

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JÁDINA SANTOS VIEIRA DOMINGUES

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DOS TERMINAIS AFERENTES
PRIMÁRIOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ACUPUNTURA NA DOR
INFLAMATÓRIA AGUDA E NEUROPÁTICA**

Alfenas/MG
2016

JÁDINA SANTOS VIEIRA DOMINGUES

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DOS TERMINAIS AFERENTES
PRIMÁRIOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ACUPUNTURA NA DOR
INFLAMATÓRIA AGUDA E NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL- MG. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Josie Resende Torres da Silva

Alfenas/MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Domingues, Jádina Santos Vieira

Participação dos receptores dos terminais aferentes primários no efeito antinociceptivo da acupuntura na dor inflamatória aguda e neuropática / Jádina Santos Vieira Domingues. -- Alfenas/MG, 2016. 82 f.

Orientadora: Josie Resende Torres da Silva.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. Acupuntura. 2. Hiperalgisia. 3. Mediadores da Inflamação. I.
Silva, Josie Resende Torres da. II. Título.

CDD-615.892

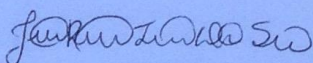
JÁDINA SANTOS VIEIRA DOMINGUES

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DOS TERMINAIS AFERENTES
PRIMÁRIOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ACUPUNTURA NA DOR
INFLAMATÓRIA AGUDA E NEUROPÁTICA**

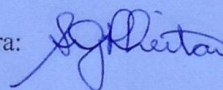
A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovada em 21 de Junho de 2016

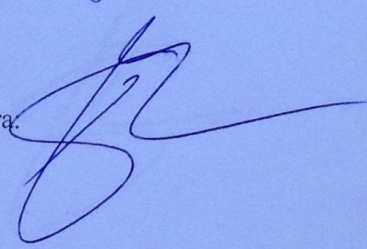
Prof.^o: Dr^a Josie Resende Torres da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof.^o: Dr^a Sílvia Graciela Ruginsk Leitão
Instituição: Universidade Federal de Alfenas^{sc}

Assinatura: 

Prof.^o: Dr. João Eduardo de Araújo
Instituição: FMRP-USP

Assinatura: 

Dedico às pessoas mais importantes da minha vida: Deus, meus pais, minha irmã e meu marido.

AGRADECIMENTOS

De todo o meu coração, agradeço a Deus por ter me sustentado e ajudado até aqui. Pela força, alegria e amor sem fim, por bênçãos sem medida que eu nem sei contar, sendo minha companhia em todo o tempo, todos os dias.

Aos meus queridos e amados pais, Beatriz e Vander que me ajudaram de todas as formas possíveis, me ampararam, deram apoio, sabedoria, força e paz e ainda o fazem, sendo grandes exemplos a serem seguidos com atitudes de honestidade, lealdade, fidelidade, empenho, dedicação e educação, por acreditarem em mim, mesmo quando eu me sentia fraca e desmotivada, e pelo amor sem fim que eles demonstram e tem por mim.

À minha irmã Laila por ter nascido comigo e desde então ser minha melhor amiga, parceira, pessoa inteligente, calma, paciente; por me ensinar que é trabalhando duro e caminhando juntas que obtemos sucesso, por podermos compartilhar momentos de desespero e logo vermos a mão de Deus nos dando descanso e refrigério, pela alegria sem fim que sentimos quando estamos juntas.

Ao meu marido Paulo Henrique Domingues pelo amor, compreensão e carinho, por sonhar e vibrar comigo de emoção a cada conquista, por sofrer comigo todos os momentos de angústia, por trazer alegria e risadas tornando os dias mais leves e alegres, por me fazer crescer como profissional, mulher e esposa.

A minha orientadora professora Dr^a Josie Resende Torres da Silva por me ajudar a construir minha história, confiar seu trabalho a mim, ensinar o valor da pesquisa e ensino, por proporcionar grandes momentos de aprendizado contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional, por me mostrar como fazemos as coisas com empenho e força de vontade, por ensinar que somos mais fortes que pensamos e que depois da tempestade sempre vem o sol. Por fazer enxergar que o melhor caminho não é o mais fácil e que confiança e cuidado são palavras importantes. Pelo incentivo de perceber que prática, perseverança e treino são o ponto chave para chegarmos mais longe, e positividade e fé em Deus são o que nos move. Agradeço imensamente por ter aberto as portas do laboratório para que eu pudesse realizar os experimentos, por compartilhar um pouco da grande linha de pesquisa e por dividir (multiplicar) os conhecimentos sobre diversas áreas importantes, acrescentando muitas conexões neuronais!
(rs)

Ao professor Dr Marcelo Lourenço da Silva pelo apoio, ensinamentos sobre farmacologia juntamente com a Prof^a Josie, conserto de equipamentos, aprendizado de novas

técnicas, pela praticidade, paciência, motivação, seriedade, e inúmeras oportunidades de agregar conhecimento, pelas contribuições científicas no trabalho, desde o tempo gasto para leitura, até às sugestões acatadas de mudanças teóricas e práticas, à disponibilidade e maneira de fazer fluir a pesquisa. Obrigada.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa que aceitaram o convite colaborando para a finalização do trabalho.

Aos professores Alexandre Giusti Paiva e Fabiana Cardoso Vilela Giusti em consentir que eu acompanhasse os procedimentos realizados em diversos experimentos no laboratório de fisiologia, aos pós-graduandos do mesmo que me ensinaram a cada momento e permitiram que construíssemos uma amizade inabalável e concreta, pela paciência, por ensinar técnicas e pela utilização de equipamentos, pela instrução sobre gráficos, planilhas, papers, por me agregar ao 'lab' fazendo com que eu me sentisse 'em casa'. Agradeço aos amigos sempre presentes: Luciana (Lu), Silvinha, Tati, Ana Cláudia, Ana Laura, Wesley, Mel, Lidiane, Vanessa Veronezi (que me auxiliou muito, sobretudo na formatação do trabalho), e especialmente à Mara e Layla que, além de serem meus grandes exemplos científicos, me mostraram o real valor de uma amizade, ajudando sem receios, ensinando profissionalmente e pessoalmente, me auxiliando a levantar depois de vários 'tombos', abrindo meus olhos para diversas situações, contribuindo inteiramente com a pesquisa com opiniões construtivas e muito válidas, com experiências científicas e extensão de conhecimento. Agradeço a todos os momentos que passamos, às inúmeras dúvidas, aos choros consolados, às longas conversas, aos ombros doados umas às outras, à nos fazerem acreditar em nós mesmos, às vitórias conquistadas, a cada teste que deu certo e as vibrações ao final do dia. Sem vocês eu não conseguiria ter chegado até aqui. Vocês fizeram a pós graduação valer a pena, contribuindo muito para minha formação. Vamos levar isso conosco sempre. Não esquecendo dos cafés nos intervalos experimentais, das comidas gostosas e dos encontros consecutivos das 'top's do lab'! Obrigada.

Aos pós graduandos e colegas da pós e do Labfex.

Aos graduandos que tornaram esses anos muito alegres, agradáveis e especiais, permitindo que iniciássemos uma amizade duradoura, compartilhando experimentos e lições de vida: Talita e Fábio Cabral, a minha querida IC (aluna de iniciação científica) Jéssica Toreti que se disponibilizou com empenho e dedicação à me ajudar nos experimentos, às caronas dadas, aos encontros para distrairmos, à amizade e carinho.

Aos técnicos e auxiliares, Dona Zélia, Lu, Luíz Thomaz, Dona Lena (por todas as tardes vazias que passamos juntos sendo a companhia uns dos outros, pelos cálculos matemáticos e farmacológicos de diluição de substâncias, pelos cafezinhos quentinhos e gostosos, pela ajuda

em geral de avisos, manipulações de animais, por compartilhar e resolver dúvidas, pela amizade) e por todo carinho e cuidado com os animais e com o laboratório.

À secretária, Maria Antonieta Nogueira, que sempre com muito carinho, zelo e um sorriso no rosto, resolveu todos os problemas e esclareceu todas as dúvidas.

Aos animaizinhos roedores criados sabiamente por Deus, que nos permitem estudar de forma ética e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À UNIFAL, CAPES E FAPEMIG, pelo apoio financeiro ao longo destes 2 anos.

A todos que de uma forma ou outra participaram para que o trabalho fosse concluído, meu muito obrigada!

*“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida
e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la.”*

CURY A., 2010

RESUMO

A dor caracteriza-se por uma resposta resultante da integração central de impulsos nervosos periféricos, ativados por estímulos locais. A nocicepção é a transdução de estímulos mecânicos, térmicos e químicos em impulsos elétricos por meio de nociceptores. Sua estimulação faz com que as informações sejam conduzidas através de fibras aferentes primárias, C e A- δ , que detectam estímulos nocivos e expressam o receptor TRPV1. Como tratamento da dor, a acupuntura é um método eficaz que traz benefícios terapêuticos como a analgesia. Para isso, o presente trabalho tem o objetivo de investigar o papel dos diferentes receptores das fibras aferentes nociceptivas A- δ e C, na condução dos estímulos produzidos pela acupuntura no controle do processo da hiperalgesia inflamatória aguda e neuropática, mediante ação de histamina, bradicinina, substância P, glutamato, serotonina e acetilcolina. Camundongos foram avaliados pelo teste de vonFrey digital. Após indução da hiperalgesia inflamatória por administração de CFA i.pl ou hiperalgesia neuropática (CCI- Constrição Crônica do nervo isquiático), foi administrado 20 μ L de glutamato ou histamina ou bradicinina ou serotonina ou substância P ou acetilcolina na pata direita traseira no acuponto E36. Após a aplicação de CFA i.pl, a dose 0,03 μ g foi eficaz para ACh. Para bradicinina e histamina, a dose de 30 μ g obteve efeito. Para o glutamato e serotonina, 3 μ g, 0,3 μ g e 0,03 μ g foram eficazes e para a substância P, 0,03 μ g foi eficaz. Após a CCI 0,3 μ g e 3 μ g de acetilcolina alteraram o efeito hiperalgésico, e para o glutamato, bradicinina, histamina, serotonina e substância P, todas as doses foram eficazes de acordo com seus respectivos tempos. De acordo com os resultados obtidos, sustenta-se a hipótese que esses mediadores estão envolvidos no efeito da acupuntura manual nos modelos de dor inflamatória e neuropática.

Palavras-chave: Acupuntura. Hiperalgesia. Mediadores da inflamação

ABSTRACT

Pain is characterized by a resultant response from the central integration of peripheral nerve impulses triggered by local stimuli. The nociception is the transduction of mechanical thermal and chemical stimuli into electrical impulses via nociceptors. Such impulses are conducted through primary afferents, C- δ and A, which detect noxious stimuli and express the TRPV1 receptor. Acupuncture is an effective pain treatment that brings therapeutic benefits as analgesia. Because of this, the present study aims to investigate the role of different receptors of nociceptive afferent A- δ and C fibers, in the conduction of stimuli produced by acupuncture in control of the process of acute and neuropathic inflammatory hyperalgesia by action of histamine, bradykinin, substance P, glutamate, serotonin, and acetylcholine. Mice were evaluated by digital vonFrey test. After induction of inflammatory hyperalgesia by i.pl CFA administration or neuropathic hyperalgesia (CCI Chronic Constriction of the sciatic nerve), it was administered 20 μ L of either glutamate or histamine or bradykinin or serotonin or substance P or acetylcholine in the right hind leg at acupoint E36. After application of the CFA i.pl, the dose of 0,03 μ g dose was effective to ACh. For bradykinin and histamine, the dose of 30 μ g was obtained. For serotonin and glutamate, 3 μ g, 0,3 μ g and 0,03 μ g were effective and substance P, 0,03 μ g was effective. After the CCI 0,3 μ g and 3 μ g acetylcholine altered the hyperalgesic effect, and glutamate, bradykinin, histamine, serotonin and substance P. In addition, all doses were effective in accordance with their respective times. The results supports the hypothesis that these mediators are involved in the effect of acupuncture in manual models of inflammatory and neuropathic pain.

Keywords: Acupuncture. Hyperalgesia. Inflammation mediators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Acetilcolina nas doses de 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g no acuponto (E36) após administração intraplantar de CFA..... 42
- Figura 2 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Bradicininina nas doses 0,03 μ g, 0,3 μ g, 3,0 μ g e 30 μ g no acuponto (E36) após administração intraplantar de CFA..... 43
- Figura 3 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Glutamato nas doses 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g no acuponto (E36) após administração intraplantar de CFA..... 44
- Figura 4 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Serotonina nas doses 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g no acuponto (E36) após administração intraplantar de CFA..... 45
- Figura 5 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Histamina nas doses 0,03 μ g, 0,3 μ g 3,0 μ g e 30 μ g no acuponto (E36) após administração intraplantar de CFA..... 46
- Figura 6 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Substância P 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3 μ g no acuponto (E36) após administração intraplantar de CFA..... 47
- Figura 7 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Ach nas doses 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g no acuponto (E36) após CCI..... 48
- Figura 8 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Glutamato nas doses 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g

	no acuponto (E36) após CCI.....	49
Figura 9 -	Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Bradicinina 0,03µg, 0,3µg e 3,0µg no acuponto (E36) após CCI.....	50
Figura 10 -	Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Histamina nas doses 0,03µg, 0,3µg e 3,0µg no acuponto (E36) após CCI.....	51
Figura 11 -	Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Serotonina nas doses 0,03µg, 0,3µg e 3,0µg no acuponto (E36) após CCI.....	53
Figura 12 -	Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Substância P nas doses 0,03µg, 0,3µg e 3,0µg no acuponto (E36) após CCI.....	54
Figura 13 -	Avaliação da expressão do receptor de canal iônico TRPV1 nos gânglios da raiz dorsal de camundongos com hiperalgesia inflamatória induzida por CFA, tratados com salina, acupuntura manual, acetilcolina 30µg, histamina 30µg, bradicinina 30µg, serotonina 3µg, glutamato 3µg e substância P 3µg, coletados em tempos específicos: T0, T1, T6 e T24.....	55
Figura 14 -	Representação gráfica da avaliação por <i>Western Blotting</i> na relação TRPV1/β-actina diante da indução da hiperalgesia por CFA e tratamento com salina, acupuntura manual, acetilcolina 30µg, histamina 30µg, bradicinina 30µg, serotonina 3µg, glutamato 3µg e substância P 3µg, em tempos específicos.....	55
Figura 15 -	Avaliação da expressão do receptor de canal iônico TRPV1 nos gânglios da raiz dorsal de camundongos com hiperalgesia neuropática induzida por CCI, tratados com salina, acupuntura manual, acetilcolina 3µg, histamina 3µg, bradicinina 3µg, serotonina 3µg, glutamato 3µg e substância P 3µg, coletados em tempos específicos: T0, T1, T6 e T24.....	57
Figura 16 -	Representação gráfica da avaliação por <i>Western Blotting</i> na relação TRPV1/β-actina diante da indução da hiperalgesia por CFA e tratamento com salina, acupuntura manual, acetilcolina	

30µg, histamina 30µg, bradicinina 30µg, serotonina 3µg,
glutamato 3µg e substância P 3µg, em tempos específicos..... 57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Descrição da linha do tempo dos grupos experimentais por CFA.....	38
Quadro 2 – Descrição da linha do tempo dos grupos experimentais por CCI.....	38
Tabela 1 – Descrição dos grupos experimentais.....	35
Tabela 2 – Porcentagem de aumento do limiar em relação ao BL2 para acupuntura e demais mediadores na melhor dose em todos os tempos avaliados.....	47
Tabela 3 - Porcentagem de aumento do limiar em relação ao BL2 para acupuntura e demais mediadores na melhor dose em todos os tempos avaliados.....	55

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

5HT1	-	5-hidroxitriptamina
a.C	-	Antes de Cristo
ACh	-	Acetilcolina
ATP	-	Trifosfato de adenosina
B1	-	Receptor de Bradicininina tipo 1
CCI	-	Constricção Crônica do nervo Isquiático
CEUA	-	Comissão de Ética em Uso Animal
CFA	-	Complete Freund's Adjuvant (Adjuvante Completo de Freund)
CGRP	-	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
E36	-	Estômago 36
EPM	-	Erro Padrão da Média
EUA	-	Estados Unidos da América
G	-	Gramas
GRD	-	Gânglio da Raiz Dorsal
H	-	Horas
H1	-	Receptor de Histamina do tipo 1
Hz	-	Hertz
IASP	-	International Association for the Study of Pain
IgG	-	Imunoglobulina G
IL-1β	-	Interleucina 1 beta
IL-6	-	Interleucina 6
L4	-	4 ^a Vértebra Lombar
L6	-	6 ^a Vértebra Lombar
μg	-	Micrograma
μL	-	Microlitro
μg/μL	-	Micrograma por Microlitro
μm	-	Micrômetro
m/s	-	Metros por segundo
M2	-	Receptor de Acetilcolina Muscarínico do tipo 2
mg/kg	-	Miligrama por kilograma

Min	-	Minutos
Mm	-	Milímetro
mm²	-	Milímetro quadrado
mmol/L	-	Milimol por litro
N	-	Número de amostras
NF200	-	Neurofilamento 200
NGF	-	Nerve Grow Factor
NK1	-	Neuroquininas
p/v	-	Peso por volume
PBS	-	Phosphate Buffered Saline
PGE₂	-	Prostaglandina
pH	-	Potencial Hidrogeniônico
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SP	-	Substância P
SPSS	-	Statistical Package for the Social Sciences
T	-	Tempo
TNFα	-	Fator de Necrose Tumoral
TrKA	-	Tirosina Kinase
TRPV1	-	Receptor Transitório de Potencial Vanilóide tipo 1
TTX	-	Tetrotoxina
UMA	-	Unidade Neural de Acupuntura
UNIFAL	-	Universidade Federal de Alfenas

LISTA DE SÍMBOLOS

°C -	Graus Celsius
= -	Igual
+ -	Mais
± -	Mais ou menos
< -	Menor
/ -	Por
% -	Porcentagem
Δ -	Delta
B -	Beta
: -	Para
Δ -	Delta
I -	Um (Algarismo Romano)
II -	Dois (Algarismo Romano)
V -	Cinco (Algarismo Romano)
X -	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	DOR.....	21
2.2	HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA AGUDA.....	24
2.3	HIPERALGESIA NEUROPÁTICA.....	26
2.4	ACUPUNTURA.....	29
3	JUSTIFICATIVA.....	31
4	OBJETIVOS.....	32
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1	ANIMAIS.....	33
5.2	AMOSTRA.....	33
5.2.2	Drogas e Diluentes.....	34
5.3	TESTES DE NOCICEPÇÃO MECÂNICA - PRESSÃO CRESCENTE NA PATA (VON FREY ELETRÔNICO).....	35
5.4	ACUPUNTURA.....	35
5.5	INDUÇÃO DA HIPERNOCICEPÇÃO AGUDA POR CFA.....	36
5.6	MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO NEUROPÁTICA PERIFÉRICA (CCD).....	37
5.7	CRONOGRAMA EXPERIMENTAL.....	38
5.7.1	Hiperalgisia Inflamatória Aguda.....	38
5.7.2	Hiperalgisia Neuropática.....	38
5.8	<i>WESTERN BLOTTING</i>	39
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
7	RESULTADOS.....	41
7.1	RESULTADOS NA DOR INFLAMATÓRIA AGUDA.....	41
7.1.1	Efeitos da administração de acetilcolina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA.....	41

7.1.2	Efeitos da administração de Bradicinina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA.....	42
7.1.3	Efeitos da administração de Glutamato no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA.....	43
7.1.4	Efeitos da administração de Serotonina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA.....	44
7.1.5	Efeitos da administração de Histamina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA.....	45
7.1.6	Efeitos da administração de Substância P 0,03µg no acuponto e36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA.....	46
7.2	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ACETILCOLINA, BRADICININA, GLUTAMATO, SEROTONINA, HISTAMINA E SUBSTÂNCIA P NA DOR NEUROPÁTICA.....	48
7.2.1	Efeitos da administração de Acetilcolina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI.....	48
7.2.2	Efeitos da administração de Glutamato no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI.....	49
7.2.3	Efeitos da administração de Bradicinina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI.....	50
7.2.4	Efeitos da administração de Histamina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI.....	51
7.2.5	Efeitos da administração de Serotonina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI.....	52
7.2.6	Efeitos da administração de Substância P no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI.....	53
7.3	RESULTADOS MOLECULARES SOBRE A ADMINISTRAÇÃO DE ACETILCOLINA, BRADICININA, HISTAMINA, SEROTONINA, SUBSTÂNCIA P E GLUTAMATO NA DOR INFLAMATÓRIA AGUDA.....	54
7.4	RESULTADOS MOLECULARES SOBRE A ADMINISTRAÇÃO DE ACETILCOLINA, BRADICININA, HISTAMINA, SEROTONINA, SUBSTÂNCIA P E GLUTAMATO NA DOR INFLAMATÓRIA AGUDA.....	57
8	DISCUSSÃO.....	60
9	CONCLUSÃO.....	68

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 69

1 INTRODUÇÃO

Grande parte da população já experimentou a experiência sensorial dolorosa. Essa experiência consiste em um mecanismo de proteção natural, participando do controle homeostático, possibilitando a detecção de estímulos químicos, físicos e mecânicos que podem ser nocivos ao organismo (BASBAUM et al., 2009).

O processo doloroso pode ser dividido de acordo com sua cronologia em dor aguda e crônica, referindo-se ao período em que estão presentes no corpo, constituindo um fenômeno bastante heterogêneo em relação ao tecido afetado. Esse fenômeno é interpretado por nociceptores, que são terminações nervosas livres, altamente especializados em conduzir a informação dolorosa até a medula espinal e ao córtex cerebral. Essa condução é realizada por meio de fibras aferentes primárias, denominadas fibras A- δ e C, sendo caracterizadas por seu diâmetro, presença de mielina e velocidade de condução, mais rápida e mais lenta, respectivamente (GREGORY et al., 2013; BASBAUM et al., 2009).

A dor pode ainda ser classificada como inflamatória e neuropática. A dor inflamatória é decorrente de uma inflamação local ou lesão tecidual acompanhada pela presença e liberação de mediadores químicos e inflamatórios como bradicinina, histamina, substância P, leucotrieno, tromboxano e ativação de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-6 por sinalização de macrófagos (JI et al., 2003). Estudos mostram que a dor inflamatória em animais pode ser induzida pela administração intraplantar de CFA (Adjuvante Completo de Freund composto por *Mycobacterium Tuberculosis*), carragenina ou formalina (ALLEN; CORTRIGHT; MCCARSON; 2003).

A dor neuropática, decorre-se à lesão de nervos do Sistema Nervoso Central ou Sistema Nervoso Periférico gerando um processo de hiperalgesia, caracterizado pela presença de alodinia à um estímulo não nocivo ou inócuo. Esse modelo de dor pode ser induzido através de técnicas de constrição do nervo isquiático (CCI), entre outras técnicas descritas por Bennet e Xie (1988). Além disso, em animais a dor neuropática é realizada por SNI (técnica que consiste no corte dos ramos fibular e tibial do nervo isquiático) ou SNL (Ligadura do nervo espinal – constrição e corte de um ou mais nervos espinais (KRAYCHETE; GOZZANI, 2008).

Durante esse processo, são liberados neurotransmissores excitatórios como o glutamato, serotonina, acetilcolina, e inibitórios como o GABA, com função de modular a informação dolorosa (ROWLAND; PEDLEY, 2011).

Como tratamento para a dor, a acupuntura, técnica criada há mais de 2000 a.C na China,

tem se mostrado eficaz na redução de processos inflamatórios e desordens álgicas. Esta técnica que faz parte da Medicina Tradicional Chinesa, consiste na inserção de agulhas por meio transdérmico, em pontos específicos denominados acupontos. Sua estimulação é conhecida por liberar mediadores químicos a partir de mastócitos (como a histamina), e outras células imunes, participando do controle da dor (LI et al., 2005).

Além disso, Zhang et al. (2012) relataram que há o envolvimento de mediadores químicos como histamina, bradicinina, Substância P, glutamato, Peptídeo Relacionado ao Gene de Calcitonina, e ATP na atividade fisiológica neural no efeito produzido pela acupuntura.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar o papel dos receptores de Acetilcolina, Bradicinina, Histamina, Serotonina, Substância P e Glutamato na dor inflamatória induzida por CFA e na dor neuropática induzida por CCI.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Abaixo segue a revisão bibliográfica em se tratando de dor.

2.1 DOR

A resposta nociceptiva resulta de diferentes estímulos traduzidos em impulsos elétricos por nociceptores, terminações nervosas livres que indicam uma injúria potencial ou real (MILLAN, 2002). Tal estímulo é conduzido ao Sistema Nervoso Central por meio de fibras aferentes primárias, classificadas de acordo com seu diâmetro, estrutura, velocidade de condução, intensidade e qualidade da dor, essencialmente em dois tipos: 1) fibras C: finas (0,4 a 1,2 mm de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2 m/s), sendo responsáveis pela dor de longa duração e difusa, e 2) fibras A- δ : médias (2 a 6 mm de diâmetro), pouco mielinizadas, de condução intermediária (2 a 30 m/s) e responsáveis pela dor de curta duração, aguda e lancinante, sentida logo após uma estimulação nociva. As fibras A- δ respondem apenas a estímulos nocivos mecânicos e térmicos, já as fibras C respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, sendo assim chamadas de polimodais. Além dessas, existem outras fibras chamadas de A- β , de maior diâmetro e muito mielinizadas, responsáveis pela detecção de estímulos inócuos (ex. táteis), que podem passar a responder como nociceptores durante certos processos patológicos, como nas neuropatias, por meio de um processo de plasticidade neuronal (BASBAUM et al., 2009).

As fibras C são não-mielinizadas, expressam o receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1) e são classificadas em dois grupos, de acordo com o seu conteúdo de peptídeos e a localização de seus terminais sinápticos no corno dorsal da medula espinal. As fibras C peptidérgicas sintetizam e liberam peptídeos como substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e expressam o receptor tirosina quinase A (TrkA) de alta afinidade para o fator de crescimento do nervo (NGF). Estas populações de fibras também possuem diferenças em relação a sua distribuição no corno dorsal da medula espinal, sendo que as peptidérgicas se localizam na lâmina I e na porção externa da lâmina II superficial, enquanto que as não-peptidérgicas na porção mais interna da lâmina II profunda (BASBAUM et al., 2009). Ambos os tipos de fibras C podem ter seus potenciais dependentes de cálcio bloqueados pela pré-administração tópica ou subcutânea de capsaicina (agonista do receptor TRPV1) sem

afetar os potenciais de fibras A- δ (LYNN, 1990; GROSSKEUTZ et al., 1996).

As fibras A- δ são pouco mielinizadas, expressam o receptor TRPV1 e são divididas em duas classes principais (I e II): ambas respondem a estímulos mecânicos intensos, mas podem ser diferenciadas por sua capacidade de responder a estímulos de calor intenso. As fibras A- δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores a 43°C. As fibras A- δ sintetizam e liberam mediadores como o glutamato e expressam o neurofilamento 200 (NF200) (PERRY et al., 1991). As mesmas conduzem informações para áreas nociceptivas específicas nas lâminas I e II da superfície do corno dorsal da medula espinal e também para neurônios na lâmina V, os quais codificam tanto informações de estímulos inócuos quanto nocivos (BASBAUM et al., 2009). As fibras A- δ podem ser bloqueadas por injeção subcutânea de tetrodotoxina (TTX), uma neurotoxina que atua por bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes nas membranas das células nervosas. Adicionalmente, alguns estudos recentes têm demonstrado o aumento da expressão de receptores TRPV1 em diferentes subtipos de neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula (GRD) após injeção de Adjuvante Completo de Freund (CFA) na pata. A dupla marcação de receptores TRPV1 com o marcador neuronal de NF200, CGRP e IB4 demonstrou o aumento da expressão de TRPV1 em fibras A- δ , C peptidérgicas e C não-peptidérgicas, respectivamente demonstrando que após injeção com CFA, ocorre aumento da expressão de TRPV1 nos três tipos de fibras aferentes nociceptivas do GRD (LUO et al., 2008).

Messeguer et al. (2006) ampliando os conhecimentos sobre receptores TRPV1, relataram que estes, participam de uma diversidade de processos fisiológicos, especialmente em se tratando de inflamação e hiperalgesia. Além disso, são canais iônicos considerados portões moleculares em sistemas sensoriais traduzindo estímulos químicos e físicos em potenciais de ação. Esses receptores são encontrados em diversas regiões do corpo, sobretudo, abundantemente expressos nos gânglios da raiz dorsal.

Sabe-se que os neurônios do GRD fazem sinapse com neurônios do corno da raiz dorsal, projetando informações através do trato espinotalâmico e espinobulbar. Existem algumas áreas do SNC que são ativadas direta ou indiretamente por estímulos nociceptivos, incluindo o córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior, córtex insular, núcleo rostroventro medial, amígdala e substância cinzenta periaquedutal. Estas áreas exercem influências bidirecionais sobre os estímulos dolorosos, podendo inibir ou facilitar a transmissão e modulação nociceptiva a nível do corno dorsal (BENARROCH, 2008). Essa modulação é mediada principalmente por vias monoaminérgicas.

As monoaminas têm um papel excepcional na modulação e controle da dor. Incluem

serotonina, noradrenalina e dopamina que agem por vias diferentes com muitos subtipos de receptores para exercer uma complexa modulação da liberação de neurotransmissores em resposta à nocicepção, através da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal. Estes sistemas monoaminérgicos tem um importante papel nos mecanismos de dor inflamatória e neuropática, sendo um alvo para o tratamento farmacológico destas condições (BENARROCH, 2008).

A serotonina possui uma família de receptores classificados como 5HT. Estes estão bem localizados no Núcleo Magno da Rafe, entretanto, os axônios serotoninérgicos se projetam e inervam quase toda região cerebral. São divididos em 5 classes, todos acoplados à proteína G, exceto 5HT3 (BERUMEM et al., 2012). Esses receptores exercem efeitos moduladores complexos sobre a transmissão dolorosa. Receptores 5-HT1 desempenham um efeito antinociceptivo; Receptores 5-HT1A pós-sinápticos inibem a excitabilidade de neurônios do trato espinotalâmico e interneurônios excitatórios, enquanto receptores 5-HT1B pré-sinápticos inibem a liberação de neurotransmissores a partir de fibras aferentes primárias. Diante disso, sabe-se que o percurso descendente serotoninérgico tem efeitos antinociceptivos mediados por 5-HT1, 5-HT2 e 5-HT3 (BENARROCH, 2008).

Outros mediadores e neuromoduladores também participam do processo de hiperalgesia. ZHANG et al. (2013) evidenciaram que os receptores de substância P (SP) e glutamato (Glu) estão relacionados à modulação e transmissão nociceptiva, através da ativação em fibras aferentes primárias A δ e C. Eles estão localizados nos terminais pré-sinápticos de nervos periféricos e na sinalização de processos inflamatórios. A substância P por meio de seu receptor é destacada por ser um importante neuropeptídeo relacionado à transmissão da informação dolorosa. Além disso, também é relatado que o glutamato é o neurotransmissor mais abundante no SNC e que seus receptores desempenham um papel importante na modulação de estímulos sensoriais periféricos e centrais, sendo divididos em receptores ionotrópicos e metabotrópicos (iGLU e mGLU) respectivamente.

A acetilcolina participa de muitos processos neurais no Sistema Nervoso Central e Periférico. Em relação aos seus receptores, são divididos em nicotínicos e muscarínicos. Os nicotínicos fazem parte da função motora, estando presentes em neurônios do Sistema Nervoso Autônomo e na função motora. Os muscarínicos compreendem cinco subtipos (M1-M5 receptores) e são expressos tanto no Sistema Nervoso Central quanto no Sistema Nervoso Periférico, atuando em tecidos-alvo. Ligam-se à acetilcolina por via extracelular e são acoplados à proteína G. Além disso, Receptores muscarínicos principalmente M-2 estão presentes em várias regiões cerebrais que são inervadas por neurônios colinérgicos, precisamente localizados nas membranas celulares pré -sinápticas (HAGA, 2013).

Ainda sobre mediadores e neurotransmissores, que atuam durante a hiperalgesia, a histamina e bradicinina participam ativamente do processo nociceptivo como principais mediadores químicos e inflamatórios. Seus receptores estão localizados em todo o corpo, abundantemente nos endotélios, derme, epiderme e tecido muscular. A histamina possui uma classe de receptores dividida em H1, H2, H3 e H4. Os receptores H1 e H2 são metabotrópicos sendo portanto, acoplados à proteína G. Ao contrário destes, o receptor H3 está principalmente localizado pré-sinápticamente, embora sua atividade controle negativamente a liberação e síntese de histamina (HU; CHEN, 2012).

Os receptores de bradicinina são divididos em B1 e B2, acoplados à proteína G e são expressos em tecidos alvo de processos inflamatórios nos quais há liberação de prostaglandinas e neuropeptídeos. Os receptores B2 são constitutivamente expressos sob condições fisiológicas e estão localizados no endotélio e estão envolvidos na vasodilatação e hipotensão vascular. Em contraste, receptores B1 são expressos em níveis mais baixos, sendo fortemente regulados na presença de estímulos inflamatórios. Vários estudos têm mostrado que esse receptor pode influenciar as respostas imunes por modulação de linfócitos T, migração de leucócitos e prostaglandinas, mediadores de mastócitos e produção de citocinas e quimiocinas (WANG et al., 2008).

2.2 HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA AGUDA

A hiperalgesia representa um processo de sensibilização dolorosa aumentada, seguida de alterações dos mediadores inflamatórios no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo, aumentando a sensibilidade nos nociceptores e uma resposta sublimiar de estímulos nociceptivos, produzindo reflexos de axônios locais, resultando na liberação de neuropeptídeos como a substância P, neurocininas e CGRP (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Existem vários modelos animais de hiperalgesia inflamatória, com diferentes agentes irritantes que podem ser injetados na pele, pata, músculos, articulações e órgãos. Estes incluem os irritantes que produzem dor inflamatória aguda associada ao recrutamento de neutrófilos, basófilos e mastócitos, assim como respostas de dor prolongada com uma infiltração de macrófagos, utilizados para modelos de inflamação aguda e crônica. Um potente agente inflamatório é a carragenina, utilizada para induzir inflamação na pata, músculo e articulações, resultando em uma inflamação aguda inicial que se converte em inflamação crônica. Ao longo

do tempo, está associada ao aumento da sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos no local da lesão, bem como fora do local da lesão, correspondendo a zonas hiperalgésicas primárias e secundárias mediada por nociceptores (O'NEIL et al., 2012; JR, 2009).

Da mesma forma, a formalina, uma solução aquosa de formaldeído a 2% produz fenômenos irritativos quando administrada na pata de roedores seguido por formação de edema, hiperemia e reflexo de retirada da pata, caracterizando hiperalgesia (GREGORY et al., 2013; LEITL et al., 2014). Semelhantemente a estes dois agentes inflamatórios, o CFA consiste em uma solução composta por alta concentração de *Mycobacterium Tuberculosis*, como agente indutor de inflamação e edema, que resulta em um processo inflamatório mais severo quando comparado à carragenina. Este modelo tem sido amplamente utilizado pois imita processos inflamatórios clínicos associados a lesões teciduais (HUANG et al., 2012).

Em geral, a inflamação é caracterizada por aumento da temperatura local, edema, hiperemia e alteração da função. Além disso, neuropeptídios, citocinas e mediadores vasoativos desempenham um papel importante durante esse processo. A formação neurogênica de mediadores vasoativos pode regular o fluxo sanguíneo, fazendo com que haja ativação e proliferação celular, e posteriormente, regulação e *clearance* de metabólitos. Tais fenômenos são interpretados e sensibilizados por nociceptores (BUCLEY et al., 2014; CUNHA et al., 2004).

Esta sensibilização é o denominador comum após injúria ou inflamação e resulta da liberação de mediadores químicos e eicosanoides (mediadores de origem lipídica) e aminas, originados de diferentes células, que podem ativar diretamente os nociceptores ou mesmo sensibilizá-los, através da diminuição do limiar de excitabilidade e frequência de disparo em resposta a estímulos (WALL; MELZACK, 1999; KANDEL et al., 2000).

Então, a hiperalgesia inflamatória é instalada pela liberação ativa de uma cascata mediadores e citocinas, iniciada pela produção de bradicinina. A primeira citocina a ser liberada é o TNF α , seguida por IL-6, IL-1 β , induzindo a ativação de neutrófilos e substâncias quimioatrativas, responsáveis pela síntese de prostaglandinas. Essas evidências foram comprovadas por pesquisas com CFA, verificando que, após sua administração via intraplantar, houve uma liberação sequencial de TNF α , IL-1 β e fator do crescimento do nervo (CUNHA et al., 2004).

Um ponto importante no que se refere à indução da hiperalgesia inflamatória é que a liberação de mediadores inflamatórios, bem como de citocinas, respeita uma hierarquia temporal de liberação e de ação. Quando se realiza uma análise do exsudato inflamatório, colhido em uma fase tardia de um processo inflamatório agudo, é possível detectar uma

liberação complexa de mediadores. Porém, se for realizada uma análise temporal cuidadosa desse exsudato, observar-se-á que a liberação dos mesmos segue uma sequência definida. É por esta razão que, ao se bloquear um passo desta sequência, pode-se inibir o desenvolvimento de determinados eventos, sinais e sintomas do processo inflamatório, inclusive a dor (CUNHA et al., 2007).

Os mediadores inflamatórios podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hiperalgésicos intermediários e finais. Os primeiros são liberados no início e durante a inflamação, sendo responsáveis pela ativação de outros mediadores. Já os finais, interagem diretamente com seus receptores específicos, presentes nos neurônios aferentes primários (CUNHA et al., 2007).

Tais mediadores são ainda divididos em plasmáticos e celulares. Os plasmáticos constituem o sistema de coagulação, sistema fibrinolítico, sistema complemento e sistema que envolve as cininas. No entanto, os celulares são compostos pela liberação de histamina, bradicinina, 5HT, CGRP e substância P, resultando num influxo imediato de leucócitos polimorfonucleares, seguido por fagocitose por meio de macrófagos e monócitos, a fim de retornar ao processo homeostático (ZIJLSTRA et al., 2003). A maioria desses mediadores, induzem seus efeitos ligando-se a receptores específicos encontrados nas células-alvo (BUCKLEY et al., 2014).

2.3 HIPERALGESIA NEUROPÁTICA

A dor neuropática pode ser resultante de doenças ou injúrias que acometem diretamente o sistema nervoso periférico, assim como a medula espinal ou SNC (SELTZER, 1999). O dano ao tecido nervoso resulta em aumento da sensibilidade aos estímulos dolorosos (hiperalgesia) assim como, estímulos inócuos passam a serem percebidos como dolorosos, caracterizando alodinia. Esta hiperalgesia neuropática pode ser devida, em parte, às alterações centrais ou espinais, porém um componente relevante provavelmente seja a sensibilização das fibras aferentes primárias periféricas (WALKER, 1995; BARON; BINDER, 2004).

A dor neuropática é evocada por algum dano, patologia, traumas, contusões ou compressões de nervos localizados no SNC ou periférico. Esse processo pode ser seguido de isquemia, alterações metabólicas locais ou exposição a toxinas, e apresenta sintomas como hipersensibilidade, inflamação neurogênica e alodinia. Estas alterações incluem geração de potenciais de ação ectópicos, facilitação em desinibição da transmissão sináptica, perda da

conectividade sináptica e formação de novos circuitos sinápticos, com interações neuroimunes (COSTIGAN et al., 2009; GREGORY et al., 2013).

Apesar das diferentes condições neuropáticas e danos nesses modelos de dor, existe uma seqüela comum pós-lesão que promove alterações inflamatórias, que levam a degranulação de mastócitos e recrutamento de macrófagos e neutrófilos (LEUNG; CAHILL, 2010).

Para se proteger contra a lesão tecidual, o organismo está ciente de estímulos potencialmente prejudiciais. Esta consciência é realizada através de um sistema sensorial de detecção de estímulo nocivos. A dor nociceptiva é um alarme mediado por neurônios não mielinizados do tipo C e mielinizados e sensoriais primários A δ , sendo fibras finas, conduzidas por vias nociceptivas do Sistema Nervoso Central. Esses nociceptores (terminações nervosas livres) são também receptores de canais de íon especializados, ajustados para responder aos intensos estímulos térmicos ou mecânicos, exógenos e endógenos. Na dor nociceptiva, ocorre um processo doloroso altamente desagradável, como resposta e mecanismo de proteção do corpo a uma agressão, alertando-o sobre um estímulo externo nocivo (COSTIGAN et al., 2009).

A lesão de um nervo periférico frequentemente leva à formação de um neuroma, uma estrutura caracterizada por um enovelamento de terminações nervosas, que desenvolvem mudanças em sua excitabilidade, sendo suficientes para gerar potenciais de ação espontâneos, e conduzir o influxo sensorial independente de qualquer estimulação periférica (LIU et al., 2001; DEVOR, 2006). Em adição ao neuroma, fibras adjacentes ao nervo lesado também podem constituir focos de hiperexcitabilidade ectópica. De qualquer maneira, a hiperexcitabilidade neuronal pode ser decorrente do aumento da expressão de canais de sódio, acarretando o aparecimento de fenômenos como dor espontânea e a sensibilização de neurônios do sistema nervoso periférico e SNC (WOOLF, 2004; CAMPBELL; MEYER, 2006; DEVOR, 2006).

Quando um nervo é lesado, alguns componentes da resposta inflamatória são ativados, resultando na liberação de mediadores e no recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão. A presença de células de *Schwann*, neutrófilos, macrófagos e mastócitos removem fragmentos da lesão tecidual, contribuindo para o processo de síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios como bradicinina, histamina, serotonina e substância P, num fenômeno conhecido como degeneração Walleriana. Tal fenômeno é caracterizado por lesão ou injúria da extremidade distal ou proximal do nervo, até o próximo nódulo de Ranvier, sendo de origem traumática, isquêmica ou compressiva (TRACEY; WALKER, 1995; ROSA; FERREIRA, 2005). A presença de serotonina, substância P, histamina, bradicinina, citocinas, TNF- α , IL-1 β e IL-6, entre outras, assim como de produtos das vias da ciclooxigenase (COX)

são capazes de ativar e/ou sensibilizar as fibras sensoriais periféricas, participando ativamente no desenvolvimento da hiperalgesia em condições de dor neuropática (SOMMER; KRESS, 2004).

Diante disso, sabe-se que as citocinas são classificadas em cinco categorias principais: interleucinas, *interferons*, fatores de necrose tumoral, fatores de crescimento e quimiocinas. Em conjunto com os mediadores citados acima, estes fatores contribuem para a patogênese da dor neuropática (LEUNG; CAHILL, 2010).

A CCI é um modelo de lesão de nervo periférico amplamente utilizado da dor neuropática crônica. É relativamente simples de executar, produzindo hipersensibilidade e dor durante pelo menos um mês após a lesão. Seguindo CCI, os ratos exibem postura anormal da pata posterior lesionada (pés mantidos juntos e superfície plantar flexionada, além da posição evertida da pata. Além da disfunção sensorial, vários investigadores demonstraram que a CCI evoca problemas comportamentais, tais como prejuízo das interações sociais, distúrbios do sono perturbado, comportamento tipo depressivo e ansiedade, semelhante ao observado na prática clínica durante tratamento de dor neuropática (AUSTIN; WU; TAYLOR; 2012).

Com base em estudos de Bennet e Xie (1988), é possível afirmar que a lesão neural pela compressão e instalação da neuropatia periférica gera um processo de alodinia e dor espontânea tendo início em 24 horas após a compressão, mas podendo ser comprovada após 72 horas, quando os limiares nociceptivos mecânicos estão abaixo dos limiares basais. Além disso, há presença de edema intraneural e oclusão parcial da vascularização do nervo afetado, gerando um grande acometimento não só do ipsilateral à lesão, mas também do lado contralateral. Mediante esse processo, observa-se que na neuropatia, estão envolvidas alterações de plasticidade neural, que ocorrem em nível do corno dorsal da medula espinal, precisamente em lâminas I e V das vias descendentes. Essa plasticidade é baseada em um aumento na síntese e liberação de aminoácidos excitatórios e redução na liberação de aminoácidos inibitórios, com subsequente ativação de células gliais como micróglia e astrócitos (WHITE; FELDMAN; MILLER, 2009).

2.4 ACUPUNTURA

A técnica de acupuntura foi criada há mais de 3 mil anos a.C na China fazendo parte da Medicina tradicional Chinesa. A palavra acupuntura deriva de duas palavras do latim: “*acus*” que significa agulha e “*pungere*” que significa punção, com o objetivo de penetrar o ponto. O

processo tradicional consiste na inserção de agulhas em pontos específicos do corpo, chamados acupontos. Além do modo tradicional, os acupontos podem ser estimulados eletricamente por uma corrente polarizada (eletroacupuntura), associado ao laser (laserpuntura) e termicamente através da moxabustão (termoterapia em forma de bastão de Artemísia) (ALIREZA et al., 2015).

A acupuntura pode ser definida como uma técnica terapêutica em que agulhas finas são inseridas em pontos específicos na pele com estimulação mecânica, elétrica ou térmica. A nomenclatura e a localização dos pontos específicos, conhecidos como acupontos, foram estabelecidos pela medicina tradicional chinesa (MTC) por volta de 400 aC. Nas últimas quatro décadas, numerosas observações clínicas e estudos em modelos animais têm demonstrado que a acupuntura possui amplos benefícios terapêuticos. Um grande número de evidências experimentais obtidas em animais e seres humanos fornecem muitas hipóteses sobre os mecanismos neurais dos efeitos da acupuntura, em especial da analgesia por acupuntura. No entanto, várias questões ainda permanecem sem resposta na pesquisa da acupuntura (ZHAO, 2008).

Quando as agulhas são estimuladas manualmente para cima e para baixo repetitivamente, os tecidos profundos, particularmente o muscular, são localmente lesados e mediadores pró-inflamatórios, como a histamina, bradicinina, PGE₂, serotonina e ATP, são liberados e excitam nociceptores direta ou indiretamente (BOUCHER et al., 2000). De fato, o uso de irritantes químicos, como adenosina, formalina ou veneno de abelha injetados diretamente sobre o acuponto é capaz de induzir efeitos semelhantes aos da acupuntura manual ou da eletroacupuntura (SILVA et al., 2011; KIM et al., 2011; GOLDMAN et al., 2010).

Princípios da acupuntura evidenciam que a melhora para muitas doenças se encontra no equilíbrio vital do fluxo de energia. Esse equilíbrio é possível através do estímulo de certos pontos localizados em meridianos. Os meridianos são compostos por 12 linhas longitudinais imaginárias, sendo que cada linha é responsável por diversos pontos específicos (acupontos) relacionados aos órgãos e sistemas do corpo (LANGEVIN, 2002). Essa especificidade de acupontos foi evidenciada por LING et al. (2012) embasados em resultados de neuroimagem.

Quando uma agulha é inserida em um determinado ponto, um estímulo mecânico é fornecido, ativando uma variedade de componentes neurais e neuroativos. Esse conjunto de variedades, distribuído ao longo da pele, músculos e tecido conjuntivo ao redor da agulha, é definido como Unidade Neural de Acupuntura (UNA) ou acuponto. Estudos antigos revelam que há uma grande quantidade de terminações nervosas livres, receptores cutâneos encapsulados (Merkel, Meissner, Ruffini, e corpúsculos de Pacinni), receptores sensoriais

(fusos musculares e órgão tendinoso), e suas fibras aferentes, localizados nos acupontos. Os componentes neuroativos mais encontrados em acupontos são mastócitos, histamina, substância P e outros fatores imunes. Os componentes não neurais encontrados são macrófagos, fibroblastos, linfócitos, plaquetas e queratinócito (ZHANG et al., 2012).

De acordo com Zhao et al. (2012), há uma especificidade muito grande e individual em cada acuponto. Dessa forma, o acuponto *Zusanli* (E36) é conhecido por apresentar propriedades analgésicas e controlar desordens álgicas e gastrointestinais quando estimulado.

Contribuindo com estas evidências, Hsu et al. (2014) concluíram que esse acuponto foi capaz de reduzir a dor neuropática causada por CCI em ratos.

Zhang et al. (2011) relataram que os acupontos têm uma estreita relação com o sistema nervoso, vasos sanguíneos e sistema muscular. Através de estudos histológicos observou-se também um aumento de terminações nervosas, fibras A e fibras C aferentes no local dos acupontos.

Diante de estudos de Zhao (2009) e Chen (2009), é possível afirmar que o acuponto *Zusanli* (E36), Estômago 36, localizado a 3cm abaixo da patela e 0,5 cm lateral à tíbia, e segundo LI et al. (2005) anatomicamente localizado em camundongos à 3mm lateralmente ao tubérculo anterior da tíbia e 4mm abaixo da articulação do joelho próximo à cabeça da fíbula, é bem utilizado em desordens dolorosas, sendo o ponto de primeira escolha para analgesia em membro inferior, podendo também ser utilizado no tratamento da dor aguda de nervo ciático e síndromes gastrointestinais (CODERRE, 1990).

Além disso, outros estudos também comprovaram a eficácia analgésica do acuponto E36 quando estimulado por agulhas de acupuntura (LEE et al., 2005; CHA et al., 2006; OH et al., 2006; ZHAO et al., 2009; ZHAO et al., 2012). Corroborando com essas evidências, Zhang et al. (2012) também verificaram que a estimulação do ponto *Zusanli* em camundongos reduziu significativamente a dor crônica na pata ipsilateral e aumentou as concentrações extracelulares de ATP e adenosina nos tecidos adjacentes.

3 JUSTIFICATIVA

De acordo com a Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como uma experiência multidimensional desagradável, associada ou não a lesões teciduais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial apresenta sintomatologias dolorosas diversas. Existem diversos tipos de dor, dentre eles, os mais frequentes são a dor inflamatória aguda e neuropática, caracterizadas por alodinia (hipersensibilidade a estímulo tátil), hiperalgesia, dor espontânea e ativação de nociceptores, presentes em fibras específicas denominadas A- δ e C.

Com o objetivo de tratar distúrbios algícos de diferentes etiologias, a acupuntura é uma técnica antiga e mundialmente reconhecida que apresenta benefícios e propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e curativas (ZIJLSTRA et al., 2003). Além disso, o estímulo mecânico provocado pela agulha causa a liberação de mediadores químicos e inflamatórios, citocinas, neuropeptídeos, neurotrofinas e quimiocinas, que fazem parte do processo de analgesia pela acupuntura (MCDONALD et al., 2015).

Goldman et al. (2010), relataram que a técnica de acupuntura é dependente da liberação de adenosina, permitindo também a liberação de outras purinas como o ATP. Corroborando com o estudo acima e considerando o estímulo em pontos de acupuntura, Hu et al. (2014) sugeriram que há também o envolvimento de canais iônicos envolvidos na recepção do estímulo mecânico como canais de potencial transitório como TRPV1 e TRPV4, também relacionados com a liberação de ATP.

Diante dessas evidências, há a necessidade de um estudo abrangente envolvendo a dor inflamatória aguda e neuropática e sobre o estímulo causado pela acupuntura, tendo em vista a avaliação de mediadores envolvidos como histamina, bradicinina, serotonina, acetilcolina, glutamato e substância P, e a expressão dos mesmos em um receptor de canal iônico e como o TRPV1, sendo este importante nos mecanismos referentes à dor.

4 OBJETIVOS

Abaixo serão descritos os objetivos geral e específicos deste estudo.

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o papel dos diferentes receptores das fibras aferentes nociceptivas A- δ e C, na condução dos estímulos produzidos pela acupuntura no controle do processo da hiperalgesia inflamatória aguda e neuropática.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nos modelos de hiperalgesia induzida por administração intraplantar de CFA e hiperalgesia neuropática induzida por CCI, os efeitos da estimulação por acupuntura e da administração via subcutânea no acuponto *Zusanli* (E36), de: histamina, bradicinina, serotonina, glutamato, substância P e acetilcolina sobre o limiar nociceptivo mecânico.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo, segue a representação da divisão amostral

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos, 6-7 semanas, com peso de 30g provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisioterapia Experimental (Labfex), sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso a ração e água até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL, com protocolo nº 618/2015 aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética em Uso de Animais).

5.2 AMOSTRA

A amostra foi constituída por 248 animais divididos em 3 grupos: Salina, CFA e CCI. Esses então, foram divididos em 16 subgrupos, sendo realizado uma curva dose-efeito com as doses 0,03 µg/20µL, 0,3 µg/20µL e 3µg/20µL, conforme tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos grupos experimentais

Salina i.pl+Salina no acuponto E36	
Sham +Salina no acuponto E36	
CFA	CCI
CFA i.pl+Salina no acuponto E36	CCI +Salina no acuponto E36
CFA i.pl+acupuntura manual no acuponto E36 por 20'	CCI +acupuntura manual no acuponto E36 por 20'
CFA i.pl+Serotonina - 5HT1 no acuponto E36	CCI +Serotonina - 5HT1 no acuponto E36
CFA i.pl+Glutamato - Glu no acuponto E36	CCI +Glutamato - Glu no acuponto E36
CFA i.pl+Bradicinina - B1 no acuponto E36	CCI +Bradicinina - B1 no acuponto E36
CFA i.pl+Substância P - SP no acuponto E36	CCI +Substância P - SP no acuponto E36
CFA i.pl+Histamina – H3 no acuponto E36	CCI +Histamina – H3 no acuponto E36
CFA i.pl+Acetilcolina - M2 no acuponto E36	CCI +Acetilcolina - M2 no acuponto E36

FONTE: DA AUTORA

5.2.2 Drogas e Diluentes

Para diluição das substâncias, foi utilizado Solução Salina a 0,9% de NaCl. Para anestesia, foi utilizado o anestésico inalatório Isoflurano 1mL/mL (Cristália®). Como indutor de hiperalgesia inflamatória aguda, utilizou-se 20 µL de CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) 1mg de *Mycobacterium Tuberculosis*/ mL. (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA). Histamina (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) Dissolvida em salina. Doses de 0,0015µg/µL, 0,015 µg/µL, 0,15 µg/µL e 1,5 µg/µL. Bradicinina (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) Dissolvida em salina. Doses de 0,0015µg/µL, 0,015 µg/µL, 0,15 µg/µL e 1,5 µg/µL. Serotonina (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) Dissolvida em salina. Doses de 0,0015µg/µL, 0,015 µg/µL e 0,15 µg/µL. Acetilcolina (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) Dissolvida em salina. Doses

de 0,0015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Glutamato (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) Dissolvida em salina. Doses de 0,0015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Substância P (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) Dissolvida em salina. Doses de 0,0015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.3 TESTES DE NOCICEPÇÃO MECÂNICA - PRESSÃO CRESCENTE NA PATA (VON FREY ELETRÔNICO)

A avaliação da hiperalgesia mecânica em camundongos foi realizada como previamente descrito por Cunha et al. (2004). Este método consiste em um algesímetro, composto de um transdutor de pressão ligado a um detector digital de força expressa em gramas. Ao transdutor foi adaptada uma ponteira de 0,5 mm² que estimula diretamente a pata do animal. A ponteira foi aplicada em ângulo reto na região central da pata direita traseira do animal com uma pressão gradual crescente, a qual provoca uma resposta de flexão característica com retirada da pata. A intensidade de hiperalgesia é quantificada após a realização da média de três medidas repetidas, segundo Goldman et al. (2010).

5.4 ACUPUNTURA

Com os animais levemente anestesiados por vaporização de Isoflurano (0,5%), o procedimento de acupuntura foi realizado na pata direita, semelhantemente aos experimentos de Silva et al. (2011), Silva et al. (2012), Wen et al. (2011) e Kung et al. (2011) que também utilizaram esse anestésico para a realização de acupuntura e eletroacupuntura, sem que o mesmo interferisse no limiar mecânico dos animais. O acuponto *Zusanli* (E36) localizado na pata direita dos animais, 3 mm lateralmente ao tubérculo anterior da tíbia, 4 mm abaixo da articulação do joelho, próximo à cabeça da fíbula, seguindo referências anatômicas de Li et al. (2005) e Yim et al. (2006), foi estimulado com agulhas de acupuntura da marca *Dong Bang* (DBC, de 0,18 mm de espessura e 8 mm de comprimento), sendo o acuponto utilizado como via de administração de substâncias, subcutaneamente (SILVA et al., 2010, 2011a, 2011b). Para execução da acupuntura manual, as agulhas foram manipuladas de forma rotacional segundo WU et al. (2014) por 10 vezes a cada 5 minutos, por 20 minutos (GOLDMAN et al., 2010). Para a execução da injeção no acuponto foi utilizada seringa de insulina com guia (mandril

adaptado) seguindo referências de Wu et al. (2014) para aplicação a 3 mm de profundidade de 20 µL de salina ou Serotonina, Glutamato, Bradicinina, Substância P, Histamina, Acetilcolina. Como estes agonistas não apresentam descrição na literatura do seu uso sobre acupontos, as doses das drogas foram definidas por um teste de dose-efeito utilizando a via subcutânea como forma de aplicação (0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL) e a melhor dose foi utilizada nos experimentos subsequentes.

5.5 INDUÇÃO DA HIPERNOCICEPÇÃO AGUDA POR CFA

Foi realizada a primeira medida da avaliação do limiar mecânico basal dos animais. Logo após, foi administrado um volume de 20 µL de CFA por via intraplantar, na pata direita traseira, segundo Chen et al. (2014) e o efeito sobre o limiar nociceptivo mecânico nos camundongos foi avaliado pelo teste de von Frey (CUNHA et al., 2004). O grupo controle recebeu injeção via intraplantar de salina (20 µL). Quatro horas após a administração de CFA ou salina, o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado novamente (basal 2). Para iniciar o tratamento, foi realizado 20 minutos de acupuntura ou injeção de salina ou agonistas no acuponto, após a indução da hiperalgesia inflamatória aguda, e logo após os animais e tiveram seus limiares avaliados 0, 1, 6 e 24 horas após serem tratados.

5.6 MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO NEUROPÁTICA PERIFÉRICA (CCI)

Foi utilizado o modelo experimental de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI). Esse modelo experimental de dor neuropática foi primeiramente descrito em ratos por Beenet e Xie (1988) e Seltzer et al. (1990) e modificado para camundongos (MAMBERG et al., 1998). Além de ser um modelo experimental de fácil execução, mimetiza os sinais da dor neuropática encontrados na clínica, caracterizados por alodinia mecânica, hipernocicepção mecânica, térmica e alodinia ao frio, mas não são verificadas mudanças no limiar térmico (WOOLF & MANNION, 1999; ERICHSEN & BLACKBURN-MUNRO, 2002; AL-AMIN et al., 2010; BOURQUIN et al., 2006).

Após anestesia inalatória com vaporização de isoflurano a 2%, a pele da superfície lateral da coxa traseira dos animais passou por assepsia e em seguida foi incisionada, e o músculo glúteo máximo divulsionado, expondo as ramificações do nervo isquiático. Esse

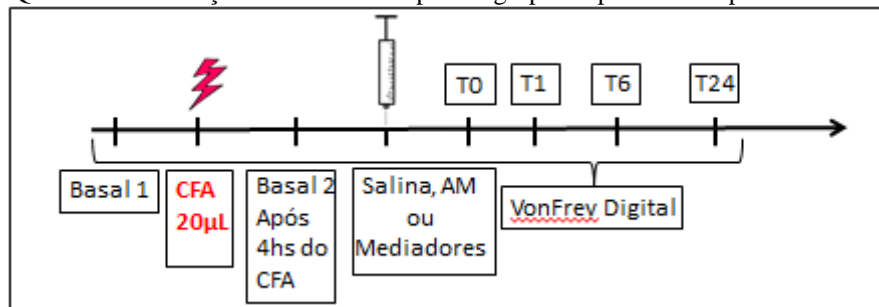
modelo consiste na amarração 1/3 a 1/2 da porção dorsal do nervo isquiático com fio de sutura de 4,0. Logo após, o músculo e a pele foram suturados.

5.7 CRONOGRAMA EXPERIMENTAL

Abaixo estão representados os cronogramas experimentais para hiperalgesia inflamatória aguda e neuropática

5.7.1 Hiperalgesia Inflamatória Aguda

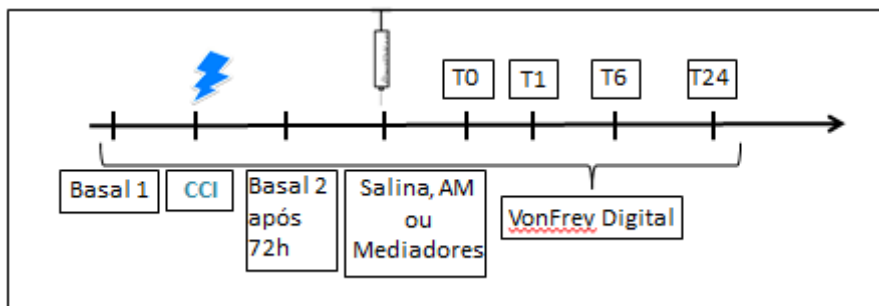
Quadro 1 – Descrição da linha do tempo dos grupos experimentais por CFA.



FONTE: DA AUTORA

5.7.2 Hiperalgesia Neuropática

Quadro 2 – Descrição da linha do tempo dos grupos experimentais por CCI



FONTE: DA AUTORA

5.8 WESTERN BLOTTING

Para avaliação da expressão de TRPV1 proporcionado pela injeção de CFA ou pela neuropatia, inicialmente, os animais de todos os grupos, exceto grupos CFA+salina e CCI+salina foram anestesiados com isoflurano a 2%, tricotomizados na região dorso-lombar e após serem incisionados na região póstero-mediana, foi realizada uma abertura dos planos até a lâmina óssea e logo após, laminectomia para visualização dos gânglios. Os GRD dos segmentos L4-L6 foram dissecados e posteriormente homogeneizados e lisados em tampão contendo 50 mmol/l de Tris (pH 7,4), 250 mmol/l de cloreto de sódio (NaCl), 10 mmol/l de etilenodiaminatetracetato de sódio (EDTA) (pH 8,0), 0,5% Nonideto P-40 (NP40) (Sigma, EUA), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mmol/l, 10 µg/l de leupeptina, 4 mmol/l de fluoreto de sódio (NaF). Os sobrenadantes foram centrifugados a 1000 g durante 10 min a 4°C. A concentração de proteína foi determinada com um kit de quantificação proteínas por método de Bradford (Pierce, EUA). As amostras de proteína (20 µg / poço) foram separadas através eletroforese em gel acrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueados por leite 5% durante 60 min à temperatura ambiente e incubadas com anticorpo primário anti-TRPV1 (1:500, Calbiochem, Oncogene, EUA, 35 kDa) durante 48 horas a 4°C com tampão de bloqueio [PBS 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% Tween 20]. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado HRP anti-coelho (1:2000, Jackson, USA) e novamente lavadas. As membranas foram reveladas com kit de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.) como descrito no manual de instruções. A taxa de densidade óptica TRPV1/ β -actina foi utilizada para o cálculo da expressão gênica de TRPV1.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados comportamentais foram expressos como média + erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância ANOVA de medidas repetidas (para interação em relação ao tempo, tratamento e tratamento x tempo). As comparações *post-hoc* foram realizadas com o teste de Bonferroni usando o Software SPSS. O nível de significância foi $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

Abaixo, serão apresentados os resultados após os tratamentos na hiperalgesia inflamatória aguda e neuropática.

7.1 RESULTADOS COMPORTAMENTAIS NA DOR INFLAMATÓRIA AGUDA: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ACETILCOLINA, BRADICININA, GLUTAMATO, SEROTONINA, HISTAMINA E SUBSTÂNCIA P NA DOR INFLAMATÓRIA AGUDA

Foi realizada administração de CFA (20 μ L) intraplantar na pata direita dos animais, e os grupos foram divididos em: Grupo Controle: Aplicação de CFA intraplantar + aplicação de 20 μ L de salina no acuponto *Zusanli* E36, e Aplicação de CFA intraplantar + acupuntura manual no acuponto *Zusanli* E36 por 20 minutos, sendo que o acuponto foi estimulado a cada 5 minutos.

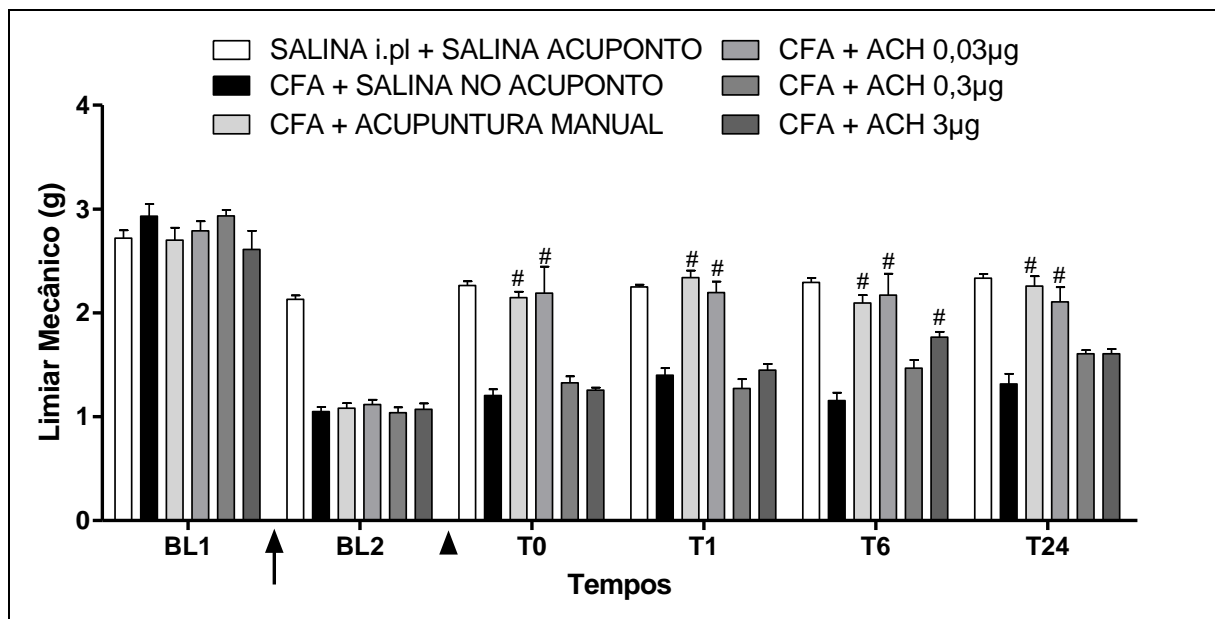
Os animais restantes foram divididos em 6 grupos e foi realizado o teste dose-efeito das drogas: Serotonina, Bradicinina, Glutamato, Acetilcolina, Histamina e Substância P, sendo que para cada droga foram estabelecidas 3 doses diferentes: 3 μ g, 0,3 μ g e 0,03 μ g. sendo administrado um volume de 20 μ L via subcutânea. Observou-se um efeito no acuponto *Zusanli* (E36) após aplicação de CFA intraplantar (20 μ L).

7.1.1 Efeitos da administração de acetilcolina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 1. A administração intraplantar de CFA induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 4 horas de indução da hiperalgesia inflamatória observado no tempo BL2. A aplicação de acupuntura manual foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela administração intraplantar de CFA significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Sugere-se que em animais tratados com Acetilcolina na dose de 0,03 μ g sobre o acuponto E36, houve participação do receptor M-2 reduzindo o processo de hiperalgesia induzido por CFA, em todos os tempos avaliados (T0, T1, T6 e T24 horas). Em

contrapartida, o mesmo efeito não foi observado sobre as doses de 0,3 e 3,0 μg . As curvas da Figura 1 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{4,125} = 6,78$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,125} = 65,35$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{20,125} = 5,06$; $p < 0,01$).

Figura 1 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Acetilcolina nas doses de 0,03 μg , 0,3 μg e 3,0 μg no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após administração intraplantar de CFA (Indução da hiperalgesia representada pela seta). Acetilcolina, acupuntura manual ou salina foram administrados após quatro horas da administração de CFA intraplantar (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média + E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CFA+Salina ($p < 0,05$).



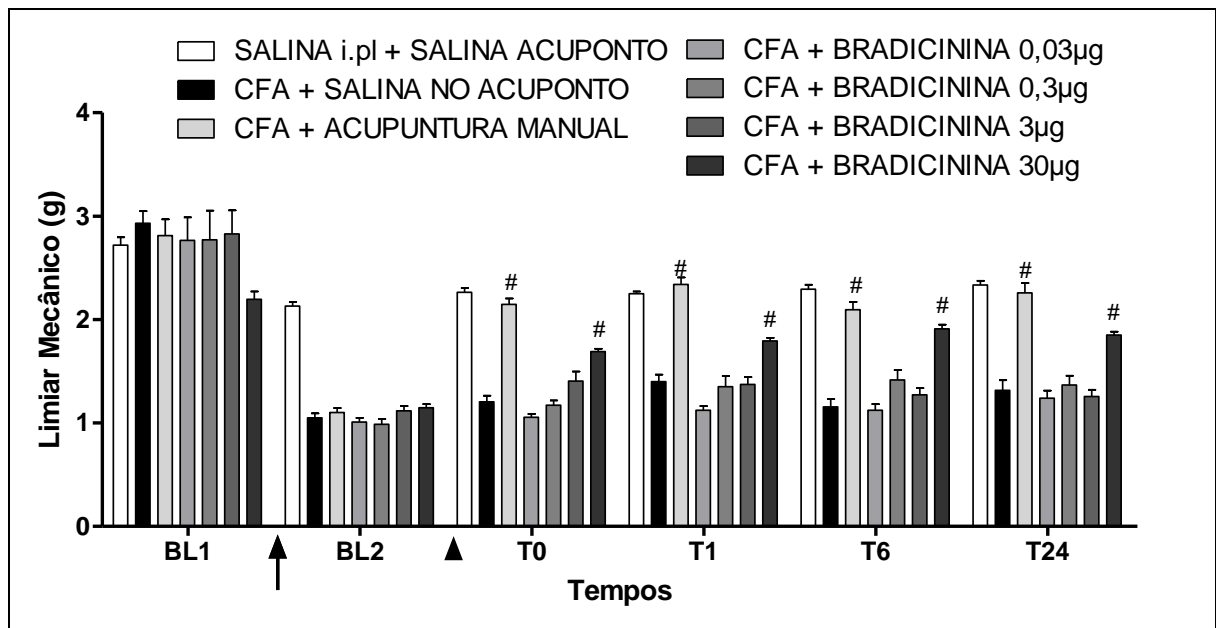
FONTE: DA AUTORA

7.1.2 Efeitos da administração de Bradicinina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 2. A administração intraplantar de CFA induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 4 horas de indução da hiperalgesia inflamatória observado no tempo BL2. A aplicação de acupuntura manual foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalérgicos induzidos pela administração intraplantar de CFA significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Em animais tratados com Bradicinina nas doses 0,03 μg , 0,3 μg e 3,0 μg sobre o acuponto E36, suspeita-se que não houve participação do receptor B1 nas doses testadas e nos seguintes tempos (T0, T1, T6 e T24 horas). As curvas da Figura 2 foram

diferentes quanto ao tratamento ($F_{5,35}=76,194$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,175}=196,397$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,125}=11,281$; $p < 0,05$).

Fig 2 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Bradicinina nas doses de 0,03 μ g, 0,3 μ g, 3,0 μ g e 30 μ g no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após administração intraplantar de CFA (Indução da hiperalgesia representada pela seta). Bradicinina, acupuntura manual ou salina foram administrados após quatro horas da administração de CFA intraplantar (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média + E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CFA+Salina ($p < 0,05$).

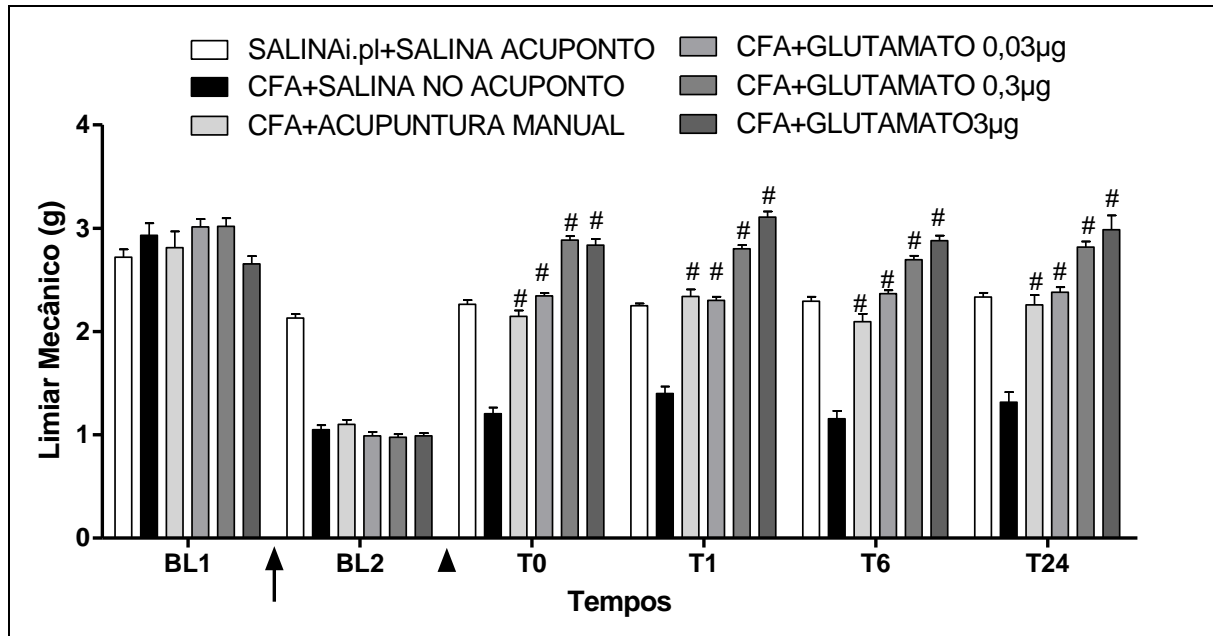


FONTE: DA AUTORA

7.1.3 Efeitos da administração de Glutamato no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 3. A administração intraplantar de CFA induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 4 horas de indução da hiperalgesia inflamatória observado no tempo BL2. Em animais tratados com Glutamato nas 3 doses (0,03 μ g 0,3 μ g e 3,0 μ g) sobre o acuponto E36, sugere-se que há participação de seu receptor (Glu) mediante efeito hiperalgésico da administração de CFA intraplantar. Houve redução da hiperalgesia mecânica em todos os tempos avaliados (T0, T1, T6 e T24 horas). As curvas da Figura 3 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{5,30}=273,580$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,150}=370,613$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{25,150}=37,247$; $p < 0,05$).

Fig 3 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Glutamato nas doses de 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após administração intraplantar de CFA (Indução da hiperalgesia representada pela seta). Glutamato, acupuntura manual ou salina foram administrados após quatro horas da administração de CFA intraplantar (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média + E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CFA+Salina ($p < 0,05$).

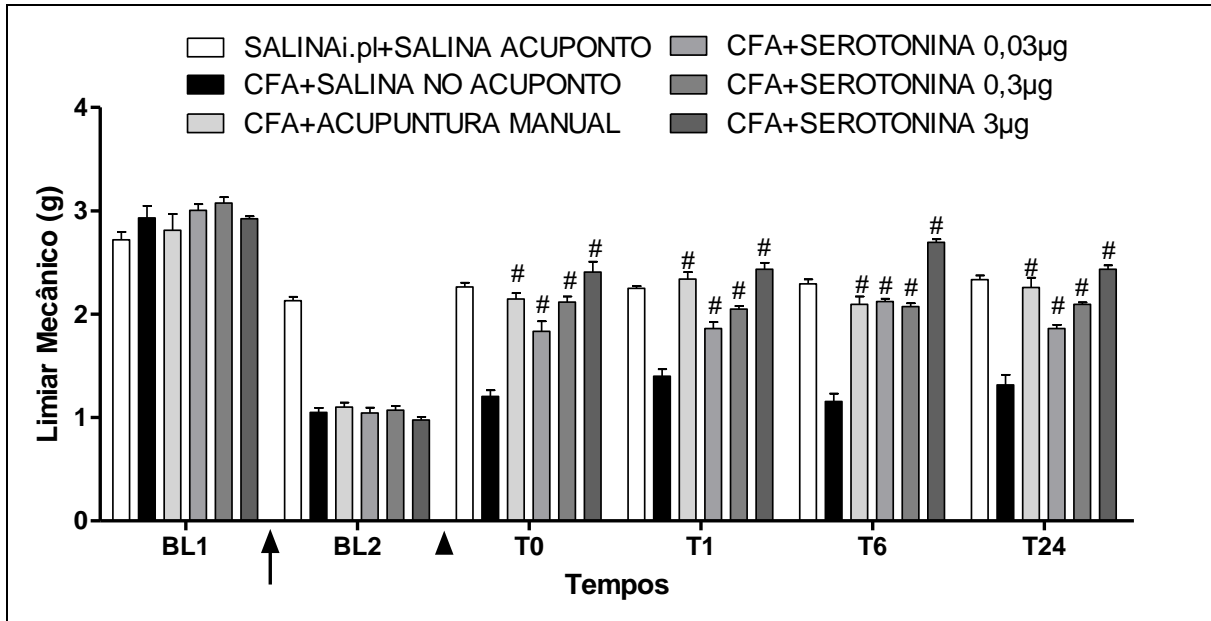


FONTE: DA AUTORA

7.1.4 Efeitos da administração de Serotonina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 4. A administração intraplantar de CFA induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 4 horas de indução da hiperalgesia inflamatória observado no tempo BL2. Em animais tratados com Serotonina nas 3 doses (0,03 μ g 0,3 μ g e 3,0 μ g) sobre o acuponto E36, observou-se uma redução da hiperalgesia após administração de CFA intraplantar em todos os tempos avaliados (T0, T1, T6 e T24 horas), sugerindo assim que há participação do receptor 5HT1 nas doses testadas. As curvas da Figura 4 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{5,30}=180,232$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,150}=373,949$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{25,150}=24,504$; $p < 0,01$).

Fig 4 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Serotonina nas doses de 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após administração intraplantar de CFA (Indução da hiperalgisia representada pela seta). Serotonina, acupuntura manual ou salina foram administrados após quatro horas da administração de CFA intraplantar (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média + E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CFA+Salina ($p < 0,05$).

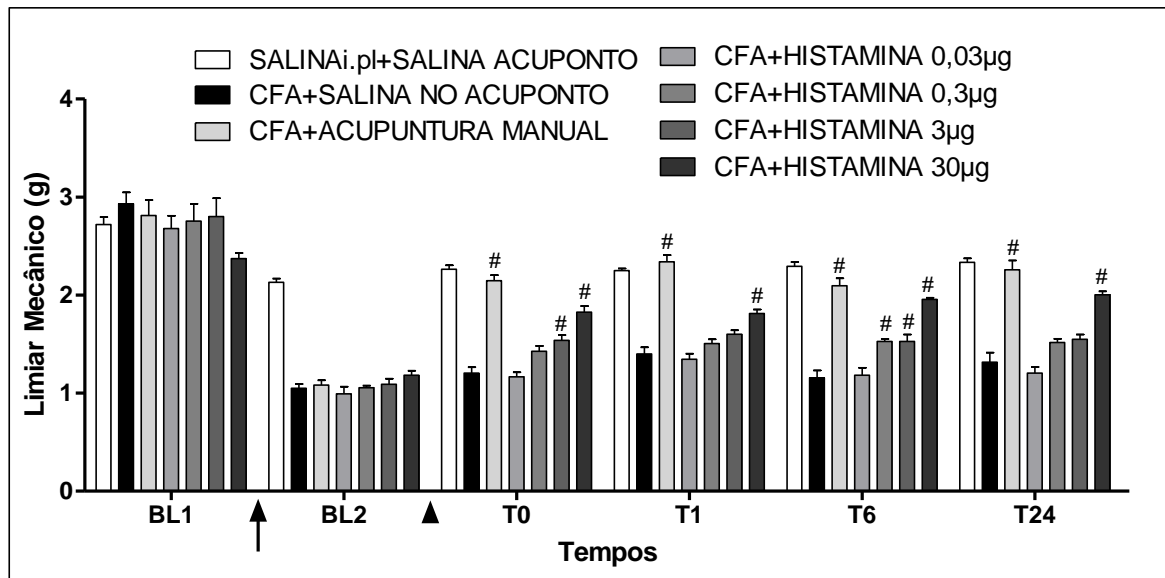


FONTE: DA AUTORA

7.1.5 Efeitos da administração de Histamina no acuponto E36 sobre a hiperalgisia induzida por CFA

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 5. A administração intraplantar de CFA induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 4 horas de indução da hiperalgisia inflamatória observado no tempo BL2. A aplicação de acupuntura manual foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela administração intraplantar de CFA significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Em animais tratados com Histamina nas doses 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g sobre o acuponto E36, não se observou um efeito reduzido de hiperalgisia após a administração de CFA intraplantar nos tempos avaliados (T0, T1, T6 e T24 horas), sugerindo que não há participação dos receptores H3 nas doses testadas. As curvas da Figura 5 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{5,35}=1,09$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,175}=277,288$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,175}=13,533$; $p > 0,05$).

Fig 5 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Histamina nas doses de 0,03 μ g, 0,3 μ g, 3,0 μ g e 30 μ g no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após administração intraplantar de CFA (Indução da hiperalgesia representada pela seta). Histamina, acupuntura manual ou salina foram administrados após quatro horas da administração de CFA intraplantar (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média + E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CFA+Salina ($p < 0,05$).

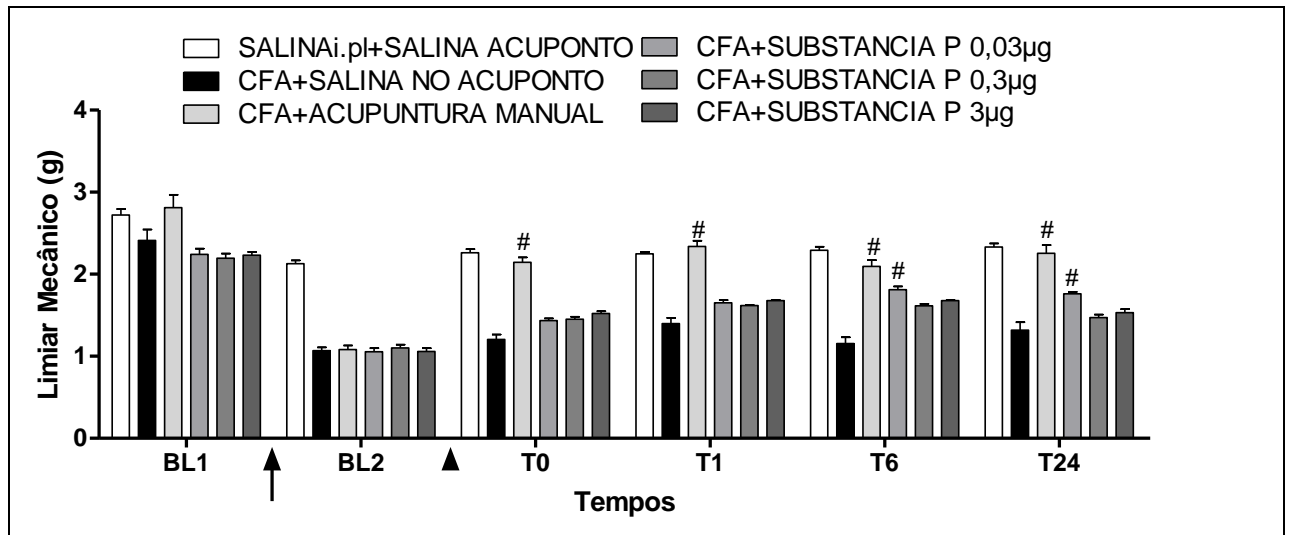


FONTE: DA AUTORA

7.1.6 Efeitos da administração de Substância P no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CFA

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 6. A administração intraplantar de CFA induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 4 horas de indução da hiperalgesia inflamatória observado no tempo BL2. A aplicação de Substância P nas doses de 0,03 μ g nos tempos T1, T6 e T24, 0,3 μ g nos tempos T0 e T6 e 3 μ g nos tempos T0, T1 e T6, sendo capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela administração intraplantar de CFA significativamente, observando a participação de seu receptor SP. As curvas da Figura 6 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{5,30}=291,991$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{6,150}=253,959$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{36,150}=19,353$; $p < 0,05$).

Fig 6 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Substância P nas doses de 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após administração intraplantar de CFA (Indução da hiperalgesia representada pela seta). Substância P, acupuntura manual ou salina foram administrados após quatro horas da administração de CFA intraplantar (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média + E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CFA+Salina ($p < 0,05$).



FONTE: DA AUTORA

Tabela 2 - Porcentagem de aumento do limiar em relação ao BL2 para acupuntura manual (MA) e demais mediadores na melhor dose em todos os tempos avaliados.

Tempos	MA	Ach 0,03	Brad 30	Glut 3	Ser 3	Hist 30	SP 0,03
T0	98	96	48	186	146	55	36
T1	116	97	56	214	149	53	56
T6	93	95	67	191	176	66	72
T24	108	89	61	202	149	70	67

FONTE: DA AUTORA

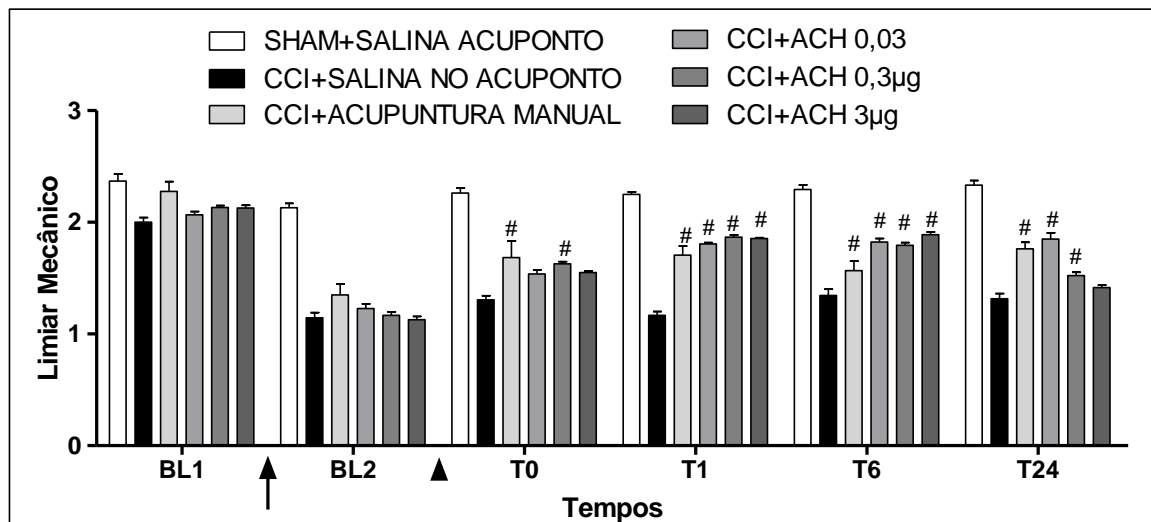
7.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ACETILCOLINA, BRADICININA, GLUTAMATO, SEROTONINA, HISTAMINA E SUBSTÂNCIA P NA DOR NEUROPÁTICA

Após a CCI, aguardou-se um tempo de 72 horas para instalação da hiperalgesia neuropática, período no qual acontece a diminuição do limiar mecânico e aumento da nocicepção de acordo com Austin, *et al.*, 2012. Os animais foram divididos em 6 grupos e foi realizado o teste dose-efeito das drogas: Serotonina (5HT), Bradicinina (B1) Glutamato (Glu), Acetilcolina (Ach), Substância P(SP) e Histamina (H3), sendo que para cada droga foram estabelecidas 3 doses diferentes: 3 μ g, 0,3 μ g e 0,03 μ g.

7.2.1 Efeitos da administração de Acetilcolina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 7. A cirurgia de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 72 horas de indução da hiperalgesia neuropática observada no tempo BL2. A aplicação de acupuntura manual foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela CCI significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Em animais tratados com Acetilcolina 0,03 µg sobre o acuponto E36, o efeito hiperalgésico CCI foi reduzido em todos os tempos avaliados (T0, T1, T6 e T24 horas). As doses de 0,3 e 3,0 µg foram capazes de alterar o efeito hiperalgésico em todos os tempos, exceto no T24, sugerindo que há participação dos receptores M-2 neste processo. As curvas da Figura 7 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{4,125} = 28,260$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,125} = 252,375$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{20,125} = 15,228$; $p < 0,01$).

Fig 7 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Ach nas doses 0,03µg, 0,3µg e 3,0µg no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após CCI (Indução da neuropatia representada pela seta). Ach, acupuntura manual ou salina foram administrados após 72 horas da CCI (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média± E.P.M de 6 animais ($p < 0,01$). (#) Diferentes do grupo CCI+Salina ($p < 0,05$).

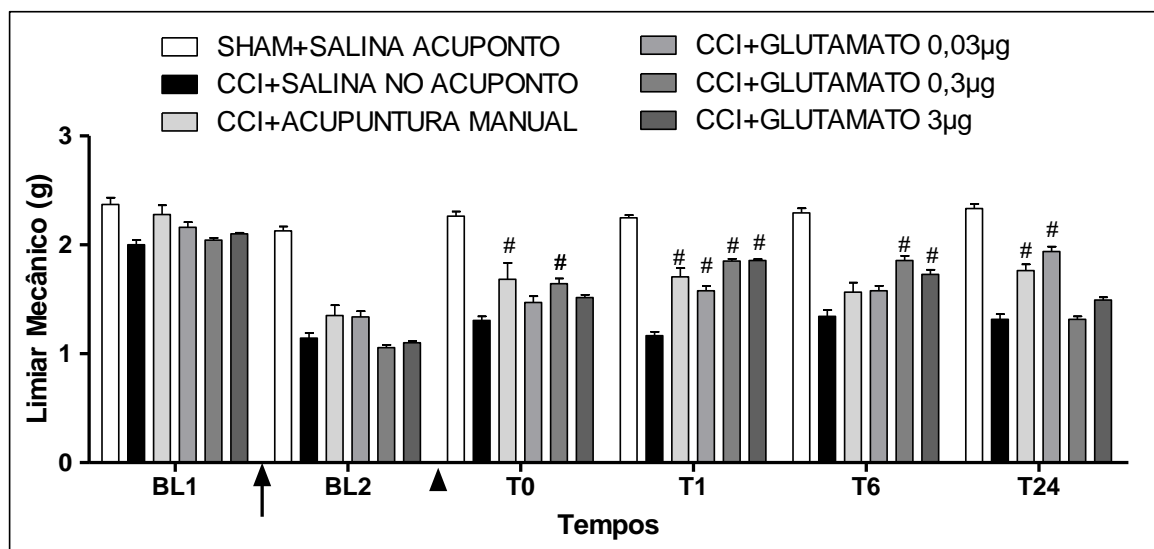


FONTE: DA AUTORA

7.2.2 Efeitos da administração de Glutamato no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 8. A cirurgia de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 72 horas de indução da hiperalgesia neuropática observada no tempo BL2. A aplicação de acupuntura manual foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela CCI significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Em animais tratados com Glutamato na dose 0,03 µg sobre o acuponto E36, o efeito hiperalgésico CCI foi reduzido nos tempos avaliados (T1, e T24 horas). As doses 0,3 µg e 3 µg de Glutamato foram capazes de alterar o efeito hiperalgésico nos tempos T1 e T6, sugerindo que há participação do receptor Glu. As curvas da Figura 8 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{4,25} = 21,343$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,125} = 224,695$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{20,125} = 17,385$; $p < 0,01$).

Fig 8 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Glutamato nas doses 0,03µg, 0,3µg e 3,0µg no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após CCI (Indução da neuropatia representada pela seta). Glutamato, acupuntura manual ou salina foram administrados após 72 horas da CCI (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média± E.P.M de 6 animais ($p < 0,01$). (#) Diferentes do grupo CCI+Salina ($p < 0,05$).

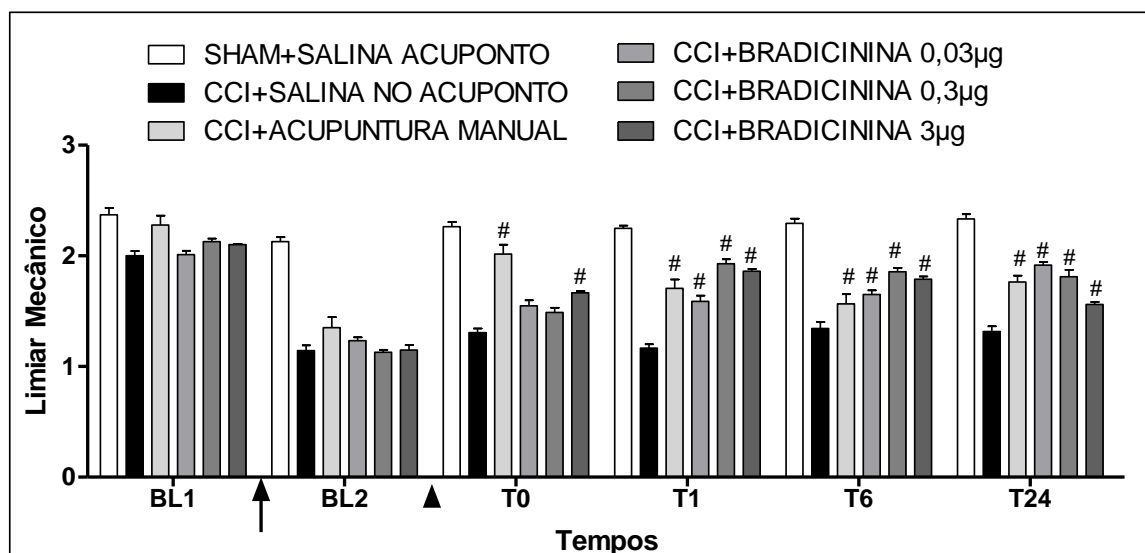


FONTE: DA AUTORA

7.2.3 Efeitos da administração de Bradicinina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 9. A cirurgia de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 72 horas de indução da hiperalgesia neuropática observada no tempo BL2. A aplicação de acupuntura manual foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela CCI significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Animais tratados com Bradicinina sobre o acuponto E36, obtiveram o efeito hiperalgésico após CCI em todas as doses (0,03 µg, 0,3 µg e 3 µg) em todos os tempos avaliados (T1, T6 e T24 horas) exceto no T0, podendo sugerir que há participação dos receptores B1 neste processo. As curvas da Figura 9 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{4,25} = 25,304$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,125} = 212,975$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{20,125} = 13,864$; $p < 0,01$).

Fig 9 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Bradicinina nas doses 0,03µg, 0,3µg e 3,0µg no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após CCI (Indução da neuropatia representada pela seta). Bradicinina, acupuntura manual ou salina foram administrados após 72 horas da CCI (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média± E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CCI+Salina ($p < 0,05$).

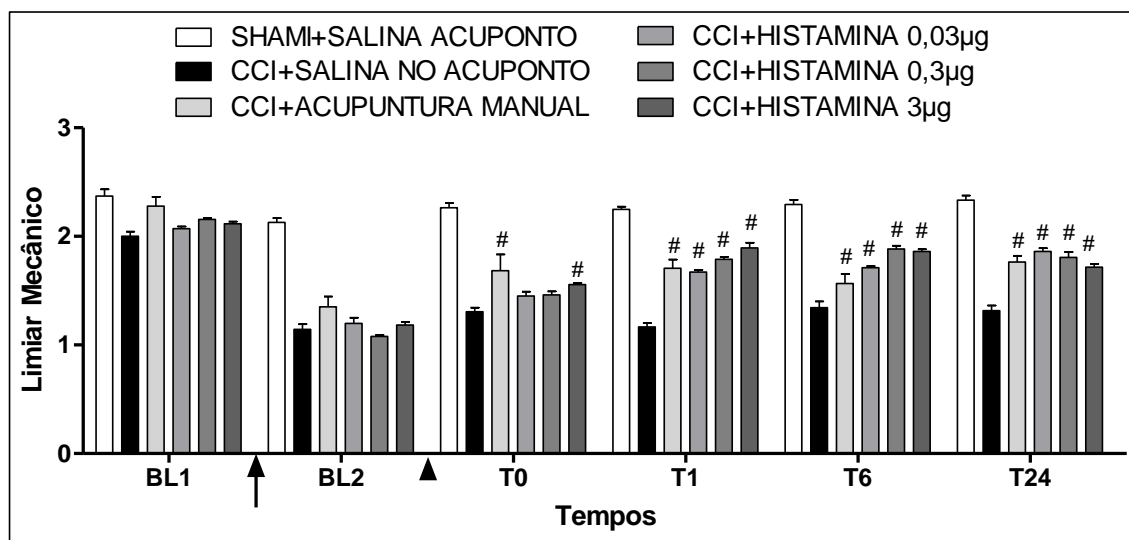


FONTE: DA AUTORA

7.2.4 Efeitos da administração de Histamina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 10. A cirurgia de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 72 horas de indução da hiperalgesia neuropática observada no tempo BL2. A aplicação de acupuntura manual foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela CCI significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Em animais tratados com Histamina sobre o acuponto E36, obtiveram o efeito hiperalgésico após CCI em todas as doses (0,03 μg , 0,3 μg e 3 μg) em todos os tempos avaliados (T1, T6 e T24 horas) exceto no T0, podendo sugerir que há participação dos receptores H-3 em todas as doses testadas. As curvas da Figura 10 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{4,25} = 28,001$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,125} = 253,914$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{20,125} = 14,202$; $p < 0,01$).

Fig 10 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Histamina nas doses 0,03 μg , 0,3 μg e 3,0 μg no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após CCI (Indução da neuropatia representada pela seta). Histamina, acupuntura manual ou salina foram administrados após 72 horas da CCI (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média \pm E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CCI+Salina ($p < 0,05$).

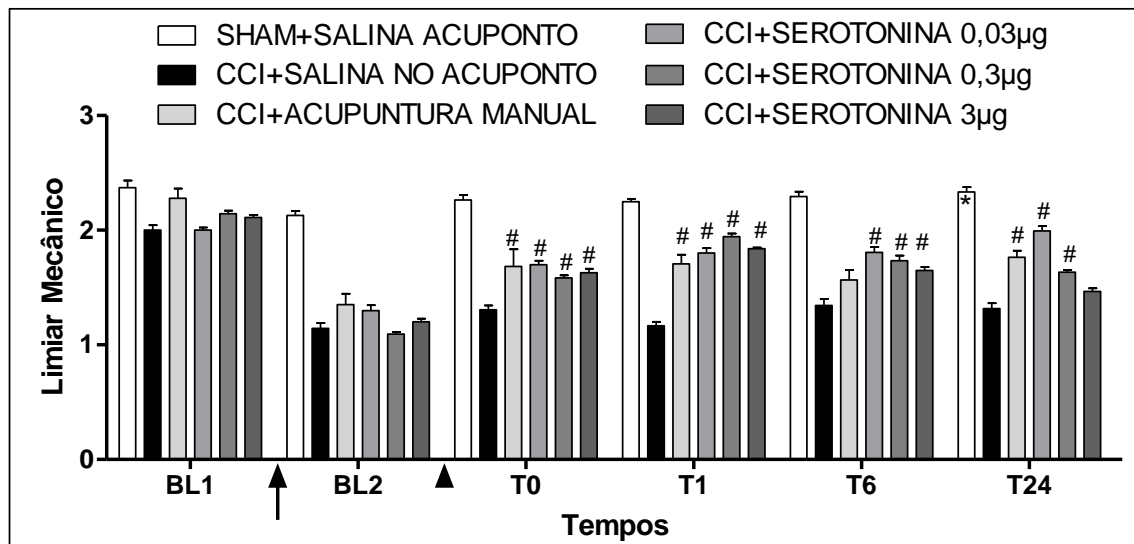


FONTE: DA AUTORA

7.2.5 Efeitos da administração de Serotonina no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 11. A cirurgia de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e consequente aumento da retirada da pata após 72 horas de indução da hiperalgesia neuropática observada no tempo BL2. A aplicação de acupuntura manual foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela CCI significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Em animais tratados com Serotonina sobre o acuponto E36, obtiveram o efeito hiperalgésico após CCI em todas as doses (0,03 μ g, 0,3 μ g e 3 μ g) em todos os tempos avaliados (T0, T1, T6 e T24 horas), sugerindo que há participação dos receptores 5HT1. As curvas da Figura 11 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{4,25} = 29,663$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,125} = 216,036$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{20,125} = 13,647$; $p < 0,01$).

Fig 11 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Serotonina nas doses 0,03 μ g, 0,3 μ g e 3,0 μ g no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após CCI (Indução da neuropatia representada pela seta). Serotonina, acupuntura manual ou salina foram administrados após 72 horas da CCI (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média \pm E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CCI+Salina ($p < 0,05$).

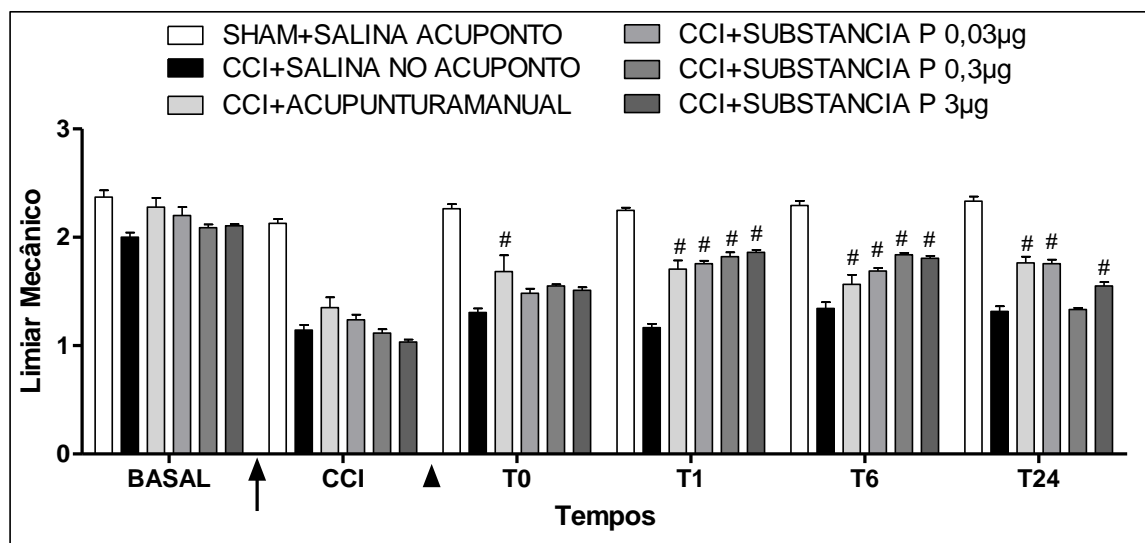


FONTE: DA AUTORA

7.2.6 Efeitos da administração de Substância P no acuponto E36 sobre a hiperalgesia induzida por CCI

Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 12. A cirurgia de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) induz uma redução no limiar mecânico nociceptivo e conseqüente aumento da retirada da pata após 72 horas de indução da hiperalgesia neuropática observada no tempo BL2. A aplicação de acupuntura manual foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pela CCI significativamente em todos os tempos observados (T0, T1, T6 e T24 horas). Em animais tratados com Substância P sobre o acuponto E36, obtiveram redução do efeito hiperalgésico após CCI em todas as doses (0,03 µg, e 3 µg) em todos os tempos avaliados (T1, T6 e T24 horas) exceto no T0, e redução do efeito hiperalgésico após CCI na dose 0,3 µg nos tempos T1 e T6, sugerindo que os receptores SP estão envolvidos neste processo. As curvas da Figura 12 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{4,25} = 24,047$; $p < 0,01$) e tempo ($F_{5,125} = 246,148$; $p < 0,01$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{20,125} = 13,748$; $p < 0,01$).

Fig 12 - Efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de acupuntura ou administração de Substância P nas doses 0,03µg, 0,3µg e 3,0µg no acuponto *Zusanli* (E36) em camundongos após CCI (Indução da neuropatia representada pela seta). Substância P, acupuntura manual ou salina foram administrados após 72 horas da CCI (início do tratamento representado pela ponta de seta). As colunas representam média± E.P.M de 6 animais. (#) Diferentes do grupo CCI+Salina ($p < 0,05$).



FONTE: DA AUTORA

7.3 RESULTADOS MOLECULARES SOBRE A ADMINISTRAÇÃO DE ACETILCOLINA, BRADICININA, HISTAMINA, SEROTONINA, SUBSTÂNCIA P E GLUTAMATO NA DOR INFLAMATÓRIA AGUDA

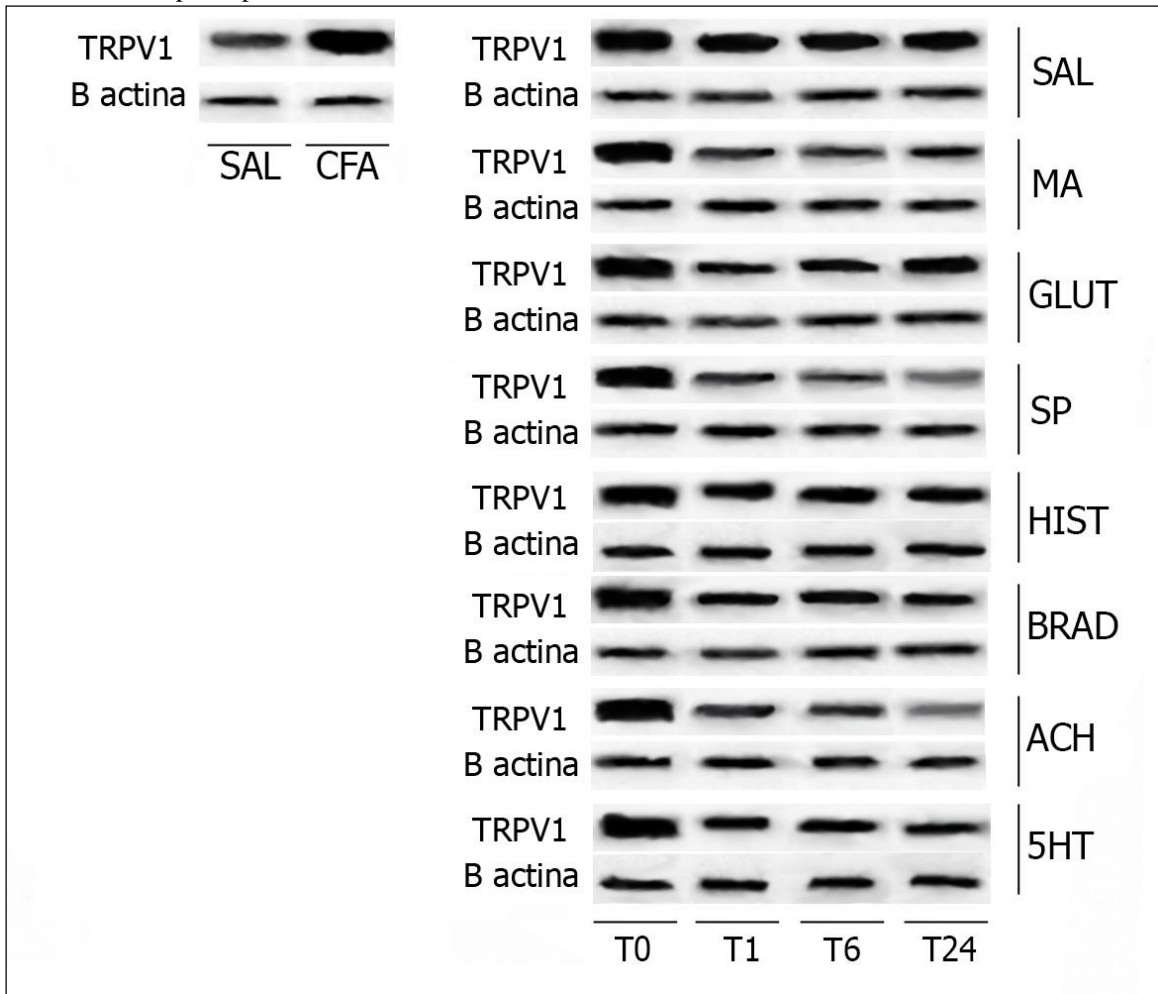
Para avaliar a expressão do receptor de canal iônico TRPV1 na hiperalgisia inflamatória aguda e após os tratamentos com acupuntura manual (MA), acetilcolina 3µg, histamina 30µg, bradicinina 30µg, serotonina 3µg, glutamato 3µg e substância P 3µg, os animais tiveram seus gânglios da raiz dorsal coletados em tempos específicos: T0 (imediatamente após o tratamento), T1, T6 e T24, sendo para cada tempo e droga, n=2 animais. Foram coletados gânglios nos tempos B1 (basal 1) e B2 (basal 2 – após a indução da hiperalgisia) para comparação com os tratamentos.

Tabela 3 - Porcentagem de aumento do limiar em relação ao BL2 para acupuntura manual (MA) e demais mediadores na melhor dose em todos os tempos avaliados

Tempos	MA	Ach 0,03	Brad 3	Glut 3	Ser 0,03	Hist 3	SP 0,03
T0	25	25	45	38	31	31	20
T1	26	47	62	69	38	60	42
T6	16	48	56	57	39	57	36
T24	31	51	36	36	53	45	42

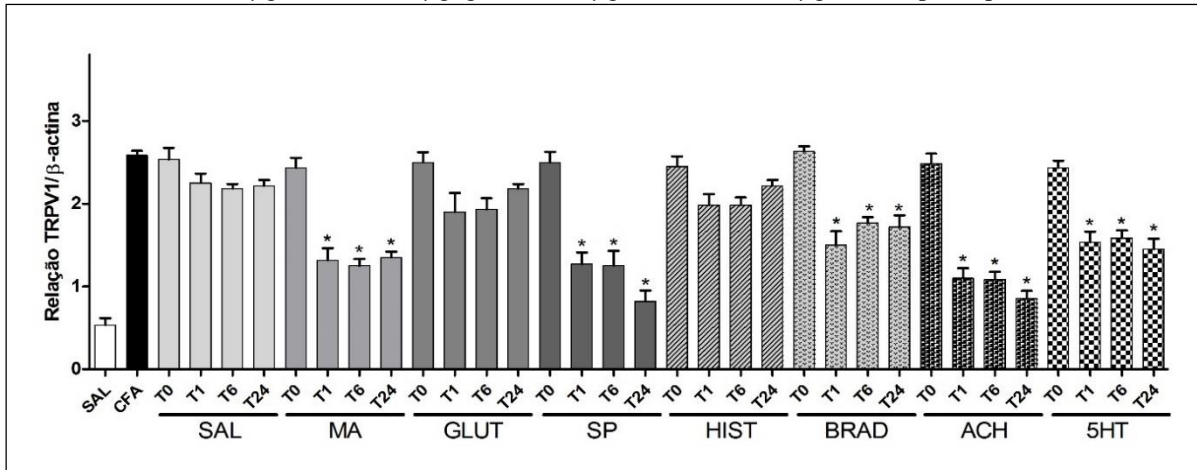
FONTE: DA AUTORA

Fig 12 - Avaliação da expressão do receptor de canal iônico TRPV1 nos gânglios da raiz dorsal de camundongos com hiperalgesia inflamatória induzida por CFA, tratados com salina, acupuntura manual, acetilcolina 30µg, histamina 30µg, bradicinina 30µg, serotonina 3µg, glutamato 3µg e substância P 3µg, coletados em tempos específicos: T0, T1, T6 e T24.



FONTE: DA AUTORA

Fig 13 - Representação gráfica da avaliação por *Western Blotting* na relação TRPV1/ β -actina diante da indução da hiperalgesia por CFA e tratamento com salina, acupuntura manual, acetilcolina 30µg, histamina 30µg, bradicinina 30µg, serotonina 3µg, glutamato 3µg e substância P 3µg, em tempos específicos.



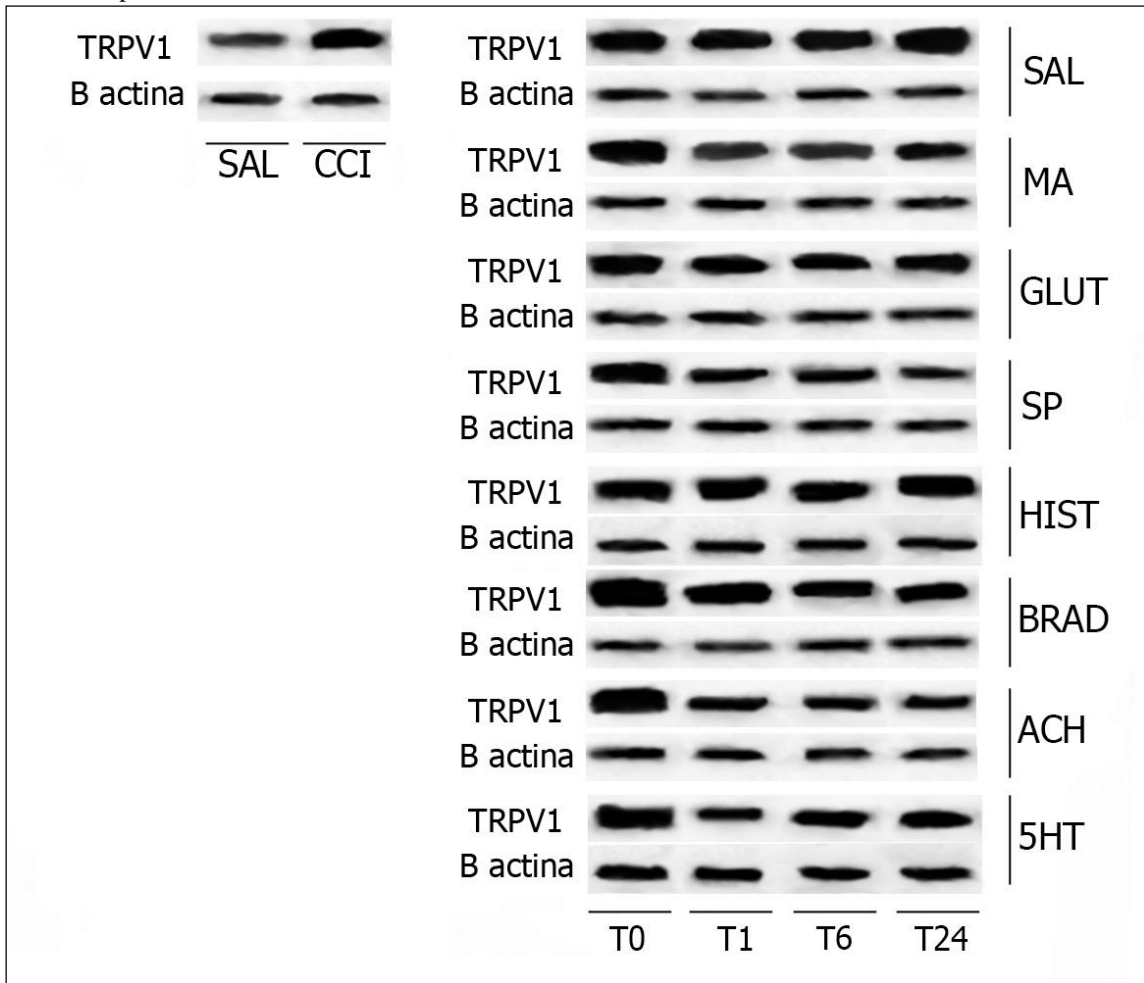
FONTE: DA AUTORA

Os animais que tiveram seus limiares reduzidos pelo agente nociceptivo (CFA), apresentaram uma maior expressão do receptor TRPV1 quando comparados aos animais salina. (Primeira e segunda barra). Os animais com hiperalgesia, tratados com salina no acuponto E36, assim como os tratados com glutamato 3 μ g e histamina 30 μ g, também apresentaram um aumento da expressão de TRPV1. Entretanto, animais com hiperalgesia tratados com acupuntura manual (MA), Substância P 3 μ g, Bradicinina 30 μ g, Acetilcolina 30 μ g e Serotonina 3 μ g, apresentaram uma menor expressão de TRPV1 quando comparados à animais com hiperalgesia não tratados, especialmente nos tempos T1, T6 e T24.

7.4 RESULTADOS MOLECULARES SOBRE A ADMINISTRAÇÃO DE ACETILCOLINA, BRADICININA, HISTAMINA, SEROTONINA, SUBSTÂNCIA P E GLUTAMATO NA DOR NEUROPÁTICA

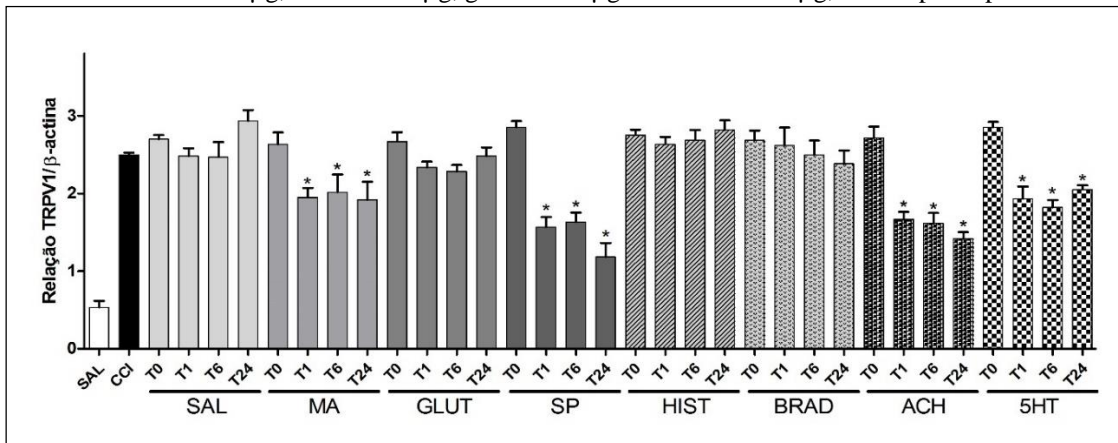
Para avaliar a expressão do receptor de canal iônico TRPV1 na hiperalgesia neuropática e após os tratamentos com acupuntura manual (MA), acetilcolina 3 μ g, histamina 3 μ g, bradicinina 3 μ g, serotonina 3 μ g, glutamato 3 μ g e substância P 3 μ g, os animais tiveram seus gânglios da raiz dorsal coletados em tempos específicos: T0 (imediatamente após o tratamento), T1, T6 e T24, sendo para cada tempo e droga, n=2 animais. Foram coletados gânglios nos tempos B1 (basal 1) e B2 (basal 2 – após a indução da hiperalgesia) para comparação com os tratamentos.

Fig 14 - Avaliação da expressão do receptor de canal iônico TRPV1 nos gânglios da raiz dorsal de camundongos com hiperalgesia neuropática induzida por CCI, tratados com salina, acupuntura manual, acetilcolina 3µg, histamina 3µg, bradicinina 3µg, serotonina 3µg, glutamato 3µg e substância P 3µg, coletados em tempos específicos: T0, T1, T6 e T24.



FONTE: DA AUTORA

Fig 15 - Representação gráfica da avaliação por *Western Blotting* na relação TRPV1/β-actina diante da indução da hiperalgesia por CFA e tratamento com salina, acupuntura manual, acetilcolina 30µg, histamina 30µg, bradicinina 30µg, serotonina 3µg, glutamato 3µg e substância P 3µg, em tempos específicos.



FONTE: DA AUTORA

Os animais que tiveram seus limiares reduzidos pela constrição crônica do nervo isquiático apresentaram uma maior expressão do receptor TRPV1 quando comparados aos animais salina. (Primeira e segunda barra). Os animais com hiperalgesia neuropática tratados com salina no acuponto E36, assim como os tratados com glutamato 3µg, bradicinina 3µg e histamina 3µg, também apresentaram um aumento da expressão de TRPV1. Entretanto, animais com dor neuropática tratados com acupuntura manual (MA), Substância P 3µg, Acetilcolina 3µg e Serotonina 3µg, apresentaram uma menor expressão de TRPV1 quando comparados à animais com hiperalgesia não tratados, especialmente nos tempos T1, T6 e T24.

8 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram estabelecidos modelos animais de dor inflamatória e neuropática através da administração intraplantar de CFA na pata direita ou CCI. Os animais com dor inflamatória e neuropática apresentaram hiperalgesia mecânica e diminuição dos limiares evidenciadas por meio do teste comportamental de von Frey digital, assim como Farghali et al. (2016) e Lu et al. (2016) que também utilizaram o mesmo método para avaliação do limiar nociceptivo. Li et al. (2005) observaram que a administração intraplantar de CFA causou uma severa dor inflamatória, sendo iniciada nas primeiras 4 horas após sua administração. A estimulação manual no ponto de acupuntura *Zusanli* reduziu a hiperalgesia inflamatória em ambos os grupos de CFA e CCI.

Nossos resultados corroboram com outros que utilizaram o mesmo acuponto e obtiveram resultados semelhantes.

Cha et al. (2006 e 2010) Zhao et al. (2009), Chen et al. (2009) afirmaram que o acuponto *Zusanli* é capaz de reduzir a hiperalgesia neuropática e alodinia em camundongos. OH et al. (2006) também relataram que estimulação desse acuponto é capaz de reduzir desafios hiperalgésicos causados pelo CFA. De forma complementar, Zhao et al. (2012), Li et al. (2005) e Song et al. (2014) ressaltaram que quando este acuponto é estimulado através de agulhas de acupuntura, há um efeito de analgesia, degranulação de mastócitos e inibição de citocinas pró inflamatórias.

Pela primeira vez nestes modelos, o comportamento hiperalgésico dos animais foi reduzido quando foram injetados no acuponto *Zusanli* mediadores como acetilcolina, bradicinina e substância P (na dose de 0,03µg), e glutamato e serotonina nas doses de 0,03µg, 0,3µg e 3µg. Entretanto, substâncias como bradicinina e histamina foram capazes de vencer o desafio hiperalgésico provocado pelo CFA apenas na dose de 30µg.

No modelo de neuropatia, os comportamentos hiperalgésicos foram reduzidos pela administração de acetilcolina, histamina, glutamato, bradicinina, substância P e serotonina em todas as doses (0,03µg, 0,3µg e 3µg).

Os estados inflamatórios normalmente estão associados à dor decorrente de dano tecidual, exposição a estímulos químicos ou processos autoimunes (SCHIENE et al., 2011). Independente da origem da inflamação, este processo envolve a liberação de mediadores inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas, histamina e fatores de crescimento do nervo, os quais levam à dor persistente por meio de ativação sustentada e sensibilização de

nociceptores primários e de neurônios de segunda ordem envolvidos na transmissão do impulso nociceptivo (JULIUS; BASBAUM, 2001; MARCHAND et al., 2005). Entretanto, alguns estudos sugerem que embora estes mediadores sejam algícos, os mesmos podem participar do processo antinociceptivo através da ativação específica de seus receptores na acupuntura (MCDONALD et al., 2015; ZHANG et al., 2012; YAO et al., 2014; LEE et al., 2014).

Os processos nociceptivos, por sua vez, levam à sensibilização central, interpretados como hiperalgesia e/ou alodínia (SCHIENE, 2011). Diversos estudos utilizam o modelo de dor inflamatória animal induzida por injeção intraplantar de carragenina ou CFA no tecido periférico, refletindo em hiperalgesia primária (RUSKIN et al., 2009; YEN et al., 2009, RICKLIN; LAMBRIS, 2013).

Na inflamação da pata de camundongos, observa-se o desenvolvimento da alodínia mecânica, sendo esta uma resposta que indica a sensibilização marcante dos nociceptores decorrente da liberação de múltiplos mediadores inflamatórios.

Diante do processo hiperalgésico instalado, muitos estudos afirmam o papel anti hiperalgésico causado pela acupuntura através do estímulo mecânico produzido, sendo capaz de aumentar os limiares mecânicos uma vez diminuídos por desafios nociceptivos, aumentando o fluxo sanguíneo periférico e central, ativando mecanismos ascendentes que contribuem para a modulação do processo doloroso (WU et al., 2014; LIN et al., 2015; HSU et al., 2014; LI et al., 2005).

A manipulação de agulhas através da acupuntura, causa a estimulação de uma ampla variedade de receptores encapsulados e não encapsulados de acordo com Langevin et al. (2001), induzindo a ativação de fibras sensoriais aferentes (LUND; LUNDEBERG, 2006). Em um estudo realizado por Lee et al. (2014), foi observado que o veneno de abelha injetado no acuponto *Zusanli* (E36), foi capaz de reduzir o edema e respostas nociceptivas no modelo de dor inflamatória induzida por CFA. Goldman et al. (2010) observaram um aumento dos níveis de adenosina após a aplicação de acupuntura manual no *Zusanli*, enquanto era observado redução nos comportamentos nociceptivos nos modelos de dor inflamatória e neuropática. Ainda, em animais knockouts para receptores para adenosina, não apresentaram a mesma resposta. Além disso, Takano et al. (2012) utilizando o mesmo método em humanos, informaram que a concentração intersticial de adenosina aumentou após o tratamento com acupuntura manual, com duração de mais de 30 minutos. A adenosina é um nucleosídeo purinérgico, que atua como um potente inibidor endógeno dos processos inflamatórios em alguns tecidos. Além da liberação de adenosina, ATP e outras purinas, há também a liberação de neurotransmissores e mediadores químicos quando os acupontos são estimulados.

Através de estudos, Zhang et al. (2012) demonstraram uma transmissão de informações entre acupontos adjacentes e distantes ao longo dos meridianos. Esse processo é um cruzamento de terminais nervosos periféricos estando relacionado com a transmissão não sináptica. Alguns neurotransmissores e neuropeptídeos como glutamato, trifosfato de adenosina (ATP), substância P, peptídeo relacionado com o gene de calcitonina, e a neuroquinina A estão envolvidos nesse processo, podendo ser considerados como sinalizadores de transmissão ao longo dos meridianos.

Junying et al. (2012) relataram que vários estudos experimentais sobre a analgesia mediante a acupuntura têm mostrado que o sistema colinérgico está envolvido nesse processo e que quando receptores de acetilcolina são ativados, o efeito analgésico de acupuntura é significativamente aumentado. No presente estudo, os dados sugerem que a administração subcutânea da menor dose de acetilcolina (0,03µg) no *Zusanli* foi capaz de reduzir o processo de hiperalgesia inflamatória aguda causada pelo CFA. Por ser um importante neurotransmissor excitatório encontrado em todo o corpo, principalmente na junção neuromuscular, a acetilcolina apresenta uma variedade de efeitos sobre a percepção sensorial e percepção do controle da dor. Angela et al. (2007) comprovaram a presença de acetilcolina e acetilcolinesterase mediante a técnica de acupuntura em acupontos específicos, evidenciando que receptores de acetilcolina podem ser responsáveis pela transmissão da resposta ao estímulo do acuponto por vias ascendentes primárias e em diferentes regiões do cérebro, juntamente com peptídeos opióides, receptores de serotonina 5HT1 e outros neurotransmissores.

Em relação à outros mediadores, os resultados apresentados demonstram que a aplicação de substância P no *Zusanli*, na dose de 0,03µg, e bradicinina na dose de 30 µg reduziu os comportamentos hiperalgésicos no modelo de dor inflamatória por CFA. Relatos de Dray e Perkins (1993) e Chen e Johnson (2007) demonstraram que a substância P apresenta um papel importante como mediador químico e inflamatório em fenômenos como a vasodilatação, extravasamento de plasma e dor. Não está claro como esse peptídeo pode induzir efeitos semelhante ao da acupuntura manual. Uma das possíveis explicações seria a relação dos receptores da bradicinina e substância P na ativação de canais iônicos de potencial transiente vanilóide tipo 1 (TRPV1) (SCHUELERT et al., 2015). Nosso estudo é o primeiro a demonstrar a redução da hiperalgesia causada pela administração de bradicinina e substância P no ponto *Zusanli* durante o processo inflamatório.

Durante informações nociceptivas, o glutamato, neurotransmissor abundante em nosso corpo é capaz de ativar fibras sensoriais primárias como fibras Aδ e fibras C. (ZHAN et al., 2013). De igual modo, mediante sua administração em todas as doses (0,03µg, 0,3 µg e 3 µg)

no acuponto *Zusanli*, observou-se que este foi capaz de reduzir os comportamentos hiperalgésicos induzidos pelo CFA. Jang et al. (2004) observaram que a ativação dos receptores de glutamato produziu analgesia após a dor aguda e dor neuropática em ratos. Zhang et al. (2012) relataram que a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato facilita a transmissão nociceptiva em modelos de dor inflamatória e neuropática. Contudo, Soares et al. (2015) em um estudo com humanos, observou um efeito antinociceptivo após a administração subcutânea de glutamato durante a dor inflamatória aguda. Diante disso, discute-se sobre a possibilidade do envolvimento de diferentes receptores do glutamato em situações nociceptivas e não nociceptivas, demonstrando um duplo papel desse neurotransmissor. Atualmente não está bem elucidado até que ponto periféricamente o este contribui no processo de diminuição da hiperalgisia, havendo necessidade de maiores estudos na área (KATARZYNA et al., 2015).

No mesmo sentido, a serotonina, potente neurotransmissor e monoamina envolvida no controle inibitório da transmissão da dor, desempenha um papel crucial em muitos efeitos da acupuntura, inibindo a excitação de neurônios de segunda ordem na presença de hiperalgisia inflamatória. Nossos resultados demonstraram que todas as doses testadas de serotonina foram eficazes na redução dos comportamentos hiperalgésicos induzidos pelo CFA. Já se sabe que após a acupuntura manual, há um aumento de receptores 5HT em eritrócitos e medula espinal, demonstrando que há uma via serotoninérgica que participa de diversos sistemas controladores da dor (ANGELA et al., 2007). Ainda, Sun et al. (2005) observaram que houve efeito anti hiperalgésico após a aplicação de eletroacupuntura de 2Hz, mediada por receptores de 5HT1A e 5HT3. Essa inibição ocorre através da medula espinal pela ativação direta de receptores serotoninérgicos e indiretamente em interneurônios que atuam em receptores adrenérgicos e opioidérgicos (MILLAN, 2002). Além disso, Zhang et al. (2012) após administrar um antagonista do receptor 5HT1-A e realizar a técnica de eletroacupuntura de baixa frequência, observaram que o efeito da técnica era bloqueado, sugerindo que a serotonina participa do processo de analgesia pela acupuntura e eletroacupuntura.

Finalmente, nossos resultados demonstram que a administração de histamina no *Zusanli*, ocasionou um aumento do limiar mecânico e redução da hiperalgisia na dose de 30µg. Huang et al. (2012) demonstraram que após o tratamento com histamina no *Zusanli*, o limiar nociceptivo e a taxa de degranulação aumentaram comparados ao grupo controle, indicando que o efeito analgésico foi relacionado à ativação de mastócitos. Este receptor também foi ativado pelo estímulo mecânico induzido pela acupuntura, o que indica que a analgesia induzida pela acupuntura pode apresentar relação com a histamina liberada no local do ponto de acupuntura. No ponto existem alvos neuronais, incluindo fibras Aδ e fibras C, que respondem

à acupuntura manual por induzir a liberação central de opióides e a ativação de mastócitos, que está relacionada com a sensação histaminérgica de prurido. Na pele, a histamina é sintetizada pelo aparelho de Golgi, basófilos e mastócitos, e armazenada em grânulos. Os mastócitos podem ser ativados por imunoglobulinas, neurotransmissores ou forças mecânicas, expulsando os grânulos de histamina para fora da célula, liberando-a no ponto de acupuntura e ativando o receptor H1 (MENG et al., 2012). Ainda neste sentido, Huang et al. (2012) aplicaram uma dose de 100µg/ml de histamina no acuponto *Zusanli* (E36) em ratos Sprague-Dawley e observaram a redução dos comportamentos hiperalgésicos induzidos pelo CFA.

Estudos têm indicado que os mecanismos de dor neuropática originam de um aumento no disparo do neurônio aferente primário e, conseqüentemente, isto pode provocar a descarga ectópica e induzir dor espontânea, hiperalgesia (causada pelo estímulo nocivo acima do limiar) ou alodinia (causado por estimulação não nociva). A alodínia mecânica avaliada no modelo experimental de dor neuropática usado no presente estudo pela constrição do nervo isquiático em camundongos, envolve não somente vias neuronais, mas também células de Schwann, células satélites no gânglio da raiz dorsal, componentes do sistema imune periférico, micróglia e astrócitos espinhais. As citocinas inflamatórias exercem um papel fundamental na indução e manutenção da sensibilização em modelos experimentais de dor neuropática (SOMMER et al., 1998; 2001). Vários mediadores inflamatórios como PGE2, BK, NGF, histamina, 5-HT, IL-1β, TNF-α, glutamato, endotelina-1 e quimiocinas, podem ser liberados de axônios ou de células de Schwann danificadas, ou células satélites, mastócitos e leucócitos infiltrados (JI; STRICHARTZ, 2004).

Há vários estudos demonstrando que o TNF-α é um mediador importante do processamento nociceptivo em modelos experimentais de dor inflamatória e neuropática (SCHÄFERS et al., 2004; WEI et al., 2007). Entre os resultados apresentados nesses estudos, há demonstração das alodínias mecânica e térmica induzidas por TNF-α e do aumento da concentração dessa citocina na pata de animais após a injeção de diferentes estímulos inflamatórios como CFA em estudos de Chen et al. (2007), carragenina em estudos de Loram et al. (2007), albumina metilada em estudos de Vieira et al. (2009) ou formaldeído em estudos de Yamato et al. (2013).

Quando há lesão neuropática, há sensibilização de nociceptores por substâncias algôgenicas como acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrieno, substância P, fator de ativação plaquetária, íons potássio, prostaglandinas, tromboxano, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNFα), fator de crescimento do nervo (NGF) e AMPc (ROCHA et al., 2007; RUSCHEWEYH et al., 2004).

A liberação de substâncias indutoras de comportamentos hiperalgésicos também pode ser observada durante a técnica de acupuntura. Segundo Huang et al. (2012) após a inserção da agulha no acuponto há liberação de peptídeos, ativação mecânica de mastócitos e consequente liberação de histamina causando efeito analgésico. Os mesmos autores, considerando os fatos citados, testaram a administração de histamina via subcutânea (acuponto), e concluíram que a mesma provoca analgesia em diferentes segmentos.

Rocha et al. (2007) afirmaram que a histamina e bradicinina causam alterações em canais específicos como o TRPV1 e são capazes de reduzir o tempo pós hiperpolarização da membrana neural, acarretando assim uma diminuição do limiar de disparo da fibra nervosa, contribuindo com a hipótese, de que esses mediadores, são capazes de reduzir a atividade nociceptiva e alodinia mecânica mediante a ação da acupuntura pelo acuponto *Zusanli*. Além disso, Whei-bo, Yan e Fuxe (2013) relataram que a inserção da agulha na pele causa a liberação de neurotransmissores como o glutamato, e moléculas como ATP, Substância P, neuroquinina e CGPR. (DJOUHRI; LAWSON, 2004). Nossos resultados demonstram que todos os mediadores administrados no *Zusanli* induzem uma redução significativa nos comportamentos hiperalgésicos no modelo de neuropatia por constrição do ciático. Dessa forma, houve redução após administração de acetilcolina e serotonina em todas as doses e tempos avaliados e glutamato, bradicinina, histamina e substância P com a particularidade de não induzirem alteração nos comportamentos na avaliação inicial (T0), fato este que pode ser explicado pela modificação de múltiplos receptores no processo de sensibilização pela neuropatia, que poderia induzir a uma hiperalgesia sustentada que demandaria tempo para ser reduzida. Sabe-se que o glutamato e seus receptores participam na modulação de impulsos sensoriais periféricos, Djouhri e Lawson, (2004) corroborando com nossos resultados apresentaram efeito analgésico. Zhang et al. (2013) e Choi et al. (2005) demonstraram que a aplicação local de glutamato ativa fibras sensoriais primárias, especificamente A- δ e C. Lee et al. (2014) estudaram o papel desse neurotransmissor através da ação da acupuntura e relataram que a estimulação provocada pela técnica produz um aumento da atividade enzimática colinérgica, aumentando sua expressão no hipocampo de ratos machos. No ano de 2000, a via colinérgica foi relatada como sendo anti-inflamatória, possuindo propriedades de antagonizar ou regular respostas inflamatórias sistêmicas pelo SNC e o neurotransmissor acetilcolina (BOROVIKOVA et al., 2000). Song et al. (2014) sugeriram que o mecanismo anti-inflamatório da acupuntura realizada bilateralmente no *Zusanli* está relacionado com a via colinérgica e seu receptor. Assim, sugere-se que os mediadores administrados participam do processo de controle da hiperalgesia neuropática através de sua ação anti-inflamatória.

Em análises moleculares do receptor TRPV1 expresso nos gânglios da raiz dorsal, nossos resultados mostraram que em situações de estímulos nociceptivos, como estados inflamatórios causados pela administração de CFA e constrição do nervo isquiático, há um aumento da expressão de TRPV1 em relação à β -actina, e uma baixa expressão em grupos tratados com salina., podendo ser observado nas bandas e representações gráficas. Corroborando com nossos resultados, Lin et al. (2015) e Kaneko e Szallasi (2013) relataram que a funcionalidade do receptor TRPV1 está associada à hiperalgesia mecânica e térmica, sendo um receptor transitório que modula sinais elétricos e impulsos nociceptivos. Recentemente foi demonstrado que este receptor é altamente expresso nos gânglios da raiz dorsal, contribuindo para outros processos dolorosos.

Lin et al. (2015) ainda em seu mesmo estudo, ressaltaram que a acupuntura e a eletroacupuntura de baixa frequência são capazes de suprimir a hiperalgesia mecânica e alodinia, ressaltando em baixa expressão de TRPV1 e TRPV4, ativando vias de sinalização celular, indo de encontro com nossos resultados, que demonstraram que o tratamento com acupuntura manual reduziu a expressão de TRPV1 em ambos modelos de hiperalgesia.

Lu et al. (2016) observaram que em modelo de dor inflamatória causada pelo CFA administrado por via intraplantar, havia um aumento da expressão de TRPV1 em gânglios da raiz dorsal, apresentando resultados semelhantes aos nossos. Além disso, após camundongos serem tratados com eletroacupuntura de baixa frequência no acuponto E36, os animais apresentaram uma diminuição da expressão de TRPV1.

Corroborando ainda com nossos estudos, Jiang et al. (2013) relataram que a expressão de TRPV1 em gânglios da raiz dorsal de roedores foi eumentada após a indução da hiperalgesia neuropática por um modelo semelhante à CCI, denominado SNI. Adicionalmente, houve uma redução da expressão deste receptor em gânglios da raiz dorsal após os animais serem tratados com eletroacupuntura de baixa frequência também no acuponto E36.

Após o tratamento com glutamato nas doses de $3\mu\text{g}$ e histamina $30\mu\text{g}$ e $3\mu\text{g}$ na hiperalgesia induzida por CFA e CCI respectivamente e bradicinina $3\mu\text{g}$ na dor neuropática, observamos um aumento do limiar mecânico e redução do processo nociceptivo na avaliação comportamental. Contudo, obtivemos um resultado diferente na análise molecular da expressão de TRPV1, detectando um aumento da expressão desse receptor. Masuoka et al. (2016) relataram que a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato contribuem para a ativação ou sensibilização de TRPV1 em neurônios sensoriais na dor inflamatória. Além disso, Devesa et al. (2011) afirmaram que os receptores TRPV1 expressos em diversas regiões do sistema nervoso central como hipotálamo, cerebelo, córtex, bulbo olfatório, hipocampo e tálamo,

quando sensibilizados por agentes pró inflamatórios ou mediadores químicos como histamina e bradicinina, podem sofrer um aumento em sua expressão em gânglios da raiz dorsal, ou possivelmente uma modificação aguda em seu canal iônico.

Contribuindo com esses achados, Min et al. (2014) afirmaram que o receptor TRPV1 participa da transmissão fisiológica e sinalização celular da histamina em neurônios sensoriais.

No presente estudo, a administração de serotonina 3µg, substância P 3µg e acetilcolina 3µg e 30µg em modelos de hiperalgesia inflamatória e neuropática, promoveu redução da expressão de TRPV1 nos gânglios da raiz dorsal. Su et al. (2016) concluíram que a serotonina participa do processo antinociceptivo reduzindo a expressão de TRPV1 nos gânglios da raiz dorsal, ao administrar centralmente um antagonista do receptor de serotonina 5HT2b, percebendo que a expressão do receptor aumentava. Em contrapartida, ao avaliar gânglios de animais administrados com serotonina, os mesmos tiveram a expressão do receptor diminuída.

Assim como a serotonina, a substância P atua diretamente no receptor TRPV1. Moraes, Kushmerick e Naves (2014), destacaram o efeito desse neuropeptídeo em neurônios sensoriais e órgãos periféricos, ressaltando sua ação no SNC: modular informações de neurônios sensoriais primários e receptores, atuando na transdução de informações nociceptivas, especialmente o TRPV1.

Adicionalmente, a diminuição da expressão de TRPV1 após o tratamento com acetilcolina, corroborou com estudos de Thyagarajan et al. (2014) afirmando que os canais TRPV1 estão envolvidos na liberação de acetilcolina, sendo este mecanismo ainda obscuro. Ainda assim, os autores demonstraram que a acetilcolina, liberada através de vesículas, apresenta um papel regulador da ativação de TRPV1, sendo esta através da liberação cálcio dependente, intracelular, observado em camundongos selvagens, sendo que o mesmo não ocorreu em camundongos *knockouts* para receptor TRPV1.

9 CONCLUSÃO

A acupuntura destacou-se como técnica eficaz mediante as hiperalgias induzida por CFA e CCI reduzindo comportamentos nociceptivos e aumentando os limiares mecânicos frente a estes estímulos.

É válido destacar a importância do acuponto *Zusanli* diante de seu efeito analgésico após estimulado. Foi demonstrado no presente estudo, que o comportamento hiperalgésico dos animais foi reduzido quando injetados no acuponto *Zusanli* os mediadores acetilcolina e substância P (na dose de 0,03µg), glutamato e serotonina (0,03µg, 0,3µg e 3µg), histamina e bradicinina 30µg por meio do desafio imposto pelo CFA. No modelo de CCI, a hiperalgia neuropática foi reduzida pela administração subcutânea no acuponto *Zusanli* de acetilcolina, serotonina, glutamato, bradicinina, histamina e substância P em todas as doses (0,03µg, 0,3µg e 3µg), demonstrando seus efeitos antinociceptivos frente à constrição do nervo isquiático.

Também foi possível evidenciar a redução da expressão dos receptores TRPV1 no GRD de animais com dor, demonstrando um possível mecanismo pelo qual a acupuntura pode reduzir a sensibilização e hiperalgia inflamatória e neuropática.

Dessa forma, é possível sugerir que os receptores H3, B1, 5HT1, Glu, SP e M2 presentes nos terminais aferentes primários localizados no acuponto *Zusanli* exercem um papel importante no início do efeito anti-hiperalgésico da acupuntura nos modelos de dor inflamatório induzida por CFA e dor neuropática induzida por CCI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIREZA, S; MARYAM, M; MOHAMMAD, H. The evaluation of curative effect of acupuncture: a review of systematic and meta-analysis studies. **Journal of Evidence Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 1. p.1-13, 2015.
- ALLEN, A. L.; CORTRIGHT, D. N.; MCCARSON, K. E. Formalin- or adjuvant-induced peripheral inflammation increases neurokinin-1 receptor gene expression in the mouse. **Brain Res**, v. 961, p. 147–152, 2003.
- ALMEIDA, M. S. et al.. Acupuncture increases the diameter and reorganisation of collagen fibrils during rat tendon healing.. **Acupunct Med**, v. 33, p. 51–57, 2015.
- ANGELA, H; JOHN, H; ZHANG, C. **Electroacupuncture; a practical manual and resource**, Churchill Livingstone Elsevier, Spain, 2007.
- AUSTIN, P. et al. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 61, p. 1-6, Mar, 2012.
- AL-AMIN, H. et al. Alteration of GABAergic and glycinergic mechanisms by lidocaine injection in the rostral ventromedial medulla of neuropathic rats. **Pain**, v. 149, p. 89-99, 2010.
- BAEUMLER, P. et al. Effects of Acupuncture on Sensory Perception: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos One**, v. 9, p. 1-40, 2014.
- BARON, R; BINDER, A. How neuropathic is sciatica? the mixed pain concept. **Orthopade**, v. 33, n. 5, p. 568-575, 2004.
- BASBAUM, A. I. et al. Distinct neurochemical features of acute and persistent pain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, p. 7739–7743, 1999.
- BASBAUM, A.I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 16, n. 139, p. 267-284, Out, 2009.
- BENARROCH, E. Descending monoaminergic pain modulation bidirectional control and clinical relevance. **Neurology**, v. 71, p. 217-221, Jul, 2008.
- BENNET, G.; XIE, Y. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.
- BERUMEM, L. et al. Serotonin receptors in hippocampus. **The Scientific World Journal**, v. 1, p. 1-15, 2012.

BOROVIKOVA, L.V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, p. 458-462, 2000.

BOUCHER, T. J. et al. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. **Science**, v. 290, p. 124-127, 2000.

BUCLEY, C. et al. Pro-resolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 20, p. 315–327, Mar, 2014.

BOURQUIN, A. F. et al. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. **Pain**, v. 122, p. 1-14, 2006.

CAMPBELL, J. N.; MEYER, R.A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**, v. 52,n. 1, p. 77-92, 2006.

CARVALHO, W.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. modulação periférica e avanços terapêuticos. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 48, p. 137 – 158, 1998.

CHEN, X. H; HAN, J. S. Analgesia induced by electroacupuncture of different frequencies is mediated by different types of opioid receptors: Another cross-tolerance study. **Behav Brain Res**, v. 47, p. 143-149, 1992.

CHEN, G. et al. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. **Mol Pain**, v. 6, p. 1-13, 2007.

CHENG, R. S; POMERANZ B. Electroacupuncture analgesia could be mediated by at least two pain-relieving mechanisms; endorphin and non-endorphin systems. **Life Sci**, v. 25,p. 1957-1962, 1979.

CHO, Z. H. et al. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 2670 –2673, 1998.

CHOI, B. et al. Involvement of ionotropic glutamate receptors in low frequency electroacupuncture analgesia in rats. **Neuroscience Letters**, v. 377, p. 185–188, 2005.

CHUNG, S. H.; DICKENSON A. Pain, enkephalin and acupuncture. **Nature**, v. 283, p. 243–244, 1980.

CHUNG, J. M. et al. Prolonged inhibition of primate spinothalamic tract cells by peripheral nerve stimulation. **Pain**, v. 19, p. 259-275, 1984.

CODERRE, T. J; VACCARINO A. L.; MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res**, v. 535, p. 155-158,

1990.

COLLIER, H.O; SCHNEIDER, C. Nociceptive response to prostaglandins and analgesic actions of aspirin and morphine. **Nat.New Biol**, v. 236, p. 141-143, 1972.

COSTIGAN, M. et al. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 1–32, 2009.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S. et al. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 3, p. 660-4, 1992.

CUNHA T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, n. 5, p. 1755-60, 2005.

CUNHA, T. et al. Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. immune and glial regulation of pain. **Iasp Press**, p. 67–83, Seattle, 2007.

CUNHA, T. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 3, p. 401-7, 2004.

DEVOR, M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **J Pain**, v. 7, n. 1, p. 3-12, 2006.

DEVESA, I. et al. Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis. **Journal of Inflammation Research**, v. 4, p. 67-81, 2011.

DJOUHRI, L.; LAWSON, S. N. A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 46, p. 131–145, 2004.

DRAY, P. et al. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends and neurosci.**, v. 16, p. 19-144, 1993.

ERICHSEN, H.;MUNRO, B. Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. **Pain**, v. 98 p. 51-61,2002.

FANG, L. I. et al. What is the acupoint? A preliminary review of acupoints. **Pain Medicine**, v. 00, p. 1–10, 2015.

FARGHALI, H; MAHMOUD, A; ABDEL-SATER,K. Effect of dexmedetomidine and cold

stress in a rat model of neuropathic pain: Role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . **Eur J Pharmacol**, v. 10, p. 40-46, 2016.

FERREIRA, S. H. et al. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 110, n. 3, p. 1227-31, Nov 1993.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat. New Biol**, v. 240, p. 200-203, 1972.

FERREIRA, S. H; LORENZETTI, B. B; DE CAMPOS, D. I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, v. 42, p. 365-371, 1990.

GOLDMAN, N., et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**, v. 13, p. 883-888, 2010.

GREGORY, N. et al. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **J Pain**, v. 14, p. 1-11. Nov, 2013.

GROSSKREUTZ, J. et al. Capsaicin blocks tetrodotoxin-resistant sodium potentials and calcium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve in vitro. **Neurosci Lett**, v. 12, n. 1, p. 49-52, 1996.

GUAN, J. S., et al. Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of D-opioid receptors and opioid analgesia. **Cell**, v. 122, p. 619–631, 2005.

HAGA, T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. **Proc. Jpn. Acad**, v. 89, p. 226-256, 2013.

HAN, J. S; TERENIUS, L. Neurochemical basis of acupuncture analgesia. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 22, p. 193-220, 1982.

HANG, J. et al. Neural acupuncture unit: a new concept for interpreting effects and mechanisms of acupuncture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2 p. 23, 2012.

HEERA Y., et al. Nicotinic acetylcholine receptors mediate the suppressive effect of an injection of diluted bee venom into the gv3 acupoint on oxaliplatin-induced neuropathic cold allodynia in rats. **Biol. Pharm**, v. 38, p. 710–714, 2015.

HONORÉ, P. et al. Spinal substance p receptor expression and internalization in acute, short-term, and long-term inflammatory pain states. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 7670–7678, Sep, 1999.

HOUCK, C. S., et al. Sensory fibers resistant to the actions of tetrodotoxin mediate

nocifensive responses to local administration of endothelin-1 in rats. **Pain**, v. 110, n. 3, p. 719-26, 2004.

HUANG, F. et al. Clinical effectiveness of laser **acupuncture** in the treatment of temporomandibular joint disorder. **J Formos Med Assoc**, v. 113, p. 535-9. 2012.

HSU, C. et al. New perspectives on patient expectations of treatment outcomes: results from qualitative interviews with patients seeking complementary and alternative medicine treatments for chronic low back pain. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p276, 2014.

HU, W.; CHEN, Z. Role of Histamine and Its Receptors in Cerebral Ischemia. **ACS Chem. Neurosci**, v.3,p.238–247, 2012.

HU, Z. L. A study on the histological structure of acupuncture points and types of fibers conveying needling sensation. **Chin. Med. J**, v. 92,p. 233, 1979.

HUANG, C. et al. Endomorphin and mu-opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture stimulation. **Neurosci Lett**, v. 294, p. 159-162, 2000.

JANG J. H, et al. Peripheral glutamate receptors contribute to mechanical hyperalgesia in a neuropathic pain model of the rat. **Neuroscience**, v. 128, p. 169–176, 2004.

JI, R. R. et al. Central sensitization and LTP: Do pain and memory share similar mechanisms? **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 12, p. 696–705, 2003.

JI, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Science Signaling**, v. 2004, n. 252, p. 1-14, 2004.

JR, W. The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. **Exp Brain Res**, v.196, p.5–11, 2009.

JULIUS, D; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 13, n. 413, p. 203-10, 2001.

JUNYING, W. et al. Acupuncture effects on the hippocampal cholinergic system in a rat model of neuropathic pain. **Neural Regen Res** v. 25, n. 7, p. 212–218, Jan, 2012.

RUSKIN, D. et al. Reduced Pain and Inflammation in juvenile and adult rats fed a ketogenic diet. **PLoS One**, v.4, p.8349, 2009.

KANEKO, Y.; SZALLASI, A. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 2474–2507, 2014.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of neural science**, 4th edition. McGraw-Hill Medical, 2000.

KATARZYNA, R. et al. Controls heat and punctuate hyperalgesia associated with nerve injury via TRPV1-Cre primary afferents. **PLOS ONE**, v. 10. p.1371, Jan, 2015.

KIM, K.W. et al. Effect of bee venom acupuncture on methamphetamine-induced hyperactivity, hyperthermia and Fos expression in mice. **Brain Res Bull**, v. 5, n. 1, p. 61-8, 2011.

KIM, S. K. et al. Effects of electroacupuncture on cold allodynia in a rat model of neuropathic pain: mediation by spinal adrenergic and serotonergic receptors. **Experimental Neurology**, v. 195, n.2, p.430-436, 2005.

KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J.L.; KRAYCHETE, A. C. Neuropathic Pain – Neurochemical Aspects. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 58, n. 5, p. 492-505, 2008.

KRAYCHETE, D.; CALASANS, M.; VALENTE, C. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Rev. Bras. Reumatol**, v. 46 n. 3, jun, 2006.

KUNG, H. et al. Electroacupuncture analgesia, stress responses, and variations in sensitivity in rats anesthetized with different sub-MAC anesthetics. **European Journal of Pain**. v.15. p.600-607, 2011.

LAN, L. et al. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR/NF- κ B pathway. **Int J Mol Med**. v.31,p75–80, 2013.

LANGEVIN, H. et al. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. **The FASEB Journal**, v. 15, p. 2275-2282, out, 2001.

LANGEVIN, H.; YANDOW, J. Relationship of Acupuncture Points and Meridians to Connective Tissue Planes. **The anatomical record (new anat.)** v. 269, p. 257–265, 2002.

LAO, L., et al. A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats. **Brain Res**, v. 1020, p. 18-29, 2004.

LEE, B. et al. Acupuncture stimulation improves scopolamine-induced cognitive impairment via activation of cholinergic system and regulation of BDNF and CREB expressions in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 338, 2014.

LEE, J. D. et al. Anti-inflammatory Effect of Bee Venom on Type II Collagen-Induced Arthritis. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 32, n. 3, p. 361–367, 2014.

LEE, J. H., et al. Electroacupuncture inhibits inflammatory edema and hyperalgesia through regulation of cyclooxygenase synthesis in both peripheral and central nociceptive sites. **Am J Chin Med**, v. 34, p. 981–988, 2006.

LEHUNG, L; CAHILL, C. TNF- α and neuropathic pain - a review. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 1-11, 2010.

LEITL, M. et al. Sustained pain-related depression of behavior: effects of intraplantar formalin and complete freund's adjuvant on intracranial self-stimulation (ICSS) and endogenous kappa opioid biomarkers in rats. **Molecular Pain**, v. 10, p. 1-11, 2014.

LEUNG, A. et al. The effect of Ting point (tendinomuscular meridians) electroacupuncture on thermal pain: a model for studying the neuronal mechanism of acupuncture analgesia. **J. Altern. Complement. Med**, v. 11, p. 653-661, 2005.

LI, W. N, et al. Analgesic Effect of Electroacupuncture on Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain in Mice: A Model of Antipain Treatment by Acupuncture in Mice. **Japanese Journal of Physiology**, v. 55, p. 339–344, 2005.

LIN, J. G; CHEN, W. L. Acupuncture analgesia: a review of its mechanisms of actions. **Am J Chin Med**, v. 36, p. 635–645, 2008.

LIN, J.; HSIEH, C.; LIN, Y. Analgesic Effect of Electroacupuncture in a Mouse Fibromyalgia Model: Roles of TRPV1, TRPV4, and Perk. **Plos One**, v. 10, p. 1-16, 2015.

LIU, C. N. Hyperexcitability in sensory neurons of rats selected for high versus low neuropathic pain phenotype. **Neuroscience**, v. 105, n. 1, p.265-75, 2001.

LIU, X. et al. Role of afferent C fibers in electroacupuncture of “*zusanli*” point in activating nucleus raphe magnus. **Acta Physiol. Sin**, v. 42, p. 523–533, 1990.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473–477, 2008.

LORAM L. C. et al. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **J Pain**, v. 8, n. 2, p. 127-36, 2007.

LUND, I.; LUNDEBERG, T. Aspects of pain, its assessment and evaluation from an acupuncture perspective. **Acupunct Med**, v. 24,n. 3, p. 109-17, Set, 2006.

- LUO, H. et al. Behavioral and electrophysiological evidence for the differential functions of TRPV1 at early and late stages of chronic inflammatory nociception in rats. **Neurochem Res**, v. 33, n.10, p.2151-8, out, 2008.
- LU, K. et al. Probing the effects and mechanisms of electroacupuncture at ipsilateral or contralateral ST37 –ST36 acupoints on CFA induced inflammatory pain. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2016.
- LYNN, B. Capsaicin: actions on nociceptive C-fibres and therapeutic potential. **Pain**, v. 41, p. 61-69, 1990.
- MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 521-32, 2005.
- MARTIN, H. A. et al. Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C- and A- δ mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. **Neuroscience**, v. 22, p. 651-659, 1987.
- MA, C. et al. excitability of chronically compressed dorsal root ganglion neurons. **J Neurophysiol**, v. 95, p. 2098-2107, 2006.
- MAMBERG, A; BASBAUM, A. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, p. 215-22, 1998.
- MASUOKA, T. et al. Long-Term Activation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors Increases Functional TRPV1- Expressing Neurons in Mouse Dorsal Root Ganglia. **Frontier in cellular neuroscience**, v. 10, p. 1-12, 2016.
- MCDONALD, J; CRIPPS, A; SMITH, P. Mediators, Receptors, and Signalling Pathways in the Anti-Inflammatory and Antihyperalgesic Effects of Acupuncture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-10, 2015.
- MENG, H., et al. In Adjuvant-Induced Arthritic Rats, Acupuncture Analgesic Effects Are Histamine Dependent: Potential Reasons for Acupoint Preference in Clinical Practice. **Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 6, 2012.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. Progress in **Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.
- MIN, H. et al. TLR4 enhances histamine-mediated pruritus by potentiating TRPV1 activity. **Molecular Brain**, v. 7, p.1-10, 2014.

MORAES, E.; KUSHMERICK, C.; NAVES, L. Characteristics of dorsal root ganglia neurons sensitive to Substance P. **Molecular Pain**, v. 10, p. 1-10, 2014.

NAKAMURA, M; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, v. 35, p. 145-53, 1987.

O'NEILL, J. et al. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. **Pharmacol Rev**, v. 64, p. 939–971, 2012.

PAN, B.; CASTRO-LOPES, J. M.; COIMBRA, A. Chemical sensory deafferentation abolishes hypothalamic pituitary activation induced by noxious stimulation or electroacupuncture but not only decreases that caused by immobilization stress. A c-fos Study. **Neuroscience**, v. 78, p.1059–1068, 1997.

PERRY, M. J.; LAWSON, S. N; ROBERTSON, J. Neurofilament immunoreactivity in populations of rat primary afferent neurons: a quantitative study of phosphorylated and non-phosphorylated subunits. **J Neurocytol**, v. 20, p. 746–758, 1991.

POMERANZ, B., PALEY, D. Electroacupuncture hypolgesia is mediated by afferent nerve impulses: an electrophysiological study in mice. **Exp. Neurol**, v. 66, p. 398–402, 1979.

ROCHA, A. et al. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central* Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 57, p. 94-105, 2007.

ROMITA, V.V; SUK, A.;HENRY, J. L. Parametric studies on electroacupuncture-like stimulation in a rat model: effects of intensity, frequency, and duration of stimulation on evoked antinociception. **Brain Research Bulletin**, v. 42, p. 289-296, 1997.

ROSA, P.; FERREIRA, C. Degeneração walleriana de origem vascular em ressonância magnética de paciente com paralisia supranuclear progressiva provável. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, p. 878-880, 2005.

ROWLAND, L. P.; PEDLEY, T. A. Merritt **Tratado de Neurologia**. 12 ed.: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2011.

RUSCHEWEYH, R. et al. Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with A-beta-, A-delta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. **J. Comp. Neurol**, v. 502, p. 325–336, 2007.

SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 101, p. 3680-3685, 2004.

SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Tumour necrosis factor- α , interleukin- 1β and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. **Pain**, v.96,p. 89-97, 2002.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. The role of the sympathetic efferents in endotoxin induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine up regulation. **Neuropharmacol**, v.42, p. 864-872, 2002.

SALVEMINI, D. et al. Evidence of peroxynitrite involvement in the CFA induced rat paw edema. **Eur J Pharmacol**, v. 303, n. 3, p. 217-20, May 1996.

SCHÄFERS, M. et al. Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. **Exp Neurol**, v. 185, n. 1, p. 160-8, Jan 2004.

SCHIENE, K.; DEVRY J.; TZSCHENTKE T. Antinociceptive and antihyperalgesic effects of tapentadol in animal models of inflammatory pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, n. 2, p. 537-44, 2011.

SCOTT, S., SCOTT, W. N. A biochemical hypothesis for the effectiveness of acupuncture in the treatment of substance abuse: acupuncture and the reward cascade. **Am J Acupunct**, v. 25, p. 33-40, 1997.

SELTZER, Z; DUBNER, R. SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-18, 1999.

SILVA, J.R.; SILVA, M.L.; PRADO, W.A. (a) Analgesia induced by 2- or 100-Hz electroacupuncture in the rat tail-flick test depends on the activation of different descending pain inhibitory mechanisms. **J Pain**, v. 12, n. 1, p. 51-60, Jan 2011.

SILVA, M. L.; SILVA, J. R.; PRADO, W.A. The antinociceptive effect of electroacupuncture at, or formalin injection into different depths in the rat tail flick test: a new perspective for the acupoint. **Chinese Medicine**, v. 2, p. 1-15, 2011.

SILVA, M. L.; SILVA, J. R.; PRADO, W.A. The integrity of the anterior pretectal nucleus and dorsolateral funiculus is necessary for electroacupuncture-induced analgesia in the rat tail- flick test. **Eur J Pain**, v. 14,n. 3,p. 249-54, Mar 2010.

SILVA, M. L; SILVA, J. R.; PRADO, W.A. The antinociceptive effect of electroacupuncture at different depths of acupoints and under the needling surface. **Chinese Medicine**, v. 7, p. 1-8, 2012.

SLUKA, K. A., et al. Differential roles of neurokinin 1 and neurokinin 2 receptors in the development and maintenance of heat hyperalgesia induced by acute inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, p. 1263 - 1273,1997.

SOMMER, C; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett**, v.361, n.1, p.184-7, 2004.

SOMMER C. et al. Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. **Brain Res**, v. 913, n. 1, p. 86-9, Sep 2001.

SOMMER C. et al. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. **Exp Neurol**, v. 151, n. 1, p. 138-42, May 1998.

SONG, Q. et al. Electroacupuncture at zusanli point (st36) attenuates pro-inflammatory cytokine release and organ dysfunction by activating cholinergic anti-inflammatory pathway in rat with endotoxin challenge. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v.11, p.469-474, 2014.

SCHUELERT, N. et al; The bradykinin B1 receptor antagonist B1 113823 reverses inflammatory hyperalgesia by desensitization of peripheral and spinal neurons. **Eur J Pain**, v.19 p.132–142, 2015.

SUN KWANG KIM. et al. Effects of electroacupuncture on cold allodynia in a rat model of neuropathic pain: Mediation by spinal adrenergic and serotonergic receptors. **Experimental Neurology**, v.195, p.430 – 436, 2005.

TAKANO, T. et al., “Traditional acupuncture triggers a local increase in adenosine in human subjects,” **Journal of Pain**, v. 13, n. 12, pp. 1215–1223, 2012.

TAYLOR, B. et al. Inflammation enhances Y1 receptor signaling, neuropeptide Y mediated inhibition of hyperalgesia, and substance P release from primary afferent neurons. **Neuroscience**, v256, pp178–194. Jan. 2014.

TRACEY, D. J.; WALKER, J. S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflamm Res**, v. 44,n.10, p.407-11, 1995.

TAKAOKA, Y et al. Electroacupuncture suppresses myostatin gene expression: cell proliferative reaction in mouse skeletal muscle. **Physiol Genomics**, v.30, p.102–110, 2007.

UCHIDA, Y. et al. Electroacupuncture induces the expression of Fos in rat dorsal horn via capsaicin-insensitive afferents. **Brain Res**, v.978, p.136–140, 2003.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat.New Biol**, v.231, p.232-235, 1971.

VIEIRA S. M. et al. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by

endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 3, p. 779-89, Oct 2009.

WALKER, K; PERKINS, M; DRAY, A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochem Int**, v.26,n.1, p.1-16, 1995.

WALL, P. D., Melzack, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone. Londres. v. 1 p. 1-8,2011.

WANG, P. et al. Bradykinin B1 Receptor Antagonism Is Beneficial in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. **Plos One**, v.3, p1-8, 2008.

WEI X. H. et al. Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF-alpha induces mechanical allodynia via upregulation of TNF-alpha in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn: the role of NF-kappa B pathway. **Exp Neurol**, v. 205, n. 2, p. 471- 84, 2013.

WEI-HSIN, C. et al. Acid-sensing ion channel 3 mediates peripheral anti-hyperalgesia effects of acupuncture in mice inflammatory pain. **Journal of Biomedical Science**, v.18, p1-10, 2011.

WEN, Y. et al. A minimal stress model for the assessment of electroacupuncture analgesia in rats under halothane. **European Journal of Pain**, v.11, p.733-742, 2007.

WHITE, F. A; FELDMAN, P.; MILLER, R. J. Chemokine signaling and the management of neuropathic pain. **Molecular interventions**, v. 9, n. 4, p. 188–195, 2009.

WILLIS, A. L. E CORNELSEN, M. Repeated injection of prostaglandin E2 in rat paws induces chronic swelling and a marked decrease in pain threshold. **Prostaglandin**, v .3, p.353-357, 1973.

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life Sci**, v.74,n.21, p.2605-10, 2004.

WOOLF, C; MANION, R. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v.5; p.1959-64, 1999.

WU, S. et al. Abundant expression and functional participation of TRPV1 at Zusanli acupoint (ST36) in mice: mechanosensitive TRPV1 as an “acupuncture-responding channel. **Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p.68-82, 2014.

YAO, W. et al. Mast Cell-Nerve Cell Interaction at Acupoint: Modeling Mechanotransduction Pathway Induced by Acupuncture. **International Journal of Biological Sciences**, v.10, p511-519, 2014.

YAMATO, K. Antinociceptive effects of radon inhalation on formalin-induced inflammatory pain in mice. **Inflammation**, v. 36, n. 2, p. 355-63, Apr 2013.

YEN, Y. T. et al. Role of acid-sensing ion channel 3 in sub-acute-phase inflammation. **Mol Pain**, v.5, p.1, 2009.

YIM, Y. K., et al. Electro-acupuncture at acupoint ST36 reduces inflammation and regulates immune activity in collagen-induced arthritic mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 4, p. 51–57, 2007.

ZHANG, D. et al. Q. Role of mast cells in acupuncture effect: a pilot study. **Explore**, v. 4, n.3, p. 170–7, 2008.

ZHANG, D. et al. Synchrotron radiation phase-contrast X-ray CT imaging of acupuncture points. **Anal Bioanal Chem**, v. 401, n.3,p.803–8, 2011.

ZHANG, Q. et al. Effects of neurotoxins and hindpaw inflammation on opioid receptor immunoreactivities in dorsal root ganglia. **Neuroscience**, v.85, p.281-291, 1998.

ZHANG, W.; ZHAO, Y.; KJELL, F. Understanding Propagated Sensation along Meridians by Volume Transmission in Peripheral Tissue. **Chin J Integr Med**, v.19,n.5,p.330- 339, Mai, 2013.

ZHANG, Y., et al. Electroacupuncture inhibition of hyperalgesia in an inflammatory pain rat model: involvement of distinct spinal serotonin and norepinephrine receptor subtypes. **Br J Anaesth**, v.109, p245–252, 2012.

ZHAO, J. Comment on the development of manipulation standardization of acupoint application technique. **Zhongguo Zhen Jiu**, v.29,n.4, p.327-9, Abr, 2009.

ZHAO, Z.Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Prog Neurobiol**, v.85, p355–375, 2008.

ZHAO, L. et al. A review of acupoint specificity research in china: status quo and prospects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.1 p.1-16, 2014.

ZHAO, L. et al. A Review of Acupoint Specificity Research in China: Status Quo and Prospects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Volume 2012.

ZHOU, L., ZHANG, Q., STEIN, C., SCHAFER, M. Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons to peripheral opioid analgesia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.286, p;1000-1006, 1998.

ZHU, L. et al. The effect of neonatal capsaicin on acupuncture analgesia. **Acupunct. Res.**, v.15, p.285–291, 1990.

ZIJLSTRA, F. et al. Anti-inflammatory actions of acupuncture. **Mediators of Inflammation**, v.12, p.59-69 Abr, 2003.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16,n.2,p.09-10, Jun 1983.