

Marcos Lisboa Neves

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO RAMO AURICULAR DO  
NERVO VAGO NA NOCICEPÇÃO VISCERAL E SOMÁTICA  
EM RATOS**

Dissertação do Programa de Pós-  
graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Neurociências.  
Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto  
Soares dos Santos

Florianópolis  
2018

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

Neves, Marcos Lisboa Neves  
EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO RAMO AURICULAR DO NERVO  
VAGO NA NOCICEPÇÃO VISCERAL E SOMÁTICA EM RATOS /  
Marcos Lisboa Neves Neves ; orientador, Adair  
Roberto Soares dos Santos , 2018.  
79 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. Ramo auricular do nervo  
vago. 3. Acupuntura auricular. 4. Nocicepção. 5.  
Sistema colinérgico. I. , Adair Roberto Soares dos  
Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III.  
Título.

**"Efeito da estimulação do ramo auricular do nervo vago na nocicepção visceral e somática em ratos"**

Por


**Marcos Lisboa Neves**

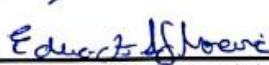
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (041/2018/PGN) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC.

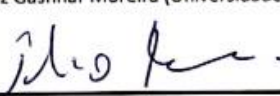
  
Prof.(a) Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Banca examinadora:

  
Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
Dr.(a) Wagner Luis Reis (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr.(a) Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr.(a) Juliano Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 27 de novembro de 2018.



Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe, aos meus professores e aos meus queridos pais.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador, Professor Adair Roberto Soares Santos, por ter me acolhido em seu Laboratório e por todos os ensinamentos. Desta forma, aproveito para registrar minha admiração, destacando sua força de vontade em ensinar, superar dificuldades e ser criativo, perante todas as necessidades, dificuldades e demandas dentro da pesquisa e limitações no cenário acadêmico em nosso país.

Agradeço aos meus colegas de LANDI por todo carinho e parceria durante todo o tempo que passamos juntos:

- Ao Marcelo, pelo convite para conhecer o LANDI, fazer parte de sua equipe no doutorado e por me apresentar o Prof. Adair;

- À Jhenifer por toda a dedicação e disposição em me auxiliar em todos os experimentos, sempre pronta pra tudo. Foi assim, do início ao fim.

- À Róli, pelas idéias, auxílio no trabalho, parceria, dicas, e por toda sua experiência, sempre pronta para dividir seu conhecimento;

- Ao Fernando e a Carol, pelas dicas, ensinamentos no manejo dos animais e por me ajudarem quando precisei;

- À Larissa, Rosane, Tassiane, Thais, Scheila, foi muito bom ter vocês como colegas e termos convivido nesse período;

- Ao Clécio, Léo, Matheus, Dani, Shelly, Ana Clara, Maíra e Vanessa, aprendi muito com todos vocês no LANDI Clínico.

- Ao senhor Carlos, Dona Eva e ao Heitor por todo o suporte dado para o nosso trabalho no laboratório e no manejo dos animais;

- Ao Nivaldo, pelo acolhimento, disponibilidade, apoio e pronto atendimento que tive em todos os momentos que precisei.

Agradeço a todos os professores e funcionários do CCB e do programa de Pós-graduação em Neurociências pela amizade, ensinamento e auxílio.

Agradeço ao Professor Arí pelos ensinamentos e pelas preciosas dicas que tive durante a qualificação do meu projeto.

Agradeço ao Professor Guilherme por me ensinar como fazer vagotomia.

Agradeço ao Professor Eduardo pela disponibilidade de me acompanhar em todas as bancas do mestrado, seleção, qualificação e defesa. Suas dicas e ensinamentos foram valiosos.

Agradeço ao amigo e colega Rafael por todo incentivo na realização deste mestrado, pelos ensinamentos e trocas de experiência.

Agradeço ao amigo e colega Bernardo por todo incentivo, conversas e trocas de experiências.

Agradeço imensamente ao meu amor, minha esposa Fernanda, por todo o suporte e apoio, sem ela não seria possível.

Agradeço a Deus por colocar na minha vida tantas pessoas especiais que trazem sentido à minha existência.

E por fim, agradeço a CAPES, ao CCB, ao departamento de fisiologia, ao LANDI e a UFSC. Instituições que estão fazendo toda a diferença na minha vida profissional e pessoal.



## RESUMO

O nervo vago fornece uma importante rota aferente ao sistema nervoso central, entre muitas funções, suas projeções encefálicas estão envolvidas no controle nociceptivo e na percepção da dor. Além disso, ele possui ramificações para o pavilhão auricular, onde é denominado ramo auricular do nervo vago (RANV), inervando principalmente o centro da aurícula e o conduto auditivo. Embora exista crescente evidência da ação analgésica e anti-inflamatória da estimulação do RANV, seus mecanismos neurobiológicos não foram completamente elucidados. Com o objetivo de avaliar a influência da estimulação do RANV no controle nociceptivo e a participação do sistema colinérgico nesses efeitos, ratos Wistar foram submetidos ao modelo de nocicepção viscero-somática induzida por ácido acético, e somática induzida por formalina ou incisão plantar. O tratamento dos animais foi feito por acupuntura auricular, onde duas agulhas foram inseridas em regiões inervadas pelo RANV. Comparado com grupos controle, a estimulação do RANV esquerdo foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção induzida pelo ácido acético e pela formalina, mas não foi efetiva no modelo de dor pós-operatória causada por incisão plantar. Além disto, o efeito antinociceptivo produzido pela estimulação do RANV esquerdo no modelo de nocicepção pelo ácido acético foi observado em ratos machos e fêmeas. Ademais, a vagotomia cervical do ramo esquerdo, mas não do ramo direito, reduziu significativamente o número de contorções abdominais, assim como o efeito antinociceptivo induzido pela estimulação do RANV esquerdo no modelo do ácido acético. O uso de atropina, antagonista muscarínico não seletivo, e de mecamilamina, antagonista nicotínico  $\alpha 2\beta 3$  seletivo, também reduziu a ação antinociceptiva da estimulação do RANV esquerdo no mesmo modelo. Esses dados mostram que a antinocicepção promovida pela estimulação RANV esquerdo ocorre de forma independente do sexo, assim como seu efeito depende da ativação do nervo vago e de receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos. Tais achados fornecem evidências neurobiológicas que fundamentam o efeito antinociceptivo do RANV na dor viscero-somática e somática em ratos.

**Palavras-chave:** Ramo auricular do nervo vago. Acupuntura auricular. Nocicepção. Sistema colinérgico.



## ABSTRACT

The vagus nerve (VN) operates as an important afferent pathway to the central nervous system, as its encephalic projections are involved in nociceptive control and pain perception, among other functions. In addition, the VN branches to the auricle via the auricular branch of the vagus nerve (ABVN), mainly innervating the inner portion of the outer ear and the auditory canal. Although there is increasing evidence of the analgesic and anti-inflammatory action of ABVN stimulation, its neurobiological mechanisms have not been fully elucidated. In order to evaluate the influence of ABVN stimulation on nociceptive control and investigate the participation of the cholinergic system on these effects, Wistar rats were submitted to viscerosomatic and somatic nociception models induced by acetic acid and formalin or plantar incision, respectively. The animals were subsequently submitted to an unilateral auricular acupuncture treatment, consisting in the insertion of two needles in regions innervated by ABVN on the left or right ear. In comparison to control groups, left-sided ABVN stimulation was able to reduce significantly nociception induced by acetic acid and formalin, but was not effective in the postoperative pain model caused by plantar incision. Moreover, this study concluded that the antinociceptive effect produced by the stimulation of the left ABVN in the acetic acid nociception model was observed in male and female rats, which was not observed on other models. Furthermore, cervical vagotomy of the left branch, but not the right branch, significantly reduced the number of abdominal constrictions, as well as the antinociceptive effect induced by the stimulation of the left ventricle in the acetic acid model. The use of atropine, a non-selective muscarinic antagonist, and mecamylamine, a selective  $\alpha 2\beta 3$  nicotinic antagonist, also reduced the antinociceptive action of left ABVN stimulation in the same model. These results show that the antinociception promoted by the left ABVN stimulation is not sex dependent, as its effect depends on the activation of the vagus nerve and muscarinic and nicotinic cholinergic receptors. These findings provide neurobiological evidence supporting the antinociceptive effect of ABVN on viscerosomatic and somatic pain in rats.

**Keywords:** Auricular branch of the vagus nerve. Auricular acupuncture. Nociception. Cholinergic system.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fibras aferentes nociceptivas. ....	22
Figura 2. Via ascendente nociceptiva. ....	22
Figura 3. Via inibitória descendente. ....	24
Figura 4. Mediadores inflamatórios. ....	25
Figura 5. Nervo vago. ....	29
Figura 6. Reflexo colinérgico. ....	31
Figura 7. Núcleos encefálicos. ....	33
Figura 8. Ramo auricular do nervo vago. ....	33
Figura 9. Mapa auricular. ....	35
Figura 10. Estimulação auricular. ....	42
Figura 11. Contorções abdominais. ....	44
Figura 12. Linha do tempo do teste com ácido acético. ....	45
Figura 13. Teste da formalina. ....	45
Figura 14. Linha do tempo do teste da formalina. ....	46
Figura 15. Cirurgia plantar. ....	47
Figura 16. Linha do tempo da avaliação mecânica de alodinia. .	48
Figura 17. Von Frey eletrônico AVS. ....	49
Figura 18. Avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor. ....	50
Figura 19. Linha do tempo da cirurgia plantar. ....	50
Figura 20. Vagotomia. ....	52
Figura 21. Linha do tempo do teste do ácido acético pós- vagotomia. ....	52
Figura 22. Organograma dos testes farmacológicos. ....	53
Figura 23. Linha do tempo dos testes farmacológicos. ....	53
Figura 24. Ácido acético em fêmeas e machos tratados pela aurícula esquerda e direita. ....	55
Figura 25. Teste da formalina. ....	56
Figura 26. Avaliação mecânica de alodinia pós-cirurgia plantar	58
Figura 27. Avaliação da hipersensibilidade ao calor pós-cirurgia plantar. ....	59
Figura 28. Avaliação mecânica de alodinia pós-cirurgia plantar. .....	60
Figura 29. Ácido acético pós-vagotomia em animais tratados. ..	61
Figura 30. Sistema colinérgico. ....	62



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Fibras vagais aferentes e eferentes, funções e núcleos encefálicos. ....	30
--	----





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise estatística de uma variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMPE	Corno posterior da medula espinal
CRF	Corticotrofina
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
E.P.M.	Erro Padrão da Média
fMRI	Ressonância magnética funcional
GABA	Ácido-gama aminobutírico
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
NTS	Núcleo do Trato Solitário
ON	Óxido nítrico
Erk	Quinase regulada pela sinalização extracelular
PKC $\alpha$	Proteína quinase C alfa
PKC $\epsilon$	Proteína quinase C épsilon
RANV	Ramo auricular do nervo vago
s.c.	Subcutânea
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
SS	Solução salina
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Substância P
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
TRPA1	receptor de potencial transitório anquirina 1
$\mu$ g	micrograma



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1	DOR E NOCICEPÇÃO .....	21
1.2	INFLAMAÇÃO E DOR .....	24
1.3	DOR SOMÁTICA E VISCERAL .....	25
1.4	INERVAÇÃO VAGAL .....	28
1.5	RAMO AURICULAR DO NERVO VAGO E AURICULOTERAPIA .....	32
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1	ANIMAIS E AMOSTRA.....	41
4.2	TRATAMENTO .....	41
4.3	DELINEAMENTO DE PESQUISA .....	43
<b>4.3.1</b>	<b>Nociceção induzida pelo ácido acético</b> .....	<b>43</b>
4.3.1.1	Avaliação das contorções abdominais no teste de ácido acético .....	44
<b>4.3.2</b>	<b>Nociceção induzida por formalina</b> .....	<b>45</b>
4.3.2.1	Avaliação do teste de dor aguda induzida por formalina .....	46
<b>4.3.3</b>	<b>Indução da dor pós-operatória</b> .....	<b>46</b>
4.3.3.1	Avaliação mecânica de alodinia .....	48
4.3.3.2	Avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor .....	49
<b>4.3.4</b>	<b>Análise do mecanismo de ação</b> .....	<b>50</b>
4.3.4.1	Vagotomia.....	51
4.3.4.2	Participação dos receptores colinérgicos.....	52
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
5.1	EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO RANV SOBRE NOCICEPÇÃO VISCERAL INDUZIDA PELO ÁCIDO ACÉTICO..	55

5.2	EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO RANV SOBRE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA .....	56
5.3	EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO RANV SOBRE A DOR PÓS-OPERATÓRIA.....	57
5.3.1	Efeito sobre a alodinia mecânica .....	57
5.3.2	Efeito sobre a hiperalgesia térmica ao calor.....	58
5.4	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO.....	61
5.4.1	Influência da vagotomia no efeito antinociceptivo da estimulação do RANV no modelo de nocicepção visceral induzida pelo ácido acético.....	61
5.4.2	Influência dos antagonistas colinérgico no efeito antinociceptivo da estimulação do RANV esquerdo no modelo de nocicepção visceral induzida pelo ácido acético .....	62
6	DISCUSSÃO .....	63
7	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	69

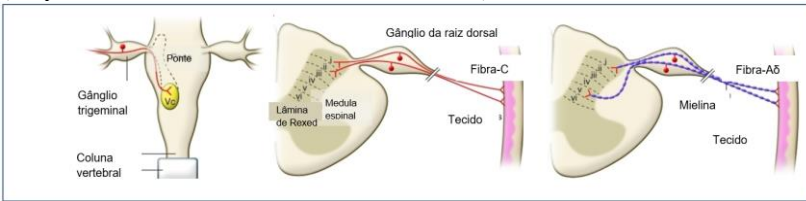
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é uma importante demanda clínica que afeta a população, trazendo prejuízos sociais e econômicos no mundo inteiro (HENSCHKE et al., 2015). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor [do inglês, International Association for the Study of Pain (IASP)], trata-se de uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos. A estimativa é que 20% dos adultos sofrem de dor, sendo que esse dado pode variar entre países, podendo atingir índices que chegam a 25% da população diagnosticada com dor crônica. Existem importantes razões para considerar seu tratamento como uma prioridade na saúde pública, não só por sua alta prevalência, mas também como sendo um fenômeno multifatorial, dinâmico e difícil de quantificar, o que dificulta seus dados epidemiológicos em todo mundo (GOLDBERG & MCGEE, 2011).

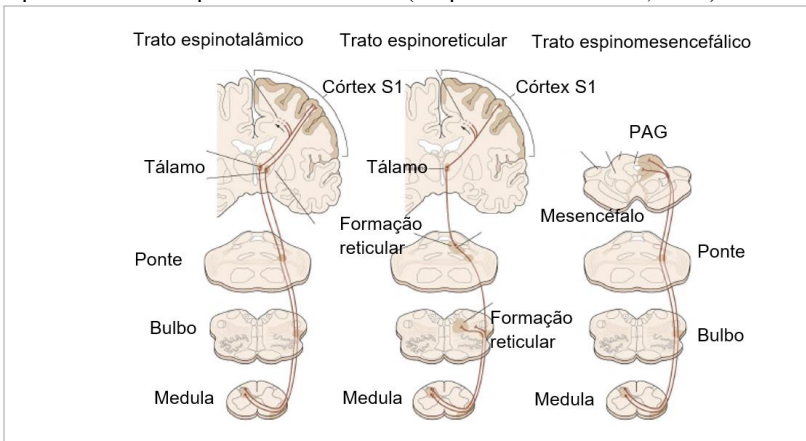
O componente sensorial da dor, que é denominado nocicepção, inclui a detecção e a transmissão de um estímulo potencialmente prejudicial ou de uma lesão. A sinalização nociceptiva é crucial para evitar danos ao corpo. Em condições fisiológicas, nociceptores possuem um limiar alto de disparo (detecção), o que garante aos estímulos que não representam qualquer ameaça ao organismo não sejam detectados por esta via e, conseqüentemente, não sejam percebidos como dor. A nocicepção inicia pela transdução de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, em um potencial elétrico, conhecido como potencial de ação, que é transmitido até a medula espinal (figura 1), por fibras nervosas periféricas, e, por sua vez, até regiões encefálicas. Os sensores primários, para estímulos potencialmente nocivos (nociceptores) são receptores não encapsulados, terminações livres de neurônios que têm seus corpos celulares nos gânglios sensoriais periféricos, como os gânglios da raiz dorsal ou trigeminal, de fibras C amielinizadas e de fibras A $\delta$  mielinizadas (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010).

Figura 1. Fibras aferentes nociceptivas ganglionares, trigeminais e espinais (adaptado de DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010).



Neurônios ganglionares possuem axônios longos, onde uma extremidade forma um terminal somático ou visceral e outra faz sinapse no corno dorsal da medula espinal, ou tronco encefálico (figura 1), com neurônios medulares, que, após decussação a linha média medular, ascendem em direção ao tálamo por meio do trato espinotalâmico, trato espinoreticular e trato mesoencefálico (figura 2). O tálamo distribui, barra ou amplifica a informação nociceptiva, levando-a para diversas regiões corticais, onde a mesma atingirá o nível de consciência, sendo que à interpretação do cérebro pode resultar na percepção de dor (KANDEL, 2000).

Figura 2. Vias ascendentes, representadas pelo trato epinotalâmico, espinoreticular e espinomesoencefálico (adaptado de KANDEL, 2000).

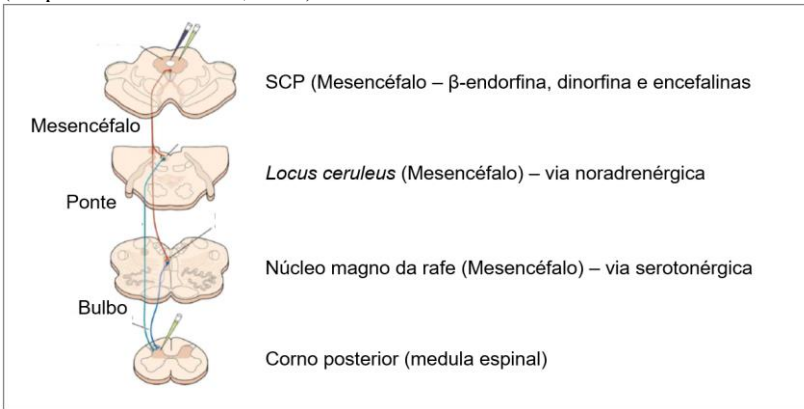


O trato espinotalâmico é a via nociceptiva que inclui fibras termossensíveis provenientes das lâminas I, V e VII do corno dorsal da medula, que ascendem até o tálamo, e está ligado com um importante

papel na informação nociceptiva e na sensação de dor. O trato espinoreticular contém fibras neuronais provenientes das lâminas VII e VIII do corno dorsal, que ascendem até a formação reticular, assim como o tálamo, e está ligado com respostas autonômicas deflagradas por estímulos nociceptivos. O trato espinimesencefálico contém fibras neuronais provenientes das lâminas I e V do corno dorsal, ele projetando-se para a formação reticular do mesencéfalo e para os núcleos da substância cinzenta periaquedutal (SCP) (figura 2), assim como também possui projeções para o núcleo parabraquial e, por conseguinte, para a amígdala, que é núcleo chave na ativação do sistema límbico. Existe ainda o trato cervicotálamico (lâminas III e V), oriundo da região superior da cervical e relacionado ao mesencéfalo e ao tálamo, e o trato espinohipotálamico (lâminas I, V e VIII), que possui suas fibras ligadas a núcleos hipotalâmicos, está envolvido com respostas autonômicas e neuroendócrinas, que acompanham as síndromes dolorosas (BASBAUM, 2009).

A principal via de controle inibitório nociceptivo faz parte do trato espinomesencefálico e é denominada Via Inibitória Descendente (figura 3). A informação nociceptiva que percorre este trato ativa a SCP, que por sua vez, ativa os núcleos, locus ceruleus (LC) e núcleo magno da rafe (NMR), responsáveis pela liberação de neurotransmissores como noradrenalina e serotonina, respectivamente, ligados à modulação inibitória no corno posterior da medula. A SCP é responsável pela liberação de encefalinas e dinorfina, produzidas por ela própria, e de  $\beta$ -endorfinas, provenientes do hipotálamo. Porém, sabe-se também que embora existam poucas conexões entre a SCP e o corno posterior da medula, núcleos medulares também liberam dinorfina e encefalinas. Sendo assim, a inibição da informação nociceptiva no corno posterior da medula dependente da liberação de opióides, noradrenalina e serotonina (HEINRICHER et al., 2009; KANDEL, 2000).

Figura 3. Via inibitória descendente, núcleos e respectivos neurotransmissores (adaptado de KANDEL, 2000).

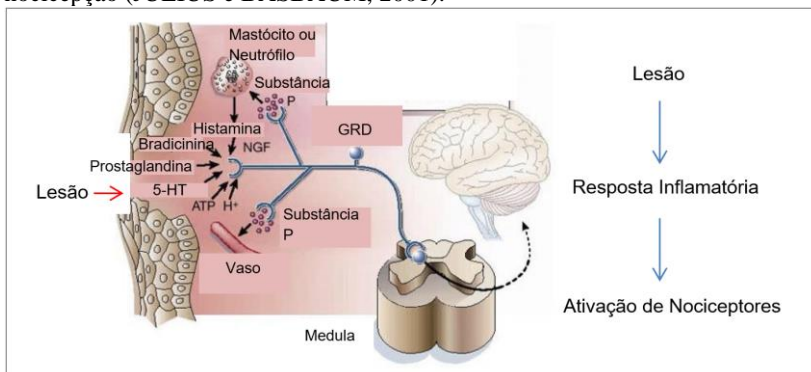


## 1.2 INFLAMAÇÃO E DOR

A inflamação é uma resposta imunológica complexa, frente a qualquer tipo de lesão (ferimentos, degenerações, infecções, queimaduras ou danos por irritantes), com objetivo de proteger e reparar os tecidos. É dividida em fase aguda, subcrônica e crônica, onde cada uma é caracterizada por evento celular [participação de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilo, mastócitos) e mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos)] e vascular (liberação de mediadores químicos como prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas, etc.), sendo esse último, composto por mediadores inflamatórios que têm papel chave na dor inflamatória. A lista desses mediadores inclui bradicinina, substância P, adenosina trifosfato (ATP), prostaglandinas, fatores de crescimento, proteases, óxido nítrico (ON), citocinas, quimiocinas, entre outros (figura 4). São consideradas como substâncias indutoras de dor, capazes de sensibilizar ou excitar diretamente os terminais periféricos dos neurônios nociceptivos, ou seja, seus sensores químicos (LINLEY et al., 2010).



Figura 4. Resposta inflamatória, mediadores inflamatórios envolvidos na nocicepção (JULIUS e BASBAUM, 2001).



Neutrófilos, monócitos e macrófagos são células fagocitárias especializadas. O sistema fagocitário mononuclear é definido com base na sua origem e atividade, e inclui os monócitos no sangue, que são células derivadas de precursores da medula óssea. Na ocorrência de estímulo inflamatório, os monócitos da circulação migram para os tecidos e se diferenciam em macrófagos. Esses são divididos de acordo com sua localização anatômica e fenotípica, como: osteoclastos (osso), macrófagos alveolares (pulmão), micróglia (sistema nervoso), entre outros. Além disso, macrófagos clássicos do tipo M1 medeiam à defesa contra uma variedade de bactérias, protozoários e vírus, tendo um papel na imunidade antitumoral; enquanto macrófagos alternativos, ou regulatórios, do tipo M2, têm funções anti-inflamatórias e regulam a cicatrização da lesão (LAWRENCE e NATOLI, 2011).

### 1.3 DOR SOMÁTICA E VISCERAL

A dor de origem nociceptiva é a experiência mais comum de dor. O termo “dor nociceptiva” é usado para descrever a dor que ocorre a partir do sistema nervoso periférico, devido ao dano real ou potencial em tecidos não neurais, resultando em ativação de nociceptores (KOSEKA et al., 2016). A dor somática é um tipo de dor nociceptiva com origem na pele, músculo ou articulações. Diferente de dor visceral, também classificada como nociceptiva, mas que surge dos órgãos viscerais (SIKANDAR e DICKENSON, 2012).

Em condições pós-cirúrgicas, como um exemplo de dor nociceptiva somática, a analgesia é uma condição essencial. O manejo

inadequado da dor, além do sofrimento, pode resultar no aumento da morbidade ou mortalidade. A eficácia na gestão da analgesia pós-operatória inclui conforto, satisfação, mobilização precoce e redução de complicações pulmonares, cardíacas e circulatórias, assim como a prevenção de dor neuropática (MICHAEL e RAMSAY, 2000).

A incisão cirúrgica dá início a uma série de reações neuroquímicas no local da lesão (incisão), mas também inicia uma cascata de alterações que podem levar à sensibilização do sistema nervoso. A ativação de nociceptores e transmissão de sinais aferentes ao encéfalo, ocasionados pela cirurgia, podem ser amplificados ou atenuados ao longo da via. O corno dorsal da medula espinal é descrita como uma área chave neste processo, ali os sinais nociceptivos podem ser atenuados pela via inibitória descendente, ou amplificados por uma série de mecanismos onde a entrada repetida de estímulos nociceptivos pode levar a redução do limiar de ativação dos neurônios medulares, resultando em sensibilização central e contribuindo para cronificação da dor. Tais alterações não se restringem apenas a nociceptores e a modulação do corno dorsal, mas também a mudanças talâmicas e corticais. Sendo assim, o controle da dor pós-operatória é de suma importância como prevenção de sua cronificação, visto que nesta última condição o padrão de mudança é tão difuso e complexo, que torna pouco provável que uma estratégia terapêutica seja eficaz (NEIL e MACRAE, 2009).

Em adultos, a prevalência das algias viscerais, uma das causas comuns por procura de atendimento em saúde, chega a 25% para queixas de dor abdominal intermitente. A dor abdominal sem explicação definitiva foi estabelecida como a décima causa mais comum de admissão de homens em hospitais e a sexta causa mais comum em mulheres, sendo que 67% das admissões consecutivas a uma enfermagem hospitalar são de dor abdominal não específica. É um tipo de queixa comum na infância, onde até 20% das crianças afetadas, os episódios são intermitentes, mas recorrentes, e somente 30% das admissões hospitalares de urgência por este tipo de dor resultam em diagnóstico definitivo, e, até 33% das apendicectomias de emergência o apêndice é normal (COLLETT, 2013).

Pacientes com dor abdominal crônica usualmente são subtratados e subdiagnosticados. Sua incidência anual é de 15 casos para cada 1000 indivíduos. Ela manifesta-se na região da linha média do abdômen, sem localização precisa no epigástrico, região periumbilical ou mesogástrico, e é habitualmente descrita como cólica, podendo associar-se a náuseas, vômitos, sudorese ou palidez. Dentre as causas mais frequentes estão processos inflamatórios de origem infecciosa ou química, doenças isquêmicas, doenças disfuncionais e neoplasias (ZAKKA et al. 2013). A

síndrome de dor abdominal, como a Doença Inflamatória Intestinal e a Síndrome do Intestino Irritável geram dois tipos diferentes de dor visceral: orgânica e funcional. A dor orgânica é consequência de uma lesão inflamatória do intestino, que ativa diretamente sua inervação sensorial. A dor funcional aparece na ausência de doença demonstrável, comumente interpretada como uma consequência da hipersensibilidade das vias nociceptivas viscerais, seja dos receptores sensoriais periféricos ou centrais. Porém, ainda não existe consenso sobre fisiopatologia da hipersensibilidade visceral, assim como a participação de fatores cognitivos e afetivos nesse processo, uma vez que também as condições de dor funcional são altamente prevalentes em mulheres, sugerindo sua correlação com os níveis de estrogênios circulantes, ao invés de uma doença orgânica abdominal ou pélvica, embora alguns pesquisadores acreditem que o papel pró-nociceptivo, ou antinociceptivo do estrogênio ainda não esteja claro (CERVERO, 2014).

O processamento nociceptivo na dor visceral e somática possui características comuns e importantes diferenças nos mecanismos sensoriais e afetivos. O tratamento de ambas as formas álgicas está se tornando progressivamente independente da doença que acompanha. Os distúrbios gastrointestinais funcionais afetam cerca de 10 a 15% da população europeia e norte-americana, contribuindo para os encargos econômicos, absenteísmo, perda da produtividade e sofrimento (SIKANDAR e DICKENSON, 2012).

Fibras aferentes que inervam as vísceras projetam-se para o SNC por meio de nervos simpáticos, pela via tóraco-lombar, e parassimpáticos, pela via crânio sacral. Aferências sensoriais do trato gastrointestinal e urinário possuem funções reguladoras e também contribuem para sensações como a dor e a plenitude. A convergência víscero-somática possui escassez de fibras aferentes viscerais na medula espinal, perfazendo um total inferior a 10%, além de divergência extensiva e em relação às fibras somáticas. Tais condições influenciam no processamento de entradas viscerais e somáticas, produzindo dor referida, de um órgão influenciando em outro, assim como condições viscerais produzindo sensações somáticas, ou vice-versa. As aferências vagais projetam-se para o núcleo trato solitário (NTS), no tronco encefálico, e são transmitidas para centros límbicos e cognitivos superiores, incluindo amígdala, hipotálamo e SCP. As aferências espinais, a partir do corno posterior da medula, possuem projeções espinotalâmicas que ascendem contralateralmente ao corno medular até atingirem núcleos talâmicos e projetar-se para outras áreas encefálicas, como córtex pré-frontal e córtex

cingulado anterior, que estão relacionadas com a percepção da dor visceral (KANDEL, 2000).

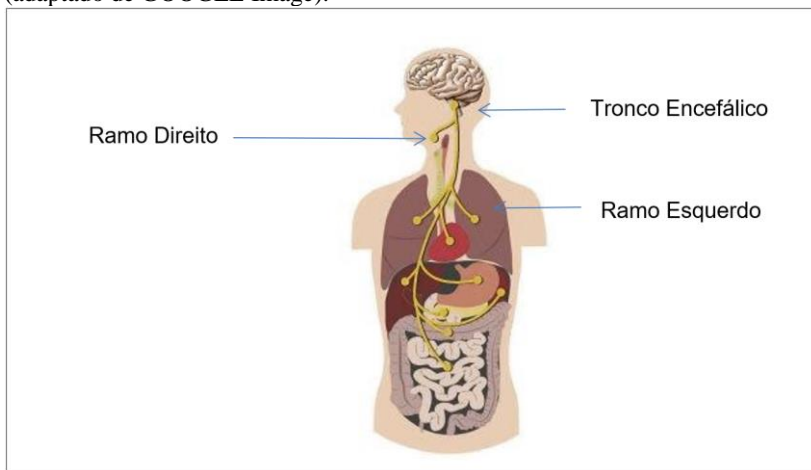
A modulação descendente dos centros superiores é um sistema dinâmico que produz tanto influências facilitatórias, como inibitórias, na medula espinal, sendo que a medula ventromedial rostral, no tronco encefálico, é o principal componente desse sistema modulador supraespinal (SIKANDAR e DICKENSON , 2012).

#### 1.4 INERVAÇÃO VAGAL

O sistema nervoso parassimpático, cujo substrato neural principal é o nervo vago, exerce um papel antinociceptivo fundamental e também influencia na função sensório-motora gastrointestinal. A redução na função vagal foi identificada em uma série de distúrbios, incluindo dispepsia funcional, síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal e diabetes. Várias linhas de evidências suportam que a neuromodulação vagal influencia na motilidade gastrointestinal e na percepção da dor (FRØKJAER et al., 2016).

O nervo vago possui importante papel na homeostase e ampla distribuição no organismo, participando do controle autonômico das atividades dos sistemas cardiovascular, respiratório, gastrointestinal e endócrino (BROWNING, 2015). O vago surge do tronco encefálico, desce por ambos os lados da região anterior cervical e distribui-se pelos órgãos do tórax e do abdômen (figura 5). O ramo direito do vago desce pela bainha carotídea direita até o tórax formando o plexo esofágico com o ramo vagal esquerdo. O ramo esquerdo desce pela bainha carotídea esquerda, que por sua vez, forma o plexo esofágico com o ramo vagal direito. O plexo esofágico dá origem aos nervos gástricos, que suprem os órgãos abdominais, sendo a porção anterior formado principalmente pelo ramo esquerdo do vago e a porção posterior principalmente pelo ramo direito do vago. No abdome, os ramos celíacos são derivados principalmente do ramo direito do vago, fornecendo inervação para o pâncreas, o baço, os rins, as glândulas supra-renais e o intestino. Os ramos hepáticos se originam do ramo esquerdo do vago, unidos ao plexo hepático e distribuídos para o fígado e vesícula biliar (BREIT et al., 2018).

Figura 5. Nervo vago, distribuição e alvos na região cervical, tórax e abdome (adaptado de GOOGLE Image).



Alguns estudos apontam que existe uma diferença na distribuição dos ramos, esquerdo e direito do vago, no que se refere à inervação do músculo cardíaco, onde o nodo sinoatrial é inervado predominantemente pelo ramo direito e o nodo atrioventricular pelo ramo esquerdo. Tais estudos se tornaram diretriz para que a eletroestimulação vagal invasiva seja feita por meio do ramo esquerdo, reduzindo assim um provável risco de efeitos cardíacos. Porém, tal assimetria na inervação cardíaca foi baseada em estudos realizados em cães, onde foi constatado que a eletroestimulação do ramo direito do vago provocou uma bradicardia maior que aquela realizada no ramo esquerdo. Em humanos essas projeções neurais ainda não foram claramente elucidadas, além disso, existe evidência que a eletroestimulação do ramo esquerdo pode ser usada para causar a interrupção do batimento cardíaco, com seu retorno resultando em ritmo sinusal normal. Nesse sentido, três crianças em tratamento para epilepsia, e que tiveram o eletrodo da eletroestimulação invasiva reposicionado no ramo direito, devido à infecção do ramo esquerdo, não apresentaram qualquer tipo de complicação cardíaca, sendo que uma delas ainda teve uma melhora significativa em relação aos resultados que tinha com o ramo esquerdo. Portanto, ainda não estão esclarecidas as possíveis variações anatômicas entre os ramos do nervo vago, entre espécies e também entre humanos (MCGREGOR et al., 2005).

O vago possui fibras aferentes viscerais gerais, que conduzem impulsos originados da faringe, laringe, traqueia, esôfago, vísceras do tórax e abdome; possui também fibras eferentes viscerais gerais, responsáveis pela inervação parassimpática das vísceras torácicas e abdominais; possui fibras aferentes viscerais especiais, que conduzem a gustação; possui fibras eferentes viscerais especiais, que inervam os músculos da faringe e da laringe; e por fim possui fibras aferentes somáticas, que transmitem a informação sensorial cutânea das conchas auriculares, meato acústico e das meninges (tabela 1). Sendo que, 80% de suas fibras são aferentes sensoriais e 20% eferentes motoras. Grande parte da informação sobre a anatomia do nervo vago e suas projeções foi investigada em ratos e é geralmente considerada similar aos humanos. (JOHNSON, 2018).

Tabela 1. Fibras vagais aferentes e eferentes, funções e núcleos encefálicos (JOHNSON, 2018).

<b>Componente</b>	<b>Função</b>	<b>Núcleo Central</b>
<b>Aferente Visceral Geral</b>	Sensibilidade visceral	Núcleo do trato solitário (NTS)
<b>Eferente Visceral Geral</b>	Controle involuntário visceral e glandular	Núcleo motor dorsal do vago
<b>Aferente Visceral Especial</b>	Gustação	Núcleo do trato solitário (NTS)
<b>Eferente Visceral Especial</b>	Deglutição e fonação	Núcleo ambíguo
<b>Aferente Somático</b>	Sensibilidade cutânea das conchas auriculares	Núcleo do trato espinal do trigêmeo

As fibras aferentes vagais abdominais são compostas por mecanorreceptores, quimiorreceptores e receptores de tensão no esôfago, estômago e intestino delgado proximal e terminações sensoriais no fígado e no pâncreas. Elas possuem projeções para o NTS e, por sua vez, para o locus ceruleus, medula ventrolateral rostral, amígdala e para o tálamo (BREIT et al., 2018).

Como descrito anteriormente, uma das principais funções do nervo vago aferente é, levar informações viscerais gerais, especiais e somáticas até o encéfalo. Porém, ele também é um nervo eferente, que atua como

um antagonista, ou melhor, atua antagonicamente ao sistema nervoso simpático, no controle das funções vegetativas e da homeostase. Por outro lado, estudos apontam para um papel crescente do nervo vago no controle da resposta inflamatória. Assim, a ação anti-inflamatória do nervo vago vem sendo amplamente estudadas e evidenciadas por três diferentes vias:

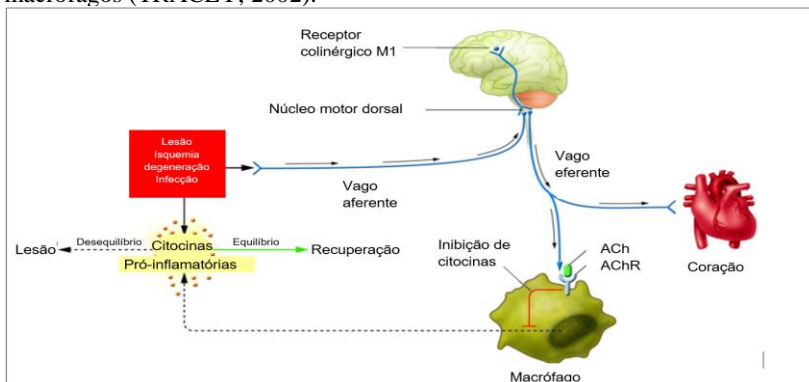
1) via do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), onde o estresse ambiental, assim como o aumento de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, ativa esse eixo por meio de corticotrofina (CRF) no hipotálamo. A CRF estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da glândula pituitária, que por sua vez, estimula a liberação de cortisol pelas glândulas adrenais;

2) via anti-inflamatória simpática esplênica, onde a interação do nervo vago ativa essa via, liberando noradrenalina, que interage com o receptor adrenérgico  $\beta_2$  de linfócitos esplênicos liberando acetilcolina (ACh), que atua na inibição da liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pelos macrófagos do baço;

3) via anti-inflamatória colinérgica, que é mediada por fibras vagais aferentes e eferentes, liberação ACh e inibição de macrófagos em liberar de citocinas anti-inflamatórias (figura 6).

Sendo que, das três, a via anti-inflamatória colinérgica, possui uma alta velocidade de condutância neural, o que permite uma entrada modulatória imediata na região afetada da inflamação, por isso, tem um papel crucial na resposta imune na homeostase (BREIT at al., 2018).

Figura 6. Reflexo colinérgico. Mediante insulto, são ativadas células imunes inatas liberando citocinas. Aferentes sensoriais vagais detectam tal condição e informam o NTS. Uma resposta vagal eferente suprime a liberação das citocinas por meio da liberação de ACh interagindo com receptores nicotínicos nos macrófagos (TRACEY, 2002).



Além disso, crescente evidência sugere que o nervo vago fornece uma importante aferência ao sistema nervoso, onde suas projeções estão associadas com funções cerebrais, envolvidas na percepção da dor. Estudos com ressonância magnética funcional (fMRI) e estimulação vagal transcutânea, em voluntários saudáveis, confirmaram seu envolvimento com neurônios do núcleo trato solitário e do locus ceruleus, no tronco encefálico. O núcleo do trato solitário possui projeções para a medula ventromedial rostral, para SCP, para locus coruleus, para o hipotálamo e para o sistema límbico, que são regiões chaves para modulação inibitória nociceptiva e para a percepção de dor. A estimulação vagal transcutânea reduziu o sinal em áreas límbicas como: amígdala, hipocampo, córtex cingulado posterior e giro para-hipocampal. Esses dados foram obtidos por meio da estimulação vagal transcutânea das conchas do pavilhão auricular (USICHENKO et al., 2017).

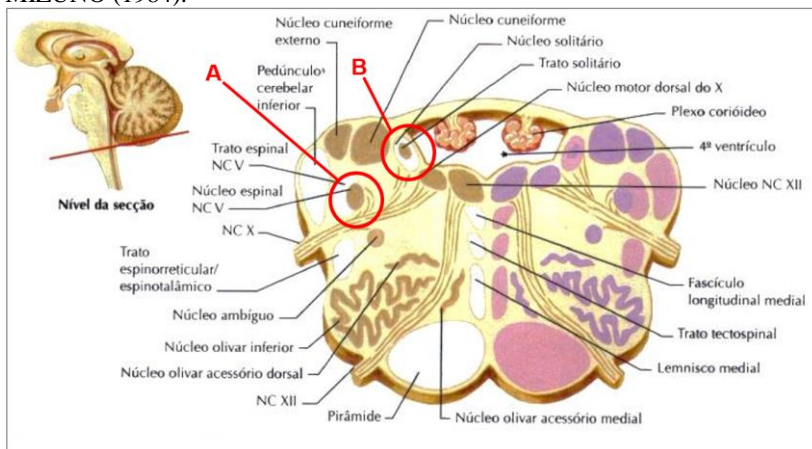
## 1.5 RAMO AURICULAR DO NERVO VAGO E AURICULOTERAPIA

O Vago possui ramificação para o pavilhão auricular, onde é denominado ramo auricular do vago, localizado ao centro do pavilhão auricular, onde estão as conchas auriculares e o conduto auditivo (BOROVIKOVA, 2000).

A conexão entre a aurícula e o sistema nervoso autônomo foi inicialmente estabelecida em 1832, pelo anatomista alemão Friedrich Arnold, onde o mesmo, ao estimular o canal auditivo externo, induziu a tosse semelhante ao reflexo de tosse induzido pelo nervo vago. Este reflexo, chamado então de "Reflexo de Arnold", passou a ser atribuído como oriundo do ramo auricular do nervo vago (RANV). Mais tarde, Nomura e Mizuno (1984), fizeram o mapeamento do trajeto do RANV em gato, por meio de coloração, concluindo que suas fibras nervosas realmente circundavam o NTS (figura 7), assim como as fibras do nervo facial (VII NC), nervo glossofaríngeo (IX NC) e o nervo vago (X NC) (HOU et al., 2015).

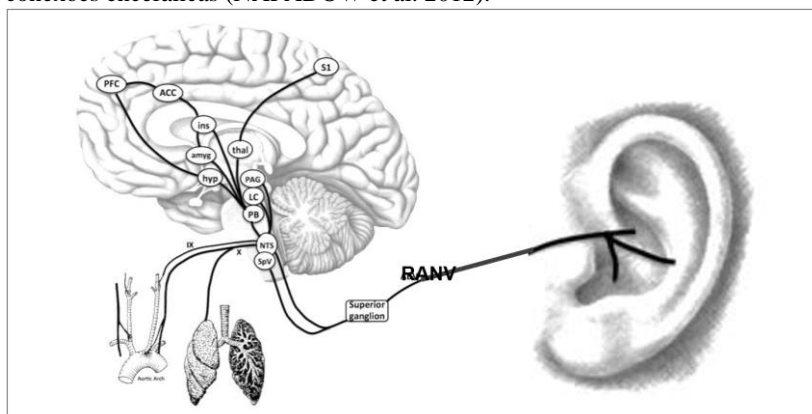


Figura 7. Núcleos do tronco encefálico. (A) núcleo espinal do trigêmeo, descrito como núcleo do RANV, conforme descrição anatômica (JOHNSON, 2018). (B) NTS, descrito como núcleo do RANV, conforme proposto por NOMURA e MIZUNO (1984).



O NTS medeia reflexos do seio carotídeo, da aorta, da tosse, assim como regula as vias respiratórias e gastrointestinais, possuindo também circuitarias que incluem a formação reticular, núcleo paraventricular do hipotálamo, o tálamo, a amígdala e demais áreas encefálicas (figura 8) (NAPADOW et al. 2012).

Figura 8. RANV, relação com o NTS, núcleo espinal do trigêmeo e demais conexões encefálicas (NAPADOW et al. 2012).



Atualmente a eletroestimulação vagal vem sendo utilizada no tratamento de diversas condições, como epilepsia e depressão, por meio de implantes cirúrgicos no tórax, conectados aos ramos cervicais, principalmente do lado esquerdo, pois se acredita que a estimulação do lado esquerdo minimiza possíveis efeitos cardíacos, relacionados com bradicardia e assistolia, como descrito anteriormente. Mesmo assim, este tipo de cirurgia traz alguns parafiteitos, como alteração na voz, tosse, dispnéia, disfagia, dor e parestesia no pescoço (HOWLAND, 2014). Entretanto, existe procedimento mais simples, que também evita os riscos de um procedimento invasivo, que esta associado a inervação da região epitelial do pavilhão auricular, ou seja, do RANV. De fato, estudos promissores apontam para o benefício da RANV no tratamento de condições como diabetes mellitus e déficit de memória (GAO, 2012).

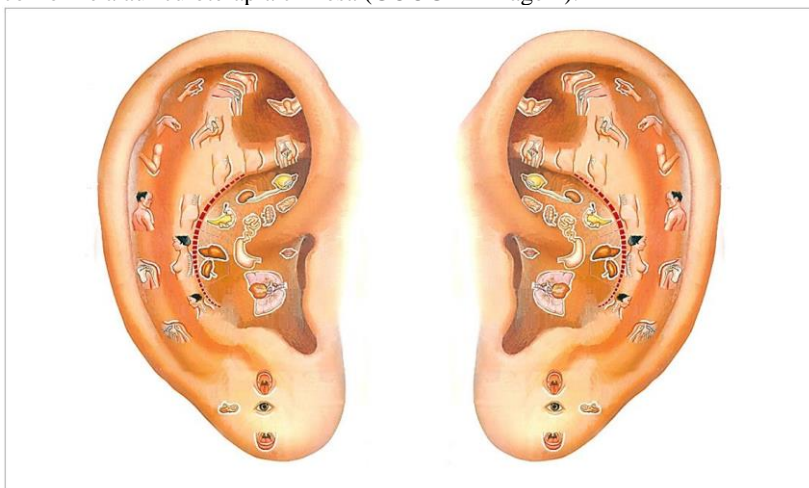
Como citado anteriormente, técnicas de estimulação transcutânea do RANV, vêm mostrando, com o uso de fMRI, a ativação de várias áreas encefálicas, além de ações sobre o sistema nervoso autônomo (BUSCH et al., 2013). Em um estudo piloto, usando voluntárias com endometriose, foi observado que a estimulação transcutânea do RANV promoveu efeito analgésico em pacientes com dor pélvica crônica, vide figura 7 (NAPADOW et al., 2012).

Contudo, a utilização terapêutica de áreas específicas da orelha não é nenhuma novidade para os entusiastas da medicina tradicional chinesa. Existem registros que datam de 100 aC, onde Huang Di Nei Jing descreve o tratamento por sopro de ar, usando um tubo de bambu sobre o pavilhão auricular, empregado para tratar um paciente inconsciente. Além disso, Huang Di indica que a flebotomia de veias auriculares pode aliviar o aperto na região costal. Já Qian Jin Yao Fang (652 dC) afirma que um ponto no hélice auricular pode ser usado para tratar icterícia. Em Wei Sheng Bao Jian (1343 dC), Luo Tian-yi escreveu que a cauterização de uma veia atrás da orelha pode tratar uma criança com convulsão. Zhen Jiu Da Cheng (1601 dC), dentro de um texto de acupuntura, relata que Yang Ji-Zhou indicou que a flebotomia na ponta da orelha pode ser eficaz para tratar doenças oculares (RABISCHONG e TERRAL, 2014).

Além disso, a relação de órgãos no pavilhão auricular já tinha sido descrita por chineses em 1888, conforme Zhang Di-Shan a aurícula é dividida em cinco regiões, alvejando coração, pulmão, fígado, baço e rim, sendo que, as disfunções orgânicas podem identificadas e tratadas pelas respectivas regiões auriculares (Figura 9). Porém, a primeira padronização de pontos auriculares, em forma de um mapa, com a representação de várias partes do corpo, foi proposta inicialmente pelo médico francês Paul Nogier, na década de 1950, quando ele fez a relação

da anatomia auricular com o corpo humano, comparável ao homúnculo do córtex cerebral, descrito por Penfield e Rasmussen. Experimentos clínicos conduzidos em seu consultório permitiram que ele identificasse diferentes áreas auriculares que se mostravam sensíveis a pressão, frente a queixas somáticas e orgânicas de seus pacientes, o que resultou na primeira cartografia auricular e na denominação do termo auriculoterapia, referindo-se a terapia por meio da orelha (RABISCHONG e TERRAL, 2014; ZHOU et al., 2017).

Figura 9. Mapa auricular, distribuição das estruturas somáticas e orgânicas conforme a auriculoterapia chinesa (GOOGLE imagem).



Sendo assim, o tratamento em auriculoterapia se baseia na seleção de pontos sensíveis no pavilhão auricular, e que tenham relação com os distúrbios relatados pelo paciente. É um recurso terapêutico amplamente difundido e que tem sido utilizado no tratamento para o alívio da dor, ansiedade, distúrbios do sono e distúrbios autonômicos. Porém, a evidência científica que apoia a teoria deste método terapêutico, e a especificidade dos pontos auriculares, ainda é questionável (ZHOU et al., 2017).

Todavia, é crescente o número de estudos que buscam melhorar o panorama científico da estimulação de pontos auriculares, assim como na estimulação do RANV, para diversas condições. Efeitos na melhora da motilidade gastrointestinal, mediado pela inibição da Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), em um modelo de lesão do estômago em ratos, já foram

demonstrados por eletroestimulação via auricular, melhorando o esvaziamento gástrico (LI et al., 2016). A eletroacupuntura auricular, sobre a região do RANV, também reduziu o edema e a hiperalgesia, em um modelo de inflamação por carragenina na pata de ratos, onde tais efeitos foram abolidos com bloqueio de receptores muscarínicos por atropina (CHUNG et al., 2011). Em um modelo de epilepsia, verificou-se aumento dos níveis TRPA1, PKC $\alpha$ , PKC $\epsilon$  e ERk1/2, em neurônios do hipocampo, posteriormente reduzidos por eletroacupuntura auricular sobre região do RANV (LIN e HSIEH, 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

A dor é uma das causas mais comuns que levam pessoas a procurarem por serviços de saúde, é uma queixa que acomete tanto adultos como crianças, e até mesmo recém-nascidos. Em muitos casos sua causa não é definida, o que faz com que seu tratamento esteja se tornando progressivamente independente da doença que acompanha.

Porém, a maioria dos procedimentos analgésicos, por meio de fármacos, além de algumas vezes não produzirem respostas satisfatoriamente, e apresentarem efeitos secundários, como depressão respiratória, náuseas, vômitos, hipotensão, bradicardia, prurido e inibição da função intestinal; possuem uma grande heterogeneidade em relação aos seus custos.

Sendo assim, estudos com estimulação do RANV vêm demonstrando resultados promissores em diferentes condições, com evidência crescente na ação analgésica e anti-inflamatória, incluindo condições viscerais e somáticas. Contudo, o uso da estimulação do RANV, embora seja um recurso seguro, simples, rápido e de baixo custo, além de amplamente utilizada prática por acupunturistas, necessita ser melhor investigada.

Neste sentido, o presente estudo se propõe a investigar o possível controle antinociceptivo da estimulação do RANV, assim como a participação do sistema colinérgico sobre tais efeitos neurobiológicos, utilizando modelos de dor visceral e somática, em ratos.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar o efeito antinociceptivo da estimulação mecânica do RANV em ratos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Investigar o efeito antinociceptivo da estimulação mecânica do RANV em modelos de dor visceral e somática;
- 2) Verificar a participação do nervo vago no efeito da estimulação mecânica do RANV na nocicepção visceral, por meio de vagotomia;
- 3) Verificar a participação de receptores colinérgicos muscarínico e nicotínico no efeito antinociceptivo da estimulação mecânica do RANV na nocicepção visceral.





## 4 MATERIAIS E METÓDOS

O presente estudo trata de uma pesquisa experimental randomizada. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação – LANDI - pertencente ao Departamento de Ciências Fisiológicas, junto ao Programa de Pós-graduação em Neurociências – PPGNeuro da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Para a execução desta pesquisa foram utilizadas substâncias como atropina (sulfato de atropina – Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), mecamilamina (cloridrato de mecamilamina – Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom), pilocarpina (cloridrato de pilocarpina – Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom) e nicotina (Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom).

### 4.1 ANIMAIS E AMOSTRA

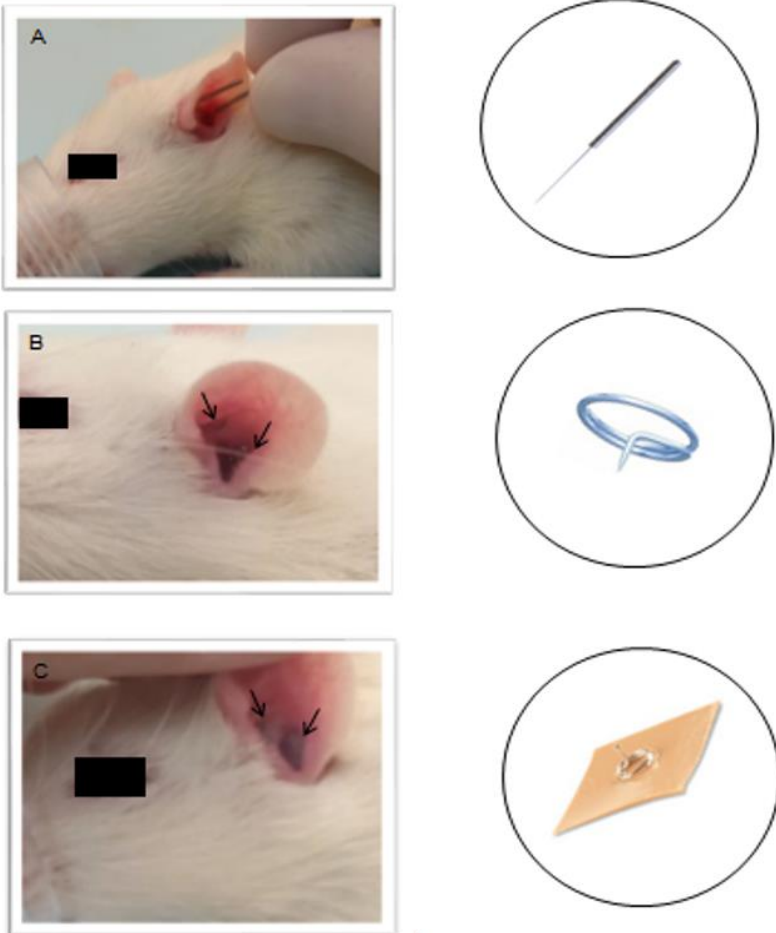
A amostra foi composta por Ratos Wistar adultos, machos e fêmeas, com idade entre 50-70 dias, pesando em média entre 200-300g, obtidos do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os procedimentos experimentais foram realizados conforme protocolo CEUA nº 4425030517, aprovado pelo Comitê do Uso Ético dos Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/ UFSC) e conduzidos de acordo com as diretrizes para o cuidado dos animais de laboratório e as normas éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983), assim como as diretrizes para o cuidado dos animais de laboratório (COBEA). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

### 4.2 TRATAMENTO

Os animais foram previamente anestesiados com 1-2 % de isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil), por meio de cone nasal. Após a verificação do estado de consciência de cada animal, por meio do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais, duas agulhas de acupuntura com tamanho 0,18 mm (espessura) X 8 mm (comprimento), da marca Dong Bang, foram implantadas a uma profundidade de 1-2 mm da superfície da pele, nas regiões superior (centro da cimba da concha) e inferior (centro da cava da concha) das conchas do pavilhão esquerdo (figura 10A), e estimuladas manualmente por meio de dois semi-giros por segundo (1 Hz), durante 30 segundos em cada agulha (figura 10B). Após

esse procedimento, as agulhas foram retiradas e duas micro agulhas de aço inox, estéreis, específicas para acupuntura auricular, da marca Dong Bag, com tamanho 0,22 mm (espessura) X 1,6 mm (comprimento), foram implantadas, nas mesmas regiões do agulhamento anterior, e assim fixadas de forma permanente com fita microporosa da marca Micropore – 3 M (figura 10C).

Figura 10. Sequência de imagens mostrando as 3 etapas do tratamento. A) manipulação com duas agulhas de acupuntura, B) implante de 2 agulhas micro agulhas e C) fixação com fita microporosa.



Tal região auricular já foi mapeada em ratos, e comparada com a aurícula humana, sendo esta a região de maior abrangência de inervação do RANV (FOLAN-CURRAN et al., 1994). Vale lembrar que o método de anestesia utilizado foi validado por outros autores no uso em experimentos que avaliam nocicepção e dor em ratos, sendo que nesse estudo teve como objetivo minimizar o estresse do procedimento e da colocação de agulhas. O tempo que os animais ficaram anestesiados com isoflurano durou em média de 3 minutos, sendo este período de exposição ao isoflurano insuficiente para promover qualquer efeito antinociceptivo por se (KINGERY et al., 2002).

Também é importante destacar que a escolha de dois tipos diferentes de agulhas para o tratamento se deu por: 1) a primeira agulha de acupuntura possibilitar melhor manipulação, conforme realizado no estudo de Gao et al. (2008); 2) a segunda agulha (micro agulha) possibilitar maior tempo de permanência, sem a necessidade de manter o animal sob o efeito da anestesia por isoflurano. Sendo assim, logo que a agulha foi implantada e fixada com micropore, os animais foram retirados do isoflurano e a micro agulha permaneceu implantada durante todo o tempo dos experimentos.

#### 4.3 DELINEAMENTO DE PESQUISA

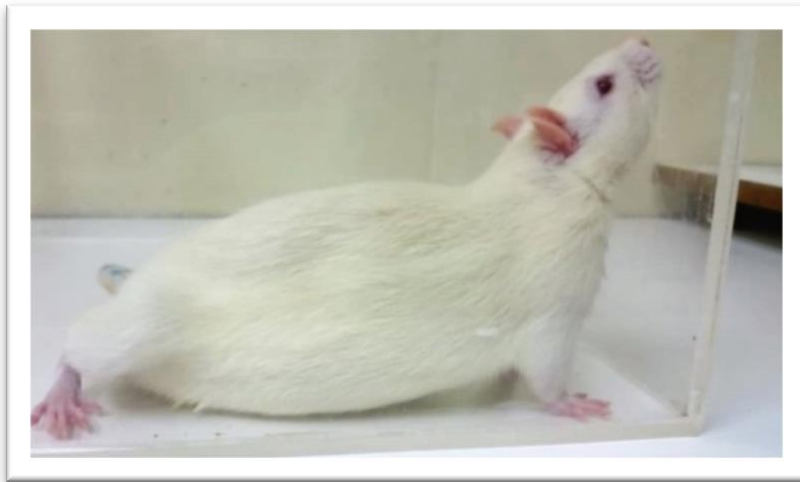
##### 4.3.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético

O modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético foi utilizado para avaliar a ação antinociceptiva da estimulação do RANV sobre a dor de origem viscero-somática. Tendo em vista que a injeção de ácido acético, na cavidade peritoneal, promove a liberação de mediadores inflamatórios como bradicinina, substância P (SP) e prostaglandinas, sensibilizando neurônios aferentes primários presente nas vísceras e na cavidade abdominal, determinando a resposta nociceptiva, que é caracterizada pela quantificação do número de contorções abdominais. Tal resposta é caracterizada por contração dos músculos abdominais, e também podem ser acompanhadas pela extensão do corpo e das patas traseiras (NESS, 1999). Sendo assim, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de 10 ml/kg de ácido acético a 0,6% em solução salina (SS).

#### 4.3.1.1 Avaliação das contorções abdominais no teste de ácido acético

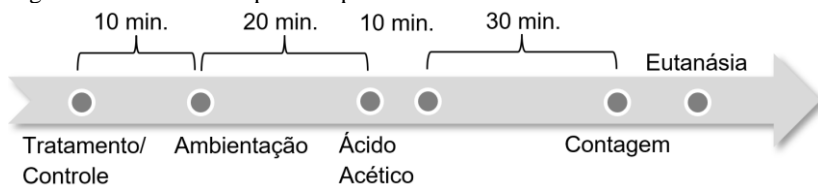
Após os animais serem ambientados por 20 minutos, em caixas acrílicas transparentes e individuais, medindo 20X17X14 cm, os ratos receberam injeção i.p. (10 ml/kg) de ácido acético a 0,6% diluída em SS e, imediatamente após a injeção, os animais foram recolocados nas caixas acrílicas para observação (10 minutos iniciais) e contagem do número de contorções durante 30 minutos. As contorções da musculatura abdominal, por vezes, são acompanhadas da extensão de uma ou ambas as patas posteriores (figura 11), e em média iniciam 10 minutos após a injeção de ácido acético.

Figura 11. Imagem mostrando contorções abdominais com extensão das patas posteriores.



Este experimento foi realizado em 2 dias diferentes e o avaliador foi cegado. Os animais foram randomizados aleatoriamente em Grupo Controle (GC) e Grupo Tratado (GT), sendo 8 animais por grupo. Tanto o GC, como o GT, foram submetidos ao mesmo tempo de anestesia inalatória por isoflurano, porém, o GC não recebeu tratamento. Logo após o termino do experimento, todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>.

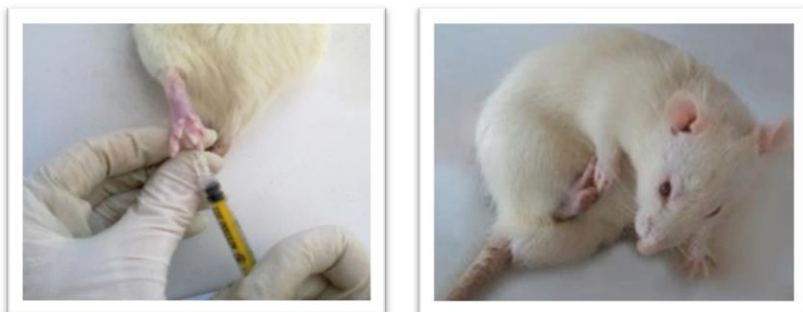
Figura 12. Linha do tempo do experimento com ácido acético.



### 4.3.2 Nociceção induzida por formalina

O teste da formalina foi utilizado com o objetivo de avaliar a ação antinociceptiva da estimulação do RANV esquerdo sobre a dor neurogênica e inflamatória de origem somática. Tal modelo permite avaliar dois tipos distintos de nociceção: (1) a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e (2) a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (TJØLSEN et al., 1992). Os animais utilizados foram individualmente ambientados por 20 minutos em caixas acrílica transparentes e individuais, medindo 20X17X14 cm. Após, um volume de 50  $\mu\text{L}$  de solução de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) foi injetado intraplantar (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal, e então os animais foram recolocados nas mesmas caixas acrílicas, para serem individualmente observados em relação ao tempo que permaneciam lambendo ou mordendo a pata, sacudindo a pata, ou permanecendo com ela elevada, no período de 0-9 min (fase neurogênica) e de 10-60 min (fase inflamatória), após a injeção da formalina (figura 13A e 13B).

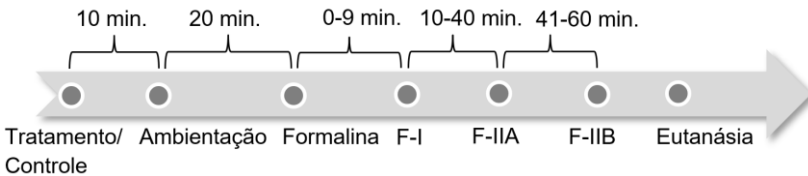
Figura 13. Sequência de imagens mostrando o teste da formalina: A) injeção de formalina na pata posterior e B) comportamental do animal após a injeção de formalina.



#### 4.3.2.1 Avaliação do teste de dor aguda induzida por formalina

A atividade antinociceptiva da estimulação do RANV (GT) foi determinada pela comparação com os resultados dos animais do grupo controle (GC), verificando se houve ou não redução do tempo, em diferentes estados comportamentais já citados. Este experimento foi realizado em 4 dias diferentes, utilizando 10 animais por grupo e, a exemplo do experimento anterior, o avaliador foi cegado, evitando a identificação de qual grupo cada animal pertencia. Tanto os GT e GC, randomizados aleatoriamente, foram submetidos ao mesmo tempo de anestesia inalatória por isoflurano, porém, o GC não recebeu tratamento. Após os animais se recuperarem completamente da anestesia, o que levou em média 10 minutos, iniciou-se o processo de ambientação. Sendo assim, os ratos só recebessem a injeção de formalina 30 minutos após o tratamento, conforme mostra a linha do tempo abaixo (figura 14). Logo após o termino do experimento, todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>.

Figura 14. Linha do tempo do experimento com formalina na pata posterior direita.

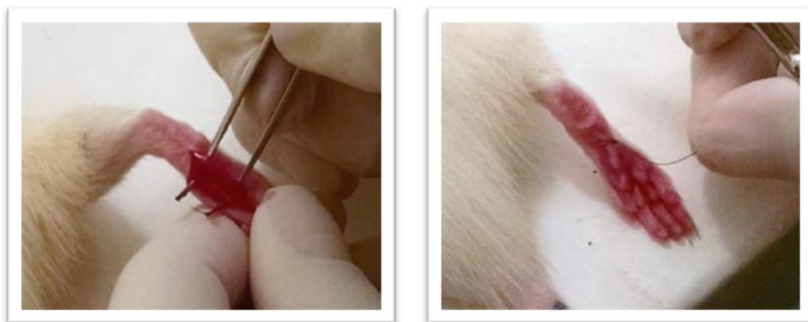


#### 4.3.3 Indução da dor pós-operatória

Com objetivo de avaliar a ação antinociceptiva da estimulação do RANV sobre a dor pós-operatória, foi realizado o modelo de incisão plantar, conforme descrito previamente por Brennan e colaboradores (1996). Os animais foram previamente anestesiados com 1-2 % de isoflurano, por meio de cone nasal. Após a verificação do estado de consciência do animal, por meio do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais, foi realizada a assepsia da pata traseira direita, com tintura de iodo, e uma incisão de 10 mm longitudinal foi feita através da pele e fâscia da parte plantar da pata, com bisturi de lâmina número 11. A incisão iniciou a 2 mm da extremidade proximal do calcâneo em direção

aos dedos da pata. O músculo plantar foi elevado com um fórceps e uma pequena incisão longitudinal foi feita nele, mantendo a origem e inserção intactas. Após a incisão, a pele foi suturada com um fio de nylon 6.0 (figura 15).

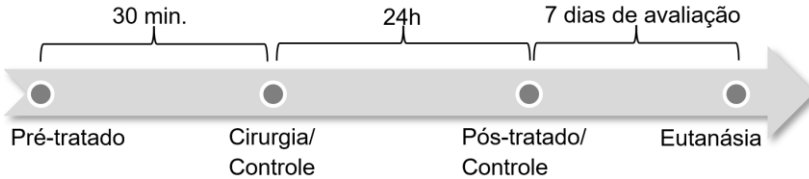
Figura 15. Procedimento cirúrgico realizado no modelo de dor pós-operatória, conforme descrito por Brennan (BRENNAN et al., 1996). (A) Incisão plantar e exposição do músculo subplantar com a pinça, para uma pequena incisão longitudinal no músculo, mantendo origem e inserção do mesmo; (B) Sutura da incisão.



Para a cirurgia, os animais foram randomizados aleatoriamente em dois grupos: Grupo Operado e Grupo Não Operado (apenas anestesia), que serviu de controle para a cirurgia. No tratamento, os animais desses grupos também foram randomizados aleatoriamente em Grupo Pré-tratado, que recebeu a intervenção cirúrgica (lesão) 30 minutos após o início do tratamento, respeitando os mesmos parâmetros dos experimentos anteriores; Grupo Pós-tratado, que recebeu o tratamento 24 horas após a intervenção cirúrgica (lesão); e Grupo Controle, que recebeu apenas anestesia, mas não tratamento (figura 16). Para este experimento

foram utilizados 5 animais por grupo e as avaliações foram realizadas por 7 dias consecutivos, conforme descrição a seguir.

Figura 16. Linha do tempo do experimento com incisão plantar da pata posterior direita.



#### 4.3.3.1 Avaliação mecânica de alodinia

Os ratos foram ambientados por 20 minutos em caixas transparentes individuais, medindo 20X17X14 cm, sobre uma plataforma elevada, feita em malha de arame, para permitir o acesso da superfície ventral das patas traseiras. O teste de sensibilidade mecânica (Von Frey) foi feito por meio de equipamento eletrônico, da marca AVS Projetos, aplicado na superfície plantar da pata posterior direita, fazendo a média de três avaliações. O aparato consiste em uma ponteira plástica de 1 mm de diâmetro conectada a um sensor de pressão, que por sua vez é conectado ao computador que faz a leitura dos testes utilizando um software próprio (figura 17). O avaliador pressiona a ponteira plástica sob a face plantar da pata do animal e o programa registra a pressão máxima exercida até que o animal retire a pata (MÖLLER et al., 1998). Esse teste foi feito antes do procedimento cirúrgico e do pré-tratamento (basal), 24 horas após a cirurgia plantar e nos 7 dias subsequentes (figura 19). Os animais tratados com a estimulação do RANV permaneceram com microagulhas fixadas no pavilhão auricular durante todos os dias de teste.



Figura 17. Von Frey eletrônico AVS, indicando a ponteira plástica (A).



Nesta fase do experimento, seguindo o que foi feito nos exames anteriores, o avaliador foi cegado, ou seja, não pode identificar o grupo que cada animal pertencia.

#### 4.3.3.2 Avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor

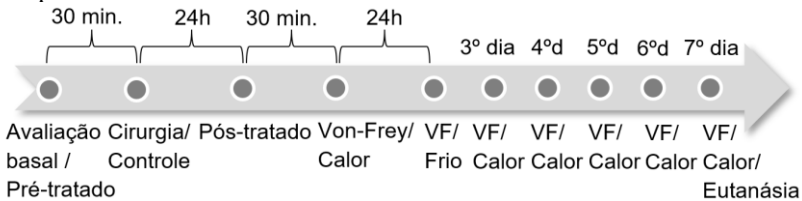
O teste de hipersensibilidade ao estímulo térmico ao calor foi feito por fonte de luz infravermelha na pata posterior direita de cada rato operado, e com aparelho Hargreaves (70 w) da marca Ugo Basile. O animal ficou livre, dentro do espaço de uma caixa acrílica transparente para ambientação, medindo 20X17X14 cm, sobre uma placa acrílica, também transparente, onde por baixo dela foi irradiado o feixe infravermelho (figura 18). O tempo de latência para retirada da pata ao estímulo do infravermelho foi medido, e o limite máximo permitido para exposição ao estímulo foi de 15 segundos, para evitar danos teciduais. Esse teste foi feito 24 horas após a cirurgia e em cinco dias consecutivos (CHEAH et al., 2017).

Figura 18. Teste de hipersensibilidade ao estímulo térmico (calor), feito no aparelho Hargreaves por fonte de luz infravermelha (70 w), marca Ugo Basile (imagem do fabricante).



Seguindo o exemplo dos experimentos anteriores, o avaliador foi cegado, sendo assim, não pode identificar o grupo que cada animal pertencia. A linha do tempo abaixo mostra como se deu o experimento, seguindo todas as avaliações (figura 19). Logo após o término dos experimentos, todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>.

Figura 19. Linha do tempo do experimento com modelo de dor pós-cirurgia na pata posterior direita.



#### 4.3.4 Análise do mecanismo de ação

Com objetivo de avaliar a participação do nervo vago no efeito promovido pela estimulação do RANV na nocicepção de origem viscerossomática, o presente estudo inicialmente investigou o efeito da vagotomia dos animais. Após, com uso de ferramentas farmacológicas, foi investigado a participação do sistema colinérgico, ou seja, dos receptores

colinérgicos, no efeito promovido pela estimulação do RANV. Para isto, foi utilizado agonista e antagonista seletivo dos receptores muscarínico e nicotínico.

#### 4.3.4.1 Vagotomia

A vagotomia cervical unilateral foi realizada conforme descrito por MOORE-GILLON (1980). O procedimento foi executado procurando amenizar os possíveis efeitos prejudiciais da secção total, digo, bilateral do nervo vago, tendo em vista a sua inervação aos músculos faríngeos, pois quando ambos os lados são inteiramente seccionados, provoca total paralisia desses músculos, acarretando na entrada de fluídos nos pulmões. Além disso, a vagotomia bilateral também interfere gravemente na regulação da respiração, eliminando o input de estiramento dos pulmões para sistemas de controle respiratório (ZIMMER et al., 1975; MOORE-GILLON, 1980).

Para a vagotomia cervical unilateral os animais foram anestesiados via i.p. com cloridato de xilazina (2%) e cloridrato de cetamina (10%), 1 ml/kg na proporção 1:1. Após a verificação do estado de consciência do animal, por meio do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais, foi realizada a tricotomia e assepsia da região cervical ventral, usando iodo. Em seguida, uma incisão de 5 mm longitudinal foi feita na linha média da região cervical ventral, seccionando a pele e divulgando tecidos subcutâneos, até a exposição do nervo vago e da artéria carótida, dissecados entre o esterno-hióideo e o músculos esternocleidomastóideo. O nervo foi separado da artéria em um comprimento de pelo menos 5 mm e assim excisado (figura 20). Os tecidos foram suturados com um fio de nylon 4.0 e os animais receberam injeção de 0,10 ml de antibiótico (Pentabiótico) intramuscular (i.m.) e 0,10 ml de anti-inflamatório (Flunixinina) subcutâneo (s.c.). A resposta nociceptiva ao ácido acético foi avaliada 7 dias após a cirurgia e 30 minutos após a estimulação do RANV esquerdo conforme descrito anteriormente (Figura 21). Foram utilizados 7-8 animais por grupo, em 3 dias diferentes, com cegamento do avaliador e randomização aleatória em vagotomia falsa (Sham), vagotomia do

ramos esquerdo e vagotomia do ramo direito. Logo após o termino do experimento, todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>.

Figura 20. Cirurgia de vagotomia, A) exposição do complexo carótida/vago, B) separação do complexo e B) secção do nervo vago.

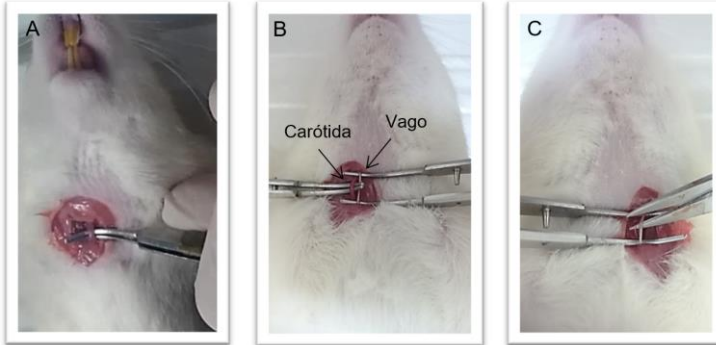
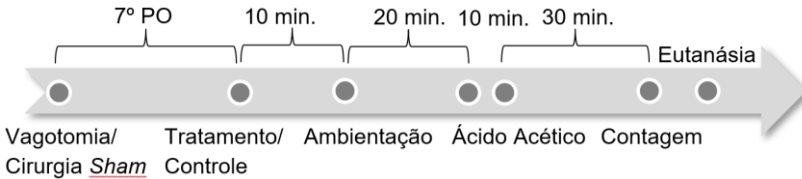


Figura 21. Linha do tempo do experimento com ácido acético em ratos que passaram por vagotomia.



#### 4.3.4.2 Participação dos receptores colinérgicos

A participação do sistema colinérgico, ou seja, dos receptores colinérgico muscarínico e nicotínico no efeito promovido pela estimulação do RANV foi avaliado por meio do uso de agonista (pilocarpina e nicotina) e antagonista (atropina e mecamilamina) seletivo dos receptores muscarínico e nicotínico, respectivamente, na nocicepção de origem viscero-somática. As doses utilizadas dos agonistas ou antagonistas foram selecionados dos dados previamente descritos na literatura (CHUNG et al., 2011; FREITAS et al., 2015) ou obtidas de estudos preliminares realizados em nosso laboratório (LANDI). Para tal, os ratos foram pré-tratados com atropina – antagonista muscarínico não seletivo (2 mg/kg, i.p.), ou mecamilamina – antagonista nicotínico  $\alpha 2\beta 3$  seletivo (2 mg/kg, i.p.), ou veículo (SS 1 ml/kg, i.p.). Após 20 minutos os

animais receberam anestesia inalatória por isoflurano e foram tratados com estimulação do RANV esquerdo, ou pilocarpina – agonista muscarínico não seletivo (2 mg/kg, i.p.), ou nicotina – agonista nicotínico não seletivo (3 mg/kg, i.p.) (figura 22). Passados 10 minutos, com os animais totalmente recuperados da anestesia, os mesmos foram ambientados por 20 minutos em caixas acrílicas transparentes, medindo 20X17X14 cm. Depois desse tempo, receberam injeção i.p. de 10 ml/kg com solução de ácido acético a 0,6% diluída em SS e, imediatamente após a injeção, os animais foram recolocados nas caixas acrílicas para observação e contagem do número de contorções abdominais conforme descrito anteriormente. Nesse experimento foram utilizados 5 animais por grupo, em 6 dias diferentes e com cegamento do avaliador e randomização aleatória. Logo após o termino do experimento, todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> (figura 23).

Figura 22. Organograma dos grupos para verificação da participação dos receptores colinérgicos.

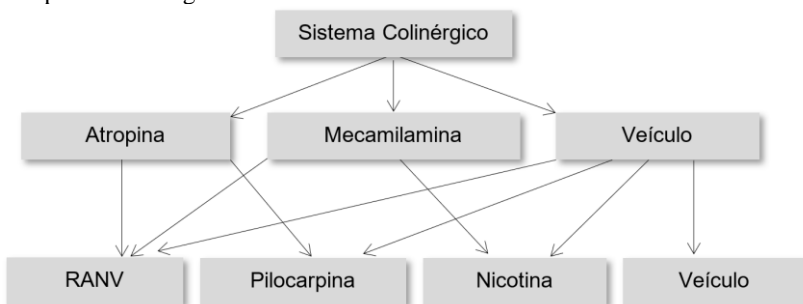
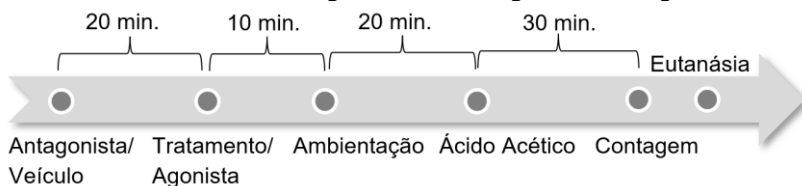


Figura 23. Linha do tempo do experimento com ácido acético que verificou o envolvimento do sistema colinérgico com uso de agonistas e antagonistas.



#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

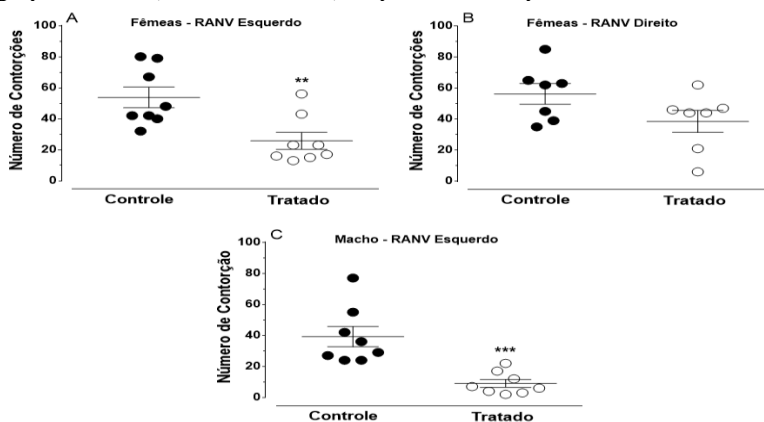
A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados estão apresentados como média e erro padrão da média (E.P.M.) para cada grupo, sendo esses avaliados estatisticamente por análise de teste t de Student ou pela análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey, utilizando o GraphPad Prism Versão 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados como indicativos de significância.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO RANV SOBRE NOCICEPÇÃO VISCERAL INDUZIDA PELO ÁCIDO ACÉTICO

Os resultados apresentados na figura 24 mostram que a estimulação do RANV no pavilhão auricular esquerdo dos ratos fêmeas reduziu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético de forma significativa ( $t_{(df = 14)} = 3,252$ ,  $p = 0,0058$ ) em  $52 \pm 10\%$  comparado ao grupo controle (figura 24A). Porém, quando a estimulação do RANV foi realizada no pavilhão auricular direito das fêmeas, observou-se uma redução de  $11 \pm 13\%$  do número de contorções, ou seja, não significativa ( $t_{(df = 12)} = 1,824$ ,  $p = 0,0931$ ), quando comparado ao seu controle (figura 24B). Por outro lado, a estimulação do RANV na aurícula esquerda de ratos machos também promoveu redução significativa ( $t_{(df = 14)} = 4,278$ ,  $p = 0,0008$ ) em  $77 \pm 7\%$  do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, quando comparado ao seu grupo controle (figura 24C). Assim, estes dados mostram claramente que o efeito antinociceptivo da estimulação do RANV na aurícula esquerda ocorre independentemente do sexo do animal (figura 24 A e C).

Figura 24. Efeito da estimulação do RANV no pavilhão auricular esquerdo e direito sobre o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em ratos fêmeas (A e B) e machos (C). Os resultados representam a média de 8 animais por grupo e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos mostram o nível de significância estatística em relação ao grupo controle (teste t de Student),  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ .

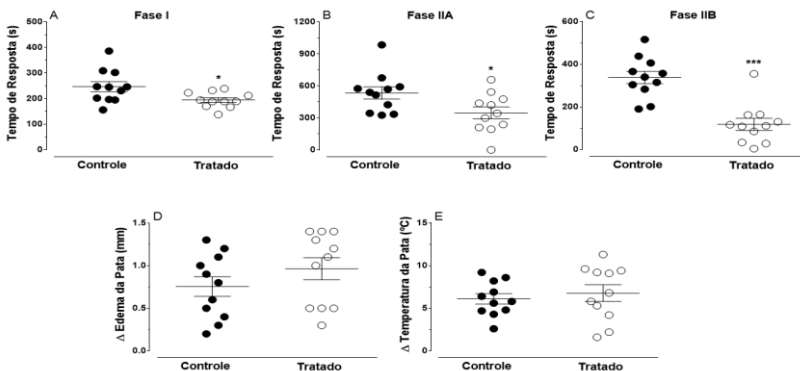


Esses resultados definiram o tratamento para os próximos experimentos que foi feito por meio da estimulação da estimulação do RANV na aurícula esquerda. Sendo que, para os próximos experimentos, se optou por usar ratos machos, visto que os experimentos anteriores também indicaram que não existe diferença significativa no efeito antinociceptivo do RANV entre ratos fêmeas e machos.

## 5.2 EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO RANV SOBRE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

Os resultados apresentados na figura 25 mostram que a estimulação do RANV no pavilhão auricular esquerdo dos ratos apresentou uma redução no tempo de resposta em  $21 \pm 4\%$  na fase neurogênica (0-5 min - Fase I,  $t_{(df=20)} = 2,423$ ,  $p = 0,0250$ ),  $35 \pm 10\%$  na fase inflamatória (10-40 min - Fase IIA,  $t_{(df=20)} = 2,344$ ,  $p = 0,0295$ ) e  $64 \pm 9\%$  na fase inflamatória (40-60 min - Fase IIB,  $t_{(df=20)} = 5,397$ ,  $p < 0,0001$ ), quando comparado ao controle. Por outro lado, a estimulação do RANV no pavilhão auricular esquerdo dos ratos não apresentou efeito significativo sobre o edema e a temperatura da pata, no teste da formalina, quando comparado ao grupo controle.

Figura 25. Efeito da estimulação do RANV no pavilhão auricular esquerdo sobre o tempo de resposta produzida pelo teste de formalina, caracterizado por lambidas ou mordidas, elevações ou sacudidas da pata, em ratos machos. Os resultados representam a média de 10 animais por grupo e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos mostram o nível de significância estatística em relação ao grupo controle (teste t de Student), \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .





### 5.3 EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO RANV SOBRE A DOR PÓS-OPERATÓRIA

Com o objetivo de avaliar o efeito antinociceptivo da estimulação do RANV na aurícula esquerda de ratos, foram utilizados 5 animais (machos) por grupo.

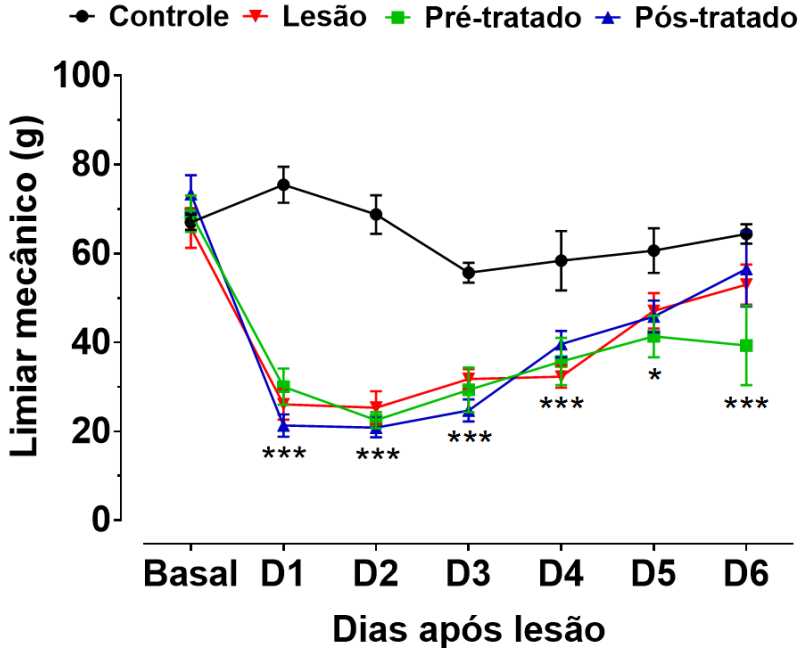
#### 5.3.1 Efeito sobre a alodinia mecânica

Os resultados apresentados na figura 26 mostram que a incisão plantar da pata posterior direita promoveu aumento significativo ( $F_{(3, 15)} = 40,34$ ,  $p < 0,0001$ ) da resposta sensorial frente ao estímulo mecânico (alodinia mecânica) dos animais. No entanto, a análise post-hoc mostrou que a estimulação do RANV na aurícula esquerda de ratos machos não foi capaz de alterar a resposta sensorial frente ao estímulo mecânico (alodinia mecânica) no modelo de dor pós-operatória. É possível observar que não existe diferença entre os grupos experimentais em relação à resposta basal dos animais. Contudo, 24 horas após a lesão (incisão plantar), comparado ao grupo controle, todos os demais grupos apresentaram redução significativa do limiar a pressão induzida pelo Filamento de Von Frey. Estes dados indicam que a estimulação do RANV na aurícula esquerda não foi eficaz em reduzir a dor de origem pós-operatória.

Esse padrão na redução do limiar foi mantido por quatro dias consecutivos e, a partir do quarto dia houve um aumento significativo do limiar em todos os grupos, com os seguintes valores:  $44 \pm 4\%$  para o grupo apenas cirurgia,  $39 \pm 9\%$  para o grupo pré-tratado e  $32 \pm 5\%$  para o grupo pós-tratado, todos comparados ao grupo controle.

A partir do quinto dia os animais foram recuperando o limiar em relação ao controle e, em nenhum momento, foi constatada diferença significativa entre os grupos tratados em relação ao grupo apenas cirurgia. Sendo assim, verificamos que nessas condições a estimulação do RANV esquerdo não teve efeito inibitório em nenhum dos grupos tratados.

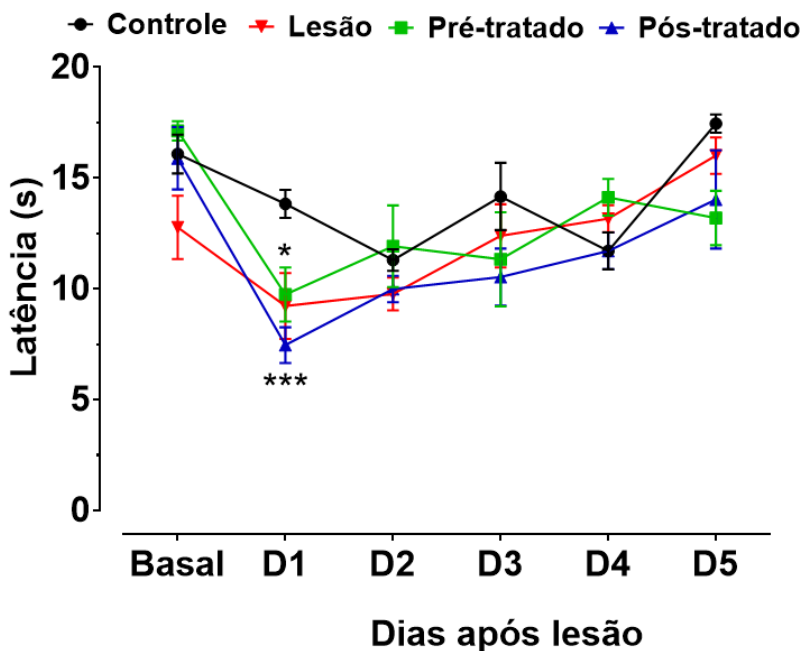
Figura 26. Efeito da estimulação do RANV no limiar mecânico (Von-Frey) no modelo de dor pós-operatória por incisão plantar, em ratos machos tratados pela aurícula esquerda (RANV). Os resultados representam a média de 4-5 animais por grupo e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos mostram o nível de significância estatística em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey), \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .



### 5.3.2 Efeito sobre a hiperalgesia térmica ao calor

Os resultados apresentados na figura 27 mostram que a cirurgia plantar reduziu de forma significativa ( $F_{(3, 15)} = 6,246$ ,  $p < 0,001$ ) o limiar ao calor após 24 horas, com os seguintes valores:  $34 \pm 11\%$  para o grupo apenas cirurgia,  $30 \pm 8\%$  para o grupo pré-tratado e  $49 \pm 6\%$  para o grupo pós-tratado. Porém, a análise post-hoc mostrou que a estimulação do RANV na aurícula esquerda de ratos machos não foi capaz de alterar a resposta sensorial frente ao estímulo térmico (calor) no modelo de dor pós-operatória. Também é possível verificar que nos quatro dias subsequentes não houve mais diferença significativa entre os grupos. Sendo assim, verificamos que nessas condições a estimulação do RANV esquerdo não teve efeito inibitório em nenhum dos grupos tratados.

Figura 27. Efeito da estimulação do RANV no limiar térmico ao calor (Hargreaves) no modelo de dor pós-operatória, em ratos machos tratados pela aurícula esquerda (RANV). Os resultados representam a média de 4-5 animais por grupo e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos mostram o nível de significância estatística em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey), \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

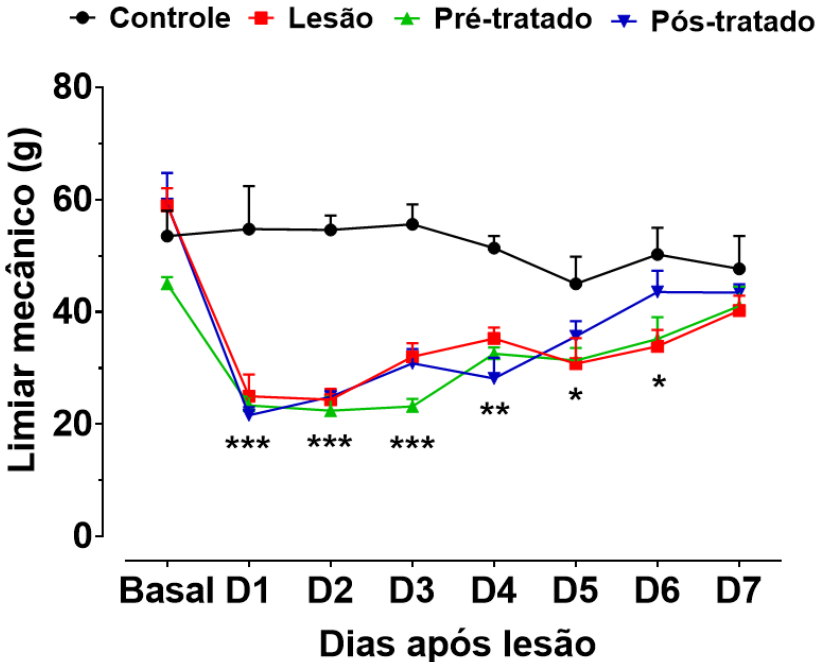


Com o objetivo de avaliar o efeito antinociceptivo da estimulação do ramo auricular do nervo vago na aurícula direita de ratos, visto que a estimulação na aurícula esquerda, conforme experimento anterior, não produziu efeito inibitório no modelo de dor pós-operatória, foram utilizados 5 animais (machos) por grupos, para testar a estimulação do RANV direito, respeitando agora a lateralidade da lesão (cirurgia).

A exemplo do experimento anterior, aos resultados apresentados na figura 28 mostram que a incisão plantar da pata posterior direita promoveu aumento significativo ( $F_{(3, 16)} = 24,27$ ,  $p < 0,0001$ ) da resposta sensorial frente ao estímulo mecânico (alodinia mecânica) dos animais. No entanto, a análise post-hoc mostrou que a estimulação do RANV na aurícula direita de ratos machos não foi capaz de alterar a resposta sensorial frente ao estímulo mecânico (alodinia mecânica) no modelo de

dor pós-operatória. É possível observar que não existe diferença entre os grupos experimentais em relação à resposta basal dos animais. Contudo, 24 horas após a lesão (incisão plantar), comparado ao grupo controle, todos os demais grupos apresentaram redução significativa do limiar a pressão induzida pelo Filamento de Von Frey. Estes dados indicam que a estimulação do RANV na aurícula esquerda não foi eficaz em reduzir a dor de origem pós-operatória.

Figura 28. Efeito da estimulação do RANV no limiar mecânico (Von-Frey) no modelo de dor pós-operatória por cirurgia plantar, em ratos machos tratados pela aurícula direita (RANV). Os resultados representam a média de 5 animais por grupo e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos mostram o nível de significância estatística em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey), \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

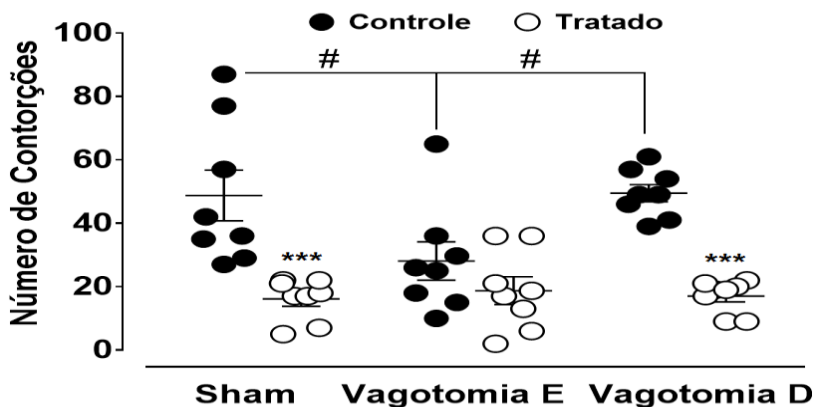


## 5.4 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO

### 5.4.1 Influência da vagotomia no efeito antinociceptivo da estimulação do RANV no modelo de nociceção visceral induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados na figura 29 mostram que os animais que sofreram vagotomia do ramo esquerdo, mas não do ramo direito, apresentaram uma redução significativa ( $F(5, 35) = 12,31$ ,  $p < 0,001$ ) em  $43 \pm 12\%$  do número de contorções abdominais em relação ao grupo controle (falso-operado – Sham). Além disto, a análise post-hoc mostrou que a estimulação do RANV esquerdo dos animais falso-operados (Sham) foi capaz de reduzir de forma significativa ( $p < 0,001$ ) em  $67 \pm 5\%$  o número de contorções em relação ao seu controle. Entretanto, a estimulação do RANV esquerdo não foi capaz de promover incremento na redução do número de contorções abdominais dos animais submetido à vagotomia do ramo esquerdo, ou seja, não produziu efeito antinociceptivo. Interessantemente, a vagotomia do ramo direito não alterou o efeito antinociceptivo promovido pela estimulação do RANV esquerdo que foi de  $65 \pm 4\%$ .

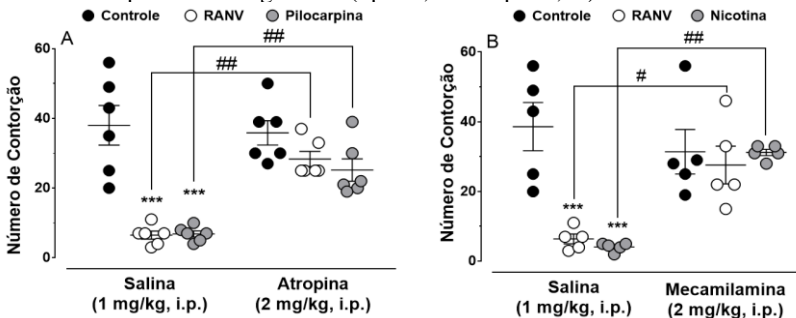
Figura 29. Influência da vagotomia no efeito antinociceptivo da estimulação do RANV no número de contorções abdominais provocadas por ácido acético i.p. (0,6%), em ratos machos tratados pela aurícula esquerda. Os resultados representam a média de 7-8 animais por grupo e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.) Os sinais mostram o nível de significância estatística dos (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey) dos tratamentos em relação aos respectivos controles (\*\*\*) ou da vagotomia à esquerda em relação aos demais controles (#p < 0,05).



### 5.4.2 Influência dos antagonistas colinérgico no efeito antinociceptivo da estimulação do RANV esquerdo no modelo de nociceção visceral induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados na figura 30 mostram que o pré-tratamento dos animais por atropina (2 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa ( $F_{(5, 25)} = 16,91$ ,  $p < 0,001$ ) a antinociceção causada pela pilocarpina (2 mg/kg, i.p.) e pelo tratamento (RANV) no teste do ácido acético. Ademais, o pré-tratamento dos animais com mecamilamina (2 mg/kg, i.p.) também causou redução significativa ( $F_{(5, 20)} = 11,53$ ,  $p < 0,001$ ) da antinociceção causada pela nicotina (3 mg/kg, i.p.) e pelo tratamento (RANV) no teste do ácido acético. A estimulação RANV esquerdo, assim como o tratamento com pilocarpina e nicotina, reduziu o número de contorções abdominais respectivamente em  $83 \pm 3\%$ ,  $82 \pm 2\%$  e  $90 \pm 1\%$  quando comparados ao grupo controle. Em contra partida, a pré-administração de atropina reduziu o efeito antinociceptivo da estimulação do RANV e da pilocarpina em  $77 \pm 4\%$  e  $73 \pm 3\%$ , respectivamente. Da mesma forma, a pré-administração de mecamilamina reduziu o efeito antinociceptivo da estimulação do RANV e da nicotina em  $77 \pm 5\%$  e  $87 \pm 2\%$ , respectivamente.

Figura 30. Influência dos antagonistas colinérgico no efeito antinociceptivo da estimulação do RANV no número de contorções abdominais provocadas por ácido acético i.p. (0,6%), em ratos machos pré-tratados com atropina (A), mecamilamina (B) ou veículo. Seguido do tratamento (RANV esquerdo), veículo (i.p.), pilocarpina (i.p.) ou nicotina (i.p.). Os resultados representam a média de 5-6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os símbolos mostram significância estatística (ANOVA de duas vias, seguida por teste de Tukey) em relação ao grupo controle (\*\*\*) ou grupo tratado com seus respectivos antagonistas (# $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$ ).



## 6 DISCUSSÃO

Desde a primeira observação feita em relação à importância terapêutica do nervo vago, onde nos anos de 1880 a estimulação vagal era realizada por massagem na região ventral da cervical, com intuito de suprimir convulsões, até o atual uso dos eletroestimuladores, muitos estudos já mostraram a sua relação na modulação de diversas condições, incluindo a dor (HOWLAND, 2014). Paralelo a isso, a acupuntura auricular, recurso terapêutico que é utilizado também pela medicina tradicional chinesa, onde também segue um padrão neuroanatômico na distribuição de seus acupontos, e que o alvo dos estudos aponta para a estimulação do RANV, é amplamente utilizada para o manejo de vários tipos de dor (HOU et al., 2015).

Nesse sentido, o presente estudo foi desenhado usando modelos de nocicepção viscero-somática e somática em ratos, com o intuito de mimetizar condições fisiopatológicas próximas às condições clínicas que envolvem o manejo da dor. Com isso, foi possível demonstrar resultados antinociceptivos significativos da estimulação do RANV esquerdo nos modelos de nocicepção de origem inflamatória, tanto viscero-somática, como somática, induzidos respectivamente por ácido acético e formalina.

Estudos anatômicos demonstram que inervação auricular possui uma abrangência preferencial de alguns nervos em determinadas regiões auriculares, sendo que, outros experimentos mostram que um mesmo padrão de resposta reflexa pode ser obtido por diferentes áreas com inervações nervosas supostamente distintas (BOROVIKOVA, 2000). Porém, segundo Gao e colaboradores (2008), a região cava da concha auricular é a que produz uma maior resposta autonômica ao ser estimulada, tanto cardiovascular, como gastrointestinal.

Contudo, cabe salientar que o estudo conduzido por Gao e colaboradores não avaliou a região da cimba da concha (GAO et al., 2008). Neste caso, a seleção dos dois pontos auriculares utilizados no presente estudo, onde cada um está localizado em uma das conchas auriculares (cimba e cava), teve esse intuito, e se deve também pelo fato de esses dois pontos serem comumente usados em diversas pesquisas com estimulação do RANV em ratos, conforme citado por Han e colaboradores (LI et al., 2013; 2014). Da mesma forma, a medição da impedância elétrica da superfície da pele auricular, em ratos Wistar com peritonite experimental, mostrou um aumento significativo de pontos de baixa impedância concentrados exatamente nas regiões cava e cimba da concha auricular, o que demonstra que estas duas regiões possuem maior relação com a atividade vagal (KAWAKITA et al., 1991).

No presente estudo os primeiros experimentos foram realizados por meio do teste com ácido acético, em fêmeas Wistar, e serviram para definir a lateralidade do tratamento. A estimulação das conchas centrais da aurícula (RANV) esquerda mostrou uma melhor resposta antinociceptiva nesses animais. Tais resultados são condizentes com o estudo realizado por Żurowski e colaboradores (2012), onde a estimulação vagal aumentou o limiar de nocicepção no teste por injeção i.p. de ácido acético, reduzindo o número de contorções nos animais. Porém, cabe salientar que o estudo de Żurowski e colaboradores foi feito com eletroestimulação vagal invasiva, onde um eletrodo foi implantado nos ramos subdiafragmáticos do nervo vago (ŻUROWSKI et al., 2012). Da mesma forma, em outro estudo, porém utilizando a eletroestimulação bilateral de um ponto entre a cimba e a cava da concha auricular, conhecido como ponto do estômago na acupuntura auricular, através de agulhas de acupuntura, mostrou ser eficaz em normalizar disritmias induzidas por distensão retal, por meio de mecanismo vagal (ZHANG et al., 2015).

Contudo, nosso estudo, ao contrário dos citados acima, que trabalharam com estímulos bilaterais, mostrou diferentes resultados em relação à lateralidade, onde a resposta antinociceptiva significativa se deu quando o tratamento foi empregado pela aurícula esquerda. Aqui é importante destacar, conforme descrito anteriormente, que existem diferenças anatômicas na distribuição dos ramos direito e esquerdo do nervo vago, e que a parte anterior dos órgãos abdominais é inervada predominantemente por ramos oriundos do ramo esquerdo, o que pode ter influenciado em nossos resultados (BREIT et al., 2018).

O teste do ácido acético também foi usado em ratos Wistar machos, repetindo a estimulação do RANV do lado esquerdo, o que também reduziu significativamente a atividade nociceptiva em relação ao controle. Os resultados deste experimento serviram para mostrar que as respostas foram semelhantes entre machos e fêmeas. Sendo assim, para os demais experimentos, optou-se pela utilização de ratos machos.

No teste da formalina, agora realizados em ratos machos, observou-se que a estimulação do RANV esquerdo promoveu redução da nocicepção neurogênica e inflamatória induzida pela formalina na pata posterior direita. Contudo, a estimulação do RANV esquerdo foi mais eficaz na fase inflamatória (Fase IIB). Nesse sentido, utilizando injeção intraplantar de carragenina, na pata posterior esquerda, Chung e colaboradores (2011) demonstraram que a eletroacupuntura auricular bilateral na cimba da concha foi capaz de aumentar a sensibilidade mecânica e reduzir o edema da pata (CHUNG et al., 2011). Em outro



estudo, seguindo o modelo de dor somática, só que com tratamento invasivo, por meio de eletrodo implantado no ramo cervical esquerdo do vago, a eletroestimulação também produziu efeito antinociceptivo, sendo que o insulto foi provocado por teste com água quente em ambas às patas posterior de ratos (BOHOTIN et al., 2003).

Em contra partida, nosso estudo não demonstrou nenhum efeito antinociceptivo da estimulação do RANV na dor pós-incisão plantar, e também não foi encontrado nenhum outro estudo com estimulação vagal nesse modelo. Contudo, existem estudos de acupuntura em ratos, onde a eletroestimulação de pontos situados próximo as patas posteriores, no mesmo segmento da lesão, usando acupontos como Zusanli (ST36) e Sanyinjiao (SP6), reduziram a hiperalgesia mecânica e térmica (TEIXEIRA et al., 2012), em modelos de dor pós-operatória com cirurgia plantar. Nesse sentido, resultados produzidos em nosso laboratório (LANDI), por Moré e colaboradores, demonstraram em camundongos, que tanto a acupuntura manual, como a eletroacupuntura, no ponto SP6 (Sanyinjiao), acuponto localizado no mesmo segmento da lesão, foi capaz de produzir efeito antinociceptivo no modelo de dor pós-operatória por cirurgia plantar (MOREÉ et al., 2013). Sendo assim, a abordagem segmentar parece ser mais eficaz no modelo de dor pós-operatória por incisão plantar.

Em nossos experimentos com animais vagotomizados, foi possível observar que a vagotomia cervical do ramo esquerdo reduziu significativamente o número de contorções abdominais em relação ao grupo controle. De forma semelhante, um estudo conduzido por Zurowski e colaboradores (2012) mostrou que a vagotomia subdiafragmática completa diminui o comportamento nociceptivo na dor visceral em ratos, indicando que o nervo vago desempenha um papel direto na transmissão da informação nociceptiva no modelo de dor visceral por ácido acético (ZUROWSKI et al., 2012). Esses achados acompanham os estudos de anatomia em relação à inervação dos ramos do vago nos órgãos abdominais, como já foi descrito aqui (BREIT et al., 2018).

Também foi possível verificar que a vagotomia cervical do ramo esquerdo reduziu o número de contorções abdominais, assim como o efeito antinociceptivo da estimulação do RANV esquerdo, e que, por outro lado, a vagotomia cervical do ramo direito, não produziu efeito nas contorções, nem interferiu na ação antinociceptiva da estimulação do RANV esquerdo. Sendo assim, nosso estudo confirma a importância do papel aferente do vago na transmissão da informação nociceptiva e sua relação de lateralidade na inervação dos órgãos abdominais, conforme

descrito em estudos anatômicos já mencionados anteriormente (BREIT et al., 2018; JOHNSON, 2018).

Por fim, nosso estudo fez o uso de ferramentas farmacológicas, com o intuito de confirmar a participação do sistema colinérgico na atividade antinociceptiva promovida pela estimulação do RANV. Utilizando o teste do ácido acético e trabalhando com agonistas e antagonistas colinérgicos, foi possível demonstrar que o pré-tratamento com antagonistas muscarínicos e nicotínicos, inibe a ação antinociceptiva da estimulação do RANV. Da mesma forma, outro estudo também utilizando acupuntura auricular, em pontos de inervação vagal, para a melhora da motilidade gastrointestinal, teve seu efeito reduzido pelo pré-tratamento com atropina (LI e WANG, 2013). Nesse sentido, embora não tenha sido encontrados trabalhos com estimulação auricular e uso associado de mecamilamina, um estudo que investigou o efeito antinociceptivo da CDP-colina administrada intracerebroventricular demonstrou que o pré-tratamento com mecamilamina reduziu o efeito desta colina na inibição do número de contorções abdominais ocasionadas por injeção i.p. de ácido acético (HAMURTEKIN e GURUN, 2006).

Sendo assim, os resultados deste estudo demonstram o efeito antinociceptivo da estimulação do RANV na dor viscero-somática e somática de origem inflamatória, com participação do nervo vago e de receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos, corroborando com os demais estudos que foram discutidos. Porém, este é o primeiro estudo que demonstra a diferença de lateralidade nos efeitos da estimulação do RANV, assim como dos ramos cervicais do vago, no que diz respeito à modulação nociceptiva.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a estimulação do RANV esquerdo reduz a atividade nociceptiva inflamatória viscero-somática e somática, mas não alterou a alodinia mecânica induzida pela incisão da pata de ratos. Este efeito antinociceptivo, que claramente independe de sexo, é dependente da ativação do nervo vago e de receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos. Esses dados fornecem evidências neurobiológicas que fundamentam o uso da estimulação do RANV na prevenção da dor viscero-somática e somática em ratos.



## REFERÊNCIAS

- ALLCHORNE, A.J.; BROOM, D.C.; WOOLF, C.J. Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. **Mol Pain**. 1: 1-9, 2005.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G. JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. 16; 139(2): 267-84, 2009.
- BOHOTIN, C.; SCHOLSEM, M.; BOHOTIN, V.; FRANZEN, R.; SCHOENEN, J. Vagus nerve stimulation attenuates heat- and formalin-induced pain in rats. **Neurosci Lett**. 13; 351(2): 79-82, 2003.
- BOROVIKOVA, L.V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G.I.; WATKINS, L.R.; WANG, H.; ABUMRAD, N.; EATON, J.W.; TRACEY, K.J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**. 405: 458-462, 2000.
- BREIT, S.; KUPFERBERG, A.; ROGLER, G.; HASLER, G. Vagus Nerve as Modulator of the Brain-Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. **Front Psychiatry**. 9: art. 44, 2018.
- BRENNAN TJ, VANDERMEULEN EP, GEBHART GF. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**. 64(3): 493-501, 1996.
- BROWNING, K.N. Role of central vagal 5-HT<sub>3</sub> receptors in gastrointestinal physiology and pathophysiology. **Front Neurosci**. 9: art. 413, 2015.
- BUSCH, V.; ZEMAN, F.; HECKEL, A.; MENNE, F.; ELLRICH, J.; EICHHAMMER, P. The effect of transcutaneous vagus nerve stimulation on pain perception--an experimental study. **Brain Stimul**. 6: 202-209, 2013.
- CERVERO, F. Pathophysiology of visceral pain. **Rev Dor**. 15: 133-138, 2014.

- CHEAH, M.; FAWCETT, J.W.; ANDREWS, M.R. Assessment of Thermal Pain Sensation in Rats and Mice Using the Hargreaves Test. **Bio Protoc.** 7(16): 1-13 2017.
- CHUNG, W. Y.; ZHANG, H. Q.; ZHANG S. P. Peripheral muscarinic receptors mediate the anti-inflammatory effects of auricular acupuncture. **Chin Med.** 6(1): 1-8, 2011.
- COLLETT, B. Visceral pain: the importance of pain management services. **Br J Pain.** 7: 6-7, 2013.
- DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest.** 120(11): 3760–3772., 2010.
- FANELLI, A.; RUGGERI, M.; BASILE, M.; CICCETTI, A.; COLUZZI, F.; DELLA ROCCA, G.; DI MARCO, P.; ESPOSITO, C.; FANELLI, G.; GROSSI, P.; LEYKIN, Y.; LORINI, F. L.; PAOLICCHI, A.; SCARDINO, M.; CORCIONE, A. Activity-based costing analysis of the analgesic treatments used in postoperative pain management in Italy. **Miner Med.** 107: 1-13, 2016.
- FOLAN-CURRAN, J.; HICKEY, K.; MONKHOUSE, W. S. Innervation of the rat external auditory meatus: a retrograde tracing study. **Somat Mot Res.** 11: 65-68, 1994.
- FRØKJAER, J.B.; BERGMANN, S.; BROCK, C.; MADZAK, A.; FARMER, A.D.; ELLRICH, J.; DREWES, A.M. Modulation of vagal tone enhances gastroduodenal motility and reduces somatic pain sensitivity. **Neurog Motil.** 28: 592-598, 2016.
- FREITAS, K.C.; CARROLL, F.I.; NEGUS, S.S. Effects of nicotinic acetylcholine receptor agonists in assays of acute pain-stimulated and pain-depressed behaviors in rats. **J Pharm Exp Ther.** 355(2): 341-50, 2015.
- GAO, X.Y.; WANG, L.; GAISCHEK, I.; MICHENTHALER, Y.; ZHU, B.; LITSCHER, G. Brain-modulated effects of auricular acupressure on the regulation of autonomic function in healthy volunteers. **Evid Based Complement Alternat Med.** Art. ID. 714391, 2012.

GAO, X.Y.; ZHANG, S.P.; ZHU, B.; ZHANG, H.Q. Investigation of specificity of auricular acupuncture points in regulation of autonomic function in anesthetized rats. **Auton Neurosci.** 138(1-2): 50-56, 2008.

GOLDBERG, D.S.; MCGEE, S.J. Pain as a global public health priority. **BMC Public Health.** 11: Art. 770, 2011.

HAMURTEKIN, E.; GURUN M.S. The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. **Brain Res.** 1117(1): 92-100, 2006.

HEINRICHER, M.M; TAVARES, I.; LEITH, J.L.; LUMB, B.M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res Rev.** 60(1): 214-25, 2009.

HENSCHKE, N.; KAMPER, S.J.; MAHER, C.G. The epidemiology and economic consequences of pain. **Mayo Clin Proc.** 90: 139-147, 2015.

HOU, P.W.; HSU, H.C.; LIN, Y.W.; TANG, N.Y.; CHENG, C.Y.; HSIEH, C.L. The History, Mechanism, and Clinical Application of Auricular Therapy in Traditional Chinese Medicine. **Evid Based Complement Alternat Med.** Art. ID. 495684, 2015.

HOWLAND, R.H. Vagus Nerve Stimulation. **Curr Behav Neurosci Rep.** 1(2): 64-73, 2014.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** 413: 203-210, 2001.

JOHNSON, R.L.; WILSON, C.G. A review of vagus nerve stimulation as a therapeutic intervention. **Journal of Inflammation Research.** 11: 203-213, 2018.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Principles of neural science. 4 ed. New York: **Elsevier**, 2000.

KAWAKITA, K.; KAWAMURA, H.; KEINO, H.; HONGO, T.; KITAKOHI, H. Development of the low impedance points in the auricular skin of experimental peritonitis rats. **Am J Chin Med.** 19(3-4): 199-205. 1991.

KINGERY, W.S.; AGASHE, G.S.; GUO, T.Z.; SAWAMURA, S.; DAVIES, M.F.; CLARK, J.D.; KOBILKA, B.K.; MAZE, M. Isoflurane and nociception: spinal alpha2A adrenoceptors mediate antinociception while supraspinal alpha1 adrenoceptors mediate pronociception. **Anesthesiology** 96(2): 367-374, 2002.

KOSEKA, E.; COHENB, M.; BARONC, R.; GEBHARTD, G.F.; MICOE, J.A.; RICEF, A.S.C.; RIEFG, W.; SLUKAH, A.K. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? **Pain**. 157: 1382–1386, 2016.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identify. **Nat Ver Immunol**. 11: 750-761, 2011.

LI, H.; HU, S.; ZHANG, J.; ZHOU, J.; RAN, H.; TANG, Y.; CHEN, J.; WANG, Y. Effects and mechanisms of auricular electroacupuncture on visceral pain induced by colorectal distension in conscious rats. **Acupunct Med**. 32(6): 472-7, 2014.

LI, H.; YIN, J.; ZHANG, Z.; WINSTON, J. H.; SHI, X. Z.; CHEN, J. D. Auricular vagal nerve stimulation ameliorates burn-induced gastric dysmotility via sympathetic-COX-2 pathways in rats. **Neurogast Motil**. 28: 36-42, 2016.

LI H, WANG YP. Effect of auricular acupuncture on gastrointestinal motility and its relationship with vagal activity. **Acupunct Med**. 31(1): 57-64, 2013.

LINLEY, J.E.; ROSE, K.; OOI, L.; GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Pflugers Arch**. 459: 657-669, 2010.

LIN, Y. W.; HSIEH, C. L. Auricular electroacupuncture reduced inflammation-related epilepsy accompanied by altered TRPA1, pPKC $\alpha$ , pPKC $\epsilon$ , and pErk1/2 signaling pathways in kainic acid-treated rats. **Mediat Inflamm**. Art. ID. 493480, 2014.



- MCGREGOR A, WHELESS J, BAUMGARTNER J, BETTIS D. Right-sided vagus nerve stimulation as a treatment for refractory epilepsy in humans. **Epilepsia**. 46(1): 91-96, 2005.
- MICHAEL, A.E.; RAMSAY, M.D. Acute postoperative pain management. **Proc Bayl Univ Med Cent**. 13: 244–247, 2000.
- MÖLLER, K.A., JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **J Neurosci Methods**. 84(1-2): 41-47, 1998.
- MOORE-GILLON M.J. Effects of Vagotomy on Drinking in the Rat. **J. Physiol**. 308: 417-426, 1980.
- MORÉ, A.O.; CIDRAL-FILHO, F.J.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D.F.; NASCIMENTO, F.P. LI, S.M.; SANTOS, A.R.S. Caffeine at Moderate Doses Can Inhibit Acupuncture-Induced Analgesia in a Mouse Model of Postoperative Pain. **J Caffeine Res**. 3(3): 143–148, 2013.
- NAPADOW, V.; EDWARDS, R.R.; CAHALAN, C.M.; MENSING, G.; GREENBAUM, S.; VALOVSKA, A.; LI, A.; KIM, J.; MAEDA, Y.; PARK, K.; WASAN, A.D. Evoked Pain Analgesia in Chronic Pelvic Pain Patients using Respiratory-gated Auricular Vagal Afferent Nerve Stimulation. **Pain Med**. 13(6): 777–789, 2012.
- NEIL, M.J.E.; MACRAE, W.A. Post Surgical Pain- The Transition from Acute to Chronic Pain. **Rev Pain**. 3(2): 6–9, 2009.
- NESS, T.J.: Models of visceral nociception. *Inst. Lab. Anim. Res. J.* 40: 119-128, 2001.
- NOMURA, S.; MIZUNO, N. Central distribution of primary afferent fibers in the Arnold's nerve (the auricular branch of the vagus nerve): a transganglionic HRP study in the cat. **Brain Res**. 292(2): 199-205, 1984.
- OMOIGUI, S. The biochemical origin of pain--proposing a new law of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 1 of 3--a unifying law of pain. **Med Hypotheses**. 69: 70-82, 2007.

PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. **Nat. Rev. Endocrinol.** 8: 743–754, 2012.

RABISCHONG, P.; TERRAL, C. Scientific Basis of Auriculotherapy: State of the Art. **Med Acupunct.** 26(2): 84-96, 2014

SIKANDAR, S.; DICKENSON, A.H. Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs. **Curr Opin Support Palliat Care.** 6: 17-26, 2012.

TEIXEIRA, F.M.; CASTRO, L.L.; FERREIRA, R.T.; PIRES, P.A.; F.A. VANDERLINDE, F.A.; MEDEIROS, M.A. High-frequency electroacupuncture versus carprofen in an incisional pain model in rats. **Braz J Med Biol Res.** 45(12): 1209-1214, 2012.

TJØLSEN, A., BERGE, O.G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J.H., HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.** 51: 5-17, 1992.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature.** 420: 853–859, 2002.

USICHENKO, T.; LAQUA, R.; LEUTZOW, B.; LOTZE, M. Preliminary findings of cerebral responses on transcutaneous vagal nerve stimulation on experimental heat pain. **Brain Imaging and Behavior.** 11(1): 30-37, 2017.

ZAKKA, T.M.; TEIXEIRA, M.J.; YENG, L.T. Abdominal visceral pain: clinical aspect. **Rev Dor.** 14: 311-314, 2013.

ZIMMER L.J.; MELIZA L.; HSIAO S. Effects of Cervical and Subdiaphragmatic Vagotomy on Osmotic and Volemic Thirst. **Physiology & Behavior.** 16: 665-670, 1975.

ZIMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** 16(2): 109-110, 1983.

ZHANG, Z.; YIN, J.; CHEN, J.D. Ameliorating effects of auricular electroacupuncture on rectal distention-induced gastric dysrhythmias in rats. **PLoS One.** 10(2): Art. 0114226, 2015.

ZHOU, J.; LI, S.; WANG, Y.; LEI, Y.; FOREMAN, R.D.; YIN, J.; CHEN, J.D. Effects and mechanisms of auricular electroacupuncture on gastric hypersensitivity in a rodent model of functional dyspepsia. **PLoS One**. 12(3): Art. 0174568, 2017.

ZUROWSKI, D.; NOWAK, Ł.; WORDLICZEK, J.; DOBROGOWSKI, J.; THOR, P.J. Effects of vagus nerve stimulation in visceral pain model. **Folia Med Cracov**. 52(1-2): 57-69, 2012.