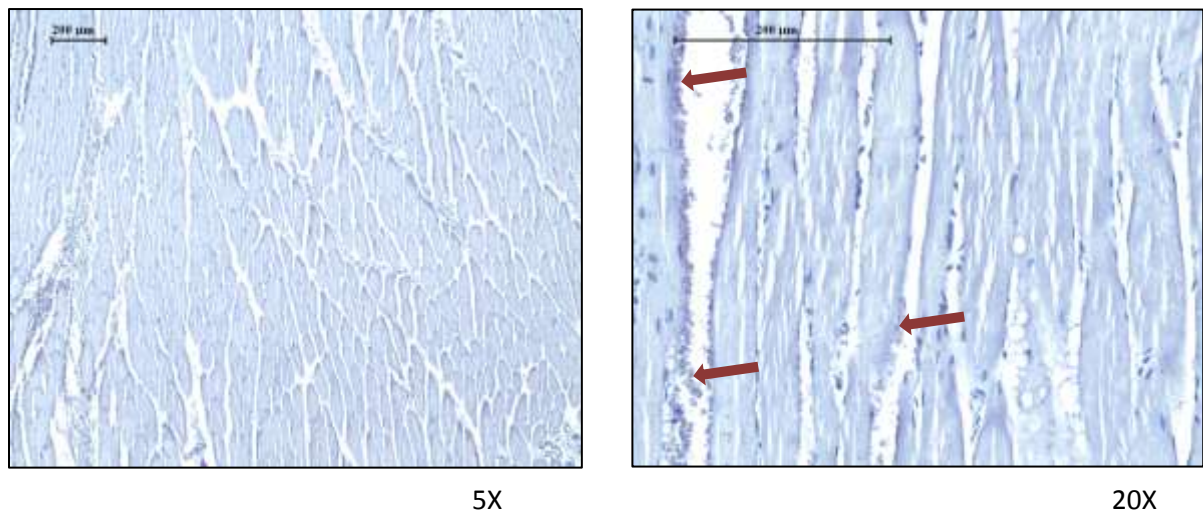


Fig.6B. Histology of the gastrocnemius muscle stained with hematoxylin and eosin of rats submitted to the sustained isometric contraction. The figure shows a significant inflammation with a presence massive of inflammatory cells. The red arrows indicate inflammatory cells.

Discussion

In the present study we have developed a new model of mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction. We also demonstrated that this process is associated with inflammation.

The data that the sustained isometric contraction induced muscle hyperalgesia in two different experimental protocols used for quantification of inflammatory pain, such as Randall Selitto and TEP, confirm the development of the muscle hyperalgesia. The temporal evolution of this response is fast, since 30 minutes after the end of the muscular contraction we were able to quantify a significant muscle hyperalgesia by both protocols; the peak of this response was at one hour, with an evident decline after this. It is interesting to point out that postural myalgia are characterized by a chronic painful process and, although our model have induced only one hour of muscle pain, it was performed only one episode of sustained isometric contraction.

Some variables of the parameters used in our study are similar to other studies (56-58) that induced muscle contraction by electrical stimulation to study DOMS. In these studies, it was used 50Hz of frequency, the same used in our study. However, the pulse duration was of 1ms, whereas in our study, it was used 19ms. This difference may be explained by the fact that our model aimed to induce sustained isometric contraction for 1 hour (without relaxation), whereas in the other studies, the contraction was performed by a cycle of contraction and relaxation, with 3 second of contraction and 1 second of relaxation.

We realized the electrical stimulation with direct current that has no interval between pulses, however, not been possible to obtain muscle contraction for a long period of time. We believe that a short interval between pulses is necessary so that

the muscle fibers can maintain cellular homeostasis. Beyond 1.6V, other voltages were tested, but higher voltage than 1.6V induced very strong muscular contractions and promoted macroscopic lesions. Have voltages below 1.6V generated very weak muscle contractions, not approaching the muscular contractions of daily life.

The Randall Selitto method is performed by applying a gradual linear force directly on the skin overlying the gastrocnemius muscle; therefore, to exclude the involvement of the subcutaneous tissue and confirm the involvement of muscle tissue in the behavioral responses evaluated by this method, we used the QX314. Also, considering that QX314 is a quaternary lidocaine derivate, it doesn't cross the blood brain barrier, therefore, confirming the peripheral nociceptive character of these responses.

It has been demonstrated that muscle pain is associated with an inflammatory process, since anti-inflammatory drugs reduce muscle pain (59) and that the concentration of proinflammatory cytokines is increased in muscle tissue of patients with muscle pain (60, 61) It has been well described that glucocorticoid drugs, such as dexamethasone inhibit both the early and late changes that contribute to the inflammatory process (62). Therefore, our results that pretreatment with dexamethasone prevented the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction confirm the involvement of inflammatory mechanisms in this response. Also, our histological analysis of the muscle tissue 1 hour after the sustained isometric contractions demonstrated the involvement of inflammatory cells in this process. This data is supported by studies that demonstrated the presence of inflammatory cells in the muscle tissue of humans post strenuous contractions (63, 64).

It has been shown that some inflammatory cells such as macrophages and neutrophils mediate the release of pro-inflammatory cytokines (65, 66), which induce the release of mediators responsible for the late inflammatory pain. These final mediators, such as prostanoids or sympathetic amines, act directly on the nociceptors to cause hyperalgesia (21, 43). Taken together, these data suggest that the muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction and prevented by pretreatment with dexamethasone and QX 314 has inflammatory and nociceptive character with the presence of inflammatory cells in the muscle tissue.

In summary, the data of the present study demonstrated the development of a new model of muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction. These data also, suggest the scientific potential of this model to the studies of muscle pain related to sustained isometric contraction.

References

1. von Frey M. Untersuchungen über die sinnesfunctionen der menschlichen haut: 1. abhandlung: Druckempfindung und schmerz: S. Hirzel; 1896.
2. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21(3):531-43. Epub 1998/10/13.
3. Simone DA, Baumann TK, LaMotte RH. Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain*. 1989;38(1):99-107.
4. Sluka KA. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(13):5687-93.
5. Parvathy S, Masocha W. Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis using the CatWalk system. *BMC Musculoskeletal Disord*. 2013;14(1):14.
6. Willis W, Jr. The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. *Exp Brain Res*. 2009;196(1):5-11.
7. O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacological reviews*. 2012;64(4):939-71. Epub 2012/10/02.
8. LaBuda CJ, Cutler TD, Dougherty PM, Fuchs PN. Mechanical and thermal hypersensitivity develops following kainate lesion of the ventral posterior lateral thalamus in rats. *Neurosci Lett*. 2000;290(1):79-83.
9. Wasserman JK, Koeberle PD. Development and characterization of a hemorrhagic rat model of central post-stroke pain. *Neuroscience*. 2009;161(1):173-83.
10. Olivéras J-L, Montagne-Clavel J. The GABAA receptor antagonist picrotoxin induces a 'pain-like' behavior when administered into the thalamic reticular nucleus of the behaving rat: a possible model for 'central' pain? *Neurosci Lett*. 1994;179(1-2):21-4.
11. Araujo P, Tufik S, Andersen ML. Animal models of pain: best behavioral analysis for better translational research. *Pain*. 2013;154(7):968-9. Epub 2013/05/18.
12. Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, et al. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur J Pharmacol*. 2002;441(3):185-91.
13. Honore P, Luger NM, Sabino MAC, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, et al. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med*. 2000;6(5):521-8.
14. Wacnik PW, Baker CM, Herron MJ, Kren BT, Blazar BR, Wilcox GL, et al. Tumor-induced mechanical hyperalgesia involves CGRP receptors and altered innervation and vascularization of DsRed2 fluorescent hindpaw tumors. *Pain*. 2005;115(1-2):95-106.
15. Hidaka K, Ono K, Harano N, Sago T, Nunomaki M, Shiiba S, et al. Central glial activation mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model. *Neuroscience*. 2011;180(0):334-43.

16. Christianson CA, Corr M, Firestein GS, Mobargha A, Yaksh TL, Svensson CI. Characterization of the acute and persistent pain state present in K/BxN serum transfer arthritis. *Pain*. 2010;151(2):394-403.
17. Sluka KA, Rasmussen LA, Edgar MM, O'Donnell JM, Walder RY, Kolker SJ, et al. Acid-Sensing Ion Channel 3 Deficiency Increases Inflammation but Decreases Pain Behavior in Murine Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(5):1194-202.
18. Vincent TL, Williams RO, Maciewicz R, Silman A, Garside P, group ftARUamw. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. *Rheumatology*. 2012;51(11):1931-41.
19. Svensson CI, Inoue T, Hammaker D, Fukushima A, Papa S, Franzoso G, et al. Gadd45 β deficiency in rheumatoid arthritis: Enhanced synovitis through JNK signaling. *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(11):3229-40.
20. Stemler KM, Crock LW, Lai HH, Mills JC, Gereau Iv RW, Mysorekar IU. Protamine Sulfate Induced Bladder Injury Protects from Distention Induced Bladder Pain. *J Urol*. 2013;189(1):343-51.
21. Ambalavanar R, Yallampalli C, Yallampalli U, Dessem D. Injection of adjuvant but not acidic saline into craniofacial muscle evokes nociceptive behaviors and neuropeptide expression. *Neuroscience*. 2007;149(3):650-9.
22. Chacur M, Lambertz D, Hoheisel U, Mense S. Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: An immunohistochemical and behavioural study in rats. *European Journal of Pain*. 2009;13(9):915-23.
23. Diehl B, Hoheisel U, Mense S. Histological and neurophysiological changes induced by carrageenan in skeletal muscle of cat and rat. *Agents and Actions*. 1988;25(3-4):210-3.
24. Fujii 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*. 2008;140(2):292-304.
25. Han SR, Lee MK, Lim KH, Yang GY, Jeon HJ, Ju JS, et al. Intramuscular administration of morphine reduces mustard oil-induced craniofacial muscle pain behavior in lightly anesthetized rats. *European Journal of Pain*. 2008;12(3):361-70.
26. Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*. 2003;104(3):567-77.
27. Malm C, Nyberg P, Engström M, Sjödin B, Lenkei R, Ekblom B, et al. Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. *J Physiol*. 2000;529(1):243-62.
28. Berberich P, Hoheisel U, Mense S. Effects of a carrageenan-induced myositis on the discharge properties of group III and IV muscle receptors in the cat. *J Neurophysiol*. 1988;59(5):1395-409.
29. Hoheisel U, Mense S. Long-term changes in discharge behaviour of cat dorsal horn neurones following noxious stimulation of deep tissues. *Pain*. 1989;36(2):239-47.
30. Hoheisel U, Mense S, Simons DG, Yu X-M. Appearance of new receptive fields in rat dorsal horn neurons following noxious stimulation of skeletal muscle: a model for referral of muscle pain? *Neurosci Lett*. 1993;153(1):9-12.
31. Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2013. Epub 2013/09/17.

32. Minson FP. Ano internacional de Combate às Dores Musculoesqueléticas. *Jornal Dor*. 2009;34:7.
33. Dina OA, Green PG, Levine JD. Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. *Neuroscience*. 2008;152(2):521-5.
34. Kehl LJ, Fairbanks CA. Experimental animal models of muscle pain and analgesia. *Exerc Sport Sci Rev*. 2003;31(4):188-94.
35. Wacnik PW, Kehl LJ, Trempe TM, Ramnaraine ML, Beitz AJ, Wilcox GL. Tumor implantation in mouse humerus evokes movement-related hyperalgesia exceeding that evoked by intramuscular carrageenan. *Pain*. 2003;101(1-2):175-86.
36. Sanchez EM, Bagues A, Martin MI. Contributions of peripheral and central opioid receptors to antinociception in rat muscle pain models. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2010;96(4):488-95. Epub 2010/07/20.
37. Sluka KA, Kalra A, Moore SA. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve*. 2001;24(1):37-46.
38. Ferreira SH, Moncada S, Parsons M, Vane JR. Proceedings: the concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenin. *Br J Pharmacol*. 1974;52(1):108P-9P.
39. Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature*. 1973;246(5430):217-9.
40. Tsuji RF, Hoshino K, Noro Y, Tsuji NM, Kurokawa T, Masuda T, et al. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(2):249-58.
41. Gautam M, Benson CJ, Ranier JD, Light AR, Sluka KA. ASICs Do Not Play a Role in Maintaining Hyperalgesia Induced by Repeated Intramuscular Acid Injections. *Pain research and treatment*. 2012;2012:817347. Epub 2011/12/23.
42. Clarkson PM, Byrnes WC, McCormick KM, Turcotte LP, White JS. Muscle soreness and serum creatine kinase activity following isometric, eccentric, and concentric exercise. *Int J Sports Med*. 1986;7(3):152-5.
43. Devor ST, Faulkner JA. Regeneration of new fibers in muscles of old rats reduces contraction-induced injury. *J Appl Physiol*. 1999;87(2):750-6.
44. Newham DJ, Jones DA, Edwards RH. Plasma creatine kinase changes after eccentric and concentric contractions. *Muscle Nerve*. 1986;9(1):59-63.
45. Newham DJ, McPhail G, Mills KR, Edwards RH. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J Neurol Sci*. 1983;61(1):109-22.
46. Newham DJ, Mills KR, Quigley BM, Edwards RH. Pain and fatigue after concentric and eccentric muscle contractions. *Clin Sci (Lond)*. 1983;64(1):55-62.
47. Boix F, Roe C, Rosenborg L, Knardahl S. Kinin peptides in human trapezius muscle during sustained isometric contraction and their relation to pain. *J Appl Physiol*. 2005;98(2):534-40.
48. Roy SH, De Luca CJ, Casavant DA. Lumbar muscle fatigue and chronic lower back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1989;14(9):992-1001.
49. Baum K, Essfeld D. Origin of back pain during bedrest: A new hypothesis. *Eur J Med Res*. 1999;4(9):389-93.
50. Hedenberg-Magnusson B, Brodda Jansen G, Ernberg M, Kopp S. Effects of isometric contraction on intramuscular level of neuropeptide Y and local pain perception. *Acta Odontol Scand*. 2006;64(6):360-7.

51. Kosek E, Ekholm J, Hansson P. Modulation of pressure pain thresholds during and following isometric contraction in patients with fibromyalgia and in healthy controls. *Pain*. 1996;64(3):415-23.
52. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10. Epub 1983/06/01.
53. Tonussi CR, Ferreira SH. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain*. 1992;48(3):421-7.
54. da Silva FS, da Rocha FA. [Zymosan induced arthritis in rats--mechanisms involved in hypernociception and cartilage lyses]. *Acta Reumatol Port*. 2006;31(2):143-9. Artrite induzida por zymosan em ratos--mecanismos envolvidos na hipernocicepcao e na lise da cartilagem articular.
55. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1957;111(4):409-19.
56. Murase S, Terazawa E, Queme F, Ota H, Matsuda T, Hirate K, et al. Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed-onset muscle soreness). *J Neurosci*. 2010;30(10):3752-61.
57. 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*. 2005;564(Pt 1):259-68.
58. Taguchi T, Matsuda T, Mizumura K. Change with age in muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contraction in rats. *Neurosci Res*. 2007;57(3):331-8.
59. Kvien TK, Viktil K. Pharmacotherapy for regional musculoskeletal pain. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2003;17(1):137-50. Epub 2003/03/28.
60. Schafers M, Sorkin LS, Sommer C. Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. *Pain*. 2003;104(3):579-88. Epub 2003/08/21.
61. Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S, Mitchell D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8(2):127-36.
62. Ferreira SH, Cunha FQ, Lorenzetti BB, Michelin MA, Perretti M, Flower RJ, et al. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. *Br J Pharmacol*. 1997;121(5):883-8. Epub 1997/07/01.
63. Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *The American journal of physiology*. 1993;265(1 Pt 2):R166-72. Epub 1993/07/01.
64. MacIntyre DL, Reid WD, Lyster DM, McKenzie DC. Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. *European journal of applied physiology*. 2000;81(1-2):47-53. Epub 1999/11/07.
65. Cunha TM, Verri WA, Jr., Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *Journal of leukocyte biology*. 2008;83(4):824-32. Epub 2008/01/22.
66. Matre D, Arendt-Neilsen L, Knardahl S. Effects of localization and intensity of experimental muscle pain on ankle joint proprioception. *Eur J Pain*. 2002;6(4):245-60. Epub 2002/08/06.

3. Discussão Geral

No presente estudo, desenvolvemos um novo modelo de hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada e também demonstramos que este processo está relacionado com a inflamação.

Os dados de que a contração isométrica sustentada induziu hiperalgesia muscular em dois diferentes protocolos experimentais, utilizados para a quantificação da dor inflamatória, tais como Randall Selitto e TEP, confirmam o desenvolvimento da hiperalgesia muscular. A evolução temporal desta resposta é rápida, uma vez que 30 minutos após o fim da contração muscular, fomos capazes de quantificar uma hiperalgesia muscular significativa em ambos os protocolos; o pico da resposta foi de uma hora, e seguido de uma redução evidente logo após esse tempo. É interessante salientar que as mialgias posturais são caracterizadas por um processo doloroso crônico e, embora o nosso modelo tenha induzido apenas uma hora de dor muscular, no presente estudo apenas um episódio de contração isométrica sustentada foi realizado.

Algumas variáveis dos parâmetros utilizados em nosso estudo são similares a variáveis de outros estudos (51-53), que induziram contração muscular por estimulação elétrica para investigar a dor muscular tardia. Nestes estudos, foi utilizado 50Hz de frequência, o mesmo utilizado em nosso estudo. No entanto, a duração do pulso foi de 1 ms, enquanto que, em nosso estudo foi utilizado 19ms. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que o nosso modelo teve como objetivo induzir a contração isométrica sustentada por 1 hora (sem relaxamento), enquanto que nos outros estudos, a contração foi realizada por um ciclo de contração e relaxamento, com três segundos de contração e 1 segundo de relaxamento.

Testamos também a corrente contínua (sem intervalos entre os pulsos) a fim de obtermos a contração isométrica sustentada. Esse tipo de corrente é a mesma utilizada em protocolos fisioterapêuticos para gerar contração muscular involuntária, no entanto, ao ser aplicada no músculo gastrocnêmio de ratos, ela não se mostrou efetiva em manter o músculo em contração por um longo período de tempo. Acreditamos que essa um pequeno intervalo de tempo entre os pulsos, assim como estipulado em nosso protocolo, seja necessário para manter a homeostase das fibras celular.

Além de 1,6V, outras voltagens foram testadas e percebemos que voltagens maiores que 1,6 induziam uma contração muscular muito vigorosa e que por vezes acabava gerando lesões macroscópicas. Já voltagens menores que 1,6V, induziam uma contração muscular mais fraca, distante das contrações musculares decorrentes das atividades de vida diária, por isso então, optamos por 1,6V, uma vez que ela é capaz de produzir uma contração muscular mais próxima da realidade sem que haja lesões macroscópicas.

O método de Randall Selitto é realizado através da aplicação de uma força linear gradual diretamente sobre a pele que recobre o músculo gastrocnêmio, portanto, para excluir o envolvimento do tecido subcutâneo e confirmar o envolvimento do tecido muscular nas respostas comportamentais avaliadas por este método, utilizamos o QX314. Vale salientar que o QX314 é um derivado quaternário de lidocaína que não atravessa a barreira hematoencefálica, confirmando, portanto, o carácter nociceptivo e periférico dessas respostas.

Foi demonstrado que a dor muscular está associada a um processo inflamatório, uma vez que as drogas anti-inflamatórias reduzem a dor muscular (65) e que a concentração de citocinas pró-inflamatórias é aumentada no tecido muscular de pacientes com dor muscular (66, 67). Está bem descrito na literatura que os glicocorticóides, tal como a dexametasona, inibem tanto as alterações precoces, quanto tardias, que contribuem para o processo inflamatório (68). Portanto, os nossos resultados de que o pré-tratamento com a dexametasona previne a hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada, confirmam o envolvimento de mecanismos inflamatórios nesta resposta. Além disso, a análise histológica do tecido muscular 1 hora após as contrações isométricas sustentadas demonstraram o envolvimento de células inflamatórias neste processo. Esses dados são confirmados por estudos que demonstraram a presença de células inflamatórias no tecido muscular de pessoas após contrações musculares extenuantes (69, 70). Tem sido demonstrado que algumas células inflamatórias, como os macrófagos e os neutrófilos, medeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (71, 72), que acabam por induzir a liberação de mediadores finais responsáveis pela dor inflamatória. Estes mediadores finais, tais como os prostanoídes ou aminas simpatomiméticas, agem diretamente sobre os nociceptores, provocando hiperalgesia (73, 74). Juntos, estes dados sugerem que a hiperalgesia induzida pela contração muscular isométrica sustentada e prevenida pelo pré-tratamento com dexametasona e QX 314, possui

caráter inflamatório e nociceptivo, com a presença de células inflamatórias no tecido muscular.

4. CONCLUSÃO GERAL

Juntos, estes dados sugerem que esse novo modelo de hiperalgesia muscular se aproxima de uma condição mais próxima da real encontrada nas dores musculares decorrentes das atividades diárias, além de possuir um grande potencial científico para os estudos dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor muscular relacionada à contração isométrica sustentada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. Pain Supplement. 1986;3:S1-226. Epub 1986/01/01.
2. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. Progress in neurobiology. 1999;57(1):1-164. Epub 1999/02/13.
3. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. Nature. 2001;413(6852):203-10. Epub 2001/09/15.
4. Burke RE. Sir Charles Sherrington's the integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. Brain : a journal of neurology. 2007;130(Pt 4):887-94. Epub 2007/04/18.
5. Burgess PR, Perl ER. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. J Physiol. 1967;190(3):541-62. Epub 1967/06/01.
6. Stacey MJ. Free nerve endings in skeletal muscle of the cat. J Anat. 1969;105(Pt 2):231-54. Epub 1969/09/01.
7. Mense S, Gerwin RD. Muscle Pain: Understanding the Mechanisms. Springer. 2010.
8. Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. British journal of anaesthesia. 2001;87(1):3-11. Epub 2001/07/20.
9. Dennis SG, Melzack R. Pain-signalling systems in the dorsal and ventral spinal cord. Pain. 1977;4(2):97-132. Epub 1977/12/01.
10. Besson JM, Chaouch A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. Physiological reviews. 1987;67(1):67-186. Epub 1987/01/01.
11. Milne RJ, Foreman RD, Giesler GJ, Jr., Willis WD. Convergence of cutaneous and pelvic visceral nociceptive inputs onto primate spinothalamic neurons. Pain. 1981;11(2):163-83. Epub 1981/10/01.
12. Tasker RR, Gorecki J, Lenz FA, Hirayama T, Dostrovsky JO. Thalamic microelectrode recording and microstimulation in central and deafferentation pain. Applied neurophysiology. 1987;50(1-6):414-7. Epub 1987/01/01.

13. Oliveira MC, Parada CA, Veiga MC, Rodrigues LR, Barros SP, Tambeli CH. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. *Eur J Pain*. 2005;9(1):87-93. Epub 2005/01/05.
14. Alstergren P, Kopp S. Prostaglandin E2 in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2000;58(2):180-6; discussion 6-8. Epub 2000/02/12.
15. Kopp S. Neuroendocrine, immune, and local responses related to temporomandibular disorders. *Journal of orofacial pain*. 2001;15(1):9-28. Epub 2002/03/14.
16. Cunha TM, Verri WA, Jr., Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(5):1755-60. Epub 2005/01/25.
17. Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Current neuropharmacology*. 2006;4(3):197-206. Epub 2008/07/11.
18. Verri WA, Jr., Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacology & therapeutics*. 2006;112(1):116-38. Epub 2006/05/30.
19. Nakamura M, Ferreira SH. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*. 1987;135(2):145-53. Epub 1987/03/17.
20. England S, Bevan S, Docherty RJ. PGE(2) modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol-London*. 1996;495(2):429-40.
21. Gold MS, Levine JD, Correa AM. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci*. 1998;18(24):10345-55. Epub 1998/12/16.
22. Fein A. Nociceptores: As células que sentem dores. *Dor On Line*. 2011.
23. Lewin GR, Lu Y, Park TJ. A plethora of painful molecules. *Current opinion in neurobiology*. 2004;14(4):443-9. Epub 2004/08/24.
24. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008;137(3):473-7. Epub 2008/06/28.

25. Mense S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain*. 1993;54(3):241-89.
26. Mense S, Meyer H. Bradykinin-induced modulation of the response behaviour of different types of feline group III and IV muscle receptors. *J Physiol*. 1988;398:49-63. Epub 1988/04/01.
27. Fock S, Mense S. Excitatory effects of 5-hydroxytryptamine, histamine and potassium ions on muscular group IV afferent units: a comparison with bradykinin. *Brain research*. 1976;105(3):459-69. Epub 1976/04/09.
28. Noma N, Shinoda M, Honda K, Kiyomoto M, Dezawa K, Nakaya Y, et al. Interaction of IL-1beta and P2X(3) receptor in pathologic masseter muscle pain. *Journal of dental research*. 2013;92(5):456-60. Epub 2013/03/23.
29. Dessem D, Ambalavanar R, Evancho M, Moutanni A, Yallampalli C, Bai G. Eccentric muscle contraction and stretching evoke mechanical hyperalgesia and modulate CGRP and P2X(3) expression in a functionally relevant manner. *Pain*. 2010;149(2):284-95. Epub 2010/03/09.
30. Shinoda M, Ozaki N, Sugiura Y. Involvement of ATP and its receptors on nociception in rat model of masseter muscle pain. *Pain*. 2008;134(1-2):148-57. Epub 2007/05/25.
31. von Frey M. Untersuchungen über die sinnesfunctionen der menschlichen haut: 1. abhandlung: Druckempfindung und schmerz: S. Hirzel; 1896.
32. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21(3):531-43. Epub 1998/10/13.
33. Simone DA, Baumann TK, LaMotte RH. Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain*. 1989;38(1):99-107.
34. Sluka KA. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(13):5687-93.
35. Parvathy S, Masocha W. Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis using the CatWalk system. *BMC Musculoskeletal Disord*. 2013;14(1):14.
36. Willis W, Jr. The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. *Exp Brain Res*. 2009;196(1):5-11.

37. O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacological reviews*. 2012;64(4):939-71. Epub 2012/10/02.
38. Dina OA, Green PG, Levine JD. Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. *Neuroscience*. 2008;152(2):521-5.
39. Kehl LJ, Fairbanks CA. Experimental animal models of muscle pain and analgesia. *Exerc Sport Sci Rev*. 2003;31(4):188-94.
40. Wacnik PW, Kehl LJ, Trempe TM, Ramnaraine ML, Beitz AJ, Wilcox GL. Tumor implantation in mouse humerus evokes movement-related hyperalgesia exceeding that evoked by intramuscular carrageenan. *Pain*. 2003;101(1-2):175-86.
41. Sanchez EM, Bagues A, Martin MI. Contributions of peripheral and central opioid receptors to antinociception in rat muscle pain models. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2010;96(4):488-95. Epub 2010/07/20.
42. Sluka KA, Kalra A, Moore SA. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve*. 2001;24(1):37-46.
43. Ferreira SH, Moncada S, Parsons M, Vane JR. Proceedings: the concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenin. *Br J Pharmacol*. 1974;52(1):108P-9P.
44. Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature*. 1973;246(5430):217-9.
45. Rush AM, Waxman SG. PGE2 increases the tetrodotoxin-resistant Nav1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins. *Brain research*. 2004;1023(2):264-71. Epub 2004/09/18.
46. Ferreira SH, Lorenzetti BB, Cunha FQ, Poole S. Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. *Agents Actions*. 1993;38 Spec No:C7-9. Epub 1993/01/01.
47. Cunha FQ, Lorenzetti BB, Poole S, Ferreira SH. Interleukin-8 as a Mediator of Sympathetic Pain. *Brit J Pharmacol*. 1991;104(3):765-7.
48. Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*. 1992;107(3):660-4. Epub 1992/11/01.
49. Lorenzetti BB, Veiga FH, Canetti CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic

component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. European cytokine network. 2002;13(4):456-61. Epub 2003/01/09.

50. Tsuji RF, Hoshino K, Noro Y, Tsuji NM, Kurokawa T, Masuda T, et al. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. Clin Exp Allergy. 2003;33(2):249-58.

51. Murase S, Terazawa E, Queme F, Ota H, Matsuda T, Hirate K, et al. Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed-onset muscle soreness). J Neurosci. 2010;30(10):3752-61.

52. Taguchi T, Matsuda T, Mizumura K. Change with age in muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contraction in rats. Neurosci Res. 2007;57(3):331-8.

53. 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. 2005;564(Pt 1):259-68.

54. Capra NF, Ro JY. Human and animal experimental models of acute and chronic muscle pain: intramuscular algescic injection. Pain. 2004;110(1-2):3-7. Epub 2004/07/28.

55. Sluka KA. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. J Neurosci. 2002;22(13):5687-93. Epub 2002/07/05.

56. Ro JY, Harriott A, Crouse U, Capra NF. Innocuous jaw movements increase c-fos expression in trigeminal sensory nuclei produced by masseter muscle inflammation. Pain. 2003;104(3):539-48. Epub 2003/08/21.

57. Imbe H, Dubner R, Ren K. Masseteric inflammation-induced Fos protein expression in the trigeminal interpolaris/caudalis transition zone: contribution of somatosensory-vagal-adrenal integration. Brain research. 1999;845(2):165-75. Epub 1999/10/28.

58. Linnamo V, Moritani T, Nicol C, Komi PV. Motor unit activation patterns during isometric, concentric and eccentric actions at different force levels. Journal of electromyography and kinesiology : official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology. 2003;13(1):93-101. Epub 2002/12/19.

59. Nordin MF, V.H. Biomecânica básica do sistema musculoesquelético Guanabara Koogan. 2001;3.ed.

60. Boix F, Roe C, Rosenborg L, Knardahl S. Kinin peptides in human trapezius muscle during sustained isometric contraction and their relation to pain. *J Appl Physiol*. 2005;98(2):534-40.
61. Roy SH, De Luca CJ, Casavant DA. Lumbar muscle fatigue and chronic lower back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1989;14(9):992-1001.
62. Baum K, Essfeld D. Origin of back pain during bedrest: A new hypothesis. *Eur J Med Res*. 1999;4(9):389-93.
63. Hedenberg-Magnusson B, Brodda Jansen G, Ernberg M, Kopp S. Effects of isometric contraction on intramuscular level of neuropeptide Y and local pain perception. *Acta Odontol Scand*. 2006;64(6):360-7.
64. Kosek E, Ekholm J, Hansson P. Modulation of pressure pain thresholds during and following isometric contraction in patients with fibromyalgia and in healthy controls. *Pain*. 1996;64(3):415-23.
65. Kvien TK, Viktil K. Pharmacotherapy for regional musculoskeletal pain. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2003;17(1):137-50. Epub 2003/03/28.
66. Schafers M, Sorkin LS, Sommer C. Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. *Pain*. 2003;104(3):579-88. Epub 2003/08/21.
67. Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S, Mitchell D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8(2):127-36.
68. Ferreira SH, Cunha FQ, Lorenzetti BB, Michelin MA, Perretti M, Flower RJ, et al. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. *Br J Pharmacol*. 1997;121(5):883-8. Epub 1997/07/01.
69. Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *The American journal of physiology*. 1993;265(1 Pt 2):R166-72. Epub 1993/07/01.
70. MacIntyre DL, Reid WD, Lyster DM, McKenzie DC. Different effects of strenuous eccentric exercise on the accumulation of neutrophils in muscle in women and men. *European journal of applied physiology*. 2000;81(1-2):47-53. Epub 1999/11/07.

71. Cunha TM, Verri WA, Jr., Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *Journal of leukocyte biology*. 2008;83(4):824-32. Epub 2008/01/22.
72. Matre D, Arendt-Neilsen L, Knardahl S. Effects of localization and intensity of experimental muscle pain on ankle joint proprioception. *Eur J Pain*. 2002;6(4):245-60. Epub 2002/08/06.
73. Ambalavanar R, Yallampalli C, Yallampalli U, Dessem D. Injection of adjuvant but not acidic saline into craniofacial muscle evokes nociceptive behaviors and neuropeptide expression. *Neuroscience*. 2007;149(3):650-9.
74. Devor ST, Faulkner JA. Regeneration of new fibers in muscles of old rats reduces contraction-induced injury. *J Appl Physiol*. 1999;87(2):750-6.

6. ANEXO I

6.1. Formulário do comitê de ética no uso de animais



UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Desenvolvimento de um novo modelo de hiperalgesia muscular" (protocolo nº 2769-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cláudia G. Oliveira Fusaro / Diogo Francisco da Silva dos Santos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 25 de junho de 2012.

Campinas, 25 de junho de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva