



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIOVANA BOBATO CORTEZ

**AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS EFEITOS DO
TRATAMENTO COM O FLAVONOIDE HESPERIDINA METIL
CHALCONA EM MODELO DE DOR MUSCULAR DE INÍCIO
TARDIO EM CAMUNDONGOS**

Londrina
2024

GIOVANA BOBATO CORTEZ

**AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS EFEITOS DO
TRATAMENTO COM O FLAVONOIDE HESPERIDINA METIL
CHALCONA EM MODELO DE DOR MUSCULAR DE INÍCIO
TARDIO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marques Borghi.

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cortez, Giovana .

Avaliação dos potenciais efeitos do tratamento com o flavonoide hesperidina metil chalcona em modelo de dor muscular de início tardio em camundongos / Giovana Cortez. - Londrina, 2024.
58 f. : il.

Orientador: Sergio Borghi.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Dor muscular de início tardio - Tese. 2. Exercício físico - Tese. 3. Inflamação - Tese. 4. Dor - Tese. I. Borghi, Sergio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

GIOVANA BOBATO CORTEZ

**AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS EFEITOS DO
TRATAMENTO COM O FLAVONOIDE HESPERIDINA METIL
CHALCONA EM MODELO DE DOR MUSCULAR DE INÍCIO
TARDIO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marques Borghi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Camila Rodrigues Ferraz
Universidade de Maryland, College Park -
UMD

Londrina, 08 de março de 2024.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me capacitar e proporcionar essa oportunidade.

Agradeço também aos meus familiares, pai, mãe, meu marido, por toda paciência, apoio e suporte durante esse tempo.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, pela companhia nos estudos e pela contribuição que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Marques Borghi, agradeço imensamente pela oportunidade, ensinamentos e crescimento durante esse período, sem dúvidas não chegaria ao final dessa etapa sem a brilhante orientação que me foi passada. Estendo meus agradecimentos ao Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior, titular do Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer (LADINC), por nos proporcionar um ambiente tão rico em conhecimento e ao mesmo tempo acolhedor.

Aos membros da banca, Dra. Estefânia Gastaldello Moreira e Dra. Camila Rodrigues Ferraz por terem aceitado o convite de participar da banca examinadora.

O desafio de sair da graduação e enfrentar um novo ambiente acadêmico, agora de pesquisa, foi algo realizador e engrandecedor, ainda mais dentro de uma instituição como a Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foi um privilégio vivenciar esta experiência. Por isso, meu muito obrigada também a UEL e em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Que os estudos e trabalhos realizados possam ajudar na saúde, crescimento da ciência, da educação e do ambiente acadêmico brasileiro. E que esta etapa possa representar o fim de um ciclo e o início de uma nova caminhada ainda mais desafiadora e de mais conquistas.

CORTEZ, Giovana Bobato. **Avaliação dos potenciais efeitos do tratamento com o flavonoide hesperidina metil chalcona em modelo de dor muscular de início tardio em camundongos**. 2024. 58 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

Dor muscular de início tardio (DMIT) é um tipo de lesão muscular causada por exercícios excêntricos, de alta intensidade ou de longa duração. As manifestações dolorosas desta condição podem representar uma barreira considerável para um estilo de vida fisicamente ativo na população em geral, bem como podem dificultar o alcance de alto desempenho em atletas profissionais. Investigamos os efeitos protetores da hesperidina metil chalcona (HMC) contra DMIT. Os camundongos receberam duas vezes HMC nas doses de 1, 3 ou 10mg/kg (30 min antes e 12h após) por via i.p. e foram submetidos à água por 30 segundos (condição simulada) ou a uma única sessão ininterrupta de natação de 120 minutos. O imageamento de cálcio dos neurônios DRG foi usado para avaliar a ativação do nociceptor. A hiperalgesia muscular mecânica foi avaliada 12-48 horas após a sessão. Parâmetros oxidativos (ânion superóxido, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante) e recrutamento de leucócitos (imunofluorescência e atividades mieloperoxidase e N-acetil-beta-D-Glucosaminidase) foram avaliados 2 e 24 horas após a sessão de natação, respectivamente. Neurônios DRG de camundongos DMIT apresentaram um nível basal mais alto de influxo de cálcio e foram mais responsivos à capsaicina e AITC do que camundongos naïve. HMC (3 mg/kg) reduziu a hiperalgesia mecânica muscular, a maior atividade basal e o aumento da responsividade à capsaicina e AITC dos neurônios DRG e inibiu o estresse oxidativo e o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o tecido muscular em camundongos DMIT. A HMC preveniu a DMIT em camundongos após exercícios não habituais. Os mecanismos subjacentes podem estar relacionados ao direcionamento da inflamação, o que resulta na redução da atividade dos neurônios nociceptores musculares.

Palavras-chave: Hesperidina metil chalcona; Dor muscular de início tardio; Natação aguda intensa; Estresse oxidativo e leucócitos.

CORTEZ, Giovana Bobato. **Evaluation of the potential effects of treatment with the flavonoid hesperidin methyl chalcone in delayed-onset muscle soreness in mice.** 2024. 58 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Delayed-onset muscle soreness (DOMS) is a type of muscle injury occasioned by eccentric, high intensity, or long duration exercise. Painful manifestations of this condition may represent a considerable barrier for a physically active lifestyle in the general population as well as can hamper to achieve high performance in professional athletes. We investigate the protective effects of hesperidin methyl chalcone (HMC) against DOMS. Mice were given two times HMC (12 hours plus 30 minutes before) by i.p. route at the doses of 1, 3, or 10 mg/kg and were subjected to water for 30 seconds (sham condition) or to an uninterrupted single swimming session of 120 minutes. Calcium imaging of DRG neurons was used to assess nociceptor activation. Muscle mechanical hyperalgesia was assessed 12-48 hours after the session. Oxidative parameters (superoxide anion, lipid peroxidation, and antioxidant capacity) and leukocyte recruitment (immunofluorescence and myeloperoxidase and N-acetil-beta-D-Glucosaminidase activities) were evaluated 2 and 24 hours after the swimming session, respectively. DRG neurons from DOMS mice presented a higher baseline level of calcium influx and were more responsiveness to capsaicin and AITC than naïve mice. HMC (3 mg/kg) reduced muscle mechanical hyperalgesia, the higher baseline activity, and the increased responsiveness to capsaicin and AITC of DRG neurons and inhibited oxidative stress and the recruitment of neutrophils and macrophages to muscle tissue in DOMS mice. HMC prevented DOMS in mice after unaccustomed exercise. The underlying mechanisms may be related to targeting inflammation, which results in reduced muscle nociceptor neurons activity.

Key-words: Hesperidin methyl chalcone; Delayed-onset muscle soreness; Intense acute swimming; Oxidative stress and leukocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mecanismos envolvidos na dor muscular de início tardio	14
Figura 2 –	Metilação da Hesperidina.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AITC	Isotiocianato de alila
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CK	Creatina quinase
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMIT	Dor muscular de início tardio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
DRGs	Gânglios da raiz dorsal
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FeCl ₃	Cloreto férrico
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
GRD	Gânglio da raiz dorsal
HBSS	Solução de sal balanceada de Hank
HEPES	Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico
HMC	Hesperidina metil chalcona
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
KCL	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
LDH	Lactato desidrogenase
MDA	Malondialdeído
MNB	Meio neurobasal

MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-Acetil-B-D-glucosaminidase
NBT	Tetrazólio nitroazul
NF-Kb	Fator nuclear kappa b
OCT	Composto de temperatura de corte ideal
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBSt	Solução salina tamponada com fosfato com adicção de triton
PCR	Proteína C reativa
PFA	Paraformaldeído
PTX-3	Pentroxin-3
P2X3	Purinoceptor do canal de íons controlado por ligante três
RM	Ressonância magnética
TA	Tibial anterior
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TiO2	Dióxido de titânio
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Exercício físico e dor muscular tardia	12
1.2	Epidemiologia, diagnóstico e tratamento da dor muscular de início tardio	15
1.3	Modelos de dor muscular de início tardio em roedores descritos na literatura	17
1.4	Hesperidina metil chalcona	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo principal	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Animais	21
3.2	Tratamento	21
3.3	Modelo de dor muscular de início tardio induzida por natação aguda	21
3.4	Avaliação da hiperalgesia mecânica muscular	22
3.5	Ensaio de imageamento de Ca²⁺ intracelular	23
3.6	Ensaio para avaliação da produção dos níveis de ânion superóxido pelo método de redução do nitroazul de tetrazólio	23
3.7	Ensaio para avaliação dos níveis de peroxidação lipídica	24
3.8	Ensaio para avaliação de capacidade antioxidante pelo método de redução férrica	24
3.9	Ensaio para determinação da atividade da mieloperoxidase	25
3.10	Ensaio para determinação da atividade da N-acetilglucosaminidase	25
3.11	Ensaio de imunofluorescência em microscópio confocal	25
3.12	Análise estatística	26

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Artigo para publicação	28
5	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS	58
	ANEXO A – Comissão de ética no uso de animais.....	58

1 INTRODUÇÃO

2

3 1.1. EXERCÍCIO FÍSICO E DOR MUSCULAR TARDIA

4

5 A expectativa de vida da população geral mundial aumentou substancialmente nas
6 últimas décadas (KONTIS et al., 2017). Esse aumento reflete o efeito positivo das melhorias
7 das condições sociais e das políticas públicas relacionadas ao saneamento, habitação,
8 educação, diminuindo satisfatoriamente a mortalidade. Somado a isso, redução no uso de
9 tabaco e mortes cardiovasculares contribuíram ainda mais para o aumento da expectativa de
10 vida (MATHERS et al., 2015). Como consequência, ocorre um aumento na sobrevivência de
11 indivíduos convivendo com alguma condição crônica, resultante da diminuição da letalidade
12 de certas doenças, provocando um aumento na prevalência de incapacidades (CAMARGOS;
13 GONZAGA, 2015).

14 Uma das principais características desse processo de transição epidemiológica é,
15 portanto, o aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis relacionadas ao
16 processo de envelhecimento, e consequente, maior morbidade, fragilidade e incapacidade.
17 (CAMPOLINA et al., 2013; FERRUCCI; FABBRI, 2018).

18 Atualmente, muitos esforços estão sendo feitos para incentivar a prática habitual de
19 atividade física, visto que esta produz efeitos significativos à saúde. Os benefícios do exercício
20 são evidentes, não só para prevenir, como também para tratar diversas doenças (VINA et al.,
21 2012). Por exemplo, exercício físico possui efeito terapêutico em muitas doenças inflamatórias
22 crônicas, como doença de Alzheimer, esclerose múltipla, obesidade, diabetes, hipertensão,
23 artrite, câncer, doenças pulmonares obstrutivas crônicas, fibromialgia, dor crônica
24 generalizada, dores na coluna e outras (VINA et al., 2012; PEDERSEN; SALTIN, 2015; CHEN;
25 ZHANG; HUANG, 2016; RICE et al., 2019). De fato, os mecanismos celulares e moleculares
26 regulados pelo exercício são comparados aos alcançados pelos compostos farmacológicos,
27 conferindo ao exercício potencial capacidade terapêutica para ser usado no tratamento de
28 diversas condições patológicas (VINA et al., 2012; PEDERSEN; SALTIN, 2015), no entanto,
29 sem os efeitos adversos esperados comumente observados após o uso de drogas sintéticas.

30 Como já elucidado, a prática regular de exercício é considerada um componente
31 importante do tratamento efetivo da dor crônica, porém, infelizmente, o aparecimento de dor
32 tardia relacionada ao período de recuperação pós-exercício pode representar grande barreira
33 para a adesão dos indivíduos à programas de exercício, precipitando um ciclo de inatividade
34 física que pode levar ao agravamento da dor e da incapacidade (LIMA; ABNER; SLUKA, 2017;
35 RICE et al., 2019; LUQUE et al., 2023);

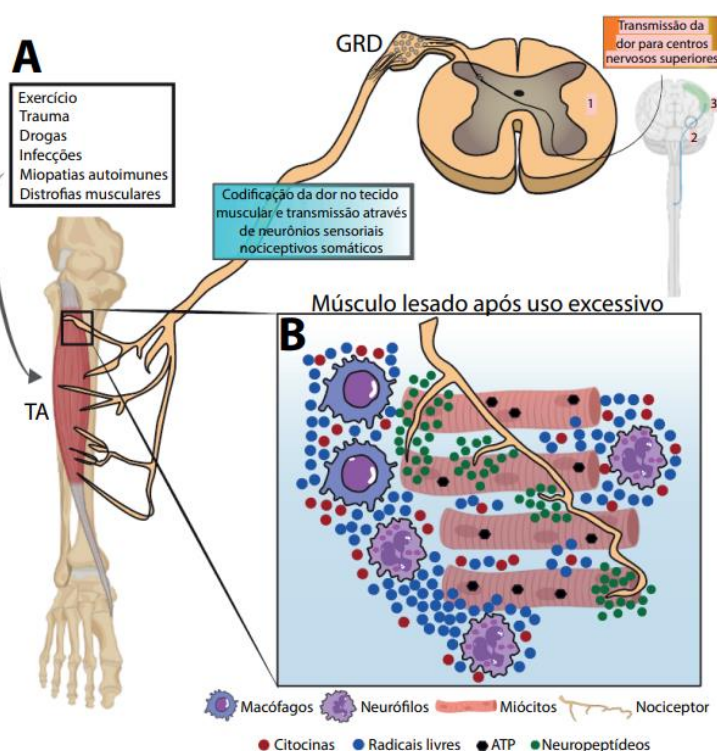
1 A dor muscular de início tardio (DMIT) induzida pelo exercício ocorre principalmente
2 após sessões de longa duração e/ou alta intensidade, exercícios excêntricos ou incomuns de
3 forma geral ao indivíduo, essa dor se desenvolvendo entre 24-48h após o exercício, podendo
4 atingir o seu pico em 72h (LEWIS; RUBY; BUSH-JOSEPH, 2012; BORGHI et al., 2014a;
5 NAHON et al., 2021; BORGHI; LUQUE, 2022). Os sintomas da DMIT incluem sensibilidade a
6 palpação, principalmente na junção musculotendínea, localização esta que pode ser atribuída
7 a uma alta concentração de receptores de dor muscular no tecido conjuntivo da região
8 miotendínea. Além disso, outros sintomas incluem edema muscular, perda da amplitude de
9 movimento, da flexibilidade, e da produção de força, assim como comprometimento
10 proprioceptivo (CHEUNG; HUME; MAXWELL, 2003; LUQUE et al., 2023). Considerando que
11 a capacidade de gerar força muscular pode ser comprometida, mais unidades motoras podem
12 ser ativadas para produzir a mesma força usada em uma atividade, resultando no aumento
13 dos custos metabólicos (BORGHI; LUQUE, 2022).

14 Inicialmente, acreditava-se que a DMIT acontecia em decorrência ao acúmulo de ácido
15 láctico nos músculos esqueléticos e no plasma imediatamente após o exercício. No entanto,
16 esta hipótese encontra resistência pelo fato de que um maior metabolismo associado às
17 contrações musculares concêntricas falha em produzir DMIT. Além disso, os níveis de ácido
18 láctico retornam aos níveis basais pré-exercício dentro de uma hora após o exercício. Sendo
19 assim, é provável que o ácido láctico contribua para a dor aguda associada com a fadiga
20 durante e imediatamente após o exercício intenso, porém, não deve ser atribuída à dor
21 retardada sentida 24-48h após (CHEUNG; HUME; MAXWELL, 2003; BORGHI; LUQUE,
22 2022). É importante destacar, que dados da literatura mostraram que o ácido láctico *per se*,
23 não é capaz de reduzir o limiar de ativação de aferentes musculares, indicando que esta
24 substância não tem ação neuronal direta. No entanto, quando associada a ATP e prótons,
25 pode ativar neurônios nociceptores (GREGORY; WHITLEY; SLUKA, 2015).

26 Sabe-se que diversos mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da DMIT.
27 Desta forma é bem aceito a hipótese de que o mecanismo da DMIT é iniciado no momento
28 do exercício, com tensões no sarcômero, resultando em acúmulo intracelular de cálcio,
29 inibindo a respiração celular e conseqüentemente prejudicando a produção de trifosfato de
30 adenosina (ATP), causando uma maior degradação da unidade funcional do músculo (LEWIS;
31 RUBY; BUSH-JOSEPH, 2012). Com o dano tecidual causado ao músculo, observa-se a
32 liberação de ATP para o meio extracelular, o qual se liga a receptores P2X3 e promovem
33 ativação neuronal, que por sua vez aumentam a secreção de neuropeptídeos, que modificam
34 as propriedades da microvasculatura local, causando edema e inflamação (BORGHI; LUQUE,
35 2022). Esse microtrauma inicial é então seguido por um processo inflamatório, com aumento

1 dos níveis de citocinas e estresse oxidativo (LEWIS; RUBY; BUSH-JOSEPH, 2012). Níveis
 2 elevados de oxidantes são um aspecto integral do metabolismo celular, sendo várias fontes
 3 potenciais de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) evidentes durante e após o exercício.
 4 Os ERO's estimulam a quimiotaxia de células imunes, sendo os leucócitos os principais
 5 contribuintes para respostas inflamatórias e oxidantes ainda mais amplas (BUSSULO et al.,
 6 2021). Resumidamente, na DMIT, o estresse oxidativo aumentado gerado pelo músculo
 7 sobrecarregado é agravado por células imunes recrutadas, intensificando a ativação dos
 8 neurônios sensoriais nociceptores, contribuindo para dor (LEWIS; RUBY; BUSH-JOSEPH,
 9 2012; BUSSULO et al., 2021) (Figura 1).

10



11
 12 *Figura 1- Mecanismos relacionados à DMIT. A: Condições que levam a percepção da dor*
 13 *muscular. Neurônios sensoriais nociceptores no músculo são ativados por estímulos nocivos e transmitem estas*
 14 *informações para a medula espinal (1), que age como estrutura de integração entre a periférica e centros nervoso*
 15 *superiores, como o tálamo (2) e o córtex sensorial (3). B: Painel com aumento para demonstração dos eventos*
 16 *que ocorrem durante a condição da lesão. Lesões no tecido muscular esquelético liberam ATP para o meio*
 17 *extracelular, o qual se liga aos receptores P2X3 e promovem a ativação neuronal, que por sua vez aumenta a*
 18 *secreção de neuropeptídeos que modificam as propriedades da microvasculatura local, causando edema e*
 19 *inflamação; A resposta inflamatória com aumento dos níveis de citocinas e estresse oxidativo é agravada com o*
 20 *recrutamento de leucócitos, intensificando a ativação dos neurônios sensoriais nociceptores, contribuindo para a*
 21 *dor. TA: tibial anterior. GRD: gânglio da raiz dorsal. Fonte: BORGHI; LUQUE, 2022.*

22

23 A DMIT representa um grande desafio para a medicina do exercício, tanto em atletas
 24 de alto desempenho e indivíduos fisicamente ativos, como também em idosos e sedentários.
 25 Em idosos com dor crônica, indivíduos fisicamente inativos, ou com doenças crônicas não-

1 transmissíveis, esse sintoma pode ser ainda mais significativo, representando um importante
2 obstáculo à adesão e permanência em programas de exercícios regulares, resultando em
3 retirada e abandono dos programas, com permanência em um estilo de vida sedentário, com
4 consequente manutenção ou piora da dor e incapacidade funcional (LIMA; ABNER; SLUKA,
5 2017; RICE et al., 2019). Em atletas de alto nível, a presença de dor induzida pelo exercício
6 que ocorre em decorrência de sobrecarga durante os treinamentos ou ritmo intenso de
7 trabalho, também é um fator complicador para que sejam alcançadas metas de rendimento
8 durante as mais variadas modalidades esportivas (ALVES; COSTA; SAMULSKI, 2006;
9 TANSKANEN; ATALAY; UUSITALO, 2010; KREHER; SCHWARTZ, 2012). Além disso, as
10 alterações nos padrões de ativação das unidades motoras e outros desconfortos associados
11 a DMIT podem contribuir para um maior risco de lesão musculoesquelética (BORGHI;
12 LUQUE, 2022).

13

14 1.2 EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOR MUSCULAR DE INÍCIO 15 TARDIO

16 Faltam dados epidemiológicos precisos sobre DMIT, devido ao elevado número de
17 casos não avaliados e pela falta de definição clara para o diagnóstico da DMIT. Em geral, uma
18 anamnese e um exame clínico composto por inspeção, palpação e testes funcionais dos
19 grupos musculares afetados podem fornecer informações importantes sobre a extensão e a
20 gravidade de uma lesão muscular, inclusive em casos de DMIT. Além disso, diversos
21 biomarcadores podem ser avaliados, como creatina quinase (CK), proteína C reativa (PCR),
22 interleucina 6 (IL-6), pentraxin-3 (PTX-3) e lactato desidrogenase (LDH), entretanto, todos
23 estes, considerados inespecíficos para o diagnóstico, por serem marcadores envolvidos em
24 vários processos fisiológicos. No diagnóstico por imagem da DMIT, diversas modalidades de
25 imagem são descritas, mas até o momento, a ressonância magnética (RM) tem sido relatada
26 como a modalidade preferida, fornecendo análise detalhada das imagens e caracterização
27 desse tipo de lesão muscular (HOTFIEL et al., 2018).

28 Os mecanismos de tratamentos para DMIT são abundantes, porém, segundo a
29 literatura, os resultados são muito variados e o sucesso do tratamento ainda é muito limitado
30 (CHEUNG; HUME; MAXWELL, 2003; HUME et al., 2004). Estes tratamentos incluem
31 crioterapia, eletroterapia, exercícios terapêuticos, homeopatia, massagens, intervenções
32 nutricionais, farmacoterapia, incluindo anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE's), entre
33 outros. O exercício por si só é umas das estratégias mais eficazes para aliviar a DMIT, no
34 entanto, o alívio da dor é temporário, e retomado rapidamente após a interrupção do exercício.
35 Esse alívio temporário da dor pode ser explicado devido ao rompimento de aderências nos

1 músculos doloridos, um aumento da remoção de resíduos nocivos através do aumento do
2 fluxo sanguíneo e um aumento na liberação de endorfina durante a atividade, a qual resulta
3 em um efeito analgésico que minimiza a sensação da DMIT (CHEUNG; HUME; MAXWELL,
4 2003). Em revisão sistemática com meta-análise recente, foram avaliados os impactos de
5 diversas intervenções não-farmacológicas para o tratamento da dor. Observou-se que a
6 massagem foi a intervenção mais eficaz que induziu benefícios significativos na DMIT e na
7 fadiga percebida (DUPUY et al., 2018).

8

9 Na nutrição, o uso de suplementos incluindo, proteínas, aminoácidos de cadeia
10 ramificada, creatina monohidratada, ômega 3 e vitamina D, são comumente usados em dietas
11 atléticas para melhorar a recuperação dos danos musculares pós exercício. Além disso,
12 compostos bioativos como os flavonoides surgiram como potencial opção para melhorar tanto
13 o desempenho esportivo como a recuperação pós exercício. Por exemplo, uma revisão
14 sistemática com meta-análise fornece evidências suficientemente forte para recomendar a
15 inclusão de alimentos ricos em flavonoides na dieta diária de atletas e indivíduos ativos
16 durante um mínimo de 7 dias antes da competição, visto que a ingestão de polifenóis
17 flavonoides pode melhorar a recuperação da força muscular e reduzir a dor muscular (CAREY;
18 LUCEY; DOYLE, 2021).

19 Dentre as opções, o uso de AINE's está entre as principais modalidades de escolha
20 para aliviar os sintomas da DMIT. Apesar da consistente base teórica da eficácia dos AINE's
21 para induzir respostas anti-inflamatórias e analgésicas, o seu real resultado no tratamento da
22 DMIT permanece incerto na maioria dos estudos, sendo inclusive reportado ausência de
23 efeitos significativos (CONNOLLY; SAYERS; MCHUGH, 2003; NAHON et al., 2021). Estas
24 inconsistências nos resultados apresentados sobre o uso de anti-inflamatórios no tratamento
25 da DMIT podem ser atribuídas a diversos fatores, como, tipo do AINE, tempo de administração
26 da droga, dose utilizada, e tipo de protocolo utilizado para induzir DMIT (NAHON et al., 2021).
27 Além disso, a utilização excessiva de AINE's está relacionada com a presença de efeitos
28 colaterais indesejáveis, incluindo, ulcerações gastrointestinais, insuficiência renal e danos
29 hepáticos (CHEUNG; HUME; MAXWELL, 2003; BUSSMANN et al., 2022). Entre os principais
30 AINEs utilizados por esportistas para evitar dor e fadiga está o diclofenaco oral, que além dos
31 efeitos indesejáveis mencionados acima, pode adicionalmente afetar o desempenho e a
32 adaptação dos tecidos em resposta às lesões (BARCELOS et al., 2021). Por estas razões,
33 seu uso tópico (1%) por períodos curtos foi recentemente recomendado para o tratamento da
34 DMIT (SINGLA et al., 2015), visando obtenção de efeito analgésico, mas também, perfil de
35 segurança mais favorável (ROTH; FULLER, 2011).

1 1.3 MODELOS DE DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO EM ROEDORES DESCRITOS NA 2 LITERATURA

3 A DMIT já está bem descrita na literatura, porém, ainda existem questões sobre
4 mecanismos moleculares e celulares associados a dor para serem mais bem elucidadas. Por
5 isso, modelos animais de dor induzida por exercício são desenvolvidos. Borghi e
6 colaboradores padronizaram estudos sobre DMIT em camundongos após sessão de exercício
7 físico por natação aguda com duração de 120 minutos, que resulta em hiperalgesia mecânica
8 entre 6-48h após a sessão de natação, sendo o pico de dor observado na 24^h após o
9 exercício (BORGHI et al., 2014a). Munehiro e colaboradores realizam estudos sobre DMIT
10 após corrida em declive como exercício excêntrico em ratos (MUNEHIRO et al., 2012).
11 Urakawa e colaboradores desenvolvem estudos sobre DMIT utilizando modelo de contração
12 excêntrica passiva com estimulação elétrica em ratos anestesiados. Em tal modelo, a
13 contração excêntrica é provocada no músculo gastrocnêmio por estimulação elétrica do nervo
14 tibial, através de um par de eletrodos de agulha inseridas próximos ao nervo. A articulação da
15 pata e do tornozelo do rato é fixada com uma placa, sendo esta tracionada mecanicamente
16 para mover a articulação do tornozelo da flexão plantar (25°) para dorsi-flexão (20°), atingindo
17 uma amplitude de movimento total de 45° para alongar o músculo gastrocnêmio sincronizando
18 com a estimulação elétrica, resultando em contração excêntrica (URAKAWA et al., 2015). A
19 idealização de diferentes modelos utilizando roedores para o estudo da DMIT é de extrema
20 importância, tanto para o avanço do entendimento dos mecanismos fisiopatológicos desta
21 condição, como para a triagem de fármacos capazes de preveni-la e/ou revertê-la. Por isso,
22 desenhos experimentais que tragam condições ambientais semelhantes as condições
23 experimentadas pelo humano são desejadas.

24

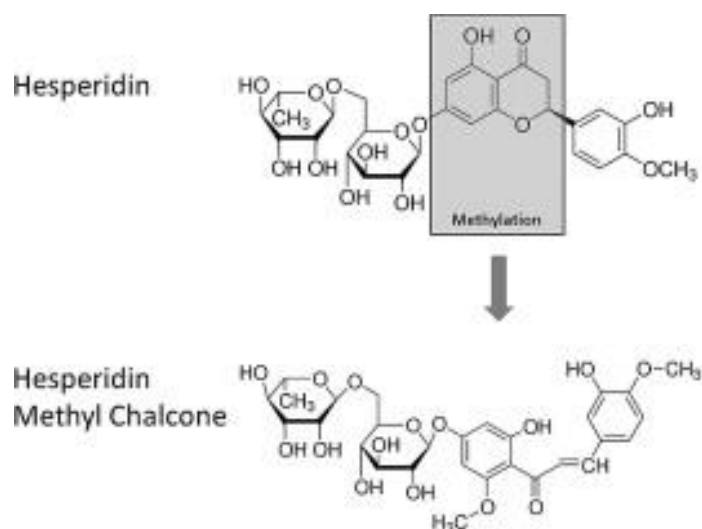
25 1.4 HESPERIDINA METIL CHALCONA

26

27 Os flavonoides são compostos polifenólicos presentes em diversos alimentos e plantas
28 do reino vegetal. Esses compostos naturais são bem conhecidos por suas propriedades
29 antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas e analgésicas (MARTINEZ et al., 2015; PINHO-
30 RIBEIRO et al., 2015; FERRAZ et al., 2020). A hesperidina, é um flavonoide da classe das
31 flavanonas encontrado em frutas cítricas que apresenta baixa solubilidade em água, o que
32 compromete sua absorção no intestino delgado, assim como muitos outros flavonoides
33 (FATHIAZAD; AFSHAR, 2004; MARTINEZ et al., 2015). Já a hesperidina metil chalcona
34 (HMC), representa um flavonoide sintetizado a partir da metilação da hesperidina em

1 condições alcalinas. A reação de metilação de flavonoides melhora sua disponibilidade,
 2 estabilidade metabólica e distribuição tecidual (BORGHI; CASAGRANDE; VERRI, 2023).

3



4

5

Figura 2- Metilação da Hesperidina. Fonte: Pinho-Ribeiro et al., 2015.

6

7 A HMC é amplamente utilizada em formulações farmacêuticas devido sua atividade
 8 vasoprotetora (FATHIAZAD; AFSHAR, 2004). Em associação com outras duas substâncias
 9 (extrato de *Ruscus Aculeatus* e vitamina C), a HMC compõe o medicamento Cyclo 3® Fort,
 10 utilizado no tratamento de insuficiência venosa crônica (BORGHI; CASAGRANDE; VERRI,
 11 2023). No entanto, ainda não existem formulações sendo comercializadas que utilizem
 12 exclusivamente a HMC para uso farmacoterápico. Em estudo controlado e aleatorizado
 13 desenvolvido recentemente pelo nosso grupo, foi demonstrado que a HMC (em regime de
 14 tratamento oral profilático) reduz a dor muscular à palpação (mas não a dor durante a
 15 movimentação ativa) e o dano ao tecido muscular esquelético (redução dos níveis séricos de
 16 creatina fosfoquinase), assim como promove a recuperação da força muscular e do deficit
 17 proprioceptivo provocado por exercício resistido dinâmico intenso na DMIT em humanos
 18 sedentários (LUQUE et al., 2023). Estudos pré-clínicos provenientes da pesquisa básica que
 19 mimetizam condições clínicas em humanos são essenciais para investigação dos
 20 mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos efeitos biológicos proporcionados pelos
 21 compostos farmacológicos estudados. Nosso grupo de pesquisa também tem sido pioneiro
 22 em estudos investigando as propriedades biológicas da HMC em modelos experimentais de
 23 dor e doenças inflamatórias. Estes são discutidos abaixo.

24 Por exemplo, o tratamento com HMC inibe a dor inflamatória (por exemplo, dor
 25 manifesta e hiperalgesia mecânica) induzida por diversos estímulos inflamatórios (incluindo

1 ácido acético, carragenina, adjuvante completo de Freund, entre outros), assim como inibe
2 a produção de citocinas pró-inflamatórias, o estresse oxidativo e a ativação do fator de
3 transcrição nuclear κ B (NF- κ B) (PINHO-RIBEIRO et al., 2015). Ainda, o tratamento com HMC
4 sistêmico e tópico protegeu a pele de camundongos dos efeitos deletérios da irradiação por
5 raios ultra-violeta, por reduzir a produção de radicais livres, melhorar a capacidade
6 antioxidante e inibir a produção de moléculas inflamatórias (MARTINEZ et al., 2015, 2016). O
7 tratamento com HMC também foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e o edema
8 articular do joelho em um modelo de artrite induzida por zimozan em camundongos, além de
9 reduzir o recrutamento de leucócitos, níveis de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo
10 (RASQUEL-OLIVEIRA et al., 2020). Em modelo de colite induzida por acético acético, o
11 tratamento com HMC demonstrou efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (GUAZELLI et al.,
12 2021). Em um modelo de lesão renal aguda induzida por diclofenaco em camundongos, o
13 tratamento com HMC reduziu o dano no tecido renal por proporcionar melhora da condição
14 antioxidante, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da produção da
15 citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL-10) (BUSSMANN et al., 2022). Por fim, a HMC
16 também apresenta efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e antioxidantes em modelos de
17 artrite gotosa induzida por injeção intra-articular de cristais de urato monossódico (RUIZ-
18 MIYAZAWA et al., 2018) e de artrite induzida por injeção intra-articular do pigmento branco
19 inorgânico dióxido de titânio (TiO₂) comumente utilizados para a confecção de próteses
20 articulares (ARTERO et al., 2023). No entanto, embora já tenhamos demonstrado seu efeito
21 analgésico e de melhora de performance em humanos, ainda não foram investigados em
22 maiores detalhes os efeitos mecanicísticos pelos quais a HMC pode ser efetiva para prevenir
23 a DMIT.

24 Sendo assim, sabendo dos promissores efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e
25 analgésicos da HMC, e de sua possível aplicabilidade para tratar diversas disfunções,
26 compreende-se ser essa, uma substância potencial para pesquisa e investigação adicionais,
27 inclusive em modelos experimentais de DMIT.

1 2 OBJETIVOS

2 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

3 Analisar os potenciais efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e antioxidantes do
4 tratamento com o flavonoide HMC em modelo de DMIT em camundongos.

5

6 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 7
- 8 • Verificar se o protocolo experimental de exercício por natação aguda induz ativação
9 de neurônios nociceptivos musculares, e se o tratamento com HMC é capaz de
10 modular a função de neurônios nociceptivos musculares após a sessão de exercício
11 por natação aguda;
 - 12 • Avaliar se o tratamento com HMC reduz a hiperalgesia mecânica, modula os níveis de
13 estresse oxidativo (capacidade antioxidante e produção de radicais livres) e inibe o
14 recrutamento de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) para o tecido muscular,
induzidos por exercício de natação aguda.

1 3 MATERIAIS E MÉTODOS

2

3 3.1 ANIMAIS

4

5 Foram utilizados camundongos Swiss (machos, pesando 20-30g) para todos os
6 experimentos, exceto para o ensaio de imunofluorescência em microscópio confocal para
7 avaliação do recrutamento de leucócitos para o tecido muscular, no qual foram utilizados
8 camundongos Lysm-eGFP e CCR2-RFP (machos, pesando entre 20-30g), ambos criados no
9 Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos no Biotério
10 do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina pelo menos
11 dois dias antes dos experimentos. Nos biotérios, os animais foram mantidos em caixas de
12 polipropileno padrão que medem 41 x 34 x 16 cm (máximo de 12 animais por caixa), com livre
13 acesso a água e ração, ciclo de claro/escuro (12/12 h) e ambiente climatizado, com exaustão
14 do ar. Os animais foram divididos em gaiolas no biotério de acordo com os grupos
15 experimentais (4 grupos de n=6; grupo naive, grupo sham, grupo natação aguda + salina e
16 grupo natação aguda + HMC) e foram adaptados aos ambientes e condições experimentais
17 com pelo menos 1 hora de antecedência em relação aos experimentos. Durante o processo
18 de eutanásia para coleta de amostras, os animais foram expostos ao isoflurano 3%, seguido
19 de luxação cervical e posterior decapitação. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética
20 no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 085/2022) e os
21 procedimentos de cuidado e manuseio de animais seguiram as diretrizes da Associação
22 Internacional de Estudo da Dor (IASP, *International Association for Study of Pain*).

23

24 3.2 TRATAMENTO

25

26 Os animais do grupo natação aguda + HMC foram tratados com 200uL de HMC
27 3mg/kg (dose determinada no experimento dose-resposta) e do grupo natação aguda + salina
28 com 200 uL solução salina 0,9%, por via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes e 12 horas
29 após a sessão de natação aguda. Nos experimentos para avaliação do estresse oxidativo, o
30 tratamento foi feito com apenas uma dose, 30 minutos antes da sessão de natação aguda.

31

32 3.3 MODELO DE DOR MUSCULAR DE INÍCIO TARDIO INDUZIDA POR NATAÇÃO AGUDA

33

34 Os animais foram posicionados individualmente em caixas de vidro divididas em 6
35 compartimentos (45×28×25 cm), com aproximadamente 30 litros de água a 31 ± 1 °C. É

1 importante ressaltar que esta temperatura da água é considerada intermediária, pois não é
2 baixa suficiente para induzir estresse, nem alta demais para induzir hipotalgia. Uma gota de
3 detergente líquido foi adicionada para reduzir a tensão superficial da água e prevenir que os
4 animais boiem durante o exercício. No início da sessão de exercício físico por natação, os
5 animais passam por período de estresse, por estarem em ambiente inescapável, no entanto,
6 este estresse inicial é mínimo e dissipado conforme ocorre a habituação do animal durante a
7 sessão de natação. A sessão de natação aguda teve duração de 120 minutos, tempo definido
8 em experimento de tempo-resposta já realizado em outro estudo do grupo (BORGHI et al.,
9 2014a). O grupo natação aguda + salina e natação aguda + HMC realizaram a sessão de
10 natação, já os animais do grupo sham (controle negativo) foram expostos por apenas 30
11 segundos à água e imediatamente retirados após este período, e os animais do grupo naive
12 não foram expostos à água. Após a sessão, os animais foram gentilmente secos com toalha
13 e posicionados em gaiolas junto com seu respectivo grupo. Entendemos que desenhos
14 experimentais com exercício aeróbio de longa duração e alta intensidade possam refletir com
15 maior proximidade a real condição observada em humanos durante a prática de atividades
16 físicas recreativas dinâmicas.

17

18 3.4 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA MUSCULAR

19

20 Foi utilizado o teste de pressão crescente na pata do camundongo já relatado
21 anteriormente (CUNHA et al., 2004; GUERRERO et al., 2006) para se avaliar dor muscular
22 (BORGHI et al., 2014a). Este método pode ser descrito como uma versão eletrônica do
23 método de filamentos de Von Frey (1896). Os animais são posicionados em compartimentos
24 de acrílico individuais com o piso de grade metálica, no mínimo 1 hora antes do experimento,
25 visando habituação às condições experimentais. O teste consiste na aplicação de uma
26 pressão crescente na superfície plantar com um transdutor de força manual (anestesiômetro
27 eletrônico Von Frey, Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) equipado com uma ponteira de
28 polipropileno com diâmetro de 0,5mm², provocando movimento de flexão na articulação do
29 tornozelo, o que gera estiramento no tendão de aquiles, com conseqüente movimentação dos
30 músculos, que resulta em resposta ou não do animal, dependendo o grupo experimental. O
31 ponto final é caracterizado pela retirada da pata, e a pressão necessária para evocar o
32 movimento de retirada da pata pelo animal é registrada automaticamente em gramas (g). O
33 teste foi realizado antes da sessão de natação para avaliação do limiar mecânico basal dos
34 animais e 12, 24, 36 e 48 horas após a sessão de exercício físico agudo para avaliação da
35 hiperalgia muscular. Para cada tempo avaliado, foram consideradas a média de três
36 medições e os resultados obtidos foram apresentados em delta (Δ), calculado pela subtração

1 dos valores obtidos dos tempos após a sessão de exercício, do valor basal.

2

3 3.5 ENSAIO DE IMAGEAMENTO DE CA^{2+} INTRACELULAR

4

5 Realizada em dois momentos, primeiramente grupo naive vs natação aguda + salina,
6 em seguida grupo naive, grupo natação aguda + salina e natação aguda + HMC. Os animais
7 do grupo natação aguda + salina e natação aguda + HMC realizaram o exercício com duração
8 de 2h, e suas amostras foram coletadas 24h após o nado. Amostras de DRGs (L4-L6 bilateral)
9 foram dissecados em MNB, dissociados em 1 mg/ml de colagenase A e 2,4 U/ml de dispase
10 II em HEPES por 20 minutos a 37°C. Após trituração com pipetas Pasteur de vidro de tamanho
11 decrescente, as células DRG foram centrifugadas em um gradiente de BSA de 10%,
12 plaqueadas em placas de cultura celular revestidas com laminina. Os DRGs foram então
13 carregados com 1,2 μ M de Fluo-4AM em MNB, incubados por 30 min 37°C, lavado com HBSS
14 e fotografado em um microscópio confocal (TCS SP8, Leica Microsystems). Para avaliar a
15 ativação neuronal, as placas de DRG foram registradas por 10 minutos, divididos em 2
16 minutos de leitura inicial (0 – 120s, valores basais), 3 minutos após estimulação com
17 capsaicina 1 μ M (120 – 350s, TRPV1 agonista), 3 minutos após estimulação com AITC (350 –
18 480s, TRPA1 agonista) e 2 minutos finais após estimulação com KCL 40mM (480 – 600s,
19 ativa todos os neurônios). O fluxo de cálcio dos neurônios foi analisado a partir da
20 fluorescência mensurada com o software LAS X (Leica Microsystems) (FATTORI et al., 2019;
21 BERTOZZI et al., 2022).

22

23 3.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO 24 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NITROAZUL DE TETRAZÓLIO

25

26 A produção do ânion superóxido foi determinada pela redução do Nitroblue tetrazólio
27 (NBT) (BORGHI et al., 2018; BORGHI et al., 2022). Em 200 μ l de EDTA, os músculos sóleos
28 foram coletados 2h após a sessão aguda intensa de natação, tempo já padronizado em estudo
29 anterior (BORGHI et al., 2014a; BORGHI et al., 2016). A amostra foi homogeneizada usando
30 um ultra-turrax (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK, EUA). Então, 50
31 μ l do homogeneizado foi colocado em uma placa de 96 poços, seguido da adição de 100 μ l de
32 solução de azul de nitro tetrazólio (1mg/mL) (NBT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e
33 mantida incubada em temperatura ambiente por 60 minutos. Toda a mistura aquosa foi
34 retirada da placa, e o precipitado foi solubilizado com a adição de 120 μ l de KOH 2M e 120 μ l
35 de DMSO. A densidade óptica foi medida usando um leitor de espectrofotômetro de

1 microplacas (Espectrofotômetro de microplacas Multiskan GO; Thermo Fischer Scientific,
2 Vantaa, Finlândia) a 600nm. Os níveis de redução foram corrigidos de acordo com a
3 concentração de proteínas, e os resultados apresentados como redução de NBT (DO/ mg de
4 proteína).

5

6 3.7 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

7

8 A peroxidação lipídica foi determinada através da avaliação dos níveis de substâncias
9 reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando metodologia adaptada descrita
10 anteriormente (BORGHI et al., 2018; BORGHI et al., 2022). Para este método, amostras do
11 músculo sóleo foram coletadas 2h após o exercício intenso de natação em 200ul de KCL. As
12 amostras foram trituradas, após, 50ul do homogeneizado foi colocado na placa e adicionado
13 5ul de FeCl₃ 1mM, 5ul de ácido ascórbico 1mm, 50ul de ácido tricloroacético (TCA; 2,8%)
14 e 50ul de ácido tiobarbitúrico (TBA; 1,0%), seguido de incubação de aproximadamente 15 min
15 em banho-maria fervente (95 °C) para posterior transferência para banho de gelo. Um produto
16 intermediário da peroxidação lipídica, denominado malondialdeído (MDA), foi então
17 quantificado em amostras de músculo, pela diferença entre a absorbância obtida
18 espectrofotometricamente a 535 e 572 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer,
19 Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia). Os níveis de proteínas nas amostras foram utilizados
20 para corrigir os resultados, os quais são apresentados como nmol de MDA por mg de proteína.

21

22 3.8 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE 23 REDUÇÃO FÉRRICA

24

25 A capacidade antioxidante endógena de se opor a condições de estresse oxidativo foi
26 verificada espectrofotometricamente pelo teste de quantificação de redução férrica (FRAP)
27 (PINHO-RIBEIRO et al., 2015; BORGHI et al., 2018). O músculo sóleo foi coletado 2 h após
28 a sessão aguda intensa de natação em 200ul de KCL, a amostra foi triturada e centrifugada
29 (200g 10 min, 4 °C). Após essa etapa, 20 µL de sobrenadante foi misturado com 30 µL de
30 água ultrapura e 150 µL de reagente FRAP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os
31 resultados foram assimilados usando uma curva padrão Trolox (0,02- 20nmol) (Sigma
32 Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os níveis de proteínas nas amostras foram utilizados para
33 corrigir o resultado. As leituras foram realizadas a 595 nm, e os resultados apresentados como
34 nmol de equivalente de Trolox por mg de proteína.

35

3.9 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

A migração leucocitária para o músculo sóleo induzida pelo nado agudo intenso foi avaliada utilizando-se o ensaio cinético-colorimétrico da MPO (BORGHI et al., 2014b; BORGHI et al., 2016). Resumidamente, amostras de músculos esqueléticos foram coletadas 24h após o nado em tampão K_2HPO_4 (200uL, 50mM, pH 6,0) contendo HTAB a 0,5% e mantido a $-86^\circ C$ até o uso. As amostras foram homogeneizadas com Polytron (PT3100; Kinematica AG, Luzern, Suíça) e centrifugadas a 16.100 g a $4^\circ C$ por 2 min. Em seguida, 15 μl do sobrenadante foram misturados com 200 μl de tampão fosfato (50 mM pH 6,0), contendo 0,167 mg/ml de dicloridrato de O-dianisidina e peróxido de hidrogênio a 0,0005%. A absorbância foi determinada após 20 min a 450nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finlândia). A atividade da MPO das amostras foi comparada com uma curva padrão de neutrófilos. Os níveis de proteína utilizados para corrigir os resultados, os quais foram apresentados como atividade da MPO (número de neutrófilos totais $\times 10^5$ /mg de proteína).

3.10 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA N-ACETILGLUCOSAMINIDASE

A atividade da NAG foi determinada por método colorimétrico adaptado previamente descrito (PINHO-RIBEIRO et al., 2015; BORGHI et al., 2016). Resumidamente, amostras de músculos esqueléticos foram coletadas 24h após o nado em tampão K_2HPO_4 (200uL, 50mM, pH 6,0) contendo HTAB a 0,5% e mantido a $-86^\circ C$ até o uso. As amostras foram homogeneizadas com Polytron (PT3100; Kinematica AG, Luzern, Suíça) e centrifugadas a 16.100 g a $4^\circ C$ por 2 min. Após, 10 μL do sobrenadante foram adicionados em uma placa de 96 poços seguidos pela adição de tampão citrato fosfato (40uL, 50 mM), pH 6,0). A reação foi iniciada pela adição de 50uL de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida 2,24mM. A placa foi incubada a $37^\circ C$ por 10min, e tampão glicina (100uL, 0,2 M, pH 10,6) foi adicionado. A atividade enzimática da NAG foi determinada espectrofotometricamente a 400 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finlândia). A atividade NAG das amostras foi comparada com uma curva padrão de macrófago. Os níveis de proteína utilizados para corrigir os resultados, os quais foram apresentados como atividade da NAG (macrófagos $\times 10^5$ /mg de proteína).

3.11 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM MICROSCÓPIO CONFOCAL

1 A coleta para imunofluorescência muscular foi realizada 24h após o exercício intenso
2 agudo por natação. Para isso os camundongos Lysm-eGFP e CCR2-RFP foram perfundidos
3 através da aorta ascendente com solução salina tamponada com fosfato (PBS) seguida de
4 4% de paraformaldeído (PFA) e o músculo sóleo foi coletado. Em seguida, as amostras foram
5 pós-fixadas em paraformaldeído (PFA 4%) durante 24h, depois lavadas com PBS e colocadas
6 em solução sacarose a 30% por mais 24h. Após esse período as amostras foram colocadas
7 em solução metade sacarose 30% e metade optimal cutting temperature (OCT). Por fim, as
8 amostras foram então incluídas em OCT usando o reagente Tissue-Tek® (Sakura® Finetek
9 USA, Torrance, CA) e congeladas. Cortes de 15 micrômetros (μm) foram cortados em
10 criostato (CM1520, Leica Biosystem, Richmond, IL, EUA) e armazenados em ultra-freezer
11 para posterior análise por imunofluorescência (quatro lâminas por grupo/ quatro animais por
12 grupo/ dois músculos por animal). As lâminas foram lavadas com PBSt, e bloqueadas com
13 DAPI durante 1 hora à temperatura ambiente, em seguida novamente realizado a lavagem
14 com PBSt. A montagem das lâminas foi realizada utilizando o dispositivo ProLong™ Gold
15 Antifade Mountant com meio de montagem. As imagens foram realizadas em microscópio
16 confocal (SP8, Leica, Wetzlar, Alemanha) e examinadas utilizando o Software Leica LAS X.

17

18 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

19

20 Todos os dados foram analisados com o programa estatístico GraphPad Prism 9.2
21 (Graphpad software, Inc.). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk.
22 Para os dados que apresentaram distribuição normal, utilizou-se os testes de One-way
23 ANOVA ou Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ou Sidak. Para os dados sem
24 distribuição normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações
25 múltiplas de Dunn. Foram realizados 2 experimentos de forma independente para confirmação
26 dos dados, e os dados foram apresentados pela média \pm EPM (erro padrão da média) de
27 medidas feitas em 6 animais por grupo, representativas do primeiro experimento. São
28 consideradas significativas as diferenças para $p < 0.05$.

1 **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

2

3 4.1 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

4 O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer da
5 Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da revista *Physiology & Behavior*. Os
6 resultados estão descritos no artigo intitulado: "Analgesic effect of hesperidin methyl chalcone
7 in delayed onset muscle soreness in mice: inhibition of oxidative stress, inflammatory cells
8 recruitment, and TRPV1+ and TRPA1+ nociceptor neurons"

1 **Analgesic effect of hesperidin methyl chalcone in delayed onset muscle**
2 **soreness in mice: inhibition of oxidative stress, inflammatory cells recruitment,**
3 **and TRPV1+ and TRPA1+ nociceptor neurons**

4

5 Giovana B. Cortez^{a,b}, Mariana M. Bertozzi^b, Amanda M. Dionisio^{a,b}, Maiara Piva^b,
6 Nayara R. Morelli², Rubia Casagrande^a, Waldiceu A. Verri Jr^{a,b*}, Sergio M. Borghi^{a,b,c,*}

7

8 ^aPostgraduate Program in Health Sciences, Center of Health Science, Londrina State
9 University, Londrina 86038-350, PR, Brazil.

10 ^bDepartment of General Pathology, Center for Biological Sciences, State University of
11 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

12 ^cCenter for Research in Health Sciences, University of Northern Paraná, Londrina,
13 Paraná 86041-140, Brazil.

14 *Author for correspondence: Prof. Sergio M. Borghi and Prof. Waldiceu A. Verri Jr,
15 Department of General Pathology, Biological Sciences Center, State University of
16 Londrina. Rod. Celso Garcia Cid Pr 445, KM 380, Londrina, Paraná, Brazil. P.O. box:
17 10.011, zip code 86057-970. Fax: + 55 43 3371 4387, Phone: + 55 43 3371 4979, e-
18 mail addresses: waverri@uel.br and sborghi@uel.br.

1 **Abstract**

2 Delayed-onset muscle soreness (DOMS) is a type of muscle injury occasioned by
3 eccentric, high intensity, or long duration exercise. DOMS may represent a
4 considerable barrier for a physically active lifestyle in the general population and can
5 hamper to achieve high performance in professional athletes. We investigate the
6 protective effects of hesperidin methyl chalcone (HMC) against DOMS. Mice were
7 given two times HMC (12 hours plus 30 minutes before) by i.p. route at the doses of 1,
8 3, or 10 mg/kg and were subjected to water for 30 seconds (sham condition) or to an
9 uninterrupted single swimming session of 120 minutes. Calcium imaging of dorsal root
10 ganglia (DRG) neurons was used to assess nociceptor neuron activation. Muscle
11 mechanical hyperalgesia was assessed 12-48 hours after the session. Oxidative
12 parameters (superoxide anion, lipid peroxidation, and antioxidant capacity) and
13 leukocyte recruitment (fluorescence, and myeloperoxidase and N-acetyl-beta-D-
14 Glucosaminidase activities) were evaluated 2 and 24 hours after the swimming
15 session, respectively. DRG neurons from DOMS mice presented a higher baseline
16 level of calcium and higher responsiveness to capsaicin (TRPV1 agonist) and AITC
17 (TRPA1 agonist) than naïve mice. HMC (3 mg/kg) reduced muscle mechanical
18 hyperalgesia, the DRG nociceptor neuron activation at baseline and upon TRPV1 and
19 TRPA1 agonists and inhibited oxidative stress and the recruitment of neutrophils and
20 macrophages to muscle tissue in DOMS mice. Thus, HMC prevented DOMS in mice
21 after unaccustomed exercise. The underlying mechanisms may be related to targeting
22 inflammation, which results in reduced TRPV1⁺ and TRPA1⁺ muscle nociceptor
23 neurons activity.

24

25 **Keywords:** Hesperidin methyl chalcone, delayed-onset muscle soreness, intense
26 acute swimming, oxidative stress, and leukocytes.

1 **1. Introduction**

2 Delayed-onset muscle soreness (DOMS) commonly occurs after eccentric or
3 unfamiliar sessions of exercise. It is presumed that excessive bouts of exercise may
4 lead to muscle damage reflected by disruption of structural proteins in muscle fibers
5 and/or connective tissues, which culminates first in a local inflammatory response
6 succeeded by systemic physiological responses which in turn triggers clinical DOMS
7 (Cheung et al., 2003; Hotfiel et al., 2018). It is typically characterized by a delayed
8 muscle pain that is initially perceived 24-48 hours, peaking soreness at 48-72 hours in
9 the post-exercise recovery period and can last up to 7 days after (Cheung et al., 2003;
10 Luque et al., 2023). DOMS symptoms can vary considerably between individuals, and
11 is associated with localized muscle soreness, stiffness, and edema, reduced force
12 capacity, and proprioceptive dysfunctions (Dupuy et al., 2018; Hotfiel et al., 2018;
13 Luque et al., 2023).

14 The clinical management of DOMS may include non-pharmacological and
15 pharmacological approaches. Regarding non-pharmacological strategies, recent data
16 have demonstrated only massage can effectively soften DOMS (Dupuy et al., 2018).
17 Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have several adverse events
18 (Cheung et al., 2003; Luque et al., 2023), may negatively affect skeletal muscle
19 adaptation under chronic usage (Schoenfeld, 2012), and are not superior when
20 compared to control drugs or placebos in alleviating DOMS (Nahon et al., 2021).
21 Nevertheless, there are promising perspectives for DOMS treatment. Current data
22 reveals that supplementation with polyphenol curcumin can reduce creatine
23 phosphokinase (CPK) serum levels (a biomarker of muscle injury) and muscle
24 soreness index as well as can promote improvements in muscle strength recovery,
25 thus suggesting curcumin as a potential intervention for DOMS (Beba et al., 2022;
26 Fang and Nasir, 2021; Oxley and Peart, 2023).

27 Flavonoids comprises a diverse class of natural polyphenols with several
28 biological properties that are widely distributed in plants and foods. Its beneficial effects
29 might range from analgesic to anticancer and microbicidal actions (Ferraz et al., 2020).
30 Hesperidin methyl chalcone (HMC) is a flavonoid pertaining to the class of chalcones.
31 HMC is a synthetic flavonoid generated from the methylation of the flavanone
32 hesperidin under alkaline conditions. This reaction increases its hepatic metabolic
33 stability and membrane transport, facilitating its intestinal absorption and increasing its
34 oral bioavailability (Borghini et al., 2023).

1 In preclinical studies, HMC was demonstrated to present analgesic, anti-
2 inflammatory, and antioxidant properties in models of inflammatory pain (Pinho-Ribeiro
3 et al., 2015), arthritis (Rasquel-Oliveira et al., 2020), ulcerative colitis (Guazelli et al.,
4 2021), ultraviolet B (UVB) skin irradiation (Martinez et al., 2016), and rosacea
5 (Hernandez-Pigeon et al., 2018). We previously conducted a randomized controlled
6 trial to evaluate the effects of HMC in DOMS in adult sedentary men. HMC preemptive
7 supplementation improved physical performance and proprioceptive deficits and
8 reduced muscle pain (Luque et al., 2023).

9 Basic research represents a crucial step for the identification of potential
10 mechanistic understanding on how pharmacological compounds exert their effects
11 (Aronson et al., 2018). In this sense, in the present study, we used an experimental
12 model of DOMS in mice in which we apply an intense acute swimming exercise to
13 mimic human DOMS (Borghi et al., 2014) aiming to evaluate the mechanisms by which
14 HMC exerts its analgesic and anti-inflammatory effects in DOMS.

16 **2. Materials and methods**

18 *2.1. Animals*

19
20 Adult male Swiss mice, weighing between 20-25g and aged 6–8 weeks from
21 State University of Londrina (UEL), Paraná State, Brazil, were used during most of the
22 experiments. Additionally, LysM-enhanced green fluorescent protein (eGFP⁺) and
23 CCR2-red fluorescent protein (RFP⁺) mice (male, 20–25 g, 6–8 weeks, strains
24 generated through its background C57BL/6 mouse) from the animal facility of Ribeirão
25 Preto Medical School were used to investigate the role of leukocytes in the present
26 DOMS model. Animals were properly housed in standard clear plastic cages with free
27 access to water/food, light/dark cycle of 12/12 hours and controlled temperature
28 environment, and were maintained in the vivarium of the Department of Pathological
29 Science of UEL for at least two days before the experiments. For experiments
30 (conducted in six mice per group), the mice were firstly identified and subsequently
31 randomized. Mice were used only once and were acclimatized to the testing room in
32 the case of behavioral analyzes at least 1 hour before the experiments, which was
33 conducted solely during the light cycle. At the end of experiments, mice were
34 anesthetized with isoflurane 3% (Abbott Park, IL, USA) to minimize suffering and

1 terminally euthanized by cervical dislocation followed by decapitation. The animal
2 condition was monitored daily and at indicated time points during the experiments. No
3 unexpected animal deaths occurred during the conduction of the present study.
4 Animals' care and handling procedures were carried out in accordance with the
5 ARRIVE guidelines for reporting animal research, with the International Association for
6 Study of Pain (IASP) guidelines and were approved by the Institutional Ethics
7 Committee for Animal Research of UEL (process number 037.2022 from October 18,
8 2022).

9

10 *2.2. Test compounds and treatment protocol*

11

12 The compounds used in this study were saline solution (NaCl 0.9%; Frenesius
13 Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brazil) and HMC (purity $\geq 95\%$; $C_{28}H_{34}O_{15}$; Santa Cruz
14 Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Mice received HMC (1, 3, and 10 mg/kg; 200
15 μL) or vehicle (saline; 200 μL) via the intra-peritoneal (i.p.) route 30 minutes before
16 plus reinforcements 12 hours after the intense acute swimming session, depending on
17 the experiment. The dilution of HMC for the treatments were conducted using saline
18 and performed immediately before its administration.

19

20 *2.3. DOMS model*

21

22 For DOMS model, mice were placed in separate lanes (six in total) in a glass
23 box (45×28×25 cm) containing approximately 20 liters of water at $31^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. The mice
24 experienced just of session of swimming and swam all at the same time for an
25 uninterrupted period of 120 min (Borghetti et al., 2016; Borghetti et al., 2014). We previously
26 developed this DOMS model caused by long duration swimming exercise with the aim
27 of favoring the translation of results for humans, since it mimics a common type of
28 recreational physical activity performed daily, comprising both concentric and eccentric
29 actions (Borghetti et al., 2022), instead of models that exclusively apply eccentric
30 contractions, which does not represent the reality of most exercises practiced during
31 life. Sham mice swam for only 30 seconds. This model of exercise also avoids stress
32 (absence of increase in endogenous glucocorticoid levels) (Borghetti et al., 2014) or
33 hypoalgesia related to water temperature and focuses on exercise-induced
34 hyperalgesia (Borghetti et al., 2016; Borghetti et al., 2022; Borghetti et al., 2014). After the

1 intense acute swimming session or sham conditions, mice were dried and placed in
2 cages together with their randomized respective group. The welfare of mice was
3 always a focus and, therefore, an experimenter continuously monitored the swimming
4 sessions.

5

6 *2.4. Calcium imaging for neuronal activity assessment*

7

8 Naïve mice or those exposed to intense acute swimming session were
9 euthanized 24 hours after the end of the intense acute swimming session (time point
10 representing the peak of muscle soreness according to previous publications of this
11 model) (Borghini et al., 2016; Borghini et al., 2014). The L₄-L₆ dorsal root ganglia (DRG)
12 were dissected into Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen,
13 Darmstadt, Germany), dissociated in collagenase A (1 mg/mL)/dispase II (2.4 U/mL)
14 (Roche Applied Sciences, Penzberg, Upper Bavaria, Germany) in 4-(2-hydroxyethyl)-
15 1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffered saline (Sigma-Aldrich, San Luis,
16 Missouri, EUA) (5 mM CaCl₂) at 37°C for 20 minutes. The DRG cells were
17 subsequently crushed with pipettes of decreasing size, and dissociated neurons were
18 plated and incubated with laminin for 45 minutes at 37°C. DRGs were then loaded with
19 1.2 µM of the reagent Fluo-4AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) in
20 Neurobasal-A medium, incubated for 30 minutes at 37°C, and washed with Hanks'
21 Balanced Salt solution (HBSS), to be posteriorly imaged on a Confocal Microscope
22 (TCS SP8, Leica Microsystems, Mannheim, Germany). To investigate nociceptor
23 neuron activation, DRG plates were recorded for 2 minutes of initial reading to achieve
24 fluorescence values with the LAS X software (Leica Microsystems, Mannheim,
25 Germany). The color scale indicates the fluorescence intensity, in which blue
26 represents low and red represents the maximum intensity (Fattori et al., 2019).
27 Experimenters were always blinded regarding experimental groups.

28

29 *2.5. Evaluation of muscle mechanical hyperalgesia*

30

31 Mice were placed individually in acrylic cages (12×10×17 cm) with wire grid
32 floors, between 15-30 minutes before the measurements. During the test, the evaluator
33 evoking a hind paw flexion reflex with a hand-held force transducer (electronic von
34 Frey anesthesiometer; Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) connected with a 0.5

1 mm² contact area polypropylene tip (Borghi et al., 2014). During the evaluations, movement-elicited hyperalgesia was provoked by the pressure exerted by the experimenter using the von Frey probe on the plantar surface of the paw, which induces the dorsal flexion of the ankle joint (an antagonistic movement in relation to soleus muscle contraction), which leads to the passive stretch of the Achilles tendon, generating calf muscle distention. As calf muscle are sensitized by the overload due to long-term swimming, mice remove its paw from the stimulus. Therefore, the end point of the assessments was always characterized by the removal of the paw followed by clear flinching movements when the muscle of the mice is distended (Borghi et al., 2014). Importantly, the measurements were performed only when the animals were not agitated, and with all four paws resting on the floor of the grid. The measurements were carried out between 12 to 48 hours after the end of the intense acute swimming session. Three repetitions of each measurement were used during the experiment to obtain the average of the final value. The results are expressed by delta (Δ) withdrawal threshold (in grams) calculated by subtracting the mean measurements (indicated time points) after stimulus from the baseline measurements. Behavioral analyses were performed always by the same person, blinded to the treatment groups.

18

19 *2.6. Quantitation of superoxide anion production, lipid peroxidation levels, and* 20 *antioxidant capacity*

21

22 Oxidative stress parameters in the soleus muscle were evaluated 2 hours after
23 the end of the intense acute swimming session as previously standardized (Borghi et
24 al., 2014). For superoxide anion production test, muscle samples were collected and
25 homogenized in saline, and 50 μ L of the homogenate was subsequently placed in a
26 96-well plate, followed by the addition of 100 μ L of the reagent nitroblue tetrazolium
27 (NBT solution, 1 mg/mL) and incubation for 1 hour at 37°C. After this initial phase, the
28 supernatant was removed, and the precipitated formazan was solubilized by adding
29 120 μ L of 2MKOH and 140 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis,
30 MO, USA). The production of superoxide anion was then determined by the reduction
31 of the redox dye NBT. Readings were performed at 600 nm (Multiskan GO Microplate
32 Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland) (Borghi et al., 2016).
33 Lipid peroxidation was evaluated through thiobarbituric acid reactive substances
34 (TBARS) levels in muscle samples. Briefly, trichloroacetic acid (TCA; 10%) was added

1 to the homogenate to precipitate proteins followed by centrifugation (1,000 g, 3 min,
2 4°C). The protein-free supernatant was separated, and thiobarbituric acid (0.67%) was
3 added to the solution, which was later maintained in water bath for 15 minutes at
4 100°C. Malondialdehyde, an intermediate product of lipid peroxidation, was
5 determined by the difference between the readings using absorbance at 535 and 572
6 nm (Borghi et al., 2016). Ferric-Reducing Ability Potential (FRAP) assay was used to
7 evaluate the antioxidant capacity of muscle samples. For FRAP assay, samples were
8 homogenized and centrifuged (200 g, 10 min, 4°C), and 50 µL of the resultant
9 supernatant was mixed with 150 µL of deionized water and 1.5 mL of freshly prepared
10 FRAP reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). The solution was then
11 incubated at 37°C for 30 minutes, and the absorbance measured at 595 nm. Protein
12 quantification was used during the tests for data normalization, and the results were
13 presented as NBT reduction (OD/mg of protein of soleus), TBARS (OD/mg of protein
14 of soleus) and FRAP (nmol of Trolox eq/mg of protein of soleus), respectively.

15

16 *2.7. Tests for the assessment of leukocytes recruitment*

17

18 Leukocyte recruitment to the soleus muscle in response to intense acute
19 swimming was evaluated 24 hours after the end of the intense acute swimming session
20 using kinetic-colorimetric methods for myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl-beta-D-
21 Glucosaminidase (NAG) enzymes activities and immunofluorescence assay (Borghi et
22 al., 2016; Borghi et al., 2022). For MPO activity assay, samples of muscles were
23 collected in 50 mM K₂HPO₄ buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyl
24 trimethylammonium bromide (HTAB), homogenized, and centrifuged (16,100 g, 2
25 minutes, 4°C). Later, 10 µL of the resultant supernatant received 200 µL of 50 mM of
26 phosphate buffer (pH 6.0), containing 0.167 mg/mL of O-dianisidine dihydrochloride
27 and 0.0005% hydrogen peroxide and assayed for MPO activity at 450 nm (Multiskan
28 GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland).
29 Protein quantification (Lowry method) was used for data normalization. The MPO
30 activity of samples was compared to a standard curve of neutrophils, and the results
31 were presented as MPO activity (numbers of total neutrophils x 10⁴/mg of soleus). For
32 NAG activity assay, 20 µL of the supernatant obtained from MPO activity test was
33 added in a 96-well plate followed by the addition of 80 µL of 50 mM of phosphate buffer
34 (pH 6.0), and 2.24 mM 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide. The plate was then

1 incubated at 37°C for 10 minutes, and the reaction stopped by the addition of 100 µL
2 of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Protein quantification (Lowry method) was used for
3 data normalization. NAG enzymatic activity was determined at 400 nm, and results
4 were presented as NAG activity (macrophages x 10⁴/mg of protein of soleus). For
5 fluorescence analysis, the mice were perfused through the ascending aorta with
6 phosphate buffered saline (PBS) followed by 4% of paraformaldehyde (PFA) twice,
7 and the soleus muscle was collected. Samples were then fixed in PFA 4% for 24 hours,
8 and after, PFA was replaced by a solution of 30% saccharose and incubation for 3
9 additional days. After this period, muscles were washed with PBS and embedded in
10 optimum cutting temperature (O.C.T.) using Tissue-Tek[®] reagent (Sakura[®] Finetek
11 USA, Torrance, CA). Sections of 10 micrometers (µm) were created using a cryostat
12 (CM1520, Leica Biosystem, Richmond, IL, USA) and properly processed for
13 immunofluorescence (six samples per mice per slide/six mice per group). The
14 representative images and quantitative analysis of different experimental groups were
15 created and performed using a confocal microscope (SP8, Leica Microsystems,
16 Mannheim, Germany). Bright field channel was used simultaneously during
17 acquisitions. Neutrophils and macrophages quantification in random fields were
18 performed by an experimenter blinded to the experimental groups. The results were
19 presented as the percentage of LysM-eGFP⁺ and CCR2-RFP⁺ fluorescent intensities,
20 as indicators of neutrophil and macrophage recruitment, respectively.

21

22 *2.8. Statistical analysis*

23

24 Experimenters were blinded to groups in all experiments for all parameters,
25 including behavioral analyses, data acquisition, sample processing, and data analyses.
26 Sample size (n = 6 animals per group) was determined using G*Power 3.1 (Faul et al.,
27 2009). The effect size *f* was determined using the population mean, and the power of
28 analysis was set to 0.95, and a probability error of 0.05. These denominators were
29 chosen based on previous studies of our group (Bussmann et al., 2022; Guazelli et al.,
30 2021; Pinho-Ribeiro et al., 2015; Ruiz-Miyazawa et al., 2018). The method of block
31 randomization was used to randomize subjects into groups which results in equal
32 sample sizes at all time points for each assay. Two experiments were conducted
33 independently for technical replicates, and data representative of one experiment were
34 plotted and analyzed. Data were submitted to Shapiro-Wilk normality test and Brown-

1 Forsythe homogeneity tests before proceeding to parametric or non-parametric
2 analysis. Results are presented as means \pm SEM (standard error of the mean) when
3 data showed Gaussian distribution and were homogeneous; or median + range when
4 data showed non-Gaussian distribution and were non-homogeneous. Data from
5 experiments possessing several time points and containing more than two groups for
6 comparison were analyzed using two-way repeated measure analysis of variance
7 (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test for data with Gaussian
8 distribution and homogeneous. For one time-point analysis, data with Gaussian
9 distribution and homogeneous were analyzed by one-way ANOVA followed by Sidak's
10 post hoc test. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test was
11 performed for non-Gaussian-distributed data or data with variance in homogeneity.
12 Statistical differences were considered significant when $p < 0.05$. Data were analyzed
13 using the software GraphPad Prism version 9.2 (La Jolla, CA, USA).

14

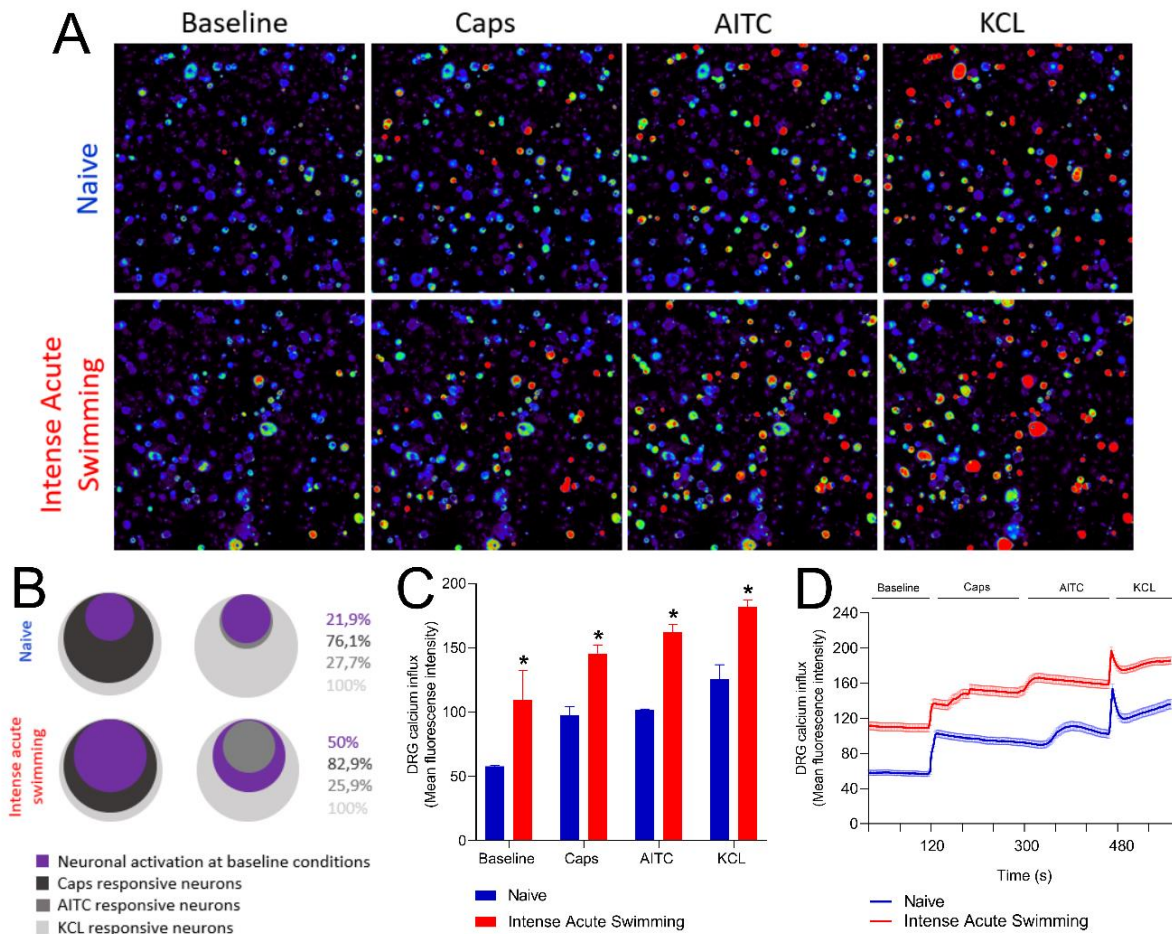
15 **3. Results**

16

17 *3.1. DRG neurons from intense acute swimming-induced DOMS mice presented* 18 *higher baseline levels of calcium*

19

20 We demonstrated previously that our DOMS model involves pain as well as the
21 peripheral production of reactive oxygen species and recruitment/activation of
22 leukocytes to overloaded muscle tissue (Borghgi et al., 2016; Borghgi et al., 2022; Borghgi
23 et al., 2014). However, it remained to be shown whether muscle nociceptor neurons
24 are activated in these model using techniques to support behavior data. Calcium influx
25 can be used as measurement of DRG neurons activation (Segato-Vendrameto et al.,
26 2023). The present results show that DRG neurons from DOMS mice presented a
27 higher baseline level of calcium influx than DRG neurons from naïve mice, as well as
28 these neurons were more responsive to capsaicin stimulus (a transient receptor
29 potential vanilloid subunit 1 (TRPV1) agonist) and activator allyl isothiocyanate
30 stimulus (AITC; a transient receptor potential ankyrin 1 [TRPA1] agonist). These
31 results indicate that in intense acute swimming-induced DOMS there is activation of
32 TRPV1⁺ and TRPA1⁺ nociceptor sensory neurons (Fig. 1a-d).

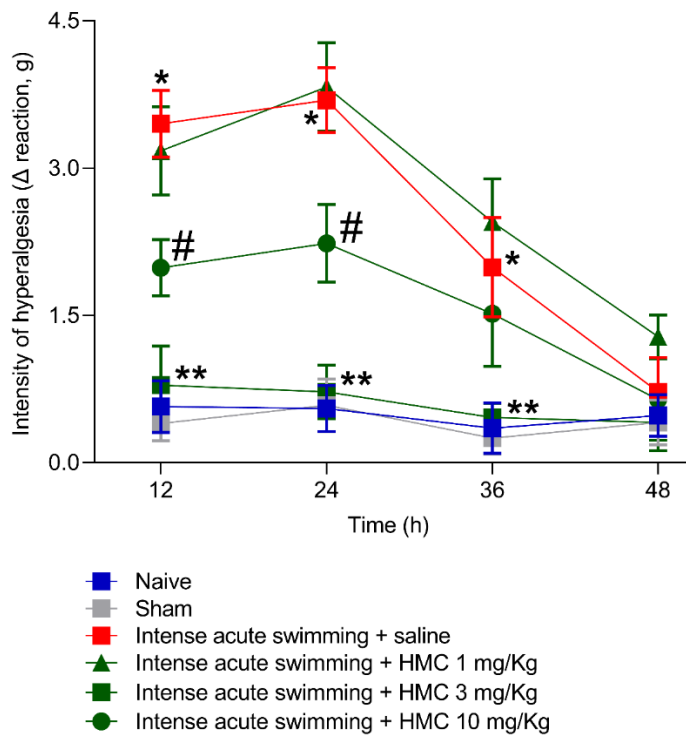


1
2 Fig. 1. Intense acute swimming leads to increased muscle nociceptor neuronal activity at baseline level.
3 Twenty-four hours after the end of the intense acute swimming, DRGs neurons from naïve and DOMS
4 mice were dissected for calcium imaging using Fluo-4AM. Representative fields of baseline
5 fluorescence of DRG neurons dissected from naïve or intense acute swimming mice (A). Absent calcium
6 levels are shown in blue, and increasing concentrations of calcium are shown by the change in color
7 spectra up to red. Venn diagram evidencing that naïve or intense acute swimming conditions activated
8 a population of TRPV1 and TRPA1 responsive neurons (B). Bars (C) and traces (D) representation of
9 data. Image resolution: 288×220 mm (96×96 DPI). Results are expressed as mean±SEM, n = 4 DRG
10 plates (each plate is a neuronal culture pooled from six mice) per group per experiment, two independent
11 experiments. *p < 0.05 vs. naïve mice (One-way ANOVA followed by Sidak's post-hoc).
12

13 3.2. HMC treatment reduces intense acute swimming-induced muscle mechanical 14 hyperalgesia in DOMS mice

15
16 Intense acute swimming protocol induced significant muscle mechanical
17 hyperalgesia that increased in a time-dependent manner until the 24th hour after the
18 session, period in which it achieves its peak (Fig. 2), and although it decreased at the
19 36th hour, it was still significant when compared to the naïve and sham groups,
20 corroborating data from our previous studies (Borghi et al., 2016; Borghi et al., 2022;
21 Borghi et al., 2014). The i.p. pre-treatment with 1 mg/kg dose of HMC did not alter

1 muscle mechanical hyperalgesia, however, the dose of 10 mg/kg of HMC significantly
 2 reduced muscle mechanical hyperalgesia between 12-24 hours after the session. On
 3 the other hand, the intermediate dose of 3 mg/kg of HMC abolished muscle mechanical
 4 hyperalgesia from 12 to 36 hours after the session (Fig. 2). This dose-response curve
 5 indicated that HMC presents a bell-shaped analgesic activity. Thus, the dose of 3
 6 mg/kg of HMC was selected for the next rounds of experiments considering it achieved
 7 a maximal response.



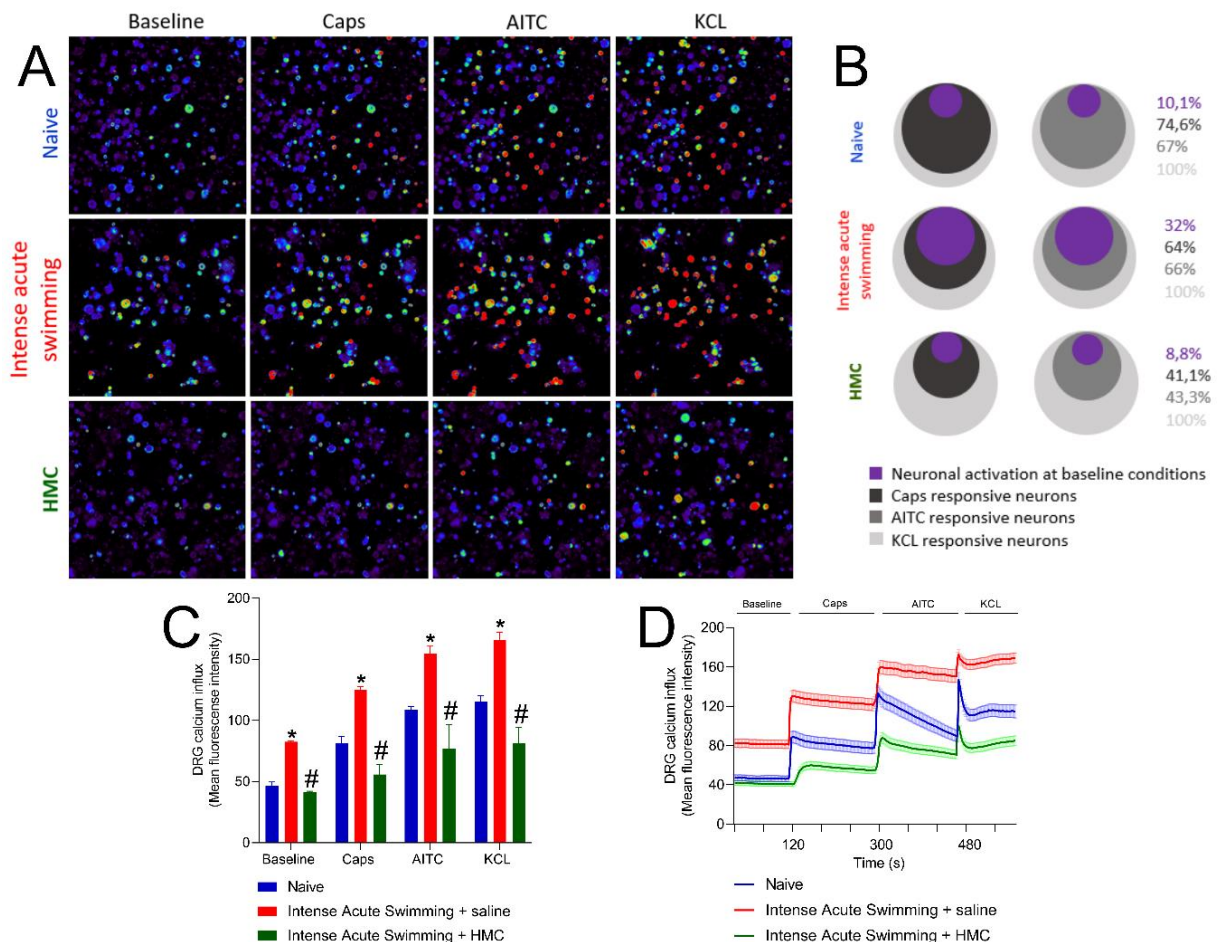
8

9 Fig. 1. HMC reduces intense acute swimming-induced muscle mechanical hyperalgesia. Mice received
 10 vehicle or HMC (1–10 mg/kg, i.p.) 30 minutes before plus reinforcements 12 hours after the intense
 11 acute swimming. The intensity of muscle mechanical hyperalgesia was evaluated 12–48 hours after the
 12 end of the intense acute swimming. Results are presented as mean±SEM of intensity of hyperalgesia
 13 (Δ reaction, in grams), n = 6 mice per group per experiment, representative of two independent
 14 experiments. *P<0.05 vs. naïve and sham mice; #P<0.05 vs. intense acute swimming + saline and
 15 intense acute swimming + HMC 1 mg/kg groups; **P<0.05 vs. intense acute swimming + saline and
 16 intense acute swimming + HMC 1 mg/kg and 10 mg/kg groups (Two-way ANOVA followed by Tukey's
 17 post-hoc).
 18

19 3.3. HMC treatment reduces intense acute swimming-induced DRG neurons activation 20 in DOMS mice

21 In our next experimental step, we wondered whether activated DRG neurons
 22 from DOMS mice would be modulated by HMC pre-treatment (Fig. 3). The i.p. pre-
 23 treatment with HMC (3 mg/kg) significantly reduced intense acute swimming elevation
 24 of baseline calcium levels, even as reduced the increased responsiveness to capsaicin

1 and AITC stimuli, evidencing an inhibitory modulation by HMC upon TRPV1 and
 2 TRPA1 channels in muscle nociceptive neurons (Fig. 3a-d). Notably, the inhibition of
 3 DRG neurons activity as well as the reduced responsiveness after capsaicin and AITC
 4 stimulation by HMC, were even lower than the basal level and response of naïve
 5 animals to stimuli, respectively, highlighting the potential down-regulatory modulation
 6 of HMC upon TRPV1⁺/TRPA1⁺ DRG neurons (Fig. 3a-d). Therefore, HMC reduced
 7 intense acute swimming-induced DOMS via downregulating TRPV1 and TRPA1
 8 function, and consequently, inhibiting DRG neurons activation.



9

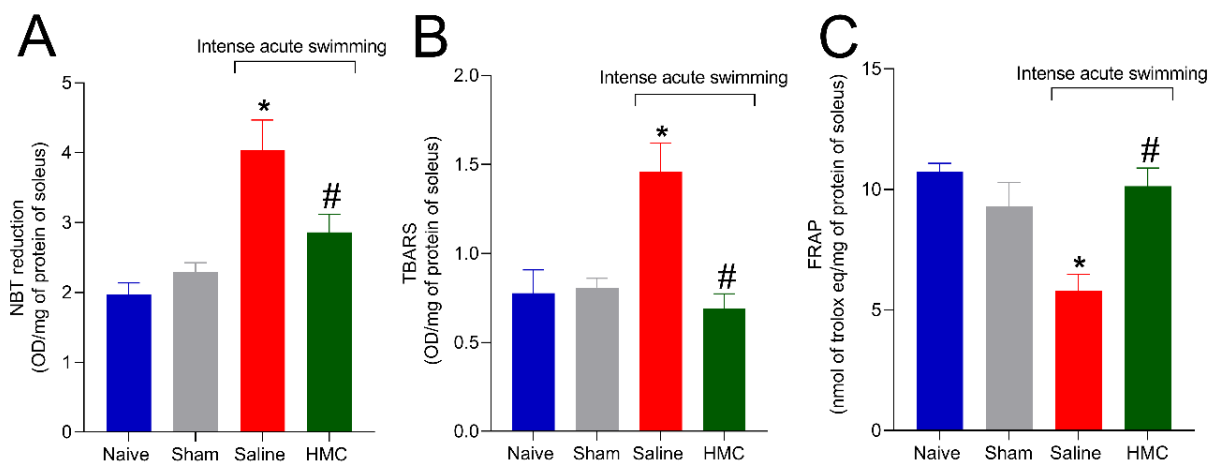
10 Fig. 2. HMC reduces intense acute swimming-induced muscle nociceptor neuron increased activity.
 11 Twenty-four hours after the end of the intense acute swimming, DRGs neurons from naïve and DOMS
 12 mice were dissected for calcium imaging using Fluo-4AM. Mice received vehicle or HMC (3 mg/kg, i.p.)
 13 30 minutes before plus reinforcements 12 hours after the intense acute swimming. Representative fields
 14 of baseline fluorescence of DRG neurons dissected from naïve, intense acute swimming + saline, and
 15 intense acute swimming + HMC groups (A). Absent calcium levels are shown in blue, and increasing
 16 concentrations of calcium are shown by the change in color spectra up to red. Venn diagram evidencing
 17 that naïve, intense acute swimming + saline, and intense acute swimming + HMC groups activated a
 18 population of TRPV1 and TRPA1 responsive neurons (B). Bars (C) and traces (D) representation
 19 of data. Image resolution: 288×220 mm (96×96 DPI). Results are expressed as mean±SEM, n = 4 DRG
 20 plates (each plate is a neuronal culture pooled from six mice) per group per experiment, two independent
 21 experiments. *p < 0.05 vs. naïve mice; #P<0.05 vs. intense acute swimming + saline group (One-way
 22 ANOVA followed by Tukey's post-hoc).

1

2 3.4. HMC treatment inhibits intense acute swimming-induced oxidative stress in 3 muscle tissue of DOMS mice

4

5 The antioxidant activity of HMC explains, at least in part, its analgesic activity
6 (Pinho-Ribeiro et al., 2015). Therefore, our next approach was to investigate the
7 antioxidant effects of HMC upon intense acute swimming-induced DOMS. Intense
8 acute swimming leads to increased production of superoxide anion and lipid
9 peroxidation corroborating previous findings associated to reduced antioxidant
10 capacity in the soleus muscle (Borghi et al., 2016; Borghi et al., 2022) (Fig. 4a,b).
11 Previously, we demonstrated that in the present DOMS model alterations occur in the
12 soleus muscle without changes in the gastrocnemius muscle (Borghi et al., 2016;
13 Borghi et al., 2014) probably because of their different physiological properties. Slow
14 oxidative muscles such as soleus muscle (predominantly type I fibers) can raise local
15 oxidative metabolism to high levels for hours without fatigue (e.g., during intense acute
16 swimming), contrary to gastrocnemius muscle [fast anaerobic adenosine triphosphate
17 (ATP) turnover due to large relative content of type II fibers] that performs anaerobic
18 glycolysis (Hamilton et al., 2022; Ratkevicius et al., 1998). The i.p. pre-treatment with
19 HMC (3 mg/kg) significantly inhibited the increase in superoxide anion production and
20 lipid peroxidation levels, as well as prevented the depletion of antioxidant capacity in
21 the soleus muscle (Fig. 4a-c). Thus, HMC can effectively act as an antioxidant
22 compound to prevent intense acute swimming-induced oxidative stress in the muscle
23 tissue of DOMS mice.



24

25 Fig. 3. HMC reduces intense acute swimming-induced oxidative stress in the muscle. Mice received
26 vehicle or HMC (3 mg/kg, i.p.) 30 minutes before the intense acute swimming. The NBT (A), TBARS

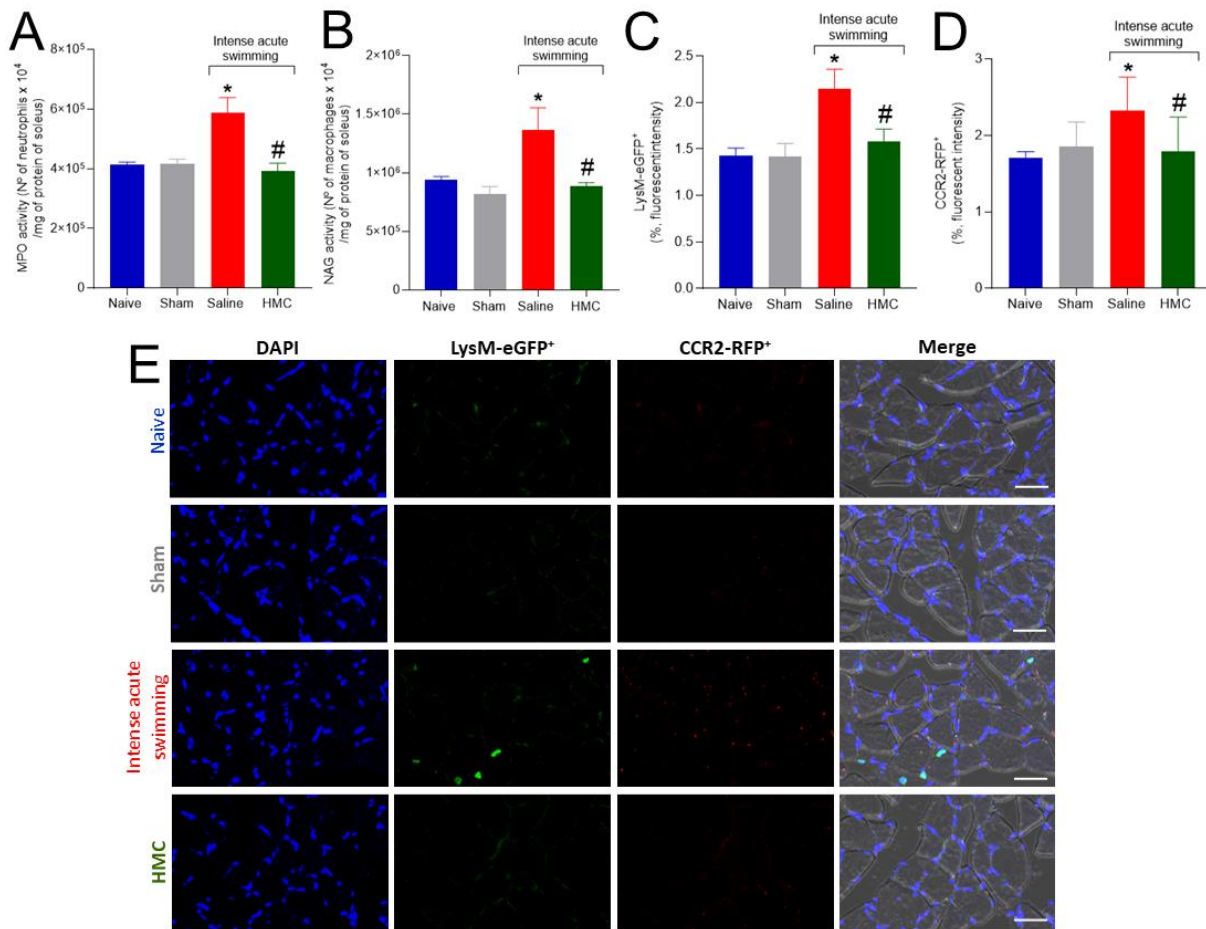
1 (B), and FRAP (C) assays in the muscle samples were quantified 2 hours after the end of the intense
2 acute swimming session. Results are presented as NBT reduction (OD/mg of protein) and TBARS
3 (OD/mg of protein) and FRAP (nmol of trolox eq/mg de protein) of soleus muscle, n = 6 mice per group
4 per experiment, representative of two independent experiments. *P<0.05 vs. naïve mice; #P<0.05 vs.
5 intense acute swimming + saline group (One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc).

6

7 *3.5. HMC treatment inhibits intense acute swimming-induced leukocyte recruitment to* 8 *the muscle tissue of DOMS mice*

9

10 Reactive oxygen species have varied functions, which include the recruitment
11 of leukocytes to the inflammatory foci (Bussulo et al., 2021; Mittal et al., 2014).
12 Leukocytes contribute to pain and inflammation in DOMS (Borghini et al., 2016; Borghini
13 et al., 2022; Borghini et al., 2014). To evaluate this parameter, we investigated whether
14 HMC mechanistic effects included targeting the recruitment of neutrophils and
15 macrophages to the soleus muscle that occurs in response to intense acute swimming
16 (Fig. 5). Using colorimetric techniques of MPO and NAG activity assays and
17 fluorescence-reporter mice, it was noticed that intense acute swimming induced the
18 recruitment of neutrophils and macrophages to the soleus muscle, demonstrated by
19 increased MPO and NAG activities and fluorescence intensity of LysM-eGFP
20 (neutrophils/ macrophages) and CCR2-RFP (macrophages), respectively, whereas
21 the i.p. pre-treatment with HMC (3 mg/kg) was able to significantly inhibit these
22 parameters, reflecting in reduction of the recruitment of these both leukocytes to the
23 soleus muscle (Fig. 5a-e). Therefore, evidencing HMC can target the migration of
24 inflammatory cells to the muscle tissue after DOMS.



1
 2 Fig. 4. HMC treatment inhibits intense acute swimming-induced leukocyte recruitment in the muscle.
 3 Mice received vehicle or HMC (3 mg/kg, i.p.) 30 minutes before plus reinforcements 12 hours after the
 4 intense acute swimming. Muscle samples were collected for quantification 24 hours after the end of the
 5 intense acute swimming session. Measurements of MPO (A) and NAG (B) activities. Fluorescent
 6 intensity for LysM-eGFP⁺ (C) and CCR2-RFP⁺ cells (D). Immunofluorescence representative fields from
 7 naïve, intense acute swimming + saline, and intense acute swimming + HMC groups (E). Results are
 8 presented as MPO and NAG activities (N° of neutrophils and macrophages, respectively, x 10⁴/mg of
 9 protein of soleus muscle) and as percentage (%) of fluorescent intensity of LysM-eGFP⁺ and CCR2-
 10 RFP⁺, n = 6 mice per group per experiment, representative of two independent experiments. *P<0.05
 11 vs. naïve mice; #P<0.05 vs. intense acute swimming + saline group [One-way ANOVA followed by
 12 Tukey's post-hoc (panels A-C) and Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc (panel D)].
 13

14

15 4. Discussion

16

17 The symptoms associated with DOMS can have unpleasant consequences and
 18 may hamper the goals of both athletes and physically inactive persons. The muscle
 19 pain perceived in post-exercise recovery period as well as the substantial drop in
 20 muscle strength and performance, represent the major clinical findings with deleterious
 21 implications for the affected individual (Cheung et al., 2003; Luque et al., 2023). For
 22 sedentary people in general population, it can represent a crucial complicating factor

1 that can frustrate the adhesion and maintenance of individuals in exercise programs
2 (Lima et al., 2017; Littlewood et al., 2015; Luque et al., 2023). Regarding the athletic
3 performance, DOMS may lead to anatomical, physiological, and psychological adverse
4 outcomes, resulting in reduced range of motion and muscle power, which can lead to
5 secondary injuries (Lima et al., 2017; Mizumura and Taguchi, 2016). In this scenario,
6 considering the demographic of DOMS, the search for new treatment options for its
7 control is pertinent.

8 HMC is describe as a well-known venoactive/lymphatic active compound and
9 is marketed in association with other components to treat, for example, chronic venous
10 insufficiencies (Boyle et al., 2003; Luque et al., 2023). HMC is also effective as
11 analgesic to reduce clinical DOMS under muscle palpation; and as a potential
12 ergogenic as it improves muscle strength recovery and postural deficits in sedentary
13 man (Luque et al., 2023). These data highlight HMC as a promising compound for the
14 treatment of DOMS. However, the mechanisms by which HMC may improve negative
15 outcomes associated with DOMS are still unknown. In the present study, HMC pre-
16 treatment reduced muscle mechanical hyperalgesia and muscle nociceptor neuron
17 activity, by inhibiting oxidative stress and inflammatory cells recruitment to the muscle
18 tissue in intense acute swimming-induced DOMS.

19 Physiological levels of reactive oxygen species (ROS) are necessary for regular
20 muscle contractions and force generation; however, its overproduction during oxidative
21 stress may impair muscle function leading to muscle weakness and fatigue (Powers
22 and Jackson, 2008). Excessive oxidative stress can even harm athletic performance
23 (McLeay et al., 2017). Exercise protocols with intense and prolonged characteristics
24 lead to increased production in ROS, which in turn, may induce cellular dysfunctions
25 in myocytes (Bussulo et al., 2021; Powers and Jackson, 2008). We previously
26 demonstrated that in the present model, increased oxidative stress in response to
27 intense and prolonged swimming is already detected in the first 2 hours after the
28 session, and that increased recruitment/activation of neutrophils and macrophages
29 occurs at 24th hours later, coinciding with the peak of muscle mechanical hyperalgesia
30 (Borghi et al., 2016; Borghi et al., 2022; Borghi et al., 2014). ROS can act boosting the
31 chemotaxis and recruitment of neutrophils (Hattori et al., 2010) as well as oxidative
32 stress can enhance inflammatory response of macrophages (Kirkham, 2007). Under
33 activation, neutrophils and inflammatory macrophages produces large quantities of
34 ROS, which adds to the myocyte-derived ROS to increase oxidative stress.

1 Importantly, ROS can activate nociceptor neurons (Maioli et al., 2015; Munoz et al.,
2 2017; Wang et al., 2004).

3 Considering those prior evidence it is possible to interpretate that unaccustomed
4 intense acute swimming increases the production of oxidants by workload muscles,
5 which overloaded the antioxidant system. This overload of the antioxidant system was
6 observed by increased superoxide anion production and lipid peroxidation and reduced
7 antioxidant capacity by FRAP assay. Oxidative stress accounted to increase
8 neutrophils and macrophages recruitment to muscle tissue, which was observed by
9 MPO and NAG activities as well as by fluorescence detection of LysM and CCR2
10 positive cells. As a result of oxidative stress and inflammatory cell recruitment and
11 activity, there is muscle nociceptor activation and muscle soreness as observed by
12 behavior data and DRG neuron data.

13 The intervention protocol with pre-treatment with HMC targets these
14 pathological events of DOMS in mice. HMC could reduce DOMS by targeting the early
15 muscle oxidative imbalance in response to intense and prolonged exercise session
16 and subsequent recruitment of inflammatory cells to the muscle tissue. These data are
17 in accordance with previous studies demonstrating HMC antioxidant properties in other
18 models of inflammatory pain and diseases (Bussmann et al., 2022; Guazelli et al.,
19 2021; Pinho-Ribeiro et al., 2015; Rasquel-Oliveira et al., 2020; Ruiz-Miyazawa et al.,
20 2018). Moreover, ROS can activate TRPV1 and TRPA1 channels (Kozai et al., 2014;
21 Stanford et al., 2019). TRPV1 and TRPA1 increased functional activity in nociceptors
22 neurons located in sensory ganglia are involved in pain and inflammation (Brown and
23 Iadarola, 2015; Wang et al., 2019). Although in different experimental conditions
24 (varied DOMS models and muscle tissue evaluated), the role of TRP channels in
25 DOMS has been demonstrated (Fujii et al., 2008; Ota et al., 2013; Retamoso et al.,
26 2016). In anesthetized rats under electric stimulation and with the gastrocnemius
27 muscle stretched (with the intension to mimic physiological eccentric contractions),
28 TRPV1 antagonists (capsazepine and ruthenium red) reduced muscle mechanical
29 hyperalgesia, whilst no increase in mRNA and protein levels of TRPV channels in DRG
30 neurons was observed (Fujii et al., 2008). Using the same model of electric stimulation
31 of gastrocnemius, it was founded that TRPV1 contributes to DOMS downstream of
32 nerve growth factor (NGF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in
33 mice, probably at muscle nociceptor level (Ota et al., 2013). In a rat model of downhill
34 running, xanthine-oxidase-derived ROS, and increased muscle TRPV1

1 (gastrocnemius) were proposed to be related to the events preceding the peak of
2 muscle pain in DOMS (Retamoso et al., 2016). Nevertheless, whether muscle
3 nociceptor neurons positive for TRP channels become more active and responsive
4 during DOMS was still uncertain.

5 We demonstrated here for the first time that TRPV1⁺ and TRPA1⁺ DRG
6 nociceptive neurons of DOMS mice are more active in the post-exercise recovery
7 period than those from their non-exercised pairs. This conclusion was reached by
8 pairing the intensity of calcium levels and whether the activated neurons were
9 responsive to capsaicin and AITC, agonists of TRPV1 and TRPA1, respectively. We
10 previously reported HMC inhibits inflammatory pain induced by capsaicin (Pinho-
11 Ribeiro et al., 2015), and in the present study, HMC pre-treatment mitigates the
12 increased activity and responsiveness to TRPV1 and TRPA1 agonists, thus, showing
13 its potential applicability for DOMS control. Therefore, this potential modulatory activity
14 of HMC upon oxidative stress, inflammatory cells recruitment and nociceptor neurons
15 activity may explain, at least in part, the analgesic mechanisms in DOMS in mice
16 (present data), and potentially explain the analgesic and ergogenic effects of HMC
17 observed in clinical DOMS (Luque et al., 2023).

18 In summary, the current study showed HMC pre-treatment reduces muscle
19 TRPV1⁺ and TRPA1⁺ nociceptor neuron activity and consequently muscle mechanical
20 hyperalgesia in DOMS mice by regulating oxidative imbalance and the recruitment of
21 leukocytes in muscle tissue after intense acute swimming session. The underlying
22 mechanism may involve the inhibition of oxidative stress and cell damage (lipid
23 peroxidation) as well as the promotion of antioxidant capacity, which in turn results in
24 reduced inflammatory cells activity. The ability of HMC to modulate DOMS pathology
25 and physiological repercussions may represent an attractive strategy for the treatment
26 of DOMS, highlighting this flavonoid from the chalcone class as a potential candidate
27 for this purpose.

28

29 **CRedit authorship contribution statement**

30

31 **Giovana B. Cortez:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis,
32 Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing original draft. **Mariana M.**
33 **Bertozzi:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology. **Amanda M.**
34 **Dionísio:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology. **Maiara Piva:**

1 Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology. **Nayara R. Morelli**: Data
2 curation, Formal analysis, Investigation, Methodology. **Rubia Casagrande**: Data
3 curation, Formal analysis, Investigation, Funding acquisition. **Waldiceu A. Verri Jr**:
4 Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing
5 – review & editing. **Sergio M. Borghi**: Conceptualization, Data curation, Formal
6 analysis, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision,
7 Validation, Writing – review & editing.

8

9 **Declaration of competing interest**

10

11 The authors declare that they have no competing interests.

12

13 **Data availability**

14

15 The data supporting the conclusions of this article will be made available by the
16 authors, without undue reservation.

17

18 **Acknowledgement**

19

20 This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento
21 Científico e Tecnológico (CNPq; agreements #309633/2021-4, #405027/2021-4, and
22 #427946/2018-2), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
23 Superior (CAPES; finance code 001), Fundação Nacional de Desenvolvimento do
24 Ensino Superior Particular (FUNADESP; #5301159), SETI/Fundação Araucária,
25 MCTI/CNPq and Governo do Estado do Paraná (PRONEX grant agreement 014/2017,
26 protocol 46.843); Fundação Araucária (PBA/PROPPG 13/2021 agreement #276/2022-
27 PBA); and Governo do Estado do Paraná, Conselho Paranaense de Ciência e
28 Tecnologia and SETI (agreement # 4560.19.571.06.6153). RC, WAV received CNPq
29 productivity fellowship. SMB received FUNADESP productivity fellowship.

30

31 **References**

32 Aronson, J.K., La Caze, A., Kelly, M.P., Parkkinen, V.P., Williamson, J., 2018. The use of
33 mechanistic evidence in drug approval. *J Eval Clin Pract* 24, 1166-1176.

- 1 Beba, M., Mohammadi, H., Clark, C.C.T., Djafarian, K., 2022. The effect of curcumin
2 supplementation on delayed-onset muscle soreness, inflammation, muscle strength, and joint
3 flexibility: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled
4 trials. *Phytother Res* 36, 2767-2778.
- 5 Borghi, S.M., Casagrande, R., Verri, W.A., 2023. Hesperidin Methyl Chalcone: An Emerging
6 Compound for the Treatment of Inflammation and Pain. *Curr Med Chem* 30, 601-603.
- 7 Borghi, S.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Fattori, V., Bussmann, A.J., Vignoli, J.A., Camilios-Neto, D.,
8 Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2016. Quercetin Inhibits Peripheral and Spinal Cord
9 Nociceptive Mechanisms to Reduce Intense Acute Swimming-Induced Muscle Pain in Mice.
10 *PLoS One* 11, e0162267.
- 11 Borghi, S.M., Zaninelli, T.H., Saraiva-Santos, T., Bertozzi, M.M., Cardoso, R.D.R., Carvalho,
12 T.T., Ferraz, C.R., Camilios-Neto, D., Cunha, F.Q., Cunha, T.M., Pinho-Ribeiro, F.A.,
13 Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2022. Brief research report: Repurposing pentoxifylline to treat
14 intense acute swimming-induced delayed-onset muscle soreness in mice: Targeting peripheral
15 and spinal cord nociceptive mechanisms. *Front Pharmacol* 13, 950314.
- 16 Borghi, S.M., Zarpelon, A.C., Pinho-Ribeiro, F.A., Cardoso, R.D., Martins-Pinge, M.C.,
17 Tatakahara, R.I., Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., Jr.,
18 2014. Role of TNF-alpha/TNFR1 in intense acute swimming-induced delayed onset muscle
19 soreness in mice. *Physiol Behav* 128, 277-287.
- 20 Boyle, P., Diehm, C., Robertson, C., 2003. Meta-analysis of clinical trials of Cyclo 3 Fort in the
21 treatment of chronic venous insufficiency. *Int Angiol* 22, 250-262.
- 22 Brown, D.C., Iadarola, I.J., 2015. TRPV1 Agonist Cytotoxicity for Chronic Pain Relief: From
23 Mechanistic Understanding to Clinical Application. In: Szallasi, A. (Ed.), *TRP Channels as*
24 *Therapeutic Targets*. Academic Press, pp. 99-118.
- 25 Bussmann, A.J.C., Zaninelli, T.H., Saraiva-Santos, T., Fattori, V., Guazelli, C.F.S., Bertozzi,
26 M.M., Andrade, K.C., Ferraz, C.R., Camilios-Neto, D., Casella, A.M.B., Casagrande, R.,
27 Borghi, S.M., Verri, W.A., Jr., 2022. The Flavonoid Hesperidin Methyl Chalcone Targets
28 Cytokines and Oxidative Stress to Reduce Diclofenac-Induced Acute Renal Injury:
29 Contribution of the Nrf2 Redox-Sensitive Pathway. *Antioxidants (Basel)* 11.
- 30 Bussulo, S.K.D., Ferraz, C.R., Carvalho, T.T., Verri, W.A., Jr., Borghi, S.M., 2021. Redox
31 interactions of immune cells and muscle in the regulation of exercise-induced pain and
32 analgesia: implications on the modulation of muscle nociceptor sensory neurons. *Free Radic*
33 *Res* 55, 757-775.
- 34 Cheung, K., Hume, P., Maxwell, L., 2003. Delayed onset muscle soreness : treatment
35 strategies and performance factors. *Sports Med* 33, 145-164.
- 36 Dupuy, O., Douzi, W., Theurot, D., Bosquet, L., Dugue, B., 2018. An Evidence-Based Approach
37 for Choosing Post-exercise Recovery Techniques to Reduce Markers of Muscle Damage,
38 Soreness, Fatigue, and Inflammation: A Systematic Review With Meta-Analysis. *Front Physiol*
39 9, 403.
- 40 Fang, W., Nasir, Y., 2021. The effect of curcumin supplementation on recovery following
41 exercise-induced muscle damage and delayed-onset muscle soreness: A systematic review
42 and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytother Res* 35, 1768-1781.
- 43 Fattori, V., Pinho-Ribeiro, F.A., Staurengo-Ferrari, L., Borghi, S.M., Rossaneis, A.C.,
44 Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2019. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1
45 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. *Br J Pharmacol* 176, 1728-
46 1744.

- 1 Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., Lang, A.G., 2009. Statistical power analyses using G*Power
2 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* 41, 1149-1160.
- 3 Ferraz, C.R., Carvalho, T.T., Manchope, M.F., Artero, N.A., Rasquel-Oliveira, F.S., Fattori, V.,
4 Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2020. Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and
5 Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical
6 Development. *Molecules* 25.
- 7 Fujii, Y., Ozaki, N., Taguchi, T., Mizumura, K., Furukawa, K., Sugiura, Y., 2008. TRP channels
8 and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and
9 delayed onset muscle soreness. *Pain* 140, 292-304.
- 10 Guazelli, C.F.S., Fattori, V., Ferraz, C.R., Borghi, S.M., Casagrande, R., Baracat, M.M., Verri,
11 W.A., Jr., 2021. Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl chalcone in
12 experimental ulcerative colitis. *Chem Biol Interact* 333, 109315.
- 13 Hamilton, M.T., Hamilton, D.G., Zderic, T.W., 2022. A potent physiological method to magnify
14 and sustain soleus oxidative metabolism improves glucose and lipid regulation. *iScience* 25,
15 104869.
- 16 Hattori, H., Subramanian, K.K., Sakai, J., Jia, Y., Li, Y., Porter, T.F., Loison, F., Sarraj, B.,
17 Kasorn, A., Jo, H., Blanchard, C., Zirkle, D., McDonald, D., Pai, S.Y., Serhan, C.N., Luo, H.R.,
18 2010. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil
19 chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3546-3551.
- 20 Hernandez-Pigeon, H., Garidou, L., Galliano, M.F., Delga, H., Aries, M.F., Duplan, H., Bessou-
21 Touya, S., Castex-Rizzi, N., 2018. Effects of dextran sulfate, 4-t-butylcyclohexanol, pongamia
22 oil and hesperidin methyl chalcone on inflammatory and vascular responses implicated in
23 rosacea. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 11, 421-429.
- 24 Hotfiel, T., Freiwald, J., Hoppe, M.W., Lutter, C., Forst, R., Grim, C., Bloch, W., Huttel, M.,
25 Heiss, R., 2018. Advances in Delayed-Onset Muscle Soreness (DOMS): Part I: Pathogenesis
26 and Diagnostics. *Sportverletz Sportschaden* 32, 243-250.
- 27 Kirkham, P., 2007. Oxidative stress and macrophage function: a failure to resolve the
28 inflammatory response. *Biochem Soc Trans* 35, 284-287.
- 29 Kozai, D., Ogawa, N., Mori, Y., 2014. Redox regulation of transient receptor potential channels.
30 *Antioxid Redox Signal* 21, 971-986.
- 31 Lima, L.V., Abner, T.S.S., Sluka, K.A., 2017. Does exercise increase or decrease pain? Central
32 mechanisms underlying these two phenomena. *J Physiol* 595, 4141-4150.
- 33 Littlewood, C., Mawson, S., May, S., Walters, S., 2015. Understanding the barriers and
34 enablers to implementation of a self-managed exercise intervention: a qualitative study.
35 *Physiotherapy* 101, 279-285.
- 36 Luque, M.Z., Aguiar, A.F., da Silva-Araujo, A.K., Zaninelli, T.H., Heintz, O.K., Saraiva-Santos,
37 T., Bertozzi, M.M., Souza, N.A., Junior, E.O., Verri, W.A., Jr., Borghi, S.M., 2023. Evaluation of
38 a preemptive intervention regimen with hesperidin methyl chalcone in delayed-onset muscle
39 soreness in young adults: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial study.
40 *Eur J Appl Physiol* 123, 1949-1964.
- 41 Maioli, N.A., Zarpelon, A.C., Mizokami, S.S., Calixto-Campos, C., Guazelli, C.F., Hohmann,
42 M.S., Pinho-Ribeiro, F.A., Carvalho, T.T., Manchope, M.F., Ferraz, C.R., Casagrande, R., Verri,
43 W.A., Jr., 2015. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and
44 inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2.
45 *Braz J Med Biol Res* 48, 321-331.

- 1 Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Caviglione, C.V., Pala, D., Baracat, M.M.,
2 Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2016. Topical formulation containing hesperidin
3 methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B
4 irradiation. *Photochem Photobiol Sci* 15, 554-563.
- 5 McLeay, Y., Stannard, S., Houltham, S., Starck, C., 2017. Dietary thiols in exercise: oxidative
6 stress defence, exercise performance, and adaptation. *J Int Soc Sports Nutr* 14, 12.
- 7 Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B., 2014. Reactive oxygen species in
8 inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 20, 1126-1167.
- 9 Mizumura, K., Taguchi, T., 2016. Delayed onset muscle soreness: Involvement of neurotrophic
10 factors. *J Physiol Sci* 66, 43-52.
- 11 Munoz, F.M., Gao, R., Tian, Y., Henstenburg, B.A., Barrett, J.E., Hu, H., 2017. Neuronal P2X7
12 receptor-induced reactive oxygen species production contributes to nociceptive behavior in
13 mice. *Sci Rep* 7, 3539.
- 14 Nahon, R.L., Silva Lopes, J.S., de Magalhães Neto, A.M., Machado, A.S., Cameron, L.C.,
15 2021. Anti-inflammatories for delayed onset muscle soreness: systematic review and meta-
16 analysis. *Rev Bras Med Esporte* 27, 646-654.
- 17 Ota, H., Katanosaka, K., Murase, S., Kashio, M., Tominaga, M., Mizumura, K., 2013. TRPV1
18 and TRPV4 play pivotal roles in delayed onset muscle soreness. *PLoS One* 8, e65751.
- 19 Oxley, R.A., Peart, D.J., 2023. The effect of curcumin supplementation on functional strength
20 outcomes and markers of exercise-induced muscle damage: A systematic review and meta-
21 analysis. *Nutr Health*, 2601060231186439.
- 22 Pinho-Ribeiro, F.A., Hohmann, M.S., Borghi, S.M., Zarpelon, A.C., Guazelli, C.F., Manchope,
23 M.F., Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2015. Protective effects of the flavonoid hesperidin
24 methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines
25 and NF-kappaB. *Chem Biol Interact* 228, 88-99.
- 26 Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms
27 and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88, 1243-1276.
- 28 Rasquel-Oliveira, F.S., Manchope, M.F., Staurengo-Ferrari, L., Ferraz, C.R., Saraiva-Santos,
29 T., Zaninelli, T.H., Fattori, V., Artero, N.A., Badaro-Garcia, S., de Freitas, A., Casagrande, R.,
30 Verri, W.A., Jr., 2020. Hesperidin methyl chalcone interacts with NFkappaB Ser276 and inhibits
31 zymosan-induced joint pain and inflammation, and RAW 264.7 macrophage activation.
32 *Inflammopharmacology* 28, 979-992.
- 33 Ratkevicius, A., Mizuno, M., Povilonis, E., Quistorff, B., 1998. Energy metabolism of the
34 gastrocnemius and soleus muscles during isometric voluntary and electrically induced
35 contractions in man. *J Physiol* 507 (Pt 2), 593-602.
- 36 Retamoso, L.T., Silveira, M.E.J., Lima, F.D., Busanello, G.L., Bresciani, G., Ribeiro, L.R.,
37 Chagas, P.M., Nogueira, C.W., Braga, A.C., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Figuera, M.R., Royes,
38 L.F., 2016. Increased xanthine oxidase-related ROS production and TRPV1 synthesis
39 preceding DOMS post-eccentric exercise in rats. *Life Sci* 152, 52-59.
- 40 Ruiz-Miyazawa, K.W., Pinho-Ribeiro, F.A., Borghi, S.M., Staurengo-Ferrari, L., Fattori, V.,
41 Amaral, F.A., Teixeira, M.M., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Casagrande, R.,
42 Verri, W.A., Jr., 2018. Hesperidin Methylchalcone Suppresses Experimental Gout Arthritis in
43 Mice by Inhibiting NF-kappaB Activation. *J Agric Food Chem* 66, 6269-6280.
- 44 Schoenfeld, B.J., 2012. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for exercise-induced
45 muscle damage: implications for skeletal muscle development. *Sports Med* 42, 1017-1028.

- 1 Segato-Vendrameto, C.Z., Zanluca, C., Zucoloto, A.Z., Zaninelli, T.H., Bertozzi, M.M., Saraiva-
2 Santos, T., Ferraz, C.R., Staurengo-Ferrari, L., Badaro-Garcia, S., Manchope, M.F., Dionisio,
3 A.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Borghi, S.M., Mosimann, A.L.P., Casagrande, R., Bordignon, J.,
4 Fattori, V., Santos, C., Verri, W.A., 2023. Chikungunya Virus and Its Envelope Protein E2
5 Induce Hyperalgesia in Mice: Inhibition by Anti-E2 Monoclonal Antibodies and by Targeting
6 TRPV1. *Cells* 12.
- 7 Stanford, K.R., Hadley, S.H., Barannikov, I., Ajmo, J.M., Bahia, P.K., Taylor-Clark, T.E., 2019.
8 Antimycin A-induced mitochondrial dysfunction activates vagal sensory neurons via ROS-
9 dependent activation of TRPA1 and ROS-independent activation of TRPV1. *Brain Res* 1715,
10 94-105.
- 11 Wang, X.L., Cui, L.W., Liu, Z., Gao, Y.M., Wang, S., Li, H., Liu, H.X., Yu, L.J., 2019. Effects of
12 TRPA1 activation and inhibition on TRPA1 and CGRP expression in dorsal root ganglion
13 neurons. *Neural Regen Res* 14, 140-148.
- 14 Wang, Z.Q., Porreca, F., Cuzzocrea, S., Galen, K., Lightfoot, R., Masini, E., Muscoli, C.,
15 Mollace, V., Ndengele, M., Ischiropoulos, H., Salvemini, D., 2004. A newly identified role for
16 superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 869-878.
- 17

1 **5 CONCLUSÃO**

2 Em resumo, o presente estudo mostrou que o pré-tratamento com HMC reduz a atividade dos
3 neurônios nociceptores musculares e conseqüentemente, a hiperalgesia mecânica muscular
4 em camundongos com DMIT, regulando o desequilíbrio oxidativo e o recrutamento de
5 leucócitos no tecido muscular após sessão de natação aguda intensa. O mecanismo
6 subjacente pode envolver a inibição de produção de EROs e do dano celular (peroxidação
7 lipídica), bem como a promoção da capacidade antioxidante, que por sua vez resulta na
8 redução da atividade das células inflamatórias. A capacidade da HMC de atuar em diferentes
9 alvos, nas repercussões fisiológicas da DMIT, pode representar uma estratégia atraente para
10 o tratamento da DMIT, destacando este flavonoide da classe das chalconas como um
11 potencial candidato para este fim.

REFERÊNCIAS

- 1
2
- 3 ALVES, R.; COSTA, L.; SAMULSKI, D. Monitoring and prevention of overtraining in athletes. **Revista**
4 **Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 5, p. 129-138, 2006.
- 5 ARTERO, Nayara A. et al. Hesperidin Methyl Chalcone Reduces the Arthritis Caused by TiO₂ in Mice:
6 Targeting Inflammation, Oxidative Stress, Cytokine Production, and Nociceptor Sensory Neuron
7 Activation. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 872, 2023.
- 8 BARCELOS, Rômulo Pillon et al. Diclofenac Administration after Physical Training Blunts Adaptations
9 of Peripheral Systems and Leads to Losses in Exercise Performance: In Vivo and In Silico
10 Analyses. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1246, 2021.
- 11 BERTOZZI, Mariana M. et al. Ehrlich Tumor Induces TRPV1-Dependent Evoked and Non-Evoked Pain-
12 like Behavior in Mice. **Brain Sciences**, v. 12, n. 9, p. 1247, 2022.
- 13 BORGHI, Sergio M. et al. Targeting interleukin-1 β reduces intense acute swimming-induced muscle
14 mechanical hyperalgesia in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 7, p. 1009-1020,
15 2014b.
- 16 BORGHI, Sergio M. et al. Quercetin inhibits peripheral and spinal cord nociceptive mechanisms to
17 reduce intense acute swimming-induced muscle pain in mice. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162267, 2016.
- 18 BORGHI, Sergio M. et al. Role of TNF- α /TNFR1 in intense acute swimming-induced delayed onset
19 muscle soreness in mice. **Physiology & Behavior**, v. 128, p. 277-287, 2014a.
- 20 BORGHI, Sergio M. et al. Intense acute swimming induces delayed-onset muscle soreness dependent
21 on spinal cord neuroinflammation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 734091, 2022.
- 22 BORGHI, Sergio M. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits mouse acute kidney injury induced by
23 diclofenac by targeting oxidative damage, cytokines and NF- κ B activity. **Life Sciences**, v. 208, p. 221-
24 231, 2018.
- 25 BORGHI, Sergio M.; CASAGRANDE, Rubia; VERRI, Waldiceu Aparecido. Hesperidin Methyl Chalcone:
26 An Emerging Compound for the Treatment of Inflammation and Pain. **Current Medicinal Chemistry**,
27 v. 30, n. 5, p. 601-603, 2023.
- 28 BORGHI, Sergio Marques; LUQUE, Mônica Zanon. Desvendando novos horizontes para o tratamento
29 da dor muscular de início tardio: chalconas como estratégia para a prática do exercício físico visando a
30 promoção da saúde. **Editores CRV**, 2022.

- 1 BUSSMANN, Allan JC et al. The Flavonoid Hesperidin Methyl Chalcone Targets Cytokines
2 and Oxidative Stress to Reduce Diclofenac-Induced Acute Renal Injury: Contribution of the
3 Nrf2 Redox-Sensitive Pathway. **Antioxidants**, v. 11, n. 7, p. 1261, 2022.
- 4 BUSSULO, Sylvia KD et al. Redox interactions of immune cells and muscle in the regulation
5 of exercise-induced pain and analgesia: implications on the modulation of muscle nociceptor
6 sensory neurons. **Free Radical Research**, v. 55, n. 6, p. 645-663, 2021.
- 7 CAREY, Conor C.; LUCEY, Alice; DOYLE, Lorna. Flavonoid containing polyphenol
8 consumption and recovery from exercise-induced muscle damage: a systematic review and
9 meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 51, p. 1293-1316, 2021.
- 10 CAMARGOS, Mirela Castro Santos; GONZAGA, Marcos Roberto. Viver mais e melhor?
11 Estimativas de expectativa de vida saudável para a população brasileira. **Cadernos de Saúde**
12 **Pública**, v. 31, p. 1460-1472, 2015.
- 13 CAMPOLINA, Alessandro Gonçalves et al. La transición de la salud y los cambios en la
14 expectativa de vida saludable de la población anciana: posibles impactos de la prevención de
15 enfermedades crónicas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, p. 1217-1229, 2013.
- 16 CHEN, Wei-Wei; ZHANG, Xia; HUANG, Wen-Juan. Role of physical exercise in Alzheimer's
17 disease. **Biomedical Reports**, v. 4, n. 4, p. 403-407, 2016.
- 18 CHEUNG, Karoline; HUME, Patria A.; MAXWELL, Linda. Delayed onset muscle
19 soreness. **Sports Medicine**, v. 33, n. 2, p. 145-164, 2003.
- 20 CONNOLLY, Declan AJ; SAYERS, Stephen E.; MCHUGH, Malachy P. Treatment and
21 prevention of delayed onset muscle soreness. **The Journal of Strength & Conditioning**
22 **Research**, v. 17, n. 1, p. 197-208, 2003.
- 23 CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian**
24 **Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 401-407, 2004.
- 25 DUPUY, Olivier et al. An evidence-based approach for choosing post-exercise recovery
26 techniques to reduce markers of muscle damage, soreness, fatigue, and inflammation: a
27 systematic review with meta-analysis. **Frontiers in Physiology**, p. 403, 2018.
- 28 FATHIAZAD, Fatemeh; AFSHAR, Jalil. An investigation on methylation methods of
29 hesperidin. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 67-70, 2004.

- 1 FATTORI, Victor et al. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces
2 inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. **British Journal of Pharmacology**, v.
3 176, n. 11, p. 1728-1744, 2019.
- 4 FERRAZ, Camila R. et al. Therapeutic potential of flavonoids in pain and inflammation:
5 mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical
6 development. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 762, 2020.
- 7 FERRUCCI, Luigi; FABBRI, Elisa. Inflammageing: chronic inflammation in ageing,
8 cardiovascular disease, and frailty. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 9, p. 505-522, 2018.
- 9 GREGORY, Nicholas S.; WHITLEY, Phillip E.; SLUKA, Kathleen A. Effect of intramuscular
10 protons, lactate, and ATP on muscle hyperalgesia in rats. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138576,
11 2015.
- 12 GUAZELLI, Carla FS et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl
13 chalcone in experimental ulcerative colitis. **ChemicoBiological Interactions**, v. 333, p.
14 109315, 2021.
- 15 GUERRERO, Ana TG et al. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a
16 novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacology**
17 **Biochemistry and Behavior**, v. 84, n. 2, p. 244-251, 2006.
- 18 HOTFIEL, Thilo et al. Advances in delayed-onset muscle soreness (DOMS): Part I:
19 Pathogenesis and diagnostics. **Sportverletzung· Sportschaden**, v. 32, n. 04, p. 243-250,
20 2018.
- 21 HUME, Patria A. et al. DOMS: An overview of treatment strategies. **International SportMed**
22 **Journal**, v. 5, n. 2, p. 98-118, 2004.
- 23 KONTIS, Vasilis et al. Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a
24 Bayesian model ensemble. **The Lancet**, v. 389, n. 10076, p. 1323-1335, 2017.
- 25 KREHER, Jeffrey B.; SCHWARTZ, Jennifer B. Overtraining syndrome: a practical
26 guide. **Sports Health**, v. 4, n. 2, p. 128-138, 2012.
- 27 LEWIS, Paul B.; RUBY, Deana; BUSH-JOSEPH, Charles A. Muscle soreness and delayed-
28 onset muscle soreness. **Clinics in Sports Medicine**, v. 31, n. 2, p. 255-262, 2012.
- 29 LIMA, Lucas V.; ABNER, Thiago SS; SLUKA, Kathleen A. Does exercise increase or decrease

- 1 pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. **The Journal of Physiology**, v.
2 595, n. 13, p. 4141-4150, 2017.
- 3 LUQUE, Mônica Z. et al. Evaluation of a preemptive intervention regimen with hesperidin
4 methyl chalcone in delayed-onset muscle soreness in young adults: a randomized, double-
5 blinded, and placebo-controlled trial study. **European Journal of Applied Physiology**, p. 1-
6 16, 2023.
- 7 MARTINEZ, Renata M. et al. Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and
8 inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage. **Journal of**
9 **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 145-153, 2015.
- 10 MARTINEZ, Renata M. et al. Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone
11 inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B
12 irradiation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, p. 554-563, 2016.
- 13 MATHERS, Colin D. et al. Causes of international increases in older age life expectancy. **The**
14 **Lancet**, v. 385, n. 9967, p. 540-548, 2015.
- 15 MUNEHIRO, Teppei et al. Establishment of an animal model for delayed-onset muscle
16 soreness after high-intensity eccentric exercise and its application for investigating the efficacy
17 of low-load eccentric training. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 17, p. 244-252, 2012.
- 18 NAHON, Roberto Lohn et al. ANTI-INFLAMMATORIES FOR DELAYED ONSET MUSCLE
19 SORENESS: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. **Revista Brasileira de**
20 **Medicina do Esporte**, v. 27, p. 646-654, 2021.
- 21 PEDERSEN, Bente Klarlund; SALTIN, Bengt. Exercise as medicine—evidence for prescribing
22 exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scandinavian Journal of Medicine &**
23 **Science in Sports**, v. 25, p. 1-72, 2015.
- 24 PINHO-RIBEIRO, Felipe A. et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone
25 in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF-
26 κB. **Chemico-Biological Interactions**, v. 228, p. 88-99, 2015.
- 27 RASQUEL-OLIVEIRA, Fernanda S. et al. Hesperidin methyl chalcone interacts with NFκB
28 Ser276 and inhibits zymosan-induced joint pain and inflammation, and RAW 264.7
29 macrophage activation. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 4, p. 979-992, 2020.

- 1 RICE, David et al. Exercise-induced hypoalgesia in pain-free and chronic pain populations:
2 state of the art and future directions. **The Journal of Pain**, v. 20, n. 11, p. 1249-1266, 2019.
- 3 ROTH, Sanford H.; FULLER, Philip. Diclofenac topical solution compared with oral diclofenac:
4 a pooled safety analysis. **Journal of Pain Research**, v. 4, p. 159-167, 2011.
- 5 RUIZ-MIYAZAWA, Kenji W. et al. Hesperidin methylchalcone suppresses experimental gout
6 arthritis in mice by inhibiting NF- κ B activation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,
7 v. 66, n. 25, p. 6269-6280, 2018.
- 8 SINGLA, Neil et al. Delayed-onset muscle soreness: a pilot study to assess analgesic study
9 design features. **Pain**, v. 156, n. 6, p. 1036, 2015.
- 10 TANSKANEN, Minna; ATALAY, Mustafa; UUSITALO, Arja. Altered oxidative stress in
11 overtrained athletes. **Journal of Sports Sciences**, v. 28, n. 3, p. 309-317, 2010.
- 12 URAKAWA, Susumu et al. Manual therapy ameliorates delayed-onset muscle soreness and
13 alters muscle metabolites in rats. **Physiological Reports**, v. 3, n. 2, p. e12279, 2015.
- 14 VINA, Jose et al. Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. **British**
15 **Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 1, p. 1-12, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Comissão de ética no uso de animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 085/2022

Londrina, 18 de outubro de 2022.

Prezado(a) professor(a),

Certificamos que o projeto intitulado: “**Avaliação dos potenciais efeitos terapêuticos de flavonoides em modelo de dor muscular de início tardio (DMIT)**” protocolo CEUA n° 037.2022 sob a responsabilidade de **Waldiceu Aparecido Verri Junior** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia **17/10/2022**.


Este projeto tem por objetivo investigar avaliar os potenciais terapêuticos da hesperidina metil chalcona em modelo de dor induzida pelo exercício agudo (muscular de início tardio) em camundongos. **Grau de invasividade: G12.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/12/2022 a 30/11/2024
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogênico – Swiss
N° de animais	264
Peso/ Idade	20 a 30 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina.
Amostras a serem coletadas	Músculo sóleo, músculo gastrocnêmio e medula espinal

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,


Profª Drª Patrícia Chimin Perandini
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a) Waldiceu Aparecido Verri Junior

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Patológicas /CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas /CCB

C/C para o Biotério Central/ CCB

C/C para o Biotério do Centro de Ciências da Saúde/ CCS