



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

**ATIVIDADE ANALGÉSICA E ALTERAÇÕES NA METABOLÔMICA APÓS A
ESTIMULAÇÃO MANUAL DO ACUPONTO “SPLEEN” 6 (SP6) EM MODELO DE
DOR NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS**

LUIZA BORGES GENTIL

Florianópolis

2023

Luiza Borges Gentil

**ATIVIDADE ANALGÉSICA E ALTERAÇÕES NA METABOLÔMICA APÓS A
ESTIMULAÇÃO MANUAL DO ACUPONTO “SPLEEN” 6 (SP6) EM MODELO DE
DOR NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas, Campus Florianópolis, da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Morgana Duarte da Silva.

Florianópolis

2023

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

Gentil, Luiza

ATIVIDADE ANALGÉSICA E ALTERAÇÕES NA METABOLÔMICA APÓS A
ESTIMULAÇÃO MANUAL DO ACUPONTO "SPLEEN" 6 (SP6) EM MODELO DE
DOR NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS / Luiza Gentil ;
orientadora, Morgana Duarte da Silva, 2023.

62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Neuropatia. 3. Dor. 4.
Metabolômica. I. Duarte da Silva, Morgana. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Neurociências. III. Título.

Luiza Borges Gentil

ATIVIDADE ANALGÉSICA E ALTERAÇÕES NA METABOLÔMICA APÓS A ESTIMULAÇÃO MANUAL DO ACUPONTO “SPLEEN” 6 (SP6) EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS

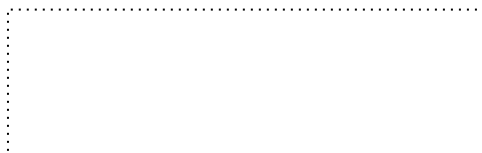
O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 31 de março de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Patricia de Souza Brocardo, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

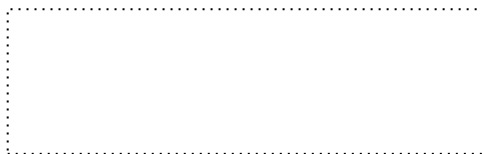
Prof.(a) Franciane Bobinski, Dr.(a)
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof.(a) Morgana Duarte da Silva, Dr.(a)
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 Mestra em Neurociências.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



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

Florianópolis, 2023.

Dedico o presente trabalho ao professor Doutor Adair Roberto dos Santos (in memoriam), que encontrei pessoalmente apenas duas vezes e ainda assim mudou-me a vida quando aceitou-me como orientanda, demonstrando que é possível ser humilde, agregador e simpático enquanto também se é genial e divertido.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), assim como a toda a equipe, especialmente Marcos e Caroline, cuja ajuda foi imprescindível;

À orientadora Dra. Morgana, cuja paciência e tranquilidade conjugadas a um cérebro veloz foram de suma importância para mim como acadêmica e como pessoa;

Ao Dr. Cameron, que me convidou a fazer mestrado e acabou precisando se afastar do experimento por problemas com o Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO);

Ao Dr. Ari, do Ambulatório de Acupuntura do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, que ajudou com material, pessoal e espaço;

Ao Dr. Carlos, responsável pelo Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica e por tornar possível a metabolômica no presente trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 DOR.....	11
1.2 DOR NEUROPÁTICA	13
1.3 ACUPUNTURA NO TRATAMENTO DA DOR	18
1.3.1 Mecanismos de ação da acupuntura	22
1.3.2 Metabólitos envolvidos nos mecanismos de ação da acupuntura.....	25
JUSTIFICATIVA	28
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 ANIMAIS	29
3.2 PROCEDIMENTOS.....	30
3.2.1 Modelo animal de dor neuropática crônica	30
3.2.1 Tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6	31
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
3.4 AVALIAÇÕES.....	35
3.4.1 Avaliação de hiperalgesia mecânica após procedimento de LPNC e intervenção com acupuntura manual no acuponto SP6.....	35
3.4.1 Avaliação de hiperalgesia térmica ao calor após procedimento de LPNC e intervenção com acupuntura manual no acupontos SP6	36
3.4.3 Avaliação de hiperalgesia térmica ao frio após procedimento de LPNC e intervenção com acupuntura manual no acupontos SP6	37
3.5 EUTANÁSIA E COLETA DE SANGUE.....	38
3.6 ANÁLISE DA METABOLÔMICA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/MS)	39
3.6.1 Preparação das amostras.....	39

3.6.2 Análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (GC-TOF/MS)	39
3.7 PROCESSAMENTO DOS DADOS E ESTATÍSTICA	40
4. RESULTADOS	41
4.1 O TRATAMENTO COM ACUPUNTURA NO ACUPONTO SP6 É CAPAZ DE REDUZIR A HIPERALGESIA MECÂNICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LPNC (LIGADURA PARCIAL DO NERVO CIÁTICO) DE FORMA PERSISTENTE	41
4.2 O TRATAMENTO COM ACUPUNTURA NO ACUPONTO SP6 É CAPAZ DE REDUZIR A HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LPNC, MAS NÃO INTERFERE NA HIPERALGESIA AO FRIO	44
4.3 A ACUPUNTURA MANUAL É CAPAZ DE ALTERAR O METABOLISMO EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM O ACUPONTO SP6 APÓS LPNC.....	46
5. DISCUSSÃO	47
5.1 A TERAPIA COM ACUPUNTURA MANUAL NO ACUPONTO SP6 APRESENTA AÇÃO ANALGÉSICA PERSISTENTE NO MODELO DE NEUROPATIA INDUZIDO PELA LPNC	48
5.2 O TRATAMENTO COM ACUPUNTURA NO ACUPONTO SP6 É CAPAZ DE REDUZIR A HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LPNC, MAS NÃO INTERFERE NA HIPERALGESIA AO FRIO	51
5.3 A ACUPUNTURA MANUAL ALTERA O METABOLISMO EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM O ACUPONTO SP6 APÓS LPNC	52
5.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS	56
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58

RESUMO

A dor neuropática possui difícil tratamento pois os fármacos disponíveis são parcialmente eficazes e trazem efeitos adversos. Isso faz com que profissionais e população busquem alternativas como a acupuntura que, ainda que controversa, é considerada segura e eficaz. Portanto, o objetivo desse estudo é investigar o efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 sobre a metabolômica de camundongos com dor neuropática crônica induzida por ligadura parcial do nervo ciático (LPNC). Na presente pesquisa foram utilizados camundongos Swiss e os grupos experimentais separados em duas etapas: (1) OP (Operado, animais submetidos à LPNC que não receberam qualquer tratamento), grupo FO (Falso Operado, submetidos ao procedimento cirúrgico, mas o nervo ciático não foi ligado) e grupo SP6 (operados e tratados com acupuntura manual no acuponto SP6). Os animais foram avaliados antes da cirurgia e diariamente após o início dos tratamentos (7 dias após a LPNC) com relação à hiperalgesia mecânica e em dias alternados desde o primeiro tratamento, nas mesmas datas em que foi realizada a acupuntura, até o 21º dia de tratamento quanto à hiperalgesia térmica ao calor (Hargreaves) e ao frio (Placa fria, 10º Celsius). Durante a segunda etapa, novos camundongos foram distribuídos em: grupo FO (falsamente operados e sem tratamento); SP6 (falsamente operados e tratados com acupuntura); OP (submetidos à LPNC e sem tratamento); LPNC+SP6 (operados e tratados com acupuntura). Ao término dos tratamentos, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue. Nos testes comportamentais foi confirmada a hiperalgesia mecânica e térmica ao calor e ao frio induzido pela LPNC. Além disso, observou-se a redução da hiperalgesia mecânica induzida pelo tratamento com acupuntura que perdurou por até 1 hora no primeiro tratamento. De forma interessante, notamos um aumento gradual da duração do efeito da acupuntura com a realização de mais sessões, sendo que com cinco tratamentos o efeito analgésico perdurou por seis horas e após oito tratamentos o efeito durou 24 horas. Após dez tratamentos, o efeito da acupuntura perdura por mais tempo. Além disso, a terapia diminuiu a hiperalgesia térmica ao calor, porém não influenciou a hiperalgesia ao frio. A análise metabolômica evidenciou alterações metabólicas nos camundongos, com diferença significativa apenas nas substâncias: ácido araquidônico, ácido cis-10-heptadecenoico e ácido butanodiólico; e com diferença significativa entre o LPNC+SP6 e os outros três grupos na substância glicerol. Mais do que isso, vieram à luz possíveis marcadores de acupuntura: oito substâncias foram encontradas nos camundongos operados ou falso-operados tratados no acuponto SP6 e não nos outros animais. Concluindo, a acupuntura reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica dos animais com neuropatia. A intervenção demonstrou efeito gradualmente mais persistente com a realização de múltiplas sessões. Diferentes metabólitos parecem participar do mecanismo da acupuntura nesse processo.

Palavras-chaves: Neuropatia, Dor, Metabolômica.

ABSTRACT

Neuropathic pain is difficult to treat as the available drugs are partially effective and have side effects. This leads professionals and the population to seek alternatives such as acupuncture, which, although controversial, is considered safe and effective. Therefore, this study aims to investigate the effect of manual acupuncture in acupoint SP6 on the metabolomics of mice with chronic neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation (PSNL). We used Swiss mice and separated them into experimental groups: In the first cohort: (1) OP (Operated, animals submitted to PSNL that did not receive any treatment), FO group (False Operated, submitted to the surgical procedure but the sciatic nerve was not ligated), and SP6 group (operated and treated with manual acupuncture at the SP6 acupoint). The animals were evaluated before the surgery and daily after the beginning of treatments (7 days after PSNL) for mechanical hyperalgesia and on alternate days from the first treatment, on the same dates when acupuncture was performed, until the 21st day of treatment for thermal hyperalgesia to heat (Hargreaves) and cold (cold plate, 10° Celsius). In the second cohort, mice were distributed in the FO group (falsely operated with no treatment); SP6 (falsely operated and treated with acupuncture); OP (submitted to PSNL with no treatment); PSNL +SP6 (underwent surgery and treated with acupuncture). The animals were euthanized for blood collection at the end of the treatments. Behavioral tests confirmed the mechanical and thermal hyperalgesia to heat and cold-induced by PSNL. In addition, we observed a reduction of mechanical hyperalgesia induced by acupuncture treatment that lasted up to 1 hour in the first treatment. Interestingly, we noticed a gradual increase in the duration of the acupuncture effect with more sessions; with five treatments the analgesic effect lasted for six hours. After eight treatments, the effect lasted for 24 hours. After ten treatments, the impact of acupuncture lasted for days. Furthermore, the therapy decreased thermal hyperalgesia to heat, but did not influence cold-induced hyperalgesia. Metabolomic analysis showed metabolic alterations in the mice, with a significant difference only in the substances: arachidonic acid, cis-10-heptadecenoic acid, and butanedioic acid; and with a significant difference between LPNC+SP6 and the other three groups in the substance glycerol. More than that, possible markers of acupuncture came to light: eight substances were found in the operated or sham-operated mice treated at the SP6 acupoint and not in the other animals. In conclusion, acupuncture reduced mechanical and thermal hyperalgesia in animals with neuropathy. The intervention demonstrated a gradually more persistent effect with multiple sessions. Different metabolites seem to participate in the mechanism of acupuncture in this process.

Keywords: Neuropathy, Pain, Metabolomics.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR

A dor é uma reação neurosensorial resultante do evento de sinalização de estímulos nocivos iniciado em estruturas localizadas no sistema nervoso periférico (SNP) e conduzido até diferentes locais do sistema nervoso central (SNC) (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM; BAUTISTA; SCHERRER *et al.*, 2009). Ela é importante como sistema de alerta para ameaças reais ou iminentes de lesões, acionando no organismo respostas de proteção. Em condições habituais, a sensação dolorosa serve para proteção e adaptação do nosso corpo (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (sigla em inglês - IASP) apresenta a definição revisada de dor como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial”. A mesma instituição vai mais além, quando estabelece que, considerando que diversos indivíduos relatam dor na ausência de danos aos tecidos ou qualquer provável causa fisiopatológica, comumente por razões psicológicas, e não existem meios de distinguir sua experiência daquela devida a danos dos tecidos baseando-se no relatório subjetivo, deve-se aceitar como dor essa experiência se eles a consideram como dor e se a relatam da mesma maneira que a dor resultante de danos aos tecidos (RAJA; CARR; COHEN *et al.*, 2020).

Dessa forma, há vários fatores constitucionais, situacionais, comportamentais e emocionais capazes de influenciar a percepção de dor em um indivíduo, fazendo com que um estímulo nocivo de intensidade semelhante provoque reações diversas em sujeitos distintos. Esses fatores colaboram para tornar complexo o estudo da dor em humanos, considerando a influência do estado emocional e cultural na maneira de encarar e expressar essa sensação.

Aspectos emocionais também influenciam a dor que um animal é capaz de sentir. Contudo, em estudos pré-clínicos com animais, tais fatores usualmente não são abordados ou aprofundados. Neste contexto, em animais é possível mensurar de forma relativamente precisa os eventos neurossensoriais da dor através da avaliação da nocicepção (RUSSO; BROSE, 1998; TJØLSEN; HOLE, 1997).

A sinalização do evento nocivo (nocicepção) é gerada por um órgão sensorial responsável especificamente pela dor (SHERRINGTON, 1906; PERL, 2007). A terminação periférica do neurônio sensorial (neurônio nociceptivo) é chamada de nociceptor, atuando como um receptor, transduzindo e decodificando um sinal nocivo (ou potencialmente nocivo) em potencial de ação do neurônio (LOESER; TREEDE, 2008). O processo neuronal de interpretação e percepção de estímulos nocivos acontece em diferentes etapas denominadas: transdução, condução, transmissão, modulação e percepção (KANDEL, 2014). Assim, os nociceptores são capazes de detectar estímulos mecânicos, térmicos e químicos nocivos e os transduzir em potenciais de ação (transdução) despolarizando neurônios sensoriais primários. Em seguida, esses potenciais de ação são conduzidos do Sistema Nervo Periférico (SNP) até o Sistema Nervoso Central (SNC) através das fibras dos neurônios nociceptivos primários do tipo A-delta ($A\delta$) e do tipo C. Esses neurônios aferentes primários possuem seus corpos celulares nos gânglios sensoriais dos nervos espinais e entram no SNC pelo corno posterior da medula espinal (CPME) (condução). Posteriormente, há liberação de neurotransmissores que são reconhecidos pelos receptores pós-sinápticos dos neurônios do CPME (neurônios de segunda ordem) transmitindo a informação do SNP ao SNC (transmissão). Assim, a informação ascende para centros encefálicos superiores, sendo cinco as principais vias ascendentes: espinotalâmica, espinoreticular, espinomesencefálica, cervicotalâmica e espino-hipotalâmica. A etapa de modulação da dor relaciona-se aos impulsos descendentes inibitórios ou facilitadores que modulam a transmissão nociceptiva, especialmente na medula espinal. Finalmente, acontece no córtex a última parte do processo de sinalização nociceptiva, a percepção, que corresponde à experiência física e emocional em resposta ao estímulo nociceptivo (KANDEL, 2014; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017).

Devido à sua complexidade, a dor foi classificada por alguns autores de acordo com seus mecanismos ou tempo de duração. Com relação à duração, ela pode ser considerada aguda ou crônica. A dor aguda acontece após ativação dos nociceptores, sendo transitória e na maior parte das vezes se extinguindo após o estímulo que a desencadeou cessar. Enquanto isso, uma sensação dolorosa que persiste por mais de três meses torna-se crônica, estando normalmente associada a quadros de infecção ou inflamação. É possível inclusive que a dor crônica permaneça mesmo após a cura ou recuperação total da lesão tecidual que inicialmente induziu a dor. A cadeia de eventos dos conhecidos caminhos multissinápticos, responsáveis por mediar as condições de dor levando a informação da periferia até diversos locais do SNC, apresenta alterações nos casos de dores crônicas (LONG; BENDEBBA; TORGERSON *et al*, 1996; MILLAN, 1999; MILLIGAN; WATKINS, 2009). Assim, a dor crônica é descrita como um estado facilitatório de condução nervosa, onde estímulos inócuos possivelmente são interpretados como dor (alodínia) ou onde o estímulo doloroso gera uma resposta desproporcional à sua intensidade (hiperalgesia) (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006; KEPLER; MARKOVA; DIBRA *et al*, 2013). Além disso, a dor pode ser classificada quanto aos mecanismos biológicos como: nociceptiva, nociplástica ou neuropática. A ativação de nociceptores provoca dor nociceptiva, já uma lesão no sistema nervoso somatossensorial provoca dor neuropática e alterações do processamento central da dor provocam dor nociplástica (CHIMENTI; A FREY-LAW; A SLUKA, 2018).

1.2 DOR NEUROPÁTICA

Uma revisão sistemática de 2021 demonstrou a prevalência de dor crônica no Brasil. Ela variou de 23,02 a 76,17%, com média nacional de 45,59% entre os 35 trabalhos utilizados na revisão, afetando mais o sexo feminino. Dentre as classificações de mecanismos da IASP, a dor neuropática ficou em segundo lugar com 14,5%, perdendo apenas para a dor provavelmente

nociceptiva que foi mais prevalente em 36,70% dos casos (AGUIAR; SOUZA; BARBOSA *et al.*, 2021).

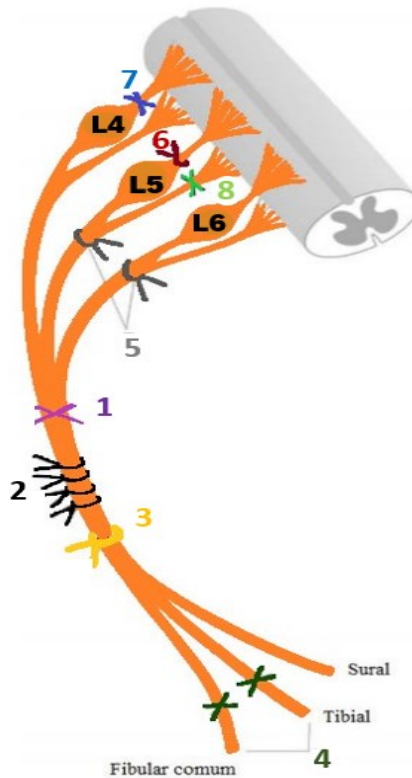
A dor neuropática está muitas vezes associada ao trauma direto e/ou à inflamação de nervos periféricos, mas pode surgir em casos de doenças metabólicas, neurodegenerativas, tumores, infecções, intoxicações, entre outros (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007; BARON, 2006). Essa dor é originada de uma lesão ou doença do sistema somatossensorial, atingindo em cerca de 7 a 10% da população em geral (VAN HECKE; AUSTIN; KHAN *et al.*, 2014). As fibras neuronais envolvidas nas disfunções periféricas que provocam dor neuropática são em sua maioria fibras do tipo C, com menor diâmetro e baixa velocidade de condução se comparadas com fibras A ou B, além de não apresentarem bainha de mielina, e fibras do tipo A mielinizadas (fibras A β e A δ) (KLUSÁKOVÁ; DUBOVÝ, 2009; FINNERUP; HAROUTOUNIAN; KAMERMAN *et al.*, 2016). A dor neuropática pode tornar-se crônica e, nesse caso, os sintomas incluem parestesia, diminuição de força e perda de reflexos profundos dos tendões na área neural afetada, dor espontânea, dor estímulo-dependente, entre outros (FINNERUP; KUNER; JENSEN, 2021; BARON; BINDER; WASNER, 2010; GILRON; WATSON; CAHILL *et al.*, 2006). De fato, os indivíduos afetados referem parestesias, como sensação de queimação ou “choques” e dor causada por estímulos não nocivos (alodínia), que, caso não cessem, provavelmente se tornarão crônicos e com resposta diminuída aos analgésicos (BENER; VERJEE; DAFEEAH *et al.*, 2013). Ainda, ela pode ser acompanhada de dor na área de inervação correspondente mesmo após o fator causal do dano tecidual ter sido eliminado. Por exemplo, a dor com sensação de “rasgo” e o queimor persistentes após o herpes zoster, muitas vezes associada a sintomas autonômicos, como irritabilidade e agitação (BANNISTER; SACHAU; BARON *et al.*, 2020). Indivíduos com dor neuropática apresentam distúrbios do sono, ansiedade e depressão, uma vez que a qualidade de vida é mais prejudicada (ATTAL; LANTERI-MINET; LAURENT *et al.*, 2011; FINNERUP; HAROUTOUNIAN; KAMERMAN *et al.*, 2016).

Além disso, a dor neuropática também produz alterações metabólicas importantes. Um ensaio clínico de 2016 com 74 pacientes encontrou alterações na metabolômica de pacientes com dor neuropática que os distinguiam de pacientes com dor nociceptiva e de pacientes sem qualquer dor relatada (FINCO; LOCCI; MURA *et al.*, 2016). Mais especificamente no metabolismo dos lipídios, pesquisa com ratos evidenciou 106 lipídios significativamente alterados em animais submetidos a um modelo de dor neuropática por esmagamento do nervo ciático, cinco semanas após a lesão (níveis aumentados de triglicerídeos e lipídios contendo ácido palmítico esterificado e diminuição nos lipídios contendo ácido araquidônico) (SENKO; GOROVAYA; STEKOLSHCHIKOVA *et al.*, 2022).

Trabalhos com experimentação de dor em seres humanos são complicados por sua característica subjetiva e limitações éticas; portanto, é amplamente aproveitado o recurso de modelos experimentais de dor em animais de laboratório (MOGIL, 2009). Um dos modelos animais para dor neuropática bastante utilizados em ratos e camundongos é confeccionado através da lesão no nervo ciático, o que pode ser realizado de diversas maneiras, como injúria mecânica (secção, esmagamento ou compressão), química, metabólica ou imunológica tendo como alvo o nervo, gânglio ou medula espinal (SORKIN; YAKSH, 2009). O modelo de constrição ou ligadura parcial do nervo ciático (CPNC ou LPNC) corresponde a uma lesão física por compressão provocada no nervo e objetiva simular uma contusão nervosa. A constrição é produzida através de um procedimento onde são utilizados uma agulha curva e fio de seda para capturar e comprimir aproximadamente um terço a metade do nervo em questão, de maneira que aproximadamente 50% das fibras nervosas sejam danificadas (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). A LPNC é amplamente utilizada, especialmente por sua característica de produzir sinais comportamentais de dor neuropática enquanto poupa um número suficiente de fibras para que o membro inferior não seja demasiadamente prejudicado motor ou sensorialmente (MCMAHON; KOLTZENBURG; TRACEY *et al.*, 2006). Outros modelos experimentais descritos para o mesmo tipo de dor em roedores também são baseados em danos mecânicos a estruturas nervosas periféricas, conforme está demonstrado na Figura 01: transecção do nervo ciático (WALL *et al.*, 1979); lesão por constrição crônica, que consiste na

realização de quatro suturas em torno do nervo ciático, restringindo-o em intervalos de 1 mm (BENNET e XIE, 1988); lesão poupadora do nervo ou lesão limitada do nervo, onde são seccionados os nervos fibular e tibial posterior, mas é poupado o sural, provocando alterações comportamentais de longa duração (DECOSTERD e WOOLF, 2000); ligadura dos nervos espinais L5/L6, na qual faz-se uma ligação dos nervos espinais (distal ao gânglio na raiz dorsal - L5 e L6), mas permanece intacto o nervo em L4, produzindo lesão do nervo ciático sem perda sensorial e atividades motoras (KIM; CHUNG, 1992); constrição da raiz dorsal (TABO *et al.*, 1999); rizotomia dorsal (LOMBARD *et al.*, 1979); e rizotomia Ventral (LI *et al.*, 2002).

Figura 01: Modelos experimentais de dor neuropática utilizados em ratos e camundongos.



Modelos experimentais de dor neuropática utilizados em ratos e camundongos. Os modelos são confeccionados por indução de danos mecânicos às estruturas nervosas periféricas: (1) Transecção do nervo ciático (WALL;

DEVOR; INBAL *et al.*, 1979); (2) Lesão por constrição crônica (BENNET; XIE, 1988); (3) Ligadura parcial do nervo ciático (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990); (4) Modelo de lesão do nervo poupadora (DECOSTERD; WOOLF, 2000); (5) Ligadura dos nervos espinais L5/L6 (KIM; CHUNG, 1992); (6) Constrição da raiz dorsal (TABO; JINKS; EISELE *et al.*, 1999); (7) Rizotomia dorsal (LOMBARD; NASHOLD; ALBE-FESSARD, 1979); (8) Rizotomia Ventral (LI *et al.*, 2002). Fonte: Adaptado de Klusáková e Dubový (2009).

Com relação ao tratamento da dor neuropática, este ainda é considerado um desafio, especialmente porque a tradução clínica dos agentes farmacológicos é limitada, poucas alternativas terapêuticas inovadoras são ofertadas e as terapias disponíveis são apenas parcialmente eficazes e muitas vezes trazem efeitos colaterais negativos substanciais para uma porção da população (GHAZISAEIDI; MULEY; SALTER, 2023). Ademais, é extremamente relevante que se mantenha em destaque a associação entre dor neuropática e o incremento da prescrição de medicamentos e aumento da necessidade de consultas médicas (MOULIN; A BOULANGER; CLARK *et al.*, 2014). De fato, a complexidade e diversidade de mecanismos da dor neuropática a tornam desafiadora. Os métodos de tratamento reconhecidos incluem a terapia farmacológica e a terapia de intervenção, que podem aliviar a dor em diferentes graus, mas não podem curar a dor neuropática crônica (GILRON; BARON; JENSEN, 2015).

Na prática clínica, essa condição é abordada de forma interdisciplinar incluindo, entre outras terapias, a terapia cognitivo comportamental, fisioterapêutica e ocupacional (BARON; BINDER; WASNER, 2010). De fato, fármacos como opioides e anti-inflamatórios não esteroides são usualmente prescritos e frequentemente combinados com medicamentos antiepilépticos e antidepressivos (BANNISTER; SACHAU; BARON *et al.*, 2020). Contudo, os pacientes com dor neuropática usualmente não obtêm bons resultados com anti-inflamatórios não-esteroidais e, em vários casos, são resistentes ou insensíveis a fármacos opioides. Desta forma, a terapia farmacológica demonstra eficácia limitada e/ou efeitos adversos importantes que comprometem a adesão (BARON, 2009). Entre as terapias intervencionistas, destacam-se o bloqueio nervoso, o estímulo elétrico transcutâneo e percutâneo, assim como estimulação da medula espinhal. Ademais, usualmente, terapias complementares podem ser associadas ao

tratamento, como a acupuntura (FINNERUP; KUNER; JENSEN, 2021; GILRON; BARON; JENSEN, 2015).

1.3 ACUPUNTURA NO TRATAMENTO DA DOR

A acupuntura, do latim “acus” (agulha) e “pungere” (perfurar), é uma técnica terapêutica milenar caracterizada pela inserção de agulhas em pontos definidos localizados em tecidos profundos do organismo com grande inervação sensorial (os acupontos) (GOLDMAN; CHEN; FUJITA *et al.*, 2010; ZYLKA, 2010; ZHANG; WANG; MCALONAN, 2012). Para essa intervenção, é possível utilizar uma variedade de instrumentos, entre agulhas especiais (acupuntura manual), calor (moxabustão), pressão (acupressão), subpressão (sangria), eletricidade (eletroacupuntura), luz (laserterapia), ultrassom (sonopuntura), campo eletromagnético estático ou pulsátil (terapia magnética) ou soluções (farmacopuntura) (ONDREJKOVICOVA; PETROVICS; SVITKOVA *et al.*, 2016).

A acupuntura foi um dos primeiros tratamentos utilizados por povos antigos (FILSHIE; ZARNEGAR, 2005). Com origem na China, posteriormente a técnica se expandiu para o Japão, Coreia e demais regiões da Ásia (XIA; CAO; WU *et al.*, 2010). De acordo com relatórios da Organização Mundial de Saúde, hoje a acupuntura é utilizada e reconhecida em quase todos os países do mundo (WHO, 2013).

Esse tipo de terapia é um recurso “originado de conhecimento empírico”, baseado em tentativa e erro, empregando pensamento pré-científico. Dessa forma, seu fundamento é um raciocínio causal não científico. Ela é parte da Medicina Tradicional Chinesa – MTC, que abrange técnicas de massagem (Tui-Na), exercícios respiratórios (Chi-Gung), instruções nutricionais (ShuShieh) e os fármacos chineses com origem animal, vegetal e mineral. A MTC tem por objetivo crucial o equilíbrio, seja naquilo que compete às funções orgânicas ou à relação do indivíduo com o meio externo. Ela considera a saúde dependente das funções psico-

neuroendócrinas, sendo influenciada por eventos genéticos e extrínsecos (alimentação, estilo de vida, clima, características do ambiente, entre outros) (SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA; FERREIRA *et al.*, 2004). As teorias do Yin-Yang e dos Cinco Elementos são a base da MTC (TAFFAREL; FREITAS, 2009), e de acordo com suas premissas, Qi (traduzido normalmente como “energia” por não ter sido encontrado termo mais apropriado) e Xue (sangue) fluem pelos órgãos e através dos meridianos ou canais de energia (POVOLNY, 2008; TAFFAREL; FREITAS, 2009).

A literatura disponível apresenta numerosas contradições sobre o uso da acupuntura como tratamento, especialmente em casos de dor (CHERKIN; SHERMAN; AVINS *et al.*, 2009; ERNST; LEE; CHOI, 2011). Revisões sistemáticas apontam que há pouca evidência convincente de que esse tipo de terapia ameniza significativamente as dores agudas e crônicas (ERNST; LEE; CHOI, 2011). De fato, revisão de literatura publicada recentemente relatou que, de acordo com as evidências, qualquer tipo de procedimento com agulhas constitui um estímulo nociceptivo e/ou sinal de dor. O autor concluiu que os dados de eficácia da acupuntura falsa (Sham) são compatíveis com aqueles apresentados pela acupuntura verdadeira em quase todos os ensaios clínicos, e que isso promove uma discussão sobre se a acupuntura seria um placebo particularmente eficaz, ou se os mecanismos utilizados como acupuntura falsa nos estudos de dor constituem um controle inadequado (MUSIAL, 2019).

Apesar dessas controvérsias, estudos recentes demonstram que a acupuntura tem sido largamente utilizada no tratamento da dor articular, muscular e nervosa de maneira segura e eficaz (WAN; FAN; ZHAO *et al.*, 2022; LIN; WANG; ZHANG, 2021; DIMITROVA; MURCHISON; OKEN, 2017). Especificamente para tratamento de dor neuropática, publicações recentes consideraram a acupuntura como potencialmente benéfica e segura, uma vez que é uma estratégia de estimulação nervosa não invasiva (YIN; ZHU; XU *et al.*, 2020; LIU; CHEN; GUO *et al.*, 2021; KELLY; WILLIS, 2019), cujo sinal é transmitido principalmente através de fibras aferentes do tipo A β , A δ e C (HUO; HAN; LIU *et al.*, 2020). O alívio da dor induzido por esse tipo de intervenção envolve diversos mecanismos mediados

principalmente por atividade de neurônios do SNC, tanto no encéfalo como na medula espinhal (HAN, 2004).

Para além desses estudos, ensaios clínicos com acupuntura demonstraram benefício clinicamente relevante e persistente no tratamento da dor crônica, com seus autores considerando que tal resultado não pode ser completamente explicado pelo efeito placebo (VICKERS; VERTOSICK; LEWITH *et al.*, 2018). Em 2016, uma meta-análise revelou que um curso de tratamento de acupuntura apresentou efeitos benéficos em pacientes com dor crônica que não diminuíram significativamente em 12 meses. Desta forma, os autores relataram que os resultados persistiram por pelo menos um ano, contribuindo de forma impactante na qualidade de vida dos indivíduos (MACPHERSON; VERTOSICK; FOSTER *et al.*, 2016). Em animais, o tratamento com eletroacupuntura nos acupontos ST36 e SP6 obteve um efeito analgésico de longa duração e com melhores resultados quando comparado ao fármaco celecoxib na redução da hiperalgesia induzida por neuropatia em ratos que receberam ligadura do nervo espinal (LAU; LAU; ZHANG *et al.*, 2010). Em outro estudo com modelo de dor neuropática espinal em ratos, o tratamento com acupuntura nos acupontos ST36 e SP6 diminuiu significativamente a hiperalgesia térmica e a alodinia mecânica. Tais efeitos analgésicos foram associados à inibição da quinase jun-n-terminal (JNK) em astrócitos na lâmina I-II do corno dorsal e à inibição da fosforilação do substrato JNK a jusante, c-Jun. Além disso, a terapia também inibiu a expressão dependente da JNK da proteína quimiocitária monocitária 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1β (MIP- 1β) (ou CCL4), e proteína inflamatória de macrófagos 3α (MIP- 3α) (ou CCL20) em astrócitos espinais (LEE; CHOI; OH *et al.*, 2013).

O resultado analgésico da acupuntura é, em sua essência, um produto de processos de integração de impulsos aferentes das regiões de dor e impulsos oriundos dos pontos de acupuntura estimulados com o SNC em diferentes níveis. A escolha de acupontos pode ser baseada na teoria dos canais ou meridianos pelos quais passam os pontos de acupuntura. É sabido que grande parte dos meridianos na parte externa do corpo tem início e término no mesmo membro, seja ele membro superior ou inferior; o que é coerente considerando o

princípio da inervação espinal segmentar da neurofisiologia moderna. Os segmentos corporais abrangem dermatômos, miótomos, esclerótomos e viscerótomos, onde há o mesmo nível de entrada no corno dorsal da medula espinal e de inervação sensorial. Alguns pesquisadores demonstraram, com uso de acupontos próximos do local lesionado, que estes podem ser mais eficazes do que aqueles distantes da lesão em grande parte dos tratamentos cujo objetivo é aliviar a dor (DAI; KONDO; FUKUOKA *et al.*, 2001; ZHAO, 2008). Pesquisas recentes demonstraram que quando a estimulação nociva ativa o sistema modulatório descendente endógeno, seu principal neurotransmissor, a serotonina (5-HT), é liberada no corno dorsal da medula espinhal diminuindo os níveis de dor (BRAVO; LLORCA-TORRALBA; BERROCOSO *et al.*, 2019; BANNISTER; LOCKWOOD; GONCALVES *et al.*, 2016), esse sistema regulatório descendente parece estar envolvido em vários métodos não farmacológicos de tratamento para dor neuropática crônica, incluindo estimulação elétrica nervosa transcutânea, hipnose e acupuntura (KUNER, 2010).

O acuponto SP6 (Baço-Pâncreas 6 ou Spleen 6) é nomeado Sanyijiao. O seu nome significa, em Mandarim, san (três), yin (antônimo de yang), jiao (intersecção), pois a MTC o considera como a intersecção dos três meridianos yin da perna (Rim, Fígado e Baço-Pâncreas) (TABOSA; YAMAMURA; FORNO *et al.*, 2002). Em seres humanos, o acuponto localiza-se a 3 cuns (medida correspondente a 4 dedos da mão do indivíduo) acima do cume do maléolo medial, na borda tibial pósteromedial (DEADMAN; AL-KHAFAJI; BAKER, 1998); já em camundongos sua localização é na região proximal da tíbia, 0,5 mm acima do maléolo medial (YIN; JEONG; PARK *et al.*, 2008). O SP6 é bastante utilizado na prática clínica por sua extensa área de ação, costuma ser indicado em quadros de desconforto abdominal, na região peitoral, baixo ventre e membros inferiores, amenorreia, menstruação irregular, disúria, insônia, palpitações, amnésia, letargia e muitos outros. Ele não é descrito como um dos pontos com maior ação analgésica, mas apresenta efeito em diversos casos de dor (YAMAMURA, 2001). Estudo recente com 40 indivíduos saudáveis utilizou o acuponto SP6 entre outros pontos para demonstrar diferença significativa na sensação de dor térmica relacionada ao frio e ao calor (SUNG; MOON; CHOI, *et al.*, 2023). O nervo tibial é distribuído sob o Sanyinjiao (SP6), e o

estímulo produzido com acupuntura provavelmente atinge o corno posterior da medula espinal através do nervo tibial (ZONIĆ-IMAMOVIĆ; SINANOVIĆ; IMAMOVIĆ *et al.*, 2021).

1.3.1 Mecanismos de ação da acupuntura

Existem muitos trabalhos indicando diversos mecanismos envolvidos no efeito da acupuntura. Inicialmente, acredita-se que a inserção e movimentação da agulha, lesionando tecidos profundos, particularmente o tecido muscular, provoca liberação de mediadores pró-inflamatórios, como a histamina, a bradicinina, prostaglandinas, serotonina e adenosina trifosfato (ATP), com conseqüente estimulação de nociceptores direta ou indiretamente. Então, é plausível a afirmação de que fibras do tipo C estão envolvidas na indução da analgesia pela acupuntura manual (BOUCHER; OKUSE; BENNETT *et al.*, 2000; MEYER; RINGKAMP; CAMPBELL *et al.*, 2006; ZHAO, 2008; ZHANG; WANG; MCALONAN, 2012). Mais do que isso, alguns pesquisadores sugerem que fibras nervosas A δ também possam ter participação importante nos processos da acupuntura manual. O efeito analgésico gerado pela acupuntura é similar àquele evocado pelo controle inibitório difuso da dor (DNIC), que é mediado por fibras A δ e C. De fato, em 2008, foi descrito que os tipos de fibras nervosas aferentes ativadas pelo tratamento variam: na acupuntura manual fibras aferentes de todos os tipos são ativadas a fim de conduzir o sinal da agulha (A β , A δ e C); enquanto a eletroacupuntura é capaz de excitar fibras aferentes A β e parte das fibras A δ (ZHAO, 2008).

Portanto, o estímulo da agulha inserida na periferia é conduzido pela medula espinal e em seguida os impulsos dos pontos de acupuntura ascendem principalmente via funículo ventrolateral. Várias estruturas encefálicas formam uma rede complexa que está envolvida na execução da analgesia pela acupuntura, como o bulbo rostroventral (especialmente o núcleo da Rafe), a substância cinzenta periaquedutal, o locus coeruleus, o núcleo arqueado, a área pré-óptica, o núcleo accumbens, o núcleo caudado, a amígdala, o córtex cingulado anterior e o

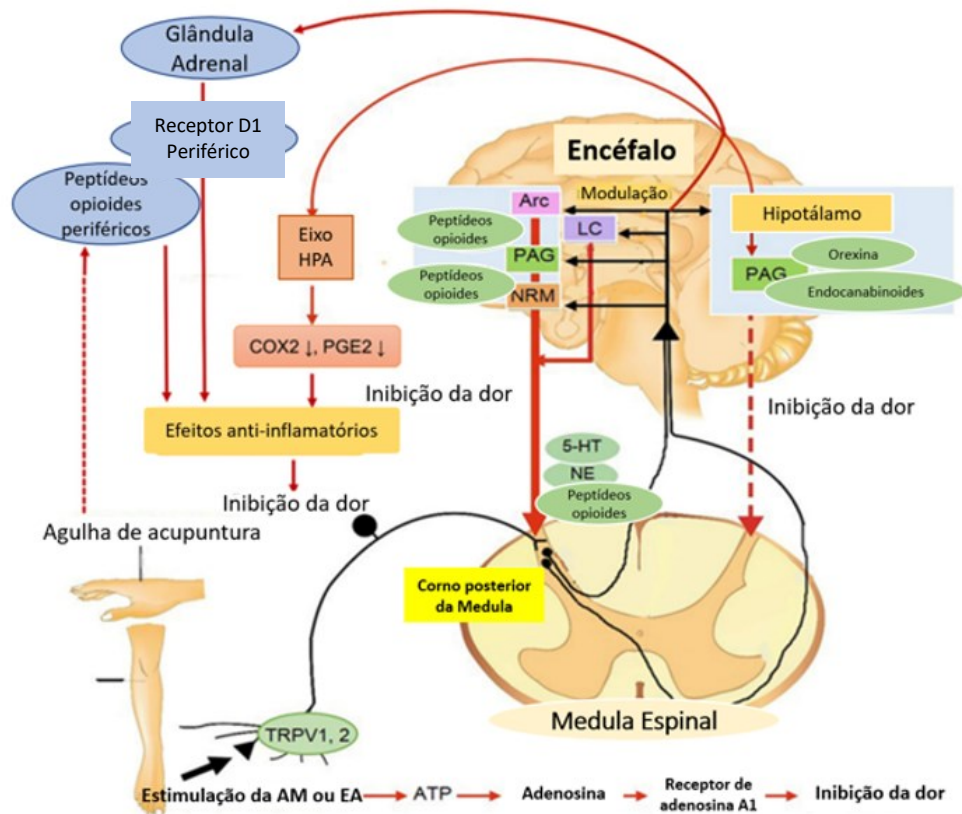
núcleo paraventricular do hipotálamo, entre outras estruturas, conforme apresenta o desenho esquemático da Figura 02. A maior parte dos núcleos pertence à constituição do sistema descendente inibitório endógeno da dor no SNC. Aparentemente, a ativação desse sistema mencionado é um dos mecanismos primordiais para que ocorra a analgesia da acupuntura, principalmente da eletroacupuntura (ZHAO, 2008; OKADA; KAWAKITA, 2009). A ativação da acupuntura é integrada em vários níveis no encéfalo, do tronco encefálico até o cerebelo (HUI; MARINA; LIU *et al.*, 2010).

Juntamente com a atuação de estruturas do SNC e SNP, moléculas de sinalização diversas contribuem para a analgesia pela acupuntura. Estudos demonstraram variadas moléculas endógenas e seus receptores, incluindo peptídeos opióides (receptores μ , δ e κ), o octapeptídeo colecistocinina (CCK-8), glutamato (receptores N-metil-D-aspartato, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico ou AMPA, e Kainato), serotonina (5-HT) e noradrenalina (HAN, 2004; ZHAO, 2008). Mais do que isso, já foi descrita liberação de ATP provocada por lesão pela manipulação da agulha de acupuntura, principalmente a partir de queratinócitos da pele e musculares. A molécula de ATP é convertida em adenosina, de modo que, ao combinar a acupuntura manual com uma supressão da atividade da enzima adenosina desaminase por fármaco, incrementando a disponibilidade da adenosina, é possível potencializar os efeitos da terapia com acupuntura manual (SAWYNOK; REID; POON *et al.*, 1998; GOLDMAN; CHEN; FUJITA *et al.*, 2010; TANG; YIN; LIU *et al.*, 2019).

O mecanismo de eixo hipotálamo-hipófise (pituitária)-adrenal (HPA) é uma forma de explicar com fundamentação molecular e neurofisiológica os processos analgésicos e anti-inflamatórios da acupuntura. De acordo com pesquisa realizada com eletroacupuntura, o tratamento age afetando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), diminuindo os níveis de ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina E2 (PGE2), além de estimular o sistema nervoso simpático provocando liberação periférica de opióides (ZHANG; LAO; REN *et al.*, 2014). Ademais, experimento em camundongos mostrou que a eletroacupuntura também provoca a liberação de catecolaminas da glândula adrenal, atuando em receptores periféricos de dopamina

D1 e produzindo efeitos anti-inflamatórios sistêmicos TORRES-ROSAS; YEHA; PEÑA *et al.*, 2014). A atividade do nervo vago também é influenciada pela acupuntura: estudo recente com acupuntura no ramo auricular do nervo vago demonstrou que o tratamento com acupuntura inibiu a sinalização nociceptiva no modelo de nocicepção visceral-somática em ratos machos e fêmeas (NEVES; KARVAT; SIMÕES *et al.*, 2022). Assim, é razoável que os efeitos da acupuntura sejam descritos como modulatórios periféricos, segmentares, centrais ou extra-segmentares (ZHAO, 2008; HUI; MARINA; LIU *et al.*, 2010). Um resumo esquemático dos mecanismos conhecidos da acupuntura está apresentado na Figura 02, onde a linha contínua representa vias demonstradas em diversos estudos e a linha pontilhada representa vias ainda em investigação.

Figura 02: Mecanismos da Acupuntura.



Mecanismos da Acupuntura. Abreviaturas: Arc, núcleo arqueado; LC, *locus coeruleus*; PAG, substância periaquedutal; NRM, núcleo da rafe; ATP, trifosfato de adenosina; TRPV1, receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1; 5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); NE, norepinefrina; D1, Dopamina 1; HPA, hipótlamo-pituitária-adrenal; COX-2, ciclo-oxigenase-2; PGE2, prostaglandina E2; AM, acupuntura manual; EA, eletroacupuntura. A linha contínua representa vias demonstradas em diversos estudos e a linha pontilhada vias ainda em investigação. Fonte: Adaptado de LIN; KOTHA; CHEN, 2022.

1.3.2 Metabólitos envolvidos nos mecanismos de ação da acupuntura

Buscando meios de aprofundar o conhecimento dos mecanismos da acupuntura, pesquisadores concluíram em suas revisões de literatura que a metabolômica tem o potencial de facilitar nossa compreensão sobre a teoria da Medicina Tradicional Chinesa e sobre os

mecanismos moleculares de doenças, bem como de tratamentos. Assim, a aplicação da metabolômica pode facilitar a compreensão dos efeitos terapêuticos da acupuntura por meio de biomarcadores em fluidos biológicos (ZHANG; SUN; WANG *et al.*, 2010, ZHANG; SUN; YAN *et al.*, 2013).

A metabolômica é uma das ciências ômicas: o sufixo “ômico” é acrescentado ao objeto de estudo ou ao nível do processo biológico para criar os termos que descrevem essas informações - por exemplo, genômica de dados de genes, proteômica de dados de proteínas, metabolômica de dados metabólicos (GREENBAUM; LUSCOMBE; JANSEN *et al.*, 2001). As técnicas ômicas são consideradas ferramentas poderosas para pesquisar mecanismos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos, assim como para aplicações interdisciplinares, como biologia, matemática e informática devido ao rápido progresso em métodos de sequenciamento e computacionais (LIN; HUANG; JUAN, 2012; LIN; CHEN; CHEN *et al.*, 2012, TSENG; LIN; CHEN *et al.*, 2011).

Não é totalmente novo o uso dessa ciência para análise de terapias desse tipo: em 2015 foi publicado um artigo analisando a metabolômica de amostras de sangue e urina de ratos submetidos a lesão em mucosa gástrica e tratados com eletroacupuntura. Através de dados de alteração nos metabólitos como acetato, creatina, fosfocolina, N,N-dimetilglicina, fenilacetilglicina, acetilcolina, α -cetogluturato e 1-metilnicotinamida; os autores concluíram que as vias metabólicas alteradas após a lesão foram parcialmente normalizadas com o tratamento (XU; CHENG; YANG *et al.*, 2015). Já em 2020, o sangue de animais da mesma espécie, agora em modelo de estresse crônico, foi utilizado em estudo que verificou que a eletroacupuntura foi capaz de regular alterações no metabolismo de hormônio liberador de corticotropina, corticosterona, glicose, alanina e valina (MA; SUN; WEI *et al.*, 2020). Mais recentemente, novo experimento com ratos submetidos a lesão em mucosa gástrica e tratados com o mesmo tipo de acupuntura utilizado nos estudos anteriores analisou a metabolômica de amostras de tecido do estômago, medula e córtex cerebral dos roedores, demonstrando que a terapia pode atuar regulando o SNC, envolvendo vias metabólicas como a do metabolismo energético, celular, dos neurotransmissores e de antioxidantes (HUANG; PENG; HE *et al.*,

2022). Em camundongos, trabalho avaliando eletroacupuntura através da metabolômica em animais com falência ovariana prematura concluiu que a terapia foi capaz de melhorar a função ovariana, além de regularizar as desordens metabólicas hepáticas e renais causadas pela disfunção ovariana, pois verificou-se que o tratamento regulou os metabolismos energético e de neurotransmissores (CHEN; HE; GUO *et al.*, 2022).

Da mesma forma, a metabolômica já foi utilizada para avaliar alterações após tratamento com acupuntura manual: em camundongos com modelo de doença de Alzheimer, a acupuntura foi capaz de regular os metabólitos da microbiota intestinal (YANG; HE; CHEN *et al.*, 2022); enquanto em animais da mesma espécie com neoplasia de mama submetidos à avaliação da fadiga pós quimioterapia, o tratamento provocou mudanças em metabólitos sanguíneos que os autores relataram ser consequência de melhora na função da barreira intestinal, inibindo a inflamação intestinal e resposta neuroinflamatória, assim como uma melhora na disfunção do eixo HPA, aliviando os sintomas de fadiga (LV; LIU; SU *et al.*, 2022). Já em ratos, a terapia em linhagem espontaneamente hipertensa demonstrou diminuir os valores pressóricos assim como modulou o metabolismo dos ácidos biliares em tecidos corticais renais (YANG; ZHANG; LV *et al.*, 2022).

Mais do que isso, pesquisadores documentaram alterações na metabolômica de seres humanos após algumas sessões com acupuntura manual: em 2016, foi documentada alteração em 34 diferentes metabólitos após intervenção diária por 14 dias em indivíduos saudáveis (ZHANG; YAN; SUN *et al.*, 2016); no mesmo ano, ensaio clínico avaliou o uso dessa terapia para tratar a hipertensão arterial sistêmica e identificou 47 possíveis biomarcadores da doença, dois deles (ácido oleico e mioinositol) voltaram aos valores normais após o tratamento (YANG; YU; DENG *et al.*, 2016). Há poucos anos, quando esse recurso científico foi usado para avaliar a acupuntura manual associada à eletroacupuntura em mulheres com obesidade ou sobrepeso em estudo duplo cego com controle sham, foi demonstrado que essa associação provocou aumento significativo nos níveis de carnitinas específicas no grupo tratado em comparação ao grupo controle (KIM; SHIN; CHOI *et al.*, 2020).

JUSTIFICATIVA

A dor é a razão mais frequente de busca de atendimentos em pronto-socorro, sendo contabilizada como causa de 70% das consultas de emergência (TODD, 2017). Ainda que as percepções dolorosas possuam função de alerta útil ao organismo como sinalização de processos de agressão, o desafio do tratamento da dor, principalmente do tipo crônica, acompanha a humanidade pois a mesma interfere na homeostasia do indivíduo e prejudica significativamente suas relações sociais e familiares (DUEÑAS; OJEDA; SALAZAR *et al.*, 2016). Como citado anteriormente, uma meta-análise de 2016 revelou que um curso de tratamento com acupuntura beneficiou pacientes com dor crônica de maneira duradoura (MACPHERSON; VERTOSICK; FOSTER *et al.*, 2016). Contudo, todos os efeitos da terapêutica, assim como os mecanismos de ação e a padronização do tratamento com acupuntura ainda não estão claros.

Uma vez que a MTC ainda não possui base científica clara, as tratativas para transformá-la em medicina baseada em evidências são importantes no avanço da temática, assim como na aplicação das técnicas relacionadas a ela (EFFERT; XU; LEE, 2019). Nesse sentido, ferramentas de inteligência artificial podem fornecer uma plataforma comum para avaliar e integrar a MTC e a medicina convencional (TIAN; WANG; LI *et al.*, 2015; HAN; ZHANG; WANG *et al.*, 2018). A metabolômica, estudo sistemático para verificar a resposta metabólica multiparamétrica de um organismo vivo a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética quantitativamente (NICOLSON; LINDON; HOLMES, 1999), pode auxiliar pesquisas futuras sobre metabólitos da manipulação da acupuntura e revelar o mecanismo desse tipo de intervenção (JU; WEN; YIN *et al.*, 2016).

Dessa forma, estudos que relacionam parâmetros biológicos como metabolomas e acupuntura no tratamento da dor representam um importante caminho para redirecionar o foco da atenção científica, visto que o conhecimento, identificação e quantificação do conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados por um organismo podem fornecer evidências

importantes para estabelecer procedimentos padrão que promovem o uso seguro e eficiente da acupuntura, com agulhas ou outras abordagens terapêuticas associadas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da acupuntura manual realizada no ponto SP6 sobre a metabolômica de camundongos com dor neuropática crônica induzida por ligadura parcial do nervo ciático.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito analgésico do tratamento com acupuntura em camundongos com neuropatia induzida por ligadura parcial do nervo ciático;
- Averiguar se o efeito do tratamento com acupuntura em animais com neuropatia é cumulativo com mais sessões de acupuntura no mesmo acuponto;
- Verificar o efeito da acupuntura no ponto SP6 sobre a metabolômica de camundongos com e sem neuropatia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O presente estudo utilizou como guia as diretrizes essenciais ARRIVE 2.0 (Anexo 01).

Os animais utilizados para os experimentos do presente estudo foram camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, todos machos adultos, pesando 30 a 40 gramas (g),

fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil). Os roedores foram mantidos no Biotério “Professor Adair Roberto dos Santos”, do Centro de Ciências Fisiológicas, em caixas ventiladas e isoladas contendo no máximo 5 animais. Os camundongos foram mantidos sob condições ambientais controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ$ Celsius) e umidade (60 - 80%), em ciclos de claro-escuro de 12 horas (7:00 às 19:00 horas), com livre acesso a água filtrada (Jojaco filtros) e alimento (ração marca BioBase). Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo.

Os animais foram distribuídos entre grupos homogêneos e mantidos no laboratório por pelo menos 60 minutos com objetivo de aclimatação antes dos experimentos de estudos comportamentais, que foram conduzidos no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, localizado na Universidade Federal de Santa Catarina, conforme as orientações e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). A quantidade de roedores e a intensidade dos estímulos empregados foram os mínimos necessários para evidenciar consistentemente o efeito das intervenções. Os pesquisadores que realizaram as avaliações comportamentais, bem como o pesquisador que analisou a metabolômica desconheciam a alocação dos grupos experimentais (cegos para o grupo experimental). Os procedimentos experimentais do presente trabalho foram submetidos à análise e aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, protocolo número 5011280820).

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Modelo animal de dor neuropática crônica

O modelo de dor crônica de origem neuropática utilizado no presente estudo foi o modelo de Ligadura Parcial do Nervo Ciático (LPNC) ou Lesão Parcial do Nervo Ciático. Tal

modelo experimental em camundongos possibilita uma análise de quadro de dor neuropática induzida pela lesão do nervo na cirurgia.

Previamente à cirurgia, assim como após ela, os animais foram avaliados em testes de sensibilidade mecânica e térmica ao calor e ao frio; com a intenção de primeiramente subtrair do grupo dos experimentos os roedores que apresentavam hiperalgesia e posteriormente subtrair do grupo experimental aqueles que não demonstravam sensibilidade mecânica e/ou térmica ao calor e ao frio compatíveis com as lesões induzidas cirurgicamente.

A cirurgia foi realizada após anestesia dos animais com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg), intraperitonealmente (i.p.). Posteriormente, foi realizada tricotomia da região do procedimento. Uma pequena incisão foi então efetuada na região da coxa direita entre os músculos quadríceps e o isquiotibial, que foram divulsionados com o auxílio de uma pinça cirúrgica até a visualização do nervo ciático. Finalmente, o nervo foi exposto de acordo com o método descrito inicialmente para ratos (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990) e adaptado para camundongos (MALMBERG; BASBAUM, 1998). Uma vez exposta a estrutura, foi realizada a amarração com fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 6.0 Prolone, não absorvível) de aproximadamente 1/3 do nervo ciático. Em seguida, a pele foi fechada por sutura com fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond). Após o procedimento, cada animal permaneceu em mesa cirúrgica aquecida a 35°C até ser considerado recuperado; quando foram realocados em suas caixas moradias. Um grupo de camundongos compôs o controle negativo, denominado Falso Operado, no qual foi realizado o processo de cirurgia até a exposição do nervo ciático, no entanto, sem sofrer amarração (não houve, portanto, constrição parcial do nervo).

3.2.1 Tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6

A identificação da localização do acuponto SP6 em camundongos foi realizada conforme documentado em publicação de 2008, que descreve a localização de vários pontos de

acupuntura em ratos e camundongos. Em camundongos, o SP6 localiza-se no ponto mais distal de uma divisão em cinco pontos de uma linha imaginária dividida que liga o ponto SP9 (localizado na depressão inferior ao côndilo medial da tíbia, entre o osso da tíbia e o músculo gastrocnêmio) ao maléolo medial da tíbia (YIN; JEONG; PARK *et al.*, 2008).

No presente estudo, os animais foram contidos cuidadosamente em cilindro de polietileno medindo 7,0 x 2,5 centímetros (cm) com as patas traseiras para fora do cilindro para que fosse realizada a intervenção com acupuntura. Na região do acuponto SP6 foi inserida manualmente uma agulha de aço inoxidável medindo 0,17 x 7,0 milímetros (mm), marca Dong Bang®, conforme demonstrado na Figura 03. A agulha foi inserida obliquamente em relação à pele, a uma profundidade de aproximadamente 2-3 milímetros da superfície na pata direita, e então manipulada manualmente com as pontas dos dedos do experimentador (girada em sentido horário e anti-horário alternadamente por 1 a 2 segundos). Todo o procedimento transcorreu em aproximadamente 15 segundos. Após a inserção da agulha, cada roedor foi colocado em uma caixa de acrílico transparente (10 x 10 x 10 cm) por 10 minutos, ainda com a agulha inserida em seu corpo. A técnica seguiu o descrito em Silva (2013), exceto por não ter sido utilizado o aplicador para agulhamento dos animais, a agulha foi inserida manualmente apenas com uso de mandril.

Figura 03: Inserção de agulha no acuponto SP6.



Fonte: Da SILVA, 2013

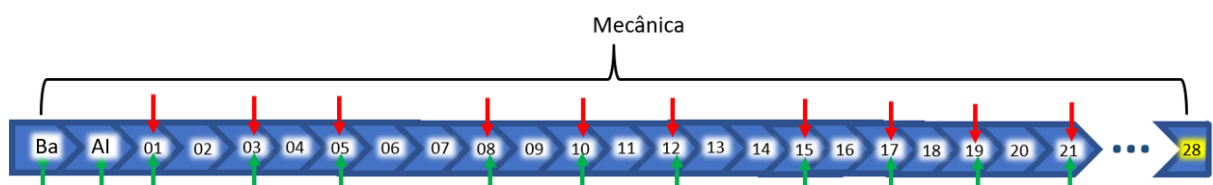
Os animais foram observados durante todo o período de tratamento permanecendo acordados e sem sinais de estresse, o tratamento acontecia em dias alternados com o objetivo de provocar o mínimo de dano aos tecidos.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo se dividiu em duas etapas:

Durante a primeira etapa, conforme representado na Figura 04, os camundongos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais de acordo com os procedimentos cirúrgicos realizados e tratamentos a serem realizados: grupo OP (Operado, onde os animais foram submetidos à cirurgia de LPNC e não receberam qualquer tratamento), grupo FO (Falso Operado, no qual os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, mas o nervo ciático não foi ligado), grupo SP6 (roedores operados e tratados com acupuntura manual no acuponto SP6). Cada um dos grupos continha 8 animais. Nessa fase, os animais foram avaliados antes do procedimento cirúrgico e diariamente após o início dos tratamentos (7 dias após o procedimento cirúrgico) com relação à hiperalgesia mecânica e em dias alternados desde o primeiro dia do tratamento, nas mesmas datas em que foi realizada a acupuntura manual, até o 21º dia de tratamento quanto à hiperalgesia térmica ao calor e ao frio.

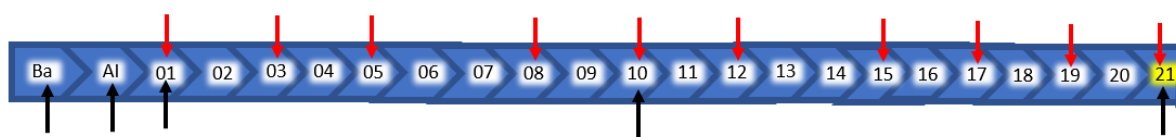
Figura 04: Delineamento experimental da primeira etapa do estudo



Delineamento experimental da primeira etapa do estudo. A linha azul representa a passagem do tempo, os números representam os dias de estudo a partir de primeiro tratamento. Ba, avaliações basais realizadas antes da cirurgia de LPNC; AI, avaliações iniciais sete dias após a cirurgia e pré-tratamento. Setas vermelhas representam datas em que foi realizado o tratamento com acupuntura. Setas verdes indicam os momentos de avaliações de hiperalgesia térmica ao calor e ao frio. Mecânica, momentos em que foi realizada avaliação de hiperalgesia mecânica, incluindo as datas entre 21 e 28, representadas pelas reticências da figura. A data destacada em amarelo representa a data da eutanásia dos animais. Fonte: próprio autor.

Durante a segunda etapa, cujo delineamento experimental está representado na figura 05, novos camundongos foram submetidos aos procedimentos de cirurgia e falsa cirurgia de LPNC, já descritos anteriormente, e esses animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: (1) grupo FO (n=04, animais falsamente operados e sem tratamento), (2) grupo SP6 (n=06, animais falsamente operados e tratados com acupuntura no acuponto SP6), (3) grupo OP (n=05, animais operados e sem tratamento), (4) grupo LPNC+SP6 (n=04, animais operados e tratados com acupuntura no acuponto SP6). Os procedimentos de acupuntura manual foram realizados com a mesma técnica e frequência da etapa anterior, e os animais foram eutanasiados para coleta de sangue total após os tratamentos e avaliações finais. Nesses animais, as avaliações comportamentais (hiperalgesia mecânica) foram realizadas apenas no basal, após a cirurgia, após o primeiro, quinto e décimo tratamentos, para confirmação dos resultados obtidos anteriormente (esses dados não estão demonstrados no presente estudo).

Figura 05: Delineamento experimental da segunda etapa do estudo



Delineamento experimental da segunda etapa do estudo. A linha azul representa a passagem do tempo, os números representam os dias de estudo a partir de primeiro tratamento. Ba, avaliações basais realizadas antes da cirurgia de LPNC; AI, avaliações iniciais sete dias após a cirurgia e pré-tratamento. As setas vermelhas representam datas em que foi realizado o tratamento com acupuntura, enquanto as setas pretas indicam os momentos de avaliações de

hiperalgesia mecânica. A data destacada em amarelo representa a data da eutanásia dos animais. Fonte: próprio autor.

3.4 AVALIAÇÕES

3.4.1 Avaliação de hiperalgesia mecânica após procedimento de LPNC e intervenção com acupuntura manual no acuponto SP6

O método descrito por Chaplan, Bach, Pogrel e colaboradores (1994) foi o método escolhido para avaliar o limiar nociceptivo mecânico. Conforme já citado, os animais foram aclimatados por no mínimo 60 minutos antes dos experimentos na sala de experimentação, mantidos em compartimentos individuais de acrílico (7 x 9 x 11 cm) alocados sobre uma plataforma de fundo gradeado, de forma a possibilitar o acesso à região ventral de suas patas traseiras. Para estimulação mecânica, empregou-se o método “up-and-down”, proposto por Dixon (1980): foi aplicada tensão de maneira perpendicular à superfície plantar das patas traseiras dos roedores com uso de vários filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, EUA), calibrados para gerar forças (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0 gramas) que provocam graus diversos de estimulação mecânica (inócua ou nociva); e então analisadas as respostas de retirada ou não da pata. Cada avaliação teve início com a aplicação do filamento 0,4 g, e no caso de resposta de estímulo nocivo – indicado pela retirada da pata – o filamento aplicado na sequência foi um filamento com menor valor subsequente em gramas. Caso a resposta correspondesse a estímulo inócua – demonstrado por permanência da pata – o próximo filamento a ser testado foi aquele com maior valor em gramas. O número máximo de estimulações mecânicas não consecutivas em cada animal foram seis. Os dados obtidos a partir do método “up and down” indicam a força correspondente a 50% do limiar de retirada da pata (em gramas). Intensa diminuição no limiar de retirada da pata é característico de aparecimento de hiperalgesia mecânica.

Os camundongos foram avaliados antes e no sétimo dia após a cirurgia de LPNC, quando foram distribuídos de forma homogênea entre os grupos, para posteriormente ser iniciado a intervenção com acupuntura no acuponto SP6. Os animais alocados no grupo SP6 receberam tratamento com acupuntura três vezes por semana com intervalo de ao menos um dia entre eles, a fim de não haver lesão por inserção repetida da agulha. Após o início dos tratamentos, as avaliações foram realizadas diariamente.

3.4.1 Avaliação de hiperalgesia térmica ao calor após procedimento de LPNC e intervenção com acupuntura manual no acupontos SP6

No presente experimento, os camundongos foram alocados na sala de experimentação para ambientação por ao menos 60 minutos antes dos testes. A hiperalgesia térmica foi avaliada apenas na primeira fase do estudo, através do teste plantar descrito por Hargreaves, Dubner, Brown e colaboradores (1988), que consiste em colocar os animais em compartimentos individuais de acrílico (7 x 9 x 11 cm) alocadas sobre uma plataforma. A plataforma do aparato possui uma superfície de vidro desenvolvida para permitir a passagem de luz e calor de forma homogênea. Após o período de ambientação, uma fonte de luz infravermelha com intensidade de radiação de 40 I.R. foi posicionada abaixo da pata traseira direita de cada animal e foi acionada de maneira sincronizada a um cronômetro eletrônico, permanecendo dessa forma até que o roedor retire a pata, momento em que a fonte de luz e o relógio param automaticamente e o tempo de latência de retirada da pata é registrado. Assim, o aparato permite aquecer a região plantar média da pata traseira do camundongo com o auxílio da fonte luminosa infravermelha dirigida à região, até que o roedor demonstre uma reação comportamental de retirada da pata. O aparelho infravermelho utilizado foi Ugo Basile, Comerio, Itália. O procedimento foi repetido três vezes com intervalo de tempo de 5 a 10 minutos, e as medidas de latência de retirada da pata foram expressas como a média dentre essas três avaliações. Caso o animal não apresentasse o comportamento de retirada da pata até o tempo limite máximo de corte de 12

segundos estipulado no experimento, a fonte luminosa era então desligada para que a integridade física do membro fosse preservada.

A avaliação da hiperalgesia térmica ao calor foi realizada apenas na primeira fase do estudo, antes da cirurgia de LPNC para que fosse caracterizada a resposta basal, 7 dias após a cirurgia (quando os camundongos foram distribuídos homogeneamente nos grupos experimentais e logo após se iniciaram as intervenções com acupuntura no acuponto SP6), sendo estas no 1º, 3º, 5º, 8º, 10º, 12º, 15º, 17º, 19º, 21º dias de tratamento. As intervenções com acupuntura foram executadas três vezes por semana com acupuntura manual por 10 minutos e os animais foram avaliados antes do tratamento e após transcorrido o tempo de 15 minutos após a retirada da agulha.

3.4.3 Avaliação de hiperalgesia térmica ao frio após procedimento de LPNC e intervenção com acupuntura manual no acupontos SP6

A avaliação da hiperalgesia ao estímulo térmico frio ocorreu através do método da placa fria utilizando uma caixa quente-frio MOD, AVS CQF, São Paulo, Brasil. A técnica utilizada foi adaptada a partir daquela descrita por Bennett e Xie (1988). No presente estudo, antes de iniciar cada avaliação, os animais foram ambientados sobre a superfície da placa em temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por 5 minutos ao dia. Na ocasião do teste, os roedores foram alocados individualmente sobre a placa fria a 10 °C (± 1 °C) e contidos por um aparato de vidro medindo 25 × 30 × 30 cm. A latência da primeira retirada de pata, demonstrada pela agitação ou lambida da pata traseira direita foi encarada como indicativo de nocicepção. Apresentando ou não resposta de retirada de pata, o camundongo foi retirado da placa fria 2 minutos após o início do teste para evitar danos à integridade de seus tecidos.

A caracterização da resposta basal de hiperalgesia térmica ao frio foi realizada através de avaliação previamente à cirurgia de LPNC. Outras avaliações ocorreram sete dias após a

cirurgia (quando os animais foram distribuídos homogeneamente nos grupos e depois iniciou-se a intervenção com acupuntura no acuponto SP6), e no 1º, 3º, 5º, 8º, 10º, 12º, 15º, 17º, 19º e 21º dias de tratamento. Os animais do grupo SP6 sofreram a intervenção com duração de 10 minutos três vezes por semana em dias alternados, sendo avaliados após transcorrido o tempo de 15 minutos após a retirada da agulha.

3.5 EUTANÁSIA E COLETA DE SANGUE

Imediatamente após os testes comportamentais, os animais da primeira fase do trabalho foram eutanasiados por um pesquisador treinado utilizando administração de “sobredosagem da associação de anestésicos dissociativos” (cetamina) e agonista de adrenorreceptores alfa-2 (xilazina) administrada pela via intraperitoneal (DIRETRIZ DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA¹). Na segunda fase do trabalho, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg, ip) e cetamina (80 mg/kg, ip). O camundongo anestesiado foi posicionado em decúbito dorsal sobre o suporte em uma superfície plana prendendo-se os membros torácicos com fita adesiva. Foi realizada antissepsia na região do tórax do animal com álcool etílico 70%, com auxílio de uma tesoura cirúrgica foi rapidamente aberto o tórax (costelas e diafragma) e inserida uma agulha no lado esquerdo do coração. Efetuando-se uma leve pressão negativa no êmbolo da seringa, puxou-se o êmbolo da seringa de forma contínua e lentamente, até a finalização do fluxo sanguíneo. Desta forma, a eutanásia foi realizada com a aplicação de dose anestésica seguida da complementação com um método secundário (exsanguinação). O sangue coletado foi colocado em tubos cônicos do tipo Eppendorf sem anticoagulante (aproximadamente 2 ml). O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos, posteriormente o sobrenadante foi

¹ BRASIL. CONCEA – Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 13 de 20 de setembro de 2013. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Experimentação Animal. Diário Oficial da União, 14 de setembro de 2013, Seção I, Pág. 5.).

coletado para obter amostras de soro, que foram então armazenadas em outros tubos (tipo Eppendorf) a -80° (Ultra congelador) para que fossem analisadas posteriormente.

3.6 ANÁLISE DA METABOLÔMICA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/MS)

3.6.1 Preparação das amostras

As amostras de soro foram preparadas para a análise através de procedimento previamente validado. Sucintamente, 100 uL de cada amostra foi extraído usando 1,0 mL de éter metil terc-butílico (MTBE) como solvente e o extrato obtido foi então evaporado até o volume de 100 uL e transferido para o cartucho de limpeza de sílica gel ou sulfato de sódio anidro (importante ressaltar que cada cartucho foi pré-condicionado com 5 ml de metanol antes da limpeza).

Os analitos foram eluidos utilizando novamente MTBE (10 mL) e o eluato foi evaporado totalmente sob corrente de nitrogênio (N₂). O extrato seco obtido sob corrente de N₂ foi derivatizado usando 70 uL de N,O-bis (trimetilsil) trifluoroacetamida (BSTFA) em acetonitrila para formar éteres trimetilsilil (ésteres TMS) a 70°C por 1 hora, antes das medições por CG/MS. O procedimento de derivatização é necessário pois a temperatura que a coluna atinge é de até 300 °C, mas substâncias como ácidos graxos, por exemplo, possuem pontos de ebulição em temperaturas maiores do que isso, e a derivatização faz com que os pontos de ebulição sejam menores.

3.6.2 Análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (GC-TOF/MS)

A coluna empregada para as análises de espectrometria sem alvo foi uma coluna de GC Zebron ZB-5MSi - Phenomenex (EUA): trata-se de uma coluna capilar de sílica fundida, medindo 10 m de comprimento, com 0,18 mm de diâmetro interior, revestida com fase estacionária de 5% de fenil a 95% de dimetil polisiloxano, espessura de filme de 0,18 μm , configurada para modo fast GC/MS; enquanto o gás de arraste utilizado foi o gás Hélio, em um instrumento Dani Master CG-TOF/MS (Itália).

A análise foi realizada a partir da injeção de 2,0 μL de amostra, nas seguintes condições: temperatura inicial do forno 70°C com tempo de equilíbrio de 1 minuto, após o qual a programação de elevação da temperatura foi de 10°C a cada minuto até 110 °C e de 15 °C por minuto até 295°C, seguido de um período isotérmico final de 3 minutos. Cada um dos compostos detectados no cromatograma foi identificado experimentalmente através da biblioteca espectral padrão (NIST02L) e da literatura relatada, baseando-se nos respectivos espectros de massas.

3.7 PROCESSAMENTO DOS DADOS E ESTATÍSTICA

Os dados passaram por teste de normalidade e seus resultados são apresentados como erro padrão da média (EPM) para cada grupo, avaliados estatisticamente por análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias), seguida de teste post hoc de BonFerroni; a área sob a curva (AUC) foi calculada e a estatística realizada com análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Para a avaliação dos metabólitos foi realizada ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey com múltiplas comparações. O valor de $p < 0,05$ foi o indicativo de significância considerado. Para o cálculo da estatística e realização dos gráficos, foram utilizados o software *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego: 2008) ou o software SPSS 13.0.

4. RESULTADOS

4.1 O TRATAMENTO COM ACUPUNTURA NO ACUPONTO SP6 É CAPAZ DE REDUZIR A HIPERALGESIA MECÂNICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LPNC (LIGADURA PARCIAL DO NERVO CIÁTICO) DE FORMA PERSISTENTE

Na primeira etapa do presente estudo, observou-se uma diminuição no limiar nociceptivo mecânico sete dias após a cirurgia em todos os animais operados, ou seja, ocorreu hiperalgesia mecânica frente aos estímulos com os filamentos de von Frey após a cirurgia de LPNC. Nesse mesmo dia iniciou-se a intervenção com acupuntura, observando-se então que uma única sessão de tratamento no acuponto SP6 reduziu significativamente o efeito de hiperalgesia mecânica nos roedores operados, com $p < 0,001$ na comparação do grupo SP6 com grupo OP (Figura 06^a), e tal redução permaneceu até 1 hora depois da sessão, com $p < 0,001$ (Figura 07 A e B).

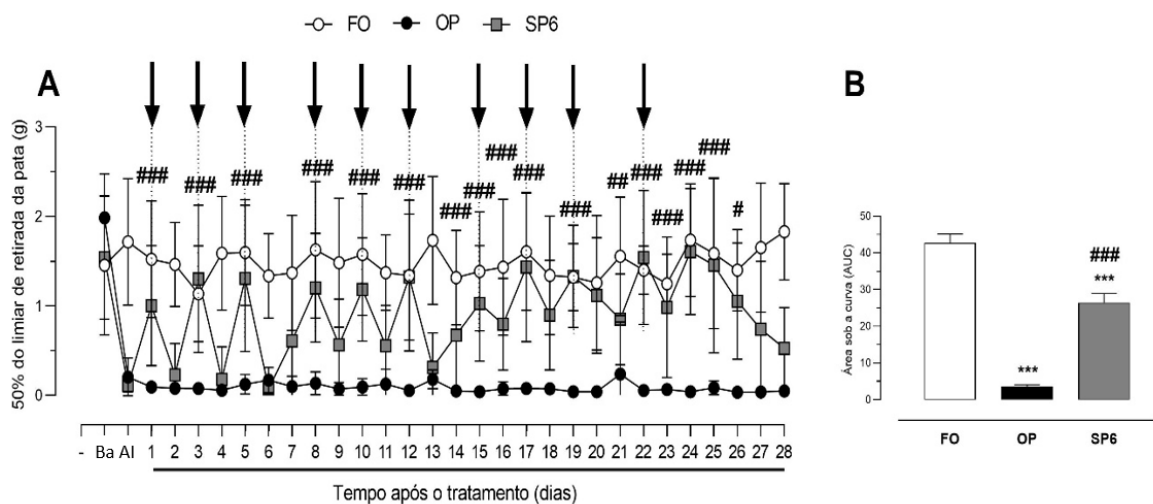
Considerando tal resultado, nos dias subsequentes, as avaliações foram realizadas no mesmo período (1 hora após o tratamento), e o efeito da acupuntura se manteve de forma uniforme e significativa, com $p < 0,05$ (Figura 06^a). Após o quinto tratamento com acupuntura, uma nova avaliação de duração do efeito analgésico da acupuntura foi realizada, quando foi demonstrado que a estimulação manual no acuponto SP6 foi efetiva em reduzir a hiperalgesia mecânica; mais do que isso, a duração do seu efeito foi grandemente aumentada, passando de 1 hora para até 6 horas após a retirada da agulha, com $p < 0,05$ (Figura 07C e D).

Como já foi mencionado, o efeito analgésico da acupuntura no acuponto SP6 foi avaliado ao longo de 28 dias. Nos primeiros dias, foi notada a presença de um efeito analgésico com a acupuntura apenas nos dias em que foi realizado o tratamento. De maneira curiosa, após o quarto tratamento, o limiar de retirada da pata dos camundongos tratados com o acuponto SP6 não retornou aos valores basais mesmo em dias em que os roedores não receberam tratamento.

Supreendentemente, após o 10º tratamento, no 22º dia de avaliação, o efeito analgésico da acupuntura se manteve por mais de 24 horas após a retirada da agulha. As avaliações continuaram mesmo após a interrupção das intervenções, e dessa forma foi demonstrado que o efeito analgésico da acupuntura manual foi capaz de aumentar gradualmente sua duração com a realização de mais sessões de acupuntura, além de permanecer por mais três dias após o 10º e último tratamento, com $p < 0,05$ comparando o grupo OP com grupo SP6 (Figura 06ª).

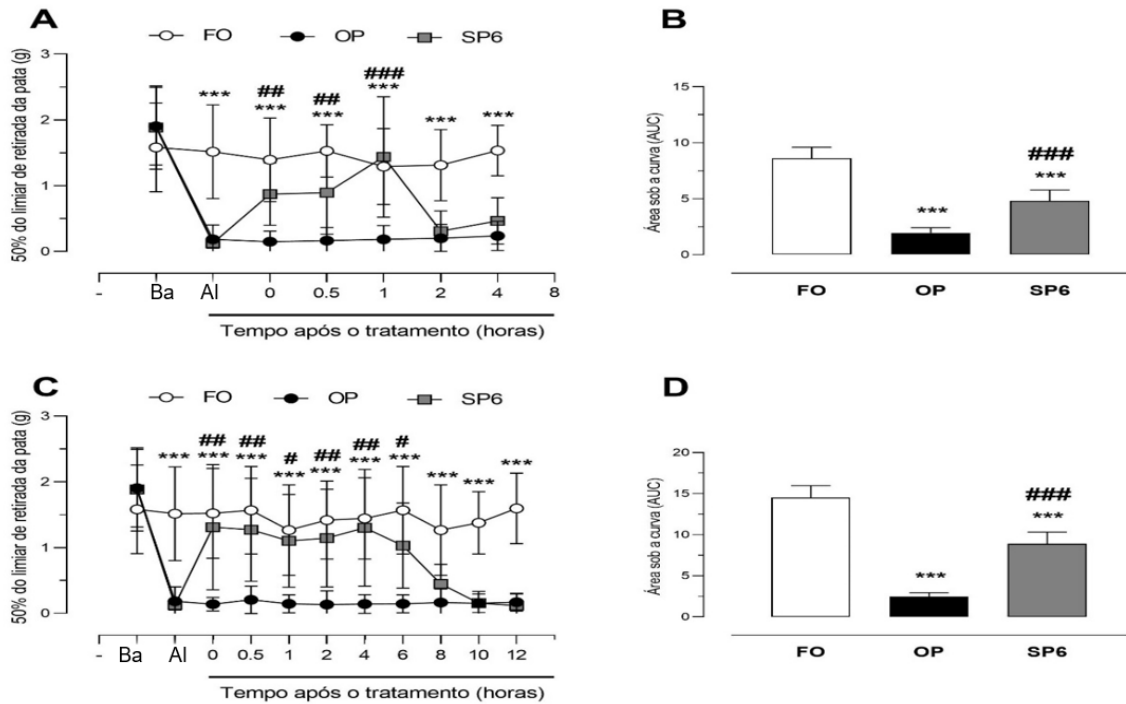
As Figuras 06B, 07B e 07D representam a área sob a curva (AUC) do teste de von Frey ao longo dos 28 dias de avaliações, no primeiro e no quinto dia de tratamento, respectivamente.

Figura 06A e B: Decurso temporal do efeito da acupuntura manual sobre a hiperalgesia mecânica induzida por lesão neuropática.



Decurso temporal do efeito da acupuntura manual sobre a hiperalgesia mecânica induzida por lesão neuropática. 06ª) Curso completo de avaliações de hiperalgesia mecânica, que se iniciaram com avaliações basais antes do procedimento cirúrgico (Ba), seguidas de uma avaliação inicial sete dias após a cirurgia e sem tratamento (AI) e depois diariamente. 06B) Área sob a curva (AUC) do teste de von Frey ao longo dos 28 dias de avaliações. Em ambas: (FO) grupo falso operado; (OP) grupo operado tratado sem tratamento; (SP6) grupo operado tratado com acupuntura manual no acuponto SP6. Todos os grupos possuem $n=08$. Os símbolos indicam: *** $p < 0,001$ – grupo OP quando comparado com FO; # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ e ##### $p < 0,001$ grupo SP6 quando comparado com grupo OP. Os grupos FO e OP apresentaram diferença estatística de $p < 0,001$ em todos os dias após a cirurgia, mas os símbolos foram retirados do gráfico para melhor visualização (ANOVA de 2 vias seguido de teste post-hoc de Bonferroni). Fonte: Próprio autor.

Figura 07: Decurso temporal do efeito da acupuntura manual na hiperalgesia mecânica induzida por LPNC após um e cinco tratamentos.



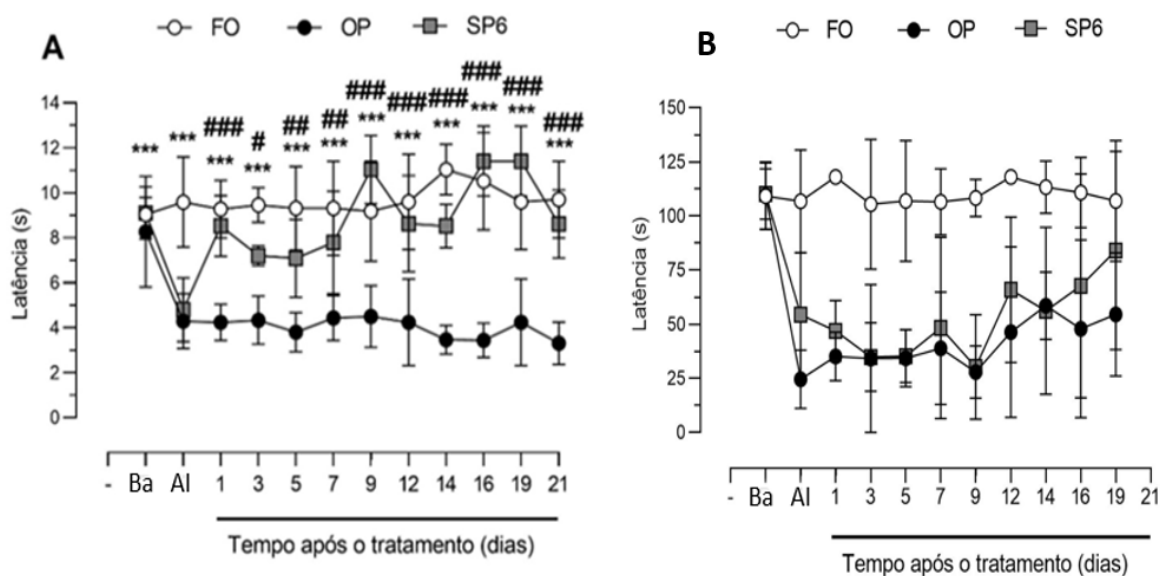
Decurso temporal do efeito da acupuntura manual na hiperalgesia mecânica induzida por LPNC após um e cinco tratamentos. 07A) Avaliações basais antes do procedimento cirúrgico (Ba), seguidas de uma avaliação inicial sete dias após a cirurgia e sem tratamento (AI) e avaliações a partir do momento após o primeiro tratamento, com números indicando horas. 07B) Área sob a curva (AUC) do teste de von Frey no primeiro dia de tratamento. 07C) Avaliações basais antes do procedimento cirúrgico (Ba), seguidas de uma avaliação inicial sete dias após a cirurgia e sem tratamento (AI) e avaliações a partir do momento após o quinto tratamento, com números indicando horas. 07D) Área sob a curva (AUC) do teste de von Frey no quinto dia de tratamento. Em todas: (FO) grupo falso operado; (OP) grupo operado tratado sem tratamento; (SP6) grupo operado tratado com acupuntura manual no acuponto SP6. Todos os grupos possuem n=08. Os símbolos indicam: ***p<0,001 - grupo OP quando comparado com FO; #p<0,05, ##p<0,01 e ####p<0,001 grupo SP6 quando comparado com grupo OP (ANOVA de 2 vias seguido de teste post-hoc de Bonferroni). Fonte: Próprio autor.

4.2 O TRATAMENTO COM ACUPUNTURA NO ACUPONTO SP6 É CAPAZ DE REDUZIR A HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LPNC, MAS NÃO INTERFERE NA HIPERALGESIA AO FRIO

Os camundongos submetidos à cirurgia de LPNC na primeira fase desse estudo apresentaram hiperalgesia térmica ao calor e ao frio quando avaliados pelo método descrito por Hargreaves e na placa fria, respectivamente.

O tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 diminuiu significativamente a hiperalgesia térmica ao calor, avaliando-se 1 hora após a retirada da agulha, ao longo de 21 dias, com $p < 0,001$ (Figura 08A). Contudo, não foi observado efeito analgésico persistente na redução da hiperalgesia ao calor, uma vez que os animais retornavam ao limiar baixo de resposta ao calor antes de cada tratamento. Curiosamente, a estimulação com agulha no acuponto SP6 não foi efetiva para reduzir a hiperalgesia ao frio, testada a uma temperatura de 10 graus Celsius (Figura 08B).

Figura 08: Acupuntura manual reduz a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela LPNC em camundongos, mas não interfere na hiperalgesia térmica ao frio.



Acupuntura manual reduz a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela LPNC em camundongos, mas não interfere na hiperalgesia térmica ao frio. 08A) Curso completo de avaliações de hiperalgesia térmica ao calor, que se iniciaram antes do procedimento cirúrgico (Ba), seguidas de uma avaliação inicial sete dias após a cirurgia e sem

tratamento (AI) e depois em dias alternados. 08B) Curso completo de avaliações de hiperalgesia térmica ao frio, que se iniciaram antes do procedimento cirúrgico (Ba), seguidas de uma avaliação inicial sete dias após a cirurgia e sem tratamento (AI) e depois em dias alternados. Em ambas: (FO) grupo falso operado; (OP) grupo operado tratado sem tratamento; (SP6) grupo operado tratado com acupuntura manual no acuponto SP6. Todos os grupos possuem n=08. Os símbolos indicam: ***p<0,001 - grupo OP quando comparado com FO; #p<0,05, ##p<0,01 e ####p<0,001 grupo SP6 quando comparado com grupo OP (ANOVA de 2 vias seguido de teste post-hoc de Bonferroni). Fonte: Próprio autor.

4.3 A ACUPUNTURA MANUAL É CAPAZ DE ALTERAR O METABOLISMO EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM O ACUPONTO SP6 APÓS LPNC

A metabolômica, como era esperado, revelou a presença de diversos metabólitos no soro. Alguns desses metabólitos estavam presentes em todos os grupos de camundongos. Nesta etapa dos estudos, com o objetivo de racionalizar as discussões e após uma análise preliminar, foram selecionados os lipídios, com ênfase nos ácidos graxos. Tais metabólitos estão evidenciados na tabela abaixo (Tabela 01):

Tabela 01: Substâncias reveladas pela metabolômica no soro dos camundongos após o 10º tratamento

SUBSTÂNCIA	FO		SP6		LPNC		LPNC+SP6	
	DESVIO	MÉDIA	DESVIO	MÉDIA	DESVIO	MÉDIA	DESVIO	MÉDIA
2,3-dimetil-aziridina	0,069	0,815	0,237	1,003	0,357	1,238	0,717	1,669
Carbamato de N,n-dietila	0,016	0,548	0,195	0,561	0,301	0,537	0,151	0,832
Ácido propanóico, 2	0,335	0,740	0,432	0,888	0,222	0,886	1,306	1,725
Ácido acético	0,234	0,294	0,127	0,158	0,224	0,200	0,059	0,234
Ácido benzóico	0,063	0,119	0,074	0,129	0,077	0,116	0,075	0,149
Glicerol	0,230	0,456	0,307	0,551	0,244	0,613	0,397	1,678(A)
Ácido butanodióico	0,034	0,066	0,095	0,130	0,055	0,072	0,109	0,295(B)
Ácido hexanodióico	0,109	0,148	0,013	0,082	0,061	0,096	0,045	0,127
Ácido benzóico, 4	0,026	0,093	0,043	0,102	0,015	0,097	0,027	0,104
Ácido dodecanóico	0,017	0,108	0,011	0,097	0,042	0,144	0,050	0,137
Ácido 1,4-benzenodicarboxílico	0,500	0,382	0,037	0,277	0,818	0,228	0,621	0,329
Ácido tetradecanóico	0,153	1,015	0,194	0,981	0,121	1,019	0,199	0,897
Ácido N-pentadecanóico	0,161	0,657	0,169	0,655	0,165	0,692	0,206	0,875

Ácido hexadecanóico	1,961	14,270	1,023	14,560	1,420	13,150	1,594	15,200
Ácido Cis-9-hexadecenóico	0,600	4,854	1,358	4,877	1,298	5,049	0,536	3,183
Ácido Cis-10-heptadecenóico	0,088	0,786	0,077	0,747	0,084	0,775	0,010	0,593(B)
Ácido 9,12-octadecadienóico (z,z)-	9,005	21,660	10,890	21,460	12,300	18,670	1,820	6,775
Ácido araquidônico	0,448	3,815	1,149	4,347	2,051	3,717	1,020	2,212(C)
Squaleno	0,096	0,301	0,108	0,250	0,337	0,442	0,349	0,559
Colesterol	0,801	1,902	1,273	2,280	2,437	2,602	0,853	1,807

Tabela 01: Substâncias reveladas pela metabolômica no soro dos camundongos após o 10º tratamento. FO = Falso Operados sem tratamento; SP6 = Falso Operados tratados com acupuntura manual no acuponto SP6; LPNC = Operados, sofreram cirurgia de ligadura parcial do nervo ciático (LPNC) e não receberam tratamento; LPNC+SP6 = animais que foram operados com LPNC e receberam acupuntura no acuponto SP6. (A) Diferença significativa com $p < 0,001$ entre o grupo LPNC+SP6 versus os demais grupos. (B) Diferença estatística com $p < 0,05$ entre o grupo LPNC versus LPNC+SP6. (C) Diferença estatística com $p < 0,05$ entre o grupo SP6 comparado ao grupo LPNC+SP6.

Curiosamente, a análise da metabolômica revelou como possíveis marcadores de tratamento com acupuntura, oito substâncias que foram encontradas nos camundongos operados ou falso-operados tratados no acuponto SP6 e não foram evidenciadas nos outros animais: Ácido 11-Eicosenóico, Ácido butanóico, 3-metil-3-Ácido propanóico, Ácido pentanodióico, Ácido pentanóico, Ácido nonanóico, 4-Fenilbutano-2-ol; 2-Etil-hexil-2-etil-hexanoato. Essas substâncias, embora encontradas no presente estudo, não foram avaliadas mais profundamente e não foi possível realizar a estatística de todas elas pois não estavam presentes em todos os grupos experimentais.

5. DISCUSSÃO

Utilizando modelo de dor neuropática por ligadura parcial do nervo ciático em camundongos, o presente trabalho foi capaz de demonstrar persistência na ação analgésica da acupuntura, algo que até o momento não parece ter sido evidenciado na literatura em estudos pré-clínicos. Também foram encontradas alterações na metabolômica dos animais submetidos aos procedimentos, corroborando estudos que encontraram alterações metabólicas em animais e seres humanos com quadros de dor e submetidos à acupuntura.

5.1 A TERAPIA COM ACUPUNTURA MANUAL NO ACUPONTO SP6 APRESENTA AÇÃO ANALGÉSICA PERSISTENTE NO MODELO DE NEUROPATIA INDUZIDO PELA LPNC

O modelo de neuropatia através da LPNC utilizado no presente estudo é bem caracterizado e largamente empregado para investigação pré-clínica, pois induz respostas comportamentais de dor neuropática semelhantes às que ocorrem em seres humanos. De fato, como já foi mencionado, o modelo torna possível poupar fibras nervosas em número suficiente para que o membro inferior afetado não demonstre grande prejuízo sensorial ou motor, dessa forma não há comprometimento dos resultados da avaliação comportamental (MCMAHON; KOLTZENBURG; TRACEY *et al.*, 2006). Como esperado, a cirurgia de LPNC utilizada neste trabalho foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica de maneira expressiva em todos os animais operados.

Em estudos clínicos, o uso de acupuntura como tratamento para aliviar dores neuropáticas ainda pode ser controverso, a exemplo de ensaio publicado demonstrando que a eletroacupuntura nos acupontos SP6 e ST36, ou LR3 e BL60, em indivíduos com condições neuropáticas dolorosas em membros inferiores, não apresentou diferença estatisticamente significativa ao ser comparada com tratamento com pseudo-eletroacupuntura (aplicação da agulha em pontos anatômicos neutros) (PENZA; BRICCHI; SCOLA *et al.*, 2011). Ainda assim, diversos trabalhos recentes consideraram a acupuntura uma estratégia potencialmente benéfica e segura, pois trata-se de estimulação nervosa não invasiva (YIN; ZHU; XU *et al.*, 2020; LIU; CHEN; GUO *et al.*, 2021; KELLY; WILLIS, 2019), cujo sinal é conduzido especialmente através de fibras aferentes A β , A δ , e fibras C (HUO; HAN; LIU *et al.*, 2020).

Outro protocolo de pesquisa possível seria a investigação de terapias como a acupuntura empregada previamente em modelos animais de nocicepção evocados através de estímulos

nocivos em animais “normais”. Tal protocolo é alvo de críticas, pois o procedimento realizado nessa sequência demonstra o efeito analgésico preventivo da acupuntura, ao invés de um efeito analgésico terapêutico para casos de condições dolorosas preexistentes. Além disso, pacientes humanos comumente recebem tratamento com acupuntura quando já apresentam quadro de dor e não preventivamente enquanto ainda estão saudáveis (KOO; PARK; LIM *et al.*, 2002).

Ainda que existam trabalhos em animais e humanos confirmando a efetividade da acupuntura no acuponto SP6 para alívio das respostas comportamentais relacionadas à dor neuropática (CIDRAL-FILHO; SILVA; MORÉ *et al.*, 2011; LIANG; QIU; DU *et al.*, 2016; SUNG; MOON; CHOI, *et al.*, 2023), os mesmos foram conduzidos com uso de eletroestimulação ou associação com outros pontos, havendo carência de trabalhos relatando o efeito da acupuntura manual neste acuponto isoladamente na redução da hiperalgesia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. No presente estudo, a intervenção com acupuntura manual no acuponto SP6, unilateral e ipsilateralmente à lesão, apresentou efeito de diminuir de forma significativa a hiperalgesia mecânica gerada pela cirurgia de LPNC, de maneira terapêutica, tanto após a primeira sessão quanto posteriormente ao longo de todos os dias em que houve avaliação.

A experimentação realizada no primeiro dia de tratamento com acupuntura evidenciou que a ação antinociceptiva do acuponto SP6 iniciou-se imediatamente após a intervenção e permaneceu por um período de sessenta minutos de forma significativa. Curiosamente, foi observado um aumento do efeito nociceptivo conforme o número de sessões de tratamento aumentava. Dessa forma, após os camundongos receberem o quinto tratamento (no 10º dia após o início dos tratamentos), houve nova avaliação do decurso temporal, dessa vez demonstrando um incremento do tempo de redução da hiperalgesia mecânica induzida pela acupuntura no SP6, mantendo-se por até 6 horas após o tratamento. A literatura já evidenciou que o efeito analgésico ou antinociceptivo da acupuntura possui duração clinicamente em torno de 3,6 horas, possivelmente chegando até 5,2 horas (GUO; ZHANG; GONG, *et al.*, 1995). De fato, a duração do efeito analgésico da acupuntura foi extensa após a primeira aplicação e pareceu aumentar no

quinto tratamento, além de ter ocorrido uma extensão da meia-vida desse efeito por muitas horas com as repetidas intervenções, sem induzir tolerância.

É interessante notar que a atividade analgésica da acupuntura manual no SP6 após a oitava sessão de tratamento perdurou significativamente por 24 a 48 horas, ou seja, mesmo nos dias em que os animais não sofreram intervenção. Após a décima sessão, essa ação perdurou por quatro dias (96 horas). De fato, meta-análise publicada recentemente observou efeito duradouro da acupuntura, chegando a perdurar por semanas após 8 a 10 sessões, analisando ensaios realizados em 2985 pacientes com dor crônica (MACPHERSON; VERTOSICK; FOSTER *et al.*, 2016). A persistência e aumento da duração do efeito da acupuntura observado nesse trabalho são dados bastante relevantes, especialmente considerando que a tolerância é um dos problemas mais prevalentes na utilização de longo prazo de medicamentos para controle da dor, como os fármacos opioides, que apresentam possível diminuição do efeito como consequência do uso prolongado (PORTENOY, 1999). Ainda mais, o período de tempo de analgesia observado após a acupuntura manual no acuponto SP6 foi superior à meia-vida de grande parte dos medicamentos empregados no tratamento farmacológico da dor neuropática atualmente, como opioides (morfina, metadona, tramadol), antidepressivos (amitriptilina, nortriptilina, desipramina) e anticonvulsivantes (gabapentina, carbamazepina, lidocaína); além disso, todas essas drogas necessitam de administração diária, além de potencialmente provocarem efeitos indesejados, possuírem contraindicações e, como já citado, serem capazes de provocar tolerância (BARON, 2009; BANNISTER; SACHAU; BARON *et al.*, 2020). Até o momento, não foi encontrada qualquer menção na literatura de fatores que possam ser responsáveis pela persistência dessa ação analgésica, sendo aventadas pelos pesquisadores as hipóteses de alteração de transcrição protéica e/ou alterações no metabolismo. Ainda que a metabolômica seja um recurso com potencial para facilitar essa compreensão e os resultados demonstrem distinções metabólicas após as intervenções, o presente estudo foi capaz de analisar apenas a metabolômica de animais sem qualquer tratamento e após todo o curso de tratamento, não tendo sido coletada amostra após poucas sessões de acupuntura.

5.2 O TRATAMENTO COM ACUPUNTURA NO ACUPONTO SP6 É CAPAZ DE REDUZIR A HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LPNC, MAS NÃO INTERFERE NA HIPERALGESIA AO FRIO

No presente trabalho, foi demonstrado que a terapia com acupuntura manual realizada no acuponto SP6 provocou redução significativa da hiperalgisia térmica ao calor induzida através de cirurgia LPNC, porém não apresentou efeito na hiperalgisia ao frio.

De fato, diversos estudos publicados demonstraram que a acupuntura manual em seres humanos aumentou o limiar de dor térmica relacionada ao calor (CHAE; PARK; HAHM *et al.*, 2006; KONG; FUFA; GERBER *et al.*, 2005; LANG; STOER; SCHOBBER *et al.*, 2010), enquanto demonstraram não haver efeito sobre a dor térmica ao frio (DOWNS; KIRK; MACSWEEN, 2005; LANG; STOER; SCHOBBER *et al.*, 2010). A literatura também já mencionou que a eletroacupuntura em combinações de acupontos é capaz de reduzir a hiperalgisia mecânica, avaliada com filamentos de von Frey, além da hiperalgisia térmica, avaliada através de placa quente, em ratos submetidos à lesão nervosa por constrição crônica, e que isso está relacionado à diminuição da expressão de receptores P2X3 na medula espinal (YU; ZHAO; LUO, 2013).

Usualmente, a maioria dos nociceptores expressa transdutores sensoriais de diferentes modalidades em combinação (polimodais – mecânicos e térmicos). A injúria ao nervo provoca alterações dramáticas nos circuitos sensoriais, e essas alterações contribuem para a resposta de alodínia mecânica e para a exacerbação da participação dos mecanotransdutores (PEIRS; SEAL, 2016).

A diferença na resposta à acupuntura manual também pode ser explicada pelas diferenças na transmissão das dores térmicas: a transmissão da dor térmica relacionada ao calor é evocada especialmente por nociceptores polimodais de fibra C responsivos a estímulos de

calor que vão de 41°C a 49°C e está ligada ao receptor vanilóide sensível à capsaicina (VR1), que também é encontrado em nociceptores A δ tipo II, por outro lado, a transmissão de dor térmica relacionada ao frio é mediada tanto por fibras C sensíveis ao frio quanto por fibras A δ que são insensíveis aos compostos vanilóides (BAEUMLER; FLECKENSTEIN; TAKAYAMA *et al.*, 2014). Mais do que isso, sabe-se que os receptores das fibras relacionadas à dor térmica são transientes, sendo as fibras relacionadas ao calor possuidoras de TRPV1 (TRPV1, em inglês, transient receptor potential channel vanilloid 1) e outros canais da mesma família e canais de sódio dependentes de voltagem; enquanto as fibras relacionadas ao frio possuem o canal TRPM8 (em inglês, transiente receptor potential metlastatin 8), assim como neurônios que expressam peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PEIRS; SEAL, 2016).

5.3 A ACUPUNTURA MANUAL ALTERA O METABOLISMO EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM O ACUPONTO SP6 APÓS LPNC

Os benefícios da acupuntura foram evidenciados através de dados de alta qualidade, sendo a terapia recomendada em diversas diretrizes clínicas internacionais, contudo, diversos autores acreditam que ainda há necessidade de comprovação clínica de melhor qualidade com o objetivo de auxiliar na sua transição do empírico para a Medicina Baseada em Evidências (LIU; CHEN; GUO *et al.*, 2021).

Embora seus mecanismos tenham sido amplamente investigados, a acupuntura segue sem possuir completo esclarecimento pela ciência (GOLDMAN; CHEN; FUJITA *et al.*, 2010; CIDRAL-FILHO; SILVA; MORÉ *et al.*, 2011; SILVA; GUGINSKI; WERNER *et al.*, 2011; HAN, 2011; EFFERT; XU; LEE, 2019). Como consequência, alguns autores sugerem que a metabolômica é um recurso com potencial para facilitar nossa compreensão sobre a MTC, assim como sobre os mecanismos moleculares de doenças e seus tratamentos por meio de

biomarcadores em fluidos biológicos (ZHANG; SUN; WANG *et al.*, 2010, ZHANG; SUN; YAN *et al.*, 2013).

No presente trabalho, a análise através da metabolômica demonstrou que a acupuntura manual foi capaz de alterar o metabolismo dos camundongos tratados com o acuponto SP6 após cirurgia de LPNC, com diferença significativa entre os grupos tratado com acupuntura e grupo controle, especificamente nas substâncias: ácido cis-10-heptadecenoico e ácido butanodióico; e com diferença significativa entre o grupo submetido à cirurgia e tratado com acupuntura e os outros três grupos na substância glicerol. A ferramenta de avaliação com metabolômica já foi utilizada para avaliar alterações após tratamento com acupuntura manual em camundongos e ratos (YANG; HE; CHEN *et al.*, 2022; LV; LIU; SU *et al.*, 2022; YANG; ZHANG; LV *et al.*, 2022); assim como em estudos clínicos, diversos pesquisadores documentaram alterações na metabolômica de seres humanos após algumas sessões com essa técnica de intervenção (ZHANG; YAN; SUN *et al.*, 2016; YANG; YU; DENG *et al.*, 2016). De fato, estudo publicado recentemente demonstrou alterações no metabolismo dos lipídios após acupuntura manual em 4 acupontos do corpo de camundongos com estresse crônico. Os autores atribuíram o resultado a uma atenuação da resistência à leptina provocada pelo tratamento, que reduziu as citocinas pró-inflamatórias nos camundongos, o que potencialmente inibiu o progresso de processos inflamatórios (JUNG; LEE; LEE *et al.*, 2021).

No presente estudo, o montante de ácido araquidônico estava diminuído no grupo que sofreu lesão por LPNC e foi tratado com acupuntura por 23 dias. Contudo, essa diferença foi observada apenas quando comparamos os animais falso operados tratados com acupuntura, sendo necessário aprofundar os estudos para esclarecimento das causas dessa diminuição. Um estudo recente realizado com ratos em modelo de dor neuropática, demonstrou após 5 semanas da lesão de esmagamento do nervo ciático uma diminuição nos lipídios, em especial, no conteúdo de ácido araquidônico (SENKO; GOROVAYA; STEKOLSHCHIKOVA *et al.*, 2022). O efeito pró-inflamatório do ácido araquidônico já foi descrito em outras publicações (CAMBRIA; ANDERSON; DIKDAN *et al.*, 1991), assim como contribui para a fluidez da

membrana celular, regulação de canais iônicos dependentes de voltagem, ativação de receptores da membrana neuronal tipo ácido gama-amino butíricos (GABA-R) e até na indução de apoptose celular (TALLIMA; RIDI, 2018).

Por outro lado, houve aumento no ácido butanodióico no grupo que sofreu lesão por LPNC e foi tratado com acupuntura comparado ao grupo LPNC. Mais conhecido como ácido succínico, o ácido butanodióico é parte do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou ciclo de Krebs, e sua presença está relacionada com atividade inflamatória (HAMEL; SANCHEZ; DUHAMEL *et al.*, 2014). Curiosamente, estudo recente demonstrou diminuição dessa substância após tratamento com acupuntura em mulheres com incontinência urinária de estresse (ZHANG; YANG; YIN; ZHU; XU *et al.*, 2020), enquanto análise metabolômica em osteoartrite demonstrou associação entre a presença de ácido succínico e dor (MEHTA; VIJAY; GOHIR *et al.*, 2023). A marcante diminuição do ácido cis-10-heptadecenoico observada nesse estudo não foi encontrada em outros estudos, talvez pelo fato de que o ácido heptadecenoico foi descrito como um dos ácidos graxos componentes das leveduras, que se acumulam no tecido adiposo dos animais (TAJIMA; OKADA; TADOKORO-YASUI *et al.*, 1976). Em humanos, estudo encontrou associação inversa entre ácido trans-10-heptadecenoico e gravidez (LI; TIAN; LV; LIU; SU *et al.*, 2022).

O glicerol aumentou nos camundongos submetidos à cirurgia de LPNC e tratados com acupuntura em relação a todos os outros três grupos. O glicerol está envolvido no metabolismo de carboidratos e lipídios. Um estudo recente em camundongos com falência ovariana prematura demonstrou que a eletroacupuntura foi capaz de aumentar os níveis de glicerol (CHEN; HE; GUO *et al.*, 2022), assim como a acupuntura manual foi capaz de reverter a diminuição de glicerol no tecido gástrico de ratos com gastrite crônica atrófica (LIU; SHEN; LIU *et al.*, 2020). De forma interessante, foi demonstrado que uma preparação de éteres de alquilglicerol, constituída principalmente por álcool químico, impediu a ativação microglial M1, contribuindo para a manutenção de níveis normais de neurogênese no hipocampo, normalizando a memória de trabalho e a atividade locomotora de camundongos com neuropatia

(TYRTYSHNAIA; MANZHULO; SULTANOV *et al.*, 2017). Em contraste, a microglia ativada por M2 induz a neurogênese (BUTOVSKY; ZIV; SCHWARTZ *et al.*, 2006; NIKOLAKOPOULOU; DUTTA; CHEN *et al.*, 2013): a interleucina-10 (IL-10) secretada pela microglia M2 controla a neurogênese adulta ao promover a diferenciação das células progenitoras (PEREIRA; FONT-NIEVES; HAUTE *et al.*, 2015; PEREZ-ASENSIO; PERPIÑÁ; PLANAS *et al.*, 2013). Em estudos prévios do nosso laboratório foi demonstrado que o tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 produz uma mudança fenotípica em macrófagos (aumentando M2, macrófagos anti-inflamatórios) e aumenta as concentrações de IL-10 no músculo reduzindo a dor e a inflamação de camundongos com dor muscular inflamatória induzida por carragenina (SILVA; BOBINSKI; SATO *et al.*, 2015). Essa via de ativação da acupuntura parece ser muito importante e deve ser mais bem estudada em estudos futuros.

Curiosamente, a análise da metabolômica revelou possíveis marcadores de tratamento com acupuntura, oito substâncias foram encontradas nos camundongos operados ou falso-operados que receberam intervenção de acupuntura no acuponto SP6 e não foram evidenciadas nos outros animais: Ácido 11-Eicosenoico, Ácido butanoico, 3-metil-3-Ácido propanoico, Ácido pentanodioico, Ácido pentanoico, Ácido nonanoico, 4-Fenilbutano-2-ol; 2-Etil-hexil-2-etil-hexanoato; é importante ressaltar que nenhuma dessas substâncias corresponde àquelas que foram encontradas em estudo que comparou acupuntura com e sem estimulação manual em ratos espontaneamente hipertensos, que citou alfa-cetoglutarato e ácido N-acetil glutâmico como candidatos à biomarcadores de acupuntura manual (WANG; LI; ZHOU *et al.*, 2017), nem se assemelham ao que foi encontrado em estudo usando seres humanos, que citou a-glucose/glicina, lactate, histidina/taurine, treonina e lisina/arginina como biomarcadores encontrados após aplicação de acupuntura nos acupontos ST36, ST21, ST3, GB34, e BL40 (WANG; WU; CHEN *et al.*, 2012).

5.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS

Questões metodológicas podem ter influenciado como limitações no presente estudo. Por exemplo, com relação à algesia térmica, estudos em seres humanos utilizando áreas pequenas de pele para investigação de dor relacionada ao frio frequentemente encontram resultados negativos, ao contrário de estudos em que, por exemplo, um membro é imerso em água gelada; a intensidade dos estímulos utilizados nos estudos comportamentais pode não ter sido suficiente para gerar respostas ou ter sido demasiadamente intensa provocando respostas exageradas; o fato de não haver grupo controle com algum tipo de acupuntura sham é outro fator que pode ter apresentado impacto na avaliação dos dados (BAEUMLER; FLECKENSTEIN; TAKAYAMA *et al.*, 2014).

O estudo de animais de ambos os sexos é recomendado para estudos de dor, ainda assim, considerando a complexidade dos resultados, o presente estudo utilizou apenas camundongos machos devido à influência dos hormônios do ciclo estral no metabolismo das fêmeas (HOCHMUTH; KÖRNER; OTT; *et al.*, 2021).

Ademais, já foi descrito na literatura que estudos com número pequeno de animais e alto número de análises em uma pequena população como o experimento atual estão expostos ao risco de resultados falso-positivos para metabolômica (TECKCHANDANI; GOWDA; RAFTERY *et al.*, 2020). Embora os animais da segunda fase do trabalho tenham sido avaliados apenas para hiperalgesia mecânica, o número de animais por grupo foi pequeno. Ainda, a metodologia para retirada do material pode interferir nos resultados encontrados e uma análise mais criteriosa dos componentes deve ser realizada. Mais do que isso, resultados positivos não implicam necessariamente que os metabólitos identificados estejam envolvidos na fisiopatologia da condição dolorosa ou no tratamento - tais relações requerem mais investigações mecanicistas, como a modulação da via metabólica (TECKCHANDANI; GOWDA; RAFTERY *et al.*, 2020).

De forma importante, o trabalho atual foi realizado com pesquisadores cegados para os grupos experimentais a fim de reduzir o viés de crença, muito discutido em trabalhos com acupuntura, onde a crença do terapeuta ou do próprio paciente de que a terapia é eficaz pode influenciar o resultado (CHERKIN; SHERMAN; AVINS *et al.*, 2009; ERNST; LEE; CHOI, 2011). Portanto, pesquisas com animais realizados com critérios éticos e com redução de vieses, parecem ser uma ferramenta importante para estudos mais aprofundados sobre o efeito da acupuntura e sobre o mecanismo da ação dela.

6. CONCLUSÃO

A acupuntura manual mostrou-se eficaz no tratamento da dor neuropática com redução da hiperalgesia mecânica e térmica ao calor, com efeito mais duradouro quanto maior o número de sessões. A análise metabolômica revelou possíveis alterações metabólicas que estão relacionadas com a acupuntura manual, assim como possíveis biomarcadores para esse tipo de intervenção.

Ainda assim, o estudo é pequeno e a metodologia possui espaço para melhoria. É necessário expandir a pesquisa relacionando metabolômica e acupuntura, uma vez que suas descobertas podem ajudar a esclarecer os mecanismos da acupuntura e também da dor. Portanto, o presente estudo surge como uma perspectiva de uso da metabolômica, que pode fornecer ferramentas para diagnosticar, prever, monitorar e tratar as condições de dor com acupuntura de forma eficaz e segura.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.P.; SOUZA, C.P.Q.; BARBOSA, W.J.M. *et al.* Prevalence of chronic pain in Brazil: systematic review. **Brazilian Journal Of Pain**, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 257-267, jul. 2021. Trimestral. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2595-0118.20210041>.
- ATTAL, N.; LANTERI-MINET, M.; LAURENT, B. *et al.* The specific disease burden of neuropathic pain: results of a french nationwide survey. **Pain**, [S.L.], v. 152, n. 12, p. 2836-2843, dez. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.014>.
- BAEUMLER, P.I.; FLECKENSTEIN, J.; TAKAYAMA, S. *et al.* Effects of Acupuncture on Sensory Perception: a systematic review and meta-analysis. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 1-40, 12 dez. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113731>.
- BANNISTER, K.; LOCKWOOD, S.; GONCALVES, L. *et al.* An investigation into the inhibitory function of serotonin in diffuse noxious inhibitory controls in the neuropathic rat. **European Journal Of Pain**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 750-760, 28 nov. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejp.979>.
- BANNISTER, K.; SACHAU, J.; BARON, R. *et al.* Neuropathic Pain: mechanism-based therapeutics. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 257-274, 6 jan. 2020. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021524>.
- BARON, R. Neuropathic Pain: a clinical perspective. **Sensory Nerves**, [S.L.], p. 3-30, 2009. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7_1.
- BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, [S.L.], v. 9, n. 8, p. 807-819, ago. 2010. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70143-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70143-5).
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, [S.L.], v. 139, n. 2, p. 267-284, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- BENER, A.A.; VERJEE, M.; DAFEEAH, E.E. *et al.* Psychological factors: anxiety, depression, and somatization symptoms in low back pain patients. **Journal Of Pain Research**, [S.L.], p. 95, fev. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/jpr.s40740>.

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 87-107, abr. 1988. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6).

BOUCHER, T.J.; OKUSE, K.; BENNETT, D.L.H. *et al.* Potent Analgesic Effects of GDNF in Neuropathic Pain States. **Science**, [S.L.], v. 290, n. 5489, p. 124-127, 6 out. 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5489.124>.

BRAVO, L.; LLORCA-TORRALBA, M.; BERROCOSO, E. *et al.* Monoamines as Drug Targets in Chronic Pain: focusing on neuropathic pain. **Frontiers In Neuroscience**, [S.L.], v. 13, n. 01268, p. 1-25, 26 nov. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2019.01268>.

BUTOVSKY, O.; ZIV, Y.; SCHWARTZ, A. *et al.* Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. **Molecular And Cellular Neuroscience**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 149-160, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2005.10.006>.

CAMBRIA, R.A.; ANDERSON, R.J.; DIKDAN, G. *et al.* The influence of arachidonic acid metabolites on leukocyte activation and skeletal muscle injury after ischemia and reperfusion. **Journal Of Vascular Surgery**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 549-556, out. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0741-5214\(91\)90250-x](http://dx.doi.org/10.1016/0741-5214(91)90250-x).

CHAE, Y.; PARK, H.J.; HAHM, D.H. *et al.* Individual Differences of Acupuncture Analgesia in Humans Using cDNA Microarray. **The Journal Of Physiological Sciences**, [S.L.], v. 56, n. 6, p. 425-431, 2006. Physiological Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.2170/physiolsci.rp010206>.

CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal Of Neuroscience Methods**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 55-63, jul. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9).

CHEN, M.; HE, QD.; GUO, JJ. *et al.* Electro-Acupuncture Regulates Metabolic Disorders of the Liver and Kidney in Premature Ovarian Failure Mice. **Frontiers In Endocrinology**, [S.L.], v. 13, 25 jul. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.882214>.

CHERKIN, D.C.; SHERMAN, K.J.; AVINS, A.L. *et al.* A Randomized Trial Comparing Acupuncture, Simulated Acupuncture, and Usual Care for Chronic Low Back

Pain. **Archives Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 169, n. 9, p. 858, 11 maio 2009. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archinternmed.2009.65>.

CHIMENTI, R.L.; A FREY-LAW, L.; SLUKA, K.A. A Mechanism-Based Approach to Physical Therapist Management of Pain. **Physical Therapy**, [S.L.], v. 98, n. 5, p. 302-314, 16 abr. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ptj/pzy030>.

CIDRAL-FILHO, F.J.; SILVA, M.D. da; MORÉ, A.O.O. *et al.* Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuroscience**, [S.L.], v. 193, p. 370-376, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.076>.

Da SILVA, M.D. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da acupuntura no acuponto spleen 6 (SP6) em camundongos: análise dos seus mecanismos neurobiológicos**. 2013. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

Da SILVA, M.D.; BOBINSKI, F.; SATO, K.L. *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**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 19-31, 25 jun. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-8790-x>.

Da SILVA, M.D.; GUGINSKI, G.; WERNER, M.F.P. *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**, [S.L.], v. 2011, p. 1-9, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nej036>.

DAI, Y.; KONDO, E.; FUKUOKA, T. *et al.* The effect of electroacupuncture on pain behaviors and noxious stimulus-evoked Fos expression in a rat model of neuropathic pain. **The Journal Of Pain**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 151-159, jun. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1054/jpai.2001.19964>.

DEADMAN, P.; AL-KHAFI, M.; BAKER, K. **A Manual of Acupuncture**. Vista, CA, USA: Eastland Press, 1998.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C.J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, [S.L.], v. 87, n. 2, p. 149-158, ago. 2000. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959\(00\)00276-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959(00)00276-1).

DIMITROVA, A.; MURCHISON, C.; OKEN, B. Acupuncture for the Treatment of Peripheral Neuropathy: a systematic review and meta-analysis. **The Journal Of Alternative**

And Complementary Medicine, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 164-179, mar. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/acm.2016.0155>.

DIXON, W.J. Efficient Analysis of Experimental Observations. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 441-462, abr. 1980. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.002301>.

DOWNS, N.M.; KIRK, K.; MACSWEEN, A. The Effect of Real and Sham Acupuncture on Thermal Sensation and Thermal Pain Thresholds. **Archives Of Physical Medicine And Rehabilitation**, [S.L.], v. 86, n. 6, p. 1252-1257, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apmr.2004.10.037>.

DUEÑAS, M.; OJEDA, B.; SALAZAR, A. *et al.* A review of chronic pain impact on patients, their social environment and the health care system. **Journal Of Pain Research**, [S.L.], v. 9, p. 457-467, jun. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/jpr.s105892>.

ERNST, E.; LEE, M.S.; CHOI, T.Y. Acupuncture: does it alleviate pain and are there serious risks? a review of reviews. **Pain**, [S.L.], v. 152, n. 4, p. 755-764, abr. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2010.11.004>.

FILSHIE, J.; ZARNEGAR, R. Acupuncture. In: HOLDCROFT, Anita; JAGGAR, Sian. **Core topics in Pain**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 247-254, 2005.

FINCO, G.; LOCCI, E.; MURA, P. *et al.* Can Urine Metabolomics Be Helpful in Differentiating Neuropathic and Nociceptive Pain? A Proof-of-Concept Study. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 1-10, 2 mar. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150476>.

FINNERUP, N.B.; HAROUTOUNIAN, S.; KAMERMAN, P. *et al.* Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain**, [S.L.], v. 157, n. 8, p. 1599-1606, 13 jan. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000492>.

FINNERUP, N.B.; KUNER, R.; JENSEN, T.S. Neuropathic Pain: from mechanisms to treatment. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 101, n. 1, p. 259-301, 1 jan. 2021. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00045.2019>.

GHAZISAEIDI, S.; MULEY, M.M.; SALTER, M.W. Neuropathic Pain: mechanisms, sex differences, and potential therapies for a global problem. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 63, n. 1, p. 565-583, 20 jan. 2023. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051421-112259>.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic Pain: principles of diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, [S.L.], v. 90, n. 4, p. 532-545, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.01.018>.

GILRON, I.; WATSON, C.P.N.; CAHILL, C.M. *et al.* Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. **Canadian Medical Association Journal**, [S.L.], v. 175, n. 3, p. 265-275, 1 ago. 2006. CMA Joule Inc. <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.060146>.

GOLDMAN, N.; CHEN, M.; FUJITA, T. *et al.* Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 883-888, 30 maio 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2562>.

GREENBAUM, D.; LUSCOMBE, N.M.; JANSEN, R. *et al.* Interrelating Different Types of Genomic Data, from Proteome to Secretome: 'oming in on function. **Genome Research**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1463-1468, 1 set. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.207401>.

GUO, R.; ZHANG, L.; GONG, Y. *et al.* The treatment of pain in bone metastasis of cancer with the analgesic decoction of cancer and the acupoint therapeutic apparatus. **J Tradit Chin Med**, v. 15, p. 262-264, 1995.

HAMEL, D.; SANCHEZ, M.; DUHAMEL, F. *et al.* G-Protein-Coupled Receptor 91 and Succinate Are Key Contributors in Neonatal Postcerebral Hypoxia-Ischemia Recovery. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 285-293, fev. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.113.302131>.

HAN, J.S. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy. **Pain**, [S.L.], v. 152, n. 3, p. 41-48, mar. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2010.10.012>.

HAN, J.S. Acupuncture and endorphins. **Neuroscience Letters**, [S.L.], v. 361, n. 1-3, p. 258-261, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.019>.

HAN, K.; ZHANG, L.; WANG, M. *et al.* Prediction Methods of Herbal Compounds in Chinese Medicinal Herbs. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 9, p. 2303, 10 set. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23092303>.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 77-88, jan. 1988. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7).

HOCHMUTH, L.; KÖRNER, C.; OTT, F.; *et al.* Sex-dependent dynamics of metabolism in primary mouse hepatocytes. **Archives Of Toxicology**, [S.L.], v. 95, n. 9, p. 3001-3013, 9 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-021-03118-9>.

HUANG, M.; PENG, Y.; HE, Q. *et al.* NMR-based metabonomics reveals the dynamic effect of electro-acupuncture on central nervous system in gastric mucosal lesions (GML) rats. **Chinese Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-17, 21 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13020-022-00593-9>.

HUI, K.K.S.; MARINA, O.; LIU, J. *et al.* Acupuncture, the limbic system, and the anticorrelated networks of the brain. **Autonomic Neuroscience**, [S.L.], v. 157, n. 1-2, p. 81-90, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2010.03.022>.

HUO, R.; HAN, S.P.; LIU, F.Y. *et al.* Responses of Primary Afferent Fibers to Acupuncture-Like Peripheral Stimulation at Different Frequencies: characterization by single-unit recording in rats. **Neuroscience Bulletin**, [S.L.], v. 36, n. 8, p. 907-918, 11 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12264-020-00509-3>.

JU, L.; WEN, Y.; YIN, J.; *et al.* Metabonomic study of the effects of different acupuncture directions on therapeutic efficacy. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1009-1010, p. 87-95, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.006>.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, [S.L.], v. 413, n. 6852, p. 203-210, set. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35093019>.

JUNG, J.; LEE, S.M.; LEE, M.J. *et al.* Lipidomics reveals that acupuncture modulates the lipid metabolism and inflammatory interaction in a mouse model of depression. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 94, p. 424-436, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2021.02.003>.

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

KELLY, R.B.; WILLIS, J. Acupuncture for Pain. **American Family Physician**, [S.L.], v. 100, n. 2, p. 89-96, julho 2019.

KEPLER, C.K.; MARKOVA, D.Z.; DIBRA, F. *et al.* Expression and Relationship of Proinflammatory Chemokine RANTES/CCL5 and Cytokine IL-1 β in Painful Human Intervertebral Discs. **Spine**, [S.L.], v. 38, n. 11, p. 873-880, maio 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/brs.0b013e318285ae08>.

KIM, K.W.; SHIN, W.C.; CHOI, M.S. *et al.* Effects of acupuncture on anthropometric and serum metabolic parameters in premenopausal overweight and obese women: a randomized, patient- and assessor-blind, sham-controlled clinical trial. **Acupuncture In Medicine**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 30-40, 17 abr. 2020. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0964528420912259>.

KIM, S.H.; CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 355-363, set. 1992. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90041-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(92)90041-9).

KLUSÁKOVÁ, I.; DUBOVÝ, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – An anatomical perspective. **Annals Of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, [S.L.], v. 191, n. 3, p. 248-259, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2009.02.007>.

KONG, J.; FUFA, D.T.; GERBER, A.J. *et al.* Psychophysical outcomes from a randomized pilot study of manual, electro, and sham acupuncture treatment on experimentally induced thermal pain. **The Journal Of Pain**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 55-64, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2004.10.005>.

KOO, S.T.; PARK, Y.II; LIM, K.S. *et al.* Acupuncture analgesia in a new rat model of ankle sprain pain. **Pain**, [S.L.], v. 99, n. 3, p. 423-431, out. 2002. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959\(02\)00164-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00164-1).

KRAYCHETE, D.C.; CALASANS, M.T.A.; VALENTE, C.M.L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 199-206, jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0482-50042006000300007>.

LANG, P.M.; STOER, J.; SCHOBER, G.M. *et al.* Bilateral Acupuncture Analgesia Observed by Quantitative Sensory Testing in Healthy Volunteers. **Anesthesia & Analgesia**, [S.L.], v. 110, n. 5, p. 1448-1456, maio 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e3181d3e7ef>.

LAU, W.K.; LAU, Y.M.; ZHANG, H.Q. *et al.* Electroacupuncture versus celecoxib for neuropathic pain in rat SNL model. **Neuroscience**, [S.L.], v. 170, n. 2, p. 655-661, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.07.031>.

LEE, J.Y.; CHOI, D.C.; OH, T.H. *et al.* Analgesic Effect of Acupuncture Is Mediated via Inhibition of JNK Activation in Astrocytes after Spinal Cord Injury. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 73948, 9 set. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073948>.

LI, M.; TIAN, Y.; LV, Y. *et al.* The association between serum fatty acids and pregnancy in PCOS women undergoing ovulation induction. **Gynecological Endocrinology**, [S.L.], v. 38, n. 12, p. 1097-1103, 28 nov. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09513590.2022.2148647>.

LIANG, Yi; QIU, Yujie; DU, Junying *et al.* Inhibition of Spinal Microglia and Astrocytes Contributes to the Anti-Allodynic Effect of Electroacupuncture in Neuropathic Pain Induced by Spinal Nerve Ligation. **Acupuncture In Medicine**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 40-47, fev. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1136/acupmed-2015-010773>.

LIN, C.C.; CHEN, Y.J.; CHEN, C.Y. *et al.* Crosstalk between transcription factors and microRNAs in human protein interaction network. **Bmc Systems Biology**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-13, 13 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-6-18>.

LIN, J.G.; KOTHA, P.; CHEN, Y.H. Understandings of acupuncture application and mechanisms. **American Journal Of Translational Research**, [s. l], v. 14, n. 3, p. 1469-1481, 15 Mar. 2022.

LIN, L.L.; HUANG, H.C.; JUAN, H.F. Discovery of biomarkers for gastric cancer: a proteomics approach. **Journal Of Proteomics**, [S.L.], v. 75, n. 11, p. 3081-3097, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.046>.

LIN, Z.M.; WANG, H.F.; ZHANG, F. The Effect of Erector Spinae Plane Blockade on Prevention of Postherpetic Neuralgia in Elderly Patients: A Randomized Double-blind Placebo-controlled Trial. **Pain Physician**, [s. l], v. 7, n. 24, p. 1109-1118, nov. 2021.

LIU, B.; CHEN, B.; GUO, Y. *et al.* Acupuncture – a national heritage of China to the world: international clinical research advances from the past decade. **Acupuncture And Herbal Medicine**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 65-73, dez. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/hm9.000000000000017>.

LIU, M.; SHEN, J.; LIU, C. *et al.* Effects of moxibustion and acupuncture at Zusanli (ST 36) and Zhongwan (CV 12) on chronic atrophic gastritis in rats. **Journal Of Traditional Chinese Medicine**, [s. l], v. 40, n. 5, p. 827-835, 13 out. 2020.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology ☆. **Pain**, [S.L.], v. 137, n. 3, p. 473-477, 31 jul. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>.

LOMBARD, M.C.; NASHOLD, B.S.; ALBE-FESSARD, D. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. **Pain**,

[S.L.], v. 6, n. 2, p. 163-174, abr. 1979. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(79\)90123-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(79)90123-4).

LONG, D. M.; BENDEBBA, M.; TORGERSON, W. S.; *et al.* Persistent back pain and sciatica in the United States: patient characteristics. **Journal of spinal disorders** , v. 9, p. 40-58, 1996.

LV, Z.; LIU, R.; SU, K. *et al.* Acupuncture ameliorates breast cancer-related fatigue by regulating the gut microbiota-gut-brain axis. **Frontiers In Endocrinology**, [S.L.], v. 13, p. 1-16, 24 ago. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.921119>.

MA, F.Q.; SUN, C.F.; WEI, J.J. *et al.* Electro-acupuncture regulates glucose metabolism in chronic stress model rats. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-9, 9 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-68132-w>.

MACPHERSON, H.; VERTOSICK, E.A.; FOSTER, N. *et al.* The persistence of the effects of acupuncture after a course of treatment: a meta-analysis of patients with chronic pain. **Pain**, [S.L.], v. 158, n. 5, p. 784-793, 17 out. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000747>.

MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, p. 215-222, 1998. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959\(98\)00045-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959(98)00045-1).

MCMAHON, S.; KOLTZENBURG, M.; TRACEY, I. *et al.* **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. 5. ed. London: Elsevier, 2006.

MEHTA, O.; VIJAY, A.; GOHIR, S.A. *et al.* Serum Metabolome Analysis identified amino-acid metabolism associated with pain in people with symptomatic knee Osteoarthritis – a cross-sectional study. **The Journal Of Pain**, [S.L.], v. 1, p. 1526, fev. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2023.02.023>.

MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. *et al.* Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. **Wall And Melzack'S Textbook Of Pain**, [S.L.], p. 3-34, 2006. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b0-443-07287-6/50006-0>.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress In Neurobiology**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 1-164, jan. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00048-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00048-3).

MILLIGAN, E.D.; WATKINS, L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 23-36, jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2533>.

MOGIL, J.S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 283-294, 4 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2606>.

MOULIN, De; BOULANGER A.; CLARK, Aj *et al.* Pharmacological Management of Chronic Neuropathic Pain: revised consensus statement from the canadian pain society. **Pain Research And Management**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 328-335, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/754693>.

MUSIAL, F. Acupuncture for the Treatment of Pain – A Mega-Placebo? **Frontiers In Neuroscience**, [S.L.], v. 13, p. 1-10, 17 out. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2019.01110>.

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress In Neurobiology**, [S.L.], v. 82, n. 4, p. 163-201, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.06.005>. BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain – a clinical perspective. **Nat Clin Prat Neurol**, v. 2, p. 95-106, 2006.

NEVES, M.L.; KARVAT, J.; SIMÕES, R.R. *et al.* The antinociceptive effect of manual acupuncture in the auricular branch of the vagus nerve in visceral and somatic acute pain models and its laterality dependence. **Life Sciences**, [S.L.], v. 309, p. 121000, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121000>.

NIKOLAKOPOULOU, A.M.; DUTTA, R.; CHEN, Z. *et al.* Activated microglia enhance neurogenesis via trypsinogen secretion. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 110, n. 21, p. 8714-8719, 6 maio 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1218856110>.

OKADA, K.; KAWAKITA, K. Analgesic Action of Acupuncture and Moxibustion: a review of unique approaches in japan. Evidence-Based **Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 11-17, 2009. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem090>.

ONDREJKOVICOVA, A.; PETROVICS, G.; SVITKOVA, K. *et al.* Why acupuncture in pain treatment? **Neuro Endocrinology Letters**, [s. l], v. 37, n. 3, p. 163-168, jul. 2016.

PEIRS, C.; SEAL, R.P. Neural circuits for pain: recent advances and current views. **Science**, [S.L.], v. 354, n. 6312, p. 578-584, 4 nov. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf8933>.

PENZA, P.; BRICCHI, M.; SCOLA, A. *et al.* Electroacupuncture Is Not Effective in Chronic Painful Neuropathies. **Pain Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 1819-1823, dez. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01230.x>.

PEREIRA, L.; FONT-NIEVES, M.; HAUTE, C.D. *et al.* IL-10 regulates adult neurogenesis by modulating ERK and STAT3 activity. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [S.L.], v. 9, p. 1-9, 25 fev. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00057>.

PEREZ-ASENSIO, F.J.; PERPIÑÁ, U.; PLANAS, A.M. *et al.* Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis on adult brain. **Journal Of Cell Science**, [S.L.], p. 4208-4219, 1 jan. 2013. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.127803>.

PERL, E.R. Ideas about pain, a historical view. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 71-80, jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2042>.

PORTENOY, R.K. Pain Specialists and Addiction Medicine Specialists Unite to Address Critical Issues. **American Pain Society Bulletin**, v. 9, 1999.

POVOLNY, B. Acupuncture and traditional Chinese medicine: an overview. **Techniques In Regional Anesthesia And Pain Management**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 109-110, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.trap.2008.01.002>.

RAJA, S.N.; CARR, D.B.; COHEN, M. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [S.L.], v. 161, n. 9, p. 1976-1982, set. 2020. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic Pain. **Annual Review Of Medicine**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 123-133, fev. 1998. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.49.1.123>.

SAWYNOK, J.; REID, A.; POON, A. Peripheral antinociceptive effect of an adenosine kinase inhibitor, with augmentation by an adenosine deaminase inhibitor, in the rat formalin test. **Pain**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 75-81, jan. 1998. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959\(97\)00153-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959(97)00153-x).

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V.; BECHARA, G.H.; FERREIRA *et al.* Effect of various acupuncture treatment protocols upon sepsis in Wistar rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1026, p. 251-256, 2004.

SELTZER, Z.E.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 205-218, nov. 1990. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)91074-s](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(90)91074-s).

SENKO, D.; GOROVAYA, A.; STEKOLSHCHIKOVA, E. *et al.* Time-Dependent Effect of Sciatic Nerve Injury on Rat Plasma Lipidome. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 24, p. 15544, 8 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232415544>.

SHERRINGTON, C.S. The Integrative Action of the Nervous System. **Nature**, [S.L.], v. 76, n. 1962, p. 122-122, jun. 1907. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/076122a0>.

SORKIN, L.S.; YAKSH, T.L. Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. **Neurotherapeutics**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 609-619, out. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nurt.2009.07.007>.

SUNG, W.S.; MOON, J.H.; CHOI, S.K. *et al.* Systemic Analgesic Effects of Electroacupuncture in Healthy Individuals: Thermal Threshold, Acupuncture Sensation Intensity and De-qi on Quantitative Sensory Test. **Alternative Therapies In Health And Medicine**, [s. l], v. 29, n. 2, p. 50-57, Mar. 2023. Disponível em: <http://alternative-therapies.com/oa/index.html?fid=7804>. Acesso em: 02 mar. 2023.

TABO, E.; JINKS, S. L.; EISELE, J. H. *et al.* Behavioral manifestations of neuropathic pain and mechanical allodynia, and changes in spinal dorsal horn neurons, following L4–L6 dorsal root constriction in rats. **Pain**, [S.L.], v. 80, n. 3, p. 503-520, 1 abr. 1999. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959\(98\)00243-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959(98)00243-7).

TABOSA, A.; YAMAMURA, Y.; FORNO, E.R. *et al.* Effect of the acupoints ST-36 (Zusanli) and SP-6 (Sanyinjiao) on intestinal myoelectric activity of Wistar rats. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 35, n. 6, p. 731-739, jun. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2002000600015>.

TAFFAREL, M.O.; FREITAS, P.M.C. Acupuntura e analgesia: aplicações clínicas e principais acupontos. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 39, n. 9, p. 2665-2672, dez. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782009000900047>.

TAJIMA, M.; OKADA, N.; TADOKORO-YASUI, S. *et al.* Fatty acid composition of adipose tissue and liver fats of the rats fed yeast grown on n-alkanes. **Journal Of Nutritional**

Science And Vitaminology, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 255-261, 1976. Center for Academic Publications Japan. <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.22.255>.

TALLIMA, H.; RIDI, R.El. Arachidonic acid: physiological roles and potential health benefits ⚡: a review. **Journal Of Advanced Research**, [S.L.], v. 11, p. 33-41, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2017.11.004>.

TANG, Y.; YIN, H.Y.; LIU, J. *et al.* P2X receptors and acupuncture analgesia. **Brain Research Bulletin**, [S.L.], v. 151, p. 144-152, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.015>.

TECKCHANDANI, Shweta; GOWDA, G. A. Nagana; RAFTERY, Daniel *et al.* Metabolomics in chronic pain research. **European Journal Of Pain**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 313-326, 5 nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejp.1677>.

TIAN, S.; WANG, J.; LI, Y. *et al.* The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 86, p. 2-10, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.009>.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of Analgesia. **Handbook Of Experimental Pharmacology**, [S.L.], p. 1-20, 1997. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-60777-6_1.

TODD, K.H. A Review of Current and Emerging Approaches to Pain Management in the Emergency Department. **Pain And Therapy**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 193-202, 10 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40122-017-0090-5>.

TORRES-ROSAS, R.; YEHA, G.; PEÑA, G. *et al.* Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 291-295, 23 fev. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3479>.

TYRTYSHNAIA, A.A.; MANZHULO, I.V.; SULTANOV, R.M. *et al.* Adult hippocampal neurogenesis in neuropathic pain and alkyl glycerol ethers treatment. **Acta Histochemica**, [S.L.], v. 119, n. 8, p. 812-821, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2017.10.007>.

TSENG, C.W.; LIN, C.C.; CHEN, C.N. *et al.* Integrative network analysis reveals active microRNAs and their functions in gastric cancer. **Bmc Systems Biology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-11, 26 jun. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-5-99>.

VAN HECKE, O.; AUSTIN, S.K.; KHAN, R.A. *et al.* Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**, [S.L.], v. 155, n. 4, p. 654-662, abr. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013>.

VICKERS, A.J.; VERTOSICK, E.A.; LEWITH, G. *et al.* Acupuncture for Chronic Pain: update of an individual patient data meta-analysis. **The Journal Of Pain**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 455-474, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2017.11.005>.

WALL, P.D.; DEVOR, M.; INBAL, R. *et al.* Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. **Pain**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 103-113, out. 1979. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(79\)90002-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(79)90002-2).

WAN, R.; FAN, Y.; ZHAO, A. *et al.* Comparison of Efficacy of Acupuncture-Related Therapy in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: a network meta-analysis of randomized controlled trials. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 13, p. 1-17, 7, mar. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.829409>.

WANG, Y.; LI, Y.; ZHOU, L. *et al.* Effects of Acupuncture on the Urinary Metabolome of Spontaneously Hypertensive Rats. **Acupuncture In Medicine**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 374-382, out. 2017. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1136/acupmed-2016-011170>.

WANG, Y.; WU, Q.F.; CHEN, C. *et al.* Revealing metabolite biomarkers for acupuncture treatment by linear programming based feature selection. **Bmc Systems Biology**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 15, 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-6-s1-s15>.

World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023. 2013 Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096>.

XIA, Y.; CAO, X.; WU, G.C. *et al.* **Acupuncture therapy for neurological diseases: a neurobiological view**. [S. L.]: Springer, 2010.

XU, J.; CHENG, K.K.; YANG, Z. *et al.* ¹H NMR Metabolic Profiling of Biofluids from Rats with Gastric Mucosal Lesion and Electroacupuncture Treatment. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2015, p. 1-11, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/801691>.

YAMAMURA, Y. **Acupuntura tradicional: a arte de inserir**. São Paulo: Roca, 2001.

YANG, B.; HE, M.; CHEN, X. *et al.* Acupuncture Effect Assessment in APP/PS1 Transgenic Mice: on regulating learning-memory abilities, gut microbiota, and microbial

metabolites. **Computational And Mathematical Methods In Medicine**, [S.L.], v. 2022, p. 1-20, 8 abr. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/1527159>.

YANG, K.; ZHANG, P.; LV, T. *et al.* Acupuncture at Taichong and Zusanli points exerts hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats by metabolomic analysis. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1207, p. 123352, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123352>.

YANG, M.; YU, Z.; DENG, S. *et al.* A Targeted Metabolomics MRM-MS Study on Identifying Potential Hypertension Biomarkers in Human Plasma and Evaluating Acupuncture Effects. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-11, 16 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep25871>.

YIN, C.S.; JEONG, H.S.; PARK, H.J. *et al.* A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research In Veterinary Science**, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 159-165, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.04.004>.

YIN, C.S.; JEONG, H.S.; PARK, H.J.; BAIK *et al.* A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research In Veterinary Science**, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 159-165, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.04.004>.

YIN, Z.; ZHU, C.; XU, G. *et al.* Acupuncture and/or moxibustion for the treatment of lumbar disc herniation: quality assessment of systematic reviews. **Traditional Medicine Research**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 282-294, 2020. TMR Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.53388/tmr20190930137>.

YU, J.; ZHAO, C.; LUO, X. The Effects of Electroacupuncture on the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2/P2X3 Signal Pathway in the Spinal Cord of Rats with Chronic Constriction Injury. **Anesthesia & Analgesia**, [S.L.], v. 116, n. 1, p. 239-246, jan. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e31826f0a4a>.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, Z. *et al.* Metabolomics: towards understanding traditional chinese medicine. **Planta Medica**, [S.L.], v. 76, n. 17, p. 2026-2035, 5 nov. 2010. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1250542>.

ZHANG, A.; SUN, H.; YAN, G. *et al.* Systems biology approach opens door to essence of acupuncture. **Complementary Therapies In Medicine**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 253-259, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2013.03.002>.

ZHANG, A.; YAN, G.; SUN, H. *et al.* Deciphering the biological effects of acupuncture treatment modulating multiple metabolism pathways. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p.

1-7, 16 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep19942>.

ZHANG, R.; LAO, L.; REN, K. *et al.* Mechanisms of Acupuncture–Electroacupuncture on Persistent Pain. **Anesthesiology**, [S.L.], v. 120, n. 2, p. 482-503, 1 fev. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/aln.000000000000101>.

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**, [S.L.], v. 2012, p. 1-23, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/429412>.

ZHANG, Z.; YANG, M.; YIN, A. *et al.* Serum metabolomics reveals the effect of electroacupuncture on urinary leakage in women with stress urinary incontinence. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 190, p. 113513, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113513>.

ZHAO, Z.Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress In Neurobiology**, [S.L.], v. 85, n. 4, p. 355-375, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.05.004>.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 109-110, jun. 1983. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4).

ZONIĆ-IMAMOVIĆ, M.; SINANOVIĆ, O.; IMAMOVIĆ *et al.* Effects of Transcutaneous and Percutaneous Tibial Nerve Stimulation in Bosnian Female Patients with an Idiopathic Overactive Urinary Bladder. **Acta Medica Academica**, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 235, 21 nov. 2021. Academy of Sciences and Arts of Bosnia and Herzegovina. <http://dx.doi.org/10.5644/ama2006-124.339>.

ZYLKA, M.J. Needling adenosine receptors for pain relief. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 783-784, jul. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nn0710-783>.

ANEXO 01



The ARRIVE Essential 10: author checklist

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design 1	For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. b. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). 	Page 25 - 26 Line 7 onwards
Sample size 2	<ol style="list-style-type: none"> a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done. 	Page 25 - 26, Line 7 onwards Page 22, Line 29-30
Inclusion and exclusion criteria 3	<ol style="list-style-type: none"> a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i>. If no criteria were set, state this explicitly. b. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. c. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group. 	Page 23, Line 13 - 17 No exclusions Page 25 - 26, Line 7 onwards
Randomisation 4	<ol style="list-style-type: none"> a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly. 	Randomisation in the distribution of the groups. Animals where treated as equally as possible, kept in similar cages and recieved similar food and water.
Blinding 5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	Page 22, Line 24 onwards
Outcome measures 6	<ol style="list-style-type: none"> a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size. 	Page 31-36, Line 21 onwards Not applicable

Statistical methods	7	<ul style="list-style-type: none"> a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met. 	<p>Page 31, Line 9 - 11</p> <p>Not applicable</p>
Experimental animals	8	<ul style="list-style-type: none"> a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures 	<p>Page 22, Line 15 - 23</p> <p>No previous procedures were performed</p>
Experimental procedures	9	<p>For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:</p> <ul style="list-style-type: none"> a. What was done, how it was done and what was used. b. When and how often. c. Where (including detail of any acclimatisation periods). d. Why (provide rationale for procedures). 	<p>Page 22 - 31 Line 24 onwards</p> <p>Page 22 - 31 Line 24 onwards</p> <p>Page 22 - 31 Line 24 onwards</p> <p>Page 22 - 31 Line 24 onwards</p>
Results	10	<p>For each experiment conducted, including independent replications, report:</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). b. If applicable, the effect size with a confidence interval. 	<p>Page 33 – 36, Figures 06A, 06B, 07A, 07B, 07C, 07D, 08A, 08B, Table 01</p> <p>Page 33 – 36, Figures 06A, 06B, 07A, 07B, 07C, 07D, 08A, 08B, Table 01</p>