

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

DANIEL TASSINARI FELBER

**EFEITOS DO AGULHAMENTO SECO EM UM MODELO DE DOR
MUSCULAR INDUZIDA EM RATOS**

Uruguaiana

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

DANIEL TASSINARI FELBER

**EFEITOS DO AGULHAMENTO SECO EM UM MODELO DE DOR
MUSCULAR INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dr^a. Morgana Duarte da Silva.

Coorientadora: Profa. Dr^a. Andréia Caroline Fernandes Salgueiro.

Uruguaiana

2019

DANIEL TASSINARI FELBER

**EFEITOS DO AGULHAMENTO SECO EM UM MODELO DE DOR
MUSCULAR INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Ciências Biológicas II.

Dissertação defendida e aprovada em: 21 de janeiro de 2019.

Banca Examinadora:

Profa. Dr^a. Morgana Duarte da Silva
Orientadora
(PMPGCF / Unipampa)

Profa. Dr^a. Andréia Caroline Fernandes Salgueiro
Coorientadora
(PPG Bioquímica / Unipampa)

Prof. Dr. Leonardo Magno Rambo
Membro Titular
(PPG Bioquímica / Unipampa)

Profa. Dr^a. Lidiane Dal Bosco
Membro Titular
(PMPGCF / Unipampa)

"Um homem com novas ideias é um homem louco, até que as suas ideias triunfam."

Marcelo Bielsa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Luísa, minha namorada, companheira, incentivadora e porto seguro, obrigado por me aguentar, respeitar e estar sempre ao meu lado, te amo!

Aos meus pais Danilo e Nara pela minha formação pessoal, minha família pelo apoio, carinho e por acreditarem em mim.

À professora Dr^a Morgana Duarte da Silva, por acreditar na minha ideia, pela valorosa orientação, compreensão e por ter me aberto portas. Obrigado pelas palavras de incentivo, dedicação, aprendizado e amizade.

À professora Dr^a Andreia Caroline Fernandes Salgueiro, pela paciência, orientação e pela viabilização dos meus experimentos.

Aos colegas de pesquisa, em especial ao Rafael e à Caroline, pelo apoio, mão-de-obra e auxílio nos experimentos.

Aos amigos do PMPGCF da Unipampa, pela troca de conhecimento, trabalhos em conjunto, discussões e momentos de diversão.

Aos colegas e amigos do Multicêntrico, pela acolhida nas unidades nucleadoras, pelos momentos de aprendizado e descontração.

Aos colegas de clínica e do hospital, por me apoiarem durante a construção deste trabalho, por compreenderem a minha ausência e pelo convívio diário.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

A síndrome de dor miofascial (SDM) é uma desordem musculoesquelética que poderá estar presente em até 85% das pessoas em alguma fase da vida, causando elevados custos diretos e indiretos com saúde. Há evidências que indicam um aumento do estresse oxidativo nos locais onde se encontram os pontos-gatilho (PG), sendo a presença de PG palpáveis na banda muscular o principal sinal clínico apresentado. A fisioterapia vem aplicando várias técnicas com o objetivo de reduzir os sintomas de dor, melhorar a força e funcionalidade dos pacientes com SDM, sendo o agulhamento seco uma das abordagens em ascensão. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos do agulhamento seco em um modelo de dor muscular em ratos sob a hiperalgesia térmica e mecânica, atividade locomotora e funcional e estresse oxidativo. No total, foram utilizados 48 ratos *Wistar* (machos, 250-300g, 8 semanas de idade) sendo divididos em seis grupos: controle salina – que recebeu a injeção de salina com pH 7.0; salina ácida – que recebeu a injeção de salina com pH 4.0; controle positivo Pregabalina – que recebeu a injeção de salina com pH 4.0 e tratamento com Pregabalina i.p. (20 mg/Kg); agulhamento profundo - que recebeu a injeção de salina com pH 4.0 e tratamento com agulhamento seco profundo; agulhamento superficial - que recebeu a injeção de salina com pH 4.0 e tratamento com agulhamento seco superficial; e agulhamento *twitch* - que recebeu a injeção de salina com pH 4.0 e agulhamento seco *twitch*. Foram avaliadas a hiperalgesia térmica, mecânica e edema, as características de locomoção, força e funcionalidade e o estresse oxidativo. Verificamos que os grupos que receberam tratamento apresentaram força e funcionalidade significativamente melhor que o grupo que recebeu salina ácida ($p < 0,01$); O grupo que recebeu tratamento com pregabalina apresentou uma significativa redução nas atividades locomotora e exploratória ($p < 0,05$) e, o grupo que recebeu tratamento com agulhamento *twitch* apresentou um aumento significativo da resposta antioxidante ($p < 0,01$). Este estudo demonstrou que o agulhamento seco melhora a força, funcionalidade e atividade locomotora no modelo de dor proposto; ainda, verificamos que a modalidade *twitch* apresenta efeito antioxidante local.

Palavras-chave: Síndrome de dor miofascial, ponto-gatilho, estresse oxidativo, agulhamento seco, fisioterapia

ABSTRACT

Myofascial pain syndrome (MPS) is a musculoskeletal disorder that can be present in up to 85% of people at some stage of life, causing high direct and indirect health costs. There are evidences that indicate an increase in oxidative stress in the places where the trigger points (TP) are found, being the presence of TP palpable in the muscular band the main clinical sign presented. Physical therapy has been applying several techniques with the aim of reducing pain symptoms, the strength and functionality of patients with MPS, with dry needling being one of the approaches that are on the rise. In this way, the objective of this study was to verify the effects of dry needling on a muscular pain model in rats under thermal and mechanical hyperalgesia, locomotor and functional activity and oxidative stress. In total, 48 Wistar rats (male, 250-300g, 8 weeks old) were divided into six groups: saline control - which received saline injection at pH 7.0; acid saline - which received saline injection at pH 4.0; positive control Pregabalin - which received saline injection at pH 4.0 and treatment with Pregabalin i.p. (20 mg / kg); deep needling - which received saline injection at pH 4.0 and treatment with deep dry needling; superficial needling - that received saline injection with pH 4.0 and treatment with superficial dry needling; and twitching needles - which received the injection of saline with pH 4.0 and dry needling twitch. Thermal, mechanical and edema hyperalgesia, locomotor, strength and functional characteristics and oxidative stress were evaluated. We verified that the groups that received treatment had significantly better strength and functionality than the group that received acidic saline ($p < 0.01$); The group receiving pregabalin treatment had a significant reduction in locomotor and exploratory activities ($p < 0.05$), and the group receiving treatment with twitch needle showed a significant increase in the antioxidant response ($p < 0.01$). This study demonstrated that dry needling improves strength, functionality and locomotor activity in the proposed pain model; still, we verified that the twitch modality presents local antioxidant effect.

Keywords: myofascial pain syndrome; trigger point; oxidative stress; dry needling, physical therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modalidades de aplicação do agulhamento seco.

Figura 2: Linha temporal com indicação dos principais eventos que compuseram o delineamento experimental do presente estudo.

Figura 3: Avaliação comportamental de hiperalgesia térmica e mecânica.

Figura 4: Avaliação comportamental de força através da preensão plantar dos animais.

Figura 5: Avaliação locomotora pelo teste de campo aberto (*Open Field*).

Figura 6: Análise de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

Figura 7: Ciclo sugerido da oxidação-redução da glutathiona na SDM.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ADM – Amplitude de movimento
ADPR - ADP-ribose
ASIC – Canais iônicos sensíveis ao ácido
ASIC3 – Canais iônicos sensíveis ao ácido subtipo 3
ATP – Trifosfato de adenosina
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP – Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GR – Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona
GSH-Px – Glutaciona peroxidase
GSSG – Glutaciona oxidada
IASTM – Liberação miofascial instrumental
LP – Peroxidação Lipídica
MPS – Myofascial Pain Syndrome
PG – Ponto-gatilho
PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SDM – Síndrome de Dor Miofascial
SFC – Síndrome de fadiga crônica
SNC – Sistema Nervoso Central
TBA-RS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TENS – Estimulação elétrica transcutânea
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TP – Trigger point
TRP – Potencial receptor transiente
TRPM2 - Potencial receptor transiente melastatina 2
TRPV1 – Potencial receptor transiente vanilóide 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Síndrome de dor miofascial	14
2.2	Pontos-gatilho miofasciais	16
2.3	Estresse oxidativo e dor muscular	18
2.4	Tratamento da SDM.....	20
	2.4.1 Tratamento farmacológico	20
	2.4.2 Fisioterapia	20
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Animais experimentais	24
4.2	Indução de dor muscular.....	24
4.3	Desenho experimental.....	24
4.4	Avaliações comportamentais	25
	4.4.1 Hiperalgisia mecânica	25
	4.4.2 Hiperalgisia térmica ao frio	26
	4.4.3 Edema	26
	4.4.4 Força e funcionalidade	26
	4.4.5 Termografia	27
	4.4.6 Locomoção	27
4.5	Tratamento	27
	4.5.1 Farmacológico	27
	4.5.2 Agulhamento seco	28
4.6	Avaliação de estresse oxidativo	28
	4.6.1 Preparo do tecido muscular	28
	4.6.2 Determinação dos níveis de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)	28
	4.6.3 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH) total	29
4.7	Análise estatística	29
5	RESULTADOS	30
6	DISCUSSÃO.....	33

7 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO I.....	43

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de dor miofascial (SDM) é uma das principais causas de dor muscular referida pela população mundial, estima-se que esta queixa atinja até 80% da população em algum período da vida tanto de forma aguda quanto crônica (BENNETT; GOLDENBERG, 2011; FLECKENSTEIN et al., 2010). Quando observamos as condições crônicas, a SDM surge como uma forma de mialgia, acometendo os músculos, tecido conectivo e a fáscia muscular, gerando espasmos musculares, redução da força e mobilidade, hiperalgesia local e irradiada (SIMONS, 2002).

A SDM é amplamente subdiagnosticada e conseqüentemente subtratada (SIMONS, 2002). Seus sintomas estão relacionados à presença de pontos-gatilho (PG) miofasciais, que são nódulos dolorosos hipersensíveis e palpáveis presentes em bandas musculares tensas (SIMONS; MENSE, 2003). A tensão muscular gerada pelos PG acarreta em um desalinhamento estrutural da fáscia, alterando a biomecânica muscular e conseqüentemente diminuindo a capacidade de geração de força e a coordenação motora (MYERS, 2008). Estes PG miofasciais são a principal característica da SDM, pois não apresentam princípio inflamatório (SIMONS et al., 1999), tendo como origem a manutenção de posturas incorretas, sobrecarga de treinamentos, tensão muscular ou associado à alguma condição clínica pré-existente (SHAH et al., 2015). Os PG miofasciais podem ser classificados como ativos ou latentes conforme a sintomatologia apresentada, os ativos são caracterizados por causar dor espontânea e constante, já os latentes são considerados clinicamente silenciosos, causando limitação do movimento ativo e da força, reduzindo a funcionalidade (SIMONS et al., 1999).

Estudos observaram a falta de substâncias antioxidantes em pacientes que apresentavam PG, sugerindo um estado oxidativo constante. A dor pode ser mantida ou iniciada pelo aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial e uma diminuição na atividade da Glutathiona peroxidase (GSH-Px) no músculo ou na fáscia, pois tais alterações são conhecidas por estarem implicadas na etiologia da dor na fibromialgia (AKKUS et al., 2009; FISCHER et al., 2018; NAZIROGLU et al., 2010; SANCHEZ-DOMINGUEZ et al., 2015).

A fisioterapia tem papel importante no tratamento da SDM, utilizando diversas técnicas para redução dos sintomas e recuperação da funcionalidade. Dentre os recursos aplicados citamos a compressão isquêmica, massoterapia, mobilizações, alongamentos,

exercícios físicos, laserterapia de baixa potência, estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS), liberação posicional, acupuntura, alongamento muscular e agulhamento seco (CUMMINGS; BALDRY, 2007; LIST; AXELSSON, 2010; SIMONS, 2002).

O agulhamento seco surge como uma alternativa interessante para o tratamento da SDM, sendo amplamente utilizado por profissionais fisioterapeutas em todo o mundo. Acredita-se que o agulhamento seco é capaz de promover redução da dor e apresentar melhoras funcionais imediatas nos pacientes (DE CARVALHO et al., 2017; DOMMERHOLT et al., 2018; GATTIE; CLELAND; SNODGRASS, 2017). A técnica do agulhamento seco consiste na inserção de uma agulha diretamente no PG miofascial, podendo ser realizada em três diferentes modalidades, sendo caracterizadas como agulhamento superficial, profundo e *twitch* (BALDRY, 2005; HONG; TORIGOE, 1994; RODRIGUEZ-MANSILLA et al., 2016). Os efeitos fisiológicos da técnica ainda não foram totalmente esclarecidos, no entanto, alguns autores relacionam os efeitos de redução da tensão muscular, e conseqüentemente da dor, à uma resposta vascular local que promove aumento do fluxo sanguíneo e remoção dos catabólitos (DE CARVALHO et al., 2017; FERNANDEZ-CARNERO et al., 2017; MAHER, 2004).

Considerando as modalidades de agulhamento, nos propomos a comparar os efeitos das diferentes aplicações em um modelo de dor muscular não inflamatória induzida em ratos, tendo como objetivo elucidar as diferenças quanto a funcionalidade, mobilidade e os sintomas hiperalgésicos, assim como parâmetros oxidativos musculares presentes após tratamento com agulhamento seco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Síndrome de dor miofascial

Os primeiros registros sobre dor miofascial são datados de 1600, descritos por Guillaume de Baillou. Balfour, em 1816, referiu a denominação de “tumores nodulares” ao que hoje conhecemos como PG. Posteriormente, estas estruturas foram denominadas por Froriep, em 1843, como um acúmulo de tecido conjuntivo doloroso. Esta estrutura passou a ser considerada uma condição inflamatória por Gowers em 1904 e, juntamente com estudos de outros cientistas que em 1900 identificaram áreas dolorosas quando estimuladas com salina hipertônica, inspiraram Janet Travell a elaborar o termo ponto-gatilho miofascial (SHAH et al., 2015).

Segundo Simons et al. (1999) a SDM pode ser descrita como os sintomas sensoriais, motores e autonômicos causados pela presença de PG palpável na banda muscular tensa (SIMONS et al., 1999). Trata-se de uma síndrome clínica iniciada a partir de um processo de dor aguda presente no sistema musculoesquelético, sendo caracterizada como primária, quando não está relacionada a outras condições clínicas, ou secundária, quando associada (BRUCE, 1995; COUTO et al., 2014). O sistema musculoesquelético compreende o tecido muscular contrátil, tecido conjuntivo, tecido nervoso e vascular e o sistema linfático (BORDONI; BORDONI, 2015). Estas diferentes estruturas trabalham sinergicamente para compor o sistema miofascial, formando uma rede de conexão entre os músculos e os tecidos adjacentes (KRAUSE et al., 2016; WILKE et al., 2016).

Os mecanismos de dor na SDM ainda são bastante complexos pois nenhuma teoria pode explicar completamente as quatro características da dor miofascial - bandas tensas, sensibilidade local, espasmos musculares locais e o padrão característico da dor referida (ELOQAYLI, 2018). No entanto, várias hipóteses são consideradas, como a de que pequenos microtraumas, causados por esforço muscular ou lesões, contribuem para um localizado e progressivo aumento do metabolismo oxidativo e do esgotamento do fornecimento de energia, especialmente pela redução de trifosfato de adenosina (ATP). O resultado deste ambiente é o aumento de subprodutos metabólicos e a nocicepção muscular na periferia, ocasionando dor local e/ou referida. As alterações do ambiente fazem com que ocorra sensibilização local e a nocicepção de origem muscular possa ser

ocasionada por várias substâncias comuns ao meio, como ácidos e substâncias inflamatórias (SIMONS, 1981; TRAVELL, J., 1976; TRAVELL, J. G.; SIMONS, 1983).

A sensibilização periférica pode ser favorecida pela liberação de diversos neuropeptídeos como a substância P, serotonina, acetilcolina (ACh) e até endorfinas. Nesta ocasião, pode ocorrer também ativação de terminações do tipo III e V muscular causando ainda aumento da rigidez muscular (LIM; GUZMAN; RODGERS, 1962; MELZACK, 1981; MENSE; SCHMIDT, 1977). Os danos musculares parecem acontecer principalmente nas placas motoras, e essa crise energética é observada no local do PG. A crise energética ainda é associada a um aumento grosseiramente anormal na liberação de acetilcolina na placa terminal do músculo, resultando em outro aumento na demanda de energia, despolarização sustentada da membrana pós-junção e alterações na função mitocondrial (SIMONS, 1997). Estando este ambiente mecanometabólico alterado, os fibroblastos mudam suas propriedades, transformando-se em miofibroblastos favorecendo assim o encurtamento dos tecidos e o aumento do tônus local (BORDONI et al., 2018).

Alterações nas propriedades do hialuronano alteram a viscosidade da matriz extracelular (STECCO et al., 2013), prejudicando o deslizamento das fáscias, ativando constantemente as terminações nervosas das áreas mais viscosas, gerando nocicepção e consequente dor ao indivíduo (BRON; DOMMERHOLT, 2012). Além destas alterações, o aumento da rigidez muscular promove uma resistência ao fluxo sanguíneo, promovendo isquemia durante pequenos movimentos, ativando as terminações do tipo IV muscular (BRON; DOMMERHOLT, 2012).

A dor musculoesquelética difusa encontrada na SDM resulta em alterações do sistema nervoso central (SNC) em seres humanos e em modelos animais. Periféricamente, a ativação de canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), especialmente o subtipo 3 (ASIC3) é necessária para o desenvolvimento de dores musculares generalizadas, porque ele parece desempenhar um papel crítico no desenvolvimento de hiperalgesia após a injeção repetida de ácido intramuscular ou inflamação do tecido profundo. Alterações centrais também são críticas para o desenvolvimento de dor muscular generalizada e provavelmente refletem alterações na modulação supra-espinal da nocicepção. As alterações encontradas no SNC incluem aumento na excitabilidade neuronal e diminuição nas vias de modulação inibitória da dor, que resultam em sensibilização central e consequente dor e hiperalgesia (DESANTANA; SLUKA, 2008).

Estes mecanismos tornam a SDM uma condição importante, que poderá estar presente em até 85% da população pelo menos uma vez durante a vida (BOURGAIZE et al., 2018), mesmo assim é comumente negligenciada na prática clínica (SIMONS et al., 1999). Nos Estados Unidos, a SDM acomete em cerca de 9 milhões de pessoas ao ano e estima-se que esta mesma demanda seja encontrada no Canadá (SHAH et al., 2015). Por se tratar de uma síndrome de prevalência semelhante entre homens e mulheres, a SDM representa um fardo econômico e social considerável. As doenças musculoesqueléticas em 2008 no Canadá corresponderam a um montante de aproximadamente 5,8 bilhões de dólares canadenses com custo direto e indireto (CANADA, 2008), já nos Estados Unidos em 2010 estimou-se que o montante financeiro que envolveu esta afecção correspondeu a mais de 560 bilhões de dólares, considerando despesas diretamente com a saúde, perda de renda e produtividade (IOM, 2011).

Modelos experimentais de dor generalizada crônica, que tentam mimetizar uma disfunção muscular / isquemia, sensibilização central e déficit nos sistemas moduladores endógenos de dor em ratos e camundongos são descritos na literatura. O modelo animal de hiperalgesia muscular crônica induzida por duas injeções intramusculares de solução salina ácida foi desenvolvido no intuito de estudar as dores musculares não inflamatórias. Este modelo tem características únicas porque nele consegue-se induzir hiperalgesia mecânica bilateral de longa duração da pata, músculo e vísceras; também porque não há dano tecidual periférico; além disso, a hiperalgesia é mantida por alterações no SNC (DESANTANA; SLUKA, 2008; SKYBA; KING; SLUKA, 2002; SKYBA; LISI; SLUKA, 2005; SLUKA; KALRA; MOORE, 2001; TILLU; GEBHART; SLUKA, 2008).

2.2 Pontos-gatilho miofasciais

Um PG miofacial é definido clinicamente como um ponto hipersensível com a presença de um nódulo palpável em uma banda tensa no músculo esquelético. Este ponto irritável é doloroso à compressão, podendo gerar dor referida, sensibilidade, alteração de funcionalidade e força. Os PG ativos são aqueles que apresentam dor espontânea e quando comprimidos reproduzem sintomas habituais, os PG latentes são pontos considerados silenciosos, e quando testados não apresentam qualquer sintoma antes referido pelo paciente (SIMONS et al., 1999). Mesmo tendo características morfológicas semelhantes, bioquimicamente os PG ativos apresentam níveis mais altos de bradicinina, serotonina e

níveis diferentes em vários outros mediadores químicos quando comparado aos PG latentes (SHAH et al., 2008; SHAH et al., 2005). Os PG podem ser o problema primário da dor miofascial ou secundário a uma doença primária (HOWITT; WONG; ZABUKOVEC, 2006) (ELOQAYLI, 2018).

A contração muscular prolongada pela formação do PG induz isquemia local, reduzindo assim o pH e criando um ambiente ácido. A acidez do meio reduz a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e aumenta a ação da acetilcolina (ACh), esta atividade permite a contração prolongada e leva a um ciclo vicioso para manutenção deste ambiente alterado. O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) tem sua liberação facilitada, aumentando o número de receptores ACh implementando assim a formação do PG (BRON; DOMMERHOLT, 2012). Outra alteração observada em relação ao PG é que a sua presença não permite à enzima ATPase retirar o cálcio presente nas fibras musculares, ocorrendo um acúmulo de cálcio local e consequente manutenção da contração muscular. Estas condições tornam o citoplasma um ambiente citotóxico, estimulando uma resposta inflamatória com aumento da bradicinina, CGRP, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), substância P, interleucinas inflamatórias, noradrenalina e serotonina, promovendo assim o envio de informações dolorosas ao sistema nervoso (SIMONS, 2008). Em estudo de Fischer et al. foi observada a falta de substâncias antioxidantes em pacientes que apresentavam PG, sugerindo um estado oxidativo constante e consequentemente um ambiente inflamatório sistêmico (FISCHER et al., 2018).

Estando estes estímulos em um caráter contínuo, pode ocorrer um aumento da excitabilidade neuronal gerando uma sensibilização central alterando a atividade das vias para controle da dor (BOURGAIZE et al., 2018). Acredita-se ainda que os PG possuam um sistema multineuronal subcutâneo, conectando um PG a outro através das camadas da fáscia, sugerindo ainda a conexão desta via ao sistema autônomo por meio da cadeia simpática paravertebral, este mecanismo vem sendo descrito como sistema de dor acessória subcutânea (ELOQAYLI, 2018). Este conceito de atividade elétrica alterada da pele está ligado a comportamentos de ansiedade e depressão em pacientes com dor miofascial. Estudos indicam que há uma relação da epiderme com áreas límbicas (PAUS, 2016) e uma redução de substância cinzenta nestas áreas (XIE et al., 2017).

A crise energética que leva a formação no PG promove alterações morfológicas na estrutura muscular, como a desorganização das fibras e alterações no citoesqueleto, apresentando encurtamento dos sarcômeros (KOISHI et al., 1995; ZHANG et al., 2017).

As propriedades mecânicas do músculo dependem da estrutura dos sarcômeros e alterações nesta estrutura diminuem a flexibilidade muscular e a capacidade de produzir força e movimento (FLITNEY; HIRST, 1978).

2.3 Estresse oxidativo e dor muscular

Em um organismo em condições normais, observa-se um equilíbrio entre as ROS e antioxidantes no espaço intracelular, nas membranas e espaço extracelular. A produção excessiva de ROS acarreta em uma sobrecarga dos depuradores de radicais livres endógenos, ou seja, antioxidantes. As ROS podem atacar os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) nos lipídios da membrana, levando assim a peroxidação lipídica (LP), resultando em perda de fluidez das membranas, alterações nos potenciais de membrana e eventualmente ruptura e liberação de conteúdo de organelas celulares. Portanto, o aumento do estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre produtos de oxidação e defesas antioxidantes (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991).

As moléculas tóxicas tornam-se altamente reativas em sua formação por causa de seu número alterado de elétrons não pareados. Existem várias condições clínicas inflamatórias associadas ao aumento do estresse oxidativo, além de uma relação intrínseca entre o estresse oxidativo e a percepção da dor, que é encontrado em pacientes com síndrome da fadiga crônica (SFC) (KEENOY et al., 2001; VECCHIET et al., 2003; WANG et al., 2004). Um aumento do estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese de várias doenças musculares, incluindo a SFC e a distrofia muscular (MURPHY, MICHAEL E; KEHRER, 1989). O estresse oxidativo é altamente expresso em músculos esqueléticos porque suas defesas antioxidantes são pobres (SEN, 1995). Após um protocolo de exercício incremental de ciclismo pode-se observar mudanças nos marcadores de estresse oxidativo no sangue dos atletas, como peroxidação lipídica e alteração nos níveis de glutatona (GSH) (JAMMES et al., 2004). O papel das ROS na mediação de danos oxidativos e a proteção oferecida pelos sistemas de defesa antioxidante têm sido estudados, acredita-se que um aumento excessivo destas espécies reativas tendem a alterar a homeostase do cálcio, ativando sistemas proteolíticos e reduzindo a função muscular (SCICCHITANO; FARALDI; MUSARO, 2015).

Estudos também sugerem a existência de aumento do estresse oxidativo e diminuição das defesas antioxidantes relacionadas à extensão da sintomatologia na SFC. Ainda, sugerem que a liberação de citocinas induzida pelo exercício nesses pacientes,

pode resultar na produção acentuada de ROS (FULLE et al., 2000; KEENOY et al., 2001; RICHARDS et al., 2000; VECCHIET et al., 2003). Da mesma maneira, radicais livres podem ser responsáveis pela degeneração muscular da distrofia muscular hereditária, isso porque uma variedade de anormalidades celulares observadas nos músculos distróficos pode ser explicada por danos mediados por radicais livres. Além disso, subprodutos químicos associados a danos causados por radicais livres são encontrados no tecido muscular distrófico de humanos e animais com esta doença. Vários sistemas antioxidantes enzimáticos podem ser aumentados como uma resposta celular normal ao estresse oxidativo, e tais mudanças são vistas tanto nas células musculares distróficas como em outros tecidos de animais distróficos. Um aumento no nível de danos causados pelos radicais livres seria consequência da produção aumentada de ROS ou um componente deficiente do sistema antioxidante celular, como a vitamina E (MURPHY, M. E.; KEHRER, 1986).

Pessoas com dor muscular ocasionada pela Fibromialgia estão constantemente sob estresse oxidativo devido à isquemia dos pontos sensíveis e anormalidades nas funções mitocondriais, resultando em um equilíbrio delicado entre os níveis sanguíneos de ROS e as capacidades antioxidantes da célula. Portanto, aumentos nas ROS acima do nível basal podem prejudicar esse equilíbrio, desencadeando assim a apoptose induzida por ROS (AKKUS et al., 2009; NAZIROGLU et al., 2010; SANCHEZ-DOMINGUEZ et al., 2015).

Ademais, o potencial receptor transiente (TRP) melastatina 2 (TRPM2) e vanilóide 1 (TRPV1) são dois membros da superfamília TRP permeável a Ca^{2+} que podem ser ativados por ROS e por ácidos, embora sua participação na dor muscular ainda não esteja totalmente esclarecida. O canal TRPV1 é ativado por diferentes estímulos, incluindo um componente pungente de pimenta malagueta (capsaicina), enquanto o canal TRPM2 é ativado pela ADP-ribose (ADPR) (TOMINAGA; TOMINAGA, 2005; YUKSEL et al., 2017). Além disso, as atividades do TRPM2 e TRPV1 são afetadas pelo estresse oxidativo (independente de ADPR) e baixo pH (<5,9) (DU; XIE; YUE, 2009; YUKSEL et al., 2017).

Sabe-se também que o corpo humano está equipado com um arsenal completo de defesas contra as ROS. Essas ROS são eliminadas por enzimas, como GSH-Px e catalase, e espécies não enzimáticas, como GSH e vitamina E (NAZIROGLU, 2012). O α -tocoferol é o principal sequestrador de ROS na fase lipídica das membranas neuronais, e sua forma oxidada é recuperada pela ação antioxidante da GSH. Um desequilíbrio entre o sistema

oxidante e antioxidante é uma característica comum na disfunção clínica do sistema nervoso. Além disso, sabe-se que um aumento na ROS mitocondrial e uma diminuição na atividade da GSH-Px são conhecidos por estarem implicados na etiologia da dor na fibromialgia (AKKUS et al., 2009; NAZIROGLU et al., 2010; SANCHEZ-DOMINGUEZ et al., 2015)

2.4 Tratamento da SDM

2.4.1 Tratamento farmacológico

O tratamento medicamentoso da SDM é voltado principalmente para atuar nos principais pontos envolvidos na síndrome, como nos músculos, nervos periféricos e no sistema nervoso central para interromper a dor, sendo encontradas diferentes abordagens farmacológicas para redução dos sintomas (FRONTERA; DELISA, 2010). Tratamentos com ciclobenzaprina são comumente indicados, atuando no SNC para inibir a dor nociceptiva, porém não existem estudos suficientes para indicar seu uso na SDM (LEITE et al., 2009).

O tratamento com Pregabalina - fármaco análogo ao ácido gama-aminobutírico (GABA), anticonvulsivante e antiepilético - tem se mostrado eficaz na redução de hiperalgesia em várias condições (MANGAIARKKARASI; RAMESHKANNAN; ALI, 2015) sendo indicado principalmente para casos de dor neuropática (FINNERUP et al., 2015). Acredita-se que a Pregabalina atue primariamente ligando-se as unidades alfa-2-delta de canais de cálcio dependentes, bloqueando estes canais, inibindo assim a liberação de glutamato na medula espinhal, reduzindo sintomas de sensibilização central (BEN-MENACHEM, 2004; CODERRE et al., 2005).

2.4.2 Fisioterapia

A fisioterapia desempenha um papel importante na atenção primária aos casos de SDM, uma avaliação precisa e um diagnóstico diferencial e confiável são essenciais para garantir a gestão dos problemas e obter resultados significativos para o paciente. Para enriquecer o diagnóstico da SDM, além de habilidade, treinamento e prática clínica, alguns recursos podem ser utilizados buscando uma melhor resolução do quadro (THOMAS; SHANKAR, 2013). Atualmente, são encontrados recursos como a

termografia por infravermelho (SIKDAR et al., 2010), ultrassonografia (IBARRA et al., 2011) e eletromiografia (DIBAI-FILHO; GUIRRO, 2015).

Nos últimos anos, várias técnicas ganharam seu espaço na busca pela resolução da SDM, dentre elas podemos citar as liberações miofasciais manual e instrumental, eletroterapia, bandagens elásticas, compressão isquêmica dos PG e o agulhamento seco. MacDonald et al. demonstraram que a auto-liberação miofascial promove melhora da amplitude de movimento (ADM) dos indivíduos sem causar prejuízos na produção de força (MACDONALD et al., 2013). A liberação miofascial instrumental (IASTM) tem sido indicada para o tratamento de condições musculoesqueléticas crônicas (HOWITT et al., 2006), assim como a eletroterapia através do TENS e em forma de terapia combinada (MORETTI et al., 2012). O uso de bandagem elástica associada ou não a inativação do PG também tem sido indicada no tratamento da SDM (KALICHMAN et al., 2018; LIETZ-KIJAK et al., 2018). Dentre outras técnicas, temos ainda o agulhamento seco, sendo indicado para redução dos sintomas no manejo da síndrome de dor miofascial (TOUGH et al., 2009).

2.4.2.1 Agulhamento seco

Nos últimos anos ocorreu um aumento expressivo no uso de agulhamento seco por fisioterapeutas, difundindo a técnica no mundo todo (DOMMERHOLT, 2004). Esse tratamento tem por objetivo inativar o PG, normalizar o ambiente químico, normalizar a sensibilização do nervo periférico, promovendo redução espontânea da atividade muscular (DOMMERHOLT, 2004).

O agulhamento seco é uma técnica fisioterapêutica minimamente invasiva onde uma agulha de acupuntura é inserida manualmente pelo terapeuta diretamente no PG miofascial (BALDRY, 2005). A técnica pode ser realizada de três maneiras, sendo ela superficial onde a agulha é inserida sobre o ponto e retirada em até um minuto (BALDRY, 2005), profundo, onde a agulha é inserida no ponto e permanece entre vinte e trinta minutos (FERNANDEZ-CARNERO et al., 2017) ou *twitch* onde a agulha é inserida no ponto e o terapeuta realiza a pistonagem até a percepção da redução da resistência muscular (Figura 1) (HONG; TORIGOE, 1994).

O mecanismo de ação do tratamento com agulhamento seco não está totalmente esclarecido, embora indique-se algumas teorias. Acredita-se que a redução dos sintomas algícos possa ser reforçado através do mecanismo de estimulação das fibras nervosas

sensoriais A-delta, ativando interneurônios do corno dorsal inibitório – comporta da dor, além da possível supressão da dor mediada por opiáceos (DOMMERHOLT, 2004). De acordo com Shah (2008), o agulhamento seco promoveu correção dos níveis de bradicinina, CGRP, substância P e outros químicos (SHAH, 2008). Outro efeito observado pela aplicação do agulhamento seco foi o de aumento do fluxo sanguíneo local, alterando mediadores inflamatórios locais (CAGNIE et al., 2012).

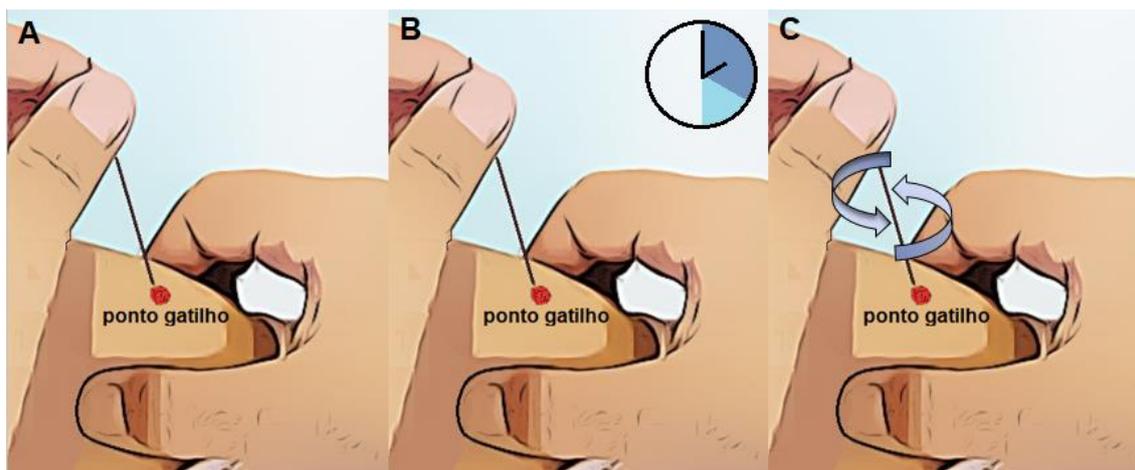


Figura 1: Modalidades de aplicação do agulhamento seco. **A:** agulhamento seco superficial; **B:** agulhamento seco profundo, indicando a aplicação entre 20 e 30 minutos; **C:** agulhamento seco *twitch*, demonstrando o movimento de pistonagem. **Fonte:** próprio pesquisador.

O pouco entendimento da fisiopatologia da dor muscular dificulta o tratamento dessa condição, no entanto, os profissionais de saúde utilizam as terapêuticas disponíveis atualmente. Ainda, embora tenha ocorrido um crescimento quanto ao uso do agulhamento seco por parte dos fisioterapeutas na clínica, poucos estudos apresentam comprovação da eficácia da técnica, como em ensaios clínicos randomizados. Ademais, apesar de existirem diferentes técnicas de agulhamento seco, a diferença da aplicação e dos efeitos delas são insuficientes. Por isso, trabalhos que comparem as diferentes técnicas de agulhamento seco e a melhor forma de aplicação dela são necessários. Da mesma maneira, não são claras as formas como o agulhamento seco age no equilíbrio ácido-base local nem em relação ao estresse oxidativo. Sendo assim, estudos relacionando a crise energética do PG com defesas antioxidantes, sintomas e funcionalidade ainda são necessários para elucidar os mecanismos de tratamento e liberação do PG promovidos pelo agulhamento seco.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos do agulhamento seco no tratamento da dor muscular não inflamatória em ratos.

3.2 Objetivos específicos

Verificar os efeitos de diferentes técnicas de agulhamento seco - agulhamento profundo, superficial ou *twitch* - sobre o edema, temperatura superficial, hiperalgesia térmica e mecânica após indução de dor muscular por salina ácida;

Averiguar os efeitos de diferentes técnicas de agulhamento seco - agulhamento profundo, superficial ou *twitch*- sobre a força muscular, funcionalidade e locomoção de ratos após indução de dor muscular por salina ácida;

Verificar os efeitos das técnicas de agulhamento seco sobre parâmetros de estresse oxidativo em um modelo de dor muscular induzida por salina ácida;

Comparar os efeitos das técnicas de agulhamento seco com o tratamento farmacológico com Pregabalina em ratos com dor muscular induzida por salina ácida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos (8 - 12 semanas, 250 – 300g), adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas/RS, sendo todos os experimentos desenvolvidos após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 0045/2017) da Universidade Federal do Pampa (Anexo I). Os animais passaram por um período de aclimação, mantidos em foto período claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 23 ± 2 °C, com água e ração *ad libitum*.

4.2 Indução de dor muscular

Para indução de dor muscular, foi realizada a injeção de 100 µL de solução salina ácida (NaCl 0,9%; pH 4.0) no ventre muscular do músculo gastrocnêmio direito dos animais. Esta injeção foi realizada em 2 momentos durante o protocolo experimental, no primeiro e quinto dia. Este protocolo visou a produção de hipersensibilidade mecânica no músculo gastrocnêmio e na pata do animal, perdurando estes sintomas por aproximadamente quatro semanas (SLUKA et al., 2001). O grupo controle recebeu 100 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%; pH 7.0) seguindo o mesmo protocolo proposto anteriormente.

4.3 Desenho experimental

Todos os ratos foram submetidos a avaliações basais (pré-injeção) e divididos em 6 grupos (n=8): grupo salina (controle), grupo salina ácida (SA), grupo controle positivo - Pregabalina (PG) (salina ácida + Pregabalina i.p.), grupo agulhamento profundo (AP) (salina ácida + agulhamento profundo), grupo agulhamento superficial (AS) (salina ácida + agulhamento superficial) e grupo agulhamento *twitch* (AT) (salina ácida + agulhamento *twitch*) (Figura 2).

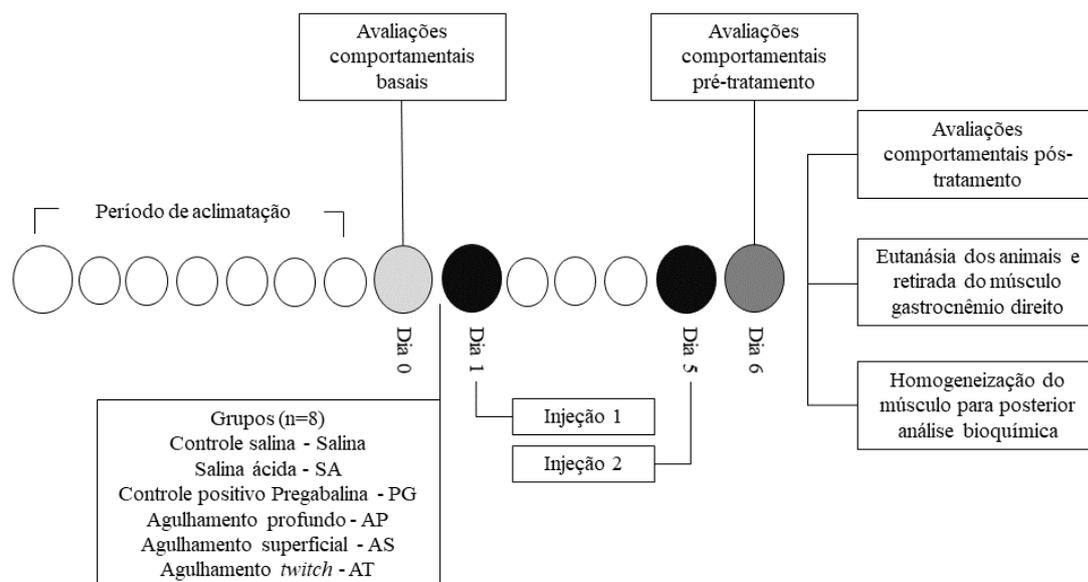


Figura 2: Linha temporal com indicação dos principais eventos que compuseram o delineamento experimental do presente estudo. **Fonte:** próprio pesquisador.

4.4 Avaliações comportamentais

4.4.1 Hiperalgesia mecânica

Para avaliar a hiperalgesia mecânica foi utilizado o método “up-and-down” (WALDER et al., 2010). Desta forma, os ratos foram aclimatados por no mínimo 1 hora antes dos experimentos, permanecendo em compartimentos individuais feitos de acrílico (7 x 9 x 11 cm), sobre uma plataforma de fundo gradeado, para facilitar o acesso à superfície ventral das patas traseiras dos animais. O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente à superfície plantar dos animais. Então, foram analisadas as respostas (retirada ou não da pata) em relação à tensão aplicada por vários filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, EUA) calibrados para produzir forças diferentes (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0 gramas), causando graus distintos de estimulação mecânica (inócuas ou nocivas). As avaliações foram iniciadas com o filamento de 0,4 g, e no caso de estímulo nocivo – indicado pela retirada da pata – foi utilizado um filamento com menor valor em gramas. Nos casos de estimulação inócua – indicada pela permanência da pata – foi testado o filamento com maior valor seguinte em gramas. Foi realizado um total de no máximo seis aplicações não consecutivas em cada animal.

4.4.2 Hiperalgisia térmica ao frio

Para avaliar a hiperalgisia térmica ao frio, os animais foram posicionados em caixas individuais de acrílico transparente, sobre plataformas elevadas. Após, foi instilado 0,05 ml de acetona através de uma seringa na região ventral da pata traseira do animal, realizando a contagem de tempo com um cronômetro. Durante 20 segundos após a aplicação da acetona, a resposta do rato foi monitorada, observando retirada ou agitação da pata ipsi e contralateral. Os animais que não apresentaram resposta tiveram o monitoramento encerrado. Porém, nos casos que houve reação ao efeito de resfriamento no período de 20 segundos, estes animais foram observados por mais 20 segundos, totalizando assim, 40 segundos. As respostas eram classificadas em escore de 0 a 3, sendo 0 nenhuma resposta, 1 quando apresentava retirada da pata, 2 quando realizava *flinches* (sacudidas) e 3 quando retirava a pata e levava o membro à boca. As medidas foram realizadas 3 vezes e a média de escore obtida foi utilizada como parâmetro de avaliação (FLATTERS; BENNETT, 2004).

4.4.3 Edema

Para avaliar o edema, um paquímetro digital foi usado para medir o diâmetro muscular (em milímetros). Uma linha foi traçada entre a origem e a inserção do músculo gastrocnêmio e o paquímetro foi posicionado transversalmente ao músculo, na linha mediana do músculo gastrocnêmio. Neste local, o diâmetro do músculo foi medido. Esta avaliação também foi realizada no membro não afetado do animal para comparação com o músculo afetado. A avaliação foi realizada três vezes em cada músculo (ambos os lados) e a diferença entre as medidas foi utilizada como resultado final (BRESSAN; Q.; TONUSSI, 2006).

4.4.4 Força e funcionalidade

A avaliação de força de preensão da pata (desempenho motor) foi realizada por meio do equipamento GripForce (Insight ®). O animal foi colocado sobre a grade do equipamento e cuidadosamente puxado pela cauda, realizado sempre pelo mesmo avaliador. O valor registrado foi o valor da média de três análises obtidas em ensaios

consecutivos com um intervalo mínimo de 5 minutos. Nesse caso, foi obtido a medida em gramas da preensão plantar exercidas pelas quatro patas no animal sobre a grade do equipamento (KEHL; TREMPPE; HARGREAVES, 2000).

4.4.5 Termografia

A termografia superficial foi realizada com uma câmera termográfica Flir One (FLIR ®) com os animais suspensos manualmente pelo dorso para obtenção da imagem da pata direita. Foi realizada tricotomia da pata dos animais com 48 horas de antecedência à primeira avaliação. As imagens obtidas foram processadas no software FlirTools (FLIR ®), onde foram obtidas a temperatura média da pata e o ponto de maior temperatura (SKORUPSKA; RYCHLIK; SAMBORSKI, 2015).

4.4.6 Locomoção

Os animais foram analisados através do teste de campo aberto (*Open Field*), que consiste em um aparato com base retangular medindo 60x40x50 cm com 12 divisões marcadas no chão do aparato medindo 15x13,3 cm cada uma. O experimento foi realizado no dia 6, por um período de 5 minutos onde animal foi observado pelo pesquisador através da parede frontal translúcida do aparato. Após cada análise experimental, o aparato foi totalmente limpo.

Foram analisados os parâmetros de locomoção, observados através do número de cruzamentos (*crossing*), sendo computados o número de vezes que o animal cruzou as linhas demarcadas no chão com as quatro patas, sendo essa uma medida de atividade exploratória; e parâmetros de orientação, sendo avaliada a frequência em que o animal levantou sobre as patas traseiras (*rearings*) em uma postura típica de orientação em um ambiente novo (SILVEIRA et al., 2005).

4.5 Tratamento

Os tratamentos foram realizados 24h após a injeção 2, sendo considerado o dia 6 do experimento.

4.5.1 Farmacológico

O grupo PG foi tratado com Pregabalina i.p. (20 mg/kg) (YOKOYAMA et al., 2007). Foi realizada injeção com seringa de 1 mL com agulha (Descarpack, Brasil) sendo aplicado no flanco direito dos animais.

4.5.2 Agulhamento seco

Os animais foram tratados com agulha de acupuntura Dux ® (0,20 x 30mm) inseridas manualmente pelo pesquisador no ventre muscular do gastrocnêmio direito (porção medial – sentido caudal-rostral) até o ponto onde foi percebida a resistência muscular (aproximadamente 5 a 10 mm de profundidade). O grupo AP foi tratado com agulhamento seco profundo com manutenção da agulha inserida no músculo por 20 minutos, recebendo fricção da agulha a cada 5 minutos; o grupo AS foi tratado com agulhamento superficial, sendo inserida a agulha no musculo até o ponto de resistência, sendo mantida por 30 segundos; e o grupo AT recebeu agulhamento *twitch*, sendo realizada a pistonagem da agulha no ventre muscular até serem observadas respostas de contração latentes, percebidas entre 20 e 30 segundos. Os grupos Salina e SA não receberam tratamento. Todos os animais foram colocados em um tubo deixando as patas traseiras expostas para o tratamento, sendo realizado período de aclimatação ao tubo nos cinco dias prévios ao tratamento.

4.6 Avaliação de estresse oxidativo

4.6.1 Preparo do tecido muscular

Os animais de todos os grupos foram eutanasiados duas horas após a avaliação comportamental final. Os músculos gastrocnêmio direito dos animais foram removidos e homogeneizados em TrisHCl 50 mM, pH 7,4, (1/10, p / v). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2400 rpm, 4° C, por 10 min e os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios bioquímicos.

4.6.2 Determinação dos níveis de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

A lipoperoxidação foi avaliada por meio do ensaio de TBA-RS (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Cada alíquota de amostra foi incubada com uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,8%, tampão ácido acético (pH 3,5) e solução de dodecilsulfato de sódio (8,1 %) a 95°C durante 1 h. A reação de cor foi mensurada a 532 nm e os resultados foram expressos como nmol de malondialdeído (MDA) e corrigidos por mg de tecido.

4.6.3 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH) total

Os níveis de GSH total foram determinados de acordo com o protocolo proposto por Ellman (1959). Brevemente, amostras do tecido foram incubadas com tampão fosfato (TFK 0,25mM; pH 7,4) e DTNB (1mM). O pigmento amarelo resultante foi mensurado espectrofotometricamente a 420nm. Os resultados foram expressos como nmol de GSH e corrigidos por mg de tecido (ELLMAN, 1959).

4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos através da avaliação de hiperalgesia térmica e mecânica, termografia superficial e edema foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA de duas vias) seguida pelo teste de *Mann Whitney* e/ou teste de Student não pareado. Os dados bioquímicos e os dados da atividade locomotora foram por ANOVA de uma via com post hoc de *Dunnett*. Foi utilizado Software *GraphPad* (San Diego, CA, USA), sendo os dados expressos como média \pm erro padrão da média e o nível de significância em todos os casos foi considerado $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Podemos observar que o modelo de indução de dor muscular proposto não induziu resposta significativa dos animais quanto a hiperalgesia mecânica e ao frio (Figura 3). No entanto, observamos que a injeção de salina ácida promoveu uma redução significativa na capacidade de produzir força de preensão plantar nos animais e consequente redução da funcionalidade dos mesmos (Figura 4A).

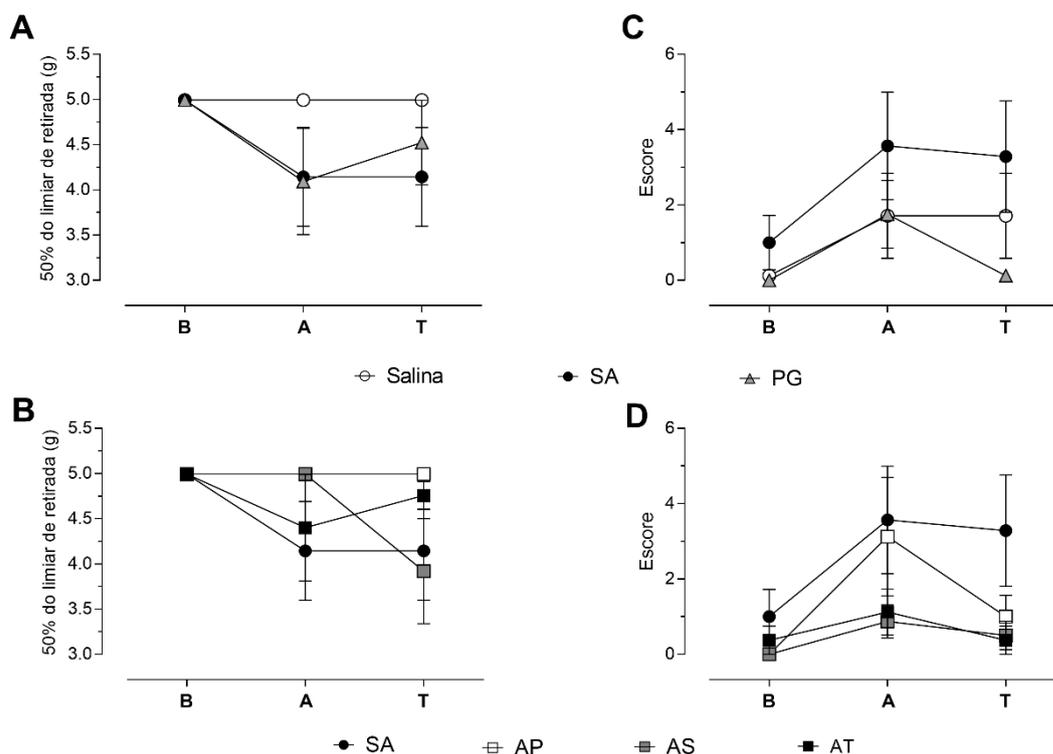


Figura 3: A, B: Avaliação da hiperalgesia mecânica com microfilamentos de von Frey, expressando 50% do limiar de retirada da pata do animal. **C, D:** Avaliação da hiperalgesia térmica ao frio com Acetona. B – basal, A – pré-tratamento, T – pós-tratamento. (*) Análise estatística por ANOVA de duas vias e teste post hoc de Newman-Keuls. **Fonte:** próprio pesquisador.

Os tratamentos propostos permitiram observar que as técnicas de agulhamento seco levaram a uma melhora da preensão plantar e funcionalidade dos animais imediatamente após a aplicação, independente da modalidade utilizada (Figura 4B). Esta mesma melhora funcional foi observada naqueles animais que receberam tratamento farmacológico com Pregabalina (Figura 4A).

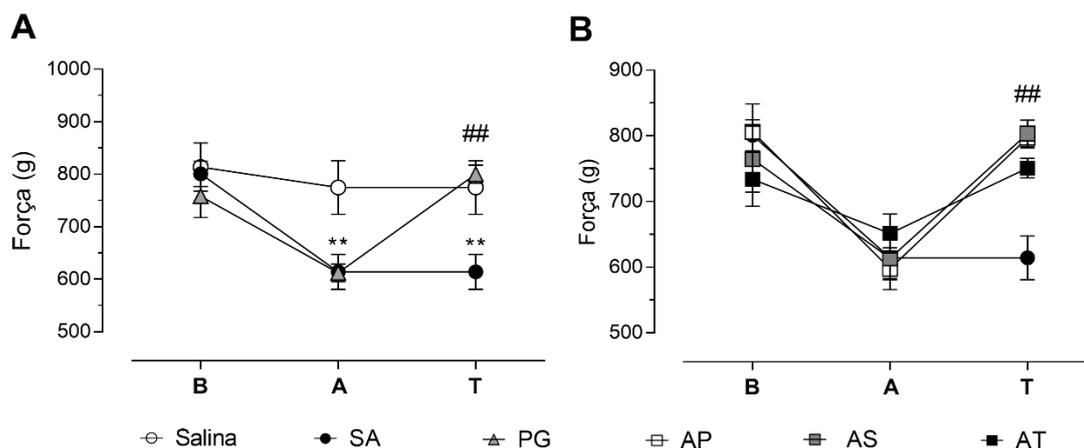


Figura 4: Avaliação da força de preensão plantar dos animais através do Grip Force. B – basal, A – pré-tratamento, T – pós-tratamento. (*) Análise estatística por ANOVA de duas vias e teste post hoc de Newman-Keuls. (sendo ** $p < 0.01$, quando comparado ao grupo Salina e ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo SA). **Fonte:** próprio pesquisador.

De forma interessante na avaliação da atividade locomotora, os animais tratados com agulhamento seco apresentaram características de deslocamento e orientação significativamente melhores quando comparados aos animais tratados com Pregabalina, mostrando que não houve comprometimento motor significativo nos animais que receberam agulhamento seco (Figura 5).

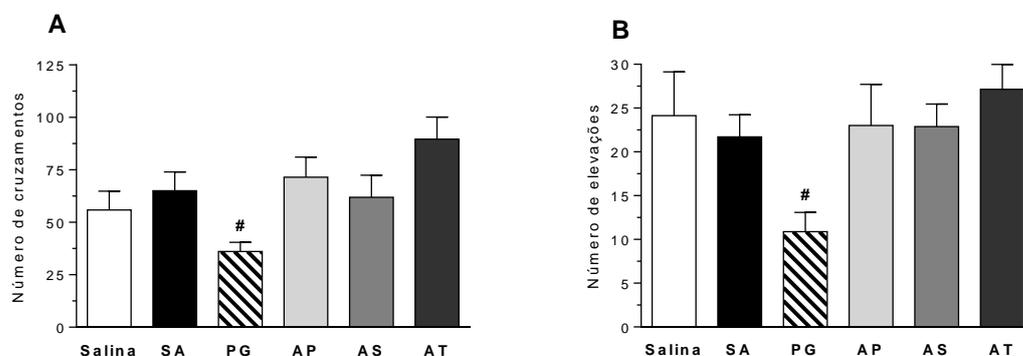


Figura 5: Avaliação locomotora pelo teste de campo aberto (Open Field). **A:** apresenta a frequência de cruzamentos (*crossing*) realizados pelos animais durante o teste; **B:** apresenta a frequência de elevações (*rearing*) realizadas pelos animais durante o teste. (*) Análise estatística utilizando test t não pareado (sendo # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SA). **Fonte:** próprio pesquisador.

Nas avaliações do edema muscular, não foram constatadas diferenças estatísticas quanto ao grupo Salina e o grupo AS, assim como entre os grupos tratados (dados não demonstrados). Ainda, não foi observado diferença estatística nas análises da termografia do músculo gastrocnêmio dos ratos em nenhum dos grupos experimentais (dados não demonstrados).

Ao analisarmos os níveis de TBA-RS, observamos um aumento significativo na peroxidação lipídica no grupo SA quando comparado aos animais do grupo salina (Figura 4A), no entanto, não observamos diferença nos tratamentos - PG, AP, AS e AT – comparando-se ao grupo Salina ou ao grupo SA (Figura 6A). Já os níveis de GSH estavam reduzidos de forma significativa nos grupos SA e em todos os tratamentos, comparados aos animais do grupo salina, exceto no agulhamento *twitch* que se apresentou o GSH aumentado quando comparado ao grupo SA (Figura 6B).

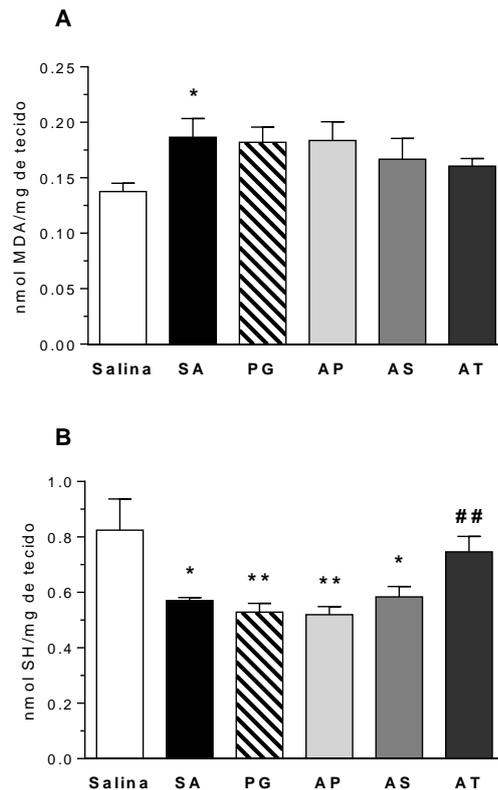


Figura 6: A: Níveis de TBARS no músculo gastrocnêmio. **B:** Níveis de GSH no músculo gastrocnêmio. (*) Análise estatística utilizando ANOVA de uma via com post hoc de Dunett (*= $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Salina; ##= $p < 0,01$ quando comparado ao grupo AS). **Fonte:** próprio pesquisador.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, verificamos que os animais que receberam tratamento com agulhamento seco após indução de dor muscular por salina ácida apresentaram melhora da força, funcionalidade e locomoção de forma significativa. Ainda, o tratamento com agulhamento *twitch* demonstrou um aumento significativo nos níveis de GSH do músculo gastrocnêmio tratado, indicando uma melhor resposta antioxidante local. Os resultados obtidos mostram que o agulhamento seco apresenta melhor resposta nas análises comportamentais em relação ao tratamento farmacológico proposto.

Ao analisarmos a funcionalidade, observa-se que os grupos tratados farmacologicamente ou através do agulhamento seco obtiveram melhor desempenho quando comparados ao grupo salina ácida. Itoh et. al. (2007), demonstraram que o agulhamento do ponto-gatilho em humanos obteve melhora do score no índice de incapacidade relacionada ao pescoço, assim como Bandy et. al. (2017) demonstraram uma melhora imediata no salto vertical em adultos-jovens tratados com agulhamento seco, corroborando com a melhora da força de preensão plantar obtida em nosso estudo. A resposta imediata do agulhamento seco vai ao encontro a estudos anteriores que indicam que esta modalidade de tratamento pode estimular as fibras nervosas motoras, melhorando assim a atividade muscular (BANDY; NELSON; BEAMER, 2017; DAR; HICKS, 2016; ITOH et al., 2007).

Mesmo apresentando boa resposta quanto a funcionalidade, os animais tratados com Pregabalina apresentaram características de locomoção inferiores aos tratados com agulhamento seco. Tais características podem ser observadas devido aos efeitos colaterais do medicamento, como sonolência e tontura, essas condições clínicas podem ter induzido a uma menor interação com o espaço e diminuído as habilidades de locomoção e exploração dos animais (FUZIER et al., 2013; MOORE et al., 2009).

Nosso estudo encontrou melhora imediata da força muscular significativa naqueles animais tratados com agulhamento seco. Este achado difere das informações encontradas em estudo de Mansfield et. al. (2018) que, em recente revisão sistemática com 21 estudos, indicam não encontrar nenhuma evidência sobre o efeito do agulhamento na produção de força na maioria dos estudos observados. Os mesmos autores ressaltam que o desenho experimental dos poucos estudos que apresentaram ganho de força não

permitiram melhores conclusões. Ainda nesta linha de contrariedade, Devereux et. al. (2018) indicam em seu experimento uma significativa redução da força imediatamente após o tratamento, com reestabelecimento a partir de 48 horas. Tais divergências tornam necessário aprofundar as pesquisas na área para elucidar os mecanismos do agulhamento seco na atividade muscular (DEVEREUX et al., 2018; MANSFIELD et al., 2018). De outro modo, a aplicação do agulhamento pode apresentar respostas semelhantes as encontradas na compressão isquêmica do PG, aumentando o suprimento de oxigênio, melhorando e diminuindo a produção de substâncias nociceptivas e inflamatórias, resultando assim em menor dano às fibras musculares e, conseqüentemente, melhor produção de força (CAGNIE et al., 2013).

O modelo de dor muscular proposto não resultou em resposta hiperalgésica como esperado, porém, as respostas funcionais podem estar relacionadas ao mecanismo similar a formação dos PG, com ativação dos canais iônicos sensíveis a ácido 3 (ASIC3) e alterações na modulação supraespinhal da nocicepção (DESANTANA; SLUKA, 2008). Este mecanismo proposto gera um aumento da toxicidade local, com conseqüente resposta inflamatória que, para Fischer et al. (2018) tende a promover um estado oxidativo permanente. Sendo assim, nosso estudo demonstrou que a indução de dor muscular com salina ácida promoveu aumento da peroxidação lipídica no músculo gastrocnêmio dos animais, reforçando o uso do modelo (FISCHER et al., 2018).

Além disso, o agulhamento *twitch* determinou um aumento significativo nos níveis de GSH total do músculo, sendo superior ao demais tratamentos neste ponto. A isquemia apresentada no PG acarreta em uma pobre defesa antioxidante, sendo assim, podemos sugerir que o agulhamento *twitch* induz ao aumento dos níveis de GSH, inferimos assim uma maior ativação da enzima GR e conseqüente melhora da reposta antioxidante local para o modelo de dor proposto. Há a hipótese de que a atividade destas enzimas antioxidantes não testadas por nós, podem potencialmente promover uma atividade citoprotetora, podendo este ser um dos mecanismos de resposta para explicar o efeito do agulhamento *twitch* na reversão da crise energética gerada pela formação dos pontos gatilho (BRON; DOMMERHOLT, 2012; SANCHEZ-DOMINGUEZ et al., 2015; SEN, 1995; WU; BATIST, 2013). Os níveis de GSH no organismo são mantidos através da atividade da enzima glutathiona redutase (GR), o modelo de dor proposto possivelmente reduz os níveis de GSH e, por tornar o meio ácido, promove aumento da LP, podendo alterar o ciclo redox da glutathiona (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Até onde temos conhecimento, não existem estudos que relacionem diretamente o uso do

agulhamento seco com as respostas antioxidantes locais nas alterações promovidas pelas SDM, porém acreditamos na hipótese de que o aumento do fluxo sanguíneo possivelmente aumentou o aporte de antioxidantes endógenos locais.

Nosso estudo não conseguiu demonstrar efeitos significativos com relação ao edema e termografia. Consideramos uma limitação do estudo os protocolos de avaliação de hiperalgesia, tendo em vista que em situações de dor miofascial a dor pode estar relacionada à sensibilização de nociceptores profundos, e não à pele (DEISING et al., 2012). Esta afirmativa é contrária às respostas encontradas em estudo de DeSantana e Sluka (2008), onde fora utilizado o mesmo método de avaliação da hiperalgesia que aplicamos em nosso estudo, apresentando resposta positiva quando avaliada a hiperalgesia superficial (DESANTANA; SLUKA, 2008). Sendo assim, sugerimos que estudos futuros que avaliem a hiperalgesia neste modelo de dor utilizem métodos de avaliação da atividade nociceptiva profunda.

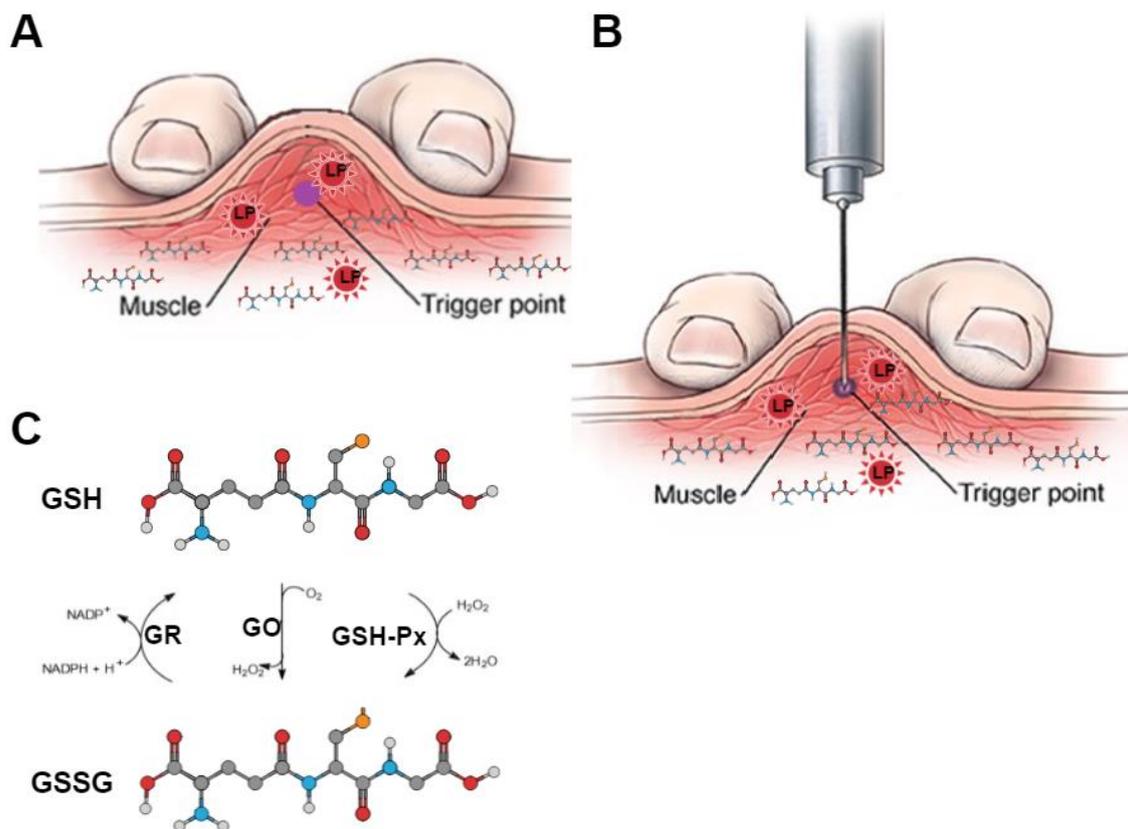


Figura 7: **A:** Ponto-gatilho miofascial apresentando baixos níveis de GSH. **B:** Ponto-gatilho miofascial sendo tratado com agulhamento seco apresentando maiores níveis de GSH, indicando maior atividade de GR. **C:** Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR). **Fonte:** próprio pesquisador.

7 CONCLUSÃO

Com base no exposto podemos verificar que o tratamento com agulhamento seco promoveu melhora da força de preensão plantar dos animais, levando ao ganho de funcionalidade após a indução de dor muscular por salina ácida. Outrossim, a técnica de agulhamento *twitch* apresentou, além da melhora funcional, capacidade protetora antioxidante no músculo lesionado e tratado, demonstrando superioridade comparada as outras formas de agulhamento seco.

Ainda em tempo, podemos citar o agulhamento seco como uma modalidade terapêutica capaz de promover benefícios similares ou superiores ao tratamento medicamentoso com Pregabalina, porém sem os efeitos deletérios do fármaco, mantendo assim a atividade locomotora normal, permitindo a manutenção das atividades funcionais.

O aprimoramento das técnicas de avaliação de hiperalgesia, utilizando investigações de hiperalgesia local e a análise da resposta inflamatória promovida pelo agulhamento seco, neste mesmo modelo experimental, podem auxiliar próximas investigações. Ademais, essas avaliações associadas a observação histológica do músculo tendem a nortear as pesquisas para elucidação dos mecanismos fisiológicos de ação desta técnica fisioterapêutica que tem ganhado espaço na prática clínica.

REFERÊNCIAS

- AKKUS, S. et al. Levels of lipid peroxidation, nitric oxide, and antioxidant vitamins in plasma of patients with fibromyalgia. **Cell Biochem Funct**, v. 27, n. 4, p. 181-5, Jun 2009.
- BALDRY, P. E. **Acupuncture, Trigger Points and Musculoskeletal Pain**. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK. 2005.
- BANDY, W. D.; NELSON, R.; BEAMER, L. Comparison of Dry Needling Vs. Sham on the Performance of Vertical Jump. **Int J Sports Phys Ther**, v. 12, n. 5, p. 747-751, Oct 2017.
- BEN-MENACHEM, E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. **Epilepsia**, v. 45 Suppl 6, p. 13-8, 2004.
- BENNETT, R. M.; GOLDENBERG, D. L. Fibromyalgia, myofascial pain, tender points and trigger points: splitting or lumping? **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 3, p. 117, Jun 30 2011.
- BORDONI, B.; BORDONI, G. Reflections on osteopathic fascia treatment in the peripheral nervous system. **J Pain Res**, v. 8, p. 735-40, 2015.
- BORDONI, B. et al. Chest pain in patients with COPD: the fascia's subtle silence. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 13, p. 1157-1165, 2018.
- BOURGAIZE, S. et al. A comparison of the clinical manifestation and pathophysiology of myofascial pain syndrome and fibromyalgia: implications for differential diagnosis and management. **J Can Chiropr Assoc**, v. 62, n. 1, p. 26-41, Apr 2018.
- BRESSAN, E.; Q., C. F. D.; TONUSSI, C. R. Contribution of TNFalpha, IL-1beta and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. **Cytokine**, v. 36, n. 1-2, p. 83-9, Oct 2006.
- BRON, C.; DOMMERHOLT, J. D. Etiology of myofascial trigger points. **Curr Pain Headache Rep**, v. 16, n. 5, p. 439-44, Oct 2012.
- BRUCE, E. Myofascial pain syndrome: early recognition and comprehensive management. **AAOHN J**, v. 43, n. 9, p. 469-74, Sep 1995.
- CAGNIE, B. et al. The influence of dry needling of the trapezius muscle on muscle blood flow and oxygenation. **J Manipulative Physiol Ther**, v. 35, n. 9, p. 685-91, Nov-Dec 2012.
- CAGNIE, B. et al. Effect of ischemic compression on trigger points in the neck and shoulder muscles in office workers: a cohort study. **J Manipulative Physiol Ther**, v. 36, n. 8, p. 482-9, Oct 2013.
- CANADA. Public Health Agency of Canada - Economic Burden of Illness in Canada. Canadá, 2008. Disponível em: < <http://cost-illness.canada.ca/custom-personnalise/results-national-resultats.php?download=pdf> >. Acesso em: 12/25/2018.
- CODERRE, T. J. et al. Evidence that gabapentin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. **J Neurochem**, v. 94, n. 4, p. 1131-9, Aug 2005.
- COUTO, C. et al. Paraspinal stimulation combined with trigger point needling and needle rotation for the treatment of myofascial pain: a randomized sham-controlled clinical trial. **Clin J Pain**, v. 30, n. 3, p. 214-23, Mar 2014.
- CUMMINGS, M.; BALDRY, P. Regional myofascial pain: diagnosis and management. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 21, n. 2, p. 367-87, Apr 2007.
- DAR, G.; HICKS, G. E. The immediate effect of dry needling on multifidus muscles' function in healthy individuals. **J Back Musculoskelet Rehabil**, v. 29, n. 2, p. 273-278, Apr 27 2016.
- DE CARVALHO, A. V. et al. The use of dry needling in the treatment of cervical and masticatory myofascial pain. **Rev. dor.**, v. 18, n. (3), p. 255-260, 2017.

DEISING, S. et al. NGF-evoked sensitization of muscle fascia nociceptors in humans. **Pain**, v. 153, n. 8, p. 1673-9, Aug 2012.

DESANTANA, J. M.; SLUKA, K. A. Central mechanisms in the maintenance of chronic widespread noninflammatory muscle pain. **Curr Pain Headache Rep**, v. 12, n. 5, p. 338-43, Oct 2008.

DEVEREUX, F. et al. The Effects of Myofascial Trigger Point Release on the Power and Force Production in the Lower Limb Kinetic Chain. **J Strength Cond Res**, Feb 22 2018.

DIBAI-FILHO, A. V.; GUIRRO, R. R. Evaluation of myofascial trigger points using infrared thermography: a critical review of the literature. **J Manipulative Physiol Ther**, v. 38, n. 1, p. 86-92, Jan 2015.

DOMMERHOLT, J. **DOMMERHOLT, J. 2004. Dry needling in orthopedic physical therapy practice. Orthop Phys Ther Practice**, 16, 15-20. 2004. 15-20

DOMMERHOLT, J. et al. A critical overview of the current myofascial pain literature - April 2018. **J Bodyw Mov Ther**, v. 22, n. 2, p. 402-410, Apr 2018.

DU, J.; XIE, J.; YUE, L. Modulation of TRPM2 by acidic pH and the underlying mechanisms for pH sensitivity. **J Gen Physiol**, v. 134, n. 6, p. 471-88, Dec 2009.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, May 1959.

ELOQAYLI, H. Subcutaneous accessory pain system (SAPS): A novel pain pathway for myofascial trigger points. **Med Hypotheses**, v. 111, p. 55-57, Feb 2018.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

FERNANDEZ-CARNERO, J. et al. Effectiveness of Different Deep Dry Needling Dosages in the Treatment of Patients With Cervical Myofascial Pain: A Pilot RCT. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 96, n. 10, p. 726-733, Oct 2017.

FINNERUP, N. B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 2, p. 162-73, Feb 2015.

FISCHER, M. J. et al. Evaluation of mitochondrial function in chronic myofascial trigger points - a prospective cohort pilot study using high-resolution respirometry. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 19, n. 1, p. 388, Oct 30 2018.

FLATTERS, S. J.; BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 109, n. 1-2, p. 150-61, May 2004.

FLECKENSTEIN, J. et al. Discrepancy between prevalence and perceived effectiveness of treatment methods in myofascial pain syndrome: results of a cross-sectional, nationwide survey. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 11, p. 32, Feb 11 2010.

FLITNEY, F. W.; HIRST, D. G. Cross-bridge detachment and sarcomere 'give' during stretch of active frog's muscle. **J Physiol**, v. 276, p. 449-65, Mar 1978.

FRONTERA, W. R.; DELISA, J. A. DeLisa's Physical medicine & rehabilitation : principles and practice. 2010. ISSN 9781451109115 1451109113. Disponível em: < <http://www.r2library.com/public/ResourceDetail.aspx?authCheck=true&resid=3535> >.

FULLE, S. et al. Specific oxidative alterations in vastus lateralis muscle of patients with the diagnosis of chronic fatigue syndrome. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 12, p. 1252-1259, 2000.

FUZIER, R. et al. Adverse drug reactions to gabapentin and pregabalin: a review of the French pharmacovigilance database. **Drug Saf**, v. 36, n. 1, p. 55-62, Jan 2013.

GATTIE, E.; CLELAND, J. A.; SNODGRASS, S. The Effectiveness of Trigger Point Dry Needling for Musculoskeletal Conditions by Physical Therapists: A Systematic

Review and Meta-analysis. **J Orthop Sports Phys Ther**, v. 47, n. 3, p. 133-149, Mar 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015. ISBN 0198717482.

HONG, C.-Z.; TORIGOE, Y. Electrophysiological Characteristics of Localized Twitch Responses in Responsive Taut Bands of Rabbit Skeletal Muscle Fibers. **Journal of Musculoskeletal Pain**, v. 2, n. 2, p. 17-43, 1994/01/01 1994.

HOWITT, S.; WONG, J.; ZABUKOVEC, S. The conservative treatment of Trigger thumb using Graston Techniques and Active Release Techniques. **J Can Chiropr Assoc**, v. 50, n. 4, p. 249-54, Dec 2006.

IBARRA, J. M. et al. Latent myofascial trigger points are associated with an increased antagonistic muscle activity during agonist muscle contraction. **J Pain**, v. 12, n. 12, p. 1282-8, Dec 2011.

IOM. (Institute of Medicine). In: (Ed.). **Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research**. Washington (DC): The National Academies Press, 2011. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). ISBN 9780309214841 030921484X.

ITOH, K. et al. Randomised trial of trigger point acupuncture compared with other acupuncture for treatment of chronic neck pain. **Complement Ther Med**, v. 15, n. 3, p. 172-9, Sep 2007.

JAMMES, Y. et al. The oxidative stress in response to routine incremental cycling exercise in healthy sedentary subjects. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 144, n. 1, p. 81-90, 2004.

KALICHMAN, L. et al. Short-term effects of kinesio taping on trigger points in upper trapezius and gastrocnemius muscles. **J Bodyw Mov Ther**, v. 22, n. 3, p. 700-706, Jul 2018.

KEENOY, B. M. et al. Antioxidant status and lipoprotein peroxidation in chronic fatigue syndrome. **Life Sci**, v. 68, n. 17, p. 2037-2050, 2001.

KEHL, L. J.; TREMPE, T. M.; HARGREAVES, K. M. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. **Pain**, v. 85, n. 3, p. 333-43, Apr 2000.

KOISHI, K. et al. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. **Dev Dyn**, v. 202, n. 3, p. 244-54, Mar 1995.

KRAUSE, F. et al. Intermuscular force transmission along myofascial chains: a systematic review. **J Anat**, v. 228, n. 6, p. 910-8, Jun 2016.

LEITE, F. et al. Cyclobenzaprine for the treatment of myofascial pain in adults. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 3, 2009.

LIETZ-KIJAK, D. et al. Assessment of the Short-Term Effectiveness of Kinesiotaping and Trigger Points Release Used in Functional Disorders of the Masticatory Muscles. **Pain Res Manag**, v. 2018, p. 5464985, 2018.

LIM, R.; GUZMAN, F.; RODGERS, D. W. Note on the muscle receptors concerned with pain. In: BARKER, D. (Ed.). **Symposium on muscle receptors**. Hong Kong: Hong Kong University Press, 1962. p.p. 215-9.

LIST, T.; AXELSSON, S. Management of TMD: evidence from systematic reviews and meta-analyses. **J Oral Rehabil**, v. 37, n. 6, p. 430-51, May 2010.

MACDONALD, G. Z. et al. An acute bout of self-myofascial release increases range of motion without a subsequent decrease in muscle activation or force. **J Strength Cond Res**, v. 27, n. 3, p. 812-21, Mar 2013.

MAHER, C. G. Effective physical treatment for chronic low back pain. **Orthop Clin North Am**, v. 35, n. 1, p. 57-64, Jan 2004.

MANGAIARKKARASI, A.; RAMESHKANNAN, S.; ALI, R. M. Effect of Gabapentin and Pregabalin in Rat Model of Taxol Induced Neuropathic Pain. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 5, p. FF11-4, May 2015.

MANSFIELD, C. et al. The Effects of Needling Therapies on Muscle Force Production: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Orthop Sports Phys Ther**, p. 1-38, Nov 30 2018.

MELZACK, R. Myofascial trigger points: relation to acupuncture and mechanisms of pain. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 62, n. 3, p. 114-7, Mar 1981.

MENSE, S.; SCHMIDT, R. D. **Muscle pain: which receptors are responsible for the transmission of noxious stimuli?** Oxford (United Kingdom): Blackwell Scientific Publications, 1977. 575

MOORE, R. A. et al. Pregabalin for acute and chronic pain in adults. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD007076, Jul 8 2009.

MORETTI, F. A. et al. Combined therapy (ultrasound and interferential current) in patients with fibromyalgia: once or twice in a week? **Physiother Res Int**, v. 17, n. 3, p. 142-9, Sep 2012.

MURPHY, M. E.; KEHRER, J. P. Free radicals: a potential pathogenic mechanism in inherited muscular dystrophy. **Life Sci**, v. 39, n. 24, p. 2271-2278, 1986.

MURPHY, M. E.; KEHRER, J. P. Oxidative stress and muscular dystrophy. **Chem Biol Interact**, v. 69, n. 2-3, p. 101-173, 1989.

MYERS, T. W. **Anatomy Trains**. Elsevier, 2008. 440 ISBN 9788535237887.

NAZIROGLU, M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca(2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 32, n. 3, p. 134-41, Jun 2012.

NAZIROGLU, M. et al. Vitamins C and E treatment combined with exercise modulates oxidative stress markers in blood of patients with fibromyalgia: a controlled clinical pilot study. **Stress**, v. 13, n. 6, p. 498-505, Nov 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979.

PAUS, R. Exploring the "brain-skin connection": Leads and lessons from the hair follicle. **Curr Res Transl Med**, v. 64, n. 4, p. 207-214, Oct - Dec 2016.

RICHARDS, R. S. et al. Blood parameters indicative of oxidative stress are associated with symptom expression in chronic fatigue syndrome. **Redox Report**, v. 5, n. 1, p. 35-41, 2000.

RODRIGUEZ-MANSILLA, J. et al. Effectiveness of dry needling on reducing pain intensity in patients with myofascial pain syndrome: a Meta-analysis. **J Tradit Chin Med**, v. 36, n. 1, p. 1-13, Feb 2016.

SANCHEZ-DOMINGUEZ, B. et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and, inflammation common events in skin of patients with Fibromyalgia. **Mitochondrion**, v. 21, p. 69-75, Mar 2015.

SCICCHITANO, B. M.; FARALDI, M.; MUSARO, A. The Proteolytic Systems of Muscle Wasting. **Recent Adv DNA Gene Seq**, v. 9, n. 1, p. 26-35, 2015.

SEN, C. K. Oxidants and antioxidants in exercise. **J Appl Physiol**, v. 79, n. 3, p. 675-686, 1995.

SHAH, J. P. Integrating Dry Needling with New Concepts of Myofascial Pain, Muscle Physiology, and Sensitization. In: AUDETTE, J. F. e BAILEY, A. (Ed.). **Integrative Pain Medicine: The Science and Practice of Complementary and Alternative**

Medicine in Pain Management. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. p.107-121. ISBN 978-1-59745-344-8.

SHAH, J. P. et al. Biochemicals associated with pain and inflammation are elevated in sites near to and remote from active myofascial trigger points. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 89, n. 1, p. 16-23, Jan 2008.

SHAH, J. P. et al. An in vivo microanalytical technique for measuring the local biochemical milieu of human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 99, n. 5, p. 1977-84, Nov 2005.

SHAH, J. P. et al. Myofascial Trigger Points Then and Now: A Historical and Scientific Perspective. **PM R**, v. 7, n. 7, p. 746-61, Jul 2015.

SIKDAR, S. et al. Understanding the vascular environment of myofascial trigger points using ultrasonic imaging and computational modeling. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 2010, p. 5302-5, 2010.

SILVEIRA, P. P. et al. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. **Int J Dev Neurosci**, v. 23, n. 1, p. 93-9, Feb 2005.

SIMONS, D. G. Myofascial trigger points: a need for understanding. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 62, n. 3, p. 97-9, Mar 1981.

_____. Myofascial trigger points: the critical experiment. **Journal of Musculoskeletal Pain**, v. 5, n. 4, p. 111-118, 1997.

_____. Understanding effective treatments of myofascial trigger points. **J Bodyw Mov Ther**, v. 6, n. 2, p. 81-88, 2002/04/01/ 2002.

_____. New views of myofascial trigger points: etiology and diagnosis. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 89, n. 1, p. 157-9, Jan 2008.

SIMONS, D. G.; MENSE, S. [Diagnosis and therapy of myofascial trigger points]. **Schmerz**, v. 17, n. 6, p. 419-24, Dec 2003.

SIMONS, D. G. et al. **Travell & Simons' myofascial pain and dysfunction: The trigger point manual.** 2th. Baltimore: Williams & Wilkins.: 1999. ISBN 0-683-08363-5.

SKORUPSKA, E.; RYCHLIK, M.; SAMBORSKI, W. Validation and Test-Retest Reliability of New Thermographic Technique Called Thermovision Technique of Dry Needling for Gluteus Minimus Trigger Points in Sciatica Subjects and TrPs-Negative Healthy Volunteers. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 546497, 2015.

SKYBA, D. A.; KING, E. W.; SLUKA, K. A. Effects of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptor antagonists on the development and maintenance of hyperalgesia induced by repeated intramuscular injection of acidic saline. **Pain**, v. 98, n. 1-2, p. 69-78, Jul 2002.

SKYBA, D. A.; LISI, T. L.; SLUKA, K. A. Excitatory amino acid concentrations increase in the spinal cord dorsal horn after repeated intramuscular injection of acidic saline. **Pain**, v. 119, n. 1-3, p. 142-9, Dec 15 2005.

SLUKA, K. A.; KALRA, A.; MOORE, S. A. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. **Muscle Nerve**, v. 24, n. 1, p. 37-46, Jan 2001.

STECCO, A. et al. Fascial components of the myofascial pain syndrome. **Curr Pain Headache Rep**, v. 17, n. 8, p. 352, Aug 2013.

THOMAS, K.; SHANKAR, H. Targeting myofascial taut bands by ultrasound. **Curr Pain Headache Rep**, v. 17, n. 7, p. 349, Jul 2013.

TILLU, D. V.; GEBHART, G. F.; SLUKA, K. A. Descending facilitatory pathways from the RVM initiate and maintain bilateral hyperalgesia after muscle insult. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 331-9, Jun 2008.

TOMINAGA, M.; TOMINAGA, T. Structure and function of TRPV1. **Pflugers Arch**, v. 451, n. 1, p. 143-50, Oct 2005.

TOUGH, E. A. et al. Acupuncture and dry needling in the management of myofascial trigger point pain: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Eur J Pain**, v. 13, n. 1, p. 3-10, Jan 2009.

TRAVELL, J. Myofascial trigger points: clinical view. In: BONICA, J. J.; LINDBLOM, U., *et al* (Ed.). **Advances in pain research and therapy**. New York: Raven Press, 1976. p.p. 919-26.

TRAVELL, J. G.; SIMONS, D. G. **Myofascial Pain and Dysfunction: The Trigger Point Manual**. Williams & Wilkins, 1983. ISBN 9780683083675.

VECCHIET, J. et al. Relationship between musculoskeletal symptoms and blood markers of oxidative stress in patients with chronic fatigue syndrome. **Neurosci Lett**, v. 335, n. 3, p. 151-154, 2003.

WALDER, R. Y. et al. ASIC1 and ASIC3 play different roles in the development of Hyperalgesia after inflammatory muscle injury. **J Pain**, v. 11, n. 3, p. 210-8, Mar 2010.

WANG, Z. Q. et al. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 309, n. 3, p. 869-78, Jun 2004.

WILKE, J. et al. What Is Evidence-Based About Myofascial Chains: A Systematic Review. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 97, n. 3, p. 454-61, Mar 2016.

WU, J. H.; BATIST, G. Glutathione and glutathione analogues; therapeutic potentials. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3350-3, May 2013.

XIE, P. et al. Corrigendum: Microstructural Abnormalities Were Found in Brain Gray Matter from Patients with Chronic Myofascial Pain. **Front Neuroanat**, v. 11, p. 62, 2017.

YOKOYAMA, T. et al. Pregabalin reduces muscle and cutaneous hyperalgesia in two models of chronic muscle pain in rats. **J Pain**, v. 8, n. 5, p. 422-9, May 2007.

YUKSEL, E. et al. Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels on hyperalgesia, apoptosis and oxidative stress in rat fibromyalgia model: Protective role of selenium. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 17543, Dec 13 2017.

ZHANG, H. et al. Histopathological nature of myofascial trigger points at different stages of recovery from injury in a rat model. **Acupunct Med**, v. 35, n. 6, p. 445-451, Dec 2017.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.649, de 11 de junho de 2008)



Pré-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 9913-9208. E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 045/2017

Título: Efeito do agulhamento seco sobre modelo de dor muscular induzida por salina ácida em ratos.

Data da aprovação: 10/11/2017

Período de vigência do projeto: 10/11/2019

Pesquisadores(a): Morgana Duarte da Silva

Campus: Uruguaiana

Telefone: (55) 99931-9242

E-mail: morganasilva@unipampa.edu.br

CEUA

Finalidade	Comissão de Ética em Uso de Animais
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	64
Peso/Idade	300g/ 2-3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFSM.

Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA