UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RODRIGO OKUBO

Análise funcional, biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidos à lesão experimental e tratados por eletroacupuntura

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RODRIGO OKUBO

Análise funcional, biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidos à lesão experimental e tratados por eletroacupuntura

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação.
Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Serviço de Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Okubo, Rodrigo

Análise funcional, biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidos à lesão experimental e tratados por eletroacupuntura / Rodrigo Okubo; orientador Antônio Carlos Shimano.

-- Ribeirão Preto, 2009.

103 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Área de Concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

1. Eletroacupuntura. 2. Músculo esquelético. 3. Trauma.
4. Biomecânica. 5. Histologia. 6. Marcha.

CDD

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigo Okubo

Análise funcional, biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidos à lesão experimental e tratados por eletroacupuntura

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Ortopedia, traumatologia e reabilitação.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela vida, apoio e, acima de tudo, pelo amor incondicional.

À Luciana, pelo amor, companheirismo, paciência e compreensão.

Palavras são perdidas,
promessas são esquecidas,
papéis e cartas apodrecem,
mas o verdadeiro amor
é o que permanece...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano, é um privilégio estar trabalhando ao seu lado, não somente pelo ensino e crescimento científico/profissional, mas, essencialmente, pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. José Batista Volpon, pelos ensinamentos e conselhos, e, pelo companheirismo da conversa.

Aos funcionários, amigos de todos os dias, do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: Carlos Alberto Moro, Francisco Carlos Mazzocato, Luiz Henrique Alves Pereira, Maria Teresinha de Moraes e Reginaldo Trevilatto da Silva.

Aos funcionários da Oficina de Precisão da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial ao Otávio Terra, pelos serviços prestados.

Aos amigos do Laboratório de Bioengenharia, pelo auxílio para ao desenvolvimento deste trabalho e pela convivência.

Às secretárias do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor: Maria de Fátima Feitosa de Lima e Elisângela Bernardi de Oliveira.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Todas as pessoas citadas são amigos. E, obrigado por não julgar. Obrigado por escutar e opinar ou, simplesmente, escutar. Obrigado por estar aí se te necessito. Obrigado por, mesmo que eu faça coisas que não compreendes estar me esperando.

Aos ratos.

A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

OKUBO, R. **Análise funcional, biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidos à lesão experimental e tratados por eletroacupuntura.** 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O objetivo deste trabalho foi avaliar funcional, biomecânica e histologicamente a influência da eletroacupuntura em músculos gastrocnêmios submetidos à lesão experimental por mecanismo de impacto. Foram utilizadas 96 ratas Wistar, de peso inicial de $239,93 \pm 12,45$ g, divididas em grupos experimentais: grupo lesão 3 e 5 dias (GL3 e GL5); grupo tratado com eletroacupuntura 3 e 5 dias (GT3 e GT5) e grupo simulado, utilizando ditos não-pontos, 3 e 5 dias (GS3 e GS5). O controle (GC) foi composto pelos músculos contralaterais à pata lesada dos grupos GT3 e GT5; A lesão direta foi provocada no músculo gastrocnêmio por mecanismo de impacto com a queda de uma carga de 200 g de altura de 30 cm. Os pontos E-36 (*Zusanli*) e BP-6 (*Sanyinjiao*) foram localizados e estimulados através do localizador de pontos *Plexus Point Scanner* e do aparelho eletroestimulador *Accurate Pulse 195 Microprocessado* (VMV Biotherapy – São Carlos / SP). A análise funcional foi designada de forma a realizar a quantificação do tempo do passo da pata lesada. Esta análise foi realizada através da filmagem da caminhada dos animais sobre um trilho de acrílico, sendo gravadas as imagens antes da lesão, um dia após a lesão e, neste mesmo dia, após a aplicação da eletroacupuntura, tanto no grupo simulado como no grupo tratado. Os músculos gastrocnêmios foram submetidos a ensaios mecânicos na máquina universal de ensaio EMIC® e calculadas as respectivas propriedades mecânicas: força máxima e rigidez. A análise histológica foi utilizada para determinar a extensão da regeneração e reparo, verificando área de lesão. O músculo removido foi fixado em formol 10% por sete dias, desidratado com diferentes concentrações de álcool, incluído em parafina e os cortes semi-finos (6 μ m de espessura) foram corados com H&E. A análise da marcha demonstrou constantes de tempos, para o grupo simulado, de: $0,53 \pm 0,12$ para antes da lesão, $0,20 \pm 0,05$ para o animal lesado e, $0,33 \pm 0,05$ para depois da eletroacupuntura. Para o grupo tratado, $0,52 \pm 0,09$ para antes da lesão, $0,22 \pm 0,06$ para o animal lesado e, $0,36 \pm 0,03$ para depois da eletroacupuntura. Os valores médios das forças máximas e rigidez foram, respectivamente: para GC de $(37,21 \pm 4,28)$ N e $(4,30 \pm 0,79)$ N/mm, GL3 de $(32,32 \pm 3,00)$ N e $(3,7 \pm 0,9)$ N/mm, para o GT3 de $(29,93 \pm 5,23)$ N e $(3,83 \pm 0,90)$ N/mm, e, para o GS3 de $(31,78 \pm 3,71)$ N e $(4,25 \pm 0,69)$ N/mm. Além disso, para GL5 de $(36,02 \pm 6,26)$ N e $(4,11 \pm 1,17)$ N/mm, GT5 de $(36,37 \pm 4,98)$ N e $(4,70 \pm 1,14)$ N/mm, e, para o GS5 de $(36,34 \pm 5,33)$ N e $(4,50 \pm 0,71)$ N/mm. A análise histológica, dos grupos de 3 dias, lesado, tratado e placebo, mostrou áreas de lesão evidente, observando infiltrado de células em locais de hematoma, não demonstrando diferenças entre os grupos. Nos grupos de 5 dias, o tratado apresentou melhora em relação aos demais grupos. Os resultados encontrados sugerem uma melhora funcional e histológica com a utilização da técnica da eletroacupuntura, porém não foi observada melhora biomecânica.

Palavras-chave: Eletroacupuntura, Músculo esquelético, Trauma, Biomecânica, Histologia, Marcha.

ABSTRACT

OKUBO, R. **Functional, biomechanical and histological analysis of gastrocnemius muscle of rats submitted to experimental injury and treated by electroacupuncture.** 2009. 103 f. Dissertation (Master) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The purpose of this study was to evaluate functional, histological and biomechanical influence of acupuncture in injury of gastrocnemius muscle (contusion). We used 96 Wistar rats with initial weight of 239.93 ± 12.45 g, divided into experimental groups: injury group 3 and 5 days (GL3 and GL5); group treated with electroacupuncture for 3 and 5 days (GT3 and GT5) and simulated group, using non-points, for 3 and 5 days (GS3 and GS5). A control (GC) was composed of contralateral leg muscle groups of injured rats. Gastrocnemius muscle injury was caused directly by a mechanism of impact with a load of 200 g and height of 30 cm. E-36 (Zusanli) and BP-6 (Sanyinjiao) points were located and stimulated through a finder of points Plexus Point Scanner and a unit stimulated Accurate Pulse 195 microprocessor (VMV Biotherapy - San Carlos / SP). Functional (walking test), biomechanical (mechanical tests) and histological analysis were performed. The assessment of walk was used to achieve the quantification of the time step of the injured leg, hypothesized that this time is lower than a normal step. Animals walked on a trail of acrylic, and images were recorded before the injury, a day after the injury and, in the same day, after the implementation of electroacupuncture in both sham and treatment group. The left gastrocnemius muscles were subjected to mechanical tests in the universal test machine EMIC® and through a microcomputer interface generated graphics force x stretching from which were calculated their mechanical properties: maximum strength and stiffness. The histological analysis was used to determine the extent of the regeneration and repair, noting area of injury. The muscle removed was fixed in formalin 10% for seven days, dehydrated with different concentrations of alcohol, included in paraffin and cut semi-thin (6 mm of thickness) were stained with hematoxylin-eosin. The walk analysis showed the constant of time for the simulated group: 0.53 ± 0.12 before injury, 0.20 ± 0.05 for the injured animal, and then 0.33 ± 0.05 after electroacupuncture. For treated group, 0.52 ± 0.09 before injury, 0.22 ± 0.06 for injured animal, and 0.36 ± 0.03 after electroacupuncture. The average values of maximum strength and stiffness were, respectively: for GC (37.21 ± 4.28) N and (4.30 ± 0.79) N/mm, GL3 (32.32 ± 3.00) N and (3.7 ± 0.9) N/mm, GT3 (29.93 ± 5.23) N and (3.83 ± 0.90) N/mm, and for GS3 (31.78 ± 3.71) N and (4.25 ± 0.69) N/mm. Moreover, GL5 showed (36.02 ± 6.26) N of maximum strength and (4.11 ± 1.17) N/mm of stiffness, GT5 (36.37 ± 4.98) N and (4.70 ± 1.14) N/mm, and GS5 (36.34 ± 5.33) N and (4.50 ± 0.71) N/mm. The histological analysis showed in three days slides of with areas of evident bruising, there were differences between groups. In 5 days-treatment group were areas of bruises but in process of advanced repairing in comparison with sham and injured groups. The results suggest a histological and functional improvement with the use of electroacupuncture, but there was no biomechanical improvement.

Key-words: Eletroacupuncture, Skeletal muscle, Trauma, Biomechanics, Histology, Gait.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho esquemático, copiado de Zijlstra et al. (2003), que representa a cascata de eventos decorrentes da acupuntura. Notam-se efeitos finais sobre a dor e a inflamação.	35
Figura 2: Ratas da variedade Wistar utilizadas no experimento.....	42
Figura 3: Desenho esquemático do aparelho e do peso utilizado para a realização da lesão muscular. (A) Vista anterior e (B) vista superior-lateral.....	44
Figura 4: Caneta localizadora de pontos.....	45
Figura 5: Localização do ponto E-36 com a caneta localizadora de pontos (<i>Point Scanner – VMV Biotherapy / Lautz, São Carlos / SP</i>).....	46
Figura 6: Localização do ponto BP-6 com a caneta localizadora de pontos (<i>Point Scanner – VMV Biotherapy / Lautz, São Carlos / SP</i>).....	46
Figura 7: Agulhas de acupuntura – <i>Dong Bang</i>	47
Figura 8: Eletroestimulador de pontos.....	48
Figura 9: Osciloscópio presente na seção de Eletrônica da PCARP da USP.	49
Figura 10: Imagem do osciloscópio com o eletroestimulador conectado e ligado (Adequou-se uma frequência maior que a utilizada no experimento [60 Hz] para a melhor visualização do padrão da curva).....	49

Figura 11: Agulhas já inseridas nos pontos determinados (E-36 e BP-6) com os conectores (jacaré) fixados nas agulhas e pronto para a realização da técnica. Esta imagem foi retratada enquanto o animal recebia a primeira sessão da técnica e estava sob efeito da anestesia.....	51
Figura 12: Fotografia representando uma visão geral da eletroestimulação. A técnica era realizada bilateralmente. Novamente, a imagem foi retratada enquanto o animal recebia a primeira sessão da técnica e estava sob efeito da anestesia.....	51
Figura 13: Imagem que demonstra o trilho de marcha, em diferentes vistas a e b, em acrílico desenvolvido na oficina de precisão da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto.	53
Figura 14: Janela demonstrativa do software Adobe® Premiere Pro CS4, a qual possibilita a importação do vídeo e sua análise, referente aos períodos de tempo da caminhada inteira sobre esta parte do trilho e o passo do animal, compreendido entre o apoio inicial e a liberação desta pata do solo. A marcação do tempo é demonstrada pelo oval vermelho.	54
Figura 15: Dissecção e exposição do músculo gastrocnêmio.....	55
Figura 16: Músculo gastrocnêmio, com suas respectivas origem e inserção, pronto para a realização do ensaio mecânico.....	56
Figura 17: Máquina Universal de Ensaios (EMIC®), modelo DL 10000, presente no Laboratório de Bioengenharia da FMRP / USP.....	57

Figura 18: Montagem e acoplamento do músculo gastrocnêmio aos acessórios da Máquina Universal de Ensaio, pronto para a realização do ensaio mecânico de tração.	58
Figura 19: Gráfico demonstrando as médias da constante de tempo para os determinados subgrupos (anterior, lesão e posterior) do grupo tratado. As diferenças estatísticas significativas foram representadas pelos conectores, demonstrando, também os níveis de significância.....	63
Figura 20: Gráfico demonstrando as médias da constante de tempo para os determinados subgrupos (anterior, lesão e posterior) do grupo simulado. As diferenças estatísticas significativas foram representadas pelos conectores, demonstrando, também os níveis de significância.....	64
Figura 21: Gráfico demonstrando as médias da constante de tempo para todos os subgrupos (anterior [A], lesão [B] e posterior [C]). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.	65
Figura 22: Gráficos correspondentes às médias dos valores de comprimento muscular relativos aos grupos de 3 (A) e 5 dias (B). As diferenças estatísticas significativas são demonstradas por conectores entre os grupos experimentais.....	67
Figura 23: Gráficos apresentando as médias dos perímetros intermédios dos músculos gastrocnêmios relativos a todos os grupos experimentais. Os conectores demonstram as diferenças estatísticas significativas entre os grupos.	68

Figura 24: As médias dos valores dos perímetros intermédios dos músculos gastrocnêmios são representados nos gráficos acima. As diferenças estatísticas significativas entre os grupos são especificadas através dos conectores.....	69
Figura 25: Gráficos demonstrando as médias dos valores dos pesos dos músculos gastrocnêmios dentro dos grupos experimentais. Os conectores apresentam as diferenças estatísticas significativas entre os grupos.....	70
Figura 26: Gráfico representando os valores médios da força máxima dos grupos experimentais de 3 dias. As diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais são demonstradas pelos conectores, assim como, seus respectivos valores de p.....	71
Figura 27: Gráfico representando as médias dos valores da força máxima dos grupos experimentais de 5 dias. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.	72
Figura 28: Gráfico representando as médias dos valores da força máxima dos grupos de 3 e 5 dias. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais.	73
Figura 29: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo lesado após 3 dias (GL3), observa-se áreas de hematomas, com infiltrados celulares e desorganização tecidual. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.....	74

Figura 30: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo simulado após 3 dias (GS3), observa-se áreas de hematomas, com infiltrados celulares e desorganização tecidual. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.74

Figura 31: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo tratado após 3 dias (GT3), observa-se áreas de hematomas, com infiltrados celulares e desorganização tecidual. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.75

Figura 32: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo lesado após 5 dias (GL5), observa-se ainda áreas dos hematomas e início da organização tecidual e maior número de vasos. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.76

Figura 33: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo simulado após 5 dias (GS5), observa-se ainda áreas dos hematomas e início da organização tecidual e maior número de vasos. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.76

Figura 34: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo tratado após 5 dias (GT5), observa-se menores áreas dos hematomas melhor organização tecidual e maior número de vasos em relação aos grupos GL5 e GS5. A e B imagem capturada

com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e
optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0.
Coloração de HE.77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de tempo e eventos durante a regeneração muscular (adaptado de KÄÄRIÄINEN et al., 2000).....27

Tabela 2: A tabela abaixo representa as médias (MD) e desvios padrões (DP) das constantes de tempo (Ct) dos grupos tratados e simulados (3 e 5 dias), sendo observada a medida anterior a lesão (anterior), 1 dia após a lesão (lesão) e, após a sessão do tratamento deste dia (posterior).62

Tabela 3: Médias $\pm$ desvios padrões (MD $\pm$ DP) das medidas das variáveis do peso final do animal (PAnimal), comprimento (C), perímetro proximal (PP), perímetro intermédio (PI), perímetro distal (PD) e do peso do músculo gastrocnêmio (PM) para cada grupo experimental: Grupo controle (GC), lesado 3 e 5 dias (GL3 e GL5), tratado 3 e 5 dias (GT3 e GT5) e simulado 3 e 5 dias (GS3 e GS5). As letras a e b representam diferenças estatísticas significativas em relação aos outros valores....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

kg – kilograma
% – porcentagem
TNF- α – *tumoral necrosis factor- α*
FGF – *fibroblast growth factor*
IGF – *insuline-like growth factor*
TGF- β – *transforming growth factor*
IL – interleucina
g – grama
mm – milímetro
cm – centímetro
RICE – *rest, ice, compression e elevation*
NIH – *National Institutes of Health*
k-Ohms – kilo-Ohms
M-Ohms – Mega-Ohms
 μ – micro
IFN- γ – interferon- γ
E-36 – ponto de acupuntura estômago 36
n° – número
h – hora
n – número amostral por grupo
GC – controle
GL3 – grupo lesado 3 dias
GL5 – grupo lesado 5 dias
GT3 – grupo tratado por 3 dias
GT5 – grupo tratado por 5 dias
GS3 – grupo simulado 3 dias
GS5 – grupo simulado 5 dias
N – Newton
kgf – kilograma-força
m – metro

s – segundo
F – força
M – massa
a – aceleração
h – altura
 ΔS – deslocamento tecidual
ml – milímetro
° - grau
V – Volt
LED – *light emission diode*
Hz – Hertz
BP-6 – ponto de acupuntura baço-pâncreas 6
min – minuto
p – nível de significância
MD – média
DP – desvio padrão
C – comprimento
PP – perímetro proximal
PI – perímetro intermédio
PD – perímetro distal
Panimal – peso final do animal
Pmuscular – peso do músculo gastrocnêmio
HE – hematoxilina e eosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Músculo esquelético	22
1.2	Lesões musculares	23
1.2.1	<i>Patologia da lesão muscular</i>	<i>24</i>
1.2.2	<i>Contusão muscular</i>	<i>27</i>
1.2.3	<i>Tratamentos</i>	<i>31</i>
1.3	Acupuntura	31
1.3.1	<i>Acupuntura como técnica.....</i>	<i>31</i>
1.3.2	<i>Propriedades dos pontos de acupuntura.....</i>	<i>32</i>
1.3.3	<i>Ações da acupuntura</i>	<i>34</i>
1.3.4	<i>Acupuntura no músculo esquelético.....</i>	<i>36</i>
2	OBJETIVOS.....	38
2.1	Objetivo primário.....	39
2.2	Objetivos secundários.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Materiais.....	41
3.1.1	<i>Animais experimentais.....</i>	<i>41</i>
3.1.2	<i>Grupos experimentais.....</i>	<i>42</i>
3.1.3	<i>Lesão muscular experimental</i>	<i>43</i>
3.1.4	<i>Localização dos pontos de acupuntura</i>	<i>45</i>
3.1.5	<i>Eletroestimulação dos pontos.....</i>	<i>47</i>
3.1.6	<i>Análise da marcha</i>	<i>52</i>

3.1.7	<i>Coleta de material</i>	55
3.1.8	<i>Ensaaios mecânicos</i>	56
3.1.9	<i>Histologia</i>	58
3.1.10	<i>Análise estatística</i>	60
4	RESULTADOS	61
4.1	Análise da marcha.....	62
4.2	Análise biomecânica.....	66
4.2.1	<i>Medidas antropométricas</i>	66
4.2.2	<i>Propriedades mecânicas</i>	70
4.3	Análise histológica.....	73
5	DISCUSSÃO	78
6	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	88
	ANEXOS	102

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Músculo esquelético*

Os músculos esqueléticos são propulsores do movimento humano. Estes quando contraídos transformam a estrutura óssea em uma potente alavanca para a cinética corporal (ARRINGTON; MILLER, 1995).

Músculos esqueléticos podem ser simplesmente considerados compostos por dois principais elementos: as fibras musculares (miofibras) e o tecido conjuntivo. As miofibras, através da sua inervação, são responsáveis pela função contrátil do músculo, enquanto que o tecido conjuntivo proporciona a estrutura que mantém as células musculares individuais unidas durante a contração muscular, além de, envolver os capilares e nervos dentro da estrutura muscular como um todo (JÄRVINEN et al., 2005; JÄRVINEN et al., 2007; KÄÄRIAINEN et al., 2000; KANNUS et al., 2003).

As miofibras são formadas por uma diversidade de miofibrilas que resguardam unidades contráteis funcionais, os sarcômeros. Esta unidade estende-se entre duas linhas “Z” e dispõem miofilamentos de actina e miosina.

O controle do influxo de cálcio pelo retículo sarcoplasmático adapta o sistema da troponina – tropomiosina, alterando a conformação estrutural da actina, que acopla à miosina, ativa a ATPase, ocasionando o deslizamento entre os miofilamentos e, conseqüentemente, a contração muscular.

A rede de tecido conjuntivo, por sua vez, cria um esqueleto de suporte para as fibras musculares, convertendo as forças de fibras individuais em uma resultante única, causando uma locomoção eficiente. As miofibras são conectadas pela

estrutura conjuntiva composta de três níveis: O endomísio, que envolve cada miofibrila; o perimísio que abrange o fascículo; e, o epimísio, considerado o mais resistente e fino, envolve o músculo como um todo (JÄRVINEN et al., 2005; JÄRVINEN et al., 2007; TAKALA; VIRTANEN, 2000).

Segundo Tidball (1991), a ligação das fibras musculares aos tendões ou fáscias resulta de forças aproximadas acima de 1000 kg durante um esforço máximo. Para abstrair tamanha força de tração, as miofibrilas contêm cadeias de moléculas específicas, que conectam os miofilamentos à matriz extracelular, denominadas integrinas e complexos distrofina-glicoproteína. Além disso, proteínas gigantes, denominadas titinas, também, apresentam papel determinante na resistência passiva à tensão do músculo esquelético. Estas proteínas localizam-se entre a linha “Z” e “M” em uma metade do sarcômero e, funcionam dependendo da extensão do alongamento muscular realizado.

O músculo esquelético, dessa forma, apresenta uma complexa formação que determina importantes funções. De maneira a cumpri-las, o sistema muscular apresenta uma distribuição principalmente externa pelo corpo humano. Deste fato decorrem fatores lesionais de diversas formas que limitam a função muscular, até que este tecido esteja integralmente recuperado.

1.2 Lesões musculares

As lesões musculares são uma das mais comuns formas de lesões decorrentes do esporte, com uma incidência variando de 10-55% de todos os acometimentos desse ramo (BEINER; JOKL, 2002; GARRETT, 1996; JÄRVINEN; LEHTO, 1993).

Contusão, estiramento ou laceração são as lesões musculares comumente observadas na clínica (GARRETT, 1996; JÄRVINEN; LEHTO, 1993). Sendo, aproximadamente, 90% de todas as lesões são contusões e estiramentos (ARMPFIELD et al., 2006).

As lesões musculares podem ser classificadas em dois principais tipos: lesão por cisalhamento, na qual as miofibras, suas lâminas basais e as bainhas musculares são dilaceradas; e, a necrose “*in situ*”, a qual apenas as miofibras são necrosadas dentro de sua lâmina basal intacta (JÄRVINEN et al., 2005; JÄRVINEN et al., 2007; KALIMO et al., 1997; KÄÄRIÄINEN et al., 1998).

Na lesão por cisalhamento, o tipo mais freqüente, a continuidade da unidade tendão-músculo-tendão é perdida. Isto leva a formação de uma falha (ou “*gap*”) na musculatura, que é preenchida por hematoma, e mais tardiamente, substituída por tecido conjuntivo (HURME et al, 1991; HURME; KALIMO, 1992).

1.2.1 Patologia da lesão muscular

O processo de recuperação da lesão do músculo esquelético segue um padrão independente do tipo da causa (laceração, contusão ou estiramento) (HURME et al., 1991; JÄRVINEN et al., 2005). A distinção da recuperação reparação ou regeneração muscular dá-se pela lesão ou não da lâmina basal. Quando a lâmina é lesada forma-se tecido cicatricial, caracterizado pelo colágeno. Esta mudança pode levar a alteração tanto mecânica e histológica quanto funcional. Enquanto que, se não há esta lesão, o tecido é regenerado, mantendo-se com as mesmas propriedades do tecido muscular normal.

As fases identificadas no processo de reparação muscular (HURME et al., 1991; HWANG et al., 2006; JÄRVINEN et al., 2005; JÄRVINEN et al., 2007) são: (1) fase de destruição, (2) fase de reparo e, (3) fase de remodelamento.

(1) A fase de destruição é caracterizada pela ruptura e necrose das miofibras, formação do hematoma entre as miofibras lesadas e a reação celular inflamatória (HURME et al., 1991; JÄRVINEN et al., 2005).

(2) A fase de reparo do músculo esquelético lesado consiste da fagocitose do tecido necrosado, regeneração das miofibras e concomitante produção do tecido cicatricial. A revascularização, também, ocorre nesta fase, pelo crescimento de capilares em áreas lesadas.

(3) O período decorrente da maturação das miofibras regeneradas, da retração e reorganização do tecido cicatricial e, conseqüentemente, a recuperação da capacidade funcional do músculo caracteriza a fase de remodelação.

De maneira resumida, Järvinen et al. (2007) relata que após o trauma inicial, as miofibras rompidas contraem para suas extremidades e, um hematoma é produzido nesse local entre as miofibras. As extremidades lesadas das miofibras sofrem apenas necrose local. Macrófagos, tendo primeiro invadido a área de lesão, removem as partículas necrosadas e secretam fatores de crescimento que ativam as células satélites (JÄRVINEN et al., 2000).

Em relação aos fatores de crescimento e citocinas liberadas, há diretas evidências de que o fator de necrose tumoral – α (TNF- α) possui papel na regeneração do músculo esquelético, como um inibidor da atividade muscular durante a recuperação (CANNON; PIERRE, 1998; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; WARREN; HULDERMAN; JENSEN, 2002). Além disso, fatores de crescimento de

fibroblastos (FGF) (ANDERSON et al., 1995; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004), fatores de crescimento “insulina-like” (IGF) (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; HAYASHI; ASO; WATANABE, 2004) e, fatores de crescimento de transformação – β (TGF- β), além de interleucinas 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6) (BUNN et al., 2004; CANNON; PIERRE, 1998; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004) são expressados no músculo lesado.

IGFs 1 e 2 mostraram ser precursores mitogênicos para mioblastos, em lesões musculares (ENGERT; BERGLUND; ROSENTHAL, 1996; FLORINI; EWTON; COOLICAN, 1996). Bunn et al. (2004) verificaram que, em lesões musculares, citocinas TNF- α e IL-1 β são quimioatrativos para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. IL-1 β e IL-6 apresentam aumentos no dia 2 e TNF- α dia 8 pós-lesão.

As células satélites encontram-se quiescentes entre o sarcolema e a lâmina basal das miofibras. Essas células são responsáveis por formar mioblastos, fundi-los emmiotubos e, finalmente, maturar em miofibras (JÄRVINEN et al., 2000; SHI; GARRY, 2006).

Kääriäinen et al. (2000) apresentaram uma tabela resumida com os eventos durante a regeneração muscular (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de tempo e eventos durante a regeneração muscular (adaptado de KÄÄRIÄINEN et al., 2000).

Tempo pós-lesão	Eventos
0-24h	<ul style="list-style-type: none"> - retração das miofibras rompidas e “gap” preenchido com hematoma - miofibras rompidas iniciam necrose - migração de macrófagos - banda de contração é formada permitindo a formação da membrana de demarcação, que impede a extensão da lesão - ativação das células satélites em 12 h - proliferação das células satélites em 24 h
Dia 2-3	<ul style="list-style-type: none"> - Diferenciação das células satélites em mioblastos e inicia a fusão em miotubos - fagocitose de miofibras necrotizadas por macrófagos - hematoma começa a ser substituído por tecido conectivo
Dia 5	<ul style="list-style-type: none"> - miotubos começam preencher membranas basais “vazias” - miofibras regeneradas começam a aderir ao tecido conectivo formado
Dia 7	<ul style="list-style-type: none"> - miofibras regeneradas mantêm-se fora das membranas - tecido conectivo começa a densificar
Dia 14	<ul style="list-style-type: none"> - formação de novas mini – junções miotendíneas
Dia 21-56	<ul style="list-style-type: none"> - tecido “cicatricial” começa a diminuir e as miofibras começam a entrelaçar - fibras regeneradas maduras e mionúcleos na periferia

1.2.2 Contusão muscular

A mais freqüente lesão muscular traumática é a contusão, produzida pelo alto impacto de um objeto não penetrante, de maneira repentina e gerando uma força compressiva sobre o músculo (CRISCO, 1994; GARRETT, 1996).

A capacidade de lesão do objeto móvel é diretamente proporcional à sua energia cinética, e, conseqüentemente, à sua massa e velocidade. Como a energia cinética aumenta com o quadrado da velocidade, objetos em velocidade alta

ocasionam maior lesão que elementos em baixa velocidade (ZHANG; QUIAN; LIU, 1988).

A magnitude desta lesão e dano depende do tipo de tecido e da região envolvida, mas as mudanças patológicas básicas no músculo esquelético permanecem as mesmas, independentes da área e do tipo de trauma (ARRINGTON; MILLER, 1995).

A contusão muscular freqüentemente é observada em atletas que realizam esportes de contato, porém, pode ser observada, também, em indivíduos não atletas. Hospitalização é raramente necessária, no entanto, essas lesões afetam a função muscular. Morbidades funcionais e estruturais, freqüentemente, ocorrem em forma de atrofia, contratura, dor e aumento da probabilidade de reincidência de lesão (KASEMKIJWATTANA et al., 1998; TAYLOR et al., 1993).

A classificação clínica desta lesão muscular depende da severidade da lesão e da natureza do hematoma. Os vasos sanguíneos intramusculares são facilmente lesados como resultado do trauma, levando a um hematoma intra ou intermuscular. No caso do hematoma intramuscular, o sangue extravasado dentro da fáscia muscular intacta aumenta a pressão intramuscular, que comprime os vasos e limita o tamanho do hematoma. Diferentemente, o hematoma intermuscular desenvolve-se quando a fáscia muscular é lesada e o sangue extravasado tem acesso aos espaços intersticiais e interfasciais, sem o aumento significativo da pressão dentro do músculo, sendo a perda sanguínea mais extensiva (JÄRVINEN et al., 2005).

A classificação cotidiana identifica lesões leves ou de primeiro grau, moderadas ou segundo grau e severas de terceiro grau, com base no comprometimento clínico (EKSTRAND; GILQUIST, 1983; EKSTRAND, 2008;

JACKSON; FEAGIN, 1973). As lesões leves representam complicações a poucas fibras musculares com pequeno inchaço e desconforto, acompanhado ou não por perda mínima de força e restrição de movimento. Contusões moderadas envolvem grandes lesões musculares com perda visível de função. E, a lesão, por toda a secção transversal do músculo, resultando em perda completa da função muscular, denomina a lesão severa.

Uma limitação dos estudos clínicos para avaliar o tratamento das contusões musculares é a variabilidade destas lesões (ASPELIN et al., 1992). Ao contrário, a ciência básica possui a capacidade para desenvolver um modelo de contusões musculares bem definidas e de fácil reprodutibilidade.

Modelos prévios eram realizados de maneira invasiva (através de um fórceps inserido pela incisão na pele) (ALLBROOK, 1962; BUNN et al., 2004), sendo sua habilidade em mimetizar situações de contusões clínicas limitadas.

Modelos de contusões não invasivas e reprodutíveis utilizam sistemas de martelo com mola (HURME; KALIMO, 1992; JÄRVINEN; SORVARI, 1975; RANTANEN et al., 1999) e, técnicas de liberação de peso de determinadas alturas (CRISCO et al., 1996; FISHER et al., 1991; FRANCIS; HECKMANN; STRATTON, 1984; MARKERT et al., 2005; MINAMOTO; GRAZZIANO; SALVINI, 1999; MINAMOTO; BUNHO; SALVINI, 2001; WRIGHT-CARPENTER et al., 2002).

Em 1975, Järvinen e Sorvari desenvolveram o modelo de contusão utilizando o martelo com mola. O objetivo foi a produção da lesão do tríceps sural acima da junção músculo-tendínea. Os animais foram sacrificados 2 dias após a lesão. Esta afetou os músculos gastrocnêmios, raramente penetrando no músculo sóleo. Notou-se uma uniformidade neste modelo de injúria.

Francis, Heckmann e Stratton (1984) utilizaram a técnica de liberação de massa (700 g) de uma altura de 125 mm no complexo da musculatura posterior da pata de ratos. Eles observaram uma fase catabólica até 3 dias após o trauma (perda de proteína muscular), seguida de uma fase anabólica, com aumento gradativo desta proteína perdida, com duração de cerca de 2 semanas. O problema deste modelo encontrava-se nos cálculos em que envolviam força, deformação tecidual e energia transferida ao músculo-alvo. Crisco et al. (1994), realizaram alterações na altura (102 cm) e massa liberada (171 g), além de adaptar uma célula de carga ao sistema, possibilitaram cálculos da energia absorvida pelo tecido muscular.

Assim sendo, os modelos atualmente utilizados adaptam-se a estes estudos prévios. A busca da massa e altura ideal para realização da lesão ainda é discutível. Essa informação é essencial para o entendimento das falhas nas propriedades mecânicas do músculo e o limiar da lesão.

Os custos financeiros das lesões por contusão muscular são difíceis de serem calculadas. A dificuldade dessa análise ocorre pela hospitalização não ser necessária, na grande maioria das vezes (CRISCO et al., 1994). No entanto, é sabida que a perda de tempo na recuperação de atletas para treinamento ou competição é grande. Havendo a necessidade primordial de se desenvolver tratamentos que acelerem o processo de recuperação e, de maneira a não-ocorrência de recidivas.

1.2.3 Tratamentos

Os tratamentos variam enormemente (CRISCO et al., 1994). Imobilizações e remobilizações (JÄRVINEN, 1975, 1976a, 1976b, 1993), gelo (crioterapia) e princípio RICE - “rest, ice, compression, elevation” (BLEAKLEY; MCDONOUGH; MACAULEY, 2004; DEAL et al., 2002; SCHASER et al., 2007), medicações como anti-inflamatórios não-esteroidais (MISHRA et al., 1995, OBREMSKY et al., 1994; RAHUSEN; WEINHOLD; ALMEKINDERS, 2001; THORSSON et al., 1998) ou corticóides (BEINER et al., 1999), ultra-som terapêutico (MARKERT et al., 2005; RANTANEN et al., 1999; WILKIN et al., 2004), fatores de crescimento (KASEMKIJWATTANA et al., 2000; MENETREY et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2003), são tratamentos realizados com a finalidade de promover a melhora da lesão muscular, entre outros.

Embora, as diversas terapias são realizadas com a finalidade de diminuir as morbidades, o melhor tratamento desta lesão muscular ainda permanece indefinido (CRISCO et al., 1994).

1.3 Acupuntura

1.3.1 Acupuntura como técnica

A acupuntura é uma técnica de tratamento que sobrevive desde épocas remotas. Seu mecanismo de tratamento pela inserção de agulhas visa o ajuste do fluxo de energia vital, que se acredita circular por uma rede de 12 canais ou

“meridianos” e, compõem e conectam cerca de 360 pontos. Esta técnica possui indícios de existência desde 5000 mil anos atrás.

Os antigos chineses estabeleceram uma série de considerações sobre a Natureza e a origem da Vida, procurando transpor os princípios e as leis que regem a Natureza para a fisiologia do Homem. Através da elaboração de diversas teorias baseadas em leis naturais, como Yin e Yang, dos cinco elementos, do Zang Fu, os chineses desenvolveram de maneira intuitiva uma fisiologia, fisiopatologia e diagnóstico das doenças (ROSS, 1994).

Em sua concepção, acredita-se que os órgãos internos teriam conexões com os sistemas músculo-esquelético, vascular e nervoso, sendo necessária uma forma de energia (Qi) que percorresse o corpo por um sistema de canais de energia (meridianos). A inserção de agulhas nos pontos de acupuntura, segundo esta medicina, mobilizaria o Qi nos canais de energia, ativando os órgãos internos e o sistema nervoso central, tendo efeitos nas patologias periféricas e viscerais (MACIOCIA, 1993; ROSS, 1994).

1.3.2 Propriedades dos pontos de acupuntura

Os pontos de acupuntura e os meridianos de energia apresentam características elétricas específicas, que os diferenciam das áreas adjacentes (ZONGXIANG, 1981).

Diversos estudos relatam estas propriedades elétricas vinculadas a pontos “bioativos”, que são freqüentemente equiparados aos pontos de acupuntura. Estas propriedades incluem aumento de condutância (HYVARINEN; KARLSSON, 1977), impedância e resistência diminuída, capacitância aumentada (LEE et al., 2003;

PROKHOROV et al., 2000) e elevado potencial elétrico (HYVARINEN; KARLSSON, 1977).

Os pontos de acupuntura apresentam cerca de 100-200 K-Ohms de resistência média, sendo que em regiões adjacentes, este valor é determinado de aproximadamente, 1 Mega-Ohm (ZONGXIANG, 1981).

Esses pontos distribuem-se no corpo de animais, inclusive de indivíduos humanos, mantendo-se as referências anatômicas (ROMITA; SUK; HENRY, 1997).

As principais correlações dos pontos de acupuntura foram feitas com os pontos motores, com a bifurcação de nervos periféricos, com locais de exteriorização de nervos cutâneos, com forames ósseos e com as linhas medianas do corpo (MELZACK, 1975).

Por outro lado, exame histológico das áreas correspondentes aos pontos de acupuntura, evidenciou haver maior concentração de mastócitos, de fibras autônomas do tipo C, relacionadas com os vasos sanguíneos, terminações nervosas, principalmente associadas às fibras A-delta e C, órgãos tendinosos de Golgi e fusos musculares (DUNG, 1984; ZONGLIAN, 1979).

Os objetos pontiagudos, que mantêm cargas elétricas, apresentam sua conformação de cargas na extremidade, gerando dessa forma uma diferença de potencial. As agulhas de acupuntura são um exemplo deste objeto, apresentando diferenças de potencial de cerca de 1.800 μV , elevando esta diferença para 140.000 μV quando manipulada (YAMAMURA et al., 1995).

1.3.2.1 Pontos Estômago-36 (Zusanli) e Baço-Pâncreas-6 (Sanyinjiao)

De acordo com Ullet, Han e Han (1998), o nervo vago pode ser estimulado produzindo um efeito de caráter parassimpático. Secções conhecidas dos meridianos (canais de energia) do Estômago e do Baço-Pâncreas correspondem ao percurso do nervo vago nestas vísceras.

Os pontos Estômago-36 (E-36) e Baço-Pâncreas-6 (BP-6) apresentam tais efeitos vagais (mecanismo parassimpático) (NOGUCHI; HAYASHI, 1996), e, em outros estudos, como supressor de inflamações periféricas (KIM et al., 2006).

Estes pontos apresentam efeitos clínicos relevantes, por participam de modelos experimentais de analgesia e, apresentarem relação com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, responsável por diminuições de edema de natureza inflamatória em trabalhos experimentais (YABUTA, 2000).

1.3.3 Ações da acupuntura

Zijlstra et al. (2003) resumem, em um desenho esquemático, a cascata de eventos prováveis da acupuntura (Figura 1). Observam-se efeitos anestésicos e antiinflamatórios como resultante dos eventos.

Figura 1: Desenho esquemático, copiado de Zijlstra et al. (2003), que representa a cascata de eventos decorrentes da acupuntura. Notam-se efeitos finais sobre a dor e a inflamação.

O sistema imune inato forma uma via bidirecional, tanto nas vias humorais quanto neurais. O estímulo do sistema imune estimula o cérebro a promover uma limitada e localizada resposta inflamatória (STERNBERG, 2003). O processo inicia-se quando fibras C sensoriais não mielinizadas são estimuladas e liberam substância “P” e outros pró-inflamatórios, induzindo vasodilatação, permeabilidade vascular e migração de leucócitos. A presença de catecolaminas e sua intervenção com

receptores β 2-adrenérgicos levam à diminuição nas citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-18) e aumento das antiinflamatórias (IL-10) (MATTHAY; WARE, 2004).

Recentemente, Jeong et al. (2002) verificaram a regulação da produção de citocinas em pacientes com asma. Inicialmente, os pacientes demonstraram níveis plasmáticos de IL-2 e IL-6 diminuídos, e, interferon - γ (IFN- γ), IL-4, fatores de necrose tumoral - α (TNF- α) aumentados. Após a acupuntura, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 estavam elevados e TNF- α reduzida.

Yu et al. (1997) também demonstraram o aumento do IFN- γ e IL-2, além de fatores “natural killers” após a aplicação da acupuntura, no ponto E-36.

Concentrações plasmáticas de TNF- α apresentam-se elevados em ratos com colite ulcerativa, sendo que o tratamento por acupuntura, no ponto E-36, mostrou-se eficaz na diminuição destes níveis de citocina (TIAN et al., 2003).

Evidências laboratoriais e clínicas demonstram que o sistema nervoso parassimpático desenvolve a função de regulação da síntese das citocinas e a contenção do processo inflamatório (BOROVIKOVA et al., 2000). Somado a este fato a “via antiinflamatória colinérgica” (PAVLOV et al., 2003), pela liberação da acetilcolina vagal inibe a síntese de pró-inflamatórios, mas não as citocinas anti-inflamatórias.

Evidências sobre a ação antiinflamatória da acupuntura podem ser observadas, no entanto, pouco se sabe sobre.

1.3.4 Acupuntura no músculo esquelético

Diversos estudos sobre acupuntura demonstram seus efeitos em relação ao tratamento da dependência química, tratamento de disfunções pulmonares (asma,

bronquite) e reabilitação de problemas neurológicos, como acidentes vasculares encefálicos (CASIMIRO et al., 2005; HOPWOOD et al., 2008; JEONG et al., 2002). Além disto, outros estudos focam o controle da dor, a melhora da função, o melhor aporte sanguíneo para o corpo, como conseqüências desta técnica (FRANÇA et al., 2008; HÜBSCHER et al., 2008; INOUE et al., 2008; UCHIDA; HOTTA, 2008).

No entanto, pouco se sabe sobre a atuação da acupuntura nas reparações musculares, processos antiinflamatórios e repercussões na resistência mecânica e função.

O processo regenerativo do músculo esquelético é bem descrito, embora suas respostas a tratamentos e, conseqüentes repercussões mecânicas na estrutura deste tecido, ainda, não é relatado um tratamento bem esclarecido que reabilite o indivíduo rapidamente e, previna lesões futuras.

A acupuntura demonstra-se uma valiosa técnica sendo necessários artefatos que possibilitem a avaliação desta em relação a outras. Desta maneira, a hipótese deste presente trabalho é que a intervenção realizada pela eletroacupuntura e seus efeitos antiinflamatórios e analgésicos podem demonstrar, clinicamente, aspectos de melhora em relação às lesões muscular por mecanismo de contusão.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliar, de maneira experimental, a influência da eletroacupuntura no tratamento das lesões musculares realizadas por um mecanismo de contusão muscular, dentro dos parâmetros:

- Funcionais, através da análise de marcha,
- Biomecânicos, através do ensaio mecânico do músculo gastrocnêmio, e,
- Histológicos, através da verificação de área de lesão.

2.2 Objetivos secundários

- Verificar os parâmetros da lesão muscular, em vista a averiguar se esta foi realmente efetiva e reprodutível.
 - Comparar os aspectos biomecânicos e histológicos da evolução da lesão.
-

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Materiais*

3.1.1 Animais experimentais

Previamente ao início dos procedimentos experimentais, o presente estudo foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), sendo aprovado, segundo protocolo nº 069/2006 (ANEXO 1), por estar de acordo com as normas de trato com animais.

Deste modo, 96 (noventa e seis) ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variação albina, Rodentia, Mammalia) (Figura 2), com peso médio inicial de $239,93 \pm 12,45$ gramas (g), de 8 a 10 semanas, foram utilizadas neste estudo. As ratas eram fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto (PCARP) da USP. Os animais foram mantidos em número de cinco ratas por gaiola padrão (dimensões 30 X 16 X 19 cm), com ciclo dia / noite de 12 / 12 horas (h), com umidade e temperatura controlada, e, ração e água *ad libitum*.

Figura 2: Ratas da variedade Wistar utilizadas no experimento

3.1.2 Grupos experimentais

Após a aquisição dos animais, estes foram divididos em grupos experimentais e alocados em diferentes caixas, de maneira aleatória. Estes grupos foram classificados desta forma:

- Grupo lesado 3 dias (GL3, n=16): Animais que sofreram a lesão experimental e, foram mantidos sem intervenções terapêuticas pelo período de 3 dias após a lesão.
 - Grupo lesado 5 dias (GL5, n=16): Animais que sofreram a lesão experimental e, sem intervenções terapêuticas pelo período de 5 dias após a lesão.
 - Grupo tratado 3 dias (GT3, n=16): Animais lesados experimentalmente, e, tratados através da eletroacupuntura por 3 dias (ou 3 sessões).
 - Grupo tratado 5 dias (GT5, n=16): Animais lesados experimentalmente, e, tratados através da eletroacupuntura por 5 dias / sessões.
-

- Grupo “*sham*” 3 dias (GS3, n=16): Animais que sofreram lesão e, realizado eletroacupuntura “*sham*” ou placebo, simulando um tratamento de 3 dias.

- Grupo “*sham*” 5 dias (GS5, n=16): Animais lesados experimentalmente, e, tratados através da eletroacupuntura “*sham*” por 5 dias.

As patas contralaterais à lesão dos animais dos grupos GL3 e GL5 foram utilizadas como controle do estudo. Além disto, os tratamentos eram iniciados imediatamente após as lesões dos animais. Sendo, a contagem de dias de acordo com a duração (dias) da intervenção.

Os animais dos grupos de 3 e 5 dias pós-lesão continham 6 animais para fins da realização da análise histológica, com a finalidade de verificar parâmetros da qualidade de melhora da lesão.

3.1.3 Lesão muscular experimental

Em seguida à aquisição dos animais, e a sua divisão em grupos experimentais, a lesão experimental, simulando a lesão por contusão muscular, foi realizada de maneira não invasiva. Para tal, foi utilizado um aparelho confeccionado na Oficina de Precisão da PCARP / USP.

Este aparelho consistia de uma base de madeira, duas hastes em aço inox fixadas paralelas na base, uma haste superior e, um sistema móvel confeccionado em acrílico, que servia de guia para a liberação do peso em queda livre (Figura 3).

O peso de 200 g foi confeccionado em latão e torneado em formato hexagonal para melhor acoplamento no guia de acrílico e, para evitar a perda de aceleração por aumento da resistência do ar.

Figura 3: Desenho esquemático do aparelho e do peso utilizado para a realização da lesão muscular. (A) Vista anterior e (B) vista superior-lateral.

A carga foi liberada de uma altura de 30 cm, que, segundo a fórmula adaptada por Minamoto (1999).

$$F = M \times a \times h \times \Delta S^{-1},$$

proporcionou uma real força de impacto, que possuía o valor de 294,0 N, ou, 30,0 kgf. Sendo, F = força (N), M = massa (0,2 kg), a = aceleração da gravidade (9,8 m/s²), h = altura de liberação da carga (0,3 m), e, ΔS = deformação tecidual estabelecida em 2 mm.

As lesões musculares foram realizadas com as ratas anestesiadas, com a combinação de Ketamina (0,21 ml) e Xilazina (1,5 ml), e, utilizando 0,057 ml desta para cada 100 g de peso do animal. As lesões foram, então, realizadas, nas patas direitas, que foram escolhidas de maneira aleatória, para padronização do estudo. A lesão foi feita com extensão da articulação coxo-femoral, e, joelho e tornozelo flexionados na angulação de 90°. A pata esquerda serviria para evidenciar o grupo controle nos grupos lesados.

Para que a lesão ocorresse na região pré-determinada, a carga foi conduzida pelo guia de acrílico e um fio lançado pela roldana posicionada na haste superior do

aparelho. A estabilização manual do animal foi realizada para evitar qualquer oscilação enquanto a queda do peso.

Os animais foram submetidos a um único trauma e separados de acordo com o grupo experimental.

3.1.4 Localização dos pontos de acupuntura

Após a realização da lesão muscular, os pontos de acupuntura foram localizados por meio de um aparelho que permite a identificação de áreas eletropermeáveis, sendo, de fato, um ohmímetro de alta sensibilidade, que mede constantemente a resistência ôhmica, identificando assim, resistências mais baixas (pontos de acupuntura).

Este localizador tipo caneta (*Point Scanner – VMV Biotherapy / Lautz, São Carlos / SP*) (Figura 4) possui uma tensão de alimentação de três Volts (V), com ajuste de dois modos de sensibilidade, e, um LED (*light emitting diode – diodo emissor de luz*).

Figura 4: Caneta localizadora de pontos.

Os pontos E-36 (*Zusanli*) e BP-6 (*Sanyinjiao*) foram escolhidos, tomando como referência as estruturas anatômicas do ser humano. O ponto E-36 (*Zusanli*)

localiza-se no terço proximal da fíbula, na face ântero-lateral (Figura 5). O ponto BP-6 localiza-se no terço médio tibial, na face medial da perna (Figura 6) (YAMAMURA, 2003).

Figura 5: Localização do ponto E-36 com a caneta localizadora de pontos (*Point Scanner – VMV Biotherapy / Lautz, São Carlos / SP*).

Figura 6: Localização do ponto BP-6 com a caneta localizadora de pontos (*Point Scanner – VMV Biotherapy / Lautz, São Carlos / SP*).

A eletroacupuntura “*sham*” ou simulada foi realizada se baseando em não pontos, ou seja, um não ponto era relacionado em uma área em que a caneta não

acendia o LED. E, para haver padronização desta localização, achava-se o ponto (E-36 ou BP-6) e deslocava-se a caneta posteriormente. Usualmente, o não ponto ficava situado em torno de 3 mm do ponto verdadeiro.

Para a localização, deveria haver o contato do equipamento com a pele do animal, encostando a ponta metálica da caneta sobre a área da pele, em que se gostaria de localizar o ponto; em seguida, movimentar a ponta suavemente. O LED acendia conforme a ponta da caneta atravessava sobre os pontos de acupuntura. Após sua localização, os pontos eram marcados com uma caneta e, remarcados após cada estimulação.

3.1.5 Eletroestimulação dos pontos

A técnica foi realizada com agulhas de acupuntura – *Dong Bang* (Figura 7) (com cabo de 2,0 cm de comprimento e corpo de aço inoxidável de 2,0 cm de comprimento e 0,275 mm de diâmetro). Um cilindro de plástico, também, foi utilizado para guiar e facilitar a inserção das agulhas. A agulha era aprofundada após a inserção a uma profundidade aproximada de 3 mm.

Figura 7: Agulhas de acupuntura – *Dong Bang*.

Para a realização da estimulação das agulhas fixadas nos pontos de acupuntura e, previamente, localizados, foi utilizado um eletroestimulador *Accurate Pulse 195* – Microprocessado (VMV Biotherapy / Lautz, São Carlos / SP) (Figura 8), com tensão de alimentação de 6 V, tensão de saída de 60 V.

Figura 8: Eletroestimulador de pontos.

O aparelho possui onda farádica bipolar assimétrica, com frequência de 2 a 195 Hertz (Hz), com ondas do tipo regular (mantém a frequência de estimulação) e regular / densa (com duas frequências variáveis: de 2 a 195 Hz e de 4 a 390 Hz alternadas entre si de 2 Hz). Além disso, há um timer 10 / 20 / 30 minutos (min).

Os cabos do eletroestimulador foram conectados a um osciloscópio Iwatsu SS-5710 60 MHz (Figura 9), para verificar os padrões da curva da diferença de

potencial por tempo, averiguando a qualidade da saída do estímulo em relação à frequência e à amplitude da corrente (Figura 10).

Figura 9: Osciloscópio presente na seção de Eletrônica da PCARP da USP.

Figura 10: Imagem do osciloscópio com o eletroestimulador conectado e ligado (Adequou-se uma frequência maior que a utilizada

no experimento [60 Hz] para a melhor visualização do padrão da curva).

A inserção das agulhas foi feita, na primeira sessão, com o animal sob efeito da anestesia (ketamina e xilazina), devido a sua utilização na realização da lesão muscular (Figura 11). Após esta, os animais eram eletroestimulados sem a utilização de qualquer forma de anestesia. Era realizada uma contenção manual, o ambiente era tranqüilo e silencioso para não causar estresse no animal.

Os parâmetros utilizados na eletroacupuntura consistiam de uma estimulação de baixa frequência de 2 Hz, com estímulos periódicos e regulares. Foi utilizada a intensidade de estímulo anterior à contração muscular, ou seja, iniciava-se o estímulo e quando era observada a contração muscular abaixava-se a intensidade até a contração não ser mais visível. Os estímulos eram realizados bilateralmente, por um período de 15 minutos (Figura 12).

Os parâmetros de tempo e frequência de estimulação seguiram pré-determinações de outros estudos (KAWAKITA et al., 2006; KIM et al., 2006). O tempo de estimulação de 15 a 20 minutos e a frequência baixa (2 Hz) foram observados nos estudos de Kim et al. (2006) e Kawakita et al. (2006). Frequências baixas de estimulação, provavelmente, induzem ativação de receptores opióides via encefalinas, endorfinas e endomorfina em partes supra-espinais do sistema nervoso central (KAWAKITA et al., 2006), por serem estímulos com períodos relativamente altos de não-estimulação, o que não levaria a uma acomodação do sistema, ao contrário do que poderia ocorrer com frequências mais altas.

Figura 11: Agulhas já inseridas nos pontos determinados (E-36 e BP-6) com os conectores (jacaré) fixados nas agulhas e pronto para a realização da técnica. Esta imagem foi retratada enquanto o animal recebia a primeira sessão da técnica e estava sob efeito da anestesia.

Figura 12: Fotografia representando uma visão geral da eletroestimulação. A técnica era realizada bilateralmente. Novamente, a imagem foi retratada enquanto o animal recebia a primeira sessão da técnica e estava sob efeito da anestesia.

3.1.6 Análise da marcha

Antes da realização dos procedimentos de intervenção, os animais dos grupos tratados e simulados (3 e 5 dias) foram avaliados através da análise da marcha, como controle das imagens a serem adquiridas posteriormente. Deste modo, 1 dia após a realização das lesões musculares, os animais eram novamente submetidos a essa avaliação. Nesta data, foram cumpridas as avaliações pré e pós administração da eletroacupuntura.

As análises foram mantidas somente durante este período de 1 dia pós-lesão, devido ao retorno da marcha aos padrões de normalidade no segundo dia pós-lesão.

O aparato consiste em uma caixa de acrílico transparente, com um corredor de 43,0 cm de comprimento por 8,7 cm de largura e 5,5 cm de altura (fechada na parte superior para evitar que os animais escapassem), com uma caixa fechada ao final do corredor (DE MEDINACELI; FREED; WYATT, 1982). Durante a avaliação, os ratos percorreram o corredor até a caixa fechada. O caminho possuía luzes na parte inferior com lâmpadas fluorescentes e a marcha foi gravada por uma câmera de vídeo Sony® DCR – DVD 203, posicionada embaixo do trilho (GASPARINI; BARBIERI; MAZZER, 2007) (Figura 13). As demarcações das patas dos animais ao atravessarem o corredor foram registradas por uma câmera de vídeo (VAREJÃO et al., 2001).

Figura 13: Imagem que demonstra o trilho de marcha, em diferentes vistas a e b, em acrílico desenvolvido na oficina de precisão da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto.

A análise da marcha objetivava a observação da melhora funcional dos animais após a realização da eletroacupuntura. Para aquisição dos dados, foi utilizado o software Adobe® Premiere Pro CS4 (Figura 14), que permitia a captura do vídeo e, o congelamento das imagens, possibilitando, desta maneira, os cálculos de tempo.

Figura 14: Janela demonstrativa do software Adobe® Premiere Pro CS4, a qual possibilita a importação do vídeo e sua análise, referente aos períodos de tempo da caminhada inteira sobre esta parte do trilho e o passo do animal, compreendido entre o apoio inicial e a liberação desta pata do solo. A marcação do tempo é demonstrada pelo oval vermelho.

Estas análises foram realizadas medindo-se os tempos de permanência da pata lesada sobre o trilho em relação ao tempo total de caminhada.

$$Ct = T_{pp} \times T_{tc}^{-1},$$

Sendo, Ct = constante de tempo (valor utilizado para estimar se os animais possuem menor tempo de contato da pata ao solo), T_{pp} = tempo de permanência da pata em contato com o solo (s), T_{tc} = tempo total da caminhada.

Para evitar a sensação de adaptação dos animais em relação ao trilho, estes andaram uma vez anteriormente a filmagem para se acostumarem com o caminho.

A quantificação destes parâmetros indicaria que os animais lesados possuem menor tempo de contato da pata lesada com o trilho, demonstrando uma forma de claudicar / mancar.

3.1.7 Coleta de material

Após o término dos protocolos experimentais, os animais foram submetidos à morte por administração intraperitoneal de dose excessiva do anestésico Hidrato de Cloral (1,5 ml para cada 100,0 g de peso do rato), para que seus gastrocnêmicos fossem dissecados, para análise mecânica e histológica.

O músculo gastrocnêmico direito de cada animal foi dissecado, por meio da retirada da pele e de algumas partes moles (Figura 15), seguida da desarticulação da tíbia e quadril. Foi preservada sua origem na região distal do fêmur e inserção no calcâneo (Figura 16). O grupo controle foi determinado pela pata esquerda dos animais do grupo lesado.

Figura 15: Dissecção e exposição do músculo gastrocnêmio.

Figura 16: Músculo gastrocnêmio, com suas respectivas origem e inserção, pronto para a realização do ensaio mecânico.

Posteriormente a dissecação, os complexos (fêmur – gastrocnêmio – pata) utilizados para o ensaio mecânico, com 10 peças por grupo, foram colocados em solução de lactato de Ringer, em temperatura ambiente, por um período inferior à uma hora até a realização dos ensaios.

Para a análise histológica, 6 (seis) animais dos grupos de 3 e 5 dias pós-lesão seguiram os mesmos procedimentos experimentais e, seus músculos gastrocnêmios foram armazenados em formoldeido 10%, por um período mínimo de sete dias para a posterior preparação das lâminas.

3.1.8 Ensaios mecânicos

Após o término dos procedimentos experimentais, os ensaios mecânicos dos músculos esqueléticos foram realizados.

Antes dos ensaios eram realizadas a pesagem do animal e as medidas do comprimento e perímetros proximal, intermédio e distal dos músculos gastrocnêmios de todos os grupos. E, após os ensaios a pesagem destes músculos (o fêmur e a pata eram seccionados).

Para a realização dos ensaios mecânicos, com a finalidade de avaliar as propriedades mecânicas dos músculos gastrocnêmios, foram realizados testes de tração, utilizando uma Máquina Universal de Ensaio (EMIC®), modelo DL 10000, do Laboratório de Bioengenharia da FMRP / USP (Figura 17).

Figura 17: Máquina Universal de Ensaio (EMIC®), modelo DL 10000, presente no Laboratório de Bioengenharia da FMRP / USP.

Os músculos foram submetidos ao ensaio mecânico de tração, sendo suas fixações à máquina de ensaio realizada por meio de acessórios (Figura 18), confeccionados na Oficina de Precisão da PCARP / USP, que prendiam a diáfise femoral e a pata, permitindo o estiramento muscular.

Figura 18: Montagem e acoplamento do músculo gastrocnêmio aos acessórios da Máquina Universal de Ensaio, pronto para a realização do ensaio mecânico de tração.

A máquina de ensaios possui uma interface com o software *Tesc®*, que permite a aquisição de dados referentes ao tempo, carga e deformação do material analisado, realizando por mecanismos internos, cálculos que definem os valores das propriedades mecânicas de carga no limite máximo e rigidez relativa.

3.1.9 Histologia

3.1.9.1 Processamento das lâminas

Os músculos foram retirados do formol após sete dias e submetidos a cortes longitudinais, com bisturi cirúrgico, na região central entre os ventres dos músculos gastrocnêmios lateral e medial, da face mais externa do músculo para a mais interna, formando pequenos blocos de 1 cm².

Posteriormente, foi iniciada a inclusão desses blocos em uma série ascendente de alcoóis a 50, 70, 80 e 90% de concentração e álcool absoluto. Em seguida, os blocos foram mergulhados em xilol e banhados duas vezes em parafina derretida, para realizar o emblocamento e, futuro corte no micrótomo.

Os cortes foram feitos transversalmente à fibra muscular, com uma espessura de 6 μm , obtidas com navalhas de vidro através de um ultramicrótomo MT 6000 – XF (RMC Inc.), formando lâminas semifinas de tecido. Após este processo, foram realizadas as hidratações das peças e desparafinação em uma estufa. Inicia-se então a montagem das lâminas que, quando prontas, foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e fixadas com resina Permout® para posterior análise em microscopia de luz, com aumento definido, e analisador de imagens, para observação da área de hematoma e outras alterações visíveis.

3.1.9.2 Microscópio óptico

As secções transversais semifinas dos segmentos foram observadas num fotomicroscópio Axioimager M1 (Carl Zeiss) usando a objetiva de 5, 10 e 40 vezes. As imagens dos músculos foram digitalizadas através de uma câmera de alta resolução AxioCam MR5 (Carl Zeiss) para um microcomputador (IBM/PC – AT Pentium® III) onde foram armazenadas no disco rígido para posterior análise. As áreas de hematoma foram identificadas por inspeção visual.

3.1.10 Análise estatística

Para a realização da análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism® versão 5.0. Os dados obtidos, na avaliação funcional e mecânica, foram analisados, pelo programa, de modo a verificar sua normalidade (demonstrando-se perfazer um modelo de curva de Gauss), verificando, se apresentam valores paramétricos ou não-paramétricos.

A partir destas análises constou-se que os dados eram paramétricos, então se utilizou o teste de variância ANOVA *One-Way* e o pós-teste de Tukey para as comparações entre os grupos experimentais. Para a avaliação entre os valores da constante da marcha entre os grupos foi utilizada a comparação t-student não pareada. Para todos os testes, o nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 *Análise da marcha*

Através das imagens adquiridas, foram observados os comportamentos das marchas dos animais. Visualmente, nas imagens de vídeos verificou-se a claudicação dos ratos.

As médias dos valores calculados das constantes de tempo estão representadas na tabela 2.

Tabela 2: A tabela abaixo representa as médias (MD) e desvios padrões (DP) das constantes de tempo (Ct) dos grupos tratados e simulados (3 e 5 dias), sendo observada a medida anterior a lesão (anterior), 1 dia após a lesão (lesão) e, após a sessão do tratamento deste dia (posterior).

	TRATADO			SIMULADO		
	Anterior	Lesão	Posterior	Anterior	Lesão	Posterior
Média	0,53	0,20	0,33	0,52	0,22	0,36
DP	0,12	0,05	0,05	0,09	0,06	0,03

Os dados demonstraram diferenças estatísticas significativas dentro dos grupos experimentais ($p < 0,05$) (Figuras 19 e 20).

Análise de marcha - Grupo tratado

Figura 19: Gráfico demonstrando as médias da constante de tempo para os determinados subgrupos (anterior, lesão e posterior) do grupo tratado. As diferenças estatísticas significativas foram representadas pelos conectores, demonstrando, também os níveis de significância.

Análise de marcha - Grupo simulado

Figura 20: Gráfico demonstrando as médias da constante de tempo para os determinados subgrupos (anterior, lesão e posterior) do grupo simulado. As diferenças estatísticas significativas foram representadas pelos conectores, demonstrando, também os níveis de significância.

Além das comparações intra-grupos, foram realizadas também, comparações entre os subgrupos (anterior, lesão e posterior) dos diferentes grupos (simulado e tratado). Assim, foram representados na figura 21.

Figura 21: Gráfico demonstrando as médias da constante de tempo para todos os subgrupos (anterior [A], lesão [B] e posterior [C]). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Entre os subgrupos anterior, lesão e posterior, nenhuma das comparações demonstrou diferença estatística significativa ($p>0,05$).

4.2 Análise biomecânica

4.2.1 Medidas antropométricas

As medidas do comprimento, perímetros proximal, intermédio e distal seu peso final e peso do músculo gastrocnêmio são demonstrados na tabela 3. Seus valores são demonstrados em média $\pm$ desvio padrão (MD $\pm$ DP).

Tabela 3: Médias $\pm$ desvios padrões (MD $\pm$ DP) das medidas das variáveis do peso final do animal (PAnimal), comprimento (C), perímetro proximal (PP), perímetro intermédio (PI), perímetro distal (PD) e do peso do músculo gastrocnêmio (PM) para cada grupo experimental: Grupo controle (GC), lesado 3 e 5 dias (GL3 e GL5), tratado 3 e 5 dias (GT3 e GT5) e simulado 3 e 5 dias (GS3 e GS5). As letras a e b representam diferenças estatísticas significativas em relação aos outros valores.

	Variáveis					
	Panimal (g)	C (mm)	PP (mm)	PI (mm)	PD (mm)	PM (g)
GC	252,5 $\pm$ 21,7	36,1 $\pm$ 2,9 ^a	29,1 $\pm$ 2,8	40,2 $\pm$ 2,7 ^a	21,6 $\pm$ 2,5	1,76 $\pm$ 0,09
GL3	251,0 $\pm$ 16,1	21,2 $\pm$ 1,4	26,9 $\pm$ 2,3	33,8 $\pm$ 1,7	24,9 $\pm$ 2,1	2,07 $\pm$ 0,14
GT3	271,0 $\pm$ 11,9	24,4 $\pm$ 1,6	30,3 $\pm$ 1,25	33,4 $\pm$ 1,7	27,0 $\pm$ 1,3	1,77 $\pm$ 0,10
GS3	255,0 $\pm$ 13,1	23,2 $\pm$ 2,4	29,6 $\pm$ 2,4	32,8 $\pm$ 1,8	25,9 $\pm$ 2,3	1,61 $\pm$ 0,09
GL5	259,0 $\pm$ 12,6	25,2 $\pm$ 2,8	27,0 $\pm$ 2,1	31,6 $\pm$ 1,6	23,7 $\pm$ 1,1	1,69 $\pm$ 0,10
GT5	260,0 $\pm$ 21,1	38,0 $\pm$ 2,6 ^a	26,1 $\pm$ 2,6	36,5 $\pm$ 1,7 ^b	21,1 $\pm$ 1,9	1,64 $\pm$ 0,09
GS5	253,5 $\pm$ 20,3	38,2 $\pm$ 2,8 ^a	27,8 $\pm$ 2,5	38,5 $\pm$ 1,1 ^a	19,0 $\pm$ 1,5	1,61 $\pm$ 0,14

Todos os dados apresentados mostraram-se paramétricos, obedecendo à curva de normalidade. Dessa forma, utilizou-se o teste de variância ANOVA “one-way” e o pós-teste de Tukey para verificar diferenças entre os grupos analisados.

Em relação ao peso final do animal e ao perímetro proximal do músculo gastrocnêmio, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

Quanto ao comprimento dos músculos gastrocnêmios, os grupos GC, GS5 e GT5 apresentaram diferenças estatísticas significativas desta variável, em relação aos demais grupos. Os grupos GL3, GT3, GS3 e GL5 não apresentaram diferenças entre eles. As diferenças podem ser mais bem observadas nos gráficos representados a seguir, separados pelos dias de lesão e tratamento (Figura 22).

Figura 22: Gráficos correspondentes às médias dos valores de comprimento muscular relativos aos grupos de 3 (A) e 5 dias (B). As diferenças estatísticas significativas são demonstradas por conectores entre os grupos experimentais.

O perímetro intermediário mostrou um comportamento semelhante à variável do comprimento (Figura 23), sendo apresentados valores estatisticamente significativos maiores dos grupos GC, GS5 e GT5. Porém, o grupo GC, nesta

variável mostrou uma diferença estatística significativa, também, em relação ao GT5. Os grupos GL3, GT3, GS3 e GL5 mantiveram-se sem apresentar diferenças estatísticas entre eles.

Figura 23: Gráficos apresentando as médias dos perímetros intermédios dos músculos gastrocnêmios relativos a todos os grupos experimentais. Os conectores demonstram as diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Entretanto, observando os dados dos perímetros distais verificou-se uma inversão em relação aos valores observados nos perímetros intermédios. Os grupos GC, GT5 e GS5 mostraram valores inferiores aos demais grupos (Figura 24).

Figura 24: As médias dos valores dos perímetros intermédios dos músculos gastrocnêmios são representados nos gráficos acima. As diferenças estatísticas significativas entre os grupos são especificadas através dos conectores.

E, em relação ao peso do músculo gastrocnêmio, observou-se o GL3 apresentando um valor estatisticamente significativo maior, em relação aos outros grupos (Figura 25).

Figura 25: Gráficos demonstrando as médias dos valores dos pesos dos músculos gastrocnêmios dentro dos grupos experimentais. Os conectores apresentam as diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

4.2.2 Propriedades mecânicas

Após a realização dos ensaios mecânicos de tração, as propriedades mecânicas de força máxima e rigidez foram calculadas.

4.2.2.1 Força máxima

Os valores médios da força máxima, para os grupos de 3 dias, foram: para o GC de $(37,21 \pm 4,2)$ N, GL3 de $(32,12 \pm 2,68)$ N, GT3 de $(29,93 \pm 5,23)$ N, e, para o GS3 de $(31,78 \pm 3,71)$ N. A partir da comparação, observou-se que o grupo GC mostrou diferença estatística significativa entre os outros grupos, sendo que os demais não demonstraram diferenças entre si (Figura 26).

Força máxima - Grupos 3 dias

Figura 26: Gráfico representando os valores médios da força máxima dos grupos experimentais de 3 dias. As diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais são demonstradas pelos conectores, assim como, seus respectivos valores de p.

Da mesma maneira, as médias dos valores da força máxima, para os grupos de 5 dias foram: para o GL5 foi de $(36,02 \pm 6,26)$ N, para o GT5 de $(36,37 \pm 4,98)$ N, e, para o GS5 de $(36,34 \pm 5,33)$ N. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (Figura 27).

Figura 27: Gráfico representando as médias dos valores da força máxima dos grupos experimentais de 5 dias. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

4.2.2.2 Rigidez

As médias dos valores da rigidez, para os grupos de 3 dias foram: para o GC foi de $(4,30 \pm 0,79)$ N/mm, o GL3 foi de $(3,72 \pm 0,48)$ N/mm, para o GT3 de $(3,83 \pm 0,90)$ N/mm, e, para o GS3 de $(4,25 \pm 0,69)$ N/mm. Para os grupos de 5 dias, os valores foram para GL5 foi de $(4,11 \pm 1,17)$ N/mm, para o GT5 de $(4,74 \pm 1,14)$ N/mm, e, para o GS5 de $(4,50 \pm 0,71)$ N/mm. A partir da comparação, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (Figura 28).

Figura 28: Gráfico representando as médias dos valores da força máxima dos grupos de 3 e 5 dias. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais.

4.3 Análise histológica

A análise qualitativa dos músculos lesados foram realizadas nos seis grupos de 3 e 5 dias, para fins de comparação.

No 3º dia pós-lesão não foram encontradas diferenças visuais entre os grupos lesado (GL3) (Figura 29), tratado (GT3) (Figura 30) e simulado (GS3) (Figura 31). Nas lâminas dos grupos foram observadas áreas de hematomas, com infiltrados celulares e desorganização tecidual.

Figura 29: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo lesado após 3 dias (GL3), observa-se áreas de hematomas, com infiltrados celulares e desorganização tecidual. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.

Figura 30: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo simulado após 3 dias (GS3), observa-se áreas de hematomas, com infiltrados celulares e desorganização tecidual. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.

Figura 31: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo tratado após 3 dias (GT3), observa-se áreas de hematomas, com infiltrados celulares e desorganização tecidual. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.

No 5° dia pós-lesão, os cortes histológicos dos músculos tanto do grupo lesado (GL5) (Figura 32), tratado (GT5) (Figura 33) e simulado (GS5) (Figura 34) mostraram uma presença maior de vasos e menor área de lesão. Porém, no grupo GT5 observaram-se menores áreas de lesão, uma melhor organização tecidual, número de vasos ainda maior, mostrando-se em processo acelerado de reparação que os grupos lesado e placebo.

Figura 32: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo lesado após 5 dias (GL5), observa-se ainda áreas dos hematomas e início da organização tecidual e maior número de vasos. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.

Figura 33: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo simulado após 5 dias (GS5), observa-se ainda áreas dos hematomas e início da organização tecidual e maior número de vasos. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.

Figura 34: Fibras musculares do músculo gastrocnêmio do grupo tratado após 5 dias (GT5), observa-se menores áreas dos hematomas melhor organização tecidual e maior número de vasos em relação aos grupos GL5 e GS5. A e B imagem capturada com objetiva de 5 e optovar de 1,0. C e D imagem capturada com objetiva de 10 e optovar de 1,0. E e F imagem capturada com objetiva de 40 e optovar de 1,0. Coloração de HE.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve como hipótese inicial que a técnica de eletroacupuntura promovesse uma melhora funcional e mecânica, e nos padrões microscópicos. A metodologia deste estudo, então, apoiou-se nas bases de tentar suprir quaisquer falhas que poderiam ser apresentadas.

Desta maneira, o estudo, inicialmente, baseou-se no sistema de lesão muscular por mecanismo de impacto, pela liberação de peso sobre uma determinada altura, sendo esta metodologia largamente aceita (BEINER et al., 2008; CRISCO et al., 1994; MATHEUS et al., 2008; MINAMOTO; GRAZZIANO; SALVINI, 1994; MINAMOTO; BUNHO; SALVINI, 2001; RAHUSEN; WEINHOLD; ALMEKINDERS, 2008; WRIGHT-CARPENTER et al., 2004), por motivos de fácil reprodutibilidade e boa padronização das lesões realizadas. A escolha da carga (200 g) e da altura (30 cm) foi determinada por estudos anteriores (MATHEUS et al., 2008; MINAMOTO; GRAZZIANO; SALVINI, 1994; MINAMOTO; BUNHO; SALVINI, 2001). O presente estudo demonstrou, assim, como os anteriores que, com a utilização destas variáveis de peso e altura, pode-se observar a ocorrência da lesão muscular. Fato este, corroborado pelos dados de força máxima dos grupos de 3 e 5 dias (Figuras 26 e 27), que demonstram um decréscimo desta força (em 3 dias) com o posterior retorno à normalidade.

Contudo, os períodos de 3 a 5 dias em que se realizou as análises, conflitam com estudos prévios (MATHEUS et al., 2008), que demonstram que a lesão mantém níveis de força máxima diminuídos até o 6º dia. Sendo que no presente estudo, houve melhora da condição mecânica muscular no 5º dia.

Além disto, a histologia foi definida por ser realizada com grupos de 5 dias, devido ao fato de estudos anteriores demonstrarem que alterações microscópicas podem não afetar os resultados de propriedades mecânicas do músculo esquelético (JÄRVINEN; SORVARI, 1975; JÄRVINEN, 1976).

A análise foi realizada em 5 dias, porque, como não houve diferenças estatisticamente significativas em relação as propriedades mecânicas dos grupos de 3 e 5 dias, a lesão em 3 dias, provavelmente, não ofertaria resultados histológicos que pudessem diferenciar os grupos lesado do tratado e simulado, por se tratar de um curto período de lesão.

Após isso, foram observadas as questões relativas às variáveis da eletroacupuntura. Notou-se que o localizador de pontos utilizado demonstrou-se eficaz, ao que se refere a indicar os pontos de acupuntura com precisão. Trata-se de uma padronização importante devido a esta localização deixar de ser subjetiva. Estudos anteriores, ao fazerem uso de localizadores de pontos, confirmam as alterações elétricas nestes pontos, sendo a utilização da caneta de fácil utilização e reprodutibilidade (AHN; MARTINSEN, 2007).

Dificuldades foram observadas em relação à contenção do animal para a realização do tratamento. Esta deveria ser realizada sem causar estresse no animal e de forma que as agulhas não sofressem tensões e saíssem dos pontos. No entanto, após várias tentativas com instrumentações, conseguiu-se a adequação com a contenção manual do próprio aplicador da técnica. Esta técnica consistiu da utilização de uma flanela sobre o animal, acobertando-o. O animal mostrou-se sem estresse nas aplicações.

Em se tratando da avaliação funcional da marcha, esta é comumente observada em estudos que envolvem lesões nervosas periféricas (DE MEDINACELI, 1990; GASPARINI; BARBIERI; MAZZER, 2007; PATEL et al., 2006; VAREJÃO et al., 2001; VAREJÃO et al., 2004), com a finalidade de se observar a melhora dessas lesões, com base em variáveis do passo e da passada dos animais, calculando dessa forma o Índice Funcional do Cíatico (SFI), que demonstra uma medida quantitativa, que permite a manutenção da referência de melhora ou piora.

Dessa maneira, utilizando-se esta análise e o cálculo, determinado por nosso estudo, para a normalização de dados, tentou-se evitar falhas metodológicas, decorrentes da variação da velocidade do animal durante o percurso. Se fosse aferido apenas o tempo do passo do animal haveria variações grandes deste em relação aos outros que andam mais lentos ou rápidos. Conseqüentemente, pensou-se na utilização desta forma de cálculo devido à determinação de uma constante, que possuísse um índice de variação menor. Os resultados demonstraram que a lesão muscular causa uma diminuição da fase de apoio do membro lesado, demonstrado pela queda dos valores da constante de tempo, nos dois grupos analisados (Figuras 19 e 20), demonstrando, quantitativamente, o que se observa visualmente, que seria o mancar / claudicar. Após a realização da eletroacupuntura ou da terapia simulada, pode-se observar que as técnicas mostraram-se satisfatórias em aumentar o tempo de apoio das patas lesadas em contato com o solo.

Embora, nenhuma teoria apresentou sucesso em oferecer uma explicação para os efeitos da acupuntura, muitos autores têm proposto que as ações analgésicas da técnica devem envolver a prevenção da percepção da dor devido a fenômeno de saturação de estímulos em que Melzack e Wall (1965) denominaram

“teoria da comporta”. Outro mecanismo propõe analgesia por rebote, que, após o estímulo nocivo agudo da agulha, calor ou estimulação, denominado “controle inibitório nocivo difuso” (DNIC), há mediação da liberação de opióides endógenos e neurotransmissores mono-aminérgicos (POMERANZ; CHIU, 1976; ZHOU et al., 1981).

Desta maneira, pode-se sugestionar que pelo aumento do tempo da passada no solo do animal, pode ter havido uma possível diminuição da dor que o animal lesado sentia ao realizar o passo no solo. Este resultado indica provavelmente uma atuação analgésica em relação a uma das comorbidades da lesão, que seria a dor à movimentação. Não foram encontrados relatos na literatura de análises semelhantes ao do presente estudo.

Em relação às análises biomecânicas, através de ensaios mecânicos, estas são cotidianas do Laboratório de Bioengenharia, as padronizações obtidas destes testes mecânicos seguiram estudos previamente realizados (MATHEUS et al., 2008; MILANI et al., 2008).

Quanto a esta análise, verificaram-se inicialmente as variáveis métricas do animal e do músculo gastrocnêmio. Por não haver diferença entre os pesos finais dos animais, qualquer mudança ocorrida nos outros parâmetros é de mudança local e, não por aumento ou diminuição de peso nos animais.

As diferenças entre os grupos em relação ao comprimento muscular, sendo os grupos lesados 3 e 5 dias e no tratado e simulado 3 dias, demonstraram possivelmente que houve uma melhora desta variável com o tratamento realizado em 5 dias. Não foram encontrados estudos anteriores que comparassem as mudanças de comprimento nas lesões musculares.

Em relação aos perímetros, da mesma forma, pode-se observar uma possível melhora das condições musculares. Os valores do perímetro proximal não se mostraram diferentes, mas isso poderia ser explicado pelo fato da lesão ser realizada na região média distal. Entretanto, apresentados os valores do perímetro intermédio, cujo comportamento foi semelhante ao comprimento, pressupõe-se que a lesão provoca diminuição da área e, conseqüentemente, do perímetro nesta região. No grupo tratado e simulado, não foi apresentada tal queda dos valores, o que se subentende como uma melhora dos valores desta variável. Os valores do perímetro distal, provavelmente, corroboram com esta melhora, pois estes dados mostraram-se invertidos em relação ao perímetro intermédio. Supõe-se ser uma resposta de edema na região do grupo lesão, tratado e simulado 3 dias e lesão 5 dias, o que nos leva a concluir que houve supressão deste edema nos grupos tratado e simulado 5 dias. Também não foram encontrados estudos que mensuram o perímetro como parâmetro para comparações com este estudo.

O peso do músculo gastrocnêmio mostrou-se aumentado no grupo lesado 3 dias em relação aos outros grupos, o que demonstra provavelmente, assim como, a perimetria distal, a presença de edema. Algumas destas observações foram verificadas, também, por Minamoto, Grazziano e Salvini (1998), Järvinen (1976) e Crisco et al. (1994), sendo que o último hipotetiza ser por causa da hemorragia e edema pós-lesão. Järvinen (1976) relata aumento no peso muscular após dois dias de lesão com diminuição com o passar do tempo, corroborando com os achados deste estudo.

Em relação à análise biomecânica, quanto à propriedade mecânica de força máxima dos músculos gastrocnêmios. A propriedade de força máxima é o dado mais

fidedigno que se pode inferir dos ensaios mecânicos. Esta forma de dado nos permite dizer qual a resistência máxima do material analisado, com base na força aplicada este corpo para a realização do ensaio. Neste estudo, observa-se a ocorrência da lesão muscular e a não melhora dos tratamentos realizados no período de 3 dias. Observou-se que não foram encontradas diferenças entre os grupos de 5 dias e o controle. Kääriäinen et al, (1998) relatam que em contusões musculares, a parte intacta da musculatura torna difícil a interpretação da contribuição dos elementos teciduais para as propriedades mecânicas do músculo.

Em relação à rigidez, esta avaliação não mostrou nenhuma diferença entre os grupos experimentais, o que torna dele um dado interessante, quando observada a força máxima. Desta maneira, os músculos lesados durante o período de 3 dias, apresentam uma força máxima menor, porém a rigidez do material é mantida. Ou seja, provavelmente, mesmo com acometimentos lesivos ao tecido muscular, este não apresenta déficits na sua capacidade de resposta (deformação) após uma carga imposta, respondendo da mesma maneira que um músculo não lesado, porém com uma força máxima menor.

A análise histológica foi realizada nos três grupos de 3 e 5 dias, para fins de comparação. Não houve o objetivo de avaliar quantitativamente as lâminas, pois em estudos pilotos observou-se que não há a diminuição radial do hematoma este se faz por inteiro, como observado na imagem do grupo tratado, que provavelmente manteve seu diâmetro de lesão.

A observação das lâminas de 3 dias mostrou não haver diferenças em relação aos grupos experimentais, demonstrando que neste período não houve o possível

efeito da intervenção. Pode-se verificar, no entanto, uma melhora do grupo tratado em relação aos outros dois, quando observadas as imagens dos grupos de 5 dias.

A eficácia de pontos específicos de acupuntura é demonstrada, porém, não diferencia seus efeitos do placebo, ou, se o fazem, são argüídos por apresentarem-se pobremente estruturados e embasados (ERNST, 2006).

Dung (1984) e Zonglian (1979) citam uma maior concentração de mastócitos, de fibras autônomas do tipo C e de terminações nervosas nos pontos de acupuntura. Embora, não descartam os efeitos provenientes de áreas consideradas não-pontos, relatam que seus efeitos deveriam ser em uma amplitude menor.

Outro aspecto que poderia justificar a não diferença seria a ação da eletroestimulação. Possivelmente, os efeitos da corrente elétrica trouxeram benefícios além dos pontos de acupuntura. Os não-pontos deste estudo localizavam-se a poucos milímetros do ponto verdadeiro, o que poderia ter influenciado e provocado os efeitos observados.

A colocação de um grupo com a acupuntura manual e seu placebo poderia responder a esta dúvida. Assim como, a aplicação de não-pontos em áreas mais afastadas do local de lesão também poderia determinar resultados diferentes. Além disto, a utilização de uma frequência mais alta (por exemplo, 100 Hz) poderia ser empregada com a finalidade de comparação entre os métodos de aplicação. Desta maneira, mais estudos se fazem necessários para determinar os efeitos desta técnica na recuperação de lesões musculares.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÕES

A eletroacupuntura na lesão muscular por contusão nos períodos de 3 a 5 dias, nos parâmetros analisados de baixa frequência (2 Hz) e baixa a moderada intensidade, demonstrou:

- 1) Que na análise funcional, houve uma melhora das constantes de tempo, observando, desta maneira, uma diminuição do tempo da fase de apoio da pata lesada sobre o solo, melhorando a marcha deste animal;
 - 2) Não haver diferenças nas propriedades mecânicas, de força máxima e rigidez, dos músculos gastrocnêmios dos animais. Não sendo capaz de verificar alterações mecânicas nas condições apresentadas (de 3 e 5 dias);
 - 3) Que nas avaliações métricas foram achados alguns argumentos, como diferenças no comprimento, perímetros e peso muscular, que levam a crer em uma melhora da técnica utilizada em relação à lesão experimental;
 - 4) Uma melhora nos padrões microscópicos desta lesão, avaliados de maneira histológica qualitativa. Sendo observadas, neste estudo, correlações entre alterações mecânicas e histológicas de 3 dias, porém, não verificadas no período de 5 dias.
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Ahn AC, Martinsen OG. Electrical characterization of acupuncture points: Technical issues and challenges. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2007 Oct;13(8):817-24.
- Allbrook D. Electron Microscopic Study of Regenerating Skeletal Muscle. *Journal of Anatomy* 1962;96(2):137-&.
- Anderson JE, Mitchell CM, Mcgeachie JK, Grounds MD. The Time-Course of Basic Fibroblast Growth-Factor Expression in Crush-Injured Skeletal-Muscles of Sjl/J and Balb/C Mice. *Experimental Cell Research* 1995 Feb;216(2):325-34.
- Armfield DR, Kim DHM, Towers JD, Bradley JP, Robertson DD. Sports-related muscle injury in the lower extremity. *Clinics in Sports Medicine* 2006 Oct;25(4):803-+.
- Aronen JG, Garrick JG, Chronister RD, McDevitt ER. Quadriceps contusions: clinical results of immediate immobilization in 120 degrees of knee flexion. *Clin J Sport Med* 2006 Sep;16(5):383-7.
- Arrington ED, Miller MD. Skeletal muscle injuries. *Orthopedic Clinics of North America* 1995 July;26(3):411-21.
- Aspelin P, Ekberg O, Thorsson O, Wilhelmsson M, Westlin N. Ultrasound Examination of Soft-Tissue Injury of the Lower-Limb in Athletes. *American Journal of Sports Medicine* 1992 Sep;20(5):601-3.
- Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, Panjabi MM. The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *Am J Sports Med* 1999 Jan;27(1):2-9.
-

- Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injury and myositis Ossificans traumatica. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2002 Oct;(403):S110-S119.
- Bleakley C, McDonough S, MacAuley D. The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury - A systematic review of randomized controlled trials. *American Journal of Sports Medicine* 2004 Jan;32(1):251-61.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang MH, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000 May 25;405(6785):458-62.
- Bunn JR, Canning J, Burke G, Mushipe M, Marsh DR, Li G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle--a biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. *J Orthop Res* 2004 Nov;22(6):1336-44.
- Cannon JG, St Pierre BA. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem* 1998 Feb;179(1-2):159-67.
- Casimiro L, Barnsley L, Brosseau L, Milne S, Robinson VA, Tugwell P, et al. Acupuncture and electroacupuncture for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005;(4).
- Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004 Jan;84(1):209-38.
- Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A Muscle Contusion Injury Model - Biomechanics, Physiology, and Histology. *American Journal of Sports Medicine* 1994 Sep;22(5):702-10.
-

- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982 Sep;77(3):634-43.
- de Medinaceli L. Use of sciatic function index and walking track assessment. *Microsurgery* 1990;11(2):191-2.
- Deal DN, Tipton J, Rosencrance E, Curl WW, Smith TL. Ice reduces edema - A study of microvascular permeability in rats. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2002 Sep;84A(9):1573-8.
- Dung HC. Anatomical features contributing to the formation of acupuncture points. *Am J Acupuncture* 1984;12:139-144.
- Ekstrand J, Gillquist J. Soccer Injuries and Their Mechanisms - A Prospective-Study. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1983;15(3):267-70.
- Ekstrand J. Epidemiology of football injuries. *Science & Sports* 2008 Apr;23(2):73-7.
- Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *Journal of Cell Biology* 1996 Oct;135(2):431-40.
- Ernst E. Acupuncture - a critical analysis. *Journal of Internal Medicine* 2006 Feb;259(2):125-37.
- Farges MC, Balcerzak D, Fisher BD, Attaix D, Bechet D, Ferrara M, et al. Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 Feb;282(2):E326-E335.
- Fisher BD, Baracos VE, Shnitka TK, Mendryk SW, Reid DC. Ultrastructural Events Following Acute Muscle Trauma. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1990 Apr;22(2):185-93.
-

Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrine Reviews* 1996 Oct;17(5):481-517.

França DLM, Senna-Fernandes V, Cortez CM, Jackson MN, Bernardo-Filho M,

Guimarães MAM. Tension neck syndrome treated by acupuncture combined with physiotherapy: A comparative clinical trial (pilot study). *Complementary Therapies in Medicine*. 2008;16(5):268-77.

Francis RS, Heckmann RA, Stratton SA. Therapeutic Ultrasound - Its Effect on the Healing Time of Contusions. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1983;15(2):154.

Garrett WE. Muscle strain injuries. *American Journal of Sports Medicine* 1996;24:S2-S8.

Gasparini ALP, Barbieri CH, Mazzer N. Correlation between different methods of gait functional evaluation in rats with ischiatic nerve crushing injuries. *Acta Ortop Bras* 2007;15(5):285-289.

Hayashi S, Aso H, Watanabe K, Nara H, Rose MT, Ohwada S, et al. Sequence of IGF-I, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle. *Histochemistry and Cell Biology* 2004 Nov;122(5):427-34.

Hopwood V, Lewith G, Prescott P, Campbell MJ. Evaluating the efficacy of acupuncture in defined aspects of stroke recovery - A randomised, placebo controlled single blind study. *Journal of Neurology* 2008 Jun;255(6):858-66.

Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M. Healing of Skeletal-Muscle Injury - An Ultrastructural and Immunohistochemical Study. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1991 Jul;23(7):801-10.

Hübscher M, Vogt L, Bernhörster M, Rosenhagen A, Banzer W. Effects of

acupuncture on symptoms and muscle function in delayed-onset muscle soreness. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2008;14(8):1011-6. Hurme T, Kalimo H. Adhesion in Skeletal-Muscle During Regeneration. *Muscle & Nerve* 1992 Apr;15(4):482-9.

Hurme T, Kalimo H. Activation of Myogenic Precursor Cells After Muscle Injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1992 Feb;24(2):197-205.

Hwang JH, Ra YJ, Lee KM, Lee JY, Ghil SH. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. *Arch Phys Med Rehabil* 2006 Jan;87(1):20-6.

Hyvarinen J, Karlsson M. Low-Resistance Skin Points That May Coincide with Acupuncture Loci. *Medical Biology* 1977;55(2):88-94.

Inoue M, Kitakoji H, Yano T, Ishizaki N, Itoi M, Katsumi Y. Acupuncture treatment for low back pain and lower limb symptoms - the relation between acupuncture or electroacupuncture stimulation and sciatic nerve blood flow. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2008;5(2):133-43.

- Jackson DW, Feagin JA. Quadriceps Contusions in Young Athletes - Relation of Severity of Injury to Treatment and Prognosis. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 1973;A 55(1):95-105.
- Jarvinen M. Healing of A Crush Injury in Rat Striated-Muscle .2. Histological Study of Effect of Early Mobilization and Immobilization on Repair Processes. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A-Pathology* 1975;A 83(3):269-82.
- Jarvinen M, Sorvari T. Healing of A Crush Injury in Rat Striated-Muscle .1. Description and Testing of A New Method of Inducing A Standard Injury to Calf Muscles. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A-Pathology* 1975;A 83(2):259-65.
- Jarvinen M. Healing of A Crush Injury in Rat Striated-Muscle .4. Effect of Early Mobilization and Immobilization on Tensile Properties of Gastrocnemius Muscle. *Acta Chirurgica Scandinavica* 1976;142(1):47-56.
- Jarvinen M. Healing of A Crush Injury in Rat Striated-Muscle .3. Micro-Angiographical Study of Effect of Early Mobilization and Immobilization on Capillary Ingrowth. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A-Pathology* 1976;84(1):85-94.
- Jarvinen MJ, Lehto MUK. The Effects of Early Mobilization and Immobilization on the Healing-Process Following Muscle Injuries. *Sports Medicine* 1993 Feb;15(2):78-89.
- Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 2005 May;33(5):745-64.
-

- Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Aarimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, et al. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007 Apr;21(2):317-31.
- Jarvinen TAH, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Current Opinion in Rheumatology* 2000 Mar;12(2):155-61.
- Jeong HJ, Kim BS, Kim KS, Kim HM. Regulatory effect of cytokine production in asthma patients by SOOJI CHIM (Koryo Hand Acupuncture Therapy). *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2002;24(2):265-74.
- Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Sievanen H, Kalimo H, Jarvinen M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. *J Orthop Res* 1998 Mar;16(2):197-206.
- Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports* 2000 Dec;10(6):332-7.
- Kannus P, Parkkari J, Jarvinen TL, Jarvinen TA, Jarvinen M. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. *Scand J Med Sci Sports* 2003 Jun;13(3):150-4.
- Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, et al. Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. *Cell Transplantation* 1998 Nov;7(6):585-98.
- Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, et al. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2000 Jan;(370):272-85.
-

- Kawakita K, Shinbara H, Imai K, Fukuda F, Yano T, Kuriyama K. How do acupuncture and moxibustion act? Focusing on the progress in Japanese acupuncture research. *Journal of Pharmacological Sciences* 2006;100(5):443-59.
- Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Kang SY, Kwon YB, Han HJ, et al. The anti-inflammatory effects of low- and high-frequency electroacupuncture are mediated by peripheral opioids in a mouse air pouch inflammation model. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2006 Jan;12(1):39-44.
- Lee H, Natsui H, Akimoto T, Yanagi K, Ohshima N, Kono I. Effects of cryotherapy after contusion using real-time intravital microscopy. *Med Sci Sports Exerc* 2005 Jul;37(7):1093-8.
- Lee JW, Kim DM, Park IY, Park HJ, Cho JH. Characteristics of human skin impedance including at biological active points. *leice Transactions on Fundamentals of Electronics Communications and Computer Sciences* 2003 Jun;E86A(6):1476-9.
- Maciocia G. *The Foundations of Chinese Medicine*. New York: Churchill Livingstone; 1993.
- Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2005 Jul;86(7):1304-10.
- Matheus JPC, Oliveira FB, Gomide LB, Milani JGPO, Volpon JB, Shimano AC. Effects of therapeutic ultrasound on the mechanical properties of skeletal muscles after contusion. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 2008 May;12(3):241-7.
-

- Matthay MA, Ware LB. Can nicotine treat sepsis? *Nature Medicine* 2004 Nov;10(11):1161-2.
- McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ, Devor ST, Merrick MA. Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2007 Jul;88(7):936-40.
- Melzack R, Wall PD. Pain Mechanisms - A New Theory. *Science* 1965;150(3699):971-978.
- Melzack R. Prolonged relief of pain by brief, intense transcutaneous stimulation. *Pain* 1975 Dec;1:357-373.
- Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 2000 Jan;82B(1):131-7.
- Milani JGPO, Matheus JPC, Gomide LB, Volpon JB, Shimano AC. Biomechanical effects of immobilization and rehabilitation on the skeletal muscle of trained and sedentary rats. *Annals of Biomedical Engineering* 2008 Oct;36(10):1641-8.
- Minamoto VB, Grazziano CR, Salvini TF. Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. *Anat Rec* 1999 Feb 1;254(2):281-7.
- Minamoto VB, Bunho SR, Salvini TF. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. *Braz J Med Biol Res* 2001 Nov;34(11):1447-52.
- Mishra DK, Friden J, Schmitz MC, Lieber RL. Antiinflammatory Medication After Muscle Injury - A Treatment Resulting in Short-Term Improvement But
-

- Subsequent Loss of Muscle Function. Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume 1995 Oct;77(10):1510-9.
- National Institutes of Health. Acupuncture. NIH Consensus Statement. 1997;15(5):1-34.
- Noguchi E, Hayashi H. Increases in gastric acidity in response to electroacupuncture stimulation of the hindlimb of anesthetized rats. Japanese Journal of Physiology 1996 Feb;46(1):53-8.
- Obremsky WT, Seaber AV, Ribbeck BM, Garrett WE, Jr. Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. Am J Sports Med 1994 Jul;22(4):558-61.
- Patel M, Vandevord PJ, Matthew H, Wu B, Desilva S, Wooley PH. Video-gait analysis of functional recovery of nerve repaired with chitosan nerve guides. Tissue Engineering 2006 Nov;12(11):3189-99.
- Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: A missing link in neuroimmunomodulation. Molecular Medicine 2003 May;9(5-8):125-34.
- Pomeranz B, Chiu D. Naloxone Blockade of Acupuncture Analgesia - Endorphin Implicated. Life Sciences 1976;19(11):1757-62.
- Prokhorov EF, Gonzalez-Hernandez J, Vorobiev YV, Morales-Sanchez E, Prokhorova TE, de Larrea GZL. In vivo electrical characteristics of human skin, including at biological active points. Medical & Biological Engineering & Computing 2000 Sep;38(5):507-11.
-

- Rahusen FTG, Weinhold PS, Almekinders LC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury. *American Journal of Sports Medicine* 2004 Dec;32(8):1856-9.
- Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle. *American Journal of Sports Medicine* 1999 Jan;27(1):54-9.
- Romita VV, Suk A, Henry JL. Parametric studies an electroacupuncture-like stimulation in a rat model: Effects of intensity, frequency, and duration of stimulation on evoked antinociception. *Brain Research Bulletin* 1997;42(4):289-96.
- Ross J. Zang Fu, *Sistemas de Órgãos e Vísceras da Medicina Tradicional Chinesa*. São Paulo: Editora Roca; 1994.
- Schaser KD, Disch AC, Stover JF, Lauffer A, Bail HJ, Mittlmeier T. Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. *American Journal of Sports Medicine* 2007 Jan;35(1):93-102.
- Shi XZ, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & Development* 2006 Jul 1;20(13):1692-708.
- Sternberg E. Neural immune interactions in health and disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003 Jul;62:3.
- Streitberger K, Ezzo J, Schneider A. Acupuncture for nausea and vomiting: An update of clinical and experimental studies. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* 2006 Oct 30;129(1-2):107-17.
-

- Takahashi T, Ishida K, Itoh K, Konishi Y, Yagyu KI, Tominaga A, et al. IGF-I gene transfer by electroporation promotes regeneration in a muscle injury model. *Gene Therapy* 2003 Apr;10(8):612-20.
- Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle exb acellular matrix: the effect of loading. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 2000 Dec;10(6):321-5.
- Taylor DC, Dalton JD, Seaber AV, Garrett WE. Experimental Muscle Strain Injury - Early Functional and Structural Deficits and the Increased Risk for Reinjury. *American Journal of Sports Medicine* 1993 Mar;21(2):190-4.
- Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, Kalimo H. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *American Journal of Sports Medicine* 1998 Mar;26(2):172-6.
- Tian L, Huang YX, Tian M, Gao W, Chang Q. Downregulation of electroacupuncture at ST36 on TNF-alpha in rats with ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology* 2003 May;9(5):1028-33.
- Tidball JG. Force Transmission Across Muscle-Cell Membranes. *Journal of Biomechanics* 1991;24:43-52.
- Tough EA, White AR, Cummings TM, Richards SH, Campbell JL. Acupuncture and dry needling in the management of myofascial trigger point pain: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *European Journal of Pain* 2009;13(1):3-10.
- Uchida S, Hotta H. Acupuncture affects regional blood flow in various organs. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2008;5(2):145-51.
-

- Varejao ASP, Cabrita AM, Patricio JA, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Melo-Pinto P, et al. Functional assessment of peripheral nerve recovery in the rat: Gait kinematics. *Microsurgery* 2001;21(8):383-8.
- Varejao ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VA, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurological Research* 2004 Mar;26(2):186-94.
- Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *Faseb Journal* 2002 Aug;16(10):1630-+.
- Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med* 2004 Jan;25(1):73-7.
- Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P, Mir LM. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contusion model. *Int J Sports Med* 2004 Nov;25(8):582-7.
- Yabuta MM. Efeito da eletroacupuntura nos pontos E-36 (Zusanli) e BP-6 (Sanyinjiao) sobre o desenvolvimento do edema inflamatório agudo induzido por carregenina, em ratos [dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo; 2000.
- Yamamura Y, Tabosa A, Mello LEAM, Ishida A, Guimarães CM. Bases neurofisiológicas da acupuntura. *Rev Ass Med Brasil* 1995;41(4):305-10.
- Yamamura Y. Acupuntura tradicional: A arte de inserir. 2ª edição. São Paulo: Editora Roca; 2003.
-

- Zhou ZF, Du MY, Wu WY, Jiang Y, Han JS. Effect of Intra-Cerebral Micro-Injection of Naloxone on Acupuncture-Analgesia and Morphine-Analgesia in the Rabbit. *Scientia Sinica* 1981;24(8):1166-78.
- Zonglian H. A study on the structure of acupuncture points and types of fibers conveying needling sensation. *Chin Med J* 1979;92:223-232.
- Zongxiang Z. Research advances in the electrical specificity of meridians and acupuncture points. *American Journal of Acupuncture* 1981;9(3):203-16.
-

ANEXOS

ANEXOS