



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS FLORIANÓPOLIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**FERNANDA TANAKA**

**EVIDÊNCIA PARA O ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO  
NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA ELETROACUPUNTURA  
SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS  
EM CAMUNDONGOS COM INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA PERSISTENTE**

FLORIANÓPOLIS

2021

FERNANDA TANAKA

**EVIDÊNCIA PARA O ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO  
NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA ELETROACUPUNTURA  
SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS  
EM CAMUNDONGOS COM INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA**

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

Orientador: Profa. Dra. Leidiane Mazzardo Martins  
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins

Florianópolis

2021

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

Tanaka, Fernanda

Evidência para o envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da eletroacupuntura sobre parâmetros inflamatórios em camundongos com inflamação periférica persistente / Fernanda Tanaka ; orientadora, Leidiane Mazzardo Martins, coorientador, Daniel Fernandes Martins, 2021.

113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Eletroacupuntura. 3. Dor nociceptiva inflamatória. 4. Modelo animal de dor nociceptiva de inflamatória induzida pelo CFA. 5. Receptor FPR2/ALX. I. Martins, Leidiane Mazzardo. II. Martins, Daniel Fernandes . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

Fernanda Tanaka

**Evidência para o envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da eletroacupuntura sobre parâmetros inflamatórios em camundongos com inflamação periférica persistente**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Ari Ojeda Ocampo Moré, Dr.(a)

Instituição: Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago

Prof.(a) Morgana Duarte da Silva, Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Leidiane Mazzardo Martins, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2021.

*Dedico este trabalho à minha querida família,  
em especial, ao meu avô Kiyoshi Ono (em memória)  
e ao meu tio Renato (em memória).*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Margaret Ono e Elio Tanaka, às minhas irmãs, Juliana e Mariana, e aos meus irmãos, Alexandre e Gabriel, pelo apoio e amor incondicionais.

À Kênia, Mimi, Medinho, Jackie e Lilica, pela convivência diária, pela paciência, pelo carinho, por tornarem a vida mais leve e feliz!

A todos os meus familiares e amigos, que sempre me motivam e me inspiram, cada um do seu jeito. (Saudades das nossas reuniões e aglomerações).

Aos professores Dra. Leidiane Mazzardo Martins e Dr. Daniel Fernandes Martins por terem me recebido de portas abertas e me orientado/coorientado durante todo o mestrado. Agradeço a oportunidade, a receptividade, os ensinamentos e a confiança que tiveram em mim. Obrigada, prof. Daniel, por ter me aceitado no seu maravilhoso grupo de pesquisa, LaNEx.

Um agradecimento especial às queridas e incríveis Daiana e Bruna, que estiveram sempre presentes durante os meus experimentos, me ensinando e me auxiliando no que fosse preciso. Não importava se era dia de semana, sábado, domingo, feriado, com ou sem pandemia, lá estavam elas comigo. Muito obrigada de coração!

Às professoras, Dra. Franciane Bobinski e Dra. Anna Paula Piovezan, e a toda equipe LaNEx, que me mostraram como a colaboração e a empatia são essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

À Larissa Joaquim e ao grupo NeuroiMet, sob orientação da profa. Dra. Fabrícia Petronilho, e à profa. Dra. Franciane Bobinski pelo auxílio com as análises bioquímicas.

Aos professores Dr. Ari Moré e Dra. Patrícia de Souza Brocardo, pelas contribuições na banca de qualificação.

Aos docentes, discentes e técnicos administrativos do Programa de Pós-graduação em Neurociências da UFSC.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

## RESUMO

A acupuntura é uma prática terapêutica comumente utilizada e recomendada para o manejo da dor e da inflamação. O conhecimento acerca do mecanismo analgésico da eletroacupuntura (EA) tem avançado pela demonstração do envolvimento do receptor 2 para peptídeos formilados (FPR2/ALX) na ação anti-hiperalgésica da EA. Os efeitos da EA na dor e na inflamação são semelhantes aos efeitos desencadeados pela ativação do receptor FPR2/ALX mediada por substâncias pró-resolutivas. Contudo o papel desse receptor no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre parâmetros inflamatórios e oxidativos não tem sido explorado. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico na anti-hiperalgesia induzida pela EA de baixa frequência sobre parâmetros inflamatórios em um modelo animal de inflamação periférica persistente. Para tanto, camundongos machos *Swiss* foram submetidos à injeção intraplantar (i.pl.) com o adjuvante completo de Freund (CFA). Do primeiro ao quarto dia após a indução do modelo, os animais receberam injeção i.pl. do antagonista seletivo para o receptor FPR2/ALX (WRW4) ou salina quinze minutos antes do tratamento com EA. Os animais foram tratados com EA (frequência 2 e 10 Hz, nos acupontos SP6 e ST36, por 20 minutos) uma vez ao dia, por quatro dias. A hiperalgesia mecânica foi avaliada pelo teste de von Frey. No quarto dia, após o tratamento com a EA, os animais foram eutanasiados e as estruturas de interesse foram coletadas para a realização das seguintes análises bioquímicas: avaliação da concentração de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6, IL-10 e IL-4), da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), de parâmetros de dano oxidativo (peroxidação lipídica, proteínas carboniladas, relação da concentração de nitrito/nitrato) e de defesa antioxidante (atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)). Os resultados demonstraram que o pré-tratamento i.pl. com o antagonista para o receptor FPR2/ALX preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA. Além disso, o tratamento com a EA aumentou a concentração de IL-10 e a atividade da enzima antioxidante CAT na pata inflamada dos animais, ações que foram prevenidas pelo antagonista WRW4. As concentrações de TNF, IL-6 e IL-4, a atividade das enzimas MPO e SOD e os parâmetros de dano oxidativo não foram alterados pelo tratamento com a EA. Diante desses achados, pode-se concluir que o tratamento com a EA reduziu a hiperalgesia mecânica, aumentou a concentração de IL-10 e aumentou a atividade da enzima CAT, ações que podem ser dependentes, pelo menos em parte, da ativação do receptor FPR2/ALX periférico.

**Palavras-chave:** CFA. Citocinas inflamatórias. Nocicepção.

## ABSTRACT

Acupuncture is a therapeutic practice commonly used and recommended for pain relief and inflammation. Our knowledge of the analgesic mechanism of electroacupuncture (EA) has advanced. We have previously demonstrated the involvement of formyl peptide receptor type 2 (FPR2/ALX) in the antihyperalgesic effect of EA. The effects of EA on pain and inflammation are similar to those triggered by the activation of FPR2/ALX by pro-resolving mediators. However, the role of this receptor in the antihyperalgesic effect of EA on inflammatory parameters and oxidative stress has not been investigated. Thus the aim of this study was to assess the role of peripheral FPR2/ALX in the antihyperalgesic effect induced by low frequency EA in an animal model of persistent peripheral inflammation. Male Swiss mice underwent intraplantar (i.pl.) injection with complete Freund's adjuvant (CFA). Animals received i.pl. WRW4 (FPR2/ALX antagonist) or saline from the first to the fourth day after CFA injection, fifteen minutes before EA treatment (frequency 2 and 10 Hz, acupoints SP6 and ST36, for 20 minutes, once a day). Mechanical hyperalgesia was assessed with von Frey filaments. On the fourth day after EA, animals were euthanized, and right hind paw tissue samples were collected for biochemical analysis. Levels of inflammatory cytokines (TNF, IL-6, IL-10 and IL-4), myeloperoxidase (MPO) activity, oxidative stress markers (lipid peroxidation, carbonylated proteins, nitrite/nitrate ratio) and antioxidant enzymes activity (catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD)) were evaluated. We found that i.pl. injection of the FPR2/ALX antagonist prevented the antihyperalgesic effect induced by EA. Furthermore, animals treated with EA showed increased levels of IL-10 and higher CAT activity in the inflamed paw, and these effects were prevented by the antagonist WRW4. Both MPO and SOD activity, levels of TNF, IL-6 and IL-4, and oxidative stress markers remained unchanged. In conclusion, EA treatment reduced mechanical hyperalgesia and increased IL-10 levels and CAT activity, effects that may be dependent, at least in part, on the activation of peripheral FPR2/ALX.

**Keywords:** CFA. Inflammatory cytokines. Nociception.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Localização dos acupontos ST36 e SP6 .....	41
<b>Figura 2</b> - Desenho experimental da 1ª etapa .....	53
<b>Figura 3</b> - Desenho experimental da 2ª etapa .....	55
<b>Figura 4</b> - Indução da inflamação periférica com CFA.....	56
<b>Figura 5</b> - Equipamentos utilizados no tratamento .....	58
<b>Figura 6</b> - Estrutura para avaliação da hiperalgesia mecânica .....	60
<b>Figura 7</b> - Efeito da administração i.pl. de WRW4 na dose de 6µg/sítio .....	67
<b>Figura 8</b> - Efeito da EA na hiperalgesia mecânica .....	69
<b>Figura 9</b> - Efeito da administração i.pl. do antagonista (WRW4) .....	71
<b>Figura 10</b> - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de TNF .....	73
<b>Figura 11</b> - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de IL-6 .....	75
<b>Figura 12</b> - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de IL-10 .....	77
<b>Figura 13</b> - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a atividade da enzima MPO .....	79
<b>Figura 14</b> - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de TBARS .....	81
<b>Figura 15</b> - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de proteínas carboniladas .....	83
<b>Figura 16</b> - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de nitrito/nitrato .....	85
<b>Figura 17</b> - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a atividade da enzima CAT .....	87
<b>Figura 18</b> - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a atividade da enzima SOD .....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
5-HT	serotonina
AA	ácido araquidônico
ACh	acetilcolina
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AD	adrenalina
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
ATLs	lipoxinas ativadas por aspirina
ATP	trifosfato de adenosina
CAT	catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA	adjuvante completo de Freund
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CINC-1	citocina quimioatraente de neutrófilos-1
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	ciclooxigenase 2
COX	ciclooxigenase
CPME	cornos posterior da medula espinal
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
DAMPs	padrões moleculares associados a danos
DHA	ácido docosahexaenoico
DNPH	dinitrofenilhidrazina
DPM	desvio padrão da média
EA	eletroacupuntura
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPA	ácido eicosapentaenoico
fMLF	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
FPR	receptor para peptídeos formilados
FPR2/ALX	receptor 2 para peptídeos formilados
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GPx	glutathiona peroxidase
HMGB	proteína de alta mobilidade Box 1
HOCl	ácido hipocloroso
HHA	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
Hsp27	proteína de choque térmico 27
i.pl.	intraplantar
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL	interleucina
IL-1Ra	antagonista para o receptor da IL-1
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
Jak1	janus cinase 1
KC	quimiocina derivada de queratinócito
LaNEx	Laboratório de Neurociências Experimental
LC	locus ceruleus
LOX	lipoxigenase
LPS	lipopolissacarídeo
LT	leucotrieno
LXA4	lipoxina A4
MAPK	proteína-cinase ativada por mitógenos
MDA	malondialdeído
MPO	mieloperoxidase
MTC	Medicina Tradicional Chinesa

NA	noradrenalina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	fator de transcrição nuclear kappa B
NIH	National Institute of Health (Instituto Nacional de Saúde)
NK	células natural killers
NLR	receptor do tipo NOD
NMR	núcleo magno da rafe
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintases
NOX	NADPH oxidases
NPH	núcleo paraventricular do hipotálamo
Nrf2	fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
NTS	núcleo do trato solitário
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAG	substância cinzenta periaquedutal
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PBS	salina tamponada com fosfato
PG	prostaglandina
PGE2	prostaglandina E2
PICs	Práticas Integrativas e Complementares
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PMNs	polimorfonucleares
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PPR	receptores de reconhecimento de padrões
Prx	peroxiredoxinas
RNS	espécies reativas de nitrogênio

ROS	espécies reativas de oxigênio
SAA	proteína amiloide sérica A
SBED	Sociedade Brasileira para Estudo da Dor
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SOCS1	supressor de sinalização de citocinas 1
SOD	superóxido dismutase
SP	substância P
SPMs	mediadores pró-resolutivos especializados
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TGF- $\beta$	fator de crescimento de transformação $\beta$
TLR	receptor do tipo Toll
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR1	receptor 1 para TNF
TNFR2	receptor 2 para TNF
TRP	receptores de potencial transitório
TRPV1	receptor de potencial transitório vaniloide 1
Tyk2	tirosina cinase 2
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
Unisul	Universidade do Sul de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	INFLAMAÇÃO .....	16
1.1.1	Controle endógeno da inflamação .....	20
1.1.2	Dor nociceptiva de origem inflamatória.....	22
1.1.3	O papel das citocinas inflamatórias na dor nociceptiva .....	25
1.1.4	O papel do estresse oxidativo na dor nociceptiva .....	29
1.1.5	Modelo animal de dor nociceptiva de origem inflamatória induzida pelo CFA .....	32
1.1.6	Resolução da inflamação.....	33
1.1.7	O receptor FPR2/ALX .....	35
1.2	ACUPUNTURA.....	38
1.2.1	Os acupontos ST36 e SP6.....	39
1.2.2	Mecanismo de ação da acupuntura .....	42
1.2.3	Acupuntura, resolução da inflamação e o receptor FPR2/ALX .....	46
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
4.1	ANIMAIS.....	51
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	52
4.3	INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA.....	56
4.4	PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM EA .....	56
4.5	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	59
4.5.1	Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	59

<b>4.5.2</b>	<b>Avaliação do papel do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA .....</b>	<b>60</b>
4.6	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	60
<b>4.6.1</b>	<b>Avaliação do papel do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre parâmetros inflamatórios .....</b>	<b>61</b>
4.6.1.1	<i>Avaliação da concentração tecidual de citocinas inflamatórias.....</i>	60
4.6.1.2	<i>Avaliação da atividade da enzima MPO.....</i>	60
4.6.1.3	<i>Avaliação dos parâmetros de dano oxidativo e defesa antioxidante.....</i>	61
4.6.1.4	<i>Avaliação do dano oxidativo sobre lipídios.....</i>	61
4.6.1.5	<i>Avaliação do dano oxidativo sobre proteínas.....</i>	62
4.6.1.6	<i>Avaliação da concentração nitrito/nitrato.....</i>	62
4.6.1.7	<i>Determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD.....</i>	63
4.7	MORTE INDOLOR ASSISTIDA (MIA) .....	65
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
5.1	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO i.pl. DE WRW4 NA DOSE DE 6µg/sítio SOBRE O EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DO TRATAMENTO COM A EA .....	66
5.2	EFEITO DA EA NA HIPERALGESIA MECÂNICA.....	68
5.3	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA .....	70
5.4	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	72
<b>5.4.1</b>	<b>Efeito da EA sobre a concentração de TNF.....</b>	<b>72</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Efeito da EA sobre a concentração de IL-6.....</b>	<b>74</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Efeito da EA sobre a concentração de IL-10 .....</b>	<b>76</b>
5.5	EFEITO DA EA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MPO.....	78

5.6	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA SOBRE PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE .....	80
5.6.1	Efeito da EA sobre a concentração de TBARS .....	80
5.6.2	Efeito da EA sobre a concentração de proteínas carboniladas .....	82
5.6.3	Efeito da EA sobre a concentração de nitrito/nitrato .....	84
5.6.4	Efeito da EA sobre a atividade da enzima CAT .....	86
5.6.5	Efeito da EA sobre a atividade da enzima SOD .....	88
6	DISCUSSÃO .....	90
7	CONCLUSÃO.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98
	ANEXO A .....	113



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação faz parte de um processo de recuperação integrante do ser humano, sendo o principal mecanismo de proteção do corpo (PAVLOV et al., 2003). Um dos primeiros a definir os parâmetros da inflamação foi *Aulus Cornelius Celsus* (30 a.C – 38 d.C), enciclopedista romano a quem é atribuída a afirmação: “Os quatro sinais cardinais da inflamação são rubor, tumor, calor e dor”. Mais tarde, um quinto sinal, a “perda da função do órgão”, foi acrescentado (NETEA et al., 2017). Esses parâmetros clássicos são utilizados até os dias de hoje, porém, a inflamação não é apenas uma soma de sinais clínicos, mas sim uma rede altamente regulada e complexa de sinalização e comunicação entre diversos tipos celulares (PINHO-RIBEIRO; VERRI-JUNIOR; CHIU, 2017; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017). A inflamação aguda é autolimitante, protetora e essencial para a ativação do mecanismo de defesa do organismo quando localizada e resolvida ativamente em tempo hábil. Em contrapartida, quando a inflamação perde esse caráter protetor e se torna excessiva, sistêmica e não-resolvida ela se torna crônica, podendo promover dano tecidual contínuo e desencadear uma série de doenças (OLOFSSON; METZ; PAVLOV, 2018).

O processo inflamatório, portanto, consiste na resposta orgânica do organismo frente a um insulto tecidual, seja esse causado por infecção, trauma, doença autoimune ou câncer (MOILANEN, 2014). A fase aguda da inflamação é caracterizada pelo recrutamento de células do sistema imunológico – monócitos/macrófagos, células polimorfonucleares (PMNs), células dendríticas, e células *natural killers* (NK) – para o sítio da inflamação, processo facilitado pela vasodilatação, pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, pelo extravasamento de proteínas plasmáticas e pela saída de água dos vasos para o tecido (MURPHY, 2014). Todos esses processos, evidenciados pelos sinais cardinais da inflamação, são regulados por mediadores inflamatórios produzidos por células residentes no tecido e pelas células do sistema imunológico que migram para o local da lesão; tais eventos têm como principal objetivo eliminar o agente agressor e, posteriormente, restaurar a

função fisiológica dos tecidos afetados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2009; MOILANEN, 2014).

Para o organismo detectar, reconhecer, conter e reparar os danos teciduais, ele conta com um sistema eficiente de sinais de alerta e células que respondem a esses danos, além de respostas fisiológicas que funcionam como vias de sinalização (BIANCHI, 2007). Parte desse sistema é composto por uma ampla classe de proteínas conhecidas como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – *pattern recognition receptors*) expressos por células do sistema imunológico inato. Os PRRs reconhecem os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs – *damage-associated molecular patterns*) (SERHAN et al., 2020). Os DAMPs são sinais de dano endógenos gerados durante o processo inflamatório liberados por células danificadas, metabolicamente comprometidas ou mortas. Alguns dos principais DAMPs são a proteína de alta mobilidade Box 1 (HMGB1 – *high mobility group box 1*), proteínas de choque térmico, RNA e DNA, trifosfato de adenosina (ATP), peroxiredoxinas, entre outros (CAVAILLON, 2018). Os PAMPs podem ser provenientes de bactérias (lipopolissacarídeos [LPS], lipoproteínas, peptídeoglicanos, glicolipídeos, DNA e RNA bacteriano, entre outros), vírus, fungos e parasitas. As estruturas dos PAMPs são bastante conservadas e estão presentes nos microrganismos, mas ausentes nas células do organismo hospedeiro. Interessantemente, o organismo é capaz de reconhecer as diferentes categorias de PAMPs e responder de forma específica a cada uma delas (MURPHY, 2014; CAVAILLON, 2018).

Os receptores do tipo Toll (TLR – *Toll-like receptor*) e do tipo NOD (NLR – *Nod-like receptor*) são tipos comuns de PRRs. A ligação de PAMPs e DAMPs aos TLRs e NLRs ativa vias de sinalização intracelulares pró-inflamatórias que levam ao aumento de mediadores inflamatórios. Entre os mediadores da resposta inflamatória aguda estão a histamina, a bradicinina, a serotonina (5-HT), as prostaglandinas (PGs), os leucotrienos (LTs), as citocinas, o óxido nítrico (NO), entre outros. Esses mediadores levam à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular, eventos fundamentais para que haja disponibilidade local de mediadores e células inflamatórias (VANDERWALL; MILLIGAN, 2019). Os LTs e as PGs são derivados do

ácido araquidônico (AA) e são formados a partir da ação das enzimas lipoxigenase (LOX) e cicloxigenase (COX), respectivamente. A COX possui duas isoformas: a COX-1, constitutiva e mediadora de funções fisiológicas; e a COX-2, induzida em resposta a estímulos inflamatórios, algésicos e térmicos. A COX-2 transforma o AA em prostaglandina E2 (PGE2) que, além de promover vasodilatação local, induz a ativação e a migração de neutrófilos, macrófagos e mastócitos (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

As células que constituem a primeira linha de defesa do organismo e desempenham papéis fundamentais no desencadeamento da inflamação, na fagocitose e neutralização de patógenos, no remodelamento e reparo dos tecidos e na imunorregulação são os neutrófilos e os monócitos/macrófagos (MURPHY, 2014; CUZZOCREA, 2018; SHALOVA; SAHA; BISWAS, 2018). Uma característica importante dessas células é a capacidade de adaptação de suas respostas de acordo com os estímulos do seu microambiente, adotando diferentes fenótipos funcionais (GINHOUX et al., 2016; KOVTUN et al., 2018). Os macrófagos e neutrófilos, por meio dos TLRs, reconhecem PAMPs e DAMPs. Essa interação específica desencadeia vias de sinalização intracelulares que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), espécies reativas de nitrogênio (RNS – *reactive nitrogen species*) e fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), o qual induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF – *tumor necrosis factor*), a interleucina (IL) 1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (CUZZOCREA, 2018a; SHALOVA; SAHA; BISWAS, 2018).

Os neutrófilos desencadeiam e controlam a resposta inflamatória aguda e contribuem de forma crucial para o posterior processo de resolução da inflamação (CUZZOCREA, 2018a). Após lesão tecidual, os neutrófilos são os primeiros a aderirem às células endoteliais. De forma coordenada por meio de quimiotaxia, os neutrófilos são rapidamente recrutados dos vasos sanguíneos para o local da inflamação em resposta a diversos mediadores inflamatórios, como quimiocinas da família CXC (*Cysteine-X-Cysteine*), fatores de complemento (C5a e C3a), IL-8 e leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (KOVTUN et al., 2018). Uma vez no sítio inflamatório, os neutrófilos se acumulam, fagocitam patógenos e liberam mediadores pró-inflamatórios. Em seguida, entram em processo de apoptose. O acúmulo inicial de

neutrófilo é seguido por uma onda de infiltração de monócitos que vão se diferenciar em macrófagos e promover a remoção de neutrófilos apoptóticos (processo denominado eferocitose) e de detritos celulares (SERHAN; CHIANG; DYKE, 2008; HALL; GUYTTON, 2011).

As citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas liberadas pelos macrófagos induzem o recrutamento e a ativação de outras células do sistema imunológico, como linfócitos T e B. Todo esse processo culminará na eliminação do patógeno (OLOFSSON; METZ; PAVLOV, 2018). A liberação prolongada e descontrolada de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos/macrófagos pode causar graves danos teciduais, portanto, uma regulação muito bem orquestrada desse mecanismo é fundamental. Simultaneamente à produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios, os macrófagos também produzem citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e a IL-4, de acordo com o fenótipo apresentado. A diminuição da resposta inflamatória pelos macrófagos e a liberação de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, com a ativação de seus respectivos receptores, são eventos essenciais para o processo de resolução da inflamação (HEADLAND; NORLING, 2015; OLOFSSON; METZ; PAVLOV, 2018).

Como exposto, então, após lesão tecidual ou infecção, o reconhecimento de PAMPs e DAMPs pelos receptores PRRs presentes em macrófagos e neutrófilos resultam na ativação de vias de sinalização intracelulares e na produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (VANDERWALL; MILLIGAN, 2019). Esses mediadores, por sua vez, estimulam células imunológicas e células residentes do tecido afetado a iniciar uma série de processos, dentre eles o recrutamento de células imunológicas ativas para o local da inflamação (CAVAILLON; SINGER, 2018). Inicialmente, esse processo é protetor e fundamental para a ativação do sistema de defesa do organismo, promovendo reparo tecidual e retorno à homeostase, eventos que dependem da liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e também de mediadores pró-resolutivos especializados (VANDERWALL; MILLIGAN, 2019). Se a inflamação resultante for desproporcional à ameaça e não for resolvida, ela pode dar origem a patologias, levando a um fenótipo inflamatório crônico que pode resultar em dano tecidual contínuo e dor (MULEY; KRUSTEV; MCDUGALL, 2015; SERHAN et al., 2020).

### 1.1.1 Controle endógeno da inflamação

O sistema nervoso regula diversas funções fisiológicas e integra os sistemas do organismo e as funções vitais, mantendo o controle da homeostase (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017). Diversos estudos têm demonstrado que a sinalização neural regula a ativação imunológica e a inflamação. Além disso, a ativação das células imunológicas com a liberação de mediadores inflamatórios tem influência na atividade neuronal e nas funções encefálicas (TRACEY, 2009; PAVLOV; TRACEY, 2012).

Diversos mecanismos controlam a resposta inflamatória para que ela seja uma resposta orgânica frente a um dano e não se torne uma causa de morbidades. Além dos mecanismos regulatórios inerentes ao sistema imunológico, mecanismos neuronais e neuro-humorais, incluindo a via catecolaminérgica, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e o reflexo inflamatório, desempenham um papel fundamental no controle da inflamação e dos seus mecanismos de reparo (PAVLOV; TRACEY, 2017; PAVLOV; CHAVAN; TRACEY, 2018).

O eixo HHA é uma importante via imunomodulatória neuro-humoral cujas principais estruturas são o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPH), a glândula hipófise/pituitária e a glândula adrenal. O NPH contém neurônios especializados que sintetizam diversos neuro-hormônios, entre eles o hormônio liberador de corticotrofina (CRH – *Corticotropin releasing hormone*) e a vasopressina. A liberação do CRH e da vasopressina pelos neurônios do NPH estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH – *adrenocorticotropic hormone*) pela glândula hipófise, na corrente sanguínea. Por fim, a ação do ACTH no córtex adrenal resulta na secreção de glicocorticoides (principalmente corticosterona em roedores e hidrocortisona/cortisol em humanos) que suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulam a produção de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, reduzem a expressão de moléculas de adesão e inibem a infiltração de macrófagos e neutrófilos durante a inflamação (ULLOA; QUIROZ-GONZALEZ; TORRES-ROSAS, 2017).

Na via catecolaminérgica, a adrenalina (AD) e a noradrenalina (NA) (neurotransmissor pós-ganglionar predominante do sistema nervoso autônomo

simpático) ao interagirem com seus receptores presentes em células imunológicas, influenciam na circulação e na proliferação de leucócitos, modulam a produção de citocinas e, conseqüentemente, a inflamação (PAVLOV; CHAVAN; TRACEY, 2018). Dependendo do contexto, do receptor envolvido e do tipo celular, as catecolaminas podem ter um efeito tanto pró como anti-inflamatório (PAVLOV et al., 2003). Por exemplo, a NA, ao interagir com receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos presentes em monócitos e macrófagos, estimula a produção de TNF e o acúmulo de neutrófilos, agravando a inflamação (ELENKOV et al., 2000). Em contrapartida, a ação das catecolaminas via ativação de receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos presentes em células imunológicas está associada a efeitos anti-inflamatórios. A cascata intracelular após a ativação dos receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos envolve a produção e a liberação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e a ativação da proteína cinase A (PKA), que levam à inibição do NF- $\kappa$ B. Além disso, há um aumento na produção de mediadores anti-inflamatórios, incluindo a IL-10 e o fator de crescimento de transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (PAVLOV; CHAVAN; TRACEY, 2018).

O reflexo inflamatório é um processo crucial para o controle da inflamação e atua controlando as respostas imunes por meio de um mecanismo que inibe a transcrição do NF- $\kappa$ B (PAVLOV; TRACEY, 2012; PAVLOV; TRACEY, 2015). A ligação específica de PAMPs e DAMPs a receptores PRRs ativa respostas imunes que resultam na ativação do NF- $\kappa$ B e de outros fatores de transcrição, ocasionando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. A liberação de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, como PGs e LTs, é essencial para a resolução da inflamação (PAVLOV; TRACEY, 2015), pois esses mediadores ativam neurônios aferentes que constituem o arco aferente (ou sensorial) do reflexo inflamatório. As fibras aferentes do nervo vago levam essa informação, na forma de potenciais de ação, ao troco encefálico, mais especificamente ao núcleo do trato solitário (NTS) (PAVLOV; TRACEY, 2017). Tal processo ativa o arco eferente (ou motor) do reflexo inflamatório, também conhecido como via anti-inflamatória colinérgica, pois envolve a liberação de acetilcolina (ACh), principal neurotransmissor parassimpático. A ACh, por sua vez, interage com as células do sistema inato que expressam o receptor nicotínico de acetilcolina alfa-7 ( $\alpha$ 7nAChR), inibindo a ativação de macrófagos e a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (PAVLOV; TRACEY, 2015, 2017).

Interessantemente, o arco eferente do reflexo inflamatório pode ser ativado por estimulação elétrica do nervo vago e interrompido por vagotomia. Algumas doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide e síndrome do intestino irritável, nas quais a ação do nervo vago apresenta-se reduzida, a estimulação do nervo vago poderia ser utilizada como uma terapia complementar não-farmacológica (KOOPMAN et al., 2016; BONAZ; SINNIGER; PELLISSIER, 2017). Há evidências de que a eletroacupuntura (EA) somática no acuponto ST36, por ativar a via nervo vago-adrenal, apresente efeitos anti-inflamatórios, como a redução dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (LIU et al., 2020; TORRES-ROSAS et al., 2014).

### **1.1.2 Dor nociceptiva de origem inflamatória**

A ligação entre o processo inflamatório e o sistema nervoso foi apresentada quando *Aulus Cornelius Celsus* incluiu a dor nos quatro sinais cardinais da inflamação há aproximadamente dois mil anos. Embora ainda não completamente elucidadas, hoje se sabe que as interações moleculares entre os sistemas nervoso e imunológico estão envolvidas no controle da inflamação e, conseqüentemente, da dor nociceptiva de origem inflamatória (CAVAILLON, 2018).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP – *International Association for the Study of Pain*) define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com, ou semelhante àquela associada com dano tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). Apesar da experiência desagradável associada à dor, esta é uma característica evolutiva fundamental para a sobrevivência e o bem-estar do organismo (BASBAUM et al., 2009), uma vez que a sensação de dor compreende um conjunto de funções fisiológicas e emocionais que alerta o organismo saudável para a presença de danos teciduais reais ou potenciais e, dessa forma, permite que ele desencadeie respostas protetoras adequadas (JULIUS; BASBAUM, 2001; WOOLF, 2010). Em contrapartida, quando a dor persiste e vai além de sua função como sistema de alerta e proteção, ela pode adquirir caráter patológico, tornando-se crônica e debilitante e um problema de saúde grave com um impacto socioeconômico importante, haja vista que interfere de modo significativo na qualidade de vida e na capacidade produtiva dos indivíduos acometidos (JULIUS; BASBAUM,

2001; WILLMAN et al., 2013). Segundo a IASP, a dor crônica atinge 20% da população mundial (INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN, 2019). No Brasil, em um estudo epidemiológico conduzido pela Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED) com 919 pessoas das cinco regiões do Brasil, 42% relataram algum tipo de dor e 37% afirmaram conviver com dor há pelo menos seis meses (SOUZA et al., 2017).

A dor, portanto, é uma experiência pessoal e deve ser considerada dentro de um contexto biopsicossocial (RAJA et al., 2020). Fisiologicamente, o componente sensorial da dor, denominado nocicepção, compreende processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo (LOESER; TREEDE, 2008). A dor pode ser classificada de diversas formas e uma delas é de acordo com o mecanismo fisiopatológico que ela contempla, podendo ser de origem nociceptiva, quando há ativação de nociceptores; de origem neuropática, quando há lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial; ou de origem nociplástica, quando há uma alteração no processamento central da dor (CHIMENTI; FREY-LAW; SLUKA, 2018).

De forma resumida, o processo neuronal de interpretação e percepção de estímulos nocivos ocorre em etapas distintas que são descritas como: transdução, condução, transmissão, modulação e percepção (KANDEL, 2014). A sinalização nociceptiva começa pela ativação de neurônios sensoriais primários (nociceptores) que detectam estímulos mecânicos, térmicos e químicos nocivos e os transduzem em potenciais de ação (transdução); os potenciais de ação são conduzidos do sistema nervoso periférico (SNP) ao sistema nervoso central (SNC) pelas fibras dos neurônios nociceptivos primários do tipo A-delta ( $A\delta$ ) e do tipo C. Os aferentes primários, cujos corpos celulares estão nos gânglios sensoriais dos nervos espinais, entram no SNC pelo corno posterior da medula espinal (CPME) (condução); a informação, então, é transmitida do SNP ao SNC por meio da liberação de neurotransmissores, que são reconhecidos pelos receptores pós-sinápticos dos neurônios do CPME (transmissão); a partir daí, por meio de neurônios de segunda ordem, os estímulos ascendem para centros encefálicos superiores por cinco vias ascendentes principais: espinotalâmica, espinoreticular, espinomesencefálica, cervicotalâmica e espino-hipotalâmica; a modulação da dor está relacionada aos impulsos descendentes inibitórios ou facilitadores que modulam a transmissão nociceptiva na medula espinal; e, por fim, a



percepção, etapa final do processo de sinalização nociceptiva, ocorre no córtex e se refere à experiência física e emocional gerada pelo estímulo nociceptivo (KANDEL, 2014; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017; MARTINS, 2019).

Durante o processo inflamatório, a resposta sensorial a estímulos de natureza nociva pode ser exacerbada (hiperalgesia) ou a dor pode ser desencadeada por estímulos inócuos (alodinia) (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017). Hiperalgesia e alodinia são causadas pela ação de uma série de mediadores inflamatórios que vão modificar o processamento da via nociceptiva (KUNER; FLOR, 2017). É importante ressaltar que no processo de indução da hiperalgesia inflamatória, a liberação de mediadores respeita uma hierarquia temporal de liberação e de ação. Nesse contexto, considera-se que os mediadores liberados durante a resposta imune inata podem ser mediadores hiperalgésicos intermediários, como a bradicinina e algumas citocinas, que são liberados no início e durante a inflamação e são responsáveis pela liberação de outros mediadores, ou mediadores hiperalgésicos finais, como as PGs e as aminas simpáticas, que causam a sensibilização de neurônios aferentes primários (FERREIRA et al., 2009).

Dependendo do contexto, no entanto, mediadores intermediários podem se comportar como mediadores finais (FERREIRA et al., 2009). Assim, a liberação de mediadores hiperalgésicos, como bradicinina, PGs, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento, ROS, entre outros, no local da inflamação, causa a sensibilização dos neurônios nociceptivos primários, ou seja, há uma redução do limiar sensorial dos nociceptores, amplificando, portanto, a sua responsividade. Tal processo é conhecido como sensibilização periférica (VERRI JUNIOR et al., 2007; MULEY; KRUSTEV; MCDOUGALL, 2015). Paralelamente às alterações periféricas pode ocorrer também o processo de sensibilização central, em que há uma resposta aumentada dos neurônios nociceptivos do SNC a estímulos aferentes normais ou sublimiáres. Durante esse processo, pode ocorrer também a liberação direta de neuropeptídeos, como substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), os quais estão envolvidos na propagação da inflamação neurogênica e no processo de cronificação da dor (KUNER; FLOR, 2017).

Como exposto, a transmissão do estímulo nociceptivo pode ser controlada e, atualmente, é sabido que o controle endógeno da dor pode ocorrer em todos os níveis

do sistema nervoso (KANDEL, 2014; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017). Uma teoria que contribuiu significativamente para esse conhecimento foi a “Teoria da Comporta da Dor” proposta, em 1965, por Melzack e Wall. Os pesquisadores propuseram que existe uma inibição da transmissão nociceptiva no corno posterior da medula espinal, mais precisamente na substância gelatinosa, de forma que os estímulos nociceptivos conduzidos do SNP ao SNC sofrem a ação de sistemas moduladores antes da percepção dolorosa ser evocada. Esse controle pode ser acionado pela ativação de fibras aferentes A $\beta$  de grosso calibre que ativam interneurônios que inibem a transmissão do estímulo nociceptivo ao SNC (MEZACK; WALL, 1965). Além dos mecanismos supracitados, as vias inibitórias descendentes da dor envolvem uma série de estruturas supraespinais e sistemas de neurotransmissão, como os sistemas endocanabinoide, glutamatérgico, gabaérgico, neuropeptidérgico, serotoninérgico, opioidérgico, adrenérgico, colinérgico, entre outros (MILLAN, 2002). Vias inibitórias descendentes da dor, envolvendo a substância cinzenta periaquedutal (PAG – *periaqueductal grey*), o núcleo magno da rafe (NMR), o locus ceruleus (LC) e o bulbo rostroventral, são responsáveis pela liberação de neurotransmissores, principalmente 5-HT e NA, no corno posterior da medula espinal, promovendo a inibição da informação nociceptiva (MILLAN, 2002; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017).

### **1.1.3 O papel das citocinas inflamatórias na dor nociceptiva**

Para uma possível resposta bem-sucedida do organismo frente a um dano, é necessário que haja um equilíbrio entre as respostas inflamatória e anti-inflamatória do hospedeiro. Como exposto, durante o processo inflamatório, uma série de mediadores precisam atuar de forma coordenada para prevenir danos ao organismo e manter o equilíbrio homeostático (CAVAILLON; SINGER, 2018). A respeito disso, destacam-se na regulação das respostas imunes e inflamatórias as citocinas. As citocinas são proteínas ou glicoproteínas que medeiam diversas atividades biológicas em vários tipos celulares e são produzidas e liberadas por células em uma sequência coordenada em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios ou infecciosos,

inclusive em resposta celular a outras citocinas (VERRI JUNIOR et al., 2007; BRADY et al., 2011).

As citocinas podem ter ações pró ou anti-inflamatórias dependendo do microambiente no qual estão situadas. Citocinas como a IL-1 $\beta$ , a IL-6, e o TNF possuem ação principalmente pró-inflamatória e desempenham um papel crítico na geração e manutenção da dor por meio da ativação do NF- $\kappa$ B e da COX-2 e, conseqüentemente, da liberação de PGs e aminas simpáticas (FERREIRA et al., 2009). Esses mediadores são capazes de ativar segundos mensageiros, como AMPc, PKA e proteína cinase C (PKC), que vão diminuir o limiar de disparo dos nociceptores, aumentando a excitabilidade da membrana neuronal, tendo, portanto, uma participação fundamental nos processos de sensibilização central e hiperalgesia (COUTAUX et al., 2005; FERREIRA et al., 2009; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

A IL-1 foi clonada pela primeira vez na década de 1980 e rapidamente emergiu como um mediador de suma importância no processo inflamatório. O termo IL-1 se refere a duas citocinas, a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , conhecidas por terem ações pró-inflamatórias ao se ligarem ao receptor para IL-1 do tipo I (IL-1R1) e por desempenharem um importante papel na resposta do organismo a estímulos nocivos exógenos e endógenos (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010). A IL-1 é produzida principalmente por monócitos e macrófagos ativados e, em menor grau, por vários outros tipos celulares, incluindo neutrófilos, queratinócitos, células epiteliais e endoteliais, linfócitos e fibroblastos (DINARELLO, 2009). Dentre as propriedades pró-inflamatórias da IL-1 $\beta$  está a indução da expressão gênica e da síntese da fosfolipase-A2, da COX-2 e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2), eventos que levam à produção e liberação dos mediadores inflamatórios PGE2 e NO, respectivamente, os quais contribuem para as respostas inflamatórias local e sistêmica e para a produção de hiperalgesia (FERREIRA et al., 2009; GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010). A primeira evidência da participação da IL-1 $\beta$  na dor inflamatória foi publicada por Ferreira e cols. (1988), que demonstraram que a IL-1 $\beta$  induzia a hiperalgesia mecânica em ratos de maneira dependente da produção de PGs durante a inflamação.

O TNF foi descoberto na década de 1970 como uma molécula com propriedades citotóxicas induzida em resposta à endotoxina (SEDGER; MCDERMOTT, 2014). Atualmente, sabe-se que o TNF e os outros ligantes de sua família desempenham um papel crucial nas respostas imune e inflamatória e no controle do ciclo celular (proliferação, diferenciação e apoptose) (CUZZOCREA, 2018b). O TNF é produzido principalmente por macrófagos e monócitos ativados em respostas a infecções e condições inflamatórias, mas também por outros tipos celulares, como linfócitos T estimulados por antígenos, células NK, mastócitos, células dendríticas, entre outros (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2009). As atividades biológicas do TNF são mediadas por dois receptores distintos: o receptor para TNF tipo 1 (TNFR1), expresso constitutivamente na maioria das células, e o receptor para TNF tipo 2 (TNFR2), restrito a tipos celulares específicos como células imunológicas, endoteliais e neurônios (SEDGER; MCDERMOTT, 2014; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2015). A ligação do TNF a esses receptores inicia vias de sinalização que podem levar tanto à sobrevivência como à morte da célula. Um modelo de sinalização propõe que a ligação do TNF ao TNFR1 promove, primariamente, o processo inflamatório e a degeneração tecidual, enquanto a ligação ao TNFR2 está associada a efeitos homeostáticos locais, como a sobrevivência celular e a regeneração tecidual. Esse modelo sugere que o bloqueio terapêutico seletivo do TNFR1 manteria intacta a sinalização homeostática do TNFR2 (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2015).

A importância do TNF na geração e manutenção da hiperalgesia pode ser observada pela indução de inflamação por carragenina. Em ratos, o estímulo inflamatório induz a hiperalgesia mecânica por meio de uma sequência bem definida de liberação de citocinas iniciada pela produção de bradicinina (CUNHA et al., 1992, 2005). A primeira citocina liberada é o TNF, que induz a liberação de IL-1 $\beta$  e da citocina quimioatraente de neutrófilos-1 (CINC-1), responsáveis por estimular a síntese de PGs e liberação de aminas simpáticas, respectivamente, mediadores importantes para a produção de hiperalgesia (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; CUNHA et al., 2005). Em camundongos, a cascata de citocinas tem início com a liberação de TNF e da quimiocina derivada de queratinócito (KC) (CINC-1, em ratos e IL-8, em humanos), os quais estimulam a liberação de IL-1 $\beta$ . Semelhante ao que ocorre em ratos, os mediadores finais dessa cascata são as PGs e as aminas

simpáticas estimuladas pela IL-1 $\beta$  e pela PKC, respectivamente (CUNHA et al., 2005). Esses conceitos nos permitem entender por que a inibição de bradicinina, de uma citocina (IL-1 $\beta$  ou TNF) ou de várias citocinas (pela ação de glicocorticoides) causa analgesia (CUNHA et al., 2005; FERREIRA et al., 2009). A respeito disso, se mecanismos semelhantes ocorrem em humanos, a inibição da produção ou da ação dessas citocinas pode ser um alvo promissor para novas abordagens terapêuticas no controle da dor inflamatória.

A IL-6 também é uma importante citocina pró-inflamatória envolvida na geração da dor e na coordenação da resposta inflamatória (BARAL; UDIT; CHIU, 2019). Em ratos, a IL-6 aumentou a resposta das fibras-C não-mielinizadas da articulação do joelho a estímulos mecânicos (BRENN; RICHTER; SCHAIBLE, 2007). Além disso, em camundongos *knockout* para a IL-6, a hiperalgesia mecânica e térmica é menor quando comparados com camundongos selvagens após injeção intraplantar de carragenina (COOK et al., 2018).

A importância das citocinas hiperalgésicas no desencadeamento da dor inflamatória levou à compreensão de um mecanismo indireto da analgesia periférica: a produção de citocinas anti-inflamatórias (FERREIRA et al., 2009). Ao contrário do TNF, da IL-6 e da IL-1 $\beta$ , citocinas como a IL-4 e a IL-10 possuem propriedades anti-inflamatórias gerais, capazes de modular negativamente as repostas inflamatórias, inibindo a produção e a liberação de diversos mediadores, incluindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, proteases e ROS. Além disso, essas citocinas anti-inflamatórias podem mudar o fenótipo das células para um perfil mais inibitório/regulatório (EIJKELKAMP et al., 2016).

A IL-10 é amplamente expressa por diversas células do sistema imunológico inato (macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, células NK e eosinófilos) e adaptativo (células T CD4+, células T CD8+ e células B) e possui uma gama de atividades biológicas, com destaque para as suas propriedades anti-inflamatórias (GABRYŠOVÁ et al., 2014; OUYANG; O'GARRA, 2019). A indução da IL-10 normalmente ocorre em paralelo à indução de citocinas pró-inflamatórias, de modo que as vias de sinalização da IL-10 são capazes de modular negativamente essas citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, o processo inflamatório e a dor nociceptiva inflamatória (SARAIVA; O'GARRA, 2010). A ligação da IL-10 aos seus

receptores inibe a liberação do TNF, da IL-1 $\beta$ , da IL-6, da IL-8 e da IL-12 e aumenta a liberação de mediadores anti-inflamatórios, como o antagonista para o receptor da IL-1 (IL-1Ra). Eventos que inibem a atividade do NF- $\kappa$ B, fator importante para a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, têm sido descritos para a IL-10, entre eles a ativação da janus cinase 1 (Jak1) e da tirosina cinase 2 (Tyk2), indução do supressor de sinalização de citocinas 1 (SOCS1) e SOCS3 e a inibição da sinalização da proteína-cinase ativada por mitógenos (MAPK) (EIJKELKAMP et al., 2016; VANDERWALL; MILLIGAN, 2019).

A IL-4 também está envolvida em diversas atividades biológicas, como na proliferação de células T, na estimulação de células B ativadas, na ativação de macrófagos e no reparo tecidual. Essa citocina é primariamente produzida por macrófagos e células T, principalmente células Th2, mastócitos, eosinófilos e basófilos (GADANI; CRONK, 2012; VANDERWALL; MILLIGAN, 2019). A importância da IL-4 na dor inflamatória está relacionada com a diminuição da produção e da atividade de diversos mediadores pró-inflamatórios. A IL-4 inibe o inflamassoma NLRP3 e subsequente secreção de IL-1 $\beta$  por macrófagos (HWANG et al., 2015) e aumenta a expressão do IL-1Ra endógeno, diminuindo, dessa forma, as ações da IL-1 $\beta$  (EIJKELKAMP et al., 2016). Além disso, a IL-4 inibe diretamente a indução da NOS e os níveis de COX-2, diminuindo, portanto, a produção de NO e PGE2, respectivamente (VANDERWALL; MILLIGAN, 2019). Diante do exposto, conclui-se que os efeitos moduladores da IL-10 e da IL-4 sobre a dor inflamatória estão relacionados com a inibição da liberação e ação tanto de mediadores hiperalgésicos intermediários (citocinas pró-inflamatórias) quanto mediadores hiperalgésicos finais (PGs) (FERREIRA et al., 2009; VANDERWALL; MILLIGAN, 2019).

#### **1.1.4 O papel do estresse oxidativo na dor nociceptiva**

Na década de 1980, já era amplamente aceito que o estresse oxidativo, definido por Sies (1985) como um “desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante em favor do primeiro”, está envolvido na patogênese e evolução de diversas doenças e distúrbios (NIKI, 2016). Mais tarde demonstrou-se que as ROS, as RNS e outras espécies reativas participam de importantes processos fisiológicos e atuam como

mensageiros da sinalização redox com importantes funções regulatórias. A sinalização redox refere-se ao papel de moléculas oxidantes em vias de transdução de sinais intracelulares (SIES; BERNDT; JONES, 2017). Considera-se um mensageiro de sinalização redox fisiologicamente significativo espécies reativas produzidas por meio de processos rigorosamente programados e controlados e que reajam com moléculas alvo por meio de mecanismos específicos (NIKI, 2016). Diante disso, outras definições de estresse oxidativo foram propostas, uma delas sendo que o estresse oxidativo é um mediador que induz reações de oxidação e/ou afeta o equilíbrio redox, tendo como resultado o aumento da capacidade de defesa do organismo ou a indução de danos deletérios (NIKI, 2009, 2016).

A maior parte da produção intracelular de espécies reativas, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), o óxido nítrico ( $NO$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), se dá durante o metabolismo basal de células aeróbicas. Outra grande fonte de ROS são as NADPH oxidases (NOX) e a xantina oxidase, presentes em diversos tipos celulares, principalmente em macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, componentes essenciais da resposta inflamatória (RANNEH; ALI; AKIM, 2017). Embora as ROS e RNS participem de diversas funções fisiológicas, das respostas inflamatória e imunológica e estejam envolvidas no controle da homeostase celular e tecidual, a produção em excesso dessas espécies reativas, juntamente com a incapacidade do sistema de defesa antioxidante em eliminá-las, resulta na oxidação de proteínas, peroxidação de lipídios constitutivos e danos ao DNA e a organelas celulares (CUMPSTEY; FEELISCH, 2018), gerando, assim, estresse oxidativo. A carbonilação proteica e os produtos decorrentes da peroxidação lipídica (malondialdeído (MDA), acroleína e 4-hidroxinonenal (4-HNE)), por exemplo, são usados como marcadores de danos oxidativos, os quais auxiliam no estudo do estresse oxidativo (MARROCCO; ALTIERI; PELUSO, 2017).

Se as ROS não são controladas por um leque de sofisticados mecanismos antioxidantes, sejam estes enzimáticos ou não-enzimáticos, tem-se inflamação persistente e lesão tecidual. O sistema antioxidante, portanto, possui um papel fundamental nesse complexo equilíbrio (ADWAS et al., 2019). Considerando o sistema antioxidante enzimático, o  $O_2^{\cdot-}$  é rapidamente dismutado em  $H_2O_2$  pela ação

da enzima superóxido dismutase (SOD). Após a reação de dismutação, o  $H_2O_2$  é eliminado na forma de água ( $H_2O$ ) e  $O_2$  pelas enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) ou peroxiredoxinas (Prx) (MITTAL et al., 2014). Entretanto, na presença de NO, o  $O_2^{\cdot-}$  reage rapidamente com o NO, formando  $ONOO^-$ , uma reação que é de três a quatro vezes mais rápida que a reação de dismutação. O  $H_2O_2$ , no entanto, pode se transformar no altamente reativo HOCl no local da inflamação pela ação da enzima mieloperoxidase (MPO) (MITTAL et al., 2014). A MPO é abundantemente expressa em neutrófilos e liberada frente a mediadores pró-inflamatórios e durante o processo de estresse oxidativo no local da lesão/infecção. A liberação descontrolada da enzima MPO pode exacerbar a inflamação e provocar dano tecidual. Assim, o aumento da atividade da MPO é considerado um importante marcador de inflamação e oxidação (KHAN; ALSAHLI; RAHMANI, 2018).

As espécies reativas desempenham um papel direto na dor nociceptiva inflamatória, pois estimulam a ativação do NF- $\kappa$ B, fator de transcrição que regula positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias. Já foi demonstrado que a injeção intraplantar de  $O_2^{\cdot-}$  e  $ONOO^-$  levam ao desenvolvimento de hiperalgesia mecânica. Além disso, o aumento na formação dessas espécies reativas é importante no desenvolvimento de hiperalgesia térmica associada à inflamação aguda e crônica (SALVEMINI et al., 2011). A geração periférica das ROS está envolvida na fisiopatologia da dor pela ativação de receptores de potencial transitório (TRP – *transient receptor potential*). Os TRPs são canais catiônicos não-seletivos permeáveis ao cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017). As ROS e os produtos resultantes da oxidação de lipídios e fosfolipídios de membrana possuem ação pró-nociceptiva via receptores TRP, em especial, receptores de potencial transitório relacionado à proteína anquirina do tipo 1 (TRPA1) e TRPV1, desempenhando, portanto, um papel importante na fisiopatologia da dor (BEATRICE et al., 2017). Os canais TRPA1 e TRPV1 são receptores para estímulos químicos e estão colocalizados em fibras nociceptivas do tipo C e A $\delta$  (HACKEL et al., 2013). Em animais com inflamação periférica induzida por CFA, por exemplo, o TRPA1 é ativado pelo 4-HNE, um produto resultante da peroxidação lipídica provocada por ROS (TREVISANI et al., 2007).



Uma RNS que está envolvida em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos e que possui um importante papel regulatório na resposta inflamatória, em especial na regulação de propriedades pró-inflamatórias do endotélio e nas fases iniciais da migração de células inflamatórias para o local da inflamação, é o NO (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003). Em tecidos animais, o NO é gerado enzimaticamente a partir da L-arginina em L-citrulina pelas óxido nítrico sintases (NOS). Existem três isoformas de NOS: NOS1 ou NOS neuronal (nNOS), NOS2 ou NOS induzível (iNOS), expressa em diversos tipos celulares frente a estímulos inflamatórios, e NOS3 ou NOS endotelial (eNOS). O NO tem meia-vida curta (segundos) e é rapidamente oxidado em nitrito e nitrato, produtos finais estáveis e inativos. Assim, a quantificação da concentração de nitrito/nitrato pode ser utilizada para medir indiretamente a produção endógena de NO (ABRAMSON, 2008). Como já visto, a iNOS e a COX-2 produzem e liberam, respectivamente, NO e PGE2, mediadores importantes que contribuem para as respostas inflamatórias local e sistêmica e para a produção de hiperalgesia (FERREIRA et al., 2009). Na dor nociceptiva inflamatória, a iNOS e a COX-2 têm sua expressão aumentada (CHEN et al., 2010). Além disso, animais *knockout* para diferentes isoformas da NOS (nNOS e iNOS) apresentaram reduções significativas na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA – *Complete Freund's adjuvant*) (LEÁNEZ; HERVERA; POL, 2009), mostrando a importância desse sistema na produção de hiperalgesia.

#### **1.1.5 Modelo animal de dor nociceptiva de origem inflamatória induzida pelo CFA**

Modelos animais que reproduzem aspectos fisiopatológicos de doenças em humanos são fundamentais para a pesquisa básica. Além disso, a facilidade de uso e reprodutibilidade de dados são critérios importantes para a escolha do modelo (BERGE, 2013). Substâncias que induzem uma resposta inflamatória prolongada têm sido utilizadas com frequência em modelos animais para o estudo da dor nociceptiva de origem inflamatória e para a investigação do efeito antinociceptivo e anti-

inflamatório de terapias complementares (ZHANG et al., 2014; YAM; LOH; OO, 2020). Dentre essas substâncias encontra-se o CFA, utilizado no presente estudo.

O CFA é composto por óleo mineral, mono-oleato de manitol (agente surfactante) e uma micobactéria inativada (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*) (BARROT, 2012). O modelo de inflamação periférica induzida pelo CFA está bem estabelecido e permite a quantificação dos mediadores envolvidos nas alterações celulares durante o processo inflamatório (MARTINS et al., 2015).

A administração intraplantar (i.pl.) de CFA na pata de camundongos induz inflamação intensa e persistente no local, caracterizada por infiltração de neutrófilos, edema, aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-17 (RITTER et al., 2012; YU et al., 2020), aumento dos níveis de ROS e RNS e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD e GPx (SINGH; VINAYAK, 2017). Além disso, a partir da administração i.pl. de CFA em ratos, foi observado que o perfil de células imunológicas muda ao longo do tempo. Seis horas após a indução do modelo, ocorre um aumento significativo de neutrófilos. A partir das 96h, predominam no tecido epitelial monócitos e macrófagos (RITTER et al., 2012).

Todos esses eventos resultam em limiares nociceptivos reduzidos e, conseqüentemente, hiperalgesia e/ou alodinia, que podem ser observados por meio de teste comportamentais e eletrofisiológicos (RITTER et al., 2012). Além disso, tem sido frequente o uso do modelo de CFA em pesquisas que investigam o efeito anti-inflamatório e anti-hiperalgésico do tratamento com a eletroacupuntura (SU et al., 2012; LIAO et al., 2017; GAO et al., 2018; YU et al., 2020), portanto, o modelo de CFA torna-se adequado para as investigações desta pesquisa.

### **1.1.6 Resolução da inflamação**

A inflamação aguda, como exposto anteriormente, é protetora e essencial para a ativação das defesas do organismo. Em contrapartida, a inflamação prolongada e persistente não é benéfica e contribui para o aparecimento de diversas doenças e, portanto, deve cessar. Quando a inflamação aguda é resolvida em tempo hábil ela não progride para um estado crônico, e isso se dá pelo processo de resolução da

inflamação, coordenado pelos chamados mediadores pró-resolutivos especializados (SPMs, *specialized proresolving mediators*) (SERHAN, 2014; HEADLAND; NORLING, 2015). O início da inflamação aguda é caracterizado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, que atraem células efetoras para o local da inflamação. Esse processo é normalmente autolimitante, uma vez que existe um equilíbrio entre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios. Com a migração de neutrófilos e monócitos/macrófagos para o sítio inflamatório, há uma diminuição da síntese e um aumento do catabolismo dos mediadores pró-inflamatórios. Paralelamente, ocorre a liberação de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos que, dentre diversas ações, vão começar a inibir a migração de células PMNs, eventos que marcam o início do processo resolutivo (SERHAN et al., 2007).

Um processo de resolução eficiente depende da atuação dos SPMs por meio de seus receptores, da redução ou interrupção da infiltração de neutrófilos nos tecidos, da contrarregulação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, da liberação de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, da indução de apoptose de neutrófilos, da remoção desses neutrófilos apoptóticos (eferocitose) e de detritos celulares pelos macrófagos, da mudança de fenótipo dos macrófagos do perfil M1 para M2 e do retorno de células não-apoptóticas à vasculatura. Todos esses eventos vão culminar no reestabelecimento da homeostase e no reparo tecidual (SERHAN, 2014; SERHAN et al., 2020).

Os SPMs incluem principalmente os mediadores lipídicos especializados (lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas), proteínas, como a anexina A<sub>1</sub> (AnxA1), galectina-1 (Gal-1) e Gal-9, a adenosina e mediadores gasosos, como o sulfeto de hidrogênio (SERHAN, 2014; SUGIMOTO et al., 2016; PERRETTI et al., 2017). A natureza distinta dos SPMs implica a existência de vias biossintéticas com perfis temporais igualmente distintos, uma característica fundamental para assegurar uma sinalização pró-resolutiva sustentada e eficiente e, assim, ocorrer o restabelecimento das funções fisiológicas (PERRETTI et al., 2017). Os mediadores lipídicos especializados são derivados de ácidos graxos essenciais que incluem o ácido araquidônico (AA) (lipoxinas), o ácido eicosapentaenoico (EPA – *eicosapentanoic acid*) (resolvinas da série E) e o ácido docosahexaenoico (DHA – *docosahexanoic acid*) (resolvinas da série D, protectinas e maresinas) (SPITE;

SERHAN, 2018). Durante o processo inflamatório, esses mediadores lipídicos são sintetizados principalmente por neutrófilos e macrófagos. As principais enzimas envolvidas na biossíntese incluem a 5-lipoxigenase (5-LOX), a 12-LOX e a 15-LOX. Interessantemente, na fase inicial da inflamação, quando a enzima 5-LOX está na membrana nuclear de neutrófilos, mastócitos e macrófagos, ela converte o AA no mediador pró-inflamatório LTB<sub>4</sub>; em contrapartida, quando no citoplasma, na fase resolutive, a 5-LOX favorece a síntese da lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) a partir do AA (BÄCK et al., 2019).

Todos esses mediadores pró-resolutivos produzem seus efeitos por ativar diferentes receptores, entre eles o receptor 2 para peptídeos formilados (FPR2 – *formyl-peptide receptor 2*) (PERRETTI et al., 2017), alvo de interesse do presente trabalho.

### 1.1.7 O receptor FPR2/ALX

Showell e cols. (1976) verificaram que existia um domínio de ligação de alta afinidade para o peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLF) na superfície de neutrófilos, o qual foi identificado como receptor para peptídeos formilados (FPR – *formyl-peptide receptor*).

Os FPRs são uma família de receptores acoplados à proteína G (GPCR – *G protein-coupled receptor*) com sete domínios transmembrana e são expressos, principalmente, em leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos/ macrófagos, células NK, células dendríticas e mastócitos (YE et al., 2009; CHEN et al., 2018). Esses receptores são conhecidos por serem ativados por uma variedade de ligantes, incluindo peptídeos formilados e não-formilados de diferentes composições, e por mediar diversas funções biológicas relevantes para a defesa do hospedeiro e para a modulação da inflamação (YE et al., 2009; DUFTON; PERRETTI, 2010; SUGIMOTO et al., 2016).

Interessantemente, os receptores FPRs também são expressos em uma variedade de células não-imunológicas, incluindo células endoteliais, células progenitoras endoteliais, fibroblastos sinoviais, queratinócitos, células do epitélio intestinal, células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e hepatócitos,

sugerindo um amplo espectro de funções biológicas desses receptores (CHEN et al., 2017).

Em humanos, a família de genes FPR possui três membros identificados: FPR1, FPR2/ALX e FPR3. Em camundongos, pelo menos oito membros já foram identificados: Fpr1, Fpr2, Fpr-rs1, Fpr-rs3, Fpr-rs4, Fpr-rs5, Fpr-rs6 e Fpr-rs7. Os receptores Fpr1 e FPR1 são considerados ortólogos, enquanto o Fpr2 é estrutural e funcionalmente semelhante ao FPR2/ALX (CHEN et al., 2017; WINTHER; DAHLGREN; FORSMAN, 2018). A denominação FPR2/ALX, adotada pela IUPHAR (*International Union and Clinical Pharmacology*), se deu após a caracterização farmacológica que levou à identificação da LXA<sub>4</sub> e dos epímeros de lipoxinas, conhecidos como ATs (*aspirin-triggered lipoxins*), como ligantes de alta afinidade para esse receptor (YE et al., 2009).

O receptor FPR2/ALX está presente principalmente em fagócitos, mas também já foi descrito em células epiteliais, endoteliais, células da microglia, de glândulas salivares, córnea, baço e pulmão (MIGEOTTE; COMMUNI; PARMENTIER, 2006; NELSON et al., 2014). A diversidade de ligantes é uma característica importante da família de receptores FPR, sendo o receptor FPR2/ALX o mais promíscuo deles. Dependendo do ligante, a ativação do receptor FPR2/ALX pode se traduzir em efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios/pró-resolutivos (CORMINBOEUF; LEROY, 2014). Um dos primeiros ligantes quimiotáticos pró-inflamatórios identificados para o receptor FPR2/ALX foi a proteína amiloide sérica A (SAA) (SUGIMOTO et al., 2016). A indução de eventos inflamatórios pela SAA via receptor FPR2/ALX leva ao aumento da secreção de IL-8 após a ativação do NF-κB em PMNs humanos (SHIMIZU et al., 2013), evidenciando os efeitos pró-inflamatórios desse receptor.

Dentre as várias moléculas com ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas que produzem seus efeito por ativarem o receptor FPR2/ALX está a LXA<sub>4</sub>, que foi o primeiro ligante lipídico endógeno identificado (MADERNA et al., 2010). Além da LXA<sub>4</sub>, o receptor FPR2/ALX reconhece diversos lipídios de meia-vida curta e análogos estáveis da LXA<sub>4</sub>, proteínas, como a AnxA1, e resolvinas da série-D (PERRETTI; GODSON, 2020). A função anti-inflamatória e pró-resolutiva do receptor FPR2/ALX é bem conhecida (DUFTON et al., 2010). A ativação do receptor FPR2/ALX pela LXA<sub>4</sub> estimula a quimiotaxia e a ativação de monócitos, inibe o recrutamento e a ativação

de neutrófilos, diminui a produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias e reduz o estresse oxidativo (CHIANG; SERHAN, 2017; SERHAN, 2017). Embora não haja evidências diretas de como ocorre a redução do estresse oxidativo via LXA<sub>4</sub>-FPR2/ALX, sugere-se que seja pelo aumento da via de sinalização do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (LEUTI; MACCARRONE; CHIURCHIÙ, 2019), considerado o regulador mestre da resposta antioxidante do organismo (HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017). Além disso, tem sido demonstrado que a LXA<sub>4</sub> reduz a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ONOO<sup>-</sup> em neutrófilos. Altos níveis de ONOO<sup>-</sup> induzem a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF e IL-8, as quais retornam a níveis controlados quando a produção de ONOO<sup>-</sup> é contrarregulada pela ação da LXA<sub>4</sub> (SPITE; SERHAN, 2018; LEUTI; MACCARRONE; CHIURCHIÙ, 2019).

Em concordância, observou-se que o BML-111, um análogo da LXA<sub>4</sub>, aumentou a produção de IL-10 e reduziu o recrutamento de neutrófilos, a ativação de mastócitos, a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1β, IL-6 e TGF) e o estresse oxidativo (observado pela redução na produção de superóxido e aumento da capacidade antioxidante, possivelmente pela ativação da via Nrf2) em um modelo de inflamação cutânea induzida por radiação ultravioleta B em camundongos. Todos esses efeitos foram prevenidos pelo antagonista (BOC-2) para o receptor FPR2/ALX (MARTINEZ et al., 2020), sugerindo o envolvimento do receptor FPR2/ALX no equilíbrio redox.

Outro ligante capaz de ativar o receptor FPR2/ALX é a proteína AnxA1, que pode exercer ação analgésica por facilitar a liberação tônica de opioides pelos neutrófilos no sítio inflamatório e interromper a transmissão nociceptiva periférica por suprimir a excitabilidade neuronal (CHEN; LV; PEI, 2013). Há evidências de que a via AnxA1-FPR2/ALX limite o recrutamento de neutrófilos e induza sua apoptose, modulando o recrutamento de monócitos e estimulando a eferocitose pelos macrófagos, além de induzir a reprogramação de macrófagos para um perfil anti-inflamatório e pró-resolutivo (MCARTHUR et al., 2015, 2020). A ativação do receptor FPR2/ALX por agonistas endógenos, como a LXA<sub>4</sub> e a AnxA1, desencadeia ações resolutivas integradas. Essa cascata pode envolver a expressão e liberação de outros mediadores pró-resolutivos, como a IL-10 (SOUZA et al., 2007). Diante do exposto,

achados de que agentes pró e anti-inflamatórios e pró-resolutivos interagem com o mesmo receptor apontam para o envolvimento do receptor FPR2/ALX durante o processo inflamatório e sua resolução (DUFTON; PERRETTI, 2010).

## 1.2 ACUPUNTURA

A acupuntura é um método terapêutico milenar e uma parte importante da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) utilizada no manejo da dor e no tratamento de diversas doenças (ZHANG et al., 2014; WANG et al., 2017; YU et al., 2020). É definida pelo Centro Nacional de Saúde Integrativa e Complementar do *National Institute of Health* (NIH) como uma técnica de estimulação de pontos específicos no corpo (pontos de acupuntura ou acupontos) por meio da inserção de agulhas filiformes (agulhas de acupuntura) na pele (ZHANG; WANG; MCALONAN, 2012; ZHAO, 2008).

Desde a década de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem incentivando o uso da acupuntura e de outras práticas integrativas pelos seus países-membros e os orienta a desenvolverem políticas proativas e a implementarem planos de ação que fortaleçam o papel dessas práticas na manutenção da saúde das populações (BARROS; SIEGEL; SIMONI, 2007; TELESÍ-JÚNIOR, 2016). No Brasil, a acupuntura está inserida no rol de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICs). Com a crescente necessidade pela integralidade na atenção à saúde, o Ministério da Saúde publicou, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (PNPIC-SUS), cuja implementação envolve justificativas de natureza política, técnica, econômica, social e cultural (BRASIL, 2006; TELESÍ-JÚNIOR, 2016).

A acupuntura como abordagem não-farmacológica tem sido extensivamente estudada nas últimas duas décadas (ZHAO, 2008; ZHANG et al., 2014; LIAO et al., 2017; LV et al., 2019). Atualmente é endossada pela OMS e pelo NIH e é utilizada por milhões de pessoas para o controle da dor e da inflamação (ULLOA; QUIROZ-GONZALEZ; TORRES-ROSAS, 2017). Pesquisas de alta qualidade sobre a eficácia e a efetividade da acupuntura têm melhorado significativamente a sua posição em diferentes *guidelines* para o tratamento de diversas condições dolorosas (LANGEVIN; WAYNE, 2018). Embora seja uma modalidade com grande potencial da medicina

complementar e integrativa, seus mecanismos de ação ainda não estão bem estabelecidos (HUANG et al., 2018; YEN et al., 2019).

Com a efetividade clínica da acupuntura reconhecida mundialmente, a pesquisa experimental básica constitui um pilar importante para a elucidação desses mecanismos e para as diretrizes da prática clínica (LI et al., 2019a). Diante desse contexto, a eletroacupuntura (EA) se torna uma importante ferramenta de pesquisa, uma vez que pode ser padronizada por meio do controle de parâmetros como frequência, intensidade, duração, corrente, entre outros (LV et al., 2019).

Diferentes técnicas podem ser usadas para a estimulação dos pontos de acupuntura. A EA é uma delas e consiste na estimulação elétrica dos acupontos por meio de eletrodos conectados às agulhas de acupuntura. Como mencionado, nos estudos com EA há parâmetros eletrônicos a serem considerados, como a frequência do estímulo, a intensidade e o tipo da corrente, a duração do pulso e a polarização das saídas. A frequência do estímulo é um dos parâmetros mais estudados (HUBACHER et al., 2016). Além da EA, existem outras técnicas para a estimulação dos acupontos, como acupuntura manual (estimulação manual das agulhas), acupressão (pressão nos acupontos), moxabustão (estímulo térmico dos acupontos com calor), fotoestimulação (estímulo dos acupontos com LASER ou LED) e farmacopuntura (injeção de substâncias nos acupontos) (ZHAO, 2008). Cada uma dessas técnicas ativa diferentes mecanismos de ação (ULLOA; QUIROZ-GONZALEZ; TORRES-ROSAS, 2017), os quais serão abordados mais adiante com enfoque na EA.

### **1.2.1 Os acupontos ST36 e SP6**

A teoria dos meridianos constitui uma base sólida para a prática clínica da acupuntura e é um dos principais fundamentos da MTC (ZHANG; HAN; LITSCHER, 2019). Inicialmente na prática da acupuntura, os pontos de estimulação eram selecionados empiricamente com base nas respostas dos pacientes (ULLOA; QUIROZ-GONZALEZ; TORRES-ROSAS, 2017). Atualmente, a seleção dos pontos utilizados na prática clínica e nas pesquisas experimentais considera essas observações iniciais, bem como outros fatores. No entanto, até o momento, a teoria dos meridianos e dos pontos de acupuntura não foi explicada detalhadamente e

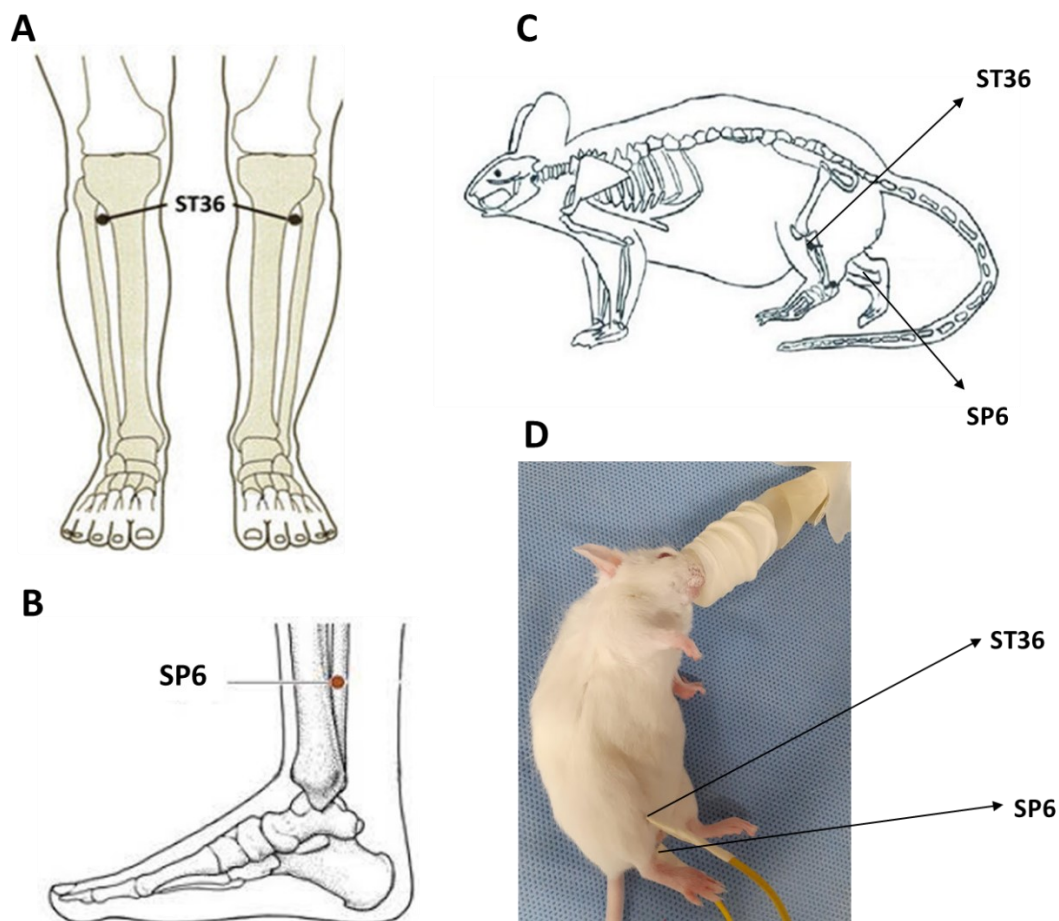


continua sendo uma questão controversa na visão biomédica (LI et al., 2015; ZHANG; HAN; LITSCHER, 2019).

A seguir, serão apresentadas características dos acupontos utilizados na presente pesquisa e o motivo de sua escolha: ST36 (*Stomach 36 / Estômago 36 (E36) / em chinês, Zusanli*) e – SP6 (*Spleen-Pancreas 6 / Baço-Pâncreas 6 (BP6) / em chinês, Sanyinjiao*).

Anatomicamente, sugere-se que os acupontos sejam abundantes em nervos, músculos, vasos sanguíneos e tendões (ZHOU; HUANG; XIA, 2010) e que estejam localizados próximo a redes neuronais (ULLOA; QUIROZ-GONZALEZ; TORRES-ROSAS, 2017). Em humanos, o acuponto ST36 está localizado a 3 polegadas (largura do polegar da pessoa que está recebendo o tratamento) abaixo da patela, entre a tíbia e a fíbula, no músculo tibial anterior; o acuponto SP6 localiza-se a três polegadas proximais à proeminência do maléolo medial, atrás da margem medial da tíbia (LIMA, 2016). Nos estudos sobre os efeitos da acupuntura em modelos animais, a localização dos acupontos é feita a partir da anatomia comparada ao humano (YIN et al., 2008). Assim, o acuponto ST36 está localizado entre a tíbia e a fíbula, aproximadamente 5 mm lateral à tuberosidade da tíbia, no músculo tibial anterior, inervado pelo nervo fibular (YIN et al., 2008; ERTHAL et al., 2016); o acuponto SP6 localiza-se no terço distal da região medial da perna. O agulhamento nesse ponto estimula fibras do músculo flexor longo dos dedos, inervado pelo nervo tibial (YIN et al., 2008). A figura (fig.) 1 ilustra a localização dos acupontos SP6 e ST36 em humanos (painéis A e B) e em camundongos (painéis C e D).

Figura 1- Localização dos acupontos ST36 e SP6



Legenda: Localização dos acupontos SP6 e ST36 em humanos (painéis A e B respectivamente); localização dos acupontos SP6 e ST36 em roedores (painéis C e D).  
 Fonte: Chiu et al. (2015); A autora (2021); Viera et al. (2021);

Além de serem amplamente utilizados na prática clínica, os acupontos ST36 (inervação - nervo fibular) e SP6 (inervação - nervo tibial) foram especificamente selecionados para o presente estudo, pois têm relação com a inervação segmentar da pata posterior dos animais (segmentos espinais L3, L4 e L5) (MAZZARDO-MARTINS et al., 2018; VIEIRA et al., 2020; MORÉ et al., 2021). Ademais, diversos estudos utilizando diferentes modelos animais demonstraram efeitos positivos do uso desses acupontos no controle da dor e da inflamação (TORRES-ROSAS et al., 2014; ZHANG et al., 2014; LU et al., 2016; LIAO et al., 2017; VIEIRA et al., 2020; YU et al., 2020).

### 1.2.2 Mecanismo de ação da acupuntura

Estudos científicos modernos têm sido conduzidos para tentar explicar os mecanismos de ação da acupuntura, porém ainda não se chegou a uma teoria unificada (ZHANG; HAN; LITSCHER, 2019). Na abordagem ocidental biomédica, tem-se como premissa o conhecimento anatomofisiológico atual e os princípios da medicina baseada em evidências para o estudo e prática da acupuntura (FILSHIE; WHITE; CUMMINGS, 2016). Em concordância, diversas pesquisas não-clínicas e clínicas mostram que o tratamento com acupuntura ativa múltiplos sistemas regulatórios no organismo, promovendo efeitos locais e sistêmicos. Tais efeitos são evidenciados por mudanças celulares, bioquímicas e fisiológicas no local de inserção da agulha (biomodulação), pela ativação de áreas do SNC e do sistema nervoso autônomo (SNA) (neuromodulação) e por mudanças na atividade de circuitos neurais relacionados a respostas psicológicas, como o estado emocional e o comportamento, e a funções encefálicas superiores (psiconeuromodulação) (QUIROZ-GONZÁLEZ et al., 2019).

Os estudos referentes aos efeitos biomodulatórios da acupuntura têm tido considerável avanço. Há evidências de que as mudanças envolvidas na manipulação e estimulação local da agulha de acupuntura tenham um papel crucial no desencadeamento dos efeitos clínicos da acupuntura (PARK et al., 2014; HUANG et al., 2018; TAN et al., 2019). Langevin e cols. sugeriram que quando a agulha de acupuntura é inserida no tecido subcutâneo e em seguida rotacionada, são observadas mudanças morfológicas nos fibroblastos e no tecido conjuntivo frouxo subcutâneo, eventos que estão envolvidos no remodelamento do citoesqueleto (LANGEVIN et al., 2006). Essas mudanças são o início do processo de mecanotransdução, em que células são recrutadas para o local de inserção da agulha (acuponto) e receptores sensoriais e fibras aferentes são ativadas, as quais vão transmitir o estímulo da periferia ao SNC por meio de diferentes mecanismos humorais e neurofisiológicos, desencadeando, assim, os efeitos sistêmicos da acupuntura (QUIROZ-GONZÁLEZ et al., 2019).

Trento e cols. (2021), em recente revisão integrativa a respeito de neuromediadores e receptores periféricos envolvidos no efeito anti-hiperaglético da

acupuntura, observaram a correlação do efeito anti-hiperalgésico da acupuntura com dez famílias de receptores periféricos (opioide, adenosinérgico, canabinoide, adrenérgico, muscarínico, TRPV, receptores para histamina, fator liberador da corticotrofina, IL-1 e endotelina) e oito tipos de neuromediadores (peptídeos opioides, adenosina, histamina, SP, CGRP, anandamida, NO e NA). Interessantemente, os autores ressaltam que os efeitos periféricos da acupuntura sobre os neuromediadores e os receptores diferem quando se compara a região do acuponto e a região lesionada do tecido somático (região da hiperalgesia). Nesse sentido, na região do acuponto, destacam-se os receptores para adenosina, histamina, adrenalina e TRPV na sinalização da acupuntura; e os neuromediadores adenosina, histamina, SP, CGRP, NO e NA liberados na região do acuponto têm influência no efeito anti-hiperalgésico da acupuntura. Considerando os receptores na região lesionada do tecido somático, destacam-se os receptores opioides, canabinoides, adenosinérgicos, muscarínicos e receptores para fator liberador de corticotrofina, para IL-1 e para endotelina. Com relação aos neuromediadores, tem-se os peptídeos opioides beta-endorfina, meta-enkefalina e dinorfina, e o endocanabinoide anandamida, evidenciando, portanto, que a sinalização periférica mediada por esses receptores e neuromediadores é parte essencial do efeito anti-hiperalgésico da acupuntura (TRENTO et al., 2021).

Zhang e cols. verificaram que a acupuntura provocou a agregação e degranulação de mastócitos nos acupontos e correlacionaram esses eventos ao efeito analgésico da acupuntura, uma vez que a inibição da degranulação dessas células atenuou significativamente o efeito analgésico promovido pela terapia (ZHANG et al., 2008). Goldman e cols. (2010) demonstraram que a acupuntura manual no acuponto ST36, durante 30 minutos (min), induziu a liberação de ATP e adenosina, um neuromodulador com propriedades antinociceptivas, no local de inserção da agulha. Também foi constatado que a administração de um agonista para receptores A1 adenosinérgicos no acuponto ST36 replicou o efeito analgésico promovido pela acupuntura (GOLDMAN et al., 2010), sugerindo a importância da adenosina e do acuponto ST36 no efeito da terapia.

Um dos efeitos mais bem caracterizados da EA é a liberação de opioides endógenos (LIN; CHEN, 2008; ZHANG et al., 2014). Um estudo com modelo animal de dor nociceptiva inflamatória induzida por carragenina demonstrou que a injeção

i.pl. do antagonista opioide naloxona ou de antagonistas seletivos para receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  ou  $\kappa$  bloquearam de maneira dose dependente os efeitos da EA na hiperalgesia mecânica (TAGUCHI; TAGUCHI; KITAKOJI, 2010). Além disso, a administração i.pl. de naloxona e de um anticorpo anti- $\beta$ -endorfina suprimiu o efeito da EA na hiperalgesia térmica em modelo animal de dor inflamatória induzida pelo CFA (ZHANG et al., 2005). Esses dados sugerem que a EA induz a liberação de opioides endógenos no tecido inflamado, e os opioides, por sua vez, ativam receptores nos terminais dos nervos periféricos, diminuindo a transmissão nociceptiva (ZHANG et al., 2014).

Um dos parâmetros de estimulação elétrica que pode ser controlada na EA é a frequência, sendo que a estimulação de baixa frequência fica entre 1 a 50 Hz e a de alta frequência a partir de 100 Hz (CHENG et al., 2012). Diante disso, observou-se que a variação das frequências de eletroestimulação na EA mobiliza diferentes respostas fisiológicas (HAN, 2003). A analgesia induzida pela EA de baixa frequência estimula a liberação de  $\beta$ -endorfinas, encefalinas e endomorfina, as quais se ligam aos receptores opioides  $\mu$  e/ou  $\delta$ . Já a analgesia induzida pela EA de alta frequência estimula a liberação de dinorfina e é mediada por receptores opioides  $\kappa$ , evidenciando, portanto, que o mecanismo de ação da EA é frequência dependente (LIN; CHEN, 2008).

Os efeitos neuromodulatórios da acupuntura têm sido os mais estudados. Esses efeitos estão associados à ativação de interneurônios inibitórios a nível espinal e ao envolvimento de diversas estruturas supraespinais (PAG, LC, NMR, bulbo rostral, hipotálamo, entre outros) e neurotransmissores e seus respectivos receptores que participam das vias inibitórias descendentes (LUNDEBERG; LUND, 2016; LV et al., 2019). Pesquisas recentes têm focado no efeito anti-inflamatório e analgésico da acupuntura e evidenciam que a terapia é capaz de influenciar a liberação, síntese, recaptção e degradação de neurotransmissores/moduladores no SNC, incluindo peptídeos opioides, monoaminas, ACh, adenosina, endocanabinoides, amino ácidos, SP, PGs, colecistoquinina octapeptídeo, entre outros (ZHAO, 2008; WEN et al., 2010; ZHANG et al., 2014; LI et al., 2019).

Estudos utilizando o modelo de CFA, modelo utilizado neste estudo, têm demonstrado os efeitos anti-hiperalgésico e anti-inflamatório da EA. Em estudo

anterior, demonstramos que o tratamento com EA (2 e 10 Hz) nos acupontos ST36 e SP6, por 20 min., reduziu a hiperalgesia mecânica na fase precoce e tardia da dor nociceptiva inflamatória induzida pelo CFA (VIEIRA et al., 2021). Lu e cols. (2016) demonstram que o tratamento com EA (2Hz) no acuponto ST36, por 30 min., diminuiu a expressão de canais TRPV1 na medula espinal e no CPME e reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica após a administração de CFA. Liao e cols., (2017) verificaram que o tratamento com EA (2 Hz), no acuponto ST36, por 15 min, reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica e térmica via ativação de receptores opioides e receptores A1 adenosinérgicos.

A EA também apresenta efeitos sobre a concentração de citocinas. Já foi demonstrado que animais tratados com EA apresentaram uma diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 (SU et al., 2012). Recentemente, Yu e cols. (2020) verificaram que o tratamento com a EA (2 e 100 Hz) nos acupontos ST36 e SP6, por 20 min., reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica, aumentou significativamente a produção e a liberação de IL-10 no tecido da pata e reduziu a produção e a liberação de TNF e IL-1 $\beta$ . Esses achados sugerem que o efeito anti-hiperalgésico e anti-inflamatório da EA pode estar parcialmente associado à inibição de citocinas pró-inflamatórias mediada pela indução de IL-10 (YU et al., 2020), evidenciando o efeito da EA sobre a concentração de citocinas inflamatórias.

Em outro importante estudo, Liu e cols. contribuíram para a base neuroanatômica da prática da acupuntura demonstrando que o tratamento com a EA é capaz de ativar vias de sinalização autonômicas distintas e modular a inflamação em camundongos com inflamação sistêmica induzida por LPS. Verificou-se que o tratamento com EA (10 Hz, 0,5 mA) no acuponto ST36, por 15 min., após a indução da inflamação por LPS, ativou o eixo nervo vago-glândula adrenal e induziu a liberação de dopamina por células cromafins da glândula adrenal, diminuindo os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  e aumentando significativamente a taxa de sobrevivência dos animais tratados com a EA quando comparado aos animais não tratados. Interessantemente, os pesquisadores observaram que o eixo nervo vago-adrenal foi ativado quando a estimulação de baixa intensidade foi feita no acuponto ST36 (músculo tibial anterior, nervo fibular), mas não foi ativado quando a

estimulação foi aplicada no acuponto ST25, localizado na região abdominal (LIU et al., 2020).

Há evidências de que a acupuntura também apresente efeitos sobre o estresse oxidativo. Em pesquisa recente, Alvarado-Sanchez e cols. (2019) demonstraram que o tratamento com EA reduziu o estresse oxidativo, diminuindo significativamente os níveis do radical hidroxila e de peroxidação lipídica em ratos com lesão na medula espinal. No entanto, não houve mudanças significativas na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Em estudos com modelos animais de lesão de isquemia e reperfusão, o tratamento com EA aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx), controlou a geração de ROS (reduzindo a expressão de subunidades da NOX) e reparou danos causados por espécies reativas a lipídios, proteínas e ao DNA (CHEN; HSIEH, 2020). Os parâmetros de tratamento com a EA, os acupontos utilizados e os modelos animais variaram entre os estudos, porém o tratamento com EA mostrou-se benéfico para o controle do estresse oxidativo.

### **1.2.3 Acupuntura, resolução da inflamação e o receptor FPR2/ALX**

Como exposto, durante o processo de resolução da inflamação o organismo produz mediadores pró-resolutivos especializados que vão atuar na redução da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado, na contrarregulação de quimiocinas e citocinas, na indução de apoptose de neutrófilos, na remoção desses neutrófilos apoptóticos e de detritos celulares pelos macrófagos e na mudança de fenótipo dos macrófagos do perfil M1 para M2, eventos fundamentais para o reestabelecimento da homeostase tecidual (SERHAN, 2014; SERHAN et al., 2020). Nesse sentido, há evidências de que o tratamento com a acupuntura desencadeie efeitos similares aos produzidos pela ativação do receptor FPR2/ALX por mediadores pró-resolutivos como a LXA<sub>4</sub> e a AnxA1.

Tem sido demonstrado que o tratamento com EA promove a apoptose de neutrófilos e diminui a liberação de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 por monócitos em modelo de colite ulcerativa (WU et al., 2007), além de diminuir a expressão do mRNA da COX2 na microglia espinal em modelo animal de dor neuropática (JI et al., 2016). Da Silva e cols., utilizando um modelo de dor nociceptiva inflamatória induzida por carragenina,

demonstraram o efeito do tratamento com acupuntura no acuponto SP6 na mudança de fenótipo de macrófagos. O tratamento com a acupuntura manual, além de reduzir o edema e a hiperalgesia mecânica e térmica (calor), aumentou a concentração de IL-10 tecidual e induziu a mudança de fenótipo dos macrófagos do tecido muscular, diminuindo o número de macrófagos M1 (perfil pró-inflamatório) e aumentando o de M2 (perfil anti-inflamatório/pró-resolutivo) (DA SILVA et al., 2014). Esses estudos corroboram a hipótese da ação pró-resolutiva da acupuntura.

Além disso, e avançando na compreensão desse efeito pró-resolutivo da EA, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a EA de baixa frequência (2 e 10Hz) nos pontos SP6 e ST36, por 20 min. reduziu, de maneira dose dependente, a hiperalgesia mecânica e que esse efeito é prevenido pelo antagonista seletivo (WRW4) para o receptor FPR2/ALX administrado perifericamente em modelo animal de CFA. No mesmo estudo também foi mostrado que o grupo de animais tratados com a EA apresentou um aumento no imunoconteúdo de AnxA1 na pata, mas não do imunoconteúdo do FPR2/ALX. Ademais, o pré-tratamento com WRW4 preveniu o aumento dos níveis de AnxA1 induzido pela EA, evidenciando, portanto, que o efeito anti-hiperalgésico da EA mobiliza a via Anxa1-FPR2/ALX (VIEIRA et al., 2021). Nesse sentido, essas evidências da literatura demonstram uma ação pró-resolutiva da EA mediada pela ativação do receptor FPR2/ALX.



## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando as abordagens não-farmacológicas para o manejo da dor e da inflamação, há um corpo robusto de evidências científicas reunidas em diversos estudos não-clínicos, clínicos e revisões sistemáticas, comprovando a eficácia e a segurança da acupuntura (JIANG et al., 2021; ZHANG et al., 2019; VICKERS et al., 2018). Com o avanço do conhecimento científico básico sobre a acupuntura e a elucidação dos seus mecanismos periférico, espinal e supraespinal, a acupuntura se tornou uma das práticas integrativas e complementares mais estudadas e aceitas em todo o mundo (MOREÉ et al., 2021). Contudo seus mecanismos de ação ainda precisam ser mais bem elucidados (HUANG et al., 2018; YEN et al., 2019), e a pesquisa experimental básica é essencial para isso. A pesquisa experimental com a EA, utilizando modelos animais (como o modelo de CFA) que reproduzem aspectos fisiopatológicos da dor nociceptiva inflamatória em humanos têm demonstrado resultados importantes no campo da acupuntura (LIAO et al., 2017a; HUANG et al., 2018; TRENTO et al., 2021).

As ações anti-hiperalgésica, anti-inflamatória e antioxidante da EA estão relacionadas à liberação de mediadores anti-inflamatórios (LIU et al., 2020) e pró-resolutivos (VIEIRA et al., 2021), à diminuição na liberação de citocinas pró-inflamatórias (YU et al., 2020) e à redução do estresse oxidativo (ALVARADO-SANCHEZ et al., 2019; CHEN; HSIEH, 2020), com a possível ativação do receptor FPR2/ALX e suas vias pró-resolutivas. O nosso grupo de pesquisa tem avançado no conhecimento acerca do mecanismo analgésico (MAZZARDO-MARTINS et al., 2018) e pró-resolutivo (VIEIRA et al., 2021) da EA, de forma que demonstramos pela primeira vez o papel do receptor FPR2/ALX na ação anti-hiperalgésica dessa terapia. No entanto, o papel desse receptor no efeito da EA sobre parâmetros inflamatórios, como a concentração de citocinas inflamatórias, e parâmetros oxidativos e de defesa antioxidante não tem sido explorado.

Diante disso, e considerando os efeitos anti-inflamatório e pró-resolutivo da ativação do receptor FPR2/ALX e todo o potencial da EA, é importante compreender os mecanismos subjacentes aos efeitos da EA. Dessa forma, buscamos correlacionar os efeitos da EA com a ativação do receptor FPR2/ALX. Assim, o presente estudo se

propôs a investigar a hipótese do envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico na ação anti-hiperalgésica da EA sobre parâmetros inflamatórios em um modelo animal de inflamação periférica persistente induzida por CFA.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel do receptor FPR2/ALX na anti-hiperalgesia induzida pela EA de baixa frequência sobre parâmetros inflamatórios em camundongos com inflamação periférica persistente.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar o envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA de baixa frequência em camundongos com inflamação persistente na pata sobre os seguintes parâmetros inflamatórios:

- Hiperalgesia mecânica;
- Concentrações teciduais de citocinas;
- Atividade da enzima mieloperoxidase;
- Parâmetros de dano oxidativo;
- Parâmetros de defesa antioxidante.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC) e aprovada sob o número de protocolo 2228260819 (ANEXO A). Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx) – Campus Universitário Grande Florianópolis, Unidade Pedra Branca, da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), e conduzidos de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito do tratamento, respeitando o princípio dos 3R's - substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*) (NC3Rs, 2019) - e os aspectos éticos da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino e de Pesquisa Científica – DBCA (BRASIL, 2016). Além disso, procurou-se seguir as recomendações do guia ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) para estudos com animais (PERCIE et al., 2020), com o intuito de conduzir e descrever esta pesquisa de maneira completa e transparente.

O número de animais (n) em cada grupo experimental foi determinado com base em estudos anteriores conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa para amostras sem reposição, com o valor de alfa fixado em 0,05 e poder estatístico de 0,8 (DANIEL; CROSS, 2013). Dessa forma, foram necessários 14 animais na 1ª etapa dos experimento e 40 animais na 2ª etapa. Para obter a quantidade necessária de amostras para as análises bioquímicas, foram realizadas quatro réplicas da 2ª etapa. Assim, para este estudo, foram necessários um total de 174 camundongos.

### 4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* machos da espécie *Mus musculus*, pesando entre 30 e 40 gramas, com idade entre 45 e 60 dias, provenientes do Biotério Central da UFSC, Campus Florianópolis, SC. No biotério da Unisul, os animais foram alojados em gaiolas coletivas de plástico

fornadas com maravalha e deixados em ambiente climatizado a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , no ciclo claro/escuro de 12 horas (claro 07h00/escuro 19h00), com acesso livre à água e ração (Presence® para ratos e camundongos). Pelo menos uma semana antes da realização dos experimentos, os animais foram ambientados na sala de experimentação animal do LaNEx e, no dia dos experimentos, os animais foram randomicamente alocados entre os grupos e ambientados na sala de experimentação por pelo menos 1h antes do início dos experimentos.

#### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliar o papel do receptor FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico da EA de baixa frequência em camundongos com inflamação periférica, os experimentos foram conduzidos nas seguintes etapas:

1ª ETAPA: Avaliação da administração i.pl. de WRW4 na dose de  $6\mu\text{g/sítio}$  sobre o efeito anti-hiperalgésico do tratamento com a EA.

Estudos anteriores conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a administração i.pl. de WRW4 na dose de  $10\mu\text{g/sítio}$ , mas não de  $3\mu\text{g/sítio}$ , em camundongos com inflamação na pata induzida pelo CFA foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo tratamento com a EA no primeiro e no quinto dia após a injeção do CFA (VIEIRA et al., 2021). Neste sentido, foi conduzido um estudo piloto com o intuito de avaliar o efeito da administração i.pl. de WRW4 na dose de  $10\mu\text{g/sítio}$  sobre a concentração de citocinas inflamatórias no efeito anti-hiperalgésico do tratamento com a IA. Os achados desse estudo piloto mostraram que a administração i.pl. de WRW4 na dose de  $10\mu\text{g/sítio}$  teve um efeito *per se* na concentração das citocinas.

Diante desses achados, procurou-se determinar se a administração i.pl. de WRW4 na dose de  $6\mu\text{g/sítio}$  poderia prevenir o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo tratamento com a EA em camundongos com inflamação na pata induzida pelo CFA. Para tanto, 14 animais animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais:

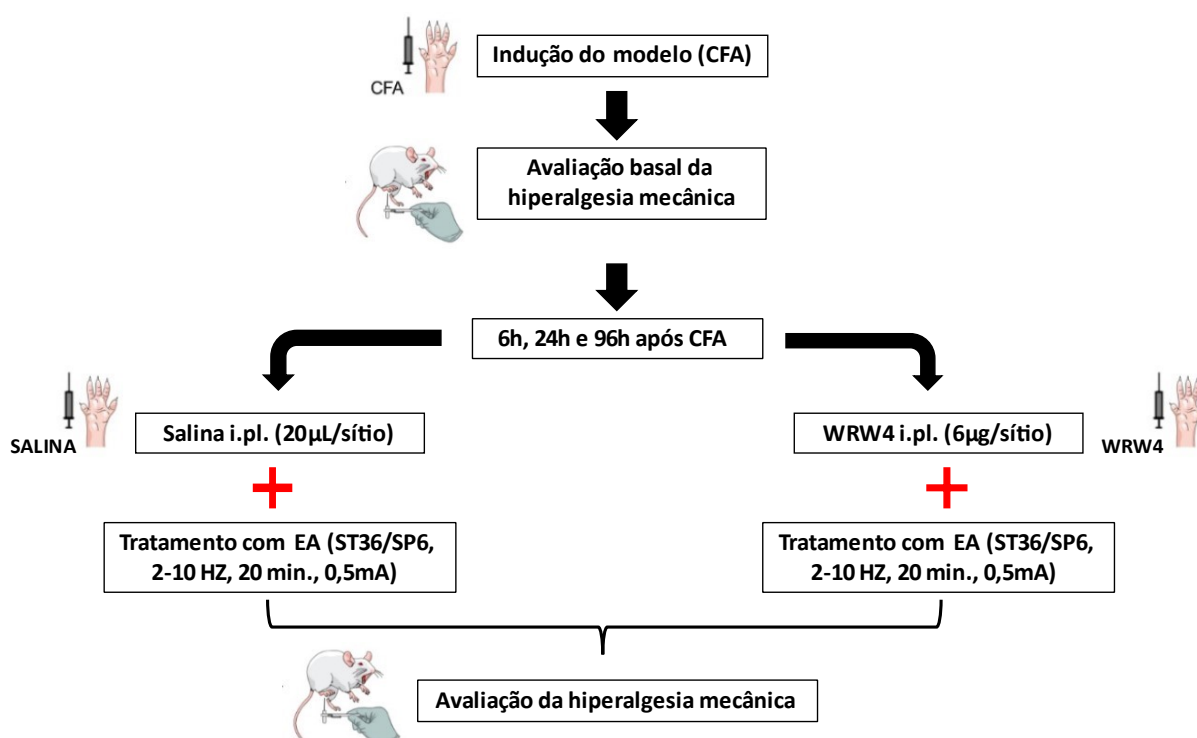
- Grupo A: Salina + EA (n=7): animais que receberam injeção i.pl. de CFA, foram pré-tratados com solução salina e receberam o tratamento com a EA (item 4.4).

- Grupo B: WRW4 + EA (n=7): animais que receberam injeção i.pl. de CFA, foram pré-tratados com o antagonista (WRW4) para o receptor FPR2/ALX e receberam o tratamento com a EA (item 4.4).

Após a indução do modelo e antes do tratamento com a EA, os animais foram avaliados quanto à hiperalgesia mecânica pelo teste de von Frey (item 4.5.1) para a caracterização da resposta basal. Esses valores foram utilizados como controle (EA *Sham*) nesta etapa.

Os animais do Grupo B foram pré-tratados com WRW4 i.pl. na dose de 6µg/sítio, nos tempos 6h, 24h e 96h após a injeção do CFA. Os animais do Grupo A foram pré-tratados com salina (20 µL/sítio). Quinze minutos após a administração de WRW4 ou salina, os animais receberam o tratamento com EA. A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada 30 min. após os tratamentos. A fig. 2 apresenta o desenho experimental da 1ª etapa de experimentos.

Figura 2 - Desenho experimental da 1ª etapa



Legenda: EA = eletroacupuntura; ST36 e SP6 = acupontos; CFA = Adjuvante Completo de Freund; WRW4 = antagonista para o receptor FPR2/ALX; i.pl. = intraplantar  
Fonte: A autora (2021).

2ª ETAPA: Avaliação do papel do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA de baixa frequência sobre parâmetros inflamatórios em camundongos com inflamação periférica persistente.

Após a avaliação da administração de WRW4 i.pl. na dose de 6µg/sítio sobre o efeito anti-hiperalgésico do tratamento com a EA, iniciou-se a 2ª etapa.

Para a condução dos experimentos desta etapa, um total de 40 animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo 1: Naive (n=6): animais que não sofreram intervenção.
- Grupo 2: CFA (n=6): animais que receberam injeção i.pl. de CFA e não foram submetidos a nenhuma forma de tratamento.
- Grupo 3: Salina + EA *Sham* (n=7): animais que receberam injeção i.pl. de CFA, foram pré-tratados com solução salina e foram agulhados nos acupontos ST36 e SP6 sem estimulação com corrente elétrica (aparelho de EA desligado).
- Grupo 4: Salina + EA (n=7): animais que receberam injeção i.pl. de CFA, foram pré-tratados com solução salina e receberam o tratamento com a EA.
- Grupo 5: WRW4 + EA *Sham* (n=7): animais que receberam injeção i.pl. de CFA, foram pré-tratados com o antagonista (WRW4) para o receptor FPR2/ALX e foram agulhados nos acupontos ST36 e SP6 sem estimulação com corrente elétrica (aparelho de EA desligado).
- Grupo 6: WRW4 + EA (n=7): animais que receberam injeção i.pl. de CFA, foram pré-tratados com o antagonista WRW4 e receberam o tratamento com a EA.

Nos três dias que antecederam a indução do modelo, os animais foram ambientados na sala de experimentação. Para tanto, seguiu-se o mesmo protocolo descrito no item 4.5.1, porém foi utilizado o filamento de von Frey de 0,02g. No dia anterior à indução do modelo, os animais foram submetidos ao teste de von Frey (item 4.5.1) para a caracterização da resposta basal (Dia -1). Vinte e quatro horas após a caracterização basal, os animais receberam a injeção i.pl. de CFA (Dia 0).

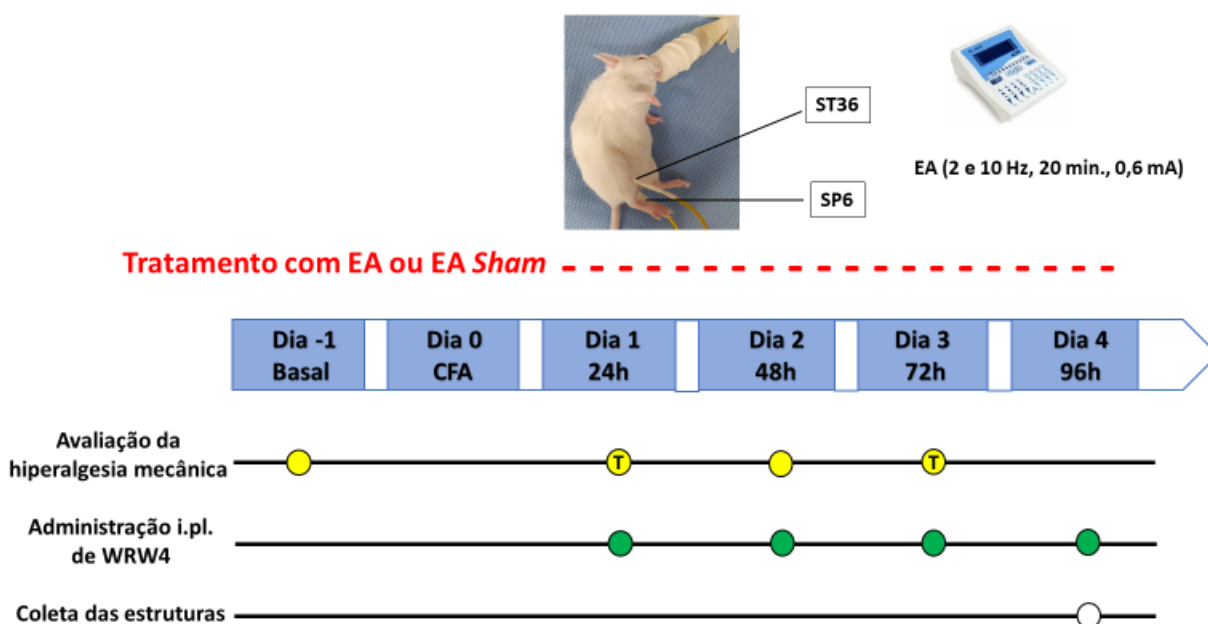
Com o intuito de avaliar o envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA, os camundongos foram pré-tratados com salina (20 µL/sítio/i.pl.) ou WRW4 (6µg/20 µL/i.pl.) nos tempos 24h (Dia 1), 48h (Dia 2), 72h (Dia

3) e 96h (Dia 4) após a injeção de CFA. Em seguida, a hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 min. após os tratamentos com EA ou EA *Sham* no primeiro, no segundo e no terceiro dia após a administração de CFA. Além disso, no primeiro e no terceiro dia após a injeção de CFA, foi feita a análise do decurso temporal (T) do efeito anti-hiperalgésico da EA.

Por fim, no quarto dia após a injeção de CFA, os animais foram pré-tratados com salina ou com WRW4 e foram submetidos ao tratamento com EA ou EA *Sham*; 30 min. após o tratamento foi realizada a morte indolor assistida (MIA) (item 4.6) dos animais e a coleta das estruturas de interesse para as análises bioquímicas.

A fig. 3 apresenta o desenho experimental da 2ª etapa de experimentos, ilustrando os dias em que os animais receberam a injeção i.pl. de CFA, avaliados quanto à hiperalgesia mecânica (von Frey), tratados com EA/EA *Sham* e submetidos à MIA para a coleta das estruturas.

Figura 3 - Desenho experimental da 2ª etapa



Legenda: EA = eletroacupuntura; ST36 e SP6 = acupontos; CFA = Adjuvante Completo de Freund; T = *time course* (decurso temporal – avaliação realizada até 2h após o tratamento com EA).  
Fonte: A autora (2021).



### 4.3 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA

Nesta pesquisa foi utilizado o modelo animal de inflamação periférica persistente induzida pelo CFA. Para a indução do modelo foi realizada a administração i.pl. de CFA (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) a 50%, dissolvido em solução salina 0,9% e Tween®80. Cada animal recebeu 20µL dessa solução na superfície plantar da pata posterior direita (fig. 4).

Figura 4 - Indução da inflamação periférica com CFA



Legenda: Indução da inflamação pela injeção i.pl. de CFA na pata posterior direita do camundongo.  
Fonte: A autora (2021).

### 4.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM EA

Os procedimentos experimentais realizados para o tratamento com a EA foram conduzidos segundo estudos anteriores (MAZZARDO-MARTINS et al., 2018; VIEIRA et al., 2021). Os animais foram levemente sedados com 1-2% de isoflurano a 100% de O<sub>2</sub> (fig. 5, painel A) aplicado por meio de uma máscara nasal adaptada para camundongos (fig. 5, painel B). Em seguida, uma agulha de acupuntura 0,18 mm de diâmetro x 8 mm de comprimento (Dux Acupuncture) foi inserida no acuponto ST36,

penetrando as fibras do músculo tibial anterior, e outra, no acuponto SP6, penetrando as fibras do músculo flexor longo dos dedos, ambos os pontos localizados do lado ipsilateral à pata submetida à injeção do CFA (MAZZARDO-MARTINS et al., 2018). A profundidade com que as agulhas foram inseridas foi de, aproximadamente, 2 mm. Cada agulha estava presa a um cabo conectado ao aparelho de EA (modelo NKL EL-608 - NKL produtos eletrônicos LTDA, Brusque, SC, Brasil) (fig. 5, painel C). Os parâmetros de estímulo da EA foram: morfologia do pulso assimétrico balanceado, frequência alternada (F1 = 2 Hz, pulso 0,7 ms, 5 s de estimulação; F2 = 10 Hz, pulso 0,2 ms, 5 s de estimulação), tempo total de estimulação 20 min. e alternando os polos positivo e negativo dos eletrodos. Para todos os animais, a intensidade da corrente utilizada foi padronizada em 0,6 mA, sendo aumentada gradativamente para que fosse observada uma leve contração do músculo tibial anterior (ST36) e do músculo flexor longo dos dedos (SP6). Os animais dos grupos EA *Sham* foram igualmente sedados com isoflurano e agulhados nos pontos ST36 e SP6, porém não houve a estimulação das agulhas com corrente elétrica (aparelho de EA desligado).

Os animais permaneceram levemente sedados com isoflurano durante todo o período de tratamento. Em estudos com modelos animais envolvendo a EA, o isoflurano é o sedativo mais comumente utilizado (ADACHI et al., 2018). Optou-se pela sedação dos animais, pois o tratamento com a EA em animais acordados, juntamente com a contenção e a manipulação, são considerados estímulos estressores e, portanto, podem influenciar na resposta dos animais e no resultado do tratamento (WEN et al., 2007).

O tratamento com a EA foi realizado 24h, 48h, 72h e 96h após a administração de CFA, totalizando, portanto, 4 dias de tratamento. Após o término de cada tratamento, as agulhas foram retiradas e os animais colocados em compartimentos individuais, ficando em observação até se recuperarem dos efeitos da sedação. Por fim, 30 min. após os tratamentos, os animais foram avaliados quanto à hiperalgesia mecânica (24h, 48h, 72h após o CFA) ou encaminhados para a coleta das estruturas (96h após o CFA).

O tratamento com a EA foi realizado por apenas uma pesquisadora, habilitada em Acupuntura e em Cuidados e Manejo de Animais de Experimentação e devidamente capacitada para a realização dos procedimentos. A avaliação da

hiperalgesia mecânica foi conduzida por outra pesquisadora experiente e igualmente habilitada em Cuidados e Manejo de Animais de Experimentação.

Figura 5 - Equipamentos utilizados no tratamento



Legenda: Equipamento com entrada para oxigênio e isoflurano (painel A); animais sedados com isoflurano aplicado por meio de máscara nasal adaptada para camundongos (painel B); equipamento de eletroacupuntura NKL EL-608 (painel C).  
Fonte: A autora (2021).

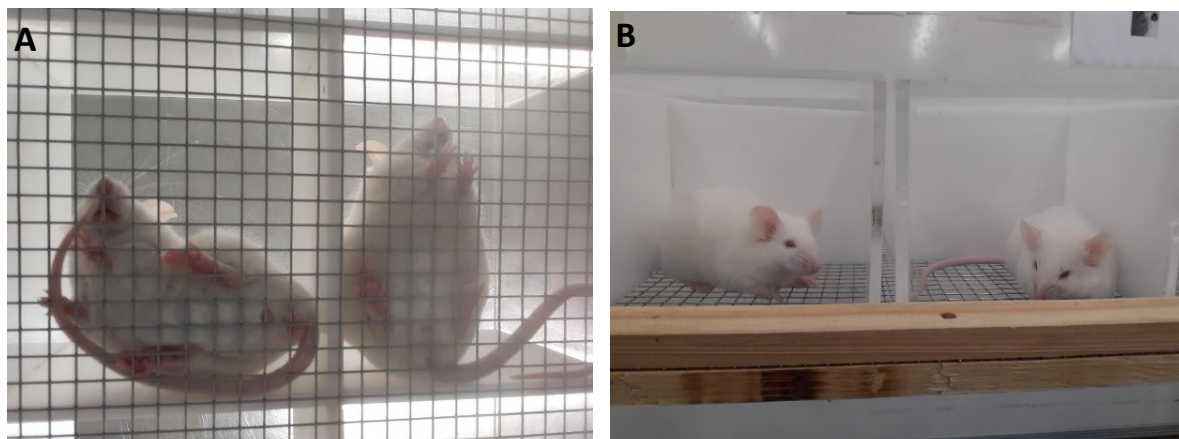
## 4.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

### 4.5.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada por meio do teste de von Frey e, para tanto, foi utilizado um monofilamento de von Frey de carga 0,6g (MAZZARDO-MARTINS et al., 2018). Para a aplicação do teste, os animais foram colocados individualmente em um compartimento de acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e tampado, posicionado sobre uma plataforma de tela de arame (70 x 40 cm) com malha de 6 milímetros (mm) (fig. 6, painel A). O monofilamento de von Frey foi aplicado na superfície plantar da pata posterior direita do animal (pata que recebeu a injeção do CFA), atendendo aos seguintes critérios: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do monofilamento, obtendo-se assim pressão total. Além disso, a avaliação foi feita quando os animais estavam acordados e com as quatro patas acomodadas sobre a tela de arame (fig. 6, painel B); a resposta de retirada da pata foi considerada positiva quando o animal removia totalmente a pata da tela de apoio. Os valores percentuais referentes a frequência de retirada da pata frente a 10 estimulações da pata posterior direita com o monofilamento de von Frey, foram considerados como indicativo de hiperalgesia mecânica.

Para a caracterização da resposta basal, o teste de von Frey (0,6g) foi realizado no dia anterior (Dia -1) à indução do modelo de CFA. Apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta de 20% ou menos foram selecionados. A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada após a indução do modelo do primeiro ao terceiro dia após a injeção de CFA (24h, 48h, 72h após CFA). Além disso, no primeiro e no terceiro dia após a indução do modelo, foi feita a análise do decurso temporal do efeito anti-hiperalgésico da EA, de forma que os animais foram avaliados 0,5h, 1h e 2h após o tratamento com a EA.

Figura 6 - Estrutura para avaliação da hiperalgesia mecânica



Legenda: Animais em compartimentos individualizados de acrílico sem fundo e tampado, posicionado sobre plataforma de tela de arame para avaliação da hiperalgesia mecânica. Vista inferior (painel A) e vista frontal (painel B).  
Fonte: A autora (2021).

#### 4.5.2 Avaliação do papel do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA

Com o objetivo de avaliar o envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA, os animais foram pré-tratados com o antagonista seletivo para o receptor FPR2/ALX (WRW4 - 6 $\mu$ g/20 $\mu$ L/i.pl.) nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h após a injeção do CFA. Os grupos controles foram pré-tratados com salina (20  $\mu$ L/i.pl.). Quinze minutos após a administração do WRW4 ou salina, os animais receberam o tratamento com EA ou EA *Sham*, conforme descrito no item 4.4. A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada 30 min. após os tratamentos, do primeiro ao terceiro dia após a injeção do CFA.

#### 4.6 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Para a realização dos experimentos bioquímicos, os animais foram submetidos ao regime de tratamento descrito no item 4.5.2. No quarto dia após a injeção do CFA, 30 min. após o tratamento com a EA, os animais foram submetidos à MIA. Em seguida,

amostras de tecido da pele da pata e do músculo da pata posterior direita dos animais foram coletadas e armazenadas a -80°C para análises bioquímicas.

#### **4.6.1 Avaliação do papel do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre parâmetros inflamatórios**

##### *4.6.1.1 Avaliação da concentração tecidual de citocinas inflamatórias*

Foram analisadas as concentrações das citocinas pró-inflamatórias, TNF e IL-6, e anti-inflamatórias, IL-10 e IL-4. A avaliação da concentração tecidual de citocinas foi realizada por meio do método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*).

As amostras de tecido foram homogeneizadas com salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzetônio (0,1 mM). O homogenato foi centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm), durante 10 min. a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C para posterior análise (MARTINS et al., 2016). O conteúdo proteico total foi mensurado do sobrenadante pelo método de Bradford. Alíquotas de 100 µl da amostra foram utilizadas para mensurar a concentração tecidual de TNF, IL-6, IL-10 e IL-4 por meio de Kits de ELISA (R&D Systems, EUA) para mensuração de citocinas em camundongos, de acordo com instruções do fabricante. Os valores obtidos foram estimados por meio da interpolação de uma curva padrão, utilizando-se ensaio colorimétrico, medido a 450 nanômetros (nm) (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um leitor de placas de ELISA. Assim todos os resultados foram expressos em picogramas de citocinas por miligrama de proteína.

##### *4.6.1.2 Avaliação da atividade da enzima MPO*

O indicativo de infiltrado de neutrófilo foi avaliado por meio da atividade da enzima MPO (DE YOUNG et al., 1989). As amostras foram homogeneizadas em brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% e centrifugado a 15.000 rpm por 40 min.

Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com uma solução de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM). A atividade da MPO foi medida por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 650 nm a 37°C. Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína.

#### 4.6.1.3 *Avaliação dos parâmetros de dano oxidativo e defesa antioxidante*

A quantificação das análises de dano oxidativo sobre lipídios, dano oxidativo sobre proteínas, análise da relação da concentração de nitrito/nitrato e atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD foram realizadas por espectrofotômetro (Hitachi 650-40, Tóquio, Japão) de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as mensurações bioquímicas foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas com albumina bovina como padrão, de acordo com o método descrito por Lowry e cols., baseado na reação de Folin-Ciocalteu (LOWRY et al., 1951). A leitura das mensurações de proteínas foi realizada em leitor de microplacas por absorbância, expressas em nmol/mg de proteína.

#### 4.6.1.4 *Avaliação do dano oxidativo sobre lipídios*

A avaliação do dano oxidativo sobre lipídios (peroxidação lipídica) foi realizada por meio da análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *thiobarbituric acid reactive substances*) (DRAPER; HADLEY, 1990). Em tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas de 100 µl da amostra a ser analisada, ácido tricloroacético (TCA) (12%), tampão tris-HCl (60mM) e ácido tiobarbitúrico (0,73%). Os tubos foram, então, fervidos por 1 hora em banho fervente e, em seguida, resfriados por 15 min. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado para análise. Dessa forma, a análise das TBARS foi determinada pela absorbância a 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de MDA por miligrama de proteína (nmol/mg) (MARTINS et al., 2016).

#### 4.6.1.5 *Avaliação do dano oxidativo sobre proteínas*

Para avaliar o dano oxidativo sobre proteínas foi analisada a carbonilação proteica por meio da determinação de grupos carbonil baseada na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH) (LEVINE et al., 1994). As amostras foram homogeneizadas em 5% de ácido sulfossalicílico gelado e centrifugadas a 15000 rpm por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e aos precipitados foi adicionado 0,5 ml de DNPH (10 mM em 2 M de HCl). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 1h, sendo vigorosamente agitadas a cada 15 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de TCA (20%) aos tubos, os quais foram agitados e centrifugados por 6 min. a 15000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e o excesso de DNPH foi removido lavando-se os precipitados por 3 vezes com uma solução de etanol: acetato de etila (1:1). Em seguida, os tubos foram centrifugados por 3 min. a 15000 rpm. Os precipitados resultantes foram dissolvidos em 1,0 mL de cloreto de guanidina (6 M), submetidos à agitação e incubados por 15 min. a 37°C, para dissolução. As absorbâncias máximas no intervalo de 360-370 nm foram determinadas, e os valores finais das proteínas carboniladas foram determinados utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 mM. Os brancos foram preparados substituindo a DNPH por HCl 2M. Os resultados foram expressos em concentração de proteínas carboniladas/mg de proteína.

#### 4.6.1.6 *Avaliação da concentração nitrito/nitrato*

A concentração de nitrito/nitrato foi mensurada por meio da técnica da reação de Griess (GREEN et al., 1982). Adicionou-se 100 µL de reagente de Griess 0,1% (w/v) em H<sub>2</sub>O e 1% (w/v) de sulfanilamida em 5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado, vol. [1:1] para 100 µL da amostra. A concentração de nitrito/nitrato foi avaliada por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.



#### 4.6.1.7 *Determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD*

Para determinar a atividade da enzima CAT, foi analisada a taxa de decaimento da absorbância do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, determinada por espectrofotômetro em 240 nm, conforme descrito por Aebi (1984). Uma solução fresca de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10mM) em tampão fosfato (50mM, pH 7,0) foi preparada no dia da análise. A 2 mL dessa solução foi adicionado 20 µL do lisado. A suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi coletado para a análise. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em U/mg proteína.

A atividade da enzima SOD foi determinada de acordo com o método descrito por Misra e Fridovich (1972) e modificado por Boveris (1984), que se baseia na formação de um cromóforo rosa, denominado adrenocromo, durante a oxidação da adrenalina promovida pelo ânion superóxido em pH alcalino. Em uma cubeta contendo 1,95 ml de tampão glicina (50 mM, pH 10,2) foram adicionados 50 µL de adrenalina 60 mM, mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar para evitar a oxidação. A velocidade inicial de formação do adrenocromo foi acompanhada durante cerca de 100 segundos do início da reação, com acréscimo de absorbância em torno de 0,013-0,015 unidades a cada 15 segundos, para então diferentes alíquotas da amostra serem adicionadas, geralmente em torno de 50 a 100 µL, dependendo da concentração e atividade da enzima presente na alíquota. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas com 4 ou 5 pontos foram obtidas, e a atividade enzimática da SOD foi determinada indiretamente, medidas em duplicata. Os valores obtidos em duplicata da SOD (U SOD mL<sup>-1</sup>) foram expressos em termos de atividade da enzima, em que uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo. As amostras foram tratadas por uma mistura de clorofórmio: etanol (3:5 v:v) e, em seguida, por adição de água destilada. Posteriormente, as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas a 5000 rpm por 4 min. para retirar a hemoglobina presente nos lisados e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

#### 4.7 MORTE INDOLOR ASSISTIDA (MIA)

A MIA foi realizada obedecendo as disposições da Resolução nº 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) de 20/06/2002, bem como a Instrução Normativa nº 13 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) de 20/09/2013. Dessa forma, o procedimento se deu por meio de overdose anestésica (cloridrato de xilazina 30 mg/kg associado a cloridrato de ketamina 150 mg/kg, por via intraperitoneal).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

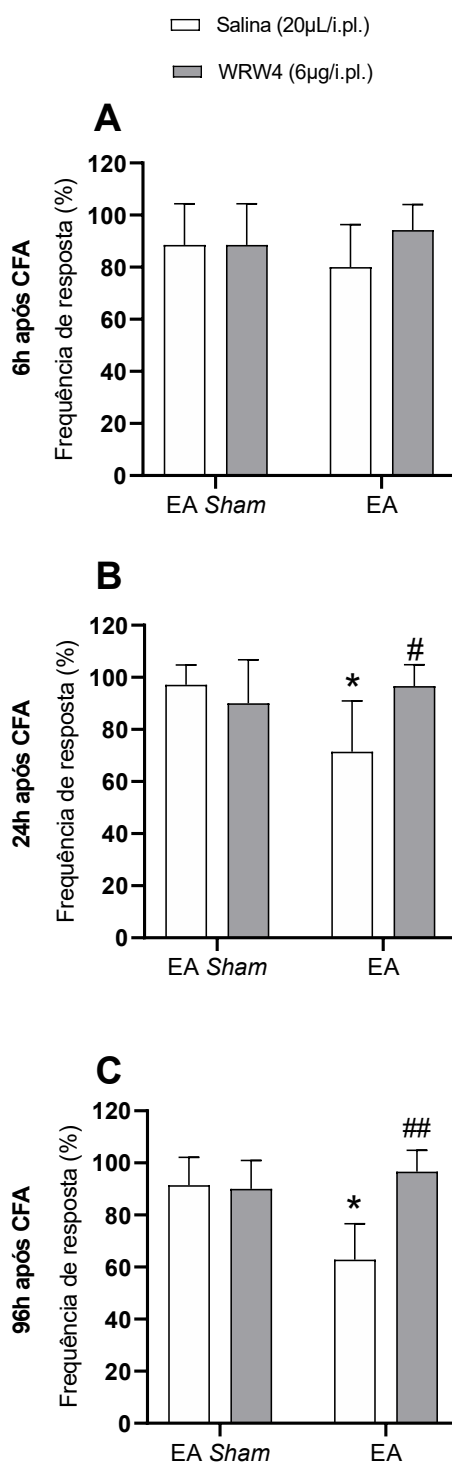
Os resultados foram analisados no programa *GraphPad Prism* na versão 9.0. A distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Dessa forma, os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). Os dados paramétricos foram comparados por meio do teste t não-pareado (para duas amostras independentes), teste de *Mann-Whitney* e por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de *Bonferroni*. Para os resultados não-paramétricos foi realizada análise estatística entre os grupos pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Em todas as análises, valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO i.pl. DE WRW4 NA DOSE DE 6 $\mu$ g/sítio SOBRE O EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DO TRATAMENTO COM A EA

Considerando os resultados apresentados na fig. 7, é possível observar que o tratamento com a EA reduziu a hiperalgesia mecânica 24 horas ( $p= 0,0274$ , painel B) e 96 horas ( $p= 0,0220$ , painel C) após a injeção de CFA, e que o pré-tratamento com WRW4 i.pl. na dose de 6 $\mu$ g/sítio preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA 24 horas ( $p= 0,0477$ , painel B) e 96 horas ( $p= 0,0029$ , painel C) após a injeção de CFA.

Figura 7 - Efeito da administração i.pl. de WRW4 na dose de 6 $\mu$ g/sítio



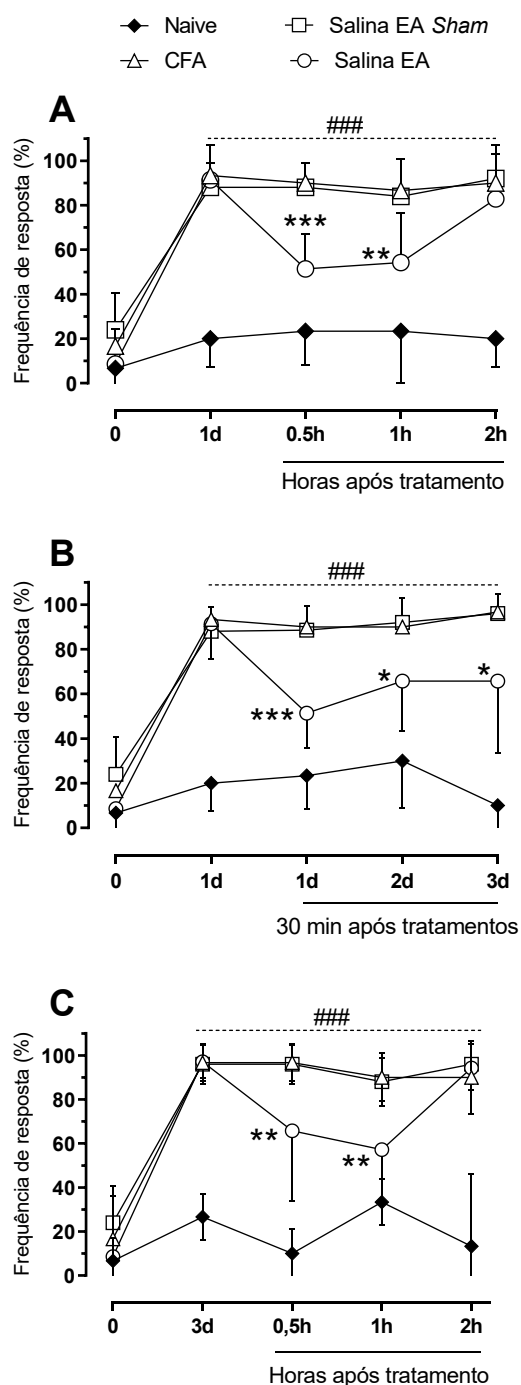
Legenda: Análises 6h (painel A), 24h (painel B) e 96h (painel C) após a injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo Salina EA Sham. # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  quando comparado com o grupo Salina EA. Análise estatística Kruskal-Wallis. CFA = Adjuvante Completo de Freund; d = dia; EA = eletroacupuntura. Fonte: A autora (2021).

## 5.2 EFEITO DA EA NA HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados apresentados na fig. 8 demonstram que a injeção de CFA induziu hiperalgesia mecânica, que persistiu ao longo de todo o período de avaliações. Antes do tratamento com a EA ou EA *Sham*, os animais dos grupos que receberam a injeção de CFA tiveram um aumento significativo na frequência de retirada da pata ( $p < 0,0001$ ) frente à estimulação mecânica com o filamento de von Frey (0,6g) quando comparados com os animais do grupo Naive.

Os resultados apresentados na fig. 8 (painel A) mostram que 1 dia (1d) após a injeção de CFA, o tratamento com a EA reduziu a hiperalgesia mecânica por meia hora ( $p = 0,0012$ ) e uma hora ( $p = 0,0124$ ) após o tratamento. Além disso, o tratamento diário com a EA por três dias consecutivos reduziu hiperalgesia mecânica no primeiro (1d) ( $p = 0,0003$ ), no segundo (2d) ( $p = 0,0368$ ) e no terceiro dia (3d) ( $p = 0,0114$ ) meia hora após os tratamentos (painel B). Ainda, de acordo com a fig. 7 (painel C), 3 dias (3d) após a injeção de CFA, o tratamento com a EA também reduziu a hiperalgesia mecânica por meia hora ( $p = 0,0111$ ) e uma hora ( $p = 0,0093$ ) após o tratamento.

Figura 8 - Efeito da EA na hiperalgesia mecânica

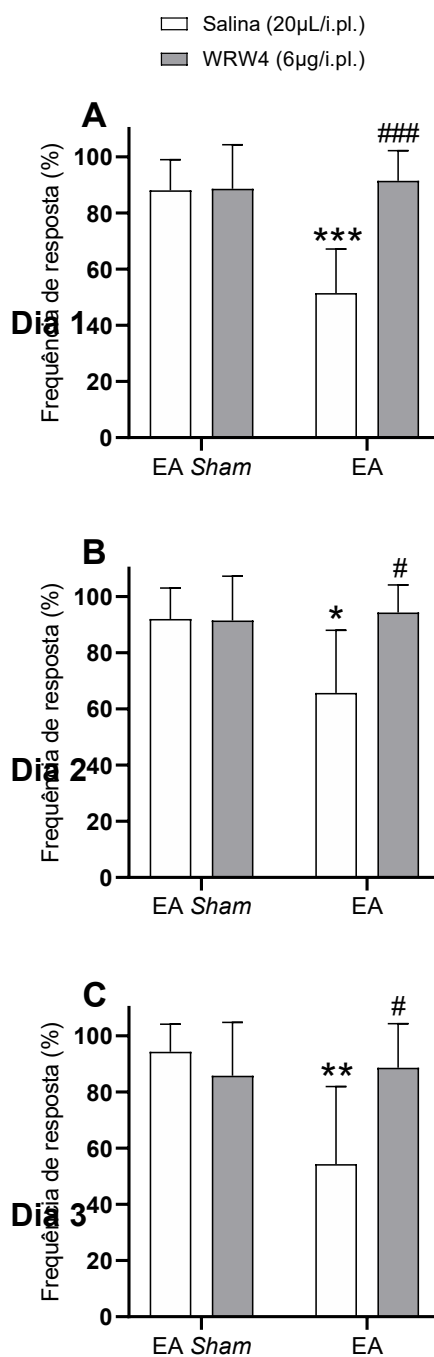


Legenda: Efeito da EA na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA. Avaliação do decurso temporal do tratamento com a EA no primeiro e terceiro dias após CFA (painel A e C, respectivamente). Avaliação do tratamento diário por 3 dias consecutivos (painel B). Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o grupo Salina EA Sham. E #### $p < 0,001$  quando comparado com o grupo Naive. Análise estatística ANOVA de duas vias seguida pelo post hoc teste de *Bonferroni*. CFA = Adjuvante Completo de Freund; d = dia; h = hora; EA = eletroacupuntura. Fonte: A autora (2021).

### 5.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA

Considerando os resultados apresentados na fig. 9, é possível observar que o tratamento com a EA reduziu a hiperalgesia mecânica no primeiro ( $p= 0,0008$ , painel A), no segundo ( $p= 0,0441$ , painel B) e no terceiro dia ( $p= 0,0035$ , painel C) após a injeção de CFA, e que o pré-tratamento com WRW4 i.pl. na dose de  $6\mu\text{g/sítio}$  preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA no primeiro no primeiro ( $p < 0,0001$ ), no segundo ( $p= 0,0134$ ) e no terceiro dia ( $p= 0,0133$ ) após a injeção de CFA.

Figura 9 - Efeito da administração i.pl. do antagonista (WRW4) para o receptor FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgesico da EA



Legenda: Análises no 1º dia (painel A), 2º dia (painel B) e 3º dia (painel C) após a injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o grupo Salina EA Sham. # $p < 0,05$  e ### $p < 0,001$  quando comparado com o grupo Salina EA. Análise estatística ANOVA de duas vias seguida pelo post hoc teste de Bonferroni. CFA = Adjuvante Completo de Freund; d = dia; EA = eletroacupuntura. Fonte: A autora (2021).



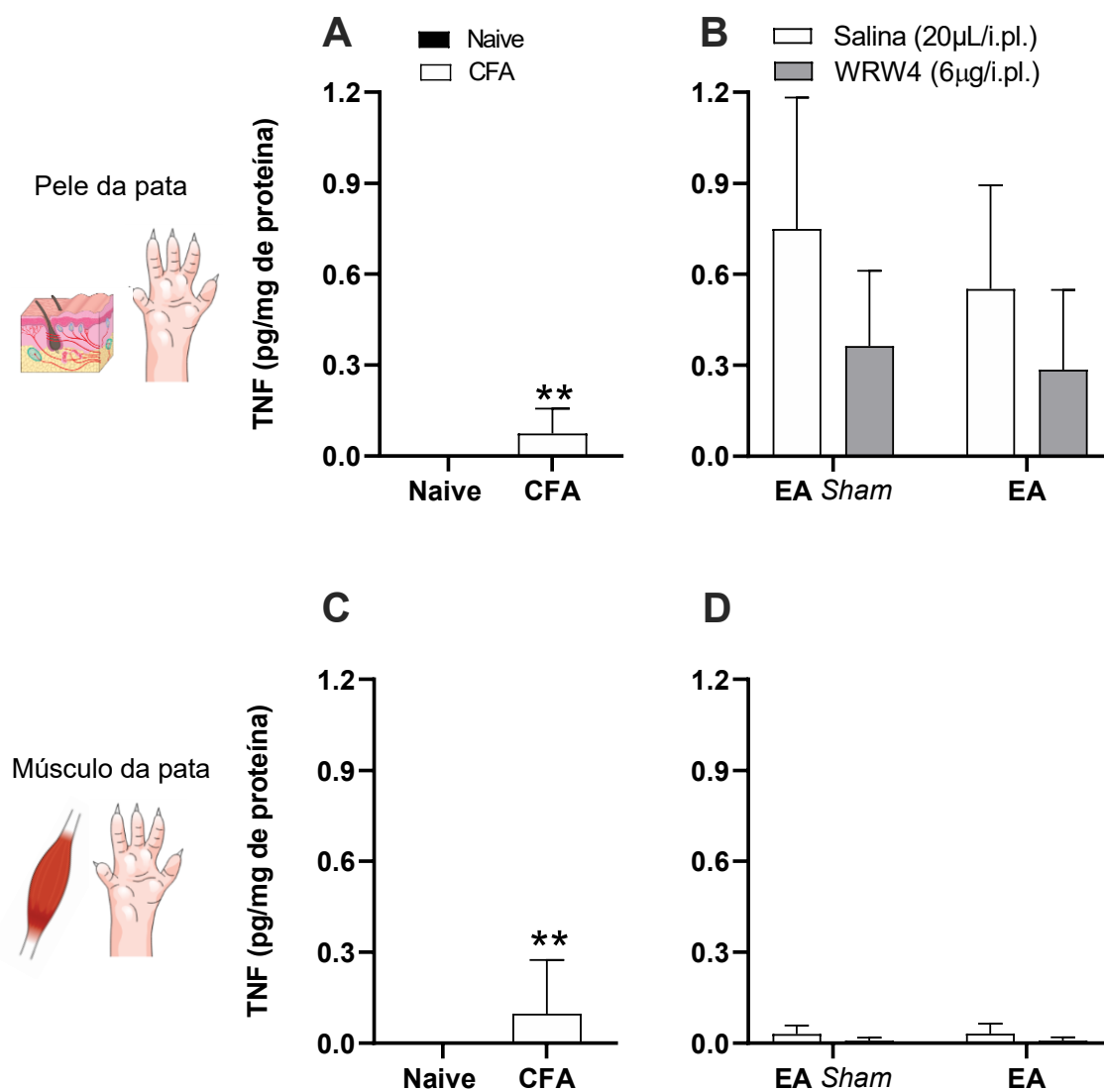
#### 5.4 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Os resultados a seguir mostram o envolvimento do receptor FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 e da citocina anti-inflamatória IL-10 na pele da pata e no músculo da pata de camundongos com inflamação na pata induzida pelo CFA. Os valores finais da concentração da IL-4 ficaram abaixo do valor de detecção do teste para IL-4, logo, não foram analisados.

##### 5.4.1 Efeito da EA sobre a concentração de TNF

Os resultados apresentados na fig. 10 mostram que os camundongos que receberam injeção de CFA na pata apresentaram maiores concentrações de TNF na pele da pata ( $p= 0,0022$ , painel A) e no músculo da pata ( $p= 0,0022$ , painel C) quando comparados com as concentrações de TNF nos animais do grupo Naive. No entanto, o tratamento com a EA e o pré-tratamento com o antagonista WRW4 não alteraram as concentrações de TNF nas estruturas analisadas (painéis B e D).

Figura 10 - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de TNF



Legenda: Concentrações de TNF na pele da pata da pata (painéis A e B) e no músculo da pata (painéis C e D) de camundongos submetidos à injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais).  $**p < 0,01$  quando comparado com o grupo Naive; Análises estatísticas pelo teste de *Mann-Whitney*, *Kruskal Wallis* e ANOVA de duas vias seguido pelo post hoc teste de *Bonferroni*.

CFA = Adjuvante Completo de Freund; EA = eletroacupuntura

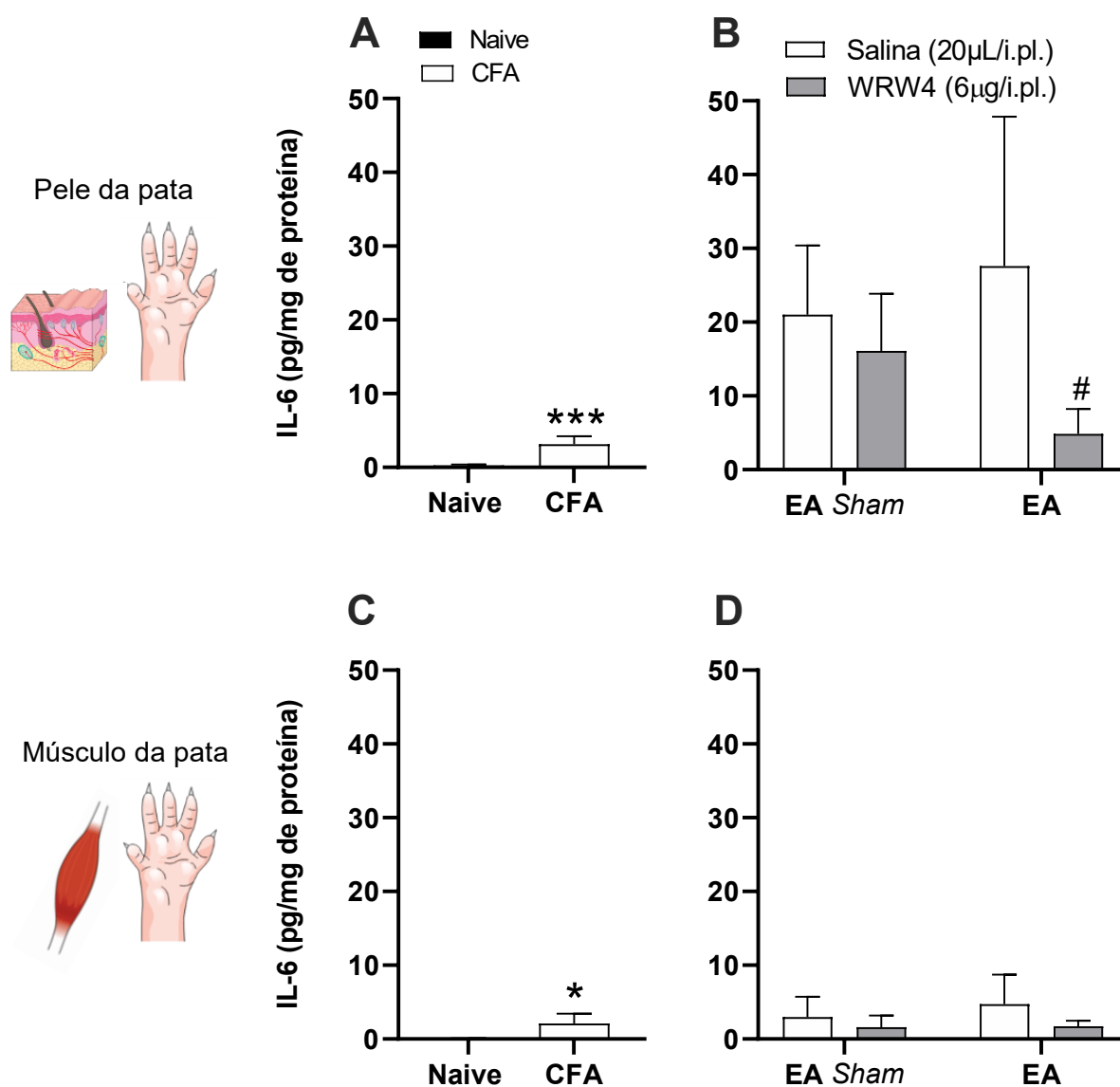
Fonte: A autora (2021).

#### 5.4.2 Efeito da EA sobre a concentração de IL-6

Os resultados apresentados na fig. 11 mostram que os camundongos que receberam injeção i.pl. de CFA apresentaram maiores concentrações de IL-6 na pele da pata ( $p < 0,0001$ , painel A) e no músculo da pata ( $p = 0,0181$ , painel C) quando comparados com as concentrações de IL-6 nos animais do grupo Naive.

Embora o tratamento com a EA não tenha alterado as concentrações de IL-6 na pele da pata ( $p > 0,9999$ , painel B) nem no músculo da pata ( $p = 0,2128$ , painel D) dos animais que receberam injeção i.pl. de CFA, o pré-tratamento com o antagonista WRW4 diminuiu a concentração de IL-6 na pele da pata ( $p = 0,0165$ , painel B), mas não no músculo da pata ( $p > 0,9999$ , painel D) dos animais tratados com EA.

Figura 11 - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de IL-6



Legenda: Concentrações de IL-6 na pele da pata (painéis A e B) e no músculo da pata (painéis C e D) de camundongos submetidos à injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparados com o grupo Naive; # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo Salina EA. Análises estatísticas test t e ANOVA de duas vias seguido pelo post hoc teste de *Bonferroni*.

CFA = Adjuvante Completo de Freund; EA = eletroacupuntura

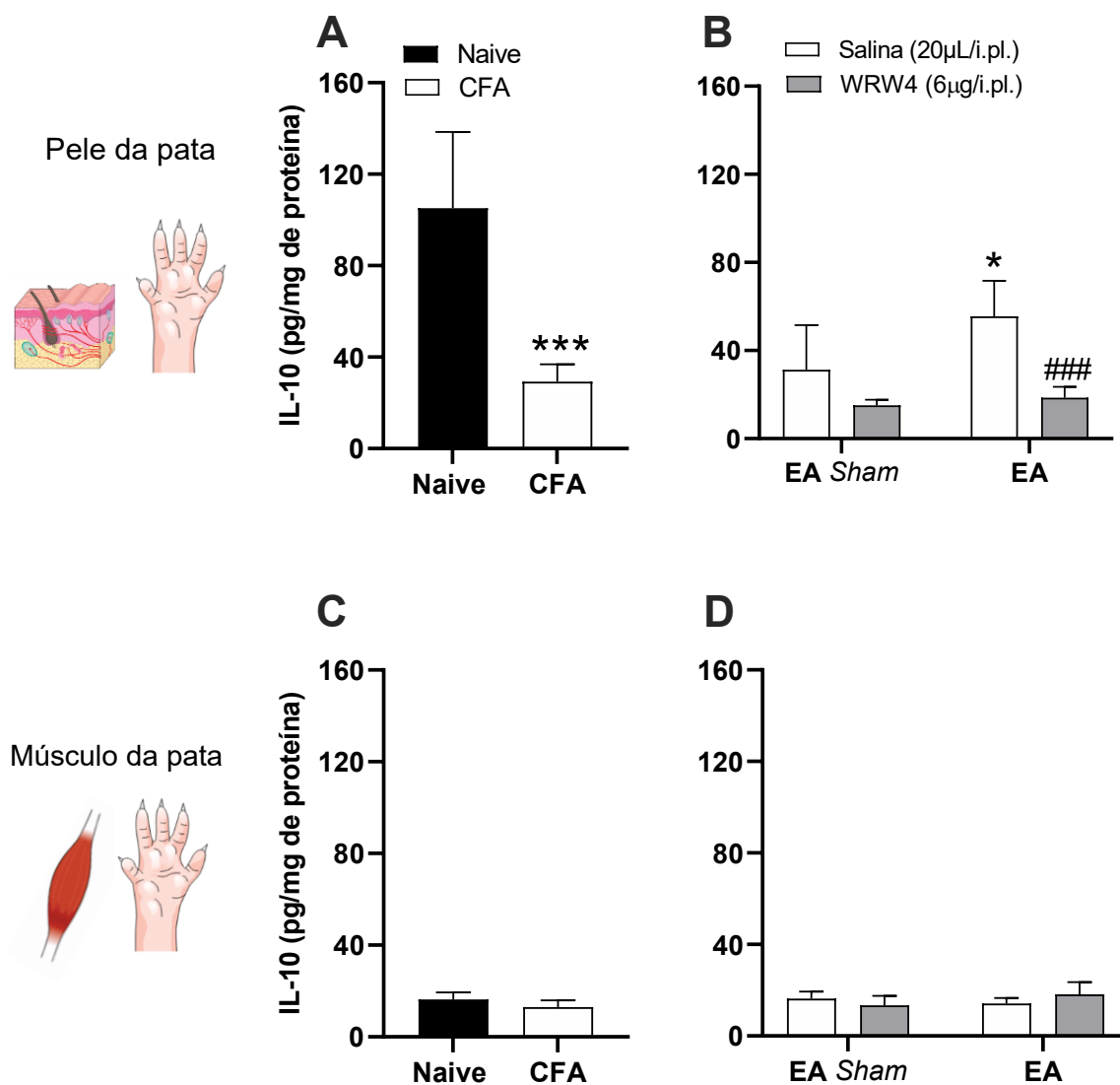
Fonte: A autora (2021).

### 5.4.3 Efeito da EA sobre a concentração de IL-10

Os resultados apresentados na fig. 12 mostram que os camundongos que receberam injeção de CFA na pata apresentaram menores concentrações de IL-10 na pele da pata ( $p= 0,0003$ , painel A), mas não no músculo da pata ( $p= 0,1175$ , painel C), quando comparados com as concentrações de IL-10 nos animais do grupo Naive.

Conforme o esperado, o tratamento dos animais com a EA aumentou a concentração de IL-10 na pele da pata ( $p= 0,0179$ , painel B) dos animais que receberam a injeção de CFA. Além disso, o pré-tratamento com o antagonista (WRW4) para o receptor FPR2/ALX preveniu o efeito do aumento na concentração de IL-10 ( $p < 0,0001$ , painel B) induzido pela EA. Entretanto, o tratamento com a EA e o pré-tratamento com o antagonista WRW4 não alteraram as concentrações de IL-10 no músculo da pata ( $p > 0,9999$ , painel D).

Figura 12 - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de IL-10



Legenda: Concentrações de IL-10 na pele da pata (painéis A e B) e no músculo da pata (painéis C e D) de camundongos submetidos à injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o grupo Naive; \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Salina EA Sham; ### $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Salina EA. Análises estatísticas teste t e ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

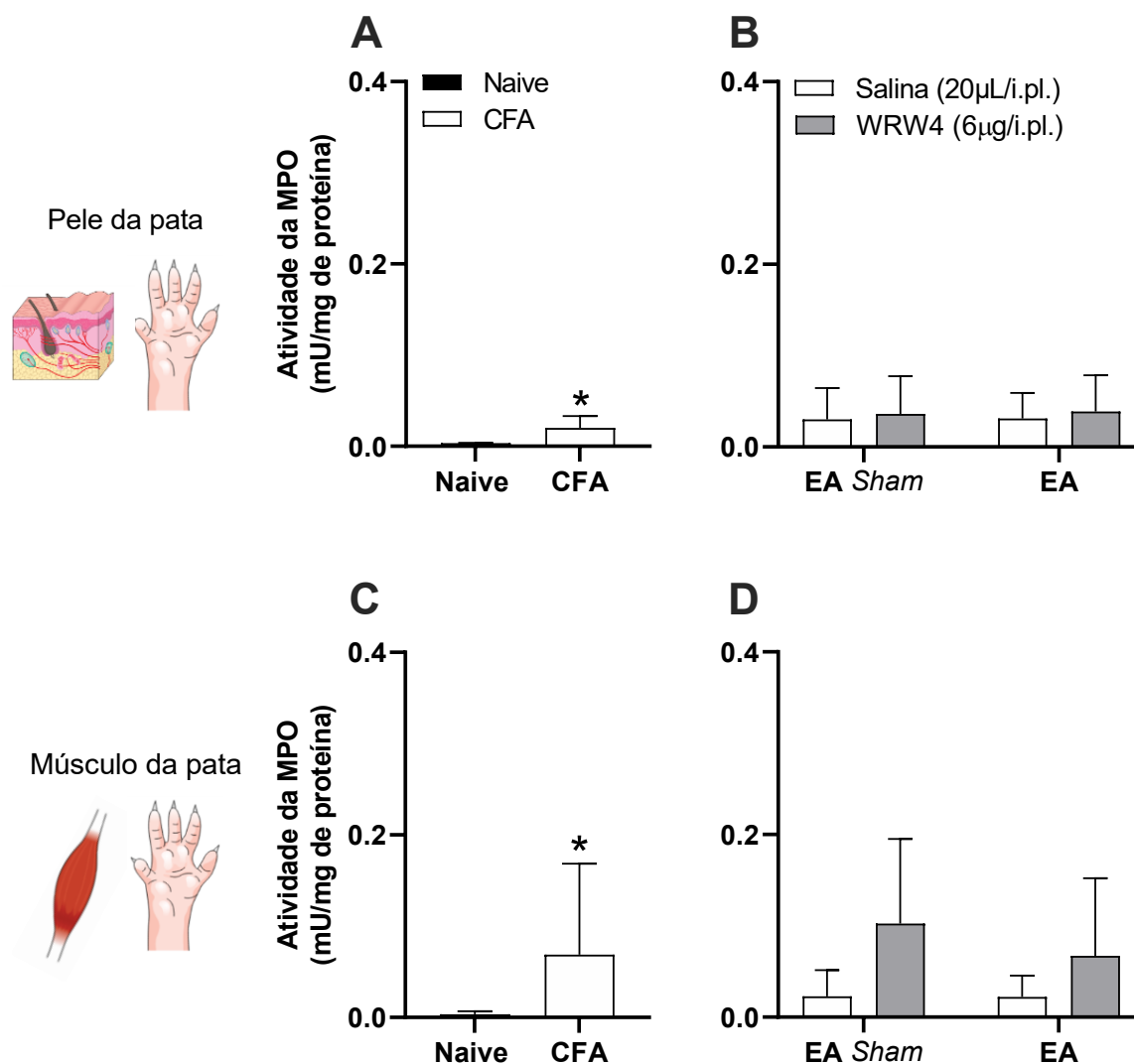
CFA = Adjuvante Completo de Freund; EA = eletroacupuntura

Fonte: A autora (2021).

## 5.5 EFEITO DA EA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MPO

Os resultados da fig. 13 mostram que os camundongos que receberam injeção de CFA na pata apresentaram maiores concentrações da enzima MPO na pele da pata ( $p= 0,0408$ , painel A) e no músculo da pata ( $p= 0,0159$ , painel C) quando comparados com as concentrações da enzima MPO dos animais do grupo Naive. No entanto, o tratamento com a EA e o pré-tratamento com o antagonista WRW4 não alteraram as concentrações da enzima MPO nas estruturas analisadas (painéis B e D).

Figura 13 - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a atividade da enzima MPO



Legenda: Determinação da atividade da enzima MPO na pele da pata (painéis A e B) e no músculo da pata (painéis C e D) de camundongos submetidos à injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo Naive. Análises estatísticas teste t, *Mann-Whitney* e *Kruskal Wallis*.

CFA = Adjuvante Completo de Freund; EA = eletroacupuntura

Fonte: A autora (2021).

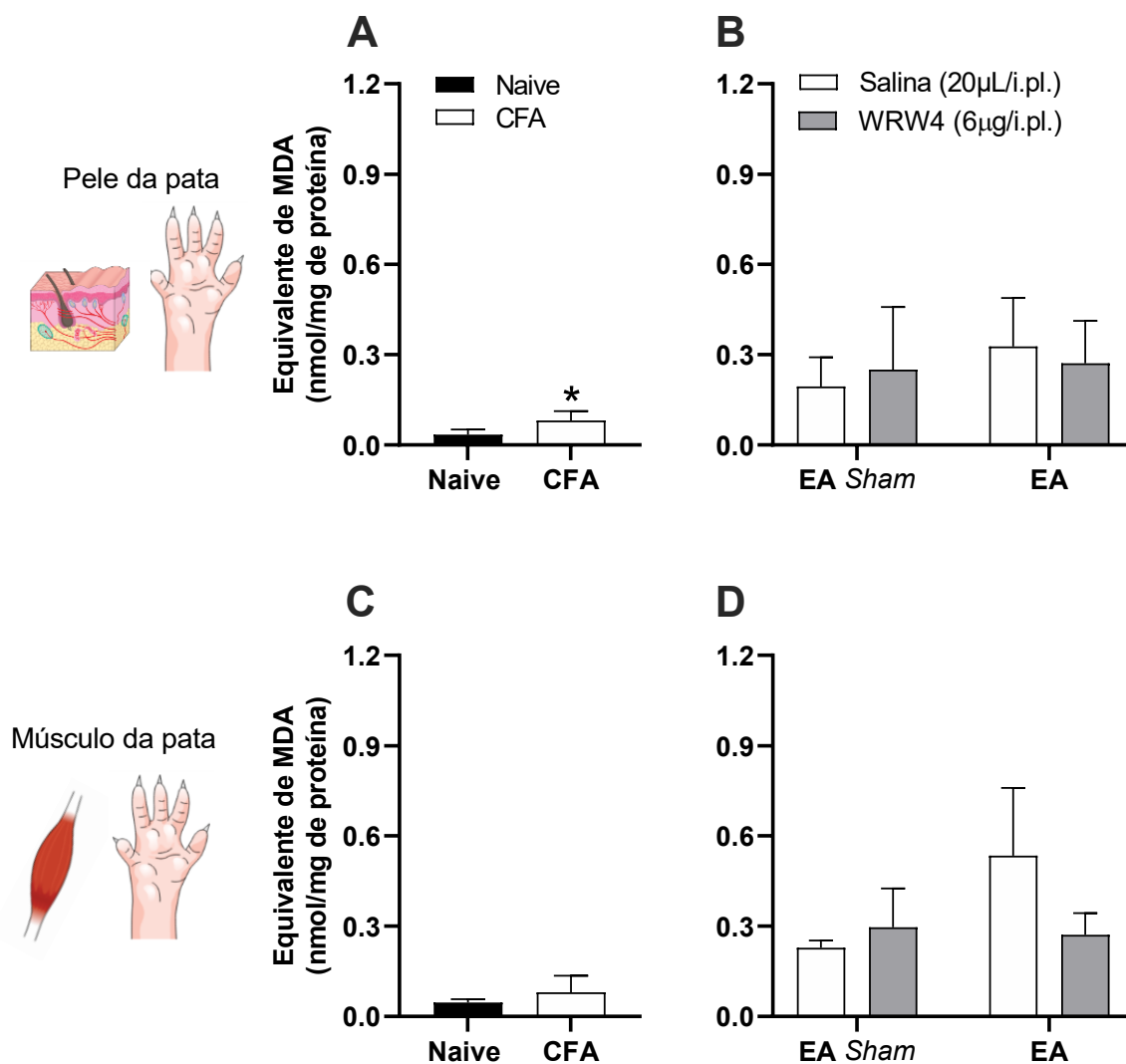


## 5.6 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALX PERIFÉRICO NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA SOBRE PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE

### 5.6.1 Efeito da EA sobre a concentração de TBARS

Com base nos resultados apresentados da fig. 14, nota-se que os camundongos que receberam injeção de CFA na pata apresentaram maiores concentrações de TBARS (resultados expressos em equivalente de MDA) na pele da pata ( $p= 0,0279$ , painel A), mas não no músculo da pata ( $p= 0,2684$ , painel C) quando comparados com as concentrações de TBARS nos animais do grupo Naive. No entanto, o tratamento com a EA e o pré-tratamento com o antagonista WRW4 não alteraram as concentrações de TBARS nas estruturas analisadas (painéis B e D).

Figura 14 - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de TBARS



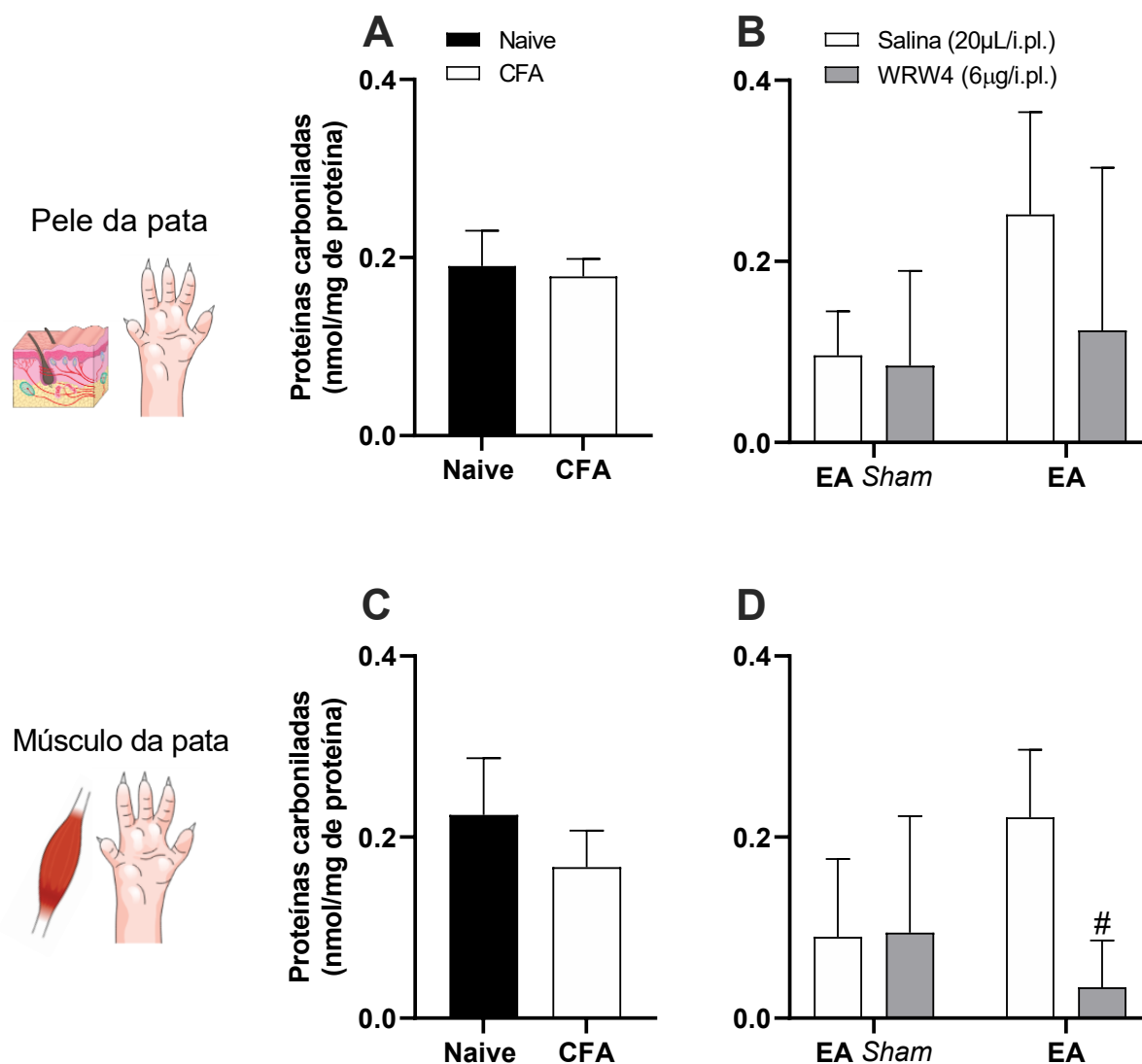
Legenda: Concentrações de TBARS expressas equivalentes de MDA na pele da pata (painéis A e B) e no músculo da pata (painéis C e D) de camundongos submetidos à injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo Naive. Análises estatísticas test t e ANOVA de duas vias seguido pelo post hoc teste de *Bonferroni*. CFA = Adjuvante Completo de Freund; EA = eletroacupuntura. Fonte: A autora (2021).

### 5.6.2 Efeito da EA sobre a concentração de proteínas carboniladas

Os resultados apresentados da fig. 15 mostram que não houve alteração na concentração de proteínas carboniladas na pele da pata ( $p= 0,5345$ , painel A) e nem no músculo da pata ( $p= 0,0866$ , painel C) de camundongos que receberam injeção de CFA quando comparados com os animais do grupo Naive. Além disso, o tratamento com a EA e o pré-tratamento com o antagonista WRW4 não alteraram as concentrações de proteínas carboniladas na pele da pata ( $p= 0,4437$ , painel B) dos camundongos que receberam injeção de CFA.

Ademais, o tratamento com a EA também não alterou a concentração de proteínas carboniladas no músculo da pata ( $p= 0,1494$ , painel D) de camundongos que receberam injeção de CFA. Em contrapartida, o pré-tratamento com o antagonista WRW4 diminuiu a concentração de proteínas carboniladas no músculo da pata ( $p= 0,0015$ , painel D) quando comparados com os animais do grupo Salina EA.

Figura 15 - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de proteínas carboniladas



Legenda: Concentrações de proteínas carboniladas na pele da pata (painéis A e B) e no músculo da pata (painéis C e D) de camundongos submetidos à injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo Salina EA. Análises estatísticas teste t e teste de *Kruskal Wallis*.

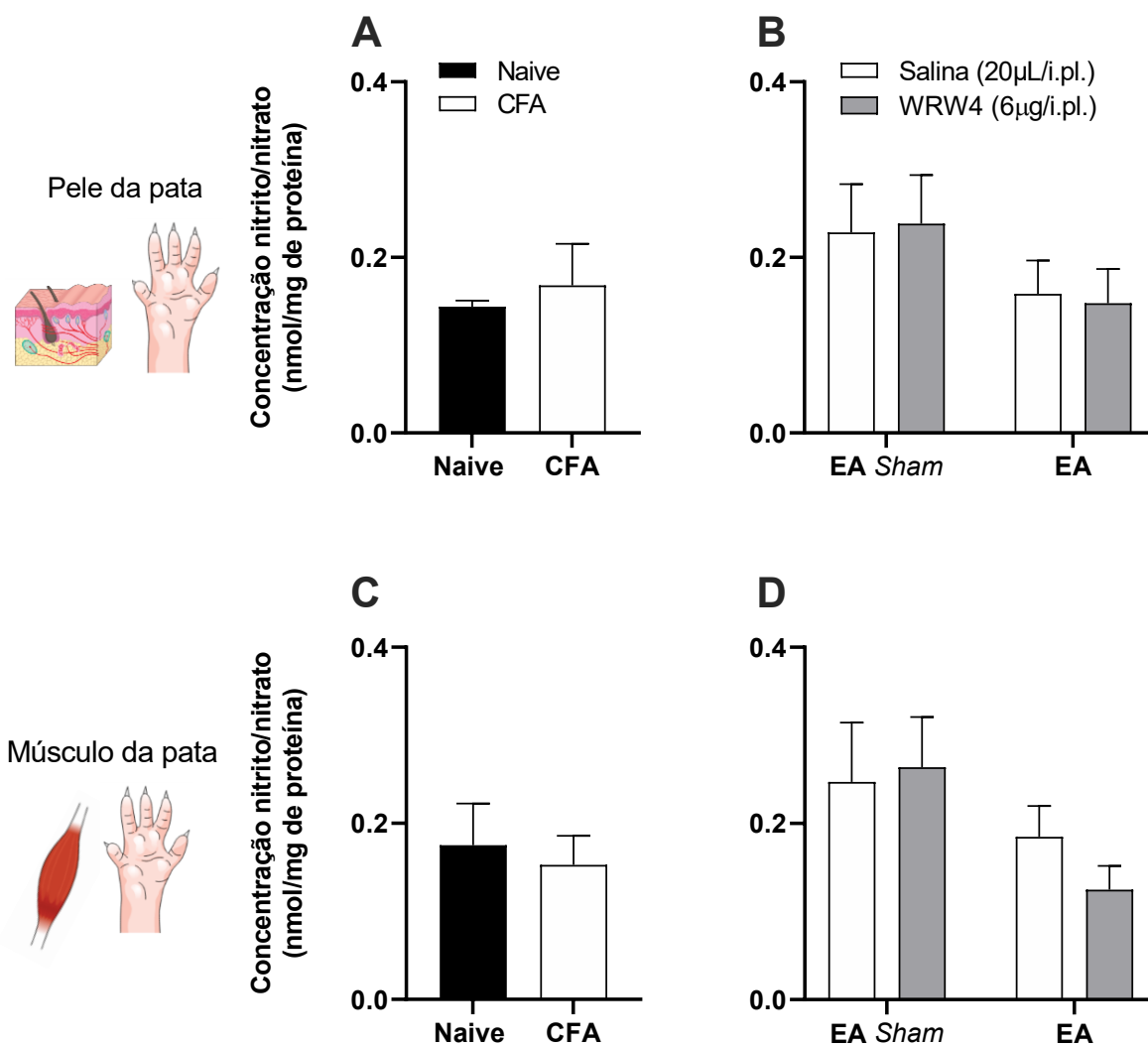
CFA = Adjuvante Completo de Freund; EA = eletroacupuntura

Fonte: A autora (2021).

### **5.6.3 Efeito da EA sobre a concentração de nitrito/nitrato**

Os resultados demonstrados na fig. 16 mostram que não houve alteração na concentração de nitrito/nitrato na pele da pata ( $p= 0,2386$ , painel A) nem músculo da pata ( $p= 0,3589$ , painel C) de camundongos que receberam injeção de CFA quando comparados com as concentrações de nitrito/nitrato nos animais do grupo Naive. Além disso, o tratamento com a EA e o pré-tratamento com o antagonista WRW4 não alteraram as concentrações de nitrito/nitrato nas estruturas analisadas (painéis B e D).

Figura 16 - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a concentração de nitrito/nitrato



Legenda: Determinação das concentrações de nitrito/nitrato na pele da pata (painéis A e B) e no músculo da pata (painéis C e D) de camundongos submetidos à injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). Análises estatísticas teste t, *Kruskal Wallis* e ANOVA de duas vias seguido pelo post hoc teste de *Bonferroni*.

CFA = Adjuvante Completo de Freund; EA = eletroacupuntura

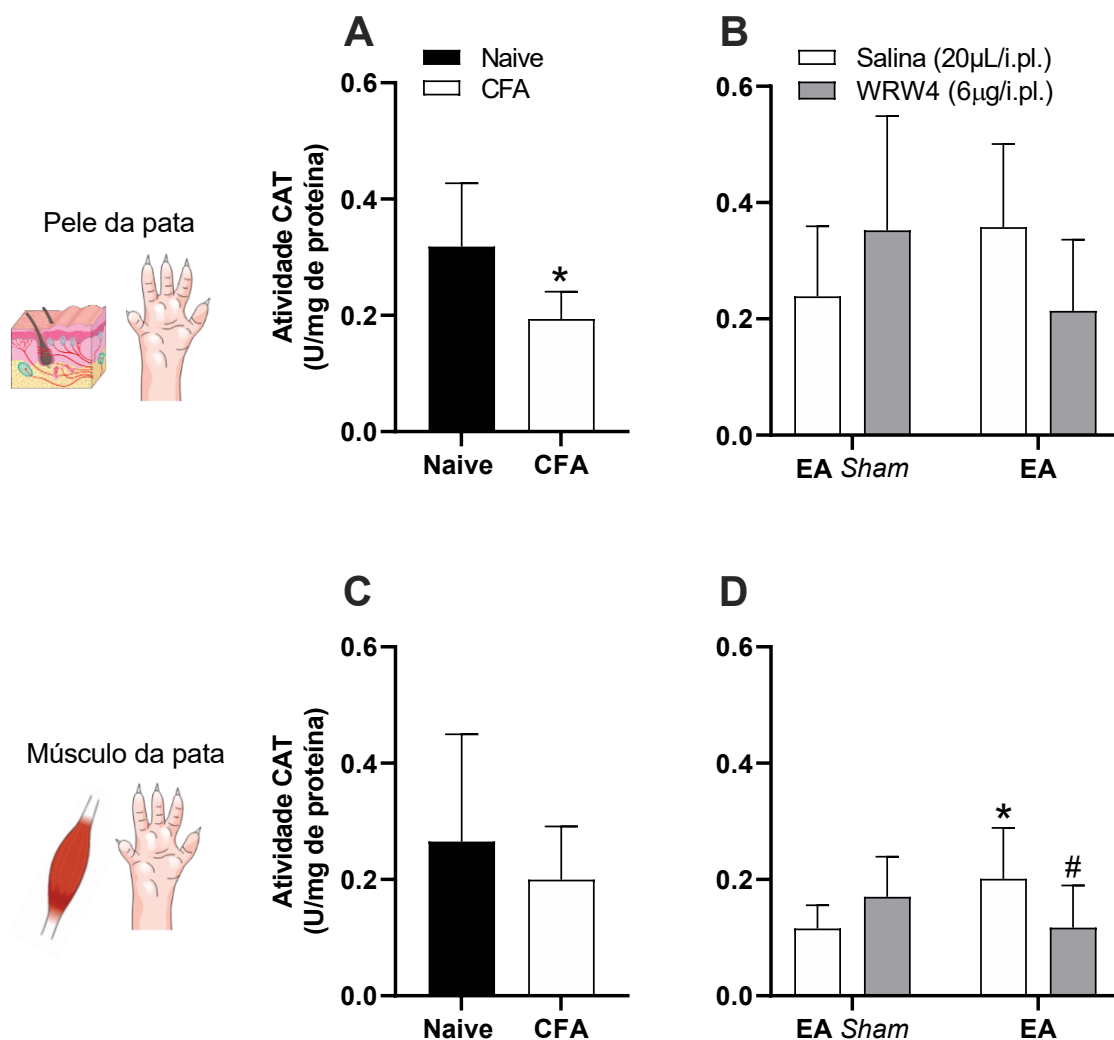
Fonte: A autora (2021).

#### 5.6.4 Efeito da EA sobre a atividade da enzima CAT

Os resultados apresentados da fig. 17 mostram que os camundongos que receberam injeção i.pl. de CFA apresentaram uma diminuição da atividade da enzima CAT na pele da pata ( $p= 0,0428$ , painel A), mas não no músculo da pata ( $p= 0,4541$ , painel C) quando comparados com a atividade da enzima CAT dos animais do grupo Naive.

O tratamento com a EA e o pré-tratamento com o antagonista WRW4 não alteraram a atividade da enzima CAT na pele da pata ( $p= 0,8787$ , painel B) dos animais que receberam a injeção de CFA. Em contrapartida, o tratamento com a EA aumentou a atividade da enzima CAT no músculo da pata ( $p= 0,0381$ , painel D) dos animais que receberam a injeção de CFA, e o pré-tratamento com o antagonista para o receptor FPR2/ALX preveniu esse efeito induzido pela EA ( $p= 0,0282$ , painel D).

Figura 17 - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a atividade da enzima CAT



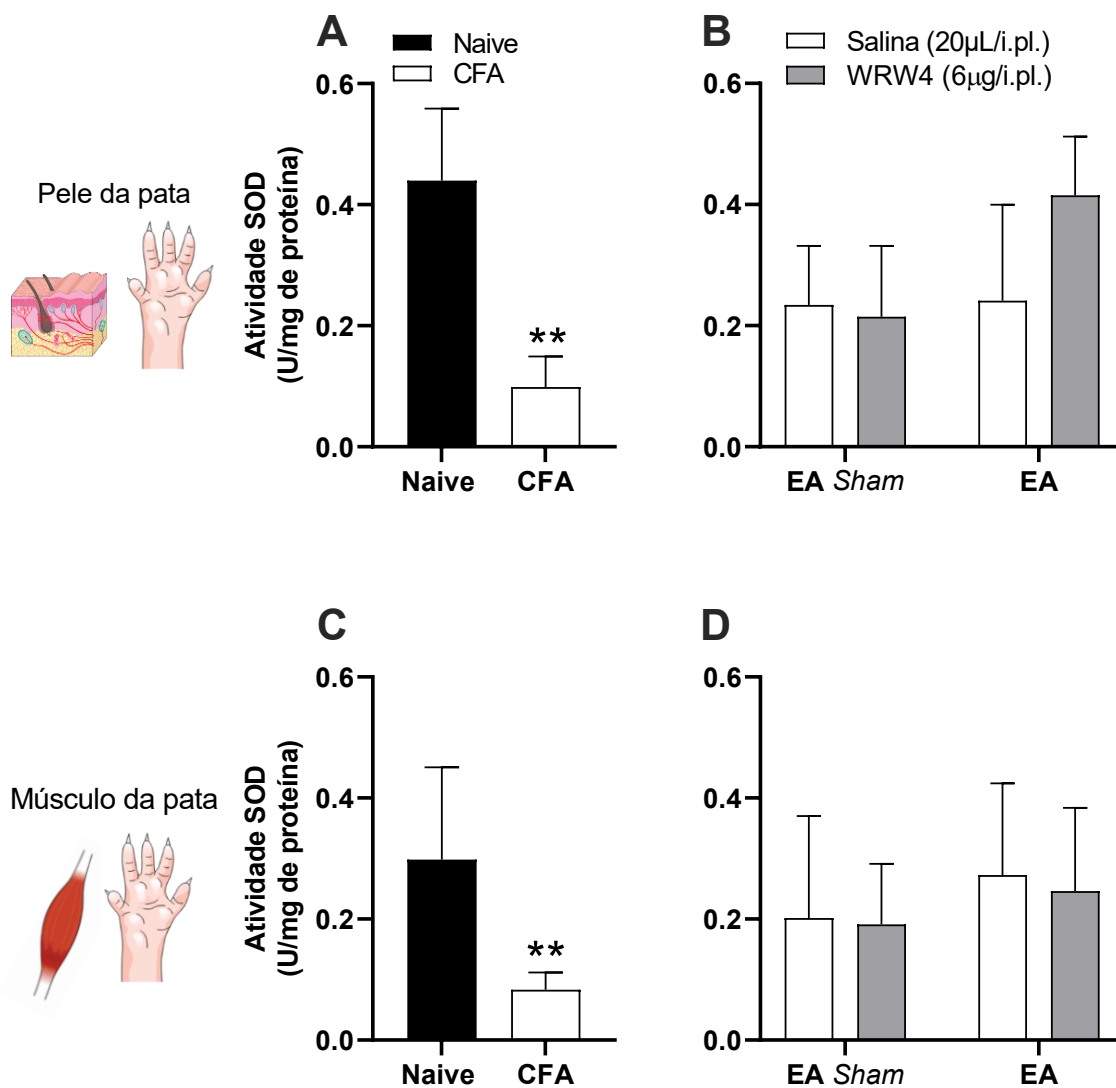
Legenda: Determinação da atividade da enzima CAT na pele da pata (painéis A e B) e no músculo da pata (painéis C e D) de camundongos submetidos à injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo Naive (painel A) e ao grupo Salina EA Sham (painel D); # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo Salina EA. Análises estatísticas test t, *Kruskal-Wallis* e ANOVA de duas vias seguido pelo post hoc teste de *Bonferroni*. CFA = Adjuvante Completo de Freund; EA = eletroacupuntura  
Fonte: A autora (2021).



### **5.6.5 Efeito da EA sobre a atividade da enzima SOD**

Com base nos resultados apresentados da fig. 18, observa-se que os camundongos que receberam injeção de CFA na pata apresentaram uma diminuição da atividade da enzima SOD na pele da pata ( $p= 0,0022$ , painel A) e no músculo da pata ( $p= 0,0067$ , painel C) quando comparados com as concentrações da enzima SOD nos animais do grupo Naive. No entanto, o tratamento com a EA e o pré-tratamento com o antagonista WRW4 não alteraram as concentrações da enzima SOD nas estruturas analisadas (painéis B e D).

Figura 18 - Envolvimento de receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA sobre a atividade da enzima SOD



Legenda: Determinação da atividade da enzima SOD na pele da pata (painéis A e B) e no músculo da pata (painéis C e D) de camundongos submetidos à injeção de CFA. Os valores representam a média  $\pm$  DPM ( $n = 7$  animais). \*\* $p < 0,01$  quando comparado com o grupo Naive. Análises estatísticas test t e ANOVA de duas vias seguido pelo post hoc teste de *Bonferroni*.

CFA = Adjuvante Completo de Freund; EA = eletroacupuntura

Fonte: A autora (2021).

## 6 DISCUSSÃO

Os achados mais relevantes do presente estudo foram que: (i) o tratamento com a EA apresentou ação anti-hiperalgésica em camundongos com inflamação na pata induzida pela injeção i.pl. de CFA; (ii) o tratamento com a EA aumentou a concentração da IL-10 na pele da pata e a atividade da enzima antioxidante CAT no músculo da pata dos animais; (iii) o pré-tratamento i.pl. com antagonista (WRW4) para o receptor FPR2/ALX preveniu os efeitos produzidos pela EA.

Os resultados aqui encontrados, que mostram a eficácia da EA na dor nociceptiva inflamatória induzida pelo CFA, fortalecem e estende os dados da literatura, consolidando a EA como uma ferramenta no tratamento da dor. Nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que a EA de baixa frequência (2 e 10 Hz) nos acupontos ST36 e SP6, por 20 min., reduz a hiperalgisia mecânica na fase precoce e tardia da dor nociceptiva inflamatória induzida pelo CFA (VIEIRA et al., 2021). Na presente pesquisa, o tratamento com a EA produziu efeito anti-hiperalgésico por até uma hora após o tratamento. Considerando o tratamento diário, o efeito anti-hiperalgésico se manteve ao longo dos três dias em que os animais foram avaliados. Nossos resultados corroboram os achados de Huang e cols. (2013), que demonstram que o tratamento com EA de baixa frequência (2 Hz) no acuponto ST36, por 20 min., reduziu a hiperalgisia mecânica e térmica após a administração de CFA em ratos; e de Liao e cols. (2017), que também verificaram que a EA (2 Hz) nos acupontos ST36 e SP6, por 15 min., reduziu a hiperalgisia mecânica por três dias consecutivos em camundongos com inflamação na pata induzida por CFA.

O modelo de inflamação periférica induzida pelo CFA, utilizado neste estudo, é bem caracterizado e permite a quantificação dos mediadores envolvidos nas alterações celulares durante o processo inflamatório (MARTINS et al., 2015; TRENTO et al., 2021). Além disso, a injeção i.pl. de CFA desencadeia hiperalgisia persistente que pode ser avaliada por métodos acessíveis, como o teste de von Frey. Trento e cols. (2021), em revisão integrativa sobre os receptores e neuromediadores periféricos envolvidos no efeito anti-hiperalgésico da acupuntura, verificaram que o modelo de dor mais utilizados dentre os artigos analisados foi o modelo de CFA. Observou-se, aqui, que os camundongos que receberam injeção i.pl. de CFA apresentaram um

aumento da frequência de resposta de retirada da pata (hiperalgesia mecânica) do primeiro ao terceiro dia de avaliação, e que o tratamento com a EA reduziu esse quadro hiperalgésico.

É importante ressaltar que os acupontos utilizados no presente estudo -ST36 (inervação - nervo fibular) e SP6 (inervação - nervo tibial) - foram selecionados, pois têm relação com a inervação segmentar da pata posterior dos animais (segmentos espinais L3, L4 e L5) (MAZZARDO-MARTINS et al., 2018; VIEIRA et al., 2020; MORÉ et al., 2021) e são amplamente utilizados na prática clínica, tendo como base as teorias-pilares da MTC. Dessa forma, procurou-se utilizar uma abordagem denominada por Moré e cols. (2021) de "*Ethno East-West Acupuncture*", em que a seleção dos acupontos é baseada tanto nas indicações da MTC como na relação anatomofisiológica dos acupontos.

Em estudo prévio, demonstramos o papel do receptor FPR2/ALX na dor nociceptiva de origem inflamatória em camundongos causada pela injeção i.pl. de CFA. É importante destacar que esse foi o primeiro estudo que demonstrou o envolvimento direto do receptor FPR2/ALX na dor nociceptiva inflamatória induzida pelo CFA. Utilizando um agonista (BML-111) para esse receptor, observou-se efeito analgésico nos camundongos inflamados, e esse efeito foi prevenido pelo antagonista (WRW4) para o receptor FPR2/ALX. Além disso, no mesmo estudo, nós avançamos e demonstramos que a ação anti-hiperalgésica da EA é dependente desse receptor. A utilização de abordagens farmacológicas para o estudo do receptor FPR2/ALX mostram que a sua ativação por ligantes como a LXA<sub>4</sub> e a AnxA1 produz efeitos anti-hiperalgésicos e anti-inflamatórios, dentre eles: a inibição do recrutamento e ativação de neutrófilos, diminuição da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (CHIANG; SERHAN, 2017; SERHAN, 2017), redução do estresse oxidativo (MARTINEZ et al., 2020), indução da liberação de peptídeos opioides por neutrófilos (SEKIDO; ISHIMARU; SAKITA, 2003), indução da apoptose e da eferocitose (MCARTHUR et al., 2015, 2020), entre outros. Diante desses dados, e conhecendo todo o potencial anti-inflamatório e pró-resolutivo do receptor FPR2/ALX, elaboramos a seguinte hipótese: os efeitos anti-inflamatórios da EA poderiam também ser dependentes da ativação do receptor FPR2/ALX?

A dor nociceptiva inflamatória é resultado da ativação e sensibilização de neurônios nociceptivos primários por uma série de mediadores inflamatórios, dentre eles citocinas e espécies reativas (SALVEMINI et al., 2011). Diversas células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos, monócitos e queratinócitos residentes, liberam citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$ , as quais induzem a expressão e ativam a COX-2, produzindo hiperalgesia via produção de prostaglandinas (VARDEH; MANNION; WOOLF, 2016). Além disso, citocinas pró-inflamatórias aumentam a atividade da enzima iNOS em macrófagos e outros leucócitos, estimulando a liberação de NO. O NO, por sua vez, contribui para a produção de hiperalgesia (FERREIRA et al., 2009) via inibição de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD e GPx, e ativação de PKC (SALVEMINI et al., 2011). Paralelamente, durante a resposta inflamatória, há produção e liberação de mediadores anti-inflamatórios, como as citocinas anti-inflamatórias que são moléculas imunorregulatórias e que controlam a resposta de citocinas pró-inflamatórias (SALVEMINI et al., 2011). A IL-10, produzida por células imunológicas ativadas, possui propriedades anti-inflamatórias potentes capazes de modular negativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG; AN, 2009). Um número crescente de evidências tem mostrado a relação direta entre dor e baixas concentrações da IL-10 e o papel anti-hiperalgésico da IL-10 em diversos modelos animais (OUYANG; O'GARRA, 2019).

Dos muitos parâmetros inflamatórios que podem ser avaliados, analisamos as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6, das anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 e a atividade da enzima MPO. A atividade da MPO em tecidos lesionados reflete a infiltração de neutrófilos no local, uma vez que essa enzima é abundantemente expressa nessas células (KHAN; ALSAHLI; RAHMANI, 2018). Também analisamos a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD e parâmetros de dano oxidativo (carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica e relação nitrito/nitrato). Diversos estudos mostram uma relação direta entre a produção de ROS e citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$ , durante a resposta inflamatória (RANNEH; ALI; AKIM, 2017). Citocinas pró-inflamatórias ativam neutrófilos e macrófagos, que se acumulam no região do tecido inflamado onde produzem e liberam mais citocinas e ROS (PINHO-RIBEIRO; VERRI-JUNIOR; CHIU, 2017). Além disso, induzem a

produção de  $H_2O_2$  e do ânion superóxido, os quais, por sua vez, promovem a ativação do NF- $\kappa$ B, fator de transcrição que regula positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (BEATRICE et al., 2017). Dessa forma, citocinas pró-inflamatórias e ROS promovem a ativação de neurônios nociceptivos primários induzindo a dor e agravando o processo inflamatório (SALVEMINI et al., 2011).

No presente estudo, verificou-se que a EA aumentou a concentração de IL-10 na pele da pata de camundongos que receberam injeção i.pl. de CFA e que essa ação é dependente do receptor FPR2/ALX, confirmando a hipótese levantada. Os nossos achados corroboram os de Yu e cols. (2020), que analisaram o efeito anti-inflamatório do tratamento com a EA (2 e 100 Hz) nos acupontos ST36 e SP6 em modelo de CFA. Eles observaram que a EA induziu a produção e liberação de IL-10 no tecido da pata e na medula espinal dos animais. Após cinco dias consecutivos de estimulação com a EA, a porcentagem de macrófagos no baço, mas não de neutrófilos, diminuiu significativamente. Paralelamente, a porcentagem de células T regulatórias (Treg) aumentou após o tratamento com a EA. Células Treg mantêm a homeostase imunológica induzindo a produção de IL-10. Assim, sugere-se que a migração de macrófagos e sua ativação e o aumento da porcentagem de células Treg levou ao aumento da concentração de IL-10 após o tratamento com a EA (YU et al., 2020).

Da Silva e cols. (2011) também verificaram que o tratamento com acupuntura, apenas no acuponto SP6, aumentou as concentrações de IL-10, além de reduzir o infiltrado de células inflamatórias, a permeabilidade vascular e a atividade da MPO na peritonite induzida por carragenina em camundongos. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que a estimulação manual do acuponto SP6 reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica, o edema e aumentou as concentrações de IL-10 teciduais de camundongos com dor muscular induzida por carragenina. Além disso, notaram que a acupuntura induziu uma mudança de fenótipo dos macrófagos do tecido muscular com uma redução dos macrófagos M1 (perfil pró-inflamatório) e um aumento dos macrófagos M2 (perfil anti-inflamatório e importante fonte de IL-10). Por fim, o tratamento foi inefetivo em reduzir a hiperalgesia e edema em camundongos nocautes (-/-IL-10) para IL-10, não deixando dúvidas acerca do papel da IL-10 nos efeitos anti-inflamatórios da estimulação do acuponto SP6 (DA SILVA et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa tem avançado no conhecimento acerca da via de sinalização do receptor FPR2/ALX ativada pela EA, e aqui demonstramos que a EA aumenta a concentração de IL-10 no local da lesão e que há o envolvimento do receptor FPR2/ALX nesse processo. Contudo esse achado pode estar relacionado à liberação prévia de AnxA1. Em estudo anterior, demonstramos que a EA aumentou o imunocontéudo de AnxA1 na pele da pata de animais com inflamação induzida pelo CFA e que o pré-tratamento com o antagonista (WRW4) para o receptor FPR2/ALX i.pl. preveniu esse aumento (VIEIRA et al., 2021). A AnxA1 foi originalmente identificada em leucócitos como uma proteína induzida por glicocorticoides que inibe a fosfolipase A2, evitando assim a formação de eicosanoides pró-inflamatórios (YANG; MORAND; LEECH, 2013). Como os glicocorticoides, a AnxA1 e peptídeos derivados inibem a síntese de eicosanoides (KIM et al., 2001), bloqueiam a migração de neutrófilos e induzem apoptose de células inflamatórias. A via AnxA1 - FPR2/ALX pode ser ativada por glicocorticoides, que induzem a expressão de genes para a AnxA1 e para o receptor FPR2/ALX, estimulando, portanto, os efeitos anti-inflamatórios dessa via (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009). Todos esses efeitos contribuem para a potente ação anti-inflamatória exercida tanto pelos glicocorticoides quanto pelas proteínas induzidas.

Como exposto, para que a resolução da inflamação tenha início, a ativação do receptor FPR2/ALX por agonistas pró-resolutivos desencadeia uma cascata de eventos envolvendo a expressão e liberação de outros mediadores pró-resolutivos, como a IL-10 (PERRETTI; GODSON, 2020). A exemplo disso, Souza e cols. (2007), num contexto de inflamação intestinal por isquemia/reperfusão, demonstraram que a administração de um análogo estável da LXA<sub>4</sub> (ATL-1) ou de um peptídeo derivado da AnxA1 (Ac2-26) preveniu a lesão tecidual, a produção de TNF e a letalidade em camundongos, e que esses eventos estavam associados ao aumento na produção de IL-10. Em animais knockout para IL-10, ATL-1 e Ac2-26 não apresentaram ação anti-inflamatória, demonstrando que a ação protetora desses agonistas sintéticos para o receptor FPR2/ALX depende da produção de IL-10. Ademais, tanto a LXA<sub>4</sub> como a AnxA1 exerceram efeitos anti-inflamatórios de maneira dependente de IL-10 possivelmente via receptor FPR2/ALX, uma vez que o uso de um antagonista (BOC-1) para o receptor FPR2/ALX diminuiu a produção de IL-10 (SOUZA et al., 2007). Em

outro estudo, Cooray e cols. (2013) demonstraram uma relação entre a produção de IL-10 e a via de sinalização pró-resolutiva AnxA1-FPR2/ALX envolvendo a fosforilação da p38/MAPKAPK (*MAPK-activated protein kinase*) e a proteína de choque térmico 27 (Hsp27 – *Heat-shock protein 27*). A Hsp27 é uma chaperona que possui propriedades imunomodulatórias, antioxidantes e anti-inflamatórias, dentre elas a liberação de IL-10 (MYMRIKOV; SEIT-NEBI; GUSEV, 2011). Por fim, Martinez e cols. (2020) demonstraram que o BML-111 aumentou a produção de IL-10 e reduziu a de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TGF, paralelamente à redução no recrutamento de neutrófilo e à ativação de mastócitos na pele de camundongos que haviam recebido radiação UVB. Todos esses efeitos foram prevenidos por um antagonista (BOC-2) para o receptor FPR2/ALX. Diante dos dados da literatura e dos achados dos nossos estudos, sugere-se, então, que a EA esteja ativando uma via de sinalização envolvendo AnxA1 - FPR2/ALX - IL-10.

No entanto, de forma intrigante, nossos achados mostraram que a EA não reduziu as concentrações de TNF e IL-6 e não alterou a atividade da MPO. Em contraposição, Yu e cols. (2020) verificaram que animais que receberam injeção i.pl. de CFA e foram tratados com EA (acupontos ST36 e SP6, 2 e 100 Hz, 20 min.) apresentaram uma diminuição na concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$  (YU et al., 2020) na pata. Liu e cols. (2020) verificaram que a EA de baixa intensidade no acuponto ST36, por 15min, estimulou o eixo nervo vago-adrenal, produzindo efeitos anti-inflamatórios, como a diminuição dos níveis séricos de TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  em animais com inflamação induzida por LPS.

Outro resultado interessante do presente estudo foi que a EA aumentou a atividade da enzima CAT de maneira dependente do receptor FPR2/ALX, embora não tenha alterado os parâmetros de dano oxidativo sobre lipídios (TBARS), a concentração de nitrito/nitrato e a atividade da SOD. Alvarado-Sanchez e cols. (2019) demonstraram que o tratamento com a EA reduziu o estresse oxidativo, diminuindo significativamente os níveis do radical hidroxila e de peroxidação lipídica em ratos com lesão na medula espinal. No entanto, não houve mudanças significativas na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Em estudos com modelos animais de lesão de isquemia e reperfusão, a EA aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx), controlou a geração de ROS e reparou danos causados por espécies



reativas a lipídios, a proteínas e ao DNA (CHEN; HSIEH, 2020). Martinez e cols. (2020) demonstraram que o BML-111 (análogo estável da LXA<sub>4</sub>) restaurou a atividade da CAT e reduziu a produção de superóxido em camundongos com inflamação cutânea induzida por UVB e que esses efeitos foram prevenidos por um antagonista (BOC-2) para o receptor FPR2/ALX.

As divergências entre os nossos achados e os dados da literatura poderiam ser explicadas pela variação dos modelos animais, do protocolo de estimulação da EA e do intervalo de tempo após a indução do modelo e a coleta das estruturas. Embora haja diversas pesquisas mostrando que a EA diminui a concentração de citocinas pró-inflamatórias e parâmetros de dano oxidativo em diferentes modelos animais, até o momento não foram encontrados estudos com o mesmo modelo de dor e o mesmo protocolo de estimulação com EA utilizados nesta pesquisa e que avaliassem a relação dos efeitos da EA sobre citocinas pró-inflamatórias, parâmetros de dano oxidativo e defesa antioxidante e o papel do receptor FPR2/ALX. Diante disso, os achados aqui apresentados contribuem para os dados da literatura e reforçam a necessidades de mais estudos.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, conclui-se que a ação anti-hiperalgésica induzida pelo tratamento com a EA de baixa frequência (2 e 10 Hz), nos acupontos ST36 e SP6, por 20 min., pode estar relacionada com o aumento da concentração de IL-10 e com aumento da atividade da enzima CAT em camundongos com inflamação periférica persistente induzida por CFA, e que essas ações podem ser dependentes, pelo menos em parte, da ativação do receptor FPR2/ALX periférico. Embora a EA tenha aumentado parâmetros anti-inflamatório (IL-10) e antioxidante (atividade da CAT), ela não alterou a concentração das citocinas pró-inflamatórias analisadas nem preveniu o dano oxidativo.

Futuros estudos com outros protocolos de EA e que possam analisar uma maior variedade de citocinas inflamatórias, mediadores pró-resolutivos especializados, bem como as vias de sinalização do receptor FPR2/ALX poderão ajudar a compreender melhor os achados desse estudo.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 4 edição ed. [s.l.] Elsevier, 2009.
- ABRAMSON, S. B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 10, n. SUPPL. 2, p. 1–7, 2008.
- ADACHI, L. N. S. et al. Isoflurane and the Analgesic Effect of Acupuncture and Electroacupuncture in an Animal Model of Neuropathic Pain. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 11, n. 3, p. 97–106, 2018.
- ADWAS, A. A. et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 6, n. 1, p. 43–47, 2019.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1 jan. 1984.
- ALVARADO-SANCHEZ, B. G. et al. Electroacupuncture and Curcumin Promote Oxidative Balance and Motor Function Recovery in Rats Following Traumatic Spinal Cord Injury. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 2, p. 498–506, 2019.
- BÄCK, M. et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 7, p. 389–406, 2019.
- BARAL, P.; UDIT, S.; CHIU, I. M. Pain and immunity : implications for host defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. July, 2019.
- BARROS, N. F. DE; SIEGEL, P.; SIMONI, C. DE. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: passos para o pluralismo na saúde. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 12, p. 3066–3067, 2007.
- BARROT, M. TESTS AND MODELS OF NOCICEPTION AND PAIN IN RODENTS. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, 2012.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 4 ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- BEATRICE, O. et al. Inflammatory pain control by blocking oxidized phospholipid-mediated TRP channel activation. **Scientific Reports**, p. 1–22, 2017.
- BERGE, O.-G. Animal Models of Pain. In: MCMAHON, S. et al. (Eds.). **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. 6 ed. ed. [s.l.] Elsevier, 2013.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–5, 2007.

BONAZ, B.; SINNIGER, V.; PELLISSIER, S. The vagus nerve in the neuro-immune axis: Implications in the pathology of the gastrointestinal tract. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, 2017.

BOVERIS, A. Determination of the Production of Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide in Mitochondria. **Methods in Enzymology**, 1984.

BRADY, S. T. et al. **Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular and medical neurobiology**. [s.l.] Academic Press., 2011.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS: atitude de ampliação de acesso**. [s.l.] Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, M. DA C. T. E I. Resolução Normativa N 30, de 2 de Fevereiro de 2016. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. 2016.

BRENN, D.; RICHTER, F.; SCHAIBLE, H. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat an inflammatory mechanism of joint pain. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 1, p. 351–359, 2007.

CARON, C. V. **Avaliação do envolvimento do receptor ALX/FPR2 periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico induzido pela eletroacupuntura**. [s.l.] UNISUL-Universidade do Sul de Santa Catarina, 2018.

CAVAILLON, J.-M.; SINGER, M. **Inflammation: from molecular and cellular mechanisms to the clinic**. [s.l.] Wiley-VHC, 2018.

CAVAILLON, J. M. Pathogen-associated molecular patterns. In: CAVAILLON, J.-M.; SINGER, M. (Eds.). **Inflammation: from molecular and cellular mechanisms to the clinic**. Weinheim: Wiley-VHC, 2018.

CHEN, C.; HSIEH, C.-L. Effect of Acupuncture on Oxidative Stress Induced by Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. **Antioxidants**, v. 9, n. 248, p. 1–15, 2020.

CHEN, K. et al. Regulation of inflammation by members of the formyl-peptide receptor family. **J Autoimmun.**, v. 85, p. 64–77, 2017.

CHEN, L.; LV, F.; PEI, L. Annexin 1: a glucocorticoid-inducible protein that modulates inflammatory pain. **European Journal of Pain**, v. 18, n. 3, p. 338–347, 2013.

CHEN, Y. et al. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1–11, 2010.

CHENG, L. L. et al. Effects of electroacupuncture of different frequencies on the release profile of endogenous opioid peptides in the central nerve system of goats.

**Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

CHIANG, N.; SERHAN, C. N. Molecular Aspects of Medicine Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 58, p. 114–129, 2017.

CHIMENTI, R. L.; FREY-LAW, L. A.; SLUKA, K. A. A mechanism-based approach to physical therapist management of pain. **Physical Therapy**, v. 98, n. 5, p. 302–314, 2018.

COOK, A. D. et al. Immune Cytokines and their receptors in inflammatory pain. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 3, p. 240–255, 2018.

COORAY, S. N. et al. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 45, p. 18232–18237, 2013.

CORMINBOEUF, O.; LEROY, X. FPR2 / ALXR Agonists and the Resolution of Inflammation. **Journal of Medical Chemistry**, 2014.

COUTAUX, A. et al. **Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms** **Joint Bone Spine** Elsevier Masson SAS, out. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1297319X04000971>>. Acesso em: 9 abr. 2020

CUMPSTEY, A.; FEELISCH, M. Free Radicals in Inflammation. In: CAVAILLON, J.-M.; SINGER, M. (Eds.). **Inflammation: from molecular and cellular mechanisms to the clinic**. [s.l.] Wiley-VHC, 2018.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, 1992.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**, v. 102, n. 5, 2005.

CUZZOCREA, S. Neutrophils. In: CAVAILLON, J. M.; SINGER, M. (Eds.). **Inflammation: from molecular and cellular mechanisms to the clinic**. [s.l.] Wiley-VHC, 2018a.

CUZZOCREA, S. TNF Superfamily. In: CAVAILLON, J.-M.; SINGER, M. (Eds.). **Inflammation: from molecular and cellular mechanisms to the clinic**. [s.l.] Wiley-VHC, 2018b.

DA SILVA, M. D. et al. Involvement of interleukin-10 in the anti-inflammatory effect of Sanyinjiao (SP6) acupuncture in a mouse model of peritonitis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

DA SILVA, M. D. et al. IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for

Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain. **Molecular Neurobiology**, v. 10, 2014.

DANIEL, W. W.; CROSS, C. L. **Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences**. 10 ed. ed. [s.l.] Wiley, 2013.

DE YOUNG, L. M. et al. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, n. 3–4, p. 335–341, 1989.

DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519–550, 2009.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. C, 1990.

DUFTON, N. et al. Anti-Inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 2611–2619, 2010.

DUFTON, N.; PERRETTI, M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 127, n. 2, p. 175–188, 2010.

EIJKELKAMP, N. et al. IL4-10 fusion protein is a Novel drug to Treat persistent inflammatory pain. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 28, p. 7353–7363, 2016.

ELENKOV, I. J. et al. **The sympathetic nerve - An integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system** *Pharmacological Reviews*, 2000.

ERTHAL, V. et al. Anti-inflammatory effect of laser acupuncture in ST36 (Zusanli) acupoint in mouse paw edema. v. 36, 2016.

FERREIRA, S. H. et al. Interleukin-1 $\beta$  as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, n. 6184, p. 698–700, 1988.

FERREIRA, S. H. et al. Dor inflamatória. In: **Dor: Princípios e Prática**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 265–279.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. **Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia** *Br. J. Pharmacol.* [s.l: s.n.].

FILSHIE, J.; WHITE, A.; CUMMINGS, M. (EDS.). **Medical Acupuncture: A Western Scientific Approach**. 2 ed. ed. [s.l.] Elsevier, 2016.

FONTANELLA, F. et al. Conhecimento, acesso e aceitação das práticas integrativas e complementares em saúde por uma comunidade usuária do Sistema Único de Saúde na cidade de Tubarão/SC. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, p. 69–74, 2007.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232–241, 2010.

GABRYŠOVÁ, L. et al. Interleukin-10 in Health and Disease. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 380, p. 157–190, 2014.

GADANI, S. P.; CRONK, J. Interleukin-4: A Cytokine to Remember. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4213–4219, 2012.

GAO, F. et al. Electroacupuncture Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation through CB2 Receptors in Inflammatory Pain. **Brain Behavior and Immunity**, 2018.

GINHOUX, F. et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. **Nature Immunology**, v. 17, n. 1, p. 34–40, 2016.

GOLDMAN, N. et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nature**, v. 13, n. 7, p. 883–888, 2010.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, 1982.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 469–487, 2003.

HACKEL, D. et al. The Connection of Monocytes and Reactive Oxygen Species in Pain. **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.

HAHN, G. F.; OLIVEIRA, J. R. DE; BOCK, P. M. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no diabetes mellitus. **Clin Biomed Res**, v. 37', n. 3, p. 203–213, 2017.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. Tradução d ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda., 2011.

HAN, J. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **TRENDS in Neurosciences**, v. 26, n. 1, p. 17–21, 2003.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, 2015.

HUANG, M. et al. Critical roles of TRPV2 channels, histamine H1 and adenosine A1 receptors in the initiation of acupoint signals for acupuncture analgesia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

HUBACHER, J. et al. Standards for reporting electroacupuncture parameters. **MEDICAL ACUPUNCTURE**, v. 28, n. 5, 2016.

HWANG, I. et al. Non-transcriptional regulation of NLRP3 inflammasome signaling by IL-4. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, n. 6, p. 591–599, 2015.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. **No Title**. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/>>.

Ji, L. Li et al. Effects of electroacupuncture intervention on expression of cyclooxygenase 2 and microglia in spinal cord in rat model of neuropathic pain. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 23, n. 10, p. 786–792, 2016.

JIANG, J. et al. Research trends of systematic review/meta-analysis on acupuncture therapy: A bibliometric analysis. **Journal of Pain Research**, v. 14, 2021.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 49–62, 1 jan. 2015.

KANDEL, E. R. **Princípios da neurociências**. 5 ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

KHAN, A.; ALSAHLI, M.; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, 2018.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 3–11, 2001.

KIM, S. W. et al. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I: Specific interaction model and mapping of the interaction site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, 2001.

KOOPMAN, F. A. et al. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in Rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 29, p. 8284–8289, 2016.

KOVTUN, A. et al. Neutrophils in tissue trauma of the skin, bone, and lung: two sides of the same coin. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–12, 2018.

KUNER, R.; FLOR, H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 20–30, 2017.

LANGEVIN, H. M. et al. Subcutaneous Tissue Fibroblast Cytoskeletal Remodeling Induced by Acupuncture : Evidence for a Mechanotransduction-Based Mechanism. **Journal of Cellular Physiology**, v. 774, n. November 2005, p. 767–774, 2006.

LANGEVIN, H. M.; CHURCHILL, D. L.; CIPOLLA, M. J. Mechanical signaling through connective tissue : a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. **FASEB**, v. 15, p. 2275–2282, 2001.

LANGEVIN, H. M.; WAYNE, P. M. What Is the Point? the Problem with Acupuncture



Research That No One Wants to Talk about. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 24, n. 3, p. 200–207, 2018.

LEÁNEZ, S.; HERVERA, A.; POL, O. Peripheral antinociceptive effects of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptor agonists in NOS2 and NOS1 knockout mice during chronic inflammatory pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 602, n. 1, p. 41–49, 5 jan. 2009.

LEUTI, A.; MACCARRONE, M.; CHIURCHIÙ, V. Proresolving lipid mediators: Endogenous modulators of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 1994.

LI, F. et al. What is the Acupoint? A Preliminary Review of Acupoints. **Pain Medicine**, v. 16, p. 1905–1915, 2015.

LI, N. C. et al. A New Perspective of Acupuncture: The Interaction among Three Networks Leads to Neutralization. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2019a.

LI, Y. et al. Mechanism of electroacupuncture on inflammatory pain: neural-immune-endocrine interactions. **Journal of traditional Chinese medicine**, v. 39, n. 5, p. 740–749, 2019b.

LIAO, H. et al. Electroacupuncture Attenuates CFA-induced Inflammatory Pain by suppressing Nav1.8 through S100B, TRPV1, Opioid, and Adenosine Pathways in Mice. **Nature Publishing Group**, n. January, p. 1–13, 2017a.

LIAO, H. et al. Electroacupuncture attenuates induction of inflammatory pain by regulating opioid and adenosine pathways in mice. **Scientific Reports**, n. July, p. 1–9, 2017b.

LIMA, P. R. **Manual de Acupuntura: direto ao ponto**. 2 ed. ed. Porto Alegre: Zen, 2016.

LIN, J. G.; CHEN, W. L. Acupuncture analgesia: A review of its mechanisms of actions. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 36, n. 4, p. 635–645, 2008.

LIU, S. et al. Somatotopic organization and intensity dependence in driving distinct NPY-expressing sympathetic pathways by electroacupuncture. **Neuron**, v. 108, n. 3, p. 436–450.e7, 2020.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin. **Journal Biological Chemistry**, 1951.

- LU, K. W. et al. Probing the effects and mechanisms of electroacupuncture at ipsilateral or contralateral ST36-ST37 acupoints on CFA-induced inflammatory pain. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–11, 2016.
- LUNDEBERG, T.; LUND, I. Peripheral components of acupuncture stimulation – their contribution to the specific clinical effects of acupuncture. In: FILSHIE, J.; WHITE, A.; CUMMINGS, M. (Eds.). . **Medical Acupuncture: A Western Scientific Approach**. [s.l.] Elsevier, 2016.
- LV, Q. et al. The Involvement of Descending Pain Inhibitory System in Electroacupuncture-Induced Analgesia. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 13, n. August, p. 1–14, 2019.
- MADERNA, P. et al. FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A4 and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. **Faseb**, v. 24, n. 11, p. 4240–4249, 2010.
- MARROCCO, I.; ALTIERI, F.; PELUSO, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- MARTINEZ, R. M. et al. The Lipoxin Receptor/FPR2 Agonist BML-111 Protects Mouse Skin against Ultraviolet B Radiation. **molecules**, v. 25, n. 2953, p. 1–16, 2020.
- MARTINS, D. F. et al. Peripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 166, n. June 2014, p. 157–166, 2015.
- MARTINS, D. F. et al. Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. **Neuroscience**, v. 324, p. 485–495, 2016.
- MAZZARDO-MARTINS, L. et al. Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 470, n. 12, p. 1815–1827, 2018.
- MCARTHUR, S. et al. Definition of a Novel Pathway Centered on Lysophosphatidic Acid To Recruit Monocytes during the Resolution Phase of Tissue Inflammation. **The Journal of Immunology**, n. 15, 2015.
- MCARTHUR, S. et al. Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1156–1167, 2020.
- MEZACK, R.; WALL, P. D. Pain Mechanisms: A New Theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971–979, 1965.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors : a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, p. 501–519, 2006.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, 2002.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, 1972.

MITTAL, M. et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidant e Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1127–1147, 2014.

MOILANEN, E. Two faces of inflammation : an immunopharmacological view. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, p. 2–6, 2014.

MORÉ, A. O. et al. Caffeine at Moderate Doses Can Inhibit Acupuncture-Induced Analgesia in a Mouse Model of Postoperative Pain. **Journal of Caffeine Research**, v. 3, n. 3, p. 143–148, 2013.

MORÉ, A. O. O. **Efeito da acupuntura no modelo de dor pós-operatória em camundongos: investigação do sistema adenosinérgico utilizando a farmacopuntura**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

MORÉ, A. O. O. et al. Acupuncture research in animal models: rationale, needling methods and the urgent need for a standards for reporting interventions in clinical trials of acupuncture—standards for reporting interventions in acupuncture using animal models adaptation. **THE JOURNAL OF ALTERNATIVE AND COMPLEMENTARY MEDICINE**, v. 27, n. 3, p. 193–197, 2021.

MULEY, M. M.; KRUSTEV, E.; MCDOUGALL, J. J. Preclinical assessment of inflammatory pain. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 22, p. 88–101, 2015.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

MYMRIKOV, E. V.; SEIT-NEBI, A. S.; GUSEV, N. B. Large potentials of small heat shock Proteins. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1123–1159, 2011.

NC3RS. Responsibility in the use of animals in bioscience research. n. April, p. 1–24, 2019.

NELSON, J. W. et al. ALX/FPR2 receptor for RvD1 is expressed and functional in salivary glands. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 306, n. 2, p. 178–185, 2014.

NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation Mihai. **Nat Immunol.**, v. 18, n. 8, p. 826–831, 2017.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free**

**Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 5, p. 469–484, 2009.

NIKI, E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 19–24, 2016.

OLOFSSON, P. S.; METZ, C. N.; PAVLOV, V. A. The Neuroimmune Communicatome in Inflammation. In: CAVAILLON, J.-M.; SINGER, M. (Eds.). . **Inflammation: from molecular and cellular mechanisms to the clinic**. [s.l.] Wiley-VHC, 2018.

OUYANG, W.; O’GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871–891, 2019.

PARK, J. et al. From Peripheral to Central: The Role of ERK Signaling Pathway in Acupuncture Analgesia. **The Journal of Pain**, v. 15, n. 5, p. 535–549, 2014.

PAVLOV, V. A. et al. The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway : A Missing Link in Neuroimmunomodulation. **Molecular medicine**, v. 9, n. 5–8, p. 125–134, 2003.

PAVLOV, V. A.; CHAVAN, S. S.; TRACEY, K. J. Molecular and Functional Neuroscience in Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 783–812, 2018.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex - linking immunity and metabolism. **Nature Revue Endocrinology**, v. 8(12), n. 12, p. 743–754, 2012.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. **Neural circuitry and immunity**. [s.l: s.n.]. v. 63

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulation of immunity: Molecular mechanisms and clinical translation. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 156–166, 2017.

PERCIE, N. et al. The ARRIVE guidelines 2 . 0 : Updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, p. 1–12, 2020.

PERRETTI, M. et al. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 87–99, 2017.

PERRETTI, M.; D’ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, 2009.

PERRETTI, M.; GODSON, C. Formyl peptide receptor type 2 agonists to kick-start resolution pharmacology. **Br. J. Pharmacol**, n. June, p. 1–6, 2020.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI-JUNIOR, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron – Immune Interactions in Pain and In fl ammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017.

QUIROZ-GONZÁLEZ, S. et al. Psychoneurobiomodulation: an emerging concept to

understand the systemic effects of neurophysiological acupuncture. **Longhua Chinese Medicine**, v. 2, p. 21–21, 2019.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain : concepts , challenges , and compromises. **Pain**, 2020.

RANNEH, Y.; ALI, F.; AKIM, A. Crosstalk between reactive oxygen species and pro-inflammatory markers in developing various chronic diseases : a review. **Applied Biological Chemistry**, 2017.

RITTER, A. M. V. et al. Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, v. 21, p. 187–197, 2012.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, n. December, p. 1445–1452, 2017.

SALVEMINI, D. et al. Roles of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pain. **Free Radic Biol Med.**, v. 51, n. 5, p. 951–966, 2011.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 15 mar. 2010.

SEDGER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. **TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future** **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2014.

SEKIDO, R.; ISHIMARU, K.; SAKITA, M. Differences of electroacupuncture-induced analgesic effect in normal and inflammatory conditions in rats. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 31, n. 6, 2003.

SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation : state of the art , definitions and terms. **FASEB**, v. 21, n. 2, p. 325–332, 2007.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, p. 92–101, 2014.

SERHAN, C. N. Treating inflammation and infection in the 21st century : new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. **FASEB**, p. 1–17, 2017.

SERHAN, C. N. et al. The Atlas of Inflammation-Resolution ( AIR ). 2020.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DYKE, T. E. VAN. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro- resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol.**, v. 8, n. 5, p. 349–361, 2008.

SHALOVA, I. N.; SAHA, S.; BISWAS, S. K. Monocytes and macrophages. In: CAVAILLON, J.-M.; SINGER, M. (Eds.). . **Inflammation: from molecular and cellular mechanisms to the clinic**. [s.l.] Wiley-VHC, 2018.

SHIMIZU, S. et al. Pro-resolution mediator lipoxin A4 and Its receptor in upper airway inflammation. **Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology**, 2013.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017.

SINGH, A. K.; VINAYAK, M. Resveratrol alleviates inflammatory hyperalgesia by modulation of reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzymes and ERK activation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 10, p. 911–921, 2017.

SOUZA, D. G. et al. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 8533–8543, 2007.

SOUZA, J. B. DE et al. Prevalence of chronic pain , treatments , perception , and interference on life activities : Brazilian population-based survey. **Pain Research and Management**, v. 2017, 2017.

SPITE, M.; SERHAN, C. N. Roles of Specialized Proresolving Lipid Mediators in Inflammation Resolution and Tissue Repair. In: CAVAILLON, J.-M.; SINGER, M. (Eds.). **Inflammation: from molecular and cellular mechanisms to the clinic**. [s.l.] Wiley-VHC, 2018.

SU, T. et al. Electroacupuncture reduces the expression of proinflammatory cytokines in inflamed skin tissues through activation of cannabinoid CB2 receptors. **European Journal of Pain**, v. 16, p. 624–635, 2012.

SU, Y.-S. Molecular mechanism of inflammatory pain. **World Journal of Anesthesiology**, v. 3, n. 1, p. 71, 2014.

SUGIMOTO, M. A. et al. Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance. **Journal of Immunology Research**, p. 1–13, 2016.

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

TAN, H. et al. Understanding Acupoint Sensitization : A Narrative Review on Phenomena , Potential Mechanism , and Clinical Application. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–9, 2019.

TELESI-JÚNIOR, E. Práticas integrativas e complementares em saúde, uma nova eficácia para o SUS. **Estudos Avançados**, v. 30, n. 86, p. 99–112, 2016.

TORRES-ROSAS, R. et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. **Nature Medicine**, v. 20, n. 3, 2014.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. v. 9, n. 6, p. 418–428, 2009.

TRENTO, M. M. S. et al. Peripheral receptors and neuromediators involved in the antihyperalgesic effects of acupuncture: a state-of-the-art review. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, 2021.

TREVISANI, M. et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **PN**, v. 104, n. 33, p. 13519–13524, 2007.

ULLOA, L.; QUIROZ-GONZALEZ, S.; TORRES-ROSAS, R. Nerve stimulation: immunomodulation and control of inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 12, p. 1103–1120, 2017.

VANDERWALL, A. G.; MILLIGAN, E. D. Cytokines in Pain: Harnessing Endogenous Anti-Inflammatory Signaling for Improved Pain Management. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. December, p. 1–15, 2019.

VARDEH, D.; MANNION, R. J.; WOOLF, C. J. **Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis** *Journal of Pain*, 2016.

VERRI JUNIOR, W. A. et al. Cytokine inhibitors and pain control. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 5, p. 341–353, 2007.

VICKERS, A. J. et al. Acupuncture for chronic pain: Update of an individual patient data meta-analysis. **The Journal of Pain**, v. 5, n. 19, p. 455–474, 2018.

VIEIRA, C. et al. Electroacupuncture decreases inflammatory pain through a pro-resolving mechanism involving the peripheral annexin A1-formyl peptide receptor 2/ALX-opioid receptor pathway. **Pflugers Arch - Eur J Physiol**, 2021.

WAECHTER, V. **Role of the lipoxin A4 receptor in inflammation**. [s.l.] University of Zurich, Faculty of Science, 2010.

WANG, Z. et al. Electro-Acupuncture at Zusanli Acupoint (ST36) Suppresses Inflammation in Allergic Contact Dermatitis Via Triggering Local IL-10 Production and Inhibiting p38 MAPK Activation. **Inflammation**, v. 40, n. 4, p. 1351–1364, 2017.

WEN, G. et al. Effect of Acupuncture on Neurotransmitters/Modulators. In: XIA, Y. et al. (Eds.). **Acupuncture Therapy for Neurological Diseases: a Neurobiological View**. [s.l.] Springer, 2010.

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

WHITTAKER, P. Laser acupuncture : past , present , and future. **Lasers in Medical Science**, v. 19, p. 69–80, 2004.

WILLMAN, A. et al. The psycho-social dimension of pain and health-related quality of life in the oldest old. **Scandinavian Journal of Caring Sciences**, v. 27, n. 3, p. 534–

540, 2013.

WINTHER, M.; DAHLGREN, C.; FORSMAN, H. Formyl peptide receptors in mice and men : similarities and differences in recognition of conventional ligands and modulating lipopeptides. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 122, p. 191–198, 2018.

WOOLF, C. J. Review series introduction What is this thing called pain ? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 10–12, 2010.

WU, H. et al. Electroacupuncture and Moxibustion Promote Neutrophil Apoptosis and Improve Ulcerative Colitis in Rats. **Dig Dis Sci**, v. 52, p. 379–384, 2007.

YAM, M. F.; LOH, Y. C.; OO, C. W. Overview of Neurological Mechanism of Pain Profile Used for Animal “ Pain-Like ” Behavioral Study with Proposed Analgesic Pathways. **International Journal of Molecular Science**, p. 1–26, 2020.

YANG, Y. H.; MORAND, E.; LEECH, M. Annexin A1 : potential for glucocorticoid. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. October, p. 595–603, 2013.

YE, R. D. et al. International union of basic and clinical pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacological Reviews American Society for Pharmacology and Experimental Therapy**, 2009.

YEN, C. M. et al. Distal electroacupuncture at the LI4 acupoint reduces CFA-induced inflammatory pain via the brain TRPV1 signaling pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1–13, 2019.

YIN, C. S. et al. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 159–165, 2008.

YU, M. et al. Electroacupuncture Relieves Pain and Attenuates Inflammation Progression Through Inducing IL-10 Production in CFA-Induced Mice. **Inflammation**, 20 mar. 2020.

ZHANG, D. et al. Role of mast cells in acupuncture effect: a pilot study. **Explore**, v. 4, n. 3, p. 170–177, 2008.

ZHANG, H.; HAN, G.; LITSCHER, G. Traditional Acupuncture Meets Modern Nanotechnology : Opportunities and Perspectives. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2019.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int Anesthesiol Clin.**, v. 69, n. 2, p. 482–489, 2009.

ZHANG, R.-X. et al. Electroacupuncture Attenuates Inflammation in a Rat Model. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, n. 1, p. 135–142, 2005.

ZHANG, R. et al. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain.



**Anesthesiology**, v. 120, n. 2, p. 482–503, 2014.

ZHANG, X. C. et al. Acupuncture therapy for fibromyalgia: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Pain Research**, v. 12, p. 527–542, 2019.

ZHANG, Z. J.; WANG, X. M.; MCALONAN, G. M. Neural acupuncture unit: a new concept for interpreting effects and mechanisms of acupuncture. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 85, n. 4, p. 355–375, 2008.

ZHOU, F.; HUANG, D.; XIA, Y. Neuroanatomic Basis of Acupuncture Points. In: XIA, Y. et al. (Eds.). . **Acupuncture Therapy for Neurological Diseases: a Neurobiological View**. [s.l.] Springer, 2010.

ZIMMERMANN, M. **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals** **Pain**, 1983.

## ANEXO A



Universidade Federal  
de Santa Catarina

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO MECANISMO NEUROFISIOLÓGICO DOS EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA DE BAIXA FREQUÊNCIA SOBRE A RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO", protocolada sob o CEUA nº 2228260819 (ID 001425), sob a responsabilidade de **Leidiane Mazzardo Martins e equipe; Daniel Fernandes Martins; FERNANDA TANAKA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 15/10/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE NEUROPHYSIOLOGICAL MECHANISM OF THE EFFECTS OF LOW FREQUENCY ELETROACUPUNCTURE ON THE RESOLUTION OF INFLAMMATION", utilizing 240 Heterogenics mice (240 males), protocol number CEUA 2228260819 (ID 001425), under the responsibility of **Leidiane Mazzardo Martins and team; Daniel Fernandes Martins; FERNANDA TANAKA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 10/15/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2019](#) a [03/2021](#) Área: [Ciências Morfológicas](#)

Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [45 a 60 dias](#)

N: [240](#)

Linhagem: [swiss](#)

Peso: [30 a 40 g](#)

Local do experimento: Testes comportamentais, tratamento e análises bioquímicas no Laboratório de Neurociências Experimental - LaNex - UNISUL

Florianópolis, 03 de novembro de 2019

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina