



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Daiana Cristina Salm

**EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA NA DOR PÓS ISQUEMIA
CRÔNICA DA PATA EM CAMUNDONGOS: AVALIAÇÃO DA
PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR ET_B PERIFÉRICO E ESPINAL**

Florianópolis
2018

Daiana Cristina Salm

**EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA NA DOR PÓS ISQUEMIA
CRÔNICA DA PATA EM CAMUNDONGOS: AVALIAÇÃO DA
PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR ET_B PERIFÉRICO E ESPINAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Leidiane Mazzardo Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins

Florianópolis
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Salm, Daiana Cristina
EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA NA DOR PÓS ISQUEMIA
CRÔNICA DA PATA EM CAMUNDONGOS: AVALIAÇÃO DA
PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR ETB PERIFÉRICO E ESPINHAL
/ Daiana Cristina Salm ; orientador, Leidiane
Mazzardo Martins, coorientador, Daniel Fernandes
Martins, 2018.
124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.


1. Neurociências. 2. Eletroacupuntura. 3. Dor
crônica. 4. Modelo animal de Dor Pós Isquemia Crônica
(DPIC). 5. Sistema endotelinérgico e receptor ETB.
I. Martins, Leidiane Mazzardo. II. Martins, Daniel
Fernandes. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
IV. Título.

DAIANA CRISTINA SALM

**“EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA NA DOR PÓS
ISQUEMIA CRÔNICA DA PATA EM CAMUNDONGOS:
AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR ET_B
PERIFÉRICO E ESPINHAL”**

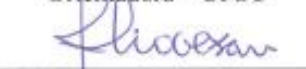
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

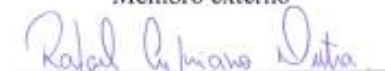
Florianópolis, 08 de fevereiro de 2018.


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Leidjane Mazzardo Martins
Orientadora – UFSC


Prof. Anna Paula Piovezan
Membro externo


Prof. Rafael Cypriano Dutra
Membro-UFSC

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo a *Deus* e toda espiritualidade amiga pelo suporte e base estrutural! Além disso, a base de toda essa estrutura espiritual transcendeu a terrena por meio de meus pais. Nisso, fica aqui a minha eterna gratidão a eles, principalmente a minha *mãe*, por me darem o auxílio nesta nova oportunidade da reencarnação. E por falar em vida, minha eterna gratidão a vida doada pelos *camundongos* para a evolução da ciência, cuidei tanto de vocês! Como sou grata! E ao meu amor, meu cachorro que tem bem mais racionalidade que muitos humanos, meu companheiro de estudos e frustrações *Théo*, te amo!

Ainda assim, tive a felicidade de ter a melhor irmã do mundo, *Simone*, bem como um presente divino o meu sobrinho *Rafael*. Gostaria de conseguir agradecer a Deus por colocar nessa vivência terrena, tantas pessoas importantes junto de mim auxiliando nessa difícil missão de evolução.

Reitero todas essas realizações, para ainda agradecer a grandeza ter a companhia e o apoio do meu namorado, *Rodrigo*. Quanta dedicação e carinho, com toda a certeza foi uma pessoa muito importante na minha caminhada! Gratidão é pouco, te amo!

E por falar em evolução, o que seríamos de nós sem as boas amizades?! Deixo aqui a minha imensa gratidão pelos bons amigos/colegas da vida, que o laboratório me proporcionou como *Daniela, Nathália, Prof Luiz, Kamilla, Júlia, Prof Cintia, Aline, Ana Caroline, Bruna Hoffmann, Prof Anna Piovezan, Prof Fran, Verônica, Lisandro, Prof Rômulo, Gisele, Gustavo, Juliete, Jéssica, Prof Maicon, Donami, Marcieli, Karol, Geraldo, Sandro, Leandro, Silvana, Ana Batisti, Tiago, Cinthia*, assim como os amigos que conquistei ao longo da vida como *Prof Luana, Sayron, Daphne, Luciana, Viviane, Letícia, Bianca, Prof Andrea, Prof Simone, Prof Silvia, Douglas, Tarcila, Renata, Marcela, minhas pacientes do projeto da Fibromialgia, professores e colegas do PPGneuro (UFSC), prof Elisa ao querido Nivaldinho (UFSC)*, que foram importantes ao longo da minha formação com a graduação e na pós-graduação. Além disso, aos meus queridos colegas do *Centro espírita Francisco Manoel da Luz* por todo apoio e compreensão.

Para finalizar, aos meus mestres “*musos inspiradores*” *prof Daniel e prof Leidiane* [...] me corre as lágrimas agora ao lembrar da importância que vocês têm para mim! Obrigada, pela paciência e

cuidado. Obrigada, pelo zelo e amizade. Obrigada, por me darem exemplos de excelentes profissionais. Obrigada, pelas oportunidades ao longo de toda a minha vida acadêmica. Obrigada, pelos “puxões de orelha” quando necessário. Obrigada! Obrigada! Que Deus abençoe muito vocês e como não falar do **Pedro**?! Que tesouro, foi sempre comportado e sem querer me ajudou em todos os experimentos, não é mesmo *prof Leidi*?! *Obrigada por serem meu exemplo*! Gratidão, muita gratidão por vocês! Eu desejo para o mundo inteiro, orientadores como vocês.

*“Todas as vitórias, ocultam uma
abdicação”.*
(Simone De Beauvoir, 1958).

RESUMO

A Síndrome da Dor Regional Complexa do tipo I (SDRC-I) possui perfil refratário à diversas formas de tratamentos. Deste modo, tratamentos integrativos como a eletroacupuntura (EA) de baixa frequência vêm sendo propostos para minimizar a dor em diferentes modelos animais e clínicos. Neste estudo, foi testado o efeito da EA no modelo animal de dor pós isquemia crônica (DPIC), o qual mimetiza os sinais e sintomas da SDRC-I em humanos, bem como avaliado o mecanismo de ação envolvido neste efeito. Camundongos *Swiss* fêmeas ($n = 8$ por grupo) foram submetidas a isquemia e reperfusão (IR) da pata traseira direita por meio de um torniquete no tornozelo, após 3 h o anel elástico foi retirado, permitindo a reperfusão da pata. O modelo animal induziu hiperalgesia mecânica e ao frio, assim como edema na pata traseira direita dos animais. O tratamento único com EA de baixa frequência nos acupontos ST36 e SP6 ipsilateral a IR da pata no 3º, 7º, 14º e 21º dia após IR da pata, sendo avaliado o decurso temporal do efeito anti-hiperalgésico da EA em cada dia. As avaliações da hiperalgesia mecânica e os tratamentos diários foram realizados do 7º ao 14º dia ou do 14º ao 21º dia, edema e temperatura da pata do 1º ao 3º dia. A avaliação dos receptores ET_B periféricos e espinais foram avaliados no 14º dia após a IR, por meio do bloqueio farmacológico (Bq-788 antagonista para o receptor ET_B) e da análise da expressão desse receptor. Os resultados demonstraram que a EA reduziu a hiperalgesia mecânica e ao frio em todos os dias avaliados. A EA também reduziu o edema, mas não a temperatura da pata. A expressão dos receptores ET_B periféricos, mas não espinais foi aumentado pela EA. Considerando o conjunto de dados obtidos o presente trabalho sugere que a EA pode ser utilizada como tratamento adjuvante para os sinais e sintomas presentes na DPIC, como a hiperalgesia mecânica e ao frio e edema; além disso os receptores ET_B periféricos e espinais parecem mediar, pelo menos em parte, o efeito anti-hiperalgésico da EA.

Palavras-chave: Eletroacupuntura, baixa frequência, receptor ET_B, isquemia e reperfusão, dor neuropática, SDRC-I.

ABSTRACT

The Complex Regional Pain Syndrome Type I (CRPS-I) has a refractory profile to various forms of treatments. Thus, integrative treatments such as low frequency electroacupuncture (EA) have been proposed to minimize pain in different experimental and clinical models. In this study, the effect of EA was tested in the Chronic Postischemic Pain Model (CPIP), which mimics the signs and symptoms of CRPS-I in humans, as well as evaluated the mechanism of action involved in this effect. Female Swiss mice (n=8 per group) were submitted to ischemia and reperfusion (IR) of the right hind paw by an ankle tourniquet, 3 h after the elastic ring was removed, allowing the paw reperfusion. The experimental model induced mechanical and cold hyperalgesia and edema in the right hind paw of the animals. The single treatment with low frequency EA in ST36 and SP6 acupoints ipsilateral to hind paw IR at the 3rd, 7th, 14th and 21st day after hind paw IR, and the temporal course of the antihyperalgesic effect of EA on each day was evaluated. The evaluations of mechanical hyperalgesia and daily treatments were performed from the 7th to the 14th day or from the 14th to the 21st day and edema and paw temperature from the 1st to the 3rd day. The evaluation of peripheral and spinal ET_B receptors was evaluated on the 14th day after IR, using pharmacological blockade (Bq-788 antagonist for the ET_B receptor) and analysis of the receptor expression. The results demonstrated that EA reduced mechanical and cold hyperalgesia on all days that were evaluated. EA also reduced edema, but not paw temperature. The expression of peripheral but not spinal ET_B receptors were increased by EA. Considering the dataset obtained the present work suggests that the EA can be used as an adjuvant treatment for the signs and symptoms present in the CRPS-I, such as mechanical and cold hyperalgesia and edema; in addition, peripheral and spinal ET_B receptors appear to mediate, at least in part, the antihyperalgesic effect of EA.

Keywords: Electroacupuncture, low frequency, ET_B receptor, ischemia and reperfusion, neuropathic pain, CRPS-I.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios da DPIC em ratos e SDRC em humanos.....	24
Figura 2 - Fisiopatologia da SDRC-I.....	27
Figura 3 - Esquema da via periférica endógena de analgesia por meio da ET.....	32
Figura 4 - Acupuntura manual e EA.....	35
Figura 5 - Eventos centrais do mecanismo de ação da EA.....	37
Figura 6 - Eventos periféricos do mecanismo de ação da EA.....	40
Figura 7 - Desenho esquemático da localização dos acupontos ST36 e SP6.....	41
Figura 8 - Parâmetros de frequência na EA modulam a liberação de opioides.....	42
Figura 9 - Indução do modelo animal de DPIC.....	47
Figura 10 - Tratamento com EA nos animais submetidos a DPIC.....	50
Figura 11 - Desenho experimental e avaliações ao longo do tempo.....	53
Figura 12 - Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	55
Figura 13 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação da hiperalgesia mecânica.....	56
Figura 14 - Avaliação da hiperalgesia ao frio.....	57
Figura 15 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação da hiperalgesia ao frio.....	58
Figura 16 - Avaliação da temperatura da superfície da pata.....	59
Figura 17 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação da temperatura da superfície da pata.....	60
Figura 18 - Avaliação do edema da pata.....	61
Figura 19 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação do edema da pata.....	61
Figura 20 - Avaliação da atividade locomotora.....	62
Figura 21 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação da atividade locomotora.....	63
Figura 22 - Coleta das estruturas para análise por meio da técnica de Western Blotting.....	67
Figura 23 - Efeito anti-hiperalgésico da EA do 3º, 7º ao 14º dia após IR.....	71
Figura 24 - Efeito anti-hiperalgésico da EA do 14º ao 21º dia após IR.....	73
Figura 25 - EA promove efeito anti-hiperalgésico ao frio em animais submetidos a IR.....	75

Figura 26 - Efeito da EA na temperatura e no edema da pata de animais submetidos a IR.....	76
Figura 27 - Efeito da EA sobre a atividade locomotora no 14º dia após IR.....	77
Figura 28 - Receptor ET _B periférico participa do efeito anti-hiperalgésico da EA.....	79
Figura 29 - Aumento da expressão do receptor ET _B periférico induzida pelo tratamento com EA no modelo animal de DPIC.....	80
Figura 30 - Receptor ET _B espinal medeia o efeito anti-hiperalgésico da EA.....	82
Figura 31 - Expressão do receptor ET _B espinal após tratamento acumulativo de EA no 14º dia após IR.....	83
Figura 32 - Desenho esquemático dos achados do presente estudo.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para o tratamento com EA.....	49
-----------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAE** - Aminoácidos excitatórios
- AFT-2** - Ativação de fator de transcrição 2
- AKT ou PKB** - Proteína cinase B (do inglês, *protein kinase B*)
- ANOVA** - Análise de variância (do inglês, *Analysis of variance*)
- ATP** - Adenosina Trifosfato (do inglês, *Adenosine triphosphate*)
- Big-ET** - Grande endotelina (do inglês, *Big-endothelin*)
- BSA** - Albumina sérica bovina fração V segundo Cohn (do inglês, *Bovine serum albumin*)
- CB2-r** - Receptor canabinóide subtipo 2
- CCK-B** - Colecistocinina B (do inglês, *cholecystokinin*)
- CEUA** - Comissão de ética no uso de animais
- CFA** - Adjuvante completo de Freud (do inglês, *Complete freud adjuvant*)
- CFMV** - Conselho Federal de Medicina Veterinária
- CONCEA** - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CORT** - Corticosterona (do inglês, *Corticosterone*)
- COX-2** - Cicloxigenase 2 (do inglês, *Cyclooxygenase 2*)
- DPIC** - Dor pós isquemia crônica
- EA** - Eletroacupuntura (do inglês, *Electroacupuncture*)
- ECE** - Enzimas Conversoras de Endotelina
- E.P.M** - Erro padrão da média
- EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio
- ET** - Endotelina (do inglês, *Endothelin*)
- ET_A** - Receptor para Endotelina A
- ET_B** - Receptor para Endotelina B
- ET-1** - Endotelina-1 (do inglês, *Endothelin 1*)
- ET-2** - Endotelina-2 (do inglês, *Endothelin 2*)
- ET-3** - Endotelina-3 (do inglês, *Endothelin 3*)
- ETs** - Endotelinas (do inglês, *Endothelins*)
- GABA** - Ácido γ -aminobutírico (do inglês, *γ -aminobutyric acid*)
- GABA_A** - Receptor para ácido γ -aminobutírico do tipo A (do inglês, *Receptor γ -aminobutyric acid A*)
- GABA_B** - Receptor ácido γ -aminobutírico do tipo B (do inglês, *Receptor γ -aminobutyric acid B*)
- GDNF** - Fator neurotrófico derivado da glia (do inglês, *Glial cell line-derived neurotrophic factor*)

GIRK - Canais de potássio retificadores de voltagem acoplados à proteína G (do inglês, *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*)

GSNE - Gânglio sensorial do nervo espinal

GPCR - Receptores acoplados à proteína G (do inglês, *G-Protein-Coupled Receptors*)

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association Study of Pain*)

IL - Interleucina (do inglês, *Interleukin*)

IL-1 β - Interleucina 1 β (do inglês, *Interleukin 1 β*)

IL-6 - Interleucina 6 (do inglês, *Interleukin 6*)

i.t. - Intratecal

i.p. - Intraperitoneal

i.pl. - Intraplantar

IR - Isquemia e reperfusão

KCl - Cloreto de potássio

KH₂PO₄ - Fosfato monobásico de potássio (do inglês, *Potassium phosphate monobasic*)

LANEX - Laboratório de Neurociências Experimental

LC - *Locus coeruleus*

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular 1 (do inglês, *Intercellular adhesion molecule 1*)

MIA - Morte indolor assistida

MS - Ministério da Saúde

NaCl - Cloreto de sódio

Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico (do inglês, *Sodium phosphate dibasic*)

NE - Norepinefrina (do inglês, *Norepinephrine*)

NMDAR - Receptor N-metil D-aspartato (do inglês, *N-methyl-D-aspartate receptor*)

NMR - Núcleo magno da rafe

NO - Óxido nítrico (do inglês, *Nitric oxide*)

N/O_{FQ} - Nociceptina/ orfanina (do inglês, *Nociceptin / Orphanin*)

OMS - Organização mundial de saúde

p-Akt - Akt fosforilada (do inglês, *Phosphorylated Akt*)

PAG - Substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *Periaqueductal gray*)

PBS - Salina tampão fosfato (do inglês, *Phosphate buffered saline*)

PGE₂ - Prostaglandina E₂ (do inglês, *Prostaglandina E₂*)

p-GluN1 – Subunidade GluN1 fosforilada (do inglês *Phosphorylated of GluN1 subunit*)

PMSF - Fluoreto de fenil-metano-sulfonil (do inglês, *phenylmethanesulfonyl fluoride*)
PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PVDF - Fluoreto de polivinilideno (do inglês, *Polyvinylidene fluoride*)
p-38 MAPK - Proteínas cinases ativadas por mitógenos p-38 (do inglês, *p-38 mitogen-activated protein kinase*)
SDRC - Síndrome da Dor Regional Complexa
SDRC-I - Síndrome da Dor Regional Complexa tipo I
SDS - Dodecil sulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecyl sulfate*)
SNC - Sistema Nervoso Central
SP - Substância P (do inglês, *substance P*)
SP6 - Baço Pâncreas 6 (do inglês, *Spleen-Pancreas 6*)
SRTX S6a-d - Sarafotoxina 6a-d (do inglês, *Sarafotoxin 6a-d*)
SRTX S6c - Sarafotoxina 6c (do inglês, *Sarafotoxin 6c*)
ST36 - Estômago 36 (do inglês, *Stomach 36*)
SUS - Sistema Único de Saúde
TBS-T - Salina tamponada com tris e tween (do inglês *Tris-buffered saline, Tween*)
TNF - Fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor necrosis factor*)
Tris HCL - Tris hidrocloreto ultrapuro (do inglês *Tris hydrochloride*)
TTX-R Na⁺ - Canal de sódio dependente de voltagem resistente a tetrodotoxina (do inglês, *Tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel*)
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
VIP - Polipetídeos vasoativos intestinais (do inglês *Vasoactive intestinal polypeptides*).
5-HT - 5-hidroxitriptamina (do inglês, *5-hydroxytryptamine*)
5-HT1AR - Receptor para 5-hidroxitriptamina 1A (do inglês, *5-hydroxytryptamine 1A receptor*)
5-HT2AR - Receptor para 5-hidroxitriptamina 2A (do inglês, *5-hydroxytryptamine 2A receptor*)

LISTA DE SÍMBOLOS

cm - Centímetros

g - Gramas

h - Hora

Hz - Hertz

k - Kappa

kg - Kilograma

min - Minutos

mg - Miligramas

mm - Milímetros

s - Segundos

μ - Mu

μl - Microlitros

μs - Microsegundos

Δ - Delta (diferença da espessura da pata)

°C - Graus centígrados

δ - Receptor opioide do tipo delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	DOR.....	21
1.2	SÍNDROME DA DOR REGIONAL COMPLEXA.....	22
1.2.1	Fisiopatologia da SDRC-I	25
1.3	SISTEMA ENDOTELINÉRGICO.....	28
1.3.1	Receptores ET_B	29
1.3.2	Papel da ET na dor	30
1.3.3	ET e SDRC-I	32
1.4	ELETROACUPUNTURA.....	33
1.4.1	Acupuntura e EA	34
1.4.2	Mecanismo de ação da EA	35
1.4.2.1	<i>Eventos centrais relacionados ao mecanismo de ação da EA</i>	35
1.4.2.2	<i>Eventos periféricos relacionados ao mecanismo de ação da EA</i>	38
1.4.3	Acupontos Stomach 36 (ST36) e Splenn-Pancreas 6 (SP6)	40
1.4.4	Parâmetros de estimulação elétrica da EA	41
2	JUSTIFICATIVA	44
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL.....	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	ANIMAIS.....	46
4.2	INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE DPIC.....	46
4.2.1	Cálculo amostral	47
4.3	TRATAMENTO COM EA.....	48
4.3.1	Parâmetros de utilização da EA	48
4.3.2	Protocolo de tratamento com EA	49
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	51
4.5	DESENHO EXPERIMENTAL.....	52
4.6	AVALIAÇÕES.....	54
4.6.1	Avaliação da hiperalgesia mecânica	54

4.6.2	Avaliação da hiperalgesia ao frio.....	56
4.6.3	Avaliação da temperatura da superfície ventral e dorsal da pata	58
4.6.4	Avaliação do edema da pata.....	60
4.6.5	Avaliação da atividade locomotora	62
4.6.6	Avaliação da participação dos receptores ET_B periféricos na anti-hiperalgesia mecânica produzida pela EA.....	63
4.6.7	Avaliação da participação dos receptores ET_B espinais na anti-hiperalgesia mecânica produzida pela EA	64
4.6.8	Avaliação da expressão dos receptores ET_B	65
4.6.9	Substâncias, drogas e equipamentos	67
4.6.10	Descrição da morte indolor assistida.....	69
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
5	RESULTADOS	70
5.1	EA REDUZ A HIPERALGESIA MECÂNICA NO MODELO ANIMAL DE DPIC	70
5.2	EA REDUZ A HIPERALGESIA AO FRIO NO MODELO ANIMAL DE DPIC	73
5.3	EFEITO DA EA NA TEMPERATURA DE SUPERFÍCIE DA PATA E NO EDEMA DE PATA NO MODELO ANIMAL DE DPIC	75
5.4	EFEITO DA EA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO MODELO ANIMAL DE DPIC	77
5.5	RECEPTOR ET_B PERIFÉRICO MEDEIA O EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA NO MODELO ANIMAL DE DPIC	78
5.6	RECEPTOR ET_B ESPINAL PARTICIPA DA ANTI-HIPERALGESIA INDUZIDA PELA EA NO MODELO ANIMAL DE DPIC	81
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÃO.....	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	ANEXO A - Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UNISUL.....	108

ANEXO B - Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UFSC.....	109
ANEXO C - Documento comprobatório de submissão do artigo .	110

1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo foram abordados tópicos com a finalidade de elucidar a proposta de trabalho, através do modelo animal de dor pós isquemia crônica (DPIC), o qual buscou mimetizar alguns sinais/sintomas da síndrome da dor regional complexa tipo I (SDRC-I), bem como o tratamento desses animais com a eletroacupuntura (EA). Além disso, buscou-se argumentos que fundamentam a principal hipótese deste estudo o qual verificou a participação do receptor para endotelina B (ET_B) nos efeitos produzidos pela EA.

1.1 DOR

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial (MERSKEY et al., 1979; LOESER, TREEDE, 2008). Neste sentido, denota-se a sua importância para a sobrevivência do indivíduo na forma de proteção contra estímulos nocivos (ALVES NETO et al., 2009). O processamento da dor envolve alterações em vias responsáveis pela transmissão, modulação e percepção desses estímulos aversivos que são provocados por diferentes alterações biológicas (BAUSBAUM et al., 2009).

Assim o processamento ocorre com uma lesão em tecidos, na qual gera uma resposta inflamatória, que recruta mediadores como mastócitos, linfócitos, neutrófilos a liberarem substâncias vasoativas como histaminas ou substância P. Estes por sua vez, sensibilizam os nociceptores, o que resulta na hiperalgesia primária. Estes eventos promovem amplificação do estímulo nociceptivo, que são denominados sensibilização periférica (NICKEL et al., 2012; KANDEL et al., 2014).

Enquanto que, a hiperalgesia secundária decorrente da primária, conduz esses estímulos nocivos persistentes a ativar fibras C e A δ , isto promove a liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato), assim como a ativação de receptores glutamatérgicos (AMPA e NMDA). Com isso, ocorre mudanças neuroquímicas no corno dorsal da medula espinal, onde há neurônios em lâminas específicas (I, II) que projetam para centros superiores através de vias ascendentes principais, como: trato espinotalâmico, trato espinorreticular, trato espinomesencefálico, trato cervico-talâmico e trato espino-hipotalâmico, este estímulo nocivo para ser percebido e processado, o que resulta na

sensibilização central (LATREMOLIERE, WOOLF, 2009; KANDEL et al., 2014).

A modulação central da percepção da dor ocorre por via descendente na medula espinal, que remodulam a informação nociceptiva por meio de regiões localizadas no tronco encefálico, como: núcleo parabraquial, núcleo magno da rafe, *locus ceruleus* e formação reticular bulbar. Estes liberam neurotransmissores, como: serotonina, noradrenalina e dopamina que por sua vez, exercem efeitos inibitórios na atividade do neurônio de projeção no corno dorsal da medula espinal (PURVES et al., 2010).

Neste contexto, denota-se a importância de compreender os mecanismos envolvidos na nocicepção, principalmente em síndromes que apresentam como principal sintoma, a dor.

1.2 SÍNDROME DA DOR REGIONAL COMPLEXA

Uma das primeiras publicações a respeito da síndrome da dor regional complexa (SDRC) foi em 1864 por Silas Weir Mitchell. Por muitos anos ficou conhecida como causalgia, em virtude da falta de conhecimento quanto a sua etiologia, o que gerou diversas denominações para essa patologia (IOLASCON et al., 2015). No entanto, a IASP definiu o nome atual como SDRC (STANTON-HICKS et al. 1995; FIELD, 2013), que apresenta manifestações clínicas autonômicas; regional por envolver uma extremidade/região, assim como a dor por ser evocada ou espontânea e síndrome devido a presença de diversos eventos correlatos ao estágio em que o paciente se encontra (DOMMERHOLT, 2004; FIELD, 2013).

A incidência é maior em mulheres, quando comparada aos homens (SANDRONI et al., 2003; GASPAR et al., 2011; BUSSA et al., 2015), principalmente em virtude de complicações em cirurgia do túnel do carpo (até 4% dos casos) e fraturas da porção distal do rádio (até 37% dos casos). Entretanto, ela pode decorrer de queda ou entorse (SAYEGH et al., 2013). A causa predominante é em 40% das lesões de tecidos moles e 25% devido à fraturas. Enquanto, que a incidência da SDRC-I após uma fratura é estimada em 1-2%, sendo que cerca de 19% acontecem no pós-operatório de cirurgias (GASPAR et al., 2011).

Quanto às principais manifestações clínicas, encontram-se: dor regional, alodinia, hiperalgesia, edema, hiperidrose, alterações na temperatura da pele, diminuição da amplitude de movimento, disfunções vasomotoras (VURAL et al., 2016) e tróficas (GILLICK et al., 2016).

Assim, caracteriza-se como uma condição crônica incapacitante, que responde de forma insatisfatória a uma variedade de tratamentos (MIDBARI et al., 2016). A patologia ainda apresenta duas classificações: tipo I quando há disfunção nervosa, porém sem a lesão nervosa instalada e (BORCHERS, GERSHWIN, 2014) tipo II quando ocorre a lesão nervosa, com sinais/sintomas clínicos que refletem a maneira como o trauma e/ou lesão ocorreu (VURAL et al., 2016).

Com o avanço em pesquisas, buscou-se diferentes modelo animais que mimetizassem os sinais/sintomas dessa condição clínica, como o modelo animal de dor pós isquemia crônica (DPIC) com a finalidade de melhor compreender o mecanismo molecular envolvido na dor após a isquemia (CODERRE et al., 2004; TANG et al., 2017). A dor é um dos principais sintomas referidos pelos pacientes com a SDRC-I, sendo esta decorrente de eventos que promoveram a isquemia.

Neste sentido, Coderre e colaboradores (2004) descreveram a DPIC em ratos, que buscou mimetizar algumas manifestações clínicas da SDRC-I. Este modelo animal foi reproduzido posteriormente por Millicamps e colaboradores (2010) em camundongos, no qual o animal é anestesiado sendo realizado um torniquete no tornozelo com um anel por um período de três horas, decorrido este tempo, o mesmo é cortado e ocorre a intensa reperfusão da pata do animal (TANG et al., 2017).

O procedimento de isquemia e reperfusão (IR) promove alterações fisiológicas nos músculos, nervo e pele da pata afetada, visto que a reperfusão desencadeia a síntese de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e citocinas pró-inflamatórias, as quais contribuem para a resposta inflamatória e lesão vascular no tecido acometido. Com essas alterações fisiológicas, a SDRC apresenta diferentes estágios (figura 1), como no painel 1a que representa a pata de um animal sem lesão e o painel 1b refere-se ao pé humano sem lesão. Após a IR ocorrem três estágios principais: hiperemia e edema (painéis 1c-d), hiperidrose e cianose (painéis 1e-f), bem como alterações distróficas (painéis 1g-h) (CODERRE et al., 2004; LAFERRIÈRE et al., 2008; CODERRE, BENNETT, 2010).

Figura 1 - Estágios da DPIC em ratos e SDRC em humanos.

Fonte: Adaptado de Coderre et al. (2004) e Laferrière et al. (2008).

Além dos sinais clínicos (figura 1), os animais que são submetidos a este modelo animal apresentam sintomas como: hiperalgesia mecânica e alodinia ao frio por um período de quatro semanas após a IR, o que caracteriza a dor crônica após a isquemia da pata (MILLECAMPS, CODERRE, 2008; MILLECAMPS et al., 2010).

Assim, o mecanismo fisiológico para o desenvolvimento da SDRC-I envolve inflamação neurogênica, autoimunidade, sensibilização central e periférica, disfunção autonômica e fatores genéticos (BRUEHL, 2010; BORCHERS, GERSHWIN; 2014; ROCKETT, 2014; VURAL et al., 2016). Entretanto, atualmente a maior atenção tem sido destinada aos eventos centrais, que podem causar respostas inadequadas nos sistemas simpático, somatossensorial e motor (VURAL et al., 2016). As regiões mais acometidas por sintomas motores e sensoriais são os membros, principalmente nas suas regiões mais distais (antebraço e mão nos membros superiores; perna e pé nos membros

inferiores) promovendo uma importante incapacidade nas atividades de vida diária dos pacientes acometidos pela síndrome (SOHN et al., 2016).

O tratamento da SDRC-I é um desafio tanto para a área clínica quanto experimental. Inclusive, os medicamentos podem variar e incluir desde antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes (DWORKIN et al., 2003), opioides (RIBBERS et al., 2005), quanto bloqueio simpático nervoso e tratamento psicológico (DWORKIN et al., 2003). Já em modelo animal de DPIC buscou verificar a redução da hiperalgesia mecânica e alodinia ao frio. Dois dias após a IR (fase aguda inflamatória) foram administrados fármacos pela via intraplantar (i.pl.) e foi observado que apenas doses elevadas de morfina, dexametasona e pregabalina foram capazes de reduzir parcialmente a hiperalgesia mecânica. Enquanto que, o ibuprofeno, acetaminofeno e amitriptilina não foram efetivos. No sétimo dia após a IR (fase crônica - neuropática), apenas a pregabalina reduziu a hiperalgesia mecânica (MILLECAMPS, CODERRE, 2008). Isto demonstra a necessidade de melhor compreensão da fisiopatologia, com o intuito de propor novas terapias farmacológicas e/ou não-farmacológicas mais efetivas para o tratamento desta síndrome.

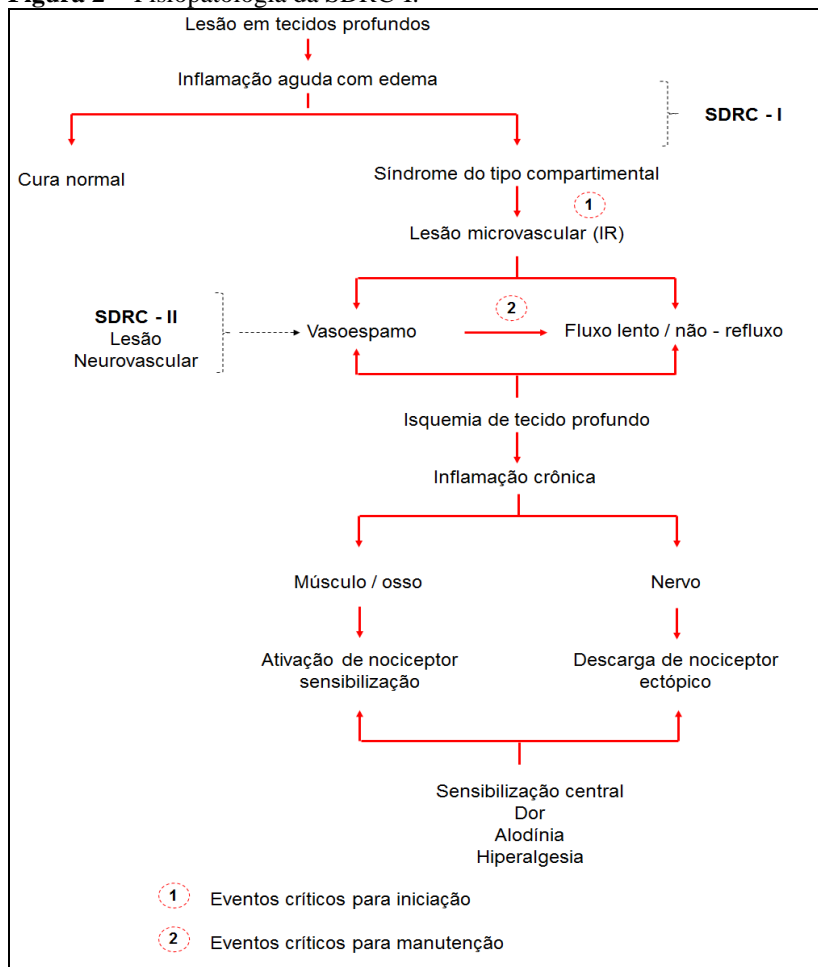
1.2.1 Fisiopatologia da SDRC-I

O mecanismo envolvido no processo fisiopatológico da SDRC é exemplificado da seguinte maneira: após um evento como um trauma sobre o membro, um processo inflamatório é desencadeado em virtude da lesão (HAUSER, HSU, NADER, 2013). Este, por sua vez, causa os danos neurológicos que contribuem para as manifestações clínicas já mencionadas (FIELD, 2013). Então, na fase inicial, apresenta características clínicas como: rubor, calor, dor e disfunções atreladas a uma resposta inflamatória e há um aumento de mediadores inflamatórios sistêmicos (TAN, OYEN, GORIS, 2005); o que fortalece a hipótese de que a SDRC apresenta uma resposta inflamatória local exacerbada devido à lesão (GORIS et al., 2009; SCHINKEL et al., 2009). A teoria das anormalidades neurológicas sucede a inflamatória, ou seja, após o processo inflamatório instalado ocorre danos em diversas estruturas, inclusive no nervo. Assim, essas fibras nervosas altamente sensíveis respondem ao estímulo nocivo amplificando o sinal doloroso (OAKLANDER et al., 2009; FIELD, 2013).

Ainda em busca de novas propostas para melhor elucidar a fisiopatologia da SDRC-I, Coderre e Bennett (2010) formularam a

hipótese de que uma reação inflamatória produzida pela lesão microvascular impede o fluxo sanguíneo ao músculo, nervo e osso na região acometida. Além disso, diversos estudos buscaram investigar outros sistemas envolvidos nas manifestações clínicas da patogênese da SDR-C-I como o sistema endotelinérgico (GORODKIN, MOORE, HERRICK, 2004; MILLECAMPs et al., 2010) e sistema adenosinérgico (MARTINS et al., 2015).

Na figura 2 é possível compreender a hipótese de Coderre e Bennett (2010), uma vez que o edema em decorrência da lesão de tecidos profundos leva a uma síndrome do tipo compartimental. Essa síndrome gera lesão microvascular em virtude da IR, assim ocorre lesão das células endoteliais pelas EROs. Esses processos desencadeiam o vasoespasmO, seguido de um fluxo lento ou uma interrupção temporária do refluxo nas porções microvasculares de tecidos profundos. Então, ocorre a isquemia persistente promovendo a inflamação. No músculo e osso, a isquemia e a inflamação resultantes (incluindo a geração de lactato) ativa e sensibiliza os nociceptores. No nervo, a isquemia e a inflamação causam descargas ectópicas nos nociceptores, enquanto que no feixe neurovascular pode provocar vasoespasmO. Existe ainda duas fases distintas, porém complementares, no processo fisiopatológico: a fase de desenvolvimento e a fase de manutenção; sendo essas determinadas pelos eventos que sucedem a lesão.

Figura 2 - Fisiopatologia da SDRC-I.

Legenda: Etapas da fisiopatologia da SDRC, na qual possui dois eventos principais, sendo o primeiro como a fase para iniciação, que está intimamente ligado a síndrome do tipo compartimental que leva a lesão microvascular, enquanto que a fase para manutenção encontra-se a partir do vasoespamo que pode levar a um fluxo lento ou não – refluxo. SDRC – I / II = síndrome da dor regional complexa tipo I / II.

Fonte: Adaptado de Coderre e Bennett (2010).

Diante disso, os eventos que sucedem a lesão microvascular com a IR são interessantes alvos terapêuticos (SILVEIRA, YOSHIDA, 2004), uma vez que esses comprometimentos são críticos para a manutenção das manifestações clínicas da SDRC-I.

1.3 SISTEMA ENDOTELINÉRGICO

O sistema endotelinérgico tem efeito biológico em células vasculares e não-vasculares (MILLECAMPS et al., 2010). É uma importante classe de mediadores, que, além de ter ação pró-inflamatória possuem reações anti-inflamatórias, quando estimulados em diferentes situações. A endotelina (ET) pertence a uma família de peptídeos, que possuem ação vasoativa, nociceptiva e propriedades que afetam inúmeros tecidos e sistemas (KHODOROVA, MONTMAYEUR, STRICHARTZ, 2009).

As endotelinas (ETs) são sintetizadas a partir de um precursor específico, que é clivado pela peptidase (furina convertase), que origina a forma inativa da big-endotelina (big-ET) que por ação de enzimas conversoras de endotelina (ECE, tipo 1 ou 2) é convertida em ET. Cada ET apresenta 21 aminoácidos em sua composição química e são classificadas em três tipos: endotelina-1 (ET-1) e endotelina-3 (ET-3), que ativam os receptores para endotelina A (ET_A) e ET_B (MAGUIRE, DAVENPORT, 2014). A descoberta dessa família de peptídeos foi em 1988, cada uma é codificada por um gene diferente e possui considerável homologia com as sarafotoxinas 6a-d (SRTX S6a-d), as quais são toxinas presentes no veneno de uma serpente israelense chamada *Atractaspis engaddensis* (DAVENPORT et al., 2016), além de ser agonista do receptor ET_B (BARRETT et al., 2014).

A ET-1 é o agente vasoconstritor com maior potência já estudado. É expressada em diferentes células, como: fibroblastos, neurônios, macrófagos, células endoteliais, pancreáticas, intestinais, dentre outras (KHODOROVA et al., 2009; HAMMER, MCPHEE, 2016). A ET-2 é restrita a células epiteliais intestinais e ovarianas, enquanto que a ET-3 é encontrada em células vasculares do epitélio intestinal (HAMMER, MCPHEE, 2016). A produção de ET no encéfalo se dá tanto por neurônios, quanto por astrócitos (SMITH et al., 2014).

As principais regiões, no sistema nervoso, onde se encontram os receptores ET_B, assim como ET_A são: nervo isquiático, gânglio sensorial do nervo espinal (GSNE), neurônios do corno anterior da medula

espinal, córtex cerebral, hipotálamo e células de Purkinje do cerebelo (HANS et al., 2008; BARRETT et al., 2014). Ainda assim, estudos em neurônios por meio da técnica de imuno-histoquímica verificaram que há expressão de receptores ET_A em 75% dos neurônios sensoriais de pequeno diâmetro no GSNE lombares (POMONIS et al., 2001).

Assim, com a ativação desses receptores por meio de ligantes específicos, ocorre a mediação de diferentes respostas endógenas. A exemplo disso, quando há estímulos nocivos ou processos inflamatórios há maior probabilidade de aumentar a disponibilidade de isopeptídeos, como a ET-1, que é considerada um importante algógeno. A ET-1 é induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL), noradrenalina, angiotensina II e bradicinina (YANAGISAWA et al. 1988), que são mediadores fundamentais no processamento da nocicepção. Estas informações demonstram o importante papel da ET-1 na dor.

1.3.1 Receptores ET_B

As ETs exercem suas funções biológicas ao se ligarem aos receptores transmembranas pertencentes a superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCR), no qual o receptor ET_B apresenta maior afinidade com ET-1, em relação ao ET-2 e ao ET-3, assim como a nível vascular apresenta ação vasodilatadora (SAKURAI, YANAGISAWA, MASAKI, 1992; KHODOROVA, MONTMAYEUR, STRICHARTZ, 2009). O receptor ET_B apresenta seletividade quanto aos seus ligantes exógenos, como a IRL-1620 e a SRTX S6c utilizadas para ativar o receptor ET_B. Enquanto que, os antagonistas são o Bq-788 e o A-192621 (SMITH et al., 2014).

A expressão dos receptores ET_B encontra-se em células satélites dos GSNE e bainhas de células de Schwann (POMONIS et al., 2001; KHODOROVA, MONTMAYEUR, STRICHARTZ, 2009), bem como em queratinócitos. Interessantemente, o receptor ET_B medeia a anti-nocicepção em queratinócitos induzindo a liberação de opióides endógenos e possivelmente este efeito estaria sendo mediado por proteínas G específicas (Gs, G1, G3). (KHODOROVA et al., 2003; KHODOROVA, MONTMAYEUR, STRICHARTZ, 2009)

Os receptores ET_B apresentam ainda efeitos distintos quando ativados a nível periférico e central, uma vez que na periferia sua ativação promove analgesia (MILLECAMPS et al., 2010), enquanto que a nível central produz dor (KIM, KIM, MYUNG, 2015). Além disso,

essa distinção da resposta pode estar relacionada ao acoplamento deste receptor à diferentes subtipos de proteínas G (KHODOROVA, MONTMAYEUR, STRICHARTZ, 2009). O acoplamento de receptores ET_B a proteína G ocorre com os subtipos G α i/1, G α i/2 e G α q/11 (SHRAGA-LEVINE, SOKOLOVSKY, 2000; KHODOROVA, MONTMAYEUR, STRICHARTZ, 2009). A associação do receptor ET_B à diferentes proteínas G, promove a ativação de vias de sinalização em distintas células, tanto em condições normais quanto patológicas. No entanto, ainda há poucas evidências (MIRSHAHI et al., 2002; LI et al., 2003; TANG et al., 2006; KHODOROVA, MONTMAYEUR, STRICHARTZ, 2009).

1.3.2 Papel da ET na dor

A primeira evidência da ET na dor foi apresentada por Ferreira e colaboradores em 1989. Os autores verificaram que o isopeptídeo ET-1 induziu hiperalgesia mecânica em ratos e incapacidade articular em cães, cuja suposta ação poderia ser mediada por seu papel vasoconstritor e indutor de síntese de prostaglandinas, de forma dose-dependente. Mais tarde, outro grupo de pesquisa, observou que quando a ET-1 foi administrada na pata de camundongos ela apresentou efeito nociceptivo e prolongou a nocicepção induzida pela capsaicina quando pré-administrada. Demonstrando assim que, possivelmente, o receptor ET_A estaria mediando o efeito nociceptivo, uma vez que a ET-1 é o seu principal agonista (PIOVEZAN et al., 1998; PIOVEZAN et al., 2000).

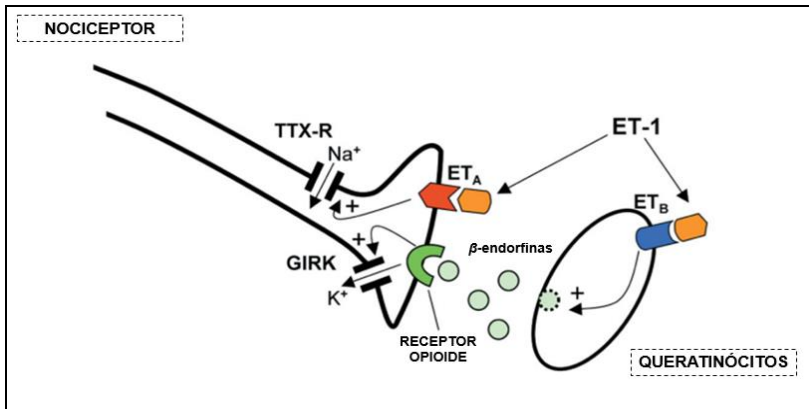
Estudos demonstraram ainda que, quando a ET-1 foi administrada localmente (i.pl.), ela amplificou a resposta comportamental a estímulos térmicos nocivos em camundongos (MENÉNDEZ et al., 2003); ou a estímulos nocivos mecânicos em ratos (FERREIRA et al., 1989). Outras pesquisas observaram que a ET-1, administrada localmente, produziu dor espontânea em humanos e roedores (HANS et al., 2007; HANS et al., 2008), estes efeitos são independentes da sua atividade vasoativa e parecem envolver a ativação e a sensibilização de nociceptores (NAMER et al., 2008). A ET-1 ativa nociceptores e exacerba a ação de outros algógenos como a capsaicina, a formalina e o ácido araquidônico (SMITH et al., 2014). Entretanto, ainda não está devidamente esclarecido, qual ou quais receptores medeiam a resposta nociceptiva induzida pela ET-1.

Alguns trabalhos evidenciaram o papel das ETs na dor, como o estudo de Piovezan e colaboradores (1997), que demonstraram o efeito

algógeno da ET-1 e da ET-3 potencializando o efeito da formalina; o mesmo não foi observado com o agonista seletivo para o receptor ET_B (SRTX S6c). Em modelo animal de dor crônica ou aguda, induzidos pela administração exógena de ET-1 foi observado um efeito nociceptivo mediante à ativação do receptor ET_A e um efeito anti-nociceptivo quando o receptor ET_B foi ativado (GOKIN et al., 2001; KHODOROVA et al, 2002; MCKELVY, MARK, SWEITZER, 2007).

A ativação do receptor ET_B, em distintos modelos animais, pelo isopeptídeo ET-1 produz analgesia, esta é decorrente da liberação de opioides endógenos pelos queratinócitos, como pode ser observado na figura 3. Mediante a ativação do receptor ET_B ocorre a liberação de β -endorfinas que, por sua vez, ativam receptores opioidérgicos do tipo μ (*mu*) e κ (*kappa*) no nociceptor periférico. Isso induz uma hiperpolarização da membrana neuronal por meio da ativação de canais de potássio retificadores de voltagem acoplados à proteína G (GIRK), que inibem a dor. Já quando a ET-1 ativa o receptor ET_A no nociceptor, ocorre a abertura de canais de sódio resistentes a tetrodoxina (TTX-R Na⁺) que despolarizam a membrana celular, amplificando a dor (KHODOROVA et al., 2003).

Figura 3 - Esquema da via periférica endógena de analgesia por meio da ET.



Legenda: Esta figura demonstra a ativação dos receptores endotelinérgicos pelo isopeptídeo ET-1. TTX-R Na^+ = canal de sódio dependente de voltagem resistente a tetrodotoxina, GIRK = canais de potássio retificadores de voltagem acoplados à proteína G, ET_A = receptor para endotelina A, ET_B = receptor para endotelina B, ET-1 = endotelina-1, Círculo tracejado = β -endorfinas migrando do queratinócitos para o meio extracelular.

Fonte: Adaptado de Khodorova et al. (2003).

Em suma, a ativação dos receptores endotelinérgicos modulando a nocicepção foi previamente observada em distintos modelos animais, entretanto, no modelo animal da DPIC ainda não foi bem documentada.

1.3.3 ET e SDRC-I

A SDRC-I promove um comprometimento vascular (VURAL, 2016), tecido no qual o sistema endotelinérgico apresenta um potente efeito biológico. A nível vascular os receptores endotelinérgicos medeiam funções diferentes (antagônicas), no qual o receptor ET_A induz vasoconstrição e o receptor ET_B induz vasodilatação. Em um estudo experimental, camundongos submetidos à DPIC exibiram um aumento do comportamento nociceptivo sustentado induzido pela ET-1 administrada localmente e analgesia induzida pelo IRL-1620 (agonista para o receptor ET_B), bem como, exibiram um aumento da expressão dos receptores ET_A e ET_B nos músculos intrínsecos da pata dos animais (MILLECAMPS et al., 2010).

Recentemente, Kim e colaboradores (2015) investigaram o papel dos receptores para ET espinais em ratos submetidos à DPIC, com a implantação de um cateter intratecal (i.t.), no 2º e 5º dia após a IR, para a administração dos antagonistas endotelinérgicos. Além disso, avaliaram o comportamento nociceptivo mecânico ao longo de 21 dias após a indução do modelo animal de DPIC. Enquanto que os níveis de ET-1 no plasma e medula espinal foram verificados no 7º e 10º dias após a IR. Assim, com a administração i.t. de Bq-788, um antagonista para o receptor ET_B, houve um aumento da frequência de resposta da pata dos animais submetidos ao modelo animal de DPIC de maneira dose-dependente. Por outro lado, a administração i.t. de Bq-123, um antagonista para o receptor ET_A, não influenciou no limiar de retirada da pata dos animais submetidos à DPIC. Diante disso, verificou-se que na medula espinal, os receptores apresentam funções distintas, uma vez que a inibição do receptor ET_B demonstrou um efeito anti-hiperalgésico mecânico, ao contrário do antagonismo do receptor ET_A, que não promoveu analgesia.

Outra pesquisa que merece ser destacada foi um estudo clínico realizado com 20 pacientes que apresentavam a SDRC-I. Foi avaliado o nível plasmático de ET-1 e concluíram que este isopeptídeo não pode ser utilizado como um único biomarcador para esta doença. Contudo, a possibilidade da participação dos receptores endotelinérgicos na fisiopatologia da SDRC-I não foi descartada (EISENBERG et al., 2004).

Diante do exposto anteriormente, é possível inferir que há o envolvimento do sistema endotelinérgico no modelo animal que mimetiza alguns sinais/sintomas da SDRC-I, tornando este sistema um potencial alvo terapêutico para o tratamento desta condição patológica.

1.4 ELETROACUPUNTURA

A EA consiste na estimulação de acupontos, por meio da passagem de corrente elétrica, nos locais onde são inseridas as agulhas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o uso da acupuntura para o tratamento de 43 doenças, além disso, a EA é considerada uma técnica inclusa nas práticas de medicina complementar por sua eficácia clínica (ZHAO, 2008). Em 2006, o Ministério da Saúde (MS) brasileiro integrou a acupuntura ao sistema único de saúde (SUS), com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2016).

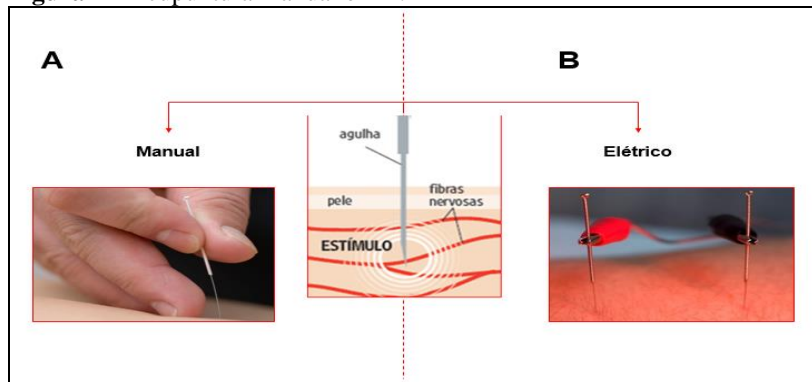
A presença dos acupontos está baseada na teoria dos meridianos, os quais são referidos como canais “*Jing*” e seus ramos “*Luo*”, onde estão localizados 361 acupontos. Os meridianos são considerados como um sistema de redes que conectam os acupontos através da corrente “*Qi*” (energia). Os acupunturistas consideram que a dor é atribuída a um bloqueio dos meridianos induzido pela doença, esse bloqueio pode ser removido pela acupuntura/EA que promove o fluxo harmonioso do “*De-Qi*” pelos meridianos e, desta forma, a dor é aliviada (ZHAO, 2008; ALVARENGA, AMARAL, STEFFEN, 2014).

Diferentes acupontos são utilizados para tratar diversas doenças na clínica. Além disso, há evidências de que o acuponto estômago 36 (ST36) e baço-pâncreas 6 (SP6) participem do controle da dor (FAIS et al., 2012; ZHANG et al., 2014; WEN LU et al., 2016). Nos parágrafos subsequentes serão abordados brevemente os principais eventos relacionados aos fenômenos espinais e periféricos, por meio dos quais a EA reduz a nocicepção.

1.4.1 Acupuntura e EA

A acupuntura manual é um método que utiliza a estimulação manual (figura 4A) de pontos específicos (acupontos) para o tratamento de doenças e alívio da dor, enquanto que a EA utiliza a estimulação elétrica (figura 4B) dos mesmos acupontos, por meio de eletrodos, os quais ficam acoplados às agulhas. Diferente da acupuntura manual, na EA é necessário escolher parâmetros específicos de acordo com a condição a ser tratada; enquanto que na acupuntura manual a estimulação é feita com rotações e percepções traduzidas como uma forma energética do corpo “*Qi*”. Esses acupontos são pontos motores ou áreas próximas a vias nervosas (ULETT, HAN, HAN, 1998).

A acupuntura baseia-se no princípio de restaurar o equilíbrio no corpo, assim como a EA, que se utiliza do mesmo princípio, associado à estimulação elétrica. A utilização cutânea por meio de corrente elétrica já é utilizada há séculos com propósito analgésico (CASSU, LUNA, 2004). Inclusive, tem sido amplamente utilizada na área de medicina veterinária para gerar hipotalgia em procedimentos cirúrgicos sem os efeitos deletérios que o anestésico gera, como depressão cardiorrespiratória e neurológica (MASSONE, 2008).

Figura 4 - Acupuntura manual e EA.

Legenda: No painel A, refere-se a acupuntura com a estimulação manual (rotações e percepções); no painel B demonstra a EA com a estimulação por meio dos eletrodos (corrente elétrica).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

1.4.2 Mecanismo de ação da EA

1.4.2.1 Eventos centrais relacionados ao mecanismo de ação da EA

Segundo Chang e colaboradores (2004), o efeito anti-nociceptivo da EA no sistema nervoso central (SNC) envolve neuropeptídeos como: encefalinas e endorfinas, assim como as monoaminas: serotonina (5-HT) e norepinefrina (NE). A inserção da agulha no acuponto promove estímulos nas terminações nervosas do tecido muscular, que é conduzido até o SNC, com destaque para as seguintes estruturas: medula espinal, mesencéfalo (que se localiza no tronco encefálico) e hipotálamo (que pertence ao diencéfalo). Na medula espinal, a EA promove a ativação de interneurônios da substância gelatinosa e a liberação de dinorfinas (CHANG et al., 2004; ALVAREGA, AMARAL, STEFFEN, 2014). Enquanto que, no mesencéfalo induz a ativação neuronal da substância cinzenta periaquedutal (PAG), que promove a liberação de endorfinas, que estimulam a produção de 5-HT e NE. No hipotálamo a EA promove a liberação de β -endorfinas (ação analgésica), cortisol (anti-inflamatório) e 5-HT (anti-depressivo) na corrente sanguínea e no líquido cerebrospinal (ALVAREGA, AMARAL, STEFFEN, 2014).

Deste modo, os eventos centrais envolvidos no mecanismo de ação da EA têm sido estudados em diferentes modelos animais. Zhang e colaboradores (2014) demonstraram diferentes mediadores endógenos envolvidos na analgesia induzida pela EA a nível espinal. Em modelos animais de dor inflamatória a nocicepção é atenuada por meio das ações da proteína cinase B (PKB ou Akt), adrenoceptores- α_2 , Interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), receptor colinérgico muscarínico, opioides, 5-HT, substância P (SP), nociceptina/ orfanina (N/OFQ), proteínas cinases ativadas por mitógenos p-38 (p-38 MAPK), TNF, subunidade GluN1 fosforilada (p-GluN1), glutamato, NE, 5-hidroxitriptamina receptor 1A (5-HT1AR), 5-hidroxitriptamina receptor 2A (5-HT2AR). Enquanto que, em modelos animais de dor neuropática alguns mediadores endógenos são semelhantes aos citados nos modelos animais de dor inflamatória, com exceção do ácido γ -aminobutírico (GABA), do receptor para o ácido γ -aminobutírico do tipo A (GABA_A), do receptor para o ácido γ -aminobutírico do tipo B (GABA_B), do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), da glutamina, da glicina e da somatostatina.

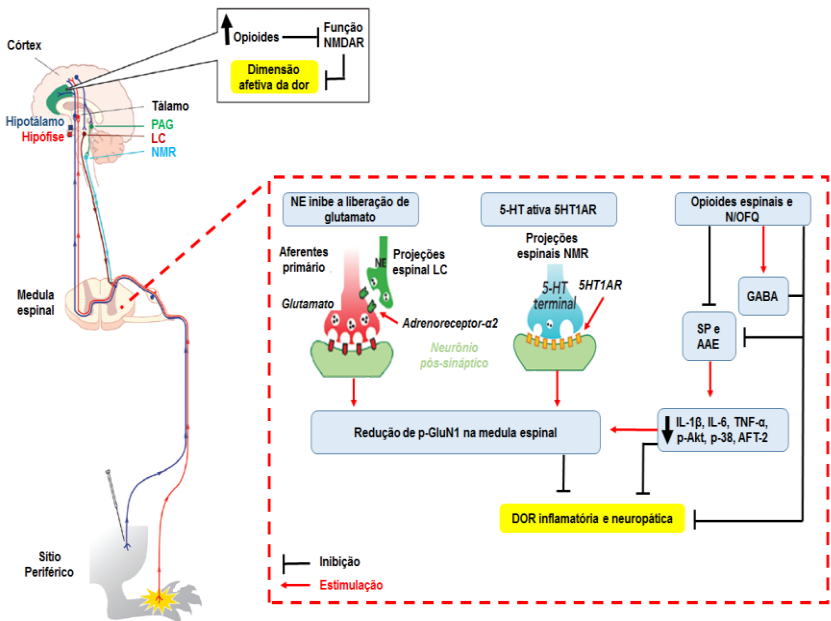
Neste contexto, na figura 5 foram identificadas as principais etapas do processamento analgésico espinal por meio da EA. Assim, foi demonstrada que a EA reduz a transmissão nociceptiva na medula espinal por meio da liberação de opioides, 5-HT, NE, inibição de células gliais, citocinas e moléculas sinalizadoras. Desta forma, seguem as possíveis vias envolvidas, de acordo com Zhang e colaboradores (2014):

- (a) A EA ativa núcleos no tronco encefálico que se projetam para a medula espinal, como o *Locus coeruleus* (LC), que produz NE (LI et al., 2007). Em um modelo animal de dor inflamatória, o tratamento com EA (2 a 10 Hz) promoveu a ativação de adrenoceptores α_2 , que preveniu a fosforilação da subunidade GluN1 do receptor NMDA, promovendo a inibição da dor (SALAZAR-COLOCHO, DEL RIO, FRECHILLA, 2007).
- (b) A EA ativa núcleos no tronco encefálico que se projetam para a medula espinal como o núcleo magno da rafe (NMR), que produz 5-HT (LI et al., 2007); esta por sua vez ativa os 5-HT1AR, que suprimem a fosforilação da subunidade GluN1 (SALAZAR-COLOCHO, DEL RIO, FRECHILLA, 2007) no neurônio pós-sináptico, inibindo a dor.

Os opioides espinais e N/OFQ desempenham papéis importantes na supressão da dor, os quais são induzidos pela EA através de mecanismo pré e pós-sináptico. Estes por sua vez, aumentam a

liberação de neurotransmissores inibitórios como o GABA, o que reduz o estímulo doloroso na medula espinal, bem como inibe a ação da SP e de aminoácidos excitatórios (AAE). Ainda assim, levam à redução de citocinas pró-inflamatórias e/ou moléculas sinalizadoras, que provoca a inibição da fosforilação de GluN1 na medula espinal promovendo a redução da dor.

Figura 5 - Eventos centrais do mecanismo de ação da EA.



Legenda: Mecanismo de inibição central através da EA na dor inflamatória e neuropática. PAG = substância cinzenta periaquedual, NMR = núcleo magno da rafe, NMDAR = receptor N-metil D-aspartato, NE = norepinefrina, LC = *locus coeruleus*, p-GluN1 = subunidade GluN1 fosforilada, 5-HT = 5-hidroxitriptamina/ serotonina, 5-HT1AR = receptor 1A da 5-HT, N/OFQ = nociceptina/ orfanina, SP = substância P, AAE = aminoácidos excitatórios, IL-1 β = interleucina 1 beta, IL-6 = interleucina 6, TNF= fator de necrose tumoral, p-Akt = Akt fosforilada, AFT-2 = ativação de fator de transcrição 2.

Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2014).

Diante do exposto, nota-se a importância da compreensão dos eventos centrais induzidos pela EA na modulação da dor, bem como o envolvimento dos sistemas endógenos modulando este efeito.

1.4.2.2 Eventos periféricos relacionados ao mecanismo de ação da EA

Estudos demonstraram os efeitos da EA como um potencial analgésico devido a ativação de diferentes produtos químicos bioativos a nível supraespinhal (TAKESHIGE et al., 1992; ZHAO, 2008; ZHANG et al., 2014), espinal (LAO et al., 2004; ZHANG et al., 2014) e periférico (ZHANG et al., 2005; TAGUCHI, TAGUCHI, KITAKOJI, 2010; ZHANG et al., 2014). Há evidências de que a EA seja capaz de ativar receptores localizados no terminal periférico do nociceptor, no local da lesão. Isso levaria a ativação de queratinócitos ou monócitos que liberam canabinóides ou opioides endógenos diminuindo a transmissão nociceptiva (ZHANG et al., 2005; ZHANG et al., 2010).

Outra hipótese refere-se à ativação de receptores (inibitórios) no terminal periférico do neurônio sensorial na região do acuponto pela adenosina trifosfato (ATP), gerada a partir de microtraumas produzidos pelas agulhas nas fibras musculares. Assim, o ATP é degradado em adenosina que, por sua vez, ativa os receptores A₁ nos neurônios sensoriais primários diminuindo a nocicepção (GOLDMAN et al., 2010).

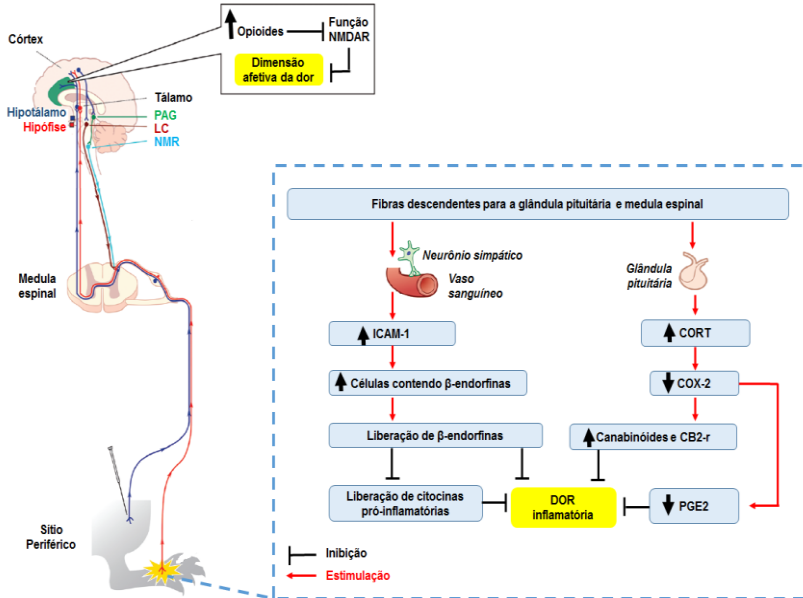
Além disso, a EA aumenta o limiar mecânico em modelo animal de dor inflamatória induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos, bem como reduz os níveis séricos de citocinas como o TNF, a IL-1 β e a IL-6 na região inflamada (SU et al., 2012). Em outro modelo animal de nocicepção, agora induzido pela carragenina, a EA reduziu a ativação dos receptores para prostaglandina E₂ (PGE₂) (LEE et al., 2006). Deve-se ter em mente que a ativação dos receptores para PGE₂ nos nociceptores periféricos contribui para o aumento da resposta dolorosa (KAWABATA, 2011), deste modo a redução da ativação dos receptores para PGE₂ pode ser uma das explicações para a diminuição da nocicepção ocasionada pela EA.

Diante do exposto, a EA tem sido descrita como uma ferramenta terapêutica interessante para a diminuição da dor em diferentes modelos animais de nocicepção periférica, com o envolvimento de diversos mediadores endógenos, como por exemplo em modelo animal de dor inflamatória pode-se citar: a adenosina, os canabinóides, a corticosterona, a ciclooxigenase 2 (COX-2), o TNF, a

IL-1 β , os opioides e a PGE₂; em modelo animal de dor neuropática, estão envolvidos: a IL-1 β , a IL-6 e o TNF; enquanto que em modelo animal de dor induzida por câncer as β -endorfinas merecem destaque. Há evidências de que, em modelo animal de dor visceral, os efeitos da EA na diminuição da nocicepção são mediadas por β -endorfinas, pela SP, pelo TNF e pelos polipetídeos vasoativos intestinais (VIP) (ZHANG et al., 2014).

Para elucidar esses eventos, a figura 6 demonstra os fenômenos periféricos atrelados ao mecanismo da ação anti-hiperalgésica da EA através do aumento de opioides em processos inflamatórios, destacam-se duas vias, conforme Zhang e colaboradores (2014):

- (a) Ativa as fibras nervosas simpáticas que, por sua vez, aumentam a expressão de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (MOUSA et al., 2010); as quais em vasos sanguíneos do tecido inflamado promove a migração de células contendo opioides (β -endorfinas) para o local inflamado, inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como a dor.
- (b) A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal promove a redução da ciclooxigenase 2 (COX-2) através de endocanabinóides, como a anandamida. Isso faz aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona; em seguida são elevados os níveis de opioides no sítio reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e inibindo a dor. Ainda assim, a EA pode reduzir a COX-2 e, conseqüentemente, diminuir os níveis de PGE₂, que leva ao alívio da dor. Ainda assim, o tratamento com a EA pode aumentar a regulação dos endocanabinóides e inibir diretamente a dor por ativação de receptor canabinóide subtipo 2 (CB2-r) (ANAND et al., 2009).

Figura 6 - Eventos periféricos do mecanismo de ação da EA.

Legenda: Mecanismo de inibição periférico através da EA na dor inflamatória. PAG = substância cinzenta periaquedutal, NMR = núcleo magno da rafe, NMDAR = receptor N-metil D-aspartato, LC = *Locus coeruleus*; ICAM-1 = molécula de adesão intercelular-1, CORT = corticosterona, COX-2 = cicloxigenase 2, CB2-r = receptor canabinóide subtipo 2, PGE₂ = prostaglandina E₂.

Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2014).

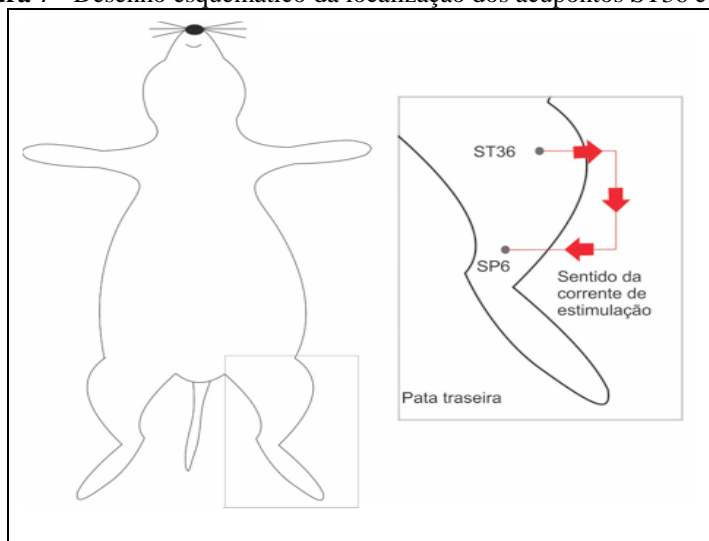
Assim, estudos têm demonstrado o papel fundamental dos opioides na inibição da dor por meio do sinergismo de acupontos na EA, visto que este fenômeno pode mediar a inibição de cascatas inflamatórias e favorecer a inibição do estímulo nocivo. No entanto, ainda é necessária uma maior compreensão tanto do mecanismo de ação, quanto da eficácia de diferentes protocolos terapêuticos da EA.

1.4.3 Acupontos *Stomach 36 (ST36)* e *Splenn-Pancreas 6 (SP6)*

Alguns estudos demonstraram que a estimulação elétrica dos acupontos (figura 7) ST36 e SP6 (CHEN, HAN, 1992) podem levar à diminuição da nocicepção em alguns modelos animais como: incisão

plantar e teste da retirada da cauda frente ao calor nocivo (FAIS et al., 2012); dor inflamatória induzida pela injeção i.pl. de CFA (WEN LU et al., 2016) e em modelo animal de dor neuropática, visceral e induzida por câncer (ZHANG et al., 2014). Pela pesquisa realizada na literatura acredita-se ser inédita a utilização da EA nestes dois acupontos para promover a redução da hiperalgesia causada pela IR da pata de camundongos.

Figura 7 - Desenho esquemático da localização dos acupontos ST36 e SP6.



Fonte: Bretherick et al. (2015).

O acuponto ST36 se localiza entre a tíbia e a fíbula, aproximadamente 5 milímetros (mm) lateral à tuberosidade da tíbia, no músculo tibial anterior (GOLDMAN et al., 2010; ERTHAL et al., 2016). O Acuponto SP6 se localiza no terço distal da região medial da perna e a agulha inserida estimula as fibras do músculo flexor longo dos dedos (YIN et al., 2008).

1.4.4 Parâmetros de estimulação elétrica da EA

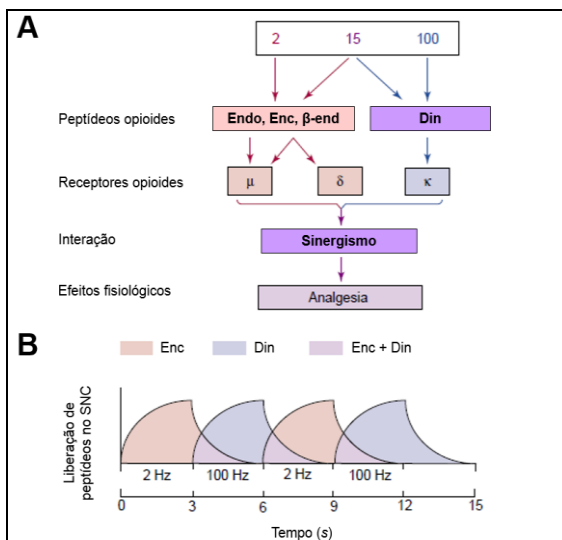
A estimulação elétrica utilizada na EA depende de diversos fatores como: intensidade, frequência, largura de pulso e duração. Sendo assim, uma baixa frequência se enquadra entre 1 a 50 hertz (Hz) e alta

freqüência de 100 a 1000 Hz, emprega-se ondas de formato quadrado e corrente alternada para evitar eletrólise e lise celular. As correntes podem ser monofásicas, indicadas para a finalidade terapêutica, contudo inadequada para analgesia; uma vez que causa polarização do local e eletrólise. Já a corrente alternada ou bifásica tem maior poder de penetração, com capacidade analgésica (CASSU, LUNA, 2004).

Ainda assim, um estudo experimental demonstrou a influência de diferentes freqüências produzindo analgesia na medula espinal, através de diferentes receptores opioidérgicos tais como: 2 Hz ativa receptores μ e δ (delta), já 2 a 15 Hz ativa tanto receptores μ e δ quanto κ e, por fim, 100 Hz ativa receptores κ (CHEN, HAN, 1992).

Deste modo, tem sido descrito que uma única freqüência, baixa ou alta, não é capaz de liberar todos os tipos de peptídeos opioidérgicos. Por este motivo, a alternância de freqüência torna-se interessante como demonstrado na figura 8A, que além de produzir maior liberação de opioides endógenos há uma ativação dos três receptores, promovendo um efeito sinérgico (figura 8B) e maior analgesia.

Figura 8 - Parâmetros de freqüência na EA modulam a liberação de opioides.



Legenda: No painel A demonstra a liberação de opioides de forma distinta conforme a alteração na freqüência. Já no painel B refere-se ao sinergismo que ocorre com a alternância das freqüências. Endo = endomorfina, Enc =

encefalinas, β -end = β -endorfinas, Din = dinorfinas, Hz = hertz, SNC = sistema nervoso central, s = segundos.

Fonte: Adaptado de Han (2003).

2 JUSTIFICATIVA

Na SDRC-I ocorre disfunção nervosa, de causa multifatorial (GAY et al., 2007), além de desencadear diversos sinais/sintomas limitantes para o indivíduo, dentre eles pode-se destacar a dor (LI et al., 2005). Contudo, em função da limitada compreensão dos mecanismos subjacentes a essa doença, o tratamento é desafiador e conta com diferentes protocolos farmacológicos, que podem produzir efeitos colaterais diversos (OERLEMANS et al., 1999). Dentre as classes utilizadas comumente, destaca-se os antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, opioides, bloqueio simpático nervoso e tratamento psicológico associado (DWORKIN et al., 2003).

Além das terapias farmacológicas, as complementares como a EA, que trata-se de uma variação da acupuntura tradicional que utiliza a corrente elétrica para a estimulação de acupontos, apresenta benefícios diversos, desde ganho de força muscular (HUANG et al., 2007a), bem como efeito analgésico (PALMEIRA, 1990). Além disso, ela é uma terapia que vem conquistando espaço no SUS, por ter um baixo custo e por focar no bem-estar do indivíduo. Deste modo, a acupuntura e a EA são terapêuticas que já vêm sendo estudadas em diferentes modelos animais de dor inflamatória e neuropática (ZHANG et al., 2014).

Contudo, até o presente momento, de acordo com o nosso conhecimento, não há evidências científicas comprovando os benefícios da EA realizada nos acupontos ST36 e SP6, bem como os mecanismos envolvidos na redução da hiperalgesia mecânica e ao frio no modelo animal de DPIC. Além disso, o modelo animal proposto promove o comprometimento das células endoteliais em virtude da IR, o que demonstra o envolvimento do sistema endotelinérgico no modelo animal de DPIC (MILLECAMPS et al., 2010). Os autores demonstram que a ativação a participação mais efetiva dos receptores ET_B no efeito anti-hiperalgésico a nível periférico (MILLECAMPS et al., 2010), enquanto que a nível espinal produz nocicepção (KIM, KIM, MYUNG, 2015). Além disso, um estudo clínico sugere a participação do sistema endotelinérgico na fisiopatologia da SDRC-I, mas enfatizam que a realização de mais estudos é de suma importância (EISENBERG et al., 2004). Deste modo, fica evidente a importância de se investigar a EA como uma abordagem não farmacológica na diminuição da hiperalgesia mecânica e ao frio, neste modelo animal de IR; além de investigar a participação dos receptores para a ET no efeito da EA no modelo animal proposto.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito anti-hiperalgésico da EA na DPIC e o envolvimento do receptor ET_B neste efeito.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar o efeito da EA na hiperalgesia mecânica e ao frio em camundongos com DPIC da pata;
- b) Analisar o efeito da EA no edema, na temperatura de superfície da pata e na atividade locomotora em camundongos com DPIC da pata;
- c) Investigar a participação do receptor ET_B periférico (pata) e central (espinal) na anti-hiperalgesia produzida pela EA;
- d) Analisar a expressão do receptor ET_B periférico e espinal no efeito da EA em camundongos com DPIC da pata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC e CEUA-UNISUL) sendo desenvolvidos no Laboratório de Neurociências Experimental (LANEX) – Campus Universitário Grande Florianópolis, Unidade Pedra Branca, Bloco I2, na Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (30 a 35 gramas), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), aclimatados a 22 ± 2 °C, no ciclo 12 horas-claro/12 horas-escuro (claro a partir das 7h00), com acesso livre à ração e água, sem enriquecimento ambiental. Os animais foram randomicamente distribuídos entre os grupos ($n = 8$ animais) e climatizados no laboratório por pelo menos uma hora antes dos testes sobre a bancada ou quando em tratamento dentro da capela. Todos os experimentos realizados estão de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes (ZIMMERNANN, 1983). Este Projeto foi aprovado inicialmente pelo CEUA-UNISUL, sob o Protocolo número 16.030.2.07.IV (Anexo A) e, posteriormente, na CEUA-UFSC sob o protocolo 8208091216 (Anexo B).

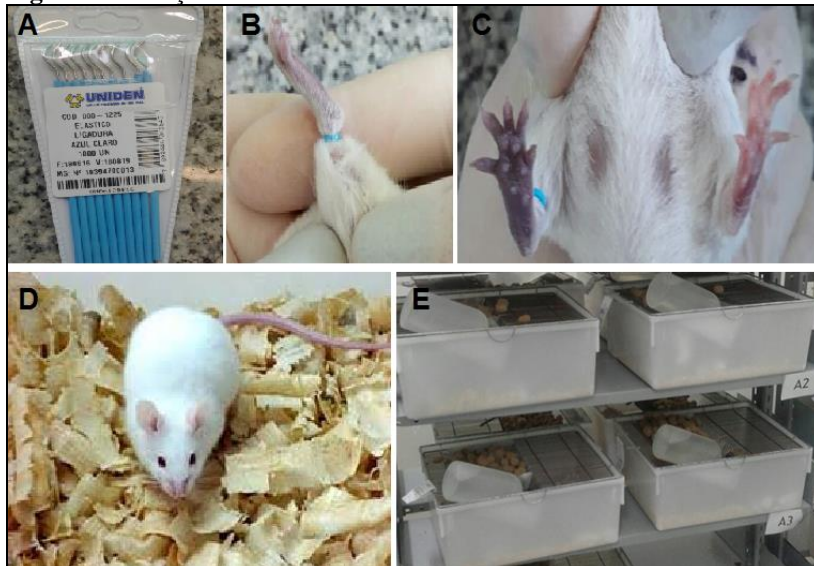
4.2 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE DPIC

Para a indução do modelo animal de DPIC que mimetiza a SDRC-I, os animais foram inicialmente anestesiados com pentobarbital sódico 55 mg/kg intraperitoneal (i.p.) e suplementados com 27,5 mg/kg (i.p.), quando necessário (MILLECAMPS et al., 2010). Após o procedimento foi verificado o estado de consciência do animal e, assim que nenhuma resposta ao estímulo doloroso foi constatada, foi realizado o posicionamento de um anel elástico de ligadura com 1,2 mm de diâmetro interno proximal à articulação do tornozelo direito da pata traseira do animal, de modo a fazer um torniquete (figura 9A-B).

O animal foi mantido anestesiado com o torniquete por três horas (figura 9C) e então o anel foi cortado permitindo a reperusão da pata. Após a IR da pata, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada até retornarem a deambular pela caixa com maravalha (figura 9D) e, posteriormente, foram conduzidos para o biotério do

laboratório (figura 9E). Sabendo, por experimentos prévios, que cerca de 30% dos animais não desenvolvem hiperalgesia, 11 animais por grupo foram submetidos a IR da pata, para que, no mínimo, 8 animais por grupo fossem incluídos no estudo (MARTINS et al., 2013).

Figura 9 - Indução do modelo animal de DPIC.



Legenda: Na ilustração 9A demonstra o anel de ligadura utilizado para indução do modelo animal DPIC. No painel 9B pode-se observar a localização do anel de ligadura, na região proximal do tornozelo direito da pata traseira do camundongo. No painel 9C destaca-se a pata traseira direita após 3 h de isquemia, com alteração na coloração e edemaciada. Em seguida, no painel 9D o anel de ligadura foi removido e o animal ficou em observação, para então, conforme painel 9E ser alocado novamente no biotério.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

4.2.1 Cálculo amostral

O cálculo amostral tem como premissa obedecer aos seguintes critérios do modelo animal (DPIC), onde 30% não desenvolvem a hiperalgesia. Além disso, Daniel (2008) descreveu o cálculo amostral para a obtenção do número de animais por grupo experimental. Para isso é usado a seguinte fórmula: $n = \{[(z \text{ alfa} + z \text{ beta}) * s] / \text{sigma}\}^2$.

O teste leva em consideração o cálculo de intervalo entre as médias e proporções (**sigma**), o desvio-padrão da probabilidade (**alfa**) que é o risco aceitável de se encontrar uma diferença. Quando ela não existe (erro do tipo I; falso positivo), ou seja, quanto menor for o **alfa** escolhido, maior é a amostra necessária. Sobre a probabilidade **beta**, que se trata do risco aceitável de não observar uma diferença, quando ela realmente existe (erro do tipo II; falso negativo). Diante disso, para o cálculo amostral, seguem as especificações:

- (a) O valor de **alfa** foi fixado em 0,05: sendo assim, o valor de z alfa foi baseado na tabela de valores de z para distribuição bicaudal (*two tailed*) que é **1,96**.
- (b) O valor de beta foi fixado em 0,10: para o valor de z beta foi baseado na tabela de valores de z (distribuição unicaudal), que é **1,28**.
- (c) O valor da diferença entre as médias dos grupos como sendo pelo menos 40%. (baseado em dados experimentais do nosso laboratório). Experimentos biológicos têm embutido um erro da ordem de 10 a 15% (resultantes de variações individuais, erro no procedimento cirúrgico, erros de dosagem, etc.), e diferenças entre dois grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo podem aumentar a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II.
- (d) O valor do desvio padrão como sendo em média 35% do valor das médias. (Baseado em dados experimentais do LANEX).

Portanto, ao aplicarmos os dados na fórmula, obtém-se: $n = \frac{\{(1,96 + 1,28) * 35\}}{40} * 2 = 8,0$. Logo, foram necessários no mínimo 8 animais em cada grupo experimental.

4.3 TRATAMENTO COM EA

4.3.1 Parâmetros de utilização da EA

O tratamento com a EA foi adaptado do estudo de Lao e colaboradores (2004), o qual utilizou parâmetros específicos para frequência, largura de pulso, duração, corrente e intensidade. A Tabela 1 ilustra os parâmetros utilizados no presente estudo.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para o tratamento com EA.

Parâmetro	Descrição	Autor
Frequência (1)	2 Hz	Adaptado Lao et al. (2004)
Largura de pulso (1)	700 μ s	
Tempo (1)	5 s	
Tempo de repouso (1)	0	
Frequência (2)	10 Hz	
Largura de pulso (2)	200 μ s	
Tempo (2)	5 s	
Tempo de repouso (2)	0	
Corrente	Contínua	
Polaridade	Alternada (+ / -)	
Acupontos	ST36	Goldman et al. (2010)
	SP6	Erthal et al. (2016) Yin et al. (2008)
Intensidade	2 a 3 mA ^a	De acordo com a intensidade da contração muscular observada pelo pesquisador
Tempo de tratamento	5, 10 e 20 min	Adaptado Silva et al. (2011)

Legenda: No aparelho foi selecionado 2 modos, onde para o modo (1): os parâmetros referem-se a menor frequência e maior largura de pulso, enquanto que no modo (2) foi selecionada uma frequência maior e uma largura de pulso menor. Hz = hertz, μ s = microssegundos, s = segundos, mA = miliamperes; min = minutos.

^a Intensidade da corrente: foi utilizada a mínima necessária, para que se observasse uma leve contração dos músculos flexor longo dos dedos e tibial anterior da pata traseira direita dos animais.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

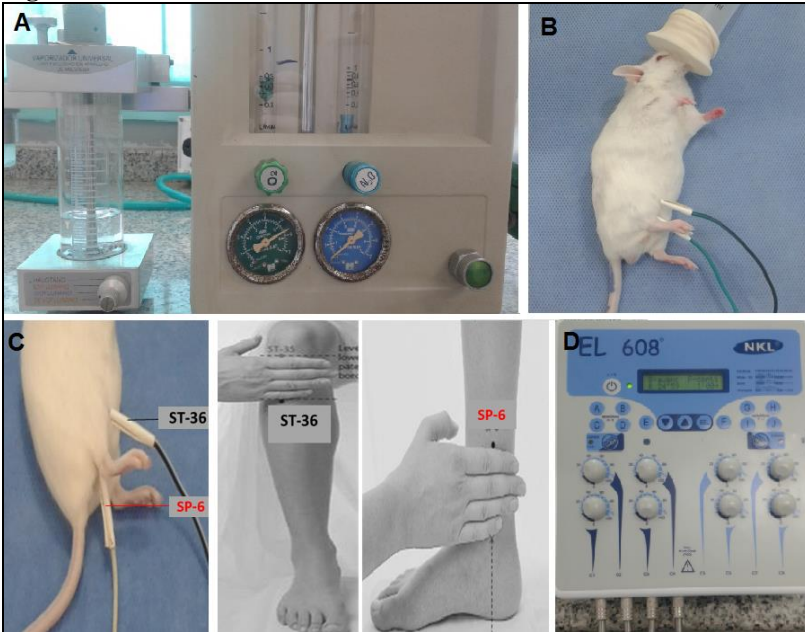
Assim, com a definição dos parâmetros do tratamento da EA foi possível alinhar quais grupos e avaliações seriam necessários para responder às questões do presente estudo.

4.3.2 Protocolo de tratamento com EA

Os animais foram levemente sedados com isoflurano inalatório a 2% e oxigênio a 100% aplicados (figura 10A) por meio de uma máscara nasal adaptada (figura 10B). Em seguida, duas agulhas de

acupuntura de (0,18 mm x 8 mm) foram inseridas nos acupontos ST36 e SP6 na pata traseira direita dos animais penetrando nas fibras do músculo tibial anterior e a outra nas fibras do músculo flexor longo dos dedos, respectivamente (figura 10C). Cada agulha foi conectada a um cabo ligado no aparelho de EA (figura 10D) (LAO et al., 2004; YIN et al., 2008; GOLDMAN et al., 2010; ERTHAL et al., 2016).

Figura 10 - Tratamento com EA nos animais submetidos a DPIC.



Legenda: O painel A, refere a máquina com entrada de oxigênio e anestésico (isoflurano). O painel B demonstra os animais sendo sedados através de uma máscara nasal adaptada. O painel C demonstra os acupontos utilizados para o tratamento com a EA em camundongos (esquerda) e em humanos (direita). O painel D representa o equipamento utilizado para gerar o estímulo elétrico por meio dos cabos, que estão conectados as agulhas inseridas nos acupontos.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Neste estudo foram analisados dois grupos controle. No grupo denominado IR + Controle 1 os animais receberam o agulhamento nos acupontos SP6 e ST36, porém sem a estimulação com a corrente elétrica. Estes animais permaneceram levemente sedados com isoflurano

inalatório durante 20 min. No grupo denominado IR + Controle 2 os animais receberam o agulhamento nos acupontos sham (não acupontos) que estavam localizados no dorso dos animais na altura da crista ilíaca, 5 mm do plano mediano nos músculos paravertebrais na região lombar, conforme descrito por Silva e colaboradores (2011), a corrente elétrica foi aplicada nestes pontos sham. Estes animais também permaneceram levemente sedados com isoflurano inalatório durante 20 min.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a condução dos experimentos foram necessários os seguintes grupos experimentais ($n = 8$ por grupo):

- (a) **Naive**: grupo de animais não submetidos ao procedimento de IR da pata e nenhuma forma de tratamento.
- (b) **IR + Controle 1**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR pata e ao agulhamento nos acupontos SP6 e ST36 sem estimulação com corrente elétrica, permanecendo levemente sedados com isoflurano inalatório (20 min).
- (c) **IR + Controle 2**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR pata e ao agulhamento no acupontos sham (não acupontos) e com estimulação com corrente elétrica, permanecendo levemente sedados com isoflurano inalatório (20 min).
- (d) **IR + EA (5' ou 10' ou 20')**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR pata e ao agulhamento nos acupontos SP6 e ST36 com corrente elétrica, conforme protocolo de tratamento no item 4.3.2. Além disso, cada grupo foi tratado com diferentes tempos de EA (5, 10 e 20 min).
- (e) **Veículo**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR pata e tratados com salina i.pl. ou i.t.
- (f) **Bq-788**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR da pata e tratados com o antagonista do receptor ET_B em diferentes doses a nível periférico (pata, 10 nmol, i.pl.) (PIOVEZAN et al., 2000) e espinal (3, 10 e 30 nmol, i.t.).
- (g) **SRTX S6c**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR pata e tratados i.pl. com o agonista do receptor ET_B na dose de 30 pmol/pata (PIOVEZAN et al., 2000).
- (h) **SRTX S6c + EA 20'**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR pata e tratados i.pl. com o agonista do receptor ET_B na dose de 30 pmol (PIOVEZAN et al., 2000) e

15 minutos após tratados com a EA por 20 min, conforme protocolo descrito no item 4.3.2.

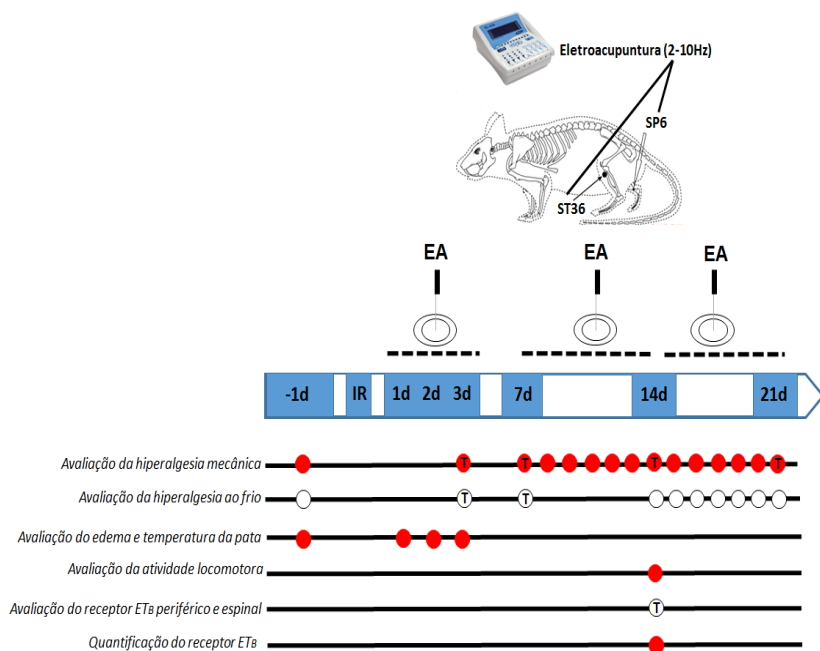
- (i) **Bq-788 + SRTX S6c**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR pata e tratados com Bq-788 (10 nmol, i.pl.) e 15 minutos após tratados com o agonista do receptor ET_B (SRTX S6c 30 pmol, i.pl.).
- (j) **Bq-788 + EA 20'**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR pata e tratados com Bq-788 (10 nmol, i.pl. ou 3 nmol, i.t.) e 15 minutos após tratados com a EA por 20 min, conforme protocolo descrito no item 4.3.2.
- (k) **Bq-788 + SRTX S6c + EA 20'**: grupos de animais submetidos ao procedimento de IR pata e tratados com Bq-788 (10 nmol, i.pl.) e 15 minutos após tratados com o agonista do receptor ET_B (SRTX S6c, 30 pmol, i.pl.). Assim, foi feito o tratamento por 20 min com EA, conforme protocolo descrito no item 4.3.2.

Observação: após o término do tratamento com EA foram retiradas as agulhas e os animais ficaram em observação até recuperarem-se dos efeitos da sedação.

4.5 DESENHO EXPERIMENTAL

Para facilitar a compreensão, a figura 11 exemplifica os dias em que os animais foram avaliados e quais foram os testes realizados.

Figura 11 - Desenho experimental e avaliações ao longo do tempo.



Legenda: Os valores expressos em números referem-se ao dia (d) após a IR, que foram realizadas as avaliações descritas, com exceção do -1d que indica a avaliação basal antes da IR. SP6 = acuponto *Splenn-Pancreas* 6, ST36 = acuponto *Stomach* 36, EA = eletroacupuntura, IR = isquemia e reperfusão, T = avaliação ao longo do tempo, WB = western blotting, ET_B = receptor para endotelina B.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Algumas avaliações foram realizadas em diferentes momentos, com todos os grupos experimentais e, posteriormente, apenas com os melhores grupos. Por fim, o total de animais utilizados para a realização do projeto foram **312** camundongos *swiss* fêmeas.

4.6 AVALIAÇÕES

4.6.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada através de um monofilamento de von Frey, com carga de 0,6 g, como descrito previamente por Martins e colaboradores (2015). Para a aplicação do teste, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação de acrílico com dimensões de 9 x 7 x 11 centímetros (cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre uma plataforma de tela de arame com malha de 6 mm (70 x 40 cm) (figura 12A). Os valores percentuais referentes à frequência de retirada da pata, frente a 10 estimulações da pata traseira direita com o monofilamento de von Frey (0,6 g) foram considerados como indicativo de hiperalgesia mecânica ou não, conforme o escore obtido. No dia anterior a IR os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal. Apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta em torno de 20% (ou inferior) foram selecionados.

O filamento foi aplicado na pata traseira direita, atendendo a alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total (figura 12B). Além disso, os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela e a resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio.

Figura 12 - Avaliação da hiperalgesia mecânica.

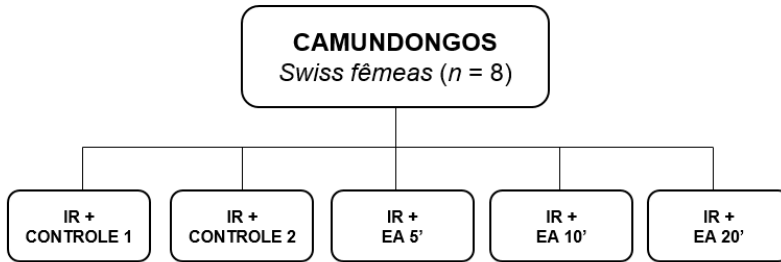


Legenda: No painel A ilustra a acomodação dos animais em câmara de observação de acrílico sobre uma tela de arame. No painel B refere-se ao teste de von Frey.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

As avaliações foram realizadas antes do procedimento de DPIC, no 3º dia e do 7º até o 21º dia após IR. O decurso temporal do efeito da EA foi avaliado no 3º, 7º, 14º e 21º dia, no restante dos dias os animais foram avaliados no melhor tempo após o tratamento com a EA. Para a execução deste experimento foram utilizados 40 animais, conforme os grupos apresentados a figura 13.

Figura 13 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação da hiperalgesia mecânica.



Avaliados no **melhor tempo** e no **decorso temporal**

Legenda: Os grupos foram compostos por 8 animais cada. n = número, IR = isquemia e reperfusão, EA = eletroacupuntura.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

4.6.2 Avaliação da hiperalgesia ao frio

A hiperalgesia ao frio foi avaliada através de um esguichamento de 20 microlitros (μl) de acetona na porção ventral da superfície plantar da pata traseira direita do camundongo, para isso foi utilizada uma seringa com agulha (não toca a pata do animal) conforme ilustrado na figura 14 e, após a aplicação da acetona foi registrado o tempo em que o animal realizou o comportamento de retirar/lamber/sacudir a pata, por um período de um minuto (BRIDGES, THOMPSON, RICE, 2001). Os dados foram expressos graficamente em segundos. O animal ficou ambientando por pelo menos uma hora na mesma grade descrita anteriormente, utilizada para o teste do von Frey (item 4.6.1).

Figura 14 - Avaliação da hiperalgesia ao frio.

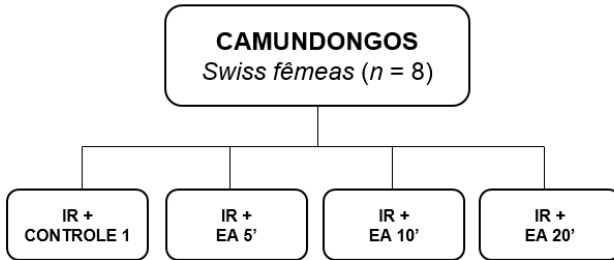


Legenda: A figura ilustra a seringa utilizada para realizar o esguichamento de 20 μ l de acetona na porção ventral da pata traseira direita do animal.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

As avaliações foram realizadas antes do procedimento de DPIC, no 3º, 7º dia e do 14º ao 21º dia após IR. O decurso temporal do efeito da EA foi avaliado no 3º, 7º dia após IR, o restante foi avaliado no melhor tempo após o tratamento com EA. Para a execução deste experimento foram utilizados 32 animais, conforme ilustrado na figura 15.

Figura 15 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação da hiperalgesia ao frio.



Avaliados no **melhor tempo** e no **decorso temporal**

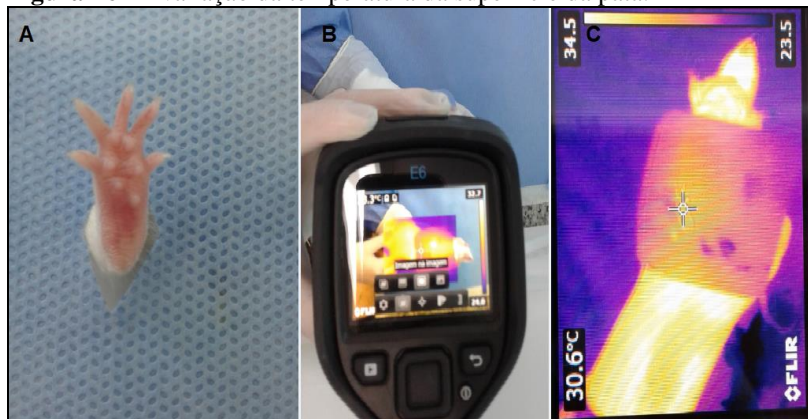
Legenda: Os grupos foram compostos por 8 animais cada. n = número, IR = isquemia e reperfusão, EA = eletroacupuntura.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

4.6.3 Avaliação da temperatura da superfície ventral e dorsal da pata

A temperatura da superfície ventral e dorsal da pata traseira direita e esquerda foram avaliadas (com um campo cirúrgico isolando a área, conforme figura 16A) antes da indução do modelo animal de DPIC, do 1º ao 3º dias, 30 min após os tratamentos. A avaliação foi através do equipamento de câmera termografia Thermal Imager (figura 16B), com precisão de $\pm 0,1$ °C e intervalo de espectro do infravermelho de 7,5 a 13 μ m, para cada coleta. Além disso, as imagens (figura 16C) foram analisadas com o próprio software da câmera termográfica (MOURA, 2011). Em relação a escala, a definição ficou paleta fria / quente e temperatura com variação entre 20 a 40°C. Assim, a temperatura de superfície da pata é calculada considerando a área da pata do camundongo. O resultado foi obtido através da diferença da pata direita em relação a esquerda avaliada no dia.

Figura 16 - Avaliação da temperatura da superfície da pata.

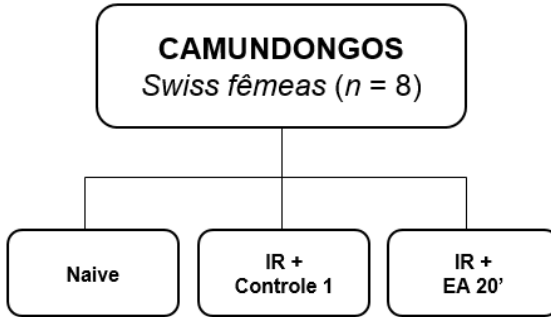


Legenda: No painel A, demonstra a pata do animal sendo isolada por um campo cirúrgico para reduzir a influência da temperatura corporal em relação a superfície ventral/dorsal da pata. No painel B pode ser observada a coleta da foto com a câmara termográfica, já o painel C ilustra a imagem termográfica da pata traseira direita de um camundongo avaliada por uma câmera Thermal Imager (Testo 880®).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Para a execução deste experimento foram necessários 24 animais e o grupo escolhido da EA foi o que apresentou melhor resposta anti-hiperalgésica, conforme os grupos descritos na figura 17.

Figura 17 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação da temperatura da superfície da pata.



Avaliados após **30 minutos** do
tratamento com EA

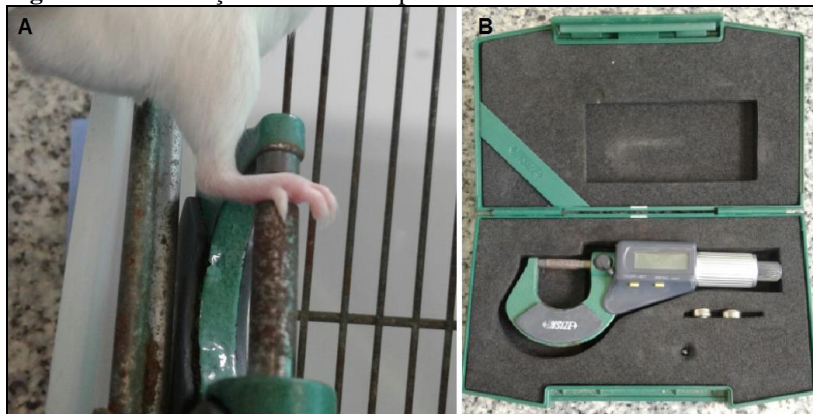
Legenda: Os grupos foram compostos por 8 animais cada. n = número, IR = isquemia e reperfusão, EA = eletroacupuntura.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

4.6.4 Avaliação do edema da pata

O edema foi avaliado antes da indução do modelo animal de DPIC e do 1º ao 3º dia, 30 min após os tratamentos. A avaliação foi realizada através do equipamento digital micrômetro (figura 18B) e foi mensurada a espessura da porção média pata traseira direita dos animais (figura 18A). O aparelho foi posicionado entre o dorso e a porção plantar da pata como descrito por Erthal e colaboradores (2016). Os resultados foram expressos como a diferença entre a espessura da pata traseira direita (submetida ao procedimento de IR) e o valor basal (antes do procedimento de IR) da mesma pata.

Figura 18 - Avaliação do edema da pata.

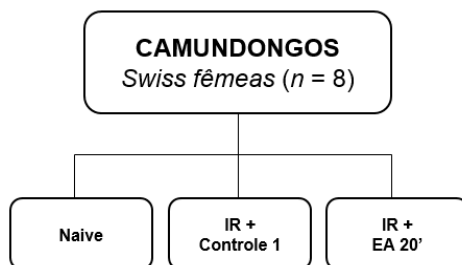


Legenda: No painel A representa a mensuração da pata traseira direita do animal. No painel B refere-se ao equipamento utilizado, micrômetro.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Para a execução deste experimento foram necessários 24 animais e o grupo escolhido da EA foi aquele que apresentou melhor resposta anti-hiperalgésica. Para melhor compreensão dos grupos, segue a figura 19.

Figura 19 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação do edema da pata.



Avaliados após **30 minutos** do
tratamento com EA

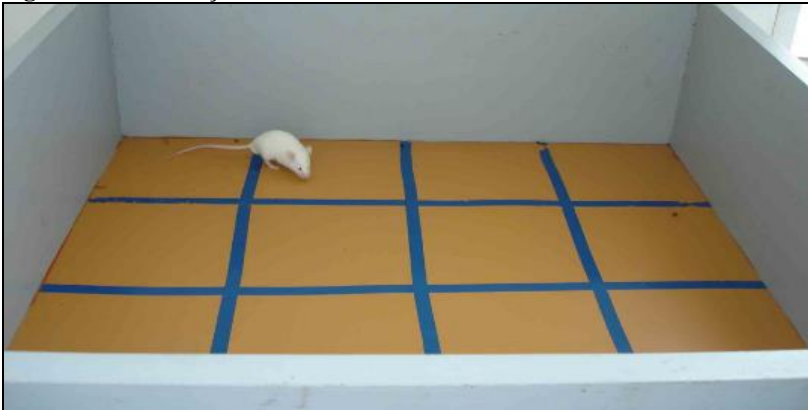
Legenda: Os grupos foram compostos por 8 animais cada. n = número, IR = isquemia e reperfusão, EA = eletroacupuntura.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

4.6.5 Avaliação da atividade locomotora

Com o objetivo de verificar a influência da EA sob a atividade locomotora dos animais. Para a avaliação da atividade locomotora foi adaptado o teste do campo aberto, conforme Rodrigues e colaboradores (2002). Este teste foi realizado com um aparato que consistiu em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm e o assoalho da caixa era dividido em 12 quadrados iguais (figura 20). A análise foi feita através da observação (contagem) do número de cruzamentos com todas as patas (*crossing*) ao longo de 6 min, na realização deste teste o ambiente estava totalmente silencioso para que não houvesse interferência na deambulação dos animais.

Figura 20 - Avaliação da atividade locomotora.

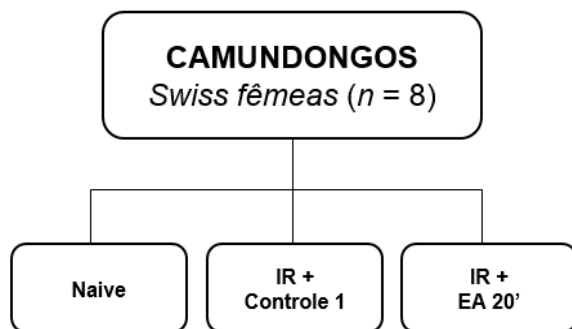


Legenda: O animal foi colocado em uma caixa com dimensões específicas e observado por 6 min o deslocamento e a contagem de quantos quadrados foram ultrapassados ao longo do tempo estipulado.

Fonte: Adaptado pela autora (2017).

Foram realizados tratamentos diários do 7º até o 14º dia após a IR com a EA na ausência de agonistas/antagonistas. Assim, a avaliação da atividade locomotora foi realizada 30 min após o último tratamento no 14º dia. Para a execução deste experimento foram utilizados 24 animais, conforme os grupos ilustrados na figura 21.

Figura 21 - Esquema ilustrativo dos grupos utilizados para a avaliação da atividade locomotora.



Avaliados após **30 minutos** do
tratamento com EA

Legenda: Os grupos foram compostos por 8 animais cada. n = número, IR = isquemia e reperfusão, EA = eletroacupuntura.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

4.6.6 Avaliação da participação dos receptores ET_B periféricos na anti-hiperalgesia mecânica produzida pela EA

Para avaliar o envolvimento do receptor ET_B periférico na anti-hiperalgesia mecânica produzida pela EA foi escolhido o 14º dia após a IR da pata; por estar bem descrito neste modelo animal, que a partir do 7º dia após a IR os animais encontram-se na fase crônica do modelo animal de DPIC. Diante disso, para avaliar a participação do receptor ET_B foi utilizado o teste de von Frey conforme já descrito no item 4.6.1, bem como a descrição detalhada de cada grupo consta no item 4.4. Assim, para a execução desses experimentos foram necessários 72 animais.

Para verificar o envolvimento do receptor ET_B periférico foram necessários dois experimentos simultaneamente, porém estão separados em diferentes momentos para melhor compreensão. Além disso, foram utilizadas doses com base na literatura (PIOVEZAN et al., 2000).

- (a) Para avaliar se os tratamentos com SRTX S6c (30 pmol, i.pl.) ou com EA 20' poderiam potencializar seus efeitos quando administrados em combinação no modelo animal da DPIC, diferentes grupos de animais com IR foram tratados com SRTX S6c (30 pmol, i.pl.) ou com EA 20' isoladamente e em combinação. A hiperalgesia mecânica foi então avaliada em 15, 30, 60, 120 e 150 min após os tratamentos. O grupo IR + Controle 1 também foi avaliado paralelamente (figura 28A).
- (b) Para avaliar se os tratamentos com SRTX S6c (30 pmol, i.pl.), com EA 20' ou a combinação dos dois poderiam ser prevenidos pela administração prévia periférica de Bq-788 (10 nmol, i.pl.), diferentes grupos de camundongos com IR foram tratados com Bq-788 (i.pl., volume fixo de 10 μ l) e após 15 minutos foram tratados com SRTX S6c (30 pmol, i.pl., volume fixo de 10 μ l) com EA 20' ou a combinação dos dois. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 min após os tratamentos e grupos controles foram avaliados paralelamente (figura 28B).

4.6.7 Avaliação da participação dos receptores ET_B espinais na anti-hiperalgesia mecânica produzida pela EA

Para avaliar o envolvimento do receptor ET_B espinal na anti-hiperalgesia mecânica, que foi produzida pela EA foi escolhido o 14º dia após a IR da pata. Diante disso, para avaliar a participação do receptor ET_B foi utilizado o teste de von Frey conforme já descrito no item 4.6.1, bem como a descrição detalhada de cada grupo consta no item 4.4. Assim, para a execução desses experimentos foram necessários 72 animais.

- (a) Para avaliar o efeito do tratamento i.t., diferentes grupos de animais com IR foram tratados com Bq-788 (3, 10 e 30 nmol, i.t.). A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 15, 30, 60, 120, 180 e 210 min após os tratamentos. O grupo IR + Controle 1 também foi avaliado paralelamente (figura 30A).
- (b) Para avaliar se os tratamentos com Bq-788 (3 nmol, i.t.), com EA 20' ou a combinação dos dois poderiam ser potencializados, diferentes grupos de camundongos com IR foram tratados com Bq-788 (3 nmol, i.t.) ou com EA 20' isoladamente e em combinação. A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 15, 30,

60, 120, 180 e 210 min após os tratamentos. O grupo IR + Controle 1 também foi avaliado paralelamente (figura 30B).

4.6.8 Avaliação da expressão dos receptores ET_B

Esta técnica foi realizada com o objetivo de quantificar a expressão do receptor ET_B na região lombar da medula espinal (segmentos medulares L4-L6, nível central) e na musculatura intrínseca da pata traseira direita (m. flexor curto dos dedos, nível periférico), conforme o método de Western blotting adaptado de Millecamps e colaboradores (2010). O procedimento foi realizado no 14º dia (fase crônica) após 30 min do tratamento com EA, sendo que os animais na fase crônica do modelo animal receberam tratamento diário do 7º até o 14º dia após a IR. Os grupos experimentais foram: Naive ($n = 8$), IR + Controle 1 ($n = 8$) e IR + EA 20' ($n = 8$). Foram utilizados 24 animais para a realização deste experimento.

Após a eutanásia dos camundongos, 30 min após o tratamento com a EA, foi realizada a coleta da região lombar da medula espinal (segmentos medulares L4-L6) (Figura 22A) e musculatura intrínseca da pata traseira direita (Figura 22B) dos camundongos. Para a coleta da medula espinal foi utilizado uma seringa de 5 ml sem agulha e com uma ponteira de pipeta adaptada, para após a extração da região desejada foi injetado no canal vertebral cerca de 2 ml de soro fisiológico, para que assim a medula espinal fosse desprendida do canal vertebral e exposto os segmentos lombares (L4-L6). Enquanto, que a musculatura flexora da pata traseira direita dos camundongos foi removida com o auxílio de uma pinça e de uma lâmina cirúrgica nº 11, onde a pele foi seccionada cuidadosamente e foi expostos o músculo flexor curto dos dedos, para então ser coletada a amostra.

Após a coleta, cada amostra foi armazenada no freezer -80 °C até a análise das mesmas. Assim, para a preparação das amostras os tecidos da medula espinal foram homogeneizados manualmente com micropistilos em tampão lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS) e salina tampão fosfato (PBS)], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1%. Já a musculatura da pata foi pulverizada em nitrogênio líquido e adicionado o tampão lise RIPA. Logo, em seguida foram incubados em gelo por 30 min.

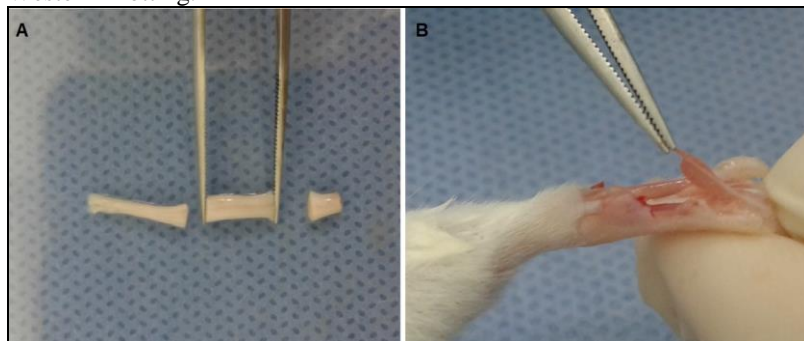
Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C, para que fosse coletado o sobrenadante (correspondente ao extrato total), a alíquota foi separada para a dosagem da proteína de cada amostra, que foi determinada por meio do método de Bradford. No restante do sobrenadante foi adicionado o tampão de amostra [glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris hidrocloreto ultrapuro 0,2 M (Tris HCL) e SDS 10%] na proporção de 1:6. Sendo assim, as amostras foram fervidas a 95 °C por 5 min e permaneceram armazenadas no freezer - 80 °C até o momento da eletroforese.

Para a realização dos ensaios de imunodeteção, todas as amostras foram mantidas em gelo até o completo descongelamento. Em seguida, foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) e SDS 10%, quantidades iguais de proteína para cada amostra (30 µg). Na etapa de transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de Fluoreto de polivinilideno (PVDF) foi realizada sob as seguintes condições: 90 V e 30 mA por 1 h e 30 min. Logo em seguida, as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%) para a visualização das proteínas. Após lavagens em solução salina tamponada com tris e tween a 20% (TBS-T), Cloreto de sódio (NaCl) 137 mM, Cloreto de potássio (KCl) 2,7 mM, Fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄) 1,5 mM, Fosfato dissódico 20 mM (Na₂HPO₄), Tween-20 0,05%, para a retirada do excesso do corante, as membranas foram imersas em solução TBS-T 20% contendo albumina sérica bovina fração V segundo Cohn a 5% (BSA) por 1 h a temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas. Na sequência, as membranas foram incubadas durante 14-16 h (2-8 °C), sob agitação, com os anticorpos primários, diluídos em TBS-T contendo BSA 1%, contra a proteína de interesse: anticorpo para o receptor ET_B na proporção de 1:5000 e actina-HRP (1:45000). Ao término do período de incubação, as membranas foram lavadas durante 30 min com TBS-T, e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:25000, cabra anti-rabbit-HRP, exceto para anti-actina-HRP) por 1 h em temperatura ambiente.

Após esse período, uma nova lavagem de 30 min com TBS-T foi realizada seguida pela exposição das membranas durante um minuto ao kit de quimiluminescência e a revelação por meio de um fotodocumentador. As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa Image Lab (versão 4.1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os valores

foram normalizados utilizando os dados obtidos para a β -actina e expressos graficamente como unidades arbitrárias.

Figura 22 - Coleta das estruturas para análise por meio da técnica de Western Blotting.



Legenda: O painel A ilustra o segmento da medula espinal de um camundongo na região lombar. No painel B, a musculatura intrínseca da pata traseira direita do camundongo.

4.6.9 Substâncias, drogas e equipamentos

Para a realização dos procedimentos foram utilizadas as seguintes substâncias e/ou drogas e equipamentos:

- (a) **Substâncias:** Acetona (Lote 1407074, Audaz Brasil, São Paulo, SP, Brasil); Ácido tricloroacético (Synth, Presidente Pudente, SP, Brasil); Azul de bromofenol (Synth, Presidente Pudente, SP, Brasil); BSA (Inlab, São Paulo, SP, Brasil); Cloridrato de quetamina (Vetnil, Louveira, SP, Brasil); Deoxicolato de sódio (Lote SLB55868, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); Fotodocumentador (ChemiDoc, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA); Glicerol (Lote DCBC2590, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); KCl (Lote 1300270, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); kit de quimiluminescência (ECL, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA); KH_2PO_4 (Merk, Dist. Pro-análise, PR, Brasil); Mercaptoetanol (Lote 1610710, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA); NaCl (Lote DCBB0925, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Na_2HPO_4 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); Ortovanadato de sódio

(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); PBS (Lote 70711012, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil); PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ; Ponceau (Lote SLBH494SV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); PVDF (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); Salina (LBS Laborasa Indústria Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil); SDS (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); TBS-T (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); Tris HCL (Lote SLBH2577V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); Tween (Lote 1000422, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

- (b) **Drogas:** Actina-HRP (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Anti-endotelin B receptor antibody (ab117529; Abcam, Cambridge, MA, EUA); Bq-788 (B157, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Cabra anti-rabitt-HRP (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); Cloridrato de xilazina (2%, Syntec, Hortolândia, SP, Brasil); Coquetel de inibidores de proteases (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); Isoflurano (Biochimico, Itatiaia, RJ, Brasil); Pentobarbital sódico (Intervet, São Paulo, SP, Brasil); Sarafotoxina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); T-61® (Hoechst Roussel Vet, Intervet, São Paulo, SP, Brasil).
- (c) **Equipamentos:** Agitador de tubos vórtex (modelo Q-220B1, Quimis, Diadema, SP, Brasil); Agulhas de acupuntura de 0,18 mm x 8 mm (DB 132, Dongbang acupuncture Inc, Korea); Anel elástico de ligadura (000-1237, Uniden Ind. e Com produtos ortodônticos Ltda, Sorocaba, SP, Brasil); Aparelho de EA (modelo NKL-608, NKL produtos eletrônicos); Balança analítica UniBloc (modelo AUY 220, Shimadzu, Barueri, SP, Brasil); Balança digital alta precisão eletrônica (Sf-400 1g a 10 Kg, Adrialaboratórios, PR, Brasil); Câmera termografia Thermal Imager (Testo 880®); Capela de exaustão (Wealab, Hortolândia, SP, Brasil); Máquina de Oxigênio (Modelo 2FN, série 0201, Narcosul, Porto Alegre, RS, Brasil); Micrômetro (Insize®, São Paulo, SP, Brasil); Von frey – monofilamento 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA).

4.6.10 Descrição da morte indolor assistida

Para realizar o método de morte indolor assistida (MIA) após os experimentos foram obedecidas as disposições da resolução número 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) de 12 de maio de 2012, bem como da Instrução Normativa número 13 – Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) de 20 de Setembro de 2013. Sendo que, o procedimento foi realizado pelo médico veterinário responsável pelo biotério experimental do LANEX, através da overdose anestésica (cloridrato de xilazina 30 mg/kg associado a cloridrato de quetamina 150 mg/kg, i.p.) seguida de aplicação de solução eutanásica T61®, por via intraperitoneal.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no programa *Graph Pad Prism* na versão 6.0 (*La Jolla*, Califórnia, EUA). Foi avaliada a distribuição dos dados por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Como os dados apresentaram distribuição normal, os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Assim, foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de *Student Newman-Keuls* ou *Bonferroni*. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 EA REDUZ A HIPERALGESIA MECÂNICA NO MODELO ANIMAL DE DPIC

Os resultados ilustrados na figura 23A-D demonstram que o modelo animal de DPIC induziu a hiperalgesia mecânica ($p < 0,001$), quando comparado ao período basal antes dos animais serem submetidos à IR (-1 d). A figura 23 representa o tratamento com EA em diferentes tempos após o procedimento de IR: no 3º dia (painel A), 7º dia (painel B), tratamento diário do 7º ao 14º dias (painel C) e no 14º dia (painel D).

Nas avaliações realizadas no 3º, 7º até o 14º dia após a IR (Figura 23A-D), não foi observada diferença estatística entre o grupo IR + Controle 1 em relação ao grupo IR + Controle 2, por este motivo nas avaliações subsequentes foi utilizado apenas o grupo IR + Controle 1.

No 3º dia após a IR (figura 23A) foi observado que o tratamento com EA por 20 min reduziu ($p < 0,001$) a hiperalgesia mecânica significativamente até 1 h após o tratamento. Enquanto que, os animais tratados com EA por 10 min obtiveram redução do quadro hiperalgésico mecânico apenas na 0,5 h ($p = 0,007$) após tratamento, entretanto o tratamento com EA por 5 min não apresentou efeito na frequência de retirada da pata. Diante disso, o tempo de tratamento com EA por 20 min foi o mais efetivo na redução da hiperalgesia mecânica e escolhido para os demais experimentos.

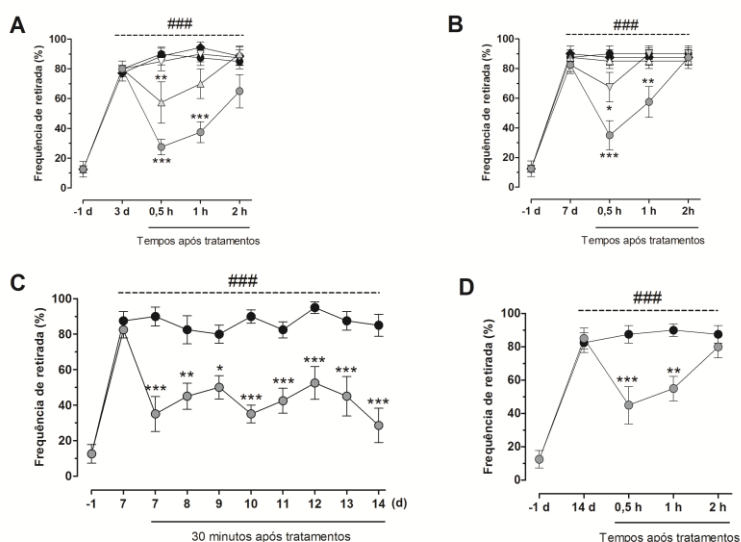
A figura 23B ilustra que, no 7º dia após a IR, a aplicação de EA por 20 min diminuiu a hiperalgesia mecânica em 0,5 h ($p < 0,001$) e 1 h ($p = 0,005$) após o tratamento. Além disso, o tratamento com EA por 10 min reduziu a hiperalgesia mecânica no tempo 0,5 h ($p = 0,046$) após o tratamento, no entanto, a EA realizada por 5 min não apresentou alteração no limiar de retirada da pata dos animais. Com a realização destes experimentos foi demonstrado que o melhor tempo de tratamento com a EA foi por um período de 20 min e que a maior eficácia analgésica foi em 0,5 h após tratamento.

Deste modo, o tratamento diário foi realizado do 7º ao 14º dias e avaliado 0,5 h após o tratamento com a EA por 20 min. Neste experimento pôde-se verificar que a EA aplicada por 20 min foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica do 7º ao 14º dia ($p < 0,001$) após o procedimento de IR quando comparado ao grupo IR + Controle 1 (painel C).

No 14º dia após a IR (painel D), após os tratamentos diários com EA por 20 min (do 7º ao 14º dia), foi observado que o tratamento apresentou o mesmo perfil, reduzindo a hiperalgesia mecânica em 0,5 h ($p < 0,001$) e 1 h ($p = 0,002$) após o tratamento, quando comparado com o grupo IR + Controle 1. Assim, não se observou efeito anti-hiperalgésico acumulativo pelo tratamento diário com EA.

Figura 23 - Efeito anti-hiperalgésico da EA do 3º, 7º ao 14º dia após IR.

● IR + Controle 1 ◆ IR + Controle 2 ▽ IR + EA 5' ▲ IR + EA 10' ○ IR + EA 20'



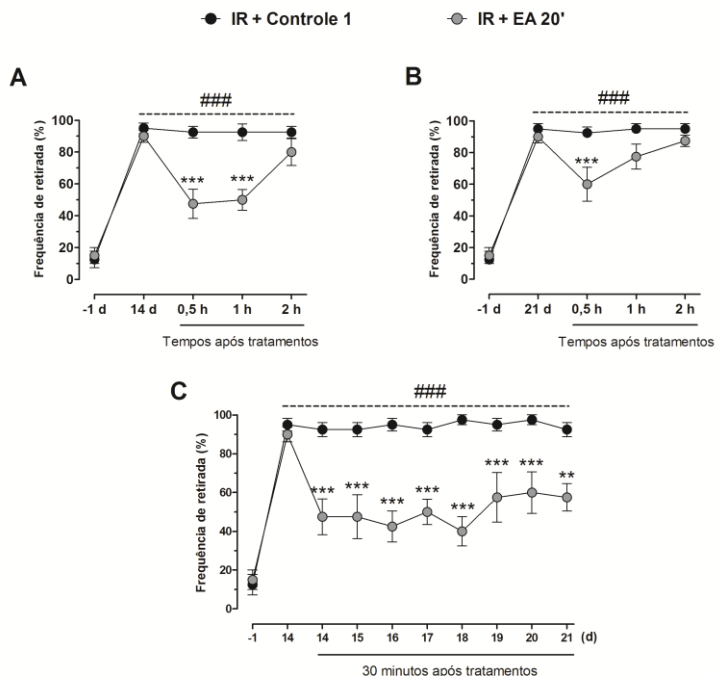
Legenda: Avaliação do decurso temporal do tratamento com EA no 3º dia após a IR (painel A). Avaliação do decurso temporal do tratamento com EA no 7º dia após a IR (painel B). Avaliação após 30 minutos do tratamento diário com EA por 7 dias consecutivos (painel C). Avaliação do decurso temporal do tratamento diário (7º ao 14º dia) com EA no 14º dia após a IR (painel D). Os dados foram expressos como média \pm E. P. M. ($n = 8$ animais). $*p = 0,046$ (painel B), $*p = 0,037$ (painel C), $**p = 0,007$ (painel A), $**p = 0,005$ (painel B), $**p = 0,002$ (painel D) ou $***p < 0,001$ quando comparados com o grupo IR + Controle 1. Considera-se $###p < 0,001$ quando comparado ao basal antes da IR (-1 d). Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. EA = eletroacupuntura, IR = isquemia e reperfusão, d = dias, h = horas.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Os resultados representados na figura 24A-C demonstram, que a indução do modelo animal de DPIC aumentou a frequência de resposta da pata dos animais ($p < 0,001$), quando comparado ao basal antes de submeter a IR (-1d). Além disso, o tratamento com EA foi realizado em diferentes tempos após o procedimento de IR no 14º dias (painel A), tratamento diário do 14º ao 21º dias (painel B) e no 21º dia (painel C).

Os resultados apresentados no 14º dia após a IR (painel A) demonstraram que o tratamento com EA por 20 min reduz a hiperalgesia mecânica após 0,5 h ($p < 0,001$) e 1 h ($p < 0,001$) do tratamento, quando comparado com o grupo IR + Controle 1 com uma única sessão. Assim como no 21º dia após a IR (painel B) e tratado com EA por 20 min ao longo de 7 dias consecutivos, obteve-se redução da hiperalgesia mecânica apenas após 0,5 h ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo IR + Controle 1 não apresentando efeito acumulativo da EA.

Com o tratamento diário com EA por 20 min, a partir do 14º ao 21º dias foi possível observar que a EA foi capaz de reduzir diariamente a hiperalgesia mecânica em todos os dias após 0,5 h de tratamento até o 21º ($p = 0,002$), quando comparado com o grupo IR + Controle 1.

Figura 24 - Efeito anti-hiperalgésico da EA do 14º ao 21º dia após IR.

Legenda: Avaliação do decurso temporal do tratamento com EA no 14º dia após uma sessão (papel A) e 21º dia após tratamento consecutivo (papel B), sendo posterior a IR. Avaliação após 30 minutos do tratamento diário com EA 20' por 7 dias consecutivos (papel C). Os dados foram expressos em média \pm E. P. M. ($n = 8$ animais). $**p = 0,002$ ou $***p < 0,001$ quando comparados com o grupo IR + Controle 1. Considera-se $###p < 0,001$ quando comparado ao basal antes da IR (-1 d). Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. EA = eletroacupuntura, IR = isquemia e reperusão, d = dias, h = horas.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

5.2 EA REDUZ A HIPERALGESIA AO FRIO NO MODELO ANIMAL DE DPIC

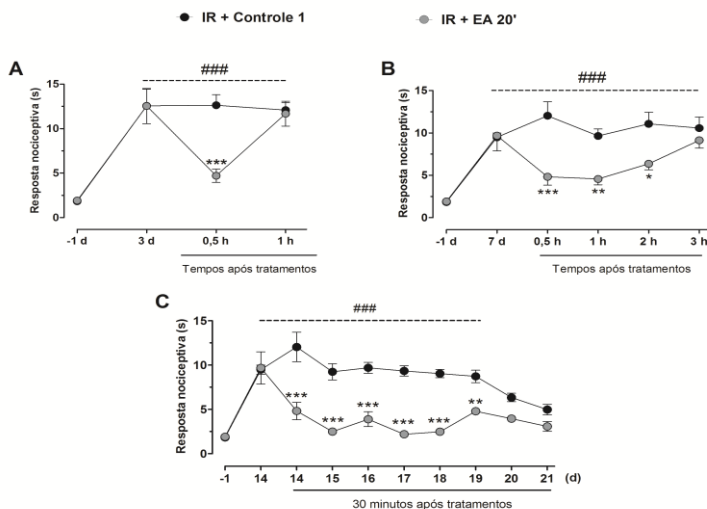
Os resultados representados na figura 25A-C demonstraram o desenvolvimento da hiperalgesia ao frio após a IR ($p < 0,001$), quando comparado ao basal antes de submeter a IR (-1d). A figura 25 ilustra o

tratamento com EA por 20 min após a IR no 3º dia (painel A), 7º dia (painel B) e tratamento diário do 14º ao 21º dia (painel C).

O painel A da figura 25, representa a fase aguda do modelo animal DPIC (3º dia após a IR), notou-se que o tratamento com EA por 20 min reduziu a hiperalgesia ao frio 0,5 h após o tratamento ($p < 0,001$), quando comparado com o grupo IR + Controle 1. No entanto, na fase caracterizada como crônica do modelo animal DPIC, no 7º dia após a IR (painel B) o tratamento com EA por 20 min reduziu a hiperalgesia ao frio em 0,5 h ($p < 0,001$), 1 h ($p = 0,007$) e 2 h ($p = 0,015$), quando comparado ao grupo IR + Controle 1. Demonstrando assim, maior efetividade da EA por 20 min na fase crônica do modelo animal de DPIC.

Com o tratamento diário com EA por 20 min, a partir do 14º até o 21º dia, foi possível observar que a EA foi capaz de reduzir diariamente, 0,5 h após o tratamento, a hiperalgesia ao frio em todos os dias de tratamento até o 19º dia após a IR ($p = 0,003$), quando comparado com o grupo IR + Controle 1 (Figura 25C). Verificou-se ainda que no grupo IR + Controle 1 a hiperalgesia ao frio foi reduzida no 20º e 21º dias após a IR.

Figura 25 - EA promove efeito anti-hiperalgésico ao frio em animais submetidos à IR.



Legenda: Avaliação do decurso temporal do tratamento com EA no 3º dia (painel A) e 7º dia (painel B) após a IR. Avaliação 30 minutos após o tratamento diário com EA 20', por 7 dias consecutivos (painel C). Os dados foram expressos como média \pm E. P. M. ($n = 8$ animais). $**p = 0,003$ ou $***p < 0,001$ quando comparados com o grupo IR + Controle 1. Considera-se $###p < 0,001$ quando comparado ao basal antes da IR (-1 d). Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. EA = eletroacupuntura, IR = isquemia e reperfusão, d = dias, h = horas.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

5.3 EFEITO DA EA NA TEMPERATURA DE SUPERFÍCIE DA PATA E NO EDEMA DE PATA NO MODELO ANIMAL DE DPIC

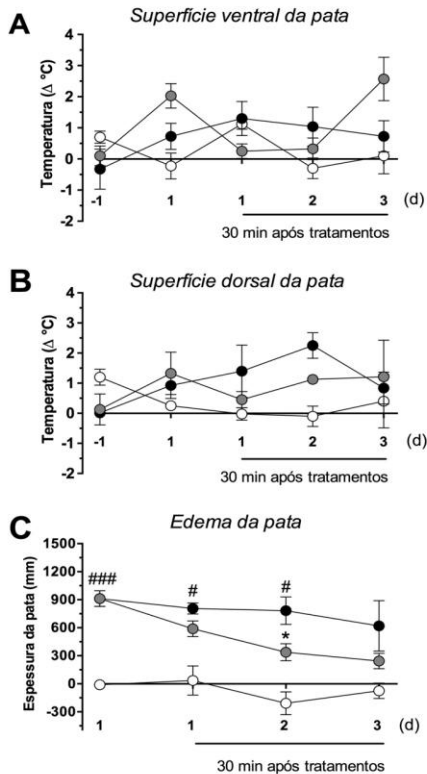
Na figura 26, painel A e B demonstram os dados referentes a temperatura de superfície da pata após a IR. Nem o procedimento de IR, tão quanto o tratamento diário por 3 dias com EA por 20 min foram capazes de alterar a temperatura da pata, tanto na superfície ventral, quanto na superfície dorsal da pata dos animais.

No painel C verificou-se que no 1º ($p = 0,001$) e no 2º ($p = 0,03$) dias após a indução do modelo animal de DPIC houve um aumento do edema de pata nos animais dos grupos IR + Controle 1, quando comparados ao grupo Naive. Houve ainda, uma redução significativa do

edema de pata ($p = 0,03$) no grupo tratado com EA por 20 min apenas no 2º dia após a IR, 30 minutos após o tratamento, quando comparado ao grupo IR + Controle 1.

Figura 26 - Efeito da EA na temperatura e no edema da pata de animais submetidos a IR.

○ Naive ● IR + Controle 1 ● IR + EA 20'



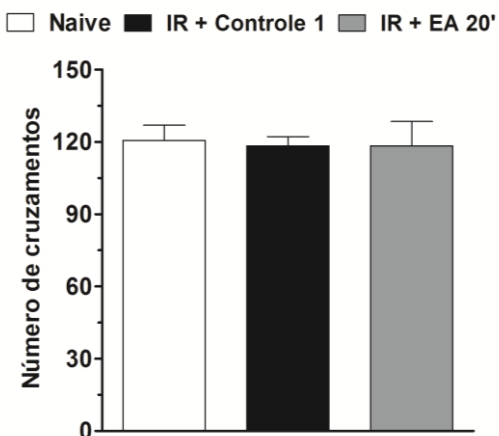
Legenda: Quantificação da temperatura de superfície ventral (painel A), superfície dorsal (painel B) e edema da pata (painel C). Os dados foram expressos em média \pm E.P.M. ($n = 8$ animais). $*p = 0,03$, quando comparados com o grupo IR + Controle 1, $\#p = 0,03$ e $###p = 0,001$ quando comparado ao Naive. Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. EA = eletroacupuntura, IR = isquemia e reperfusão, d = dias, Δ = delta (espessura da pata), $^{\circ}\text{C}$ = graus centígrados, mm = milímetros.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

5.4 EFEITO DA EA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO MODELO ANIMAL DE DPIC

O teste do campo aberto foi realizado no 14º dia após a IR (figura 27). Os animais receberam tratamento com EA 20 min por 7 dias consecutivos (1 vez ao dia, do 7º ao 14º dia após a IR) e 0,5 h após o último tratamento foi verificado que a EA não exerceu influência sobre a atividade locomotora dos animais, quando comparados ao grupo IR + Controle 1. A média do número de cruzamentos ao longo de 6 min para os grupos foram: 120 cruzamentos para o Naive, 118 cruzamentos para o grupo IR + Controle 1 e 118 cruzamentos para o grupo IR + EA 20'.

Figura 27 - Efeito da EA sobre a atividade locomotora no 14º dia após a IR.



Legenda: Avaliação da atividade locomotora no 14º dia após a IR, 30 min após o tratamento com EA. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. ($n = 8$ animais). A análise estatística utilizada foi ANOVA de uma via seguida do teste *Student Newman-Keuls*. EA = eletroacupuntura, min = minutos, IR = isquemia e reperfusão.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

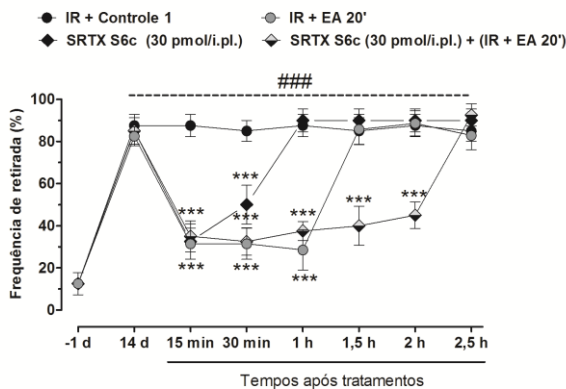
5.5 RECEPTOR ET_B PERIFÉRICO MEDEIA O EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA NO MODELO ANIMAL DE DPIC

Os resultados representados na figura 28A demonstram, que a indução do modelo animal de DPIC aumentou a frequência de resposta da pata dos animais ($p < 0,001$), quando comparado ao basal antes de submeter a IR (-1d). Ainda assim, no painel A verificou-se que a administração de SRTX S6c (30 pmol, i.pl.) foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica após 15 min e 30 min do tratamento ($p < 0,001$), assim como no tratamento com a EA por 20 min houve efeito anti-hiperalgésico até 1h após tratamento ($p < 0,001$). No entanto, quando associado a SRTX S6c (30 pmol, i.pl.) com EA por 20 min houve efeito anti-hiperalgésico acumulativo por até 2 h após o tratamento ($p < 0,001$).

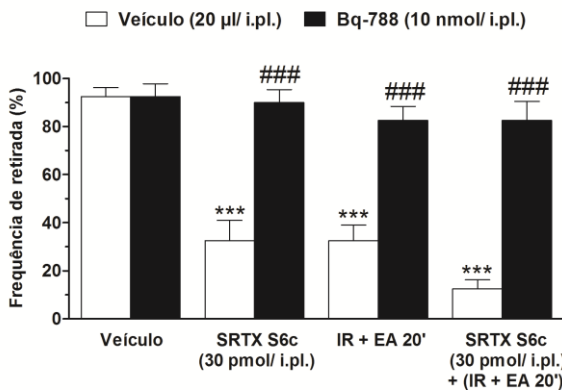
A figura 28B demonstra que a administração i.pl. de Bq-788 na dose de 10 nmol/sítio (15 minutos antes dos tratamentos), no 14º dia após a IR, foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico induzido pela SRTX S6c ($p < 0,001$), EA por 20 min ($p < 0,001$), assim como quando associado a SRTX S6c com EA por 20 min ($p < 0,001$). Estes experimentos apresentam evidências de que a ativação do receptor ET_B periférico é capaz de diminuir a hiperalgesia mecânica na fase crônica do modelo animal de DPIC e também que este receptor (ET_B periférico) está envolvido no efeito anti-hiperalgésico da EA no modelo animal de IR da pata.

Figura 28 - Receptor ET_B periférico participa do efeito anti-hiperalgésico da EA.

A



B



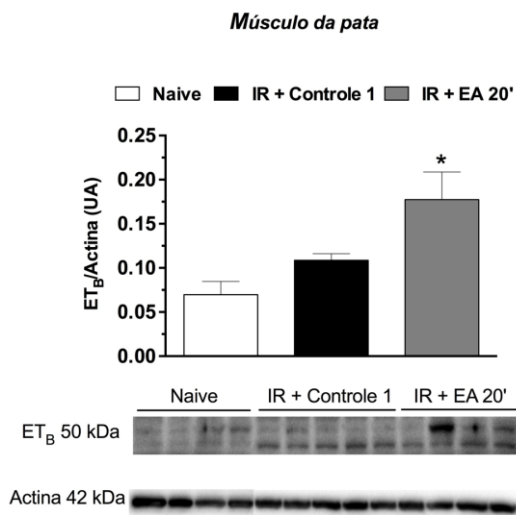
Legenda: Efeito do receptor ET_B periférico na hiperalgesia mecânica, com a administração de SRTX S6c (i.pl) e EA no 14º dia após a IR (painel A) e do Bq-788 (i.pl), EA e SRTX S6c (i.pl) no 14º dia após IR (painel B). $***p < 0,001$ quando comparado com o grupo IR + Controle 1. Considera-se $###p < 0,001$ (painel B), quando comparados ao grupo Veículo (20µl/ i.pl.) + SRTX S6c (30 pmol/ i.pl) ou Veículo (20µl/ i.pl.) + IR EA 20' ou Veículo (20µl/ i.pl.) + (SRTX S6c 30 pmol/ i.pl + IR EA 20') ou quando comparado ao basal antes da IR (-1 d). Os dados foram expressos em média ± E. P. M.

($n = 8$ animais). A análise estatística utilizada foi ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni (painel A) e ANOVA de uma via seguida do teste *Student Newman-Keuls* (painel B). EA = eletroacupuntura, min = minutos, h = horas, d = dias, SRTX S6c = sarafotoxina 6c (agonista do receptor ET_B), Bq-788 = antagonista do receptor ET_B , i.pl. = intraplantar.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

A figura 29 demonstra que os animais naive expressam constitutivamente o receptor ET_B no músculo flexor curto dos dedos. Quatorze dias após a IR da pata, não houve um aumento significativo da expressão deste receptor. No entanto, nos animais submetidos à IR e tratados com EA por 20 min foi evidenciado um aumento da expressão ($p = 0,03$) dos receptores ET_B no músculo flexor curto dos dedos da pata traseira direita dos camundongos, quando comparado ao grupo IR + Controle 1. Diante disso, ficou evidente que a EA por 20 min aumenta a expressão de receptores ET_B na periferia no 14º dia seguido da IR, após tratamento diário por 7 dias consecutivos.

Figura 29 - Aumento da expressão do receptor ET_B periférico induzida pelo tratamento com EA no modelo animal de DPIC.



Legenda: Efeitos dos tratamentos acumulativos (7º ao 14º dia pós a IR) com EA por 20 min sobre a expressão do receptor ET_B no músculo flexor longo dos dedos. Os dados foram expressos como média \pm E. P. M. ($n = 8$ animais), ($n = 4$ animais na representação da banda). * $p < 0,003$ quando

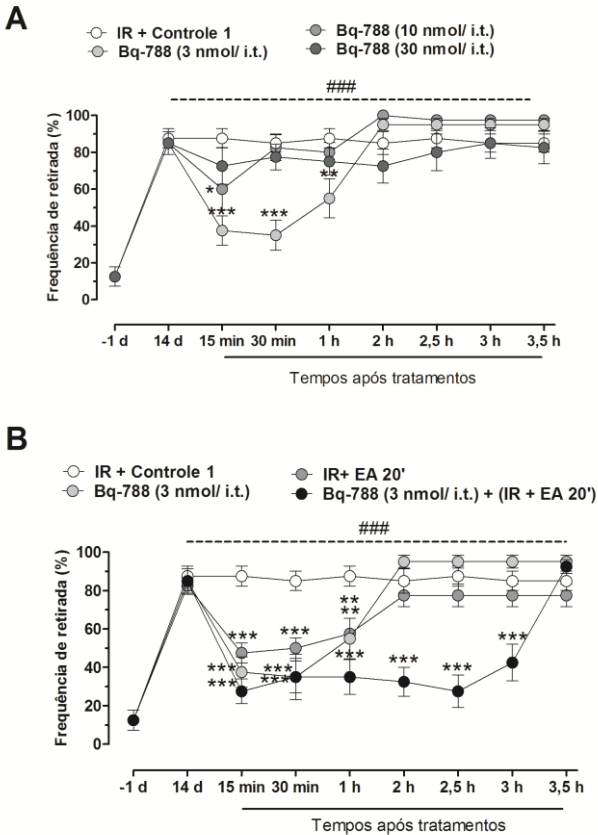
comparado ao grupo IR + Controle 1. Foi realizado ANOVA de uma via seguida do teste *Student Newman-Keuls*. EA = eletroacupuntura, IR = isquemia e reperfusão, ET_B = receptor para endotelina B, UA = unidades arbitrárias.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

5.6 RECEPTOR ET_B ESPINAL PARTICIPA DA ANTI-HIPERALGESIA INDUZIDA PELA EA NO MODELO ANIMAL DE DPIC

Os dados apresentados na figura 30A-B demonstram que o modelo animal de DPIC induziu ($p < 0,001$) hiperalgesia mecânica, quando comparado à avaliação basal, isto é, antes dos animais terem sido submetidos à IR (-1 d). No painel A, verificou-se que o tratamento i.t. com Bq-788 (3 nmol) reduziu a hiperalgesia mecânica em 15 min e 30 min ($p < 0,001$) e 60 min ($p = 0,002$) após o tratamento. Entretanto, a dose de 10 nmol, i.t. de Bq-788 apresentou efeito apenas em 15 min após tratamento ($p = 0,014$). O tratamento com Bq-788 (30 nmol/i.t.) não reduziu a hiperalgesia mecânica.

Já na figura 30B está demonstrado o efeito anti-hiperalgésico da melhor dose do Bq-788 (3 nmol, i.t) no 14º dia após a IR. Nota-se que os animais tratados com o Bq-788 ou com a EA 20' apresentaram efeito anti-hiperalgésico por até 1 h após os tratamentos. No entanto, quando os animais receberam os tratamentos com o Bq-788 juntamente com a EA por 20 min foi observado uma redução ($p < 0,001$) da hiperalgesia mecânica por até 3 h após o tratamento. Estes resultados demonstram o envolvimento da ativação espinal do receptor ET_B na diminuição da hiperalgesia mecânica na fase tardia do modelo animal de IR da pata e, ainda, que a ativação deste receptor parece mediar o efeito anti-hiperalgésico da EA.

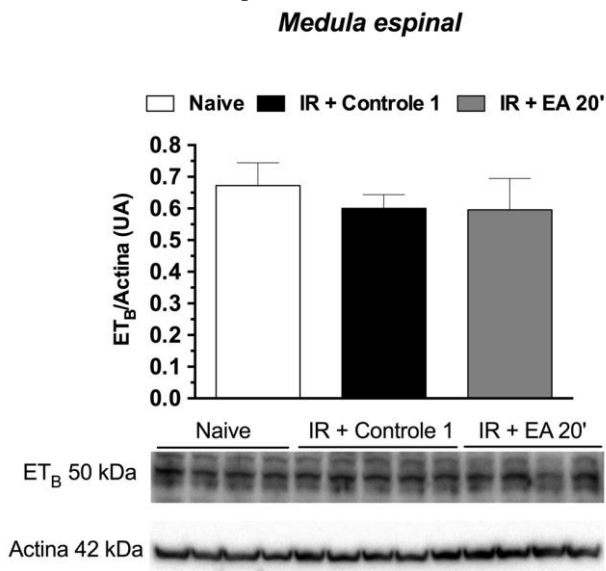
Figura 30 - Receptor ET_B espinal medeia o efeito anti-hiperalgésico da EA.

Legenda: Curva dose resposta do antagonista do receptor ET_B (Bq-788, i.t.) (painel A) e efeito espinal do receptor ET_B na hiperalgesia mecânica, com a administração da melhor dose do Bq-788 (i.t.) e EA no 14º dia após IR (painel B). * $p = 0,014$ (painel A), ** $p = 0,002$ (painel A), *** $p = 0,001$, ** $p = 0,004$ (painel B), *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo IR + Controle 1. Considera-se ### $p < 0,001$ quando comparado ao basal, isto é, antes da IR (-1 d). Os dados foram expressos como média \pm E. P. M. ($n = 8$ animais). A análise estatística utilizada foi ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. EA = eletroacupuntura, min = minutos, h = horas, d = dias, Bq-788 = antagonista do receptor ET_B, i.t. = intratecal.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Na figura 31 é possível observar que os animais naive expressam constitutivamente o receptor ET_B na medula espinal, no entanto, 14 dias após a indução da IR não houve aumento e nem redução significativos da expressão deste receptor. Além disso, foi constatado que nos animais submetidos à IR e tratados com EA por 20 min não evidenciaram mudanças na expressão do receptor ET_B . Diante do exposto acima foi verificado que a EA por 20 min não influencia na expressão dos receptores ET_B na medula espinal após 7 dias de tratamentos diários com EA.

Figura 31 - Expressão do receptor ET_B espinal após tratamento acumulativo de EA no 14º dia após a IR.



Legenda: Efeitos dos tratamentos acumulativos (7º ao 14º dia pós a IR) com EA por 20 min sobre a expressão do receptor ET_B na medula espinal. Os dados foram expressos como média \pm E. P. M. ($n = 8$ animais), ($n = 4$ animais na representação da banda). Não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Foi realizado ANOVA de uma via seguida do teste *Student Newman-Keuls*. EA = eletroacupuntura, IR = isquemia e reperfusão, ET_B = receptor para endotelina B, UA = unidades arbitrárias.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

6 DISCUSSÃO

A dor neuropática decorrente de lesões isquêmicas (TEIXEIRA et al., 2012), como é o caso da SDRC-I é debilitante e de difícil tratamento, visto que os eventos envolvidos no mecanismo periférico e espinal da DPIC não estão ainda bem elucidados (CODERRE et al., 2004; TANG et al., 2017). Neste sentido, terapias não-farmacológicas como a EA têm sido estudadas incessantemente na última década para o tratamento de dores desencadeadas por lesões inflamatórias e neuropáticas (ZHANG et al., 2014). As endotelinas são peptídeos que têm seus efeitos mediados pelos receptores ET_A e ET_B , os quais induzem vasoconstrição e vasodilatação, respectivamente (ZHAO et al., 1991; MILLECAMPS et al., 2010). Além disso, pela expressão destes receptores em estruturas que participam das vias da dor fica evidente sua participação na modulação da nocicepção (ZHANG et al., 2014). Millecamps e colaboradores (2010) demonstraram que o receptor ET_B (periférico) expresso no músculo da pata em modelo animal de DPIC poderia ser um interessante alvo terapêutico para o tratamento da SDRC-I. Além disso, foi demonstrado o papel do receptor ET_B espinal na nocicepção e que sua inibição, mas não a do receptor ET_A , foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica no modelo animal de DPIC que mimetiza a SDRC-I (KIM, KIM, MYUNG, 2015).

Apesar da extensa literatura sobre lesões isquêmicas, o aspecto sensorial tem sido pouco estudado em tempos distintos após a lesão, sendo que a maioria dos estudos tem exploraram principalmente parâmetros nociceptivos agudos após a SDRC-I. Neste sentido, o presente estudo foi realizado para determinar se o receptor ET_B periférico e espinal estão envolvidos no efeito anti-hiperalgésico da EA no modelo animal de DPIC na fase crônica da doença (14 dias após a IR). Com o intuito de investigar as mudanças sensoriais e a influência do tratamento com EA no modelo animal da DPIC, primeiramente foram caracterizadas as fases aguda (3º dia) e crônica/neuropática (7º, 14º ao 21º dia) da disfunção sensorial e testados os efeitos da EA.

No presente estudo foi demonstrado, pela primeira vez na literatura, após o procedimento de IR foi capaz de produzir hiperalgesia (mecânica e ao frio) nas fases aguda (quente - inflamatória) e crônica (fria - neuropática), o qual um único tratamento (tempo dependente) ou diário com EA foi capaz de reduzir a hiperalgesia. Estes resultados estão de acordo com a literatura que demonstrou que a EA realizada nos acupontos ST36 e SP6 foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica em

modelo animal de neuropatia (LAU et al., 2010; GIM et al., 2011; CHOI et al., 2015) e em modelo animal de dor inflamatória persistente induzida pelo CFA (HUANG et al., 2013).

Em relação à hiperalgesia ao frio, Millecamps e colaboradores (2010) inicialmente mostraram que o procedimento de IR da pata de camundongos desenvolve hiperalgesia ao frio e que o antagonista para o receptor ET_B (IRL-1620) produz efeito anti-hiperalgésico ao frio dois dias após o procedimento. Kim e colaboradores (2005) demonstraram ainda, que EA de baixa frequência (2 Hz) no acuponto ST36 por 30 min, após duas semanas da lesão nervosa foi efetiva em reduzir a hiperalgesia ao frio no modelo animal de dor neuropática induzido por ressecção do nervo espinal. Assim, os resultados do presente estudo confirmam e estendem os dados da literatura por demonstrar, que a EA reduz a hiperalgesia ao frio na fase neuropática do modelo animal da DPIC.

Estudos prévios têm estabelecido em modelo animal de DPIC, assim como o utilizado neste estudo, que após a indução por 3 h de isquemia ocorre em seguida um rápido período de reperfusão (modelo animal de lesão por IR) o qual não provoca lesão neural direta pela compressão mecânica produzida pelo torniquete (LAFERRIÈRE et al., 2008), mas sim uma disfunção do sistema nervoso (CODERRE, BENNETT, 2010). Neste modelo animal, que inicialmente foi realizado em ratos e posteriormente adaptado para camundongos, foi descrito que a lesão isquêmica apresenta fases aguda e crônica (neuropática) e que possuem características semelhantes às observadas em pacientes com SDRC-I (CODERRE et al., 2004; DE MOS et al., 2009), por esse motivo este modelo animal de SDRC-I foi selecionado para esta pesquisa. As características clínicas da SDRC-I incluem dor espontânea e provocada por estímulo, edema, distúrbios vasomotores e sudomotores, disfunção motora e alterações tróficas, sem evidência de lesão do nervo espinal (STANTON-HICKS et al., 1995).

O perfil do tratamento farmacológico da DPIC em ratos e camundongos é muito semelhante ao perfil do tratamento em pacientes com SDRC-I. Visto que, na fase precoce (inflamatória) é sensível a fármacos anti-inflamatórios e morfina, enquanto que na fase tardia (neuropática) desenvolve resistência a esses tratamentos, mas é sensível a pregabalina (MILLECAMPS, CODERRE, 2008). Para avaliar o potencial clínico da EA os camundongos foram tratados nas duas fases no 3º e 7º ao 21º dias após a IR. O tratamento com EA foi eficaz tanto na fase inflamatória, quanto na fase neuropática sem alterar a atividade locomotora dos animais. Além disso, pode-se afirmar que a EA não

produziu efeito anti-hiperalgésico acumulativo. Pelo contrário, no 14º dia a EA produziu efeito mais breve quando comparado com os outros dias avaliados.

A tolerância ao tratamento repetido com EA tem sido associada ao sistema N/OFG. Inclusive, Tian e colaboradores (1998) demonstraram que a tolerância observada no efeito da EA pode ser prevenida pela administração intracerebroventricular do anticorpo contra a orfanina-fq em ratos (TIAN et al. 1998; HUANG et al., 2003). Os autores concluíram que a EA pode aumentar a liberação endógena de orfanina-fq no SNC de ratos, que assim poderia agir como antagonista sobre o efeito anti-hiperalgésico da EA no encéfalo. Além disso, tem sido demonstrado que a própria estimulação elétrica pode produzir tolerância, como é o caso da TENS. DeSantana e colaboradores (2010) demonstraram que o bloqueio do receptor para colecistocinina B (CCK-B) preveniu a tolerância induzida pelo tratamento repetido com TENS em ratos com inflamação no joelho induzida pela caolina/carragenina. Neste sentido, em razão do octapeptídeo-colecistocinina (agonista do receptor CCK-B) ter um importante papel na tolerância induzida tanto pela morfina como pela EA, Huang e colaboradores (2007b) demonstraram que o bloqueio deste receptor potencializou o efeito da EA e preveniu a tolerância crônica do efeito anti-hiperalgésico da EA. Assim, sugere-se que estes mediadores peptidérgicos possam mediar a tolerância observada no tratamento repetido com EA.

Outro interessante achado do presente estudo foi a demonstração, de que o tratamento com EA foi capaz de reduzir o edema, mas não a temperatura da pata na fase inflamatória do modelo animal de DPIC. Estes achados estão de acordo com achados prévios, uma vez que tem sido demonstrado que a EA apresenta efeito anti-inflamatório e é efetiva em reduzir edema no modelo animal de CFA (LIANG et al., 2012) e carragenina (KIM et al., 2008) mostrando seu potencial terapêutico nas condições inflamatórias crônicas (ZHANG et al., 2014). Interessantemente, dados de estudo clínico corroboram com os achados do presente estudo, Zhang e colaboradores (2017) analisaram os efeitos da acupuntura nos acupontos ST36 e SP6 por 20 min em mulheres com edema nas pernas induzido pela postura sentada. A acupuntura foi capaz de reduzir o edema logo após o procedimento.

Acredita-se que na SDRG-I, o processamento da dor é alterado em razão da reação inflamatória desencadeada pela IR e por esta provocar modificações no fluxo sanguíneo de estruturas (OAKLANDER et al., 2006; FIELD, 2012) como o nervo e músculo da

região acometida (CODERRE, BENNETT, 2010). Ainda que estudos experimentais tenham descrito o papel da sensibilização periférica e espinal no processamento da dor em modelo animal de dor neuropática (CAMPBELL, MEYER, 2006; JENSEN, FINNERUP, 2009) torna-se importante identificar os sistemas endógenos envolvidos neste mecanismo de facilitação e inibição da dor.

Na SDRC-I, observa-se que a IR lesiona células endoteliais (CODERRE, BENNETT, 2010), que são fundamentais para a modulação do tônus vascular (DAVENPORT et al., 2016) promovendo a MONTMAYEUR, STRICHARTZ, 2009), por meio da ativação de seus receptores com funções distintas tanto a nível periférico, quanto central (espinal). Como, por exemplo: a ativação do receptor ET_B a nível periférico produz analgesia (MILLECAMPS et al., 2010), ao passo que, a nível central (espinal) produz nocicepção (KIM, KIM, MYUNG, 2015). redução do óxido nítrico (NO) através das espécies reativas ao nitrogênio, que são extremamente importantes para as funções celulares (ENDEMANN, SCHIFFRIN, 2004). Neste sentido, estudos têm investigado outros sistemas endógenos envolvidos nas manifestações clínicas da SDRC-I como o sistema adenosinérgico (MARTINS et al., 2015) e o sistema endotelinérgico (GORODKIN, MOORE, HERRICK, 2004; MILLECAMPS et al., 2010).

Alguns estudos destacam a implicação do sistema endotelinérgico no processamento da dor (KHODOROVA, O receptor ET_B pode ser ativado endogenamente pelo isopetídeo ET-1 que é secretado localmente por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (HAMMER, MCPHEE, 2016). Os receptores ET_B na periferia são expressos em células endoteliais (GHONEIM et al., 1993), células da musculatura lisa (SHETTY et al., 1993), macrófagos (SAKURAI-YAMASHITA et al., 1997) e em queratinócitos dentro da derme e epiderme da pele, onde as terminações periféricas dos nociceptores estão localizadas. No sistema nervoso são expressos em estruturas como o nervo isquiático, GSNE, hipotálamo, dentre outros (HANS et al., 2008; BARRETT et al., 2014). Neste sentido, a ativação do receptor ET_B periférico pela administração i.pl. de SRTX S6c (agonista do receptor ET_B) (PIOVEZAN et al., 2000) ou o bloqueio espinal deste receptor pela administração de Bq-788 reduz a nocicepção.

No presente estudo também foi testado se a administração i.pl. de SRTX S6c produz efeito anti-hiperalgésico por meio da ativação do receptor ET_B na fase crônica do modelo animal de DPIC, uma vez que esse efeito já tem sido descrito desde 1988 (HAYNES, WEEB, 1994)

em outros modelos. Assim, neste estudo, a SRTX S6c foi utilizada com dois propósitos: **i)** verificar o papel do receptor ET_B na patogênese da hiperalgesia mecânica induzida pela IR da pata, **ii)** usa-lá como um controle positivo nas investigações do envolvimento do receptor ET_B no efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA.

Conforme o esperado, a administração periférica de SRTX S6c e o tratamento com EA reduziram a hiperalgesia mecânica na fase crônica do modelo animal de DPIC, porém o maior efeito foi evidenciado quando houve a combinação das duas terapias. Os achados sugerem que as duas terapias poderiam compartilhar do mesmo mecanismo de ação, ou seja, ativação do receptor ET_B periférico. Diante do exposto, acredita-se que os efeitos observados estejam atrelados a ação da SRTX S6c sobre o receptor ET_B expresso no vaso, uma vez que este induz uma vasodilatação que se contrapõem ao estado de hipoperfusão crônica presente no modelo animal de DPIC e pelo efeito anti-hiperalgésico sobre o receptor ET_B expresso no neurônio nociceptivo primário, que causa a liberação de opioide induzindo a analgesia. O mesmo tem sido observado e sugerido por Millecamps e colaboradores (2010) que administraram o composto IRL-1620, também agonista para o receptor ET_B , no modelo animal de DPIC em camundongos, porém no segundo dia após a IR. Estudo tem mostrado que a estimulação manual dos acupontos ST36 e SP6, a exemplo da SRTX S6c que ativa receptor ET_B , também pode ser efetiva em aumentar o fluxo sanguíneo no membro inferior (ZHANG, ONOSE, FUJIKAWA, 2017), apontando para um possível efeito da estimulação desses acupontos via receptor ET_B . Assim, investigou-se o envolvimento do receptor ET_B periférico na fase neuropática do modelo animal da SDR-C-I nos efeitos anti-hiperalgésicos induzidos pela SRTX S6c, EA e pela combinação das duas terapias. Os resultados mostram que o bloqueio farmacológico do receptor ET_B periférico na fase neuropática do modelo animal da SDR-C-I preveniu tanto o efeito da SRTX S6c, quanto da EA. Surpreendentemente, também preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido pela combinação das duas terapias. Além disso, nas análises da expressão do receptor ET_B periférico (no músculo flexor curto dos dedos) foi notado que apesar de ser no 14º dia e não apresentar significância estatística, a expressão do receptor ET_B mostrou-se aumentada na pata dos animais que sofreram a IR, quando comparado com os animais naives. No entanto, o tratamento diário com EA induziu um aumento significativo da expressão do receptor ET_B no músculo flexor curto dos dedos desses animais. Tomados em conjunto, os

resultados sugerem o envolvimento do receptor ET_B periférico no efeito anti-hiperalgésico causado pela EA.

Embora, tenha sido demonstrada a expressão do receptor ET_B na medula espinal (RUBANYI, POLOKOFF, 1994) e em neurônios do GSNE (PLANT et al., 2007), pouco foi investigado sobre o seu papel em condições crônicas de dor, principalmente neuropáticas. A ET-1 induz dor diretamente, pela ativação de neurônios nociceptivos (GOKIN et al., 2001) e, indiretamente por induzir a produção de outros mediadores inflamatórios que também ativam e sensibilizam os neurônios nociceptivos, incluindo citocinas (DONATE et al., 2012), prostanoídes (JUNIOR VERRI et al., 2006) e espécies reativas ao oxigênio (ROMERO et al., 2010). A ET-1 é a isoforma predominante e mais potente das ETs (ET-1, ET-2 e ET-3) e produz dor pela ativação do receptor ET_B na medula espinal. Assim como, Kim e colaboradores (2015) demonstraram no modelo animal de dor neuropática induzida pela ligadura das raízes espinais, que a administração via i.t. Bq-788 reduziu a hiperalgesia mecânica nesses ratos. Neste sentido, os dados do presente estudo mostraram que a administração i.t. de Bq-788 no 14º dia após a IR também foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica em camundongos com DPIC de maneira dose dependente. No entanto, o procedimento de IR não foi capaz de alterar a expressão do receptor ET_B na medula espinal. Estes achados corroboram com estudos prévios que também demonstraram que o bloqueio do receptor ET_B na medula espinal pelo Bq-788 produz efeito anti-hiperalgésico de maneira dose dependente, porém em ratos e ao longo de 21 dias (KIM, KIM, MYUNG, 2015).

Após a determinação do efeito anti-hiperalgésico do antagonista do receptor ET_B administrado na medula espinal, o próximo passo do presente estudo foi analisar o envolvimento do receptor ET_B no efeito da EA. Os achados do presente estudo também demonstraram que, embora o tratamento diário com EA não foi capaz de alterar a expressão do receptor ET_B na medula espinal, o tratamento i.t. com antagonista do receptor ET_B potencializou o efeito anti-hiperalgésico da EA sugerindo a participação do receptor ET_B espinal no efeito da EA.

Como a ET-1 é o principal ativador endógeno do receptor ET_B espinal e tem sido mostrado, que as concentrações plasmáticas desse peptídeo estão aumentadas no modelo animal da DPIC, verifica-se assim que há possibilidade da hiperalgesia mecânica ser também sustentada pela ação da ET-1 no receptor ET_B espinal. Em consonância com esta afirmação, tem sido descrito que a síntese e a liberação de ET-

1 é modulada por fatores fisiológicos e fisiopatológicos. Os fatores que demonstraram induzir a produção de ET-1 incluem: citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, angiotensina II, NE, vasopressina, bradicinina, trombina, estresse mecânico, lesão tecidual periférica e hipóxia (MOREAU et al., 1997; AHN et al., 1998; KOPETZ, NELSON, CARDUCCI, 2002). No entanto, fatores como o NO, a prostaciclina e o hormônio natriurético atrial demonstraram inibir a produção de ET-1 (CARDUCCI, JIMENO, 2006). Vários estudos têm demonstrado o efeito da EA na modulação do NO (ALMEIDA, DUARTE, 2008; GUO et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017). Especificamente, a EA no acuponto ST36 reduziu a hiperalgisia térmica orofacial em ratos, efeito que foi prevenido por inibidores específicos da enzima óxido nítrico sintase neuronal e da enzima óxido nítrico induzida. Além disso, os autores observaram que as concentrações foram elevadas quatro vezes no fluido cerebrospinal e três vezes no plasma após a EA (ALMEIDA et al., 2017).

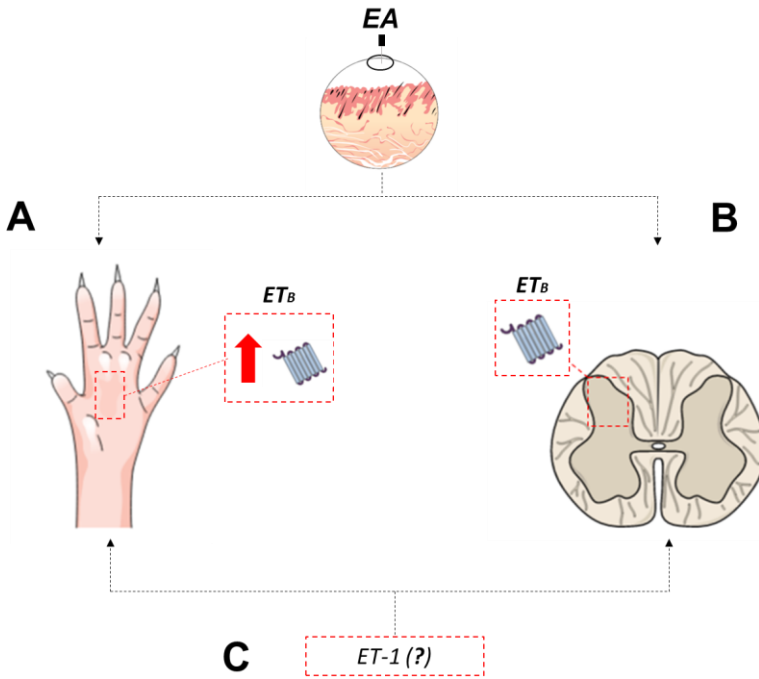
Assim, uma explicação plausível para o efeito observado aqui está relacionada ao aumento de NO induzido pela EA, que poderia ocasionar uma diminuição nas concentrações de ET-1 na medula espinal e assim reduzir a ativação do receptor ET_B, bem como a hiperalgisia. Contudo, futuros estudos analisando as concentrações plasmáticas e teciduais de ET-1 no modelo animal de DPIC em camundongos no 14º dia após a IR e após sete dias consecutivos de tratamento com EA são necessários para confirmar esta hipótese.

7 CONCLUSÃO

Sendo assim, com base nos resultados demonstrados neste estudo, foi possível concluir que:

- (1) O tratamento com EA de baixa frequência em animais com DPIC apresentou efeito anti-hiperalgésico ao estímulo mecânico dependente do tempo de estimulação, tanto na fase aguda, quanto na fase crônica do modelo animal;
- (2) A ativação do receptor ET_B pelo agonista SRTX S6c, além de produzir efeito anti-hiperalgésico *per se*, potencializou o efeito da EA sugerindo o envolvimento deste receptor no mecanismo de ação da EA;
- (3) O tratamento diário com EA de baixa frequência foi efetivo em reduzir a hiperalgesia ao frio, mas não produziu efeito acumulativo;
- (4) O tratamento com EA de baixa frequência em animais com DPIC na fase aguda foi capaz de reduzir o edema de pata, mas não a temperatura da superfície da pata;
- (5) O bloqueio farmacológico do receptor ET_B periférico com Bq-788 preveniu o efeito anti-hiperalgésico da EA de baixa frequência com a mesma dose que inibiu o efeito anti-hiperalgésico da SRTX S6c em animais com DPIC na fase crônica. Já o bloqueio farmacológico do receptor ET_B na medula espinal produziu efeito anti-hiperalgésico *per se*, bem como quando associado, prolongou o efeito anti-hiperalgésico da EA;
- (6) Os animais com DPIC não apresentaram maior expressão do receptor ET_B na periferia e nem na medula espinal (figura 32B), porém o tratamento diário com EA por 20 min em animais com DPIC ocasionou uma maior expressão do receptor ET_B na periferia (figura 32A).

Figura 32 - Desenho esquemático dos achados do presente estudo.



Legenda: O tratamento com a EA induz aumento da expressão do receptor ET_B na pata (painel A), porém não altera a expressão do receptor ET_B na medula espinal. Sugere-se que o isopeptídeo ET-1 estaria envolvido na analgesia induzida pelo receptor (painel C).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Desta forma foi possível constatar, que o tratamento diário com EA foi efetivo em reduzir os sinais e sintomas da DPIC, assim como os receptores ET_B periféricos e centrais participam do efeito anti-hiperalgésico da EA na fase crônica desta síndrome. Logo, este estudo aprofundou o conhecimento acerca dos eventos relacionados ao mecanismo de ação da EA, bem como os fenômenos fisiopatológico da SDR-C-I.

REFERÊNCIAS

AHN, G. Y., et al. The expression of endothelin-1 and its binding sites in mouse skin increased after ultraviolet B irradiation or local injection of tumor necrosis factor alpha. **Br J Dermatol**, v. 25, n. 2, p. 78-84. 1998.

ALMEIDA, R. T. et al. ST36 electroacupuncture activates nNOS, iNOS and ATP-sensitive potassium channels to promote orofacial antinociception in rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 68, n. 1, p. 27-33. 2017.

ALMEIDA, R. T.; DUARTE, I. D. Nitric oxide/cGMP pathway mediates orofacial antinociception induced by electroacupuncture at the St36 acupoint. **Brain Res**, v. 10, p. 54-60. 2008.

ALVAREGA, T. F.; AMARAL, C. G.; STEFFEN, C. P. Ação da acupuntura na neurofisiologia da dor: revisão bibliográfica. **Rev Amaz Science & Health**, v. 2, n. 4, p. 29-36. 2014.

ALVES NETO, O. et al. **Dor: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

ANAND, P. et al. Targeting CB₂ receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. **Brain Res Rev**, v. 60, p. 255-66. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro: 2011.

BARRETT, K. et al. **Fisiologia médica de Ganong**. 24. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

BASBAUM, A. I., et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284. 2009.

BORCHERS, A.T; GERSHWIN, M.E. Complex regional pain syndrome: a comprehensive and critical review. **Autoimmun Rev**, v. 13, p. 242-65. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de atenção à saúde. Departamento de atenção básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. PNPIC-SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BREThERICK, T. A. S. et al. Bases neuroquímicas do tratamento da doença de parkinson pela eletroacupuntura. **J eletr Inst Nanocell**, v. 2, n. 17. 2015.

BRIDGES, D.; THOMPSON, S. W.; RICE, A. S. Mechanisms of neuropathic pain. **Br J Anaesth**, v. 87, p. 12-26. 2001.

BRUEHL, S. Na update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. **Anesthesiology**, v. 113, p. 713-25. 2010.

BUSSA, M. et al. Complex regionalpain syndrome type I: comprehensive review. **Acta Anaesthesiol. Scandinavica**, v. 59, p. 685-97. 2015.

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

CARDUCCI, M. A.; JIMENO, A. Targeting bone metastasis in prostate cancer with endothelin receptor antagonists. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. S6296-6300. 2006.

CASSU, R. N.; LUNA, S. P. L. Aplicações da acupuntura para analgesia. **Revista Científica de Medicina Veterinária – pequenos animais e animais de estimação**, v. 2, p. 121-26, 2004.

CHANG, F.C. et al. The central serotonergic system mediates the analgesic effect of electroacupuncture on Zusanli (ST36) acupoints. **J Biomed Sci**, v. 11, p. 179-85. 2004.

CHEN, Z. H.; HAN, J. S. Analgesia induced by electroacupuncture of different frequencies is mediated by diferente types of opioid receptors: another cross-tolerance study. **Behavioural Brain Research**, v. 47, p. 143-9. 1992.

CHOI, J. W. Analgesic effect of electroacupuncture on paclitaxel-induced neuropathic pain via spinal opioidergic and adrenergic mechanisms in mice. **Am J Chin Med**, v. 43, n. 1, p. 57-70. 2015.

CODERRE, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, v. 112, p. 94-105. 2004.

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome - type I (Reflex Sympathetic Dystrophy): Pain Due to Deep-Tissue Microvascular Pathology. **Pain Medicine**, v. 11, p. 1224-38. 2010.

DANIEL, W.W. **Biostatistics**: a foundation for analysis in the health sciences. 9. ed. New York: John Wiley & Sons, 2008.

DAVENPORT, A. P. et al. Endothelin. **Pharmacol Rev**, v. 68, p. 357-418. 2016.

DE MOS, M. et al. Role of NFkappaB in an animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I). **J Pain**, v. 10, p. 1161-9. 2009.

DESANTANA, J. M.; DA SILVA, L. F.; SLUKA, K. A. Cholecystokinin receptors mediate tolerance to the analgesic effect of TENS in arthritic rats. **Pain**, v. 148, n. 1, p. 84-93. 2010.

DOMMERHOLT, J. Complex regional pain syndrome – 1: history, diagnostic criteria and etiology. **Journal of bodywork and movement therapies**, v. 8, p. 167-77. 2004.

DONATE, P. B. et al. Bosentan, an endothelin receptor antagonist, ameliorates collagen-induced arthritis: the role of TNF-alpha in the induction of endothelin system genes. **Inflamm Res**, v. 61, p. 337-348. 2012.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol**, v. 60, n. 11, p. 1524-34. 2003.

- EISENBERG, E. et al. Plasma endothelin-1 levels in patients with complex regional pain syndrome. **Eur J Pain**, v. 8, p. 533-38. 2004.
- ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. **J Am Soc Nephrol**, v. 5, p. 1983-92. 2004.
- ERTHAL, V. et al. Anti-inflammatory effect of laser acupuncture in ST36 (Zusanli) acupoint in mouse paw edema. **Lasers Med Sci**, v. 31, p. 315-22. 2016.
- FAIS, R. S. et al. Amitriptyline converts non-responders into responders to low-frequency electroacupuncture-induced analgesia in rats. **Life Sci**, v. 91, n. 1-2, p. 14-19. 2012.
- FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J Card Pharmacol**, v.13 Suppl 5, p. S220-2. 1989.
- FIELD, J. Complex Regional Pain Syndrome: a review. **J Hand Sur**, v. 6, p. 616-26. 2013.
- GASPAR, A.T. et al. Síndrome doloroso regional complexo tipo I. **Acta Med Port**, v. 24, n. 6, p. 1031-40. 2011.
- GAY, A. et al. Proprioceptive feedback enhancement induced by vibratory stimulation in complex regional pain syndrome type I: an open comparative pilot study in 11 patients. **Joint Bone Spine**, v. 74, p. 461-6. 2007.
- GHONEIM, M. A. et al. Endothelium localization of ET_B receptor revealed by immunohistochemistry. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 22, p. S111-112. 1993.
- GILLICK, J. L. et al. Successful treatment of complex regional pain syndrome with pseudoaneurysm excision and median nerve neurolysis. **World neurosurgery**. 2016.
- GIM, G. T. et al. Electroacupuncture attenuates mechanical and warm allodynia through suppression of spinal glial activation in a rat model of neuropathic pain. **Brain Res Bull**, v. 86, n. 5-6, p. 403-11. 2011.

GOKIN, A.P. et al. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. **J Neurosci**, v. 21, n. 14, p. 5358-66. 2001.

GOLDMAN, N. et al. Adenosine A1 receptors mediate local antinociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 883-88. 2010.

GORIS, R. J. A. et al. Delayed recovery and late development of complex regional pain syndrome in patients with an isolated fracture of the distal radius prediction of a regional inflammatory response by early signs. **J Bone Joint Surg Br**, v. 89, p. 1076-79. 2007.

GORODKIN, R., MOORE, T., HERRICK, A. Assessment of endothelial function in complex regional pain syndrom type I using iontophoresis and laser doppler imaging. **Rheumatol**, v. 43, p. 727-30. 2004.

GUO, J. et al. Electroacupuncture at Zusanli (ST36) ameliorates colonic neuronal nitric oxide synthase upregulation in rats with neurogenic bowel dysfunction following spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 54, n. 12, p. 1139-44. 2016.

HAN, J. S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different by electrical stimulation of different frequencies. **Trends in Neurosc**, v. 26, n. 1, p. 17-22. 2003.

HANS, G.; DESEURE; A. DRIAENSEN. Endothelin-1-induced pain and hyperalgesia: a review of pathophysiology, clinical manifestations and future therapeutic options. **Neuropeptides**, v. 42, n. 2, p. 119-132. 2008.

HANS, G. et al. Neurosensory changes in a human model of endothelin-1 induced pain: a behavioral study. **Neurosci Lett**. v. 418, n. 2, p. 117-121. 2007.

HAMMER, G. D; MCPHEE, S. J. **Fisiopatologia da doença**: uma introdução à medicina clínica. Tradução Geraldo de Alencar Serra e Patrícia Lydie Voeux. 7. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

HAUSER, J.; HSU, B.; NADER, N. D. Inflammatory process in complex regional pain syndromes. **Immunol investig**, v. 42, n. 4, p. 263-72. 2013.

HAYNES, W. G.; WEBB, D. J. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. **Lancet**, v. 344, n. 8926, p.852-4. 1994.

HUANG, L. et al. Bilateral effect of unilateral electroacupuncture on muscle strength. **J Alternat Complem Med**, v. 13, n. 5, p. 539-546. 2007a.

HUANG, C. et al. CCK(B) receptor antagonist L365,260 potentiates the efficacy to and reverses chronic tolerance to electroacupuncture-induced analgesia in mice. **Brain Res Bull**, v. 71, n. 5, p. 447-51. 2007b.

HUANG, C. P. et al. Electroacupuncture reduces carrageenan- and CFA-induced inflammatory pain accompanied by changing the expression of Nav1.7 and Nav1.8, rather than Nav1.9, in mice dorsal root ganglia. **Evid based complement alternat med**, 1-8. 2013.

HUANG, C. et al. Nocistatin potentiates electroacupuncture antinociceptive effects and reverses chronic tolerance to electroacupuncture in mice. **Neurosc Lett**, v. 350, p. 93-96. 2003.

IOLASCON, G. et al. Complex regional pain syndrome (CRPS) type I: historical perspective and critical issues. **Clin Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 12, n. 1 suppl., p. 4-10. 2015.

JENSEN, S. T.; FINNERUP, N. B. Neuropathic pain: peripheral and central mechanisms. **Eur J Pain Suppl**, v. 3, p. 33-36. 2009.

JUNIOR VERRI, W. A. et al. IL-15 mediates immune inflammatory hypernociception by triggering a sequential re-lease of IFN-gamma, endothelin, and prostaglandin. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, p. 9721-25. 2006.

KANDEL, R. et al. **Princípios de neurociências**. Tradução Ana Lúcia Severo Rodrigues et al. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KAWABATA A. Prostaglandin E₂ and pain - An update. **Biol Pharm Bull**, v. 34, p. 1170-73. 2011.

KHODOROVA, A. et al. Local injection of a selective endothelin-B receptor agonist inhibits endothelin-1-induced pain-like behavior and excitation of nociceptors in a naloxone-sensitive manner. **J Neurosci**, v. 22, n. 17, p. 7788-96. 2002.

KHODOROVA, A. et al. Endothelin-B receptor activation triggers and endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nat Med**, v. 9, n. 8, p. 1055-61. 2003.

KHODOROVA, A.; MONTMAYEUR, J. P.; STRICHARTZ, G. Endothelin Receptors and Pain. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 1, p. 2-28. 2009.

KIM, H. W. et al. Low-frequency electroacupuncture suppresses carrageenan-induced paw inflammation in mice via sympathetic post-ganglionic neurons, while high-frequency EA suppression is mediated by the sympathoadrenal medullary axis. **Brain Res Bulletin**, v. 75, n. 5, p. 698-705. 2008.

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. **Exp Neurol**, v. 195, p. 430-36. 2005.

KIM, Y. O.; KIM, I. J.; MYUNG, H. Y. Antiallodynic effect through spinal endothelin-B receptor antagonism in rat models of complex regional pain syndrome. **Neurosci Lett**. v. 584, n.1, p.45-49. 2015.

KOPETZ, E. S.; NELSON, J. B.; CARDUCCI, M. A. Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer. **Invest New Drugs**, v. 20, n. 2, p. 173-182. 2002.

LAFERRIÈRE, A. et al. Cutaneous tactile allodynia associated with microvascular dysfunction in muscle. **Mol. Pain**, v. 4, n. 49, p. 1-11. 2008.

LAO, L. et al. A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats. **Brain Res**, v. 1020, n.1-2, p. 18-29. 2004.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926. 2009.

LAU, W. K. et al. Electroacupuncture versus celecoxib for neuropathic pain in rat SNL model. **Neurosci**, v. 170, n. 2, p. 655-61. 2010.

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. 981-88. 2006.

LI, A. et al. Electroacupuncture suppresses hyperalgesia and spinal Fos expression by activating the descending inhibitory system. **Brain Resear**, v. 1186, p. 171-9. 2007.

LI, J. et al. Agonist-induced formation of opioid receptor-G protein-coupled receptor kinase (GRK)-G beta gamma complex on membrane is required for GRK2 function in vivo. **J Biol Chem**, v. 278, p. 30219-26. 2003.

LI, Z. et al. Diagnosis and management of complex regional pain syndrome complicating upper extremity recovery. **J Hand Ther**, v. 18, p. 270-76. 2005.

LIANG, Y. et al. Effect of Electroacupuncture on Activation of p38MAPK in Spinal Dorsal Horn in Rats with Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 1-6. 2012.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-77. 2008.

MAGUIRE, J. J.; DAVENPORT, A. P. Endothelin@25 – Endothelin – New agonists, antagonists, inhibitors and emerging research frontiers: IUPHAR review 12. **Br J Pharmacol**, v. 171, p. 5555-72. 2014.

MARTINS, D. F. et al. High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. **Neuroscience**, v. 27, n. 234, p. 69-76. 2013.

MARTINS, D.F. et al. Inhalation of *Cedrus atlantica* essential oil Alleviates pain behavior through activation of descending pain modulation Pathways in a mouse model of postoperative pain. **J Ethnopharmacol**, v. 175, p. 30-38. 2015.

MASAKI, T.; VANE, J. R.; VANHOUTTE, P. M. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 2, p. 137-42. 1994.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária, farmacologia e técnicas**. 5 ed. Guanara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.

MCKELVY, A. D.; MARK, T. R. SWEITZER, S. M. Age- and sex-specific nociceptive response to endothelin-1. **J Pain**, v. 8, n. 8, p. 657–666. 2007.

MENÉNDEZ, L. et al. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 367, n. 1, p. 28-34. 2003.

MERSKEY, H. et al. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. **Pain**, v. 6, n. 3, p. 249-252. 1979.

MIDBARI, A. et al. Amputation in patients with complex regional pain syndrome: a comparative study between amputees and non-amputees with intractable disease. **The Bone and Joint Journal**, v. 98, p. 548-54. 2016.

MILLECAMPS, M.; CODERRE, T. J. Rats with chronic pos-ischemia pain exhibit an analgesic sensitivity profile similar to human patients with complex regional pain syndrome – type I. **Eur J Pharmacol**, v. 583, p. 97-102. 2008.

MILLECAMPS, M. et al. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I).

Pain, v.151, n. 1, p. 174-183. 2010.

MIRSHAHI, T. et al. Distinct sites on G protein beta gamma subunits regulate different effector functions. **J Biol Chem**, v. 277, p. 36345-50. 2002.

MOREAU, P. et al. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist.

Circulation, v. 96, v. 5, p. 1593-97. 1997.

MOURA, D. Uso da termografia infravermelha na análise da termorregulação de cavalo em treinamento. **Eng. Agríc**, v. 31, n. 1, p. 23-32. 2011.

MOUSA, S. A. Involvement of the peripheral sensory and sympathetic nervous system in the vascular endothelial expression of ICAM-1 and the recruitment of opioid-containing immune cells to inhibit inflammatory pain. **Brain Behav Immun**, v. 24, p. 1310-23. 2010.

NAMER et al. Endothelin 1 activates and sensitizes human C-nociceptors. **Pain**. v. 137, n. 1, p. 41-49. 2008.

NICKEL, F. T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **Eur Neuropsychopharm**, v. 22, p. 81-91. 2012.

PLANT, T. D. et al. Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. **Mol Pain**, v. 3, n. 1, p. 35. 2007.

OAKLANDER A. L. et al. Evidence of small fibre axonal degeneration in complex regional pain syndrome type 1 (RSD). **Pain**, v. 120, p. 235-43. 2009.

OERLEMANS, H. M. et al. Pain and reduced mobility in complex regional pain syndrome I: outcome of a prospective randomised controlled clinical trial of adjuvant physical therapy versus occupational therapy. **Pain**, v. 83, p. 77-83. 1999.

OZAKI, S. et al. Coexpression studies with endothelin receptor subtypes indicate the existence of intracellular cross-talk between ET(A) and ET(B) receptors. **J Biochem**, v. 121, p. 440-47. 1997.

PALMEIRA, G. A. Acupuntura no ocidente. **Cad. Saúde Pública**, v. 6, n. 2. 1990.

PIOVEZAN, A. P. et al. Effects of endothelin- 1 on capsaicin-induced nociception in mice. **Eur J Pharmacol**, v.351, n.1, p.15-22. 1998.

PIOVEZAN A. P. et al. Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. **Br J Pharmacol**. v. 129, n. 5, p. 961-968. 2000.

PIOVEZAN, A. P. et al. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 75, n. 6, p. 596-600. 1997.

POMONIS, J. D. et al. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. **J Neurosci**, v.21, n.3, p.999-1006. 2001.

PURVES, D. et al. **Neurociências**. Revisão: Carça Daç, az. Jorge Alberto Quillfeldt. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

RAJA, S.N.; HAYTHOMTHWAITE, J. A. Combination therapy for neuropathic pain – which drugs, which combination, which patients? **N Engl J Med**, v. 352, p. 13. 2005.

RIBBERS, G. M. et al. Pharmacologic treatment of complex regional pain syndrome I: a conceptual framework. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 84, p. 141-46. 2003.

ROCKETT, M. Diagnosis, mecanismos and treatment of complex regional pain syndrome. **Curr Opin Anesthesiol**, v. 27, p. 494-500. 2014.

RODRIGUES, A. L. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 1347-58. 2002.

ROMERO, M. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non-receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. **Atherosclerosis**, v. 212, p. 78-85. 2010.

RUBANYI, G. M., POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacol Rev**, v. 46, p. 325-415. 1994.

SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Molecular characterization of endothelin receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, p. 103-08. 1992.

SAKURAI-YAMASHITA, Y. et al. Rat peritoneal macrophages express endothelin ET(B) but not endothelin ET(A) receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 338, n. 2, p. 199-203. 1997.

SALAZAR-COLOCHO, P.; DEL RÍO, J.; FRECHILLA, D. Serotonin 5-HT_{1A} receptor activation prevents phosphorylation of NMDA receptor NR1 subunit in cerebral ischemia. **J Physiol Biochem**, v. 63, n. 3, p. 203-12. 2007.

SANDRONI, P. et al. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. **Pain**, v. 103, p. 199-207. 2003.

SAYEGH, S. A. L et al. Mirror therapy for Complex Regional Pain Syndrome (CRPS) – A literature review and an illustrative case report. **Scandin J Pain**, v. 4, p. 200-07. 2013.

SCHINKEL C. et al. Systemic inflammatory mediators in post-traumatic complex regional pain syndrome (CRPS I) - longitudinal investigations and differences to control groups. **Eur J Med Res**, v. 14, p. 130–35. 2009.

SHETTY, S. S. et al. Functionally distinct endothelin B receptors in vascular endothelium and smooth muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 191, n. 2, p. 459-464. 1993.

SHRAGA-LEVINE Z, SOKOLOVSKY M: Functional coupling of G proteins to endothelin receptors is ligand and receptor subtype specific. **Cell Mol Neurobiol**, v. 20, p. 305-17. 2000.

SILVA, M. D. et al. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2011.

SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Ischemia and reperfusion in skeletal muscle: injury mechanisms and treatment perspectives. **J. Vasc. Br**, v. 3, n. 4, p. 367-78. 2004.

SMITH, T. P. et al. Evidence for the endothelin system as an emerging therapeutic target for the treatment of chronic pain. **J Pain Res**, v. 7, p. 531-45. 2014.

SOHN, H. S. et al. Impaired Empathic Abilities among Patients with Complex Pain Syndrome (type I). **Kor neuropsychiatric Assoc**, v. 13, n. 1, p. 34-42. 2016.

STANTON-HICKS, M. et al. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. **Pain**, v. 63, p. 127-33. 1995.

SU T. F. et al. Electroacupuncture reduces the expression of proinflammatory cytokines in inflamed skin tissues through activation of cannabinoid CB2 receptors. **Eur J Pain**, v. 16, p. 624-35. 2012.

TAGUCHI, R.; TAGUCHI T.; KITAKOJI, H. Involvement of peripheral opioid receptors in electroacupuncture analgesia for carrageenan-induced hyperalgesia. **Brain Res**, v. 1355, p. 97-103. 2010.

TAKESHIGE C. et al. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. **Brain Res Bull**, v. 29, p. 617-34. 1992.

- TAN, E. C. T. H.; OYEN, W. J. G.; GORIS, R. J. A. Leukocytes in complex pain syndrome type I. **Inflammation**, v. 29, n. 4, p. 182-86. 2005.
- TANG, C. et al. Sex differences in complex regional pain syndrome type – I (CRPS-I) in mice. **J. Pain Res**, v. 10, p. 1811-19. 2017.
- TANG, W. et al. Gbetagamma inhibits G-alpha GTPase-activating proteins by inhibition of G-alpha-GTP binding during stimulation by receptor. **J Biol Chem**, v. 281, p. 4746-53. 2006.
- TEIXEIRA, F. et al. Síndrome dolorosa Regional Complexa tipo 1 – uma etiologia incomum. **Acta Reumatol**, v. 37, p. 86-90. 2012.
- TIAN, J. H. et al. Endogenous orphanin FQ: evidence for a role in the modulation of electroacupuncture analgesia and the development of tolerance to analgesia produced by morphine and electroacupuncture. **Br J Pharmacol**, v. 124, p. 21-26, 1998.
- ULETT, G. A.; HAN, S.; HAN, J. S. Electroacupuncture: mechanisms and clinical application. **Biol. Psychiatry**, v. 44, p. 129-38. 1998.
- VURAL, S. P. et al. Effects of mirror therapy in stroke patients with complex regional pain syndrome type 1: a randomized controlled study. **Arch phys med rehabil**, v. 97, p. 575-81. 2016.
- WEN LU, K. et al. Probing the Effects and Mechanisms of Electroacupuncture at Ipsilateral or Contralateral ST36-ST37 Acupoints on CFA-induced Inflammatory Pain. **Sci Rep**, v. 6, p. 1-11. 2016.
- YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411-15. 1988.
- YIN, C. S. et al. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Res Vet Sci**, v. 84, n. 2, p. 159-65. 2008.
- ZHANG, G. G. et al. Involvement of peripheral opioid mechanisms in electroacupuncture analgesia. **Explore (NY)**, v. 1, n. 5, p. 365-71. 2005.

ZHANG, J. et al. Electroacupuncture increases CB2 receptor expression on keratinocytes and infiltrating inflammatory cells in inflamed skin tissues of rats. **J Pain**, v. 11, n. 12, p. 1250-58. 2010.

ZHANG, R. et al. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain. **Anesthesiol**, v. 120, n. 2, p. 482-503. 2014.

ZHANG, W. P.; ONOSE, Y.; FUJIKAWA, T. A trial study of moxibustion with a warming needle on edema. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 10, n. 1, p. 20-25. 2017.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progr Neurobiol**, v. 85, p. 355-75. 2008.

ZHAO, Y. D. et al. Autoradiographic localization of endothelin-1 binding sites in porcine skin. **J Invest Dermatol**, v. 96, n. 1. 1991.

ZIMMERNAM, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2. 1983.

ANEXO A - Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UNISUL



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 28 de novembro de 2016
Registro na CEUA (código): 16.030.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins


Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Efeitos da eletroacupuntura na dor pós isquemia crônica: avaliação da participação do sistema endotelinérgico", registrada com o nº16.030.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 13/12/2016.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,


Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

ANEXO B - Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UFSC



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da eletroacupuntura na dor pós isquemia crônica: avaliação da participação do sistema endotelinérgico.", protocolada sob o CEUA nº 8208091216, sob a responsabilidade de **Leidiane Mazzardo Martins** e equipe; *Daiana Cristina Salm; Daniel Fernandes Martins* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/06/2017.

We certify that the proposal "Effects of electroacupuncture on pain after chronic ischemia: evaluation of endothelinergic system involvement.", utilizing 503 Heterogenics mice (503 females), protocol number CEUA 8208091216, under the responsibility of **Leidiane Mazzardo Martins and team; Daiana Cristina Salm; Daniel Fernandes Martins** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 06/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 04/2017 a 02/2018

Área: **Ciências Morfológicas**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **45 a 60 dias**

N: **503**

Linhagem: **SWISS**

Peso: **30 a 35 g**

ANEXO C - Documento comprobatório de submissão do artigo

Elsevier Editorial System(tm) for The
Journal of Pain
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in chronic phase of mouse model of complex regional pain syndrome type I

Article Type: Animal Study

Keywords: Chronic pain; Chronic post-ischemia pain; Neuropathic pain; Sanyinjiao (SP6); Zusanli (ST36)

Corresponding Author: Dr. Daniel F. Martins, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of Southern Santa Catarina

First Author: Leidiane Masardo-Martins, PhD

Order of Authors: Leidiane Masardo-Martins, PhD ; Daiana C Salm, Master Degree; Elisa C Duarte, PhD ; Júlia K Ferreira, Graduate Student; Daniela T Ludtke , PhD Student ; Kamilla F Frech , Graduate Student; Luis A Belmonte , PhD Student ; Verônica V Norewicz, PhD; Anna P Piovesan, PhD; Francisco J Cidral-Filho, PhD; Ari O More, PhD; Daniel F. Martins, Ph.D.

Abstract: Complex regional pain syndrome (CRPS) is a disorder that involves abnormal inflammation and nerve dysfunction frequently resistant to a broad range of treatments. Peripheral nerve stimulation with electroacupuncture (EA) has been widely used in different clinical conditions to control pain and inflammation, however the use of EA in the treatment of CRPS is under investigated. In this study, we explore the effects of EA in an animal model of chronic post-ischemia pain (CPIP) model and the mechanism involved in this effect. Female Swiss mice were subjected to 9 h hind paw ischemia/reperfusion CPIP model. EA treatment produced time-dependent inhibition of mechanical and cold hyperalgesia in CPIP mice without altering spontaneous locomotor activity in the open-field test as the highest active time. EA also reduced peripheral inflammation, as evaluated by examining paw edema. The intraplantar injections of ETB receptor antagonists (Bq-788) prevented the EA-induced antihyperalgesia. Interestingly, in mice pretreated with Bq-788 intraneural the antihyperalgesic effect of EA was significantly longer. Furthermore, the expression of peripheral ETB receptors was increased after EA treatments in the western blot. Overall, our work shows that EA produces a significant antihyperalgesic effect in CPIP mice by way of peripheral and spinal ETB receptors. **Perspective:** Our results indicate that EA is effective in reducing CPIP through mechanisms that involve peripheral and spinal ETB receptors. Furthermore, these results support the use of EA as a nonpharmacological approach for the management of CRPS-I.

De: eesserver@eesmail.elsevier.com <eesserver@eesmail.elsevier.com> em nome de The Journal of Pain <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Enviado: segunda-feira, 22 de janeiro de 2018 16:16
Para: danielmartinsfsio@hotmail.com, daniel.martins4@unisol.br
Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr. Martins,

Your submission entitled "Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in chronic phase of mouse model of complex regional pain syndrome type I" has been received by The Journal of Pain.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/jpain/>.

Your username is: danielmartinsfsio@hotmail.com
If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/jpain/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

PLEASE NOTE: If you haven't yet, please send the required Mandatory Submission Form, signed by all authors. You may

<https://outlook.live.com/owa/?path=/mail/inbox>

1/2