

VANESSA GUILLAUMON EMMEL

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO CAUSADO PELA ESTIMULAÇÃO DO
ACUPONTO BL60 (KUNLUN) EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis/SC

2008

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO CAUSADO PELA ESTIMULAÇÃO DO
ACUPONTO BL60 (KUNLUN) EM CAMUNDONGOS**

VANESSA GUILLAUMON EMMEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis/SC

2008

*“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus
pensamentos tornam-se suas palavras.
Mantenha suas palavras positivas, porque suas
palavras tornam-se suas atitudes.
Mantenha suas atitudes positivas, porque suas
atitudes tornam-se seus hábitos.
Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos
tornam-se seus valores.
Mantenha seus valores positivos, porque seus valores
tornam-se seu destino.”*
Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao professor Adair Roberto Soares dos Santos, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho, abrindo as portas de seu laboratório pra que este pudesse ser realizado.

À Ana Paula Luiz, que sempre me ajudou, principalmente no início, estudando junto e estando sempre presente. À Morgana Duarte, Denise Lima e Dessana Leal que me ajudaram nos experimentos. Ao Vinícius Gadotti pelo “empurrãozinho” inicial. A Giselle Guginsky, Francisney Pinto, Flávia Meotti, Rodrigo Marcon e a todos os amigos do laboratório pelo apoio técnico e pelo carinho. À Fabiana Figueiredo de Barba, Fábio Borges, Murilo Marcos dos Santos, Alisson Freire e a todos os amigos já citados pela companhia e amizade, pelos momentos de trabalho e descontração. Também à Dona Vilma e Seu Carlos, funcionários, sempre tão atenciosos.

Aos meus pais e minha família que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos, me dando suporte emocional necessário durante esta jornada.

E, finalmente, agradeço muito também a todos os animais que participaram deste estudo, pois sem eles, definitivamente, não seria possível sua realização.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Acupuntura.....	1
1.2. Acupuntura e Analgesia.....	4
1.3. Acuponto BL60 (Kunlun).....	7
1.4. Dor.....	8
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Animais.....	18
3.2. Tratamento.....	18
3.3. Drogas.....	19
3.4. Nocicepção induzida pelo ácido acético.....	19
3.5. Nocicepção induzida pelo glutamato.....	21
3.6. Nocicepção induzida pela formalina.....	21
3.7. Análise dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva.....	22
3.7.1. Envolvimento do sistema opióide.....	22

3.7.2. Envolvimento do sistema serotoninérgico.....	23
3.7.3. Envolvimento do sistema alfa-adrenérgico.....	24
3.7.4. Envolvimento do sistema dopaminérgico.....	25
3.8. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Nocicepção induzida pelo ácido acético.....	26
4.2. Nocicepção induzida pelo glutamato.....	29
4.3. Nocicepção induzida pela formalina.....	30
4.4. Análise dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva.....	31
4.4.1. Envolvimento do sistema opióide.....	31
4.4.2. Envolvimento do sistema serotoninérgico.....	33
4.4.3. Envolvimento do sistema alfa1-adrenérgico.....	35
4.4.4. Envolvimento do sistema alfa2-adrenérgico.....	36
4.4.5. Envolvimento do sistema dopaminérgico.....	37
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÕES.....	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
5-HT	Serotonina
BL60	Acuponto Bexiga 60
SP6	Acuponto Baço-Pancreas 6
BK	Bradicinina
C	Grupo Controle sem Contenção
Ca^{2+}	Íon cálcio
CC	Grupo Controle Contido
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNR	Núcleo Dorsal da Rafe
ST36	Acuponto Estômago 36
E.P.M.	Erro padrão da média
GABA	Ácido γ -amino butírico
$G_{i/o}$	Proteína $G_{i/o}$
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-8	Interleucina 8
IL-1 β	Interleucina 1 β
K^+	Íon potássio
mg/kg	Miligramas por quilograma

MRN	Núcleo Magno da Rafe
NO	Óxido nítrico
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PBRP	Ponto de Baixa Resistência Elétrica da Pele
PCPA	P-clorofenilalanina
PG	Prostaglândina
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
GB34	Acuponto Vesícula Biliar 34
CV12	Acuponto Vaso Conceção 12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Agulhas de osso.....	1
Figura 2: Modelo humano demonstrando o trajeto dos meridianos.....	3
Figura 3: Acuponto BL60 (Kunlun) em camundongo.....	8
Figura 4: Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.....	12
Figura 5: Teoria do portão da dor.....	14
Figura 6: Ponto Sham.....	20
Figura 7: Avaliação do efeito antinociceptivo da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos.....	26
Figura 8: Avaliação da duração do efeito antinociceptivo da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos	27
Figura 9: Comparação entre a atividade antinociceptiva do acuponto BL60 (Kunlun) em relação a um ponto Sham.....	28
Figura 10: Avaliação do efeito antinociceptivo da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) na nocicepção induzida por glutamato tamponado em camundongos.....	29
Figura 11: Avaliação do efeito antinociceptivo da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) na nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	30
Figura 12: Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona sobre a atividade antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	31
Figura 13: Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona methiodida sobre a atividade antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	32

Figura 14: Efeito do pré-tratamento dos animais com PCPA sobre a atividade antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) e morfina, no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	33
Figura 15: Efeito do pré-tratamento dos animais com cetancerina, WAY e ondasetrona sobre a atividade antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	34
Figura 16: Efeito do pré-tratamento dos animais com prazosina sobre a atividade antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	35
Figura 17: Efeito do pré-tratamento dos animais com ioimbina sobre a atividade antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	36
Figura 18: Efeito do pré-tratamento dos animais com sulpiride sobre a atividade antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	37

RESUMO

A acupuntura é uma técnica milenar que tem sido usada para o tratamento de diversos tipos de dores. O presente estudo analisou a ação antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) em modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético, glutamato e formalina em camundongos. Primeiramente foi avaliada a possível atividade antinociceptiva causada pela acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun), bem como se o tempo em que a agulha permanece retida no acuponto tem influência nestes resultados no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Observou-se que a acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun) reduziu o número de contorções abdominais de maneira dependente do tempo, sendo que as inibições observadas foram $38\pm 7\%$, $38\pm 8\%$, $27\pm 8\%$ e $54\pm 15\%$ para os tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos de estímulo, respectivamente. Além disso, foi observado que esta antinocicepção dura até duas horas após o estímulo com inibições de $49\pm 5\%$, $70\pm 7\%$, $63\pm 7\%$ e $42\pm 5\%$ do número de contorções abdominais para os tempos de zero, 30 minutos, 1 e 2 horas após o estímulo, respectivamente. A estimulação de um falso ponto (Sham) não causou redução significativa do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. No modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, a acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun) também se mostrou efetiva em reduzir o comportamento nociceptivo com inibição $38\pm 7\%$. Da mesma forma, causou inibição significativa da nocicepção de origem neurogênica ($29\pm 10\%$) e inflamatória ($44\pm 9\%$) induzida pela injeção intraplantar de formalina. A antinocicepção causada pela estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) foi revertida de forma significativa pelo pré-tratamento dos animais com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, i.p.), naloxona metiodida (antagonista não seletivo de receptores opióides que não atravessa a barreira hemato-encefálica, 1 mg/kg, s.c.), PCPA (inibidor da síntese de serotonina, 100 mg/kg, i.p., por 4 dias) e WAY100635 (antagonista dos receptores 5-HT_{1A}, 0,1 mg/kg, i.p.), mas não foi alterada pelo tratamento dos animais com cetanserina (antagonista dos receptores 5-HT_{2A}, 0,3 mg/kg, i.p.), ondansetrona (antagonista dos receptores 5-HT₃, 0,5 mg/kg, i.p.), prazosina (antagonista α_1 adrenérgico 0,15 mg/kg i.p.), ioimbina (antagonista dos receptores α_2 adrenérgicos, 0,15 mg/kg, i.p.) ou sulpirida (antagonista dopaminérgico tipo D₂, 1,0 mg/kg, i.p.). Os dados do presente estudo demonstram claramente que a acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun) produz antinocicepção em vários modelos de nocicepção química em camundongos. O mecanismo de ação envolve, pelo menos em parte, a estimulação do sistema opióide central e periférico e serotoninérgico (via receptores 5-HT_{1A}), mas não adrenérgico nem dopaminérgico.

ABSTRACT

Acupuncture is a millenary technique which has been used in the treatment of many kinds of pain. The present study analysed the antinociceptive action of the stimulation at BL60 acupoint (Kunlun) in models of nociception caused by acetic acid, glutamate and formalin in mice. Initially it was evaluated the possible antinociceptive activity of acupuncture at BL60 (Kunlun) and if the period of permanence of the needle at the acupoint has influence in these results, in the test of abdominal writhes induced by acetic acid. It was observed that acupuncture at BL60 (Kunlun) reduced the abdominal writhes in a time-dependent condition with inhibitions of $38\pm7\%$, $38\pm8\%$, $27\pm8\%$ and $54\pm15\%$, respectively for the periods of 5, 10, 20 and 30 minutes of stimulation. It was also observed that this antinociception lasts until two hours after stimulation, with inhibitions of $49\pm5\%$, $70\pm7\%$, $63\pm7\%$ and $42\pm5\%$ in the abdominal writhes number for the periods of zero, 30 minutes, 1 and 2 hours of stimulation, respectively. The stimulation at a false-point (Sham) does not cause significant decrease in the abdominal writhes number induced by acetic acid. In the model of nociception by intraplantar injection of glutamate, acupuncture at BL60 (Kunlun) was also effective in decrease the nociceptive behavior, with inhibition of $38\pm7\%$. In the same way, significant inhibition at the nociception of neurogenic ($29 \pm 10\%$) and inflammatory ($44 \pm 9\%$) origin induced by formalin was observed. The antinociceptive effect caused by acupuncture at BL60 (Kunlun) was significantly reversed by the pre-treatment of animals with naloxone (non selective opioid receptor antagonist, 1 mg/Kg, i.p.), naloxone methiodide (non selective opioid receptor antagonist that does not cross the hemato-encephalic barrier, 1 mg/Kg, s.c.), PCPA (inhibitor of serotonin synthesis, 100 mg/Kg i.p., 4 consecutive days) and WAY100635 (selective 5HT_{1A} receptor antagonist, 0.1mg/Kg i.p.), but it was not reversed by the pre-treatment with ketanserin (5-HT_{2A} receptor antagonist, 0.3 mg/kg, i.p.), ondansetron (5-HT₃ receptor antagonist, 0.5 mg/kg, i.p.), prazosin (α_1 adrenergic antagonist, 0.15 mg/kg i.p.), yohimbine (α_2 adrenergic antagonist, 0.15 mg/kg, i.p.) or sulpiride (D₂ dopaminergic receptor antagonist, 1.0 mg/kg, i.p.). The present study clearly show that acupuncture at BL60 (Kunlun) produces antinociception in various models of chemical nociception in mice. The action mechanism involves the stimulation of opioid and serotonergic systems (5HT_{1A} receptor), but does not involve adrenergic and dopaminergic systems.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acupuntura

A acupuntura é uma das terapias médicas complementares mais conhecidas com finalidades preventiva e terapêutica, a qual tem sido importante para os povos orientais há milhares de anos (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001, CHAE et al, 2007).

Derivada dos radicais latinos *acus* e *pungere*, que significam agulha e puncionar, respectivamente, a acupuntura visa a terapia e cura das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas em pontos específicos chamados acupontos (WEN, 1989; JAGGAR, 1992; SCHOEN,1993, CHAE et al, 2007). Há relatos de agulhas de pedra, ossos e de espinha de peixe que foram utilizadas na China durante a Idade da Pedra (cerca de 3000 anos AC) (figura 1) (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001).

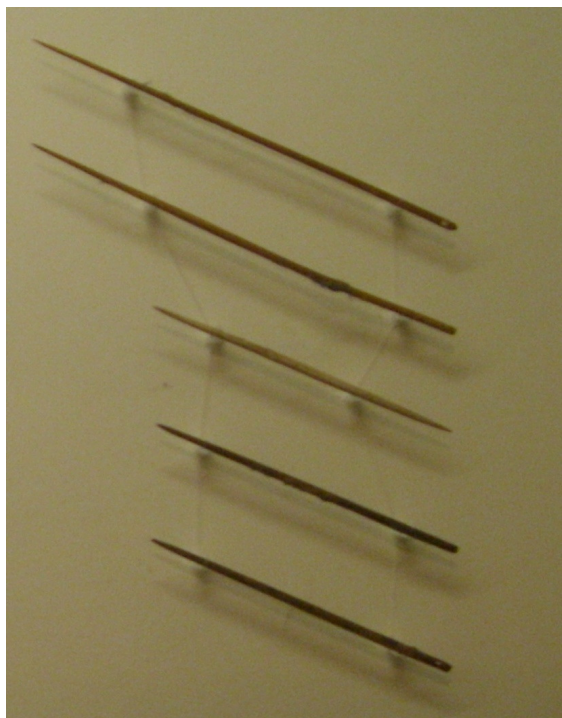


Figura 1: agulhas de osso (Museu de Medicina Tradicional Chinesa - Universidade de Shanghai)

Os acupontos foram empiricamente determinados no transcorrer de milhares de anos de prática médica. Acuponto é uma região da pele em que é grande a concentração de terminações nervosas sensoriais. Essa região está em relação íntima com nervos, vasos sanguíneos, tendões, periósteo e cápsulas articulares. Sua estimulação possibilita acesso direto ao SNC. Estudos morfofuncionais identificaram plexos nervosos, elementos vasculares e feixes musculares como sendo os mais prováveis sítios receptores dos acupontos (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001).

Outros receptores encapsulados, principalmente o órgão de Golgi do tendão e bulbos terminais de Krause também podem ser observados. Diversos trabalhos têm demonstrado a presença de um grande número de mastócitos nos acupontos. Nesse sentido, verificou-se que ratos adultos possuem contagens de mastócitos significativamente mais altas nos acupontos que em outros locais (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001). Além disso, os acupontos possuem propriedades elétricas diversas das áreas adjacentes: condutância elevada, menor resistência, padrões de campo organizados e diferenças de potencial elétrico (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001). Por isso, são denominados pontos de baixa resistência elétrica da pele (PBRP) e podem ser localizados na superfície da pele através de um localizador de pontos (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001).

Os conhecimentos da acupuntura estiveram isolados do mundo ocidental por cerca de 5000 anos, distanciando a forma de raciocínio e linguagem (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001). Na medicina oriental, o corpo humano é considerado como uma complexa rede de processos relacionados entre si através de duas forças opostas: o Yin e o Yang. A saúde é vista como a manutenção do equilíbrio e harmonia do Yin e Yang, enquanto a doença é vista como um desequilíbrio e

desarmonia entre essas duas forças. Nesse sentido, a acupuntura é uma importante modalidade de manipulação e balanceamento do Yin e Yang (CHAE et al, 2007).

Na Medicina Tradicional Chinesa, a saúde é entendida em termos de força vital ou energia, chamada de “Qi”, que circula entre os órgãos por canais hipotéticos chamados “meridianos” (figura 2). Nestes meridianos existem 365 acupontos que podem ser utilizados para inserção de agulhas ou moxabustão (estímulo térmico) para balancear e harmonizar o Yin e Yang e desbloquear o fluxo de Qi (CHAE et al, 2007).



Figura 2: Modelo humano demonstrando trajeto dos meridianos (Museu de Medicina Chinesa de Beijing)

A acupuntura faz parte de um conjunto de conhecimentos teóricos empíricos da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) que inclui técnicas de massagem (Tui-Na), exercícios respiratórios (Qi-Gung), orientações nutricionais (Shu-Shieh) e a farmacopéia chinesa (medicamentos de origem animal, vegetal e mineral) (ALTMAN, 1979). Ela é utilizada pra tratar diversas patologias, inclusive alguns tipos de dores intratáveis na medicina ocidental (LI et al, 2004).

Embora tenha sido introduzida relativamente recentemente, a acupuntura tem ganhado popularidade e grande aceitação nos países ocidentais (CHAE et al, 2007). Nas últimas décadas, aumentou o interesse pelo estudo da acupuntura e seus mecanismos de ação. Os mecanismos de ação propostos para os efeitos terapêuticos da acupuntura são baseados no princípio de manter ou recuperar a homeostase. Recentemente, muitos esforços foram realizados para se estabelecer as propriedades e características desses mecanismos em termos de neuroanatomia, neurofisiologia e neuroquímica. Entretanto, a maioria dos estudos é publicada em Chinês, deixando ainda muitas questões em aberto (KIM et al, 2003, GUIMARÃES et al, 1997).

1.2. Acupuntura e Analgesia

Os mecanismos de analgesia por acupuntura tem sido demonstrados por vários estudos e tem se mostrado o papel dos opióides endógenos e de vários neurotransmissores no Sistema Nervoso Central (SNC) (OKADA e KAWAKITA, 2007).

Uma das possíveis explicações é que a acupuntura atue modulando o sistema imune como um reflexo neuro-imune. As informações inflamatórias são transmitidas através de nervos sensoriais para o hipotálamo, onde são processadas, resultando numa eferência anti-inflamatória (CHO et al, 2006). O complexo vagal dorsal e o núcleo dorsal do nervo vago são responsivos às concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) circulantes e ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) induzindo a liberação de glicocorticóides, que subsequentemente irão suprimir a síntese de citocinas (CHO et al, 2006). Desta forma, a estimulação nervosa vagal (tanto aferente quanto eferente) e de aferências somáticas

(dependendo do acuponto) pode ser um importante componente da ação da acupuntura (CHO et al, 2006).

Tem se demonstrado que a acupuntura inibe a expressão de Fos no corno dorsal da medula espinhal em resposta a estímulos nocivos e inibe a resposta nociceptiva (RONG et al, 2005). Em diversos modelos inflamatórios, a acupuntura reduz o número de células inflamatórias e o volume do exsudato. No modelo de peritonite induzida por carragenina, a concentração de interleucina 1 β (IL-1 β) foi inibida pelo tratamento com acupuntura nos pontos extras Bai Hui, Ho Hai e Yin Tang em ratos (SCOGNAMILLO-SZABÓ et al, 2005).

Acredita-se também que o efeito analgésico da acupuntura é devido à ativação do sistema de modulação descendente da dor. Quando um acuponto é estimulado, ele ativa fibras aferentes primárias, que por sua vez, ativam vias ascendentes que ativam o sistema modulador da via descendente da dor, incluindo a substância cinzenta periaquedutal, rafe magna, locus coeruleus, núcleo medial central do tálamo e hipotálamo posterior. Opióides endógenos como encefalinas e monoaminas são importantes mediadores conhecidos na analgesia induzida por acupuntura (KIM et al, 2000; MEDEIROS et al, 2003).

O uso da eletroacupuntura em baixa frequência ativa vias de analgesia por acupuntura na medula espinhal, que ascende pelo trato anterolateral contralateral até a porção dorsal da substância periaquedutal (PAG), hipotálamo lateral e núcleo arco hipotalâmico medial. Além disso, a glândula pituitária é ativada através da área pré-óptica e eminência mediana e libera fatores humorais (β -endorfina e dopamina). Esses fatores humorais são essenciais para a conexão das vias aferentes e eferentes da analgesia por acupuntura. Uma via eferente passa através do núcleo hipotalâmico ventromedial e então se divide em dois sistemas inibitórios

descendentes da dor no tronco cerebral. Um é o sistema inibitório da dor serotoninérgico na rafe dorsal e rafe magna. Outro é o sistema noradrenérgico no núcleo paragigantocelular reticular. Esses sistemas inibitórios da dor descendem pelo funículo dorsolateral e bloqueiam os impulsos de sensação de dor no corno dorsal espinal (OKADA e KAWAKITA, 2007).

De fato, estudos demonstram que a acupuntura ativa vias serotoninérgicas descendentes pelo trato anterolateral (SCOTT e SCOTT, 1997). Quando a estimulação da acupuntura é aplicada nos pontos corretos, impulsos neurais são recebidos no corno dorsal da medula espinal. Esses impulsos são conduzidos a uma variedade de fibras para os tratos espinoreticular e espinomesencefálico se projetando para o mesencéfalo onde eles influenciam diretamente vias serotoninérgicas (SCOTT e SCOTT, 1997).

Também foi demonstrado a ativação de α_2 -adrenoceptores em experimentos onde a utilização de veneno de abelha nos pontos de acupuntura CV12 (Zhongwan) e ST36 (Zusanli) inibiu o comportamento nociceptivo nos modelos de nocicepção induzida por ácido acético e formalina, e atenuou a expressão de Fos em ratos e camundongos (KIM et al,2003; KWON et al, 2001)

Interessantemente, pacientes com sintomas de dor obtêm um alívio imediatamente após a sessão de acupuntura indicando um possível mecanismo de ação ligado a reflexos axonais mediados por receptores polimodais (KAWAKITA et al, 2006).

1.3. Acuponto BL60 (Kunlun)

A grande maioria dos estudos não propõe mecanismos de ação dependentes da seleção de pontos (MOFFET, 2006). No entanto, parte dos trabalhos publicados trabalha com o acuponto ST36 (Suzanli) e com a técnica de eletroacupuntura (HAHM, 2007; XING et al, 2007; MEDEIROS et al, 2003; CHA et al, 2006; YIM et al, 2007; RONG et al, 2005; KIM et al, 2003; SAIDAH et al, 2003; GUIMARÃES et al, 1997).

O acuponto escolhido para este trabalho chama-se “Kunlun” (BL60), que significa “grande e alto” e é indicado para tratar patologias da região alta do corpo, como ombros, pescoço e cabeça. Está localizado a meia distância entre o maléolo lateral e o tendão do calcâneo, no meridiano da Bexiga (figura 3). Além disso, o seu nome também faz analogia a um conjunto de montanhas, localizadas na província de Sichuan na China, que em seu vale passa o rio Yang Tse, o maior rio da China: o meridiano da Bexiga é o maior meridiano do corpo (para a Medicina Chinesa, os meridianos são como rios de energia) e o ponto localiza-se ao lado do maléolo lateral (em analogia às montanhas). As funções deste ponto são para o tratamento de diversas patologias, entre elas cefaléias, rigidez no pescoço, obscurecimento da visão, epistaxe, espasmo e dor no ombro, lombalgias, dor no calcanhar, epilepsia, distocia, alterações menstruais e cistite (MACIOCIA, 1996; Fundamentos da Acupuntura Chinesa, 1995; DING, 1996; SCHOEN, 2006)

Poucos estudos foram publicados com o ponto BL60 (Kunlun), nenhum deles com o uso isolado. O conjunto de acupontos: BL60 (Kunlun) ST36 (Zuzanli) e GB34 (Yanglingquan) com o uso de eletroacupuntura, não reduziram o requerimento de desflurano em anestesia em humanos (MORIOKA et al, 2002). Em outro estudo realizado com pacientes portadores do vírus HIV que apresentaram neuropatias,

devido ao uso de drogas antiretrovirais, foi demonstrado que a eletroacupuntura nos pontos BL60, R1, F3 e ST36 melhorou a condição geral destes pacientes, aumentando a aptidão física, resposta muscular e reflexo tibial (GALANTINO et al, 1999).



Figura 3: acuponto BL60 (Kunlun) em camundongo

1.4. Dor

Dentre os inúmeros mecanismos de controle da homeostasia que o corpo humano possui, a dor exerce uma função importante, pois seu papel fisiológico é alertar acerca de possíveis ameaças ao bem estar e a integridade do organismo, e reter nossa atenção até que a causa de sua ativação tenha sido identificada e afastada (CHAPMAN & GAVRIN, 1999; WALL, 1999). Desta forma, a dor é um sinal vital clinicamente importante para a detecção e avaliação de inúmeras doenças, bem como para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitação de danos (MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, podemos defini-la como “uma

experiência emocional e sensorial desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER & MELZACK, 1999). No entanto, a dor é uma experiência complexa que não envolve somente a transdução de estímulos nocivos advindos do ambiente, mas principalmente seu processamento cognitivo e emocional, realizado pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (JULIUS & BASBAUM, 2001). A partir desta definição, pode-se citar um componente fisiológico e outro psicológico ou emocional, e a junção de ambos é o que os humanos entendem por dor. Sendo assim, em animais avalia-se a dor de forma indireta. Uma vez que não há aparatos que permitam mensurar algum componente emocional, avalia-se somente o componente fisiológico, ao qual denomina-se nocicepção (TJØLSEN & HOLE, 1997). A função de alerta da dor reflete a ativação fásica de sensores denominados nociceptores, os quais são ativados quando o estímulo é potencialmente perigoso, ou seja, excedem uma determinada faixa considerada fisiológica (estímulo inócuo) (BURGESS & PER, 1967; MILLAN, 1999).

Em termos de duração, a sensação dolorosa pode ser transitória, aguda ou crônica. Quando transitória, a ativação de nociceptores é feita na ausência de qualquer dano tecidual. Em contrapartida, na dor aguda geralmente ocorre lesão e ativação de nociceptores no sítio lesionado. Por sua vez, a dor crônica, na maioria das vezes, é gerada por lesão ou doença, podendo ser perpetuada por fatores que não sejam os seus causadores (LOESER & MELZACK, 1999; WOOLF & MANNION, 1999; MENDELL & SAHENK, 2003).

Quanto à sua origem, a dor pode ser classificada em: nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica e inflamatória. A dor nociceptiva deve-se à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros tecidos. A dor neurogênica reflete dano de tecido neuronal na periferia ou no SNC.

Quando há disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos, resultando em quadro álgico, denomina-se dor neuropática. No entanto, quando a dor não é proveniente de fonte somática identificável e pode refletir fatores psicológicos, diz-se dor psicogênica (MILLAN, 1999). Por fim, na dor inflamatória, ocorre significativo dano tecidual, com dor geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nestas circunstâncias, geralmente ocorre quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos, produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação (DRAY, 1997).

Aproximadamente um século atrás, Sherrington propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário que é ativado por estímulos capazes de gerar dano tecidual. De acordo com esse modelo, os nociceptores têm limiares característicos que os distinguem de outras fibras nervosas sensoriais. Eles estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras e são sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (Figura 4). Existem ainda os nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que compreendem uma pequena proporção das fibras aferentes, que normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A sensibilização dos nociceptores ocorrida, por exemplo, em casos de mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), resulta na liberação local de mediadores químicos tais como bradicinina, prótons, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, substância P (SP), óxido nítrico (NO) entre outros (JULIUS & BASBAUM,

2001; GRIFFIS *et al.*, 2006). Estes mediadores interagem com receptores específicos, levando a uma propagação do sinal nociceptivo graças a um aumento na permeabilidade da membrana neuronal a cátions e conseqüente geração do potencial de ação (CARLTON & COGGESHALL, 1998; PASERO *et al.*, 1999; RAJA *et al.*, 1999;). É importante ressaltar que estes mediadores podem ser liberados não somente pelos neurônios sensoriais, mas também por fibras simpáticas e por células não neuronais como plaquetas, células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e células inflamatórias (BESSON, 1997).

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada por meio das fibras aferentes até o SNC. Os longos axônios das fibras nociceptivas, que se localizam em nervos periféricos, estendem-se de seus corpos celulares, reunidos no gânglio da raiz dorsal. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos concomitantemente à medula espinhal e aos tecidos corporais (MILLAN, 1999). As fibras aferentes primárias são classificadas de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (Figura 4). Os neurônios mais mielinizados, de maior diâmetro e que apresentam maior velocidade de condução são as fibras A β . Essas fibras respondem ao leve toque ou movimento e são importantes para informar a posição do corpo no espaço (propriocepção), elas são encontradas basicamente nos nervos que inervam a pele e em condições fisiológicas não contribuem para a sensação dolorosa. Entretanto, a estimulação desse tipo de fibra pode aliviar a sensação dolorosa, como ocorre quando ativadas por fricção da pele após alguma lesão.

No entanto, ainda existem dois outros tipos de aferentes primários responsáveis pela transmissão da nocicepção da periferia à medula espinhal. As

fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem fibras C não mielinizadas e fibras pouco mielinizadas A δ . Estas fibras são responsáveis por transmitir o estímulo nociceptivo (PLEUVRY, 1996; SHELLEY & CROSS, 1994; MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001).

Todas as fibras nociceptivas sensoriais primárias fazem conexões sinápticas com neurônios secundários na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios do corno dorsal, por sua vez, projetam seus axônios e transmitem a informação nociceptiva para os centros encefálicos superiores, que através de neurônios terciários enviam informação ao córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; ALMEIDA et al., 2004). Os principais tratos que transmitem a informação nociceptiva da medula para o encéfalo são o espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espinohipotalâmico (CRAIG & DOSTROVSKY, 1999).


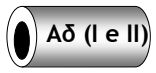

Tipo de fibra	 A α e A β	 A δ (I e II)	 C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 μ m	2 - 6 μ m	0.4 - 1.2 μ m
Velocidade de condução	30 - 100m/s	1.2 - 30m/s	0.5 - 2m/s
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

Figura 4: Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. Adaptado a partir de Julius & Basbaum, 2001.

Em 1965, Ronald Melzack e Patrick Wall sugeriram a teoria do “Controle de Portão para a Dor”. Eles propuseram que no corno dorsal, os neurônios que transmitem a informação nociceptiva ao longo do trato espinotalâmico (chamados neurônios de projeção - célula T) pudessem ser estimulados tanto por fibras C (nociceptivas) como por fibras A β mecanossensíveis (não-nociceptivas) (figura 5). Este neurônio também seria normalmente inibido por um interneurônio inibitório (célula G), que é excitado por um axônio sensorial de grande calibre, inibindo a transmissão, ou inibido por axônios nociceptivos, estimulando a transmissão (Melzack e Wall, 1965) .

Assim, a ativação de neurônios nociceptivos excitaria os neurônios de projeção e inibiriam o interneurônio inibitório, transmitindo a informação nociceptiva até o tálamo onde a informação seria somatizada. De forma contrária, a ativação dos neurônios mielinizados não-nociceptivos ativaria o interneurônio inibitório, inibindo a transmissão nociceptiva (MELZACK, 1999; YAKSH, 1999) .

Para simplificar e tornar mais didática a compreensão das conexões e terminações dos neurônios no corno dorsal, este foi dividido em lâminas de I a VI. Foi considerada lâmina I a mais superficial e a lâmina VI a mais profunda. As fibras A β responsáveis por sensações mecânicas e de propriocepção terminam em lâminas mais profundas, como III, IV, V e VI. As fibras A δ que respondem a estímulos nocivos terminam nas lâminas I e V, enquanto que as fibras A δ sensíveis mecanicamente realizam conexões nas lâminas II e III. As fibras C, que são os principais nociceptores terminam nas lâminas I e II (RANG, 2003) .

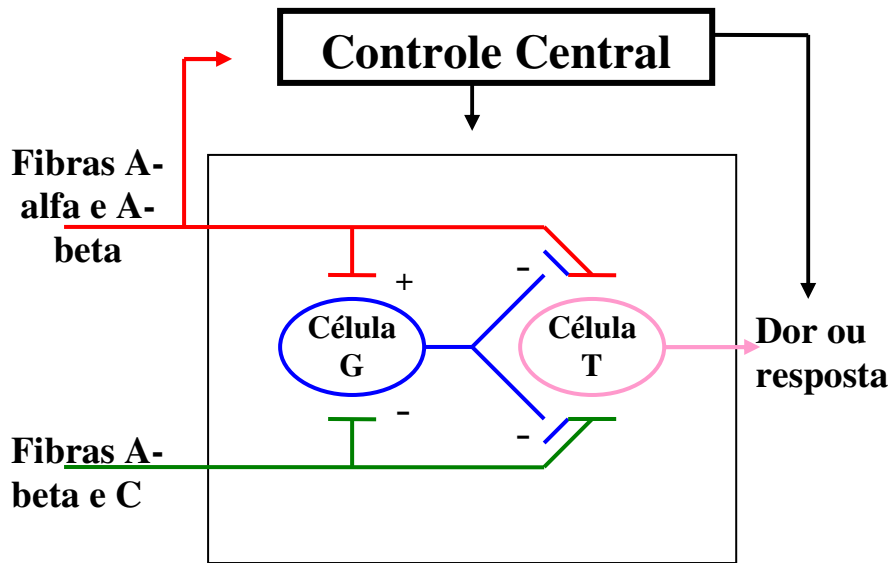


Figura 5. Teoria do Controle de Portão da Dor, adaptado de Wall e Melzack, 1965.

Primeiramente os impulsos nociceptivos chegam através dos aferentes primários ao corno dorsal da medula espinhal nas respectivas lâminas onde realizam conexões. Após isso, a informação nociceptiva se projeta do corno dorsal para o tálamo através de neurônios de segunda ordem, que constituem as vias ascendentes. Os neurônios sensoriais secundários recebem seus sinais pela liberação de glutamato e SP dos aferentes primários, além disso, este processo excitatório também depende de canais de cálcio e sódio, sendo os canais de cálcio os principais reguladores da liberação de neurotransmissores.

Assim, o organismo também possui mecanismos intrínsecos de controle da dor, pois após a estimulação dos diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo. Um circuito modulador endógeno descendente conectando a substância cinzenta periaquedutal e o corno dorsal da medula é responsável pela ativação de conexões que promovem facilitação ou

inibição da nocicepção. Entretanto, esse sistema não age simplesmente facilitando ou inibindo, uma vez que cada lesão induz um tipo diferente de resposta devido à plasticidade do sistema, exercendo este controle principalmente nas dores crônicas. Os sistemas de neurotransmissão mais estudados nesta conexão são: glutamatérgico, GABAérgico, neuropeptidérgico, serotoninérgico, opioidérgico e adrenérgico, entre outros (MILLAN, 2002; REN & DUBNER, 2002; VANEGAS & SCHAIBLE, 2004).

Um sistema ativo na inibição da nocicepção é o opióide, que age por duas vias principais, central e periférica. Na via central os agonistas opióides, endógenos ou não, atuam sobre receptores opioidérgicos localizados na substância cinzenta periaquedutal, bulbo rostroventromedial e corno dorsal da medula espinhal, ativando a via de controle descendente da dor, em parte, por ativar os canais de potássio e inibir canais de cálcio dependentes de voltagem (MILLAN, 1999). Periféricamente, tem se proposto que agonistas μ - opióides inibem a ativação da adenilato ciclase em neurônios aferentes primários, enquanto agonistas de receptores δ e κ opióides inibem a secreção de substâncias pró-inflamatórias por neurônios simpáticos (KIM *et al.*, 2006).

A serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) é uma monoamina que também está envolvida na estimulação das vias descendentes de controle da dor. Estudos demonstram que a estimulação de áreas relacionadas à analgesia está associada à elevação dos níveis de serotonina (BASBAUM, 1981). Está bem estabelecido que as vias serotoninérgicas no SNC originam-se dos núcleos da rafe, os quais representam uma rica fonte de serotonina neuronal em mamíferos (FIELDS *et al.*, 1991; MILLAN, 2002). O núcleo dorsal da rafe tem sido implicado nos efeitos regulatórios de antidepressivos nos transtornos de humor (ARTIGAS *et al.*, 1996), bem como na

modulação da dor (MILLAN, 2002). Além disso, o núcleo magno da rafe é provavelmente o núcleo serotoninérgico mais importante na modulação do controle descendente da transmissão da dor (BASBAUM e FIELDS, 1984; MILLAN, 2002). Em adição, vários estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que medicamentos antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação de 5-HT são capazes de produzir marcante analgesia tanto em humanos quanto em animais (CARTER e SULLIVAN, 2002; MILLAN, 2002).

Várias evidências sugerem que os subtipos de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂ e 5-HT₃ modulam a transmissão nociceptiva. A ativação destes receptores na medula espinhal produz antinocicepção no teste da formalina e em outros modelos de nocicepção (BARDIN et al., 2000; MILLAN, 2002). Os distintos subtipos de receptores 5-HT presentes na medula espinhal parecem exercer diferentes funções no controle da nocicepção, resultado dos diferentes mecanismos de transdução de sinal pelos quais cada receptor atua (BARDIN et al., 2000). Dessa forma, a atividade dos receptores de 5-HT é complexa e muitas vezes contraditória. Vários fatores podem influenciar sua resposta, dentre eles podemos citar: o subtipo de receptor ativado; a contribuição de ação pré ou pós-sináptica do receptor; o estímulo nociceptivo em termos de qualidade e intensidade; e o efeito da dose, que pode ser antinociceptiva ou não, dependendo do subtipo de receptor 5-HT que o agonista ou antagonista irá atuar (HYLDEN e WILCOX, 1983; MILLAN, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Verificar o possível efeito antinociceptivo da estimulação do acuponto “Kunlun” (BL60), através de vários modelos de nociceção em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos:

- Verificar a atividade da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) nos modelos de nociceção induzida pelo ácido acético, formalina e glutamato em camundongos;
- Verificar a participação dos sistemas de opióides endógenos, da serotonina, noradrenalina e dopamina no efeito antinociceptivo produzido pela estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) no modelo de nociceção induzida pelo ácido acético.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos do tipo Swiss de ambos os sexos, pesando entre 25-35g. Os animais foram mantidos, sob o ciclo claro e escuro (12 h claro/12 h escuro, claro às 7:00 h), com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e livre acesso à água e comida. Os camundongos (machos e fêmeas) foram homogeneamente distribuídos entre os grupos. Todos os animais utilizados foram aclimatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo (n: 23080.0011700/2005-03/UFSC) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), seguindo as normas éticas para o cuidado dos animais de laboratório e investigação científica da dor em animais (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

3.2. Tratamento

A estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) nos camundongos foi realizada através da inserção de agulha de acupuntura (0.18 x 8 mm) de aço inoxidável. Este acuponto está localizado nos membros posteriores a meia distância entre o ponto mais alto do maléolo lateral e o tendão do calcâneo, sendo que se estímulo foi unilateral no membro posterior esquerdo.

Os animais foram contidos para a inserção da agulha de acupuntura no ponto descrito, em um tubo cilíndrico de polietileno e, em seguida colocados separadamente em caixas acrílicas durante o período de estimulação com a agulha.

Os animais usados como controle passaram pelo mesmo método de contenção, contudo, sem a inserção da agulha nos mesmos.

3.3. Drogas

As seguintes substâncias foram utilizadas: formalina e cloridrato de morfina (Merck, Darmstadt, Alemanha); cloridrato de naloxona, naloxona metiodida, WAY 100635, prazosina, fenilefrina, ioimbina, clonidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), ácido acético, glutamato, sulpirida, apomorfina, p-clorofenilalanina (PCPA), cetancerina (Tocris Cookson Inc., Ellisville, USA), ondansetrona (Cristália, São Paulo, Brasil).

3.4. Nocicepção induzida pelo ácido acético

Primeiramente verificou-se o efeito da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este teste é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER *et al.*, 1959; VINEGAR *et al.*, 1979; TJØLSEN & HOLE, 1997). A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de 450 µl de ácido acético (0,6%). As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com o método descrito anteriormente (KOSTER *et al.*, 1959; SANTOS *et al.*, 1999). Grupos de animais foram tratados com acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) antes da realização dos experimentos; os grupos controles foram contidos da mesma forma que os grupos tratados, porém sem a inserção da agulha (grupo Controle Contido - CC). Também foi utilizado um grupo falso estimulado em um ponto sham (não-acuponto)

localizado na região proximal do membro posterior direito do animal (figura 6). Após a injeção do ácido acético os camundongos foram colocados individualmente em funis de vidro e o número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número das contorções abdominais observadas nos animais tratados com acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) em relação aos animais controles.

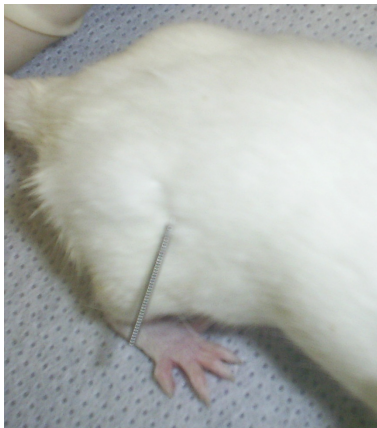


Figura 6: Ponto sham

Inicialmente foi avaliado o tempo de retenção da agulha. Para isto, grupos distintos de animais foram estimulados no acuponto BL60 (Kunlun) por períodos de 1, 5, 10, 20 e 30 minutos e imediatamente após a retirada da agulha, os animais foram injetados com ácido acético e o número de contorções abdominais determinado como descrito acima. Para cada grupo punturado, existiu um grupo somente contido (grupo CC).

Em outra série de experimentos foi avaliada a duração do efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun). Para este fim, os animais receberam acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com duração do estímulo (manutenção da agulha no ponto) de 10 minutos e transcorrido o tempo de 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 horas, os animais receberam uma injeção de ácido acético (0,6%) e o número de contorções abdominais foi avaliada conforme descrito anteriormente.

3.5. Nociceção induzida pelo glutamato

O sistema glutamatérgico é um dos mais importantes sistemas envolvidos na modulação da nociceção e da antinociceção, tanto em nível periférico quanto central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL & NEECK, 2001). Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro por 30 minutos. Um volume de 20 µL de glutamato pH 7,0 (20 µmol/pata) foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal. Os animais foram recolocados nos funis de vidro e observados por 15 min logo após a injeção, sendo que o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como indicativo de nociceção. Os animais foram tratados com acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) com estímulo do acuponto por dez minutos, ou contidos da mesma forma que o grupo punturado (grupo CC), 30 minutos antes da injeção de glutamato.

3.6. Nociceção induzida pela formalina

O modelo de nociceção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nociceção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR & HOLE, 1987, TJØLSEN *et al.*, 1992). A metodologia utilizada foi essencialmente a mesma descrita por Santos e Calixto (1997). Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro por 30 minutos. Um volume de 20 µL de solução de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata

direita do animal, sendo observado o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada em intervalos de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-30 min (fase inflamatória) após a injeção da formalina. Os animais foram tratados com acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) com estímulo do acuponto por dez minutos, ou contidos da mesma forma que o grupo punturado (grupo CC), 30 minutos antes da administração da formalina.

3.7. Análise dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva da acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun)

A fim de avaliar alguns dos possíveis mecanismos de ação pelo qual a acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) promove seu efeito antinociceptivo na nocicepção induzida pelo ácido acético, os animais foram tratados com diferentes drogas. As doses das drogas utilizadas foram selecionadas com base em dados da literatura (SANTOS *et al.*, 1995, 1999, TAKESHITA e YAMAGUCHI, 1995; BHARGAWA e SAHA, 2001; DUMAN *et al.*, 2004, DALBÓ *et al.*, 2006, MENDES *et al.*, 2000) e dados obtidos previamente em nosso laboratório.

3.7.1. Avaliação da participação do sistema opióide

A fim de avaliar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun), os camundongos foram pré-tratados com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, i.p.) (SANTOS *et al.*, 1999), naloxona metiodida (antagonista não seletivo de

receptores opióides que não atravessa a barreira hemato-encefálica, 1 mg/kg, s.c.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e após 20 min os animais receberam acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) com duração do estímulo por dez minutos. Os animais do grupo controle receberam injeção de salina ou de morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, s.c.), 30 minutos antes de realizar o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.

3.7.2. Avaliação da participação do sistema serotoninérgico

A fim de evidenciar a participação do sistema serotoninérgico sobre a atividade antinociceptiva da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), os animais foram pré-tratados com p-clorofenilalanina (PCPA) (inibidor da síntese de serotonina, 100 mg/kg, i.p.) ou com veículo (10 ml/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 4 dias consecutivos de acordo com a metodologia descrita por SANTOS et al. (1999). Após 20 min da última administração de PCPA, os animais receberam acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) com duração do estímulo de dez minutos, injeção de morfina (1 mg/kg, s.c.) ou veículo. Após 30 min do tratamento, a resposta nociceptiva foi analisada em relação a nocicepção causada pelo ácido acético.

Em outra série de experimentos foi investigada a participação dos subtipos de receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT₃) na ação antinociceptiva da acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun). Para isto, os animais foram pré-tratados com os antagonistas dos receptores 5-HT_{1A} (WAY100635 0,1 mg/kg, i.p.), 5-HT_{2A} (cetanserina, 0,3 mg/kg, i.p.) ou 5-HT₃ (ondansetron, 0,5 mg/kg, i.p.) 20 min antes da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) por dez minutos, como anteriormente descrito (TAKESHITA e YAMAGUCHI, 1995; BHARGAWA e SAHA, 2001; DUMAN et al.,

2004). Após 30 min do tratamento dos animais com acupuntura, a resposta nociceptiva foi analisada em relação a nocicepção causada pelo ácido acético. Outros grupos de animais foram tratados com veículo, WAY100635, cetanserina ou ondansetron 30 min antes da injeção de ácido acético.

3.7.3 Avaliação da participação do sistema α -adrenérgico

Para avaliar a possível participação dos receptores α_1 -adrenérgicos no efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), diferentes grupos de animais receberam prazosina (antagonista de receptores α_1 adrenérgico 0,15 mg/kg i.p.) ou veículo (10 ml/kg i.p.) e, 15 minutos após um grupo recebeu acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) por 10 minutos enquanto outro grupo recebeu fenilefrina (agonista de receptores α_1 adrenérgico 10 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes do teste do ácido acético (SANTOS et al, 1995).

Em outra série de experimentos, foi verificada a participação do sistema α_2 -adrenérgico na ação antinociceptiva da acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun). Os animais foram pré-tratados com ioimbina (antagonista dos receptores α_2 adrenérgicos, 0,15 mg/kg, i.p.) ou com o veículo (10 ml/kg, i.p.) 20 minutos antes da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) com duração do estímulo de 10 minutos ou da administração de clonidina (agonista de receptores α_2 -adrenérgico, 0,5 mg/kg, i.p.) conforme anteriormente descrito (MENDES et al., 2000 modificado). Após 30 minutos do tratamento dos animais, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético. Outros grupos de animais foram tratados com veículo ou ioimbina 30 minutos antes da injeção de ácido acético.

3.7.4. Avaliação da participação do sistema dopaminérgico

Para investigar a participação do sistema dopaminérgico na ação antinociceptiva do acuponto BL60 (Kunlun), os animais foram pré-tratados com sulpirida (antagonista de receptores dopaminérgicos tipo D₂, 1,0 mg/kg, i.p.) ou veículo e após 15 minutos, receberam acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun) por 10 minutos, apomorfina (agonista não-seletivo de receptores dopaminérgicos, 5 mg/kg i.p.) ou veículo (10 ml/kg i.p.), 30 minutos antes do teste do ácido acético (DALBÓ et al, 2006).

3.8. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média + erro padrão da média (E.P.M.) As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman Keuls. Valores de *p* menores que 0,05 (*p*<0,05) foram considerados como indicativos de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Nociceção induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados na figura 7 mostram que a estimulação prévia do acuponto BL60 (Kunlun) por 5, 10, 20 e 30 minutos reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, com valores de inibição de $38 \pm 7\%$, $38 \pm 8\%$, $27 \pm 8\%$ e $54 \pm 15\%$, respectivamente. Por outro lado, os animais do grupo controle contido (CC) não apresentaram redução do número de contorções abdominais induzidos pelo ácido acético. Vale a pena destacar que com apenas um minuto de estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) não houve redução significativa no número de contorções. Após a realização deste experimento o tempo de 10 min de estimulação foi escolhido para os experimentos seguintes pela facilidade em manter a agulha no ponto durante todo o período de estimulação.

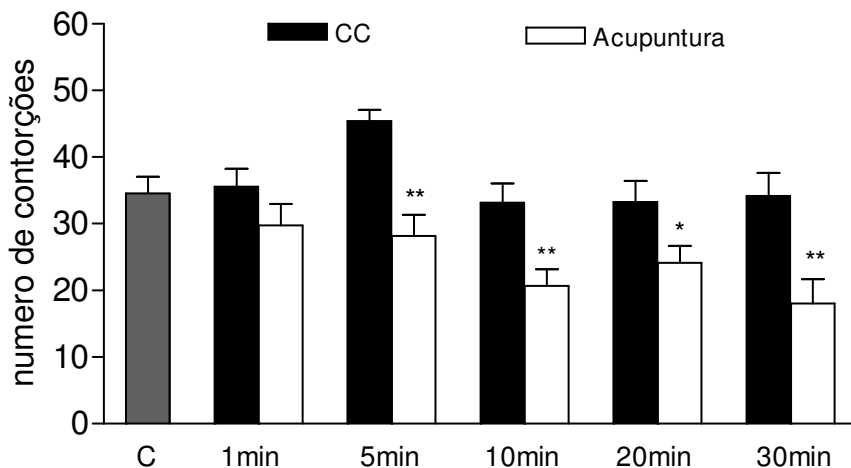


Figura 7: Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) com duração do estímulo de 1, 5, 10, 20 e 30 minutos na nociceção induzida por ácido acético 0,6% (450 µl, i.p.) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle contido (CC) (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls).

Os resultados apresentados na figura 8 mostram que a estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) por 10 minutos foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais induzida pelo ácido acético de forma tempo-dependente, sendo que seu pico máximo de efeito antinociceptivo foi aos 30 min após o estímulo, sendo este efeito mantido de forma significativa até 2 h após a estimulação. As inibições observadas foram de $49 \pm 5\%$, $70 \pm 7\%$, $63 \pm 7\%$ e $42 \pm 5\%$ para os tempos de 0 (imediatamente após a retirada da agulha); 0,5; 1 e 2 h após a realização da acupuntura, respectivamente.

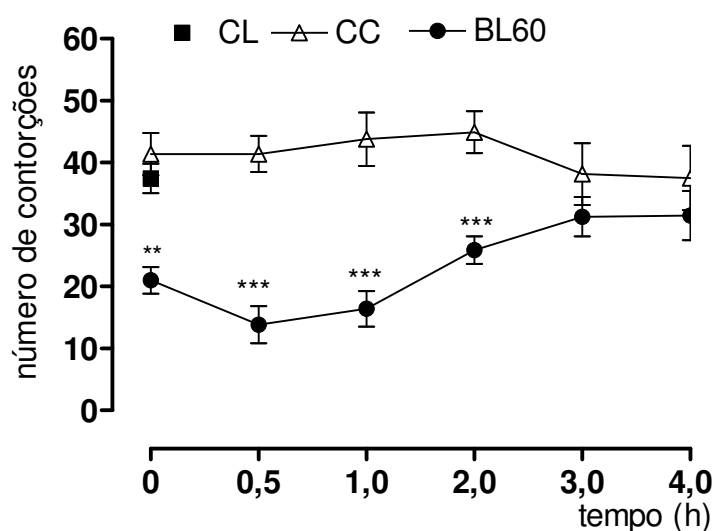


Figura 8: Avaliação da duração do efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) estimulado por 10 minutos na nocicepção induzida por ácido acético 0,6% (450 µl, i.p.) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8 a 10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle contido (CC) (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls). CL refere-se ao grupo controle sem contenção.

Os resultados apresentados na figura 9 mostram que a estimulação prévia do acuponto BL60 (Kunlun) por 10 minutos reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (inibição de $63 \pm 9\%$), o que não ocorreu com a estimulação de um não-ponto (Sham).

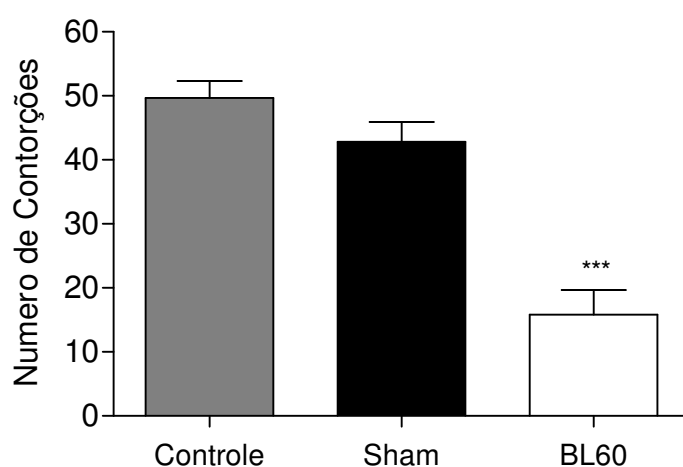


Figura 9: Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) e do ponto Sham estimulados por 10 minutos na nocicepção induzida por ácido acético 0,6% (450 μ l, i.p.) em camundongos, 30 minutos após a retirada da agulha. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle. O grupo Sham não diferiu estatisticamente do grupo controle (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls).

4.2. Nociceção induzida pelo glutamato

Os resultados apresentados na figura 10 mostram que a estimulação prévia do acuponto BL60 (Kunlun) por 10 minutos reduziu significativamente a nociceção causada pela injeção intraplantar de glutamato, 30 minutos após a retirada da agulha, com inibição de $38 \pm 7\%$. A resposta nociceptiva induzida pelo glutamato não foi alterada pela contenção dos animais.

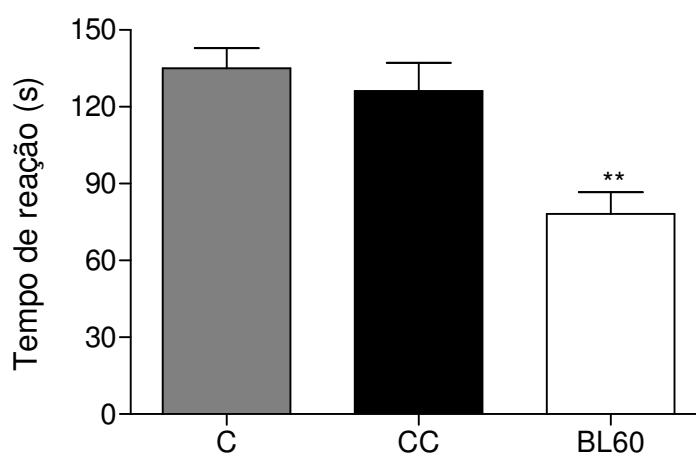


Figura 10: Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) estimulado por 10 minutos, na nociceção induzida por glutamato ($20 \mu\text{mol/pata}$) em camundongos, 30 minutos após a retirada da agulha. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle contido (CC) (pelo teste Student de Newman-Keuls).

4.3. Nociceção induzida pela formalina

Os resultados apresentados na figura 11 mostram que a estimulação prévia do acuponto BL60 (Kunlun) por 10 minutos, mas não a contenção do animal, reduziu significativamente tanto a nociceção neurogênica (0-5 min, painel A) quanto a inflamatória (15-30 min, painel B) causada pela injeção intraplantar de formalina (2,5%), 30 minutos após a retirada da agulha, com inibição de 29 ± 10 e $44 \pm 9\%$, respectivamente em relação ao grupo controle contido (CC).

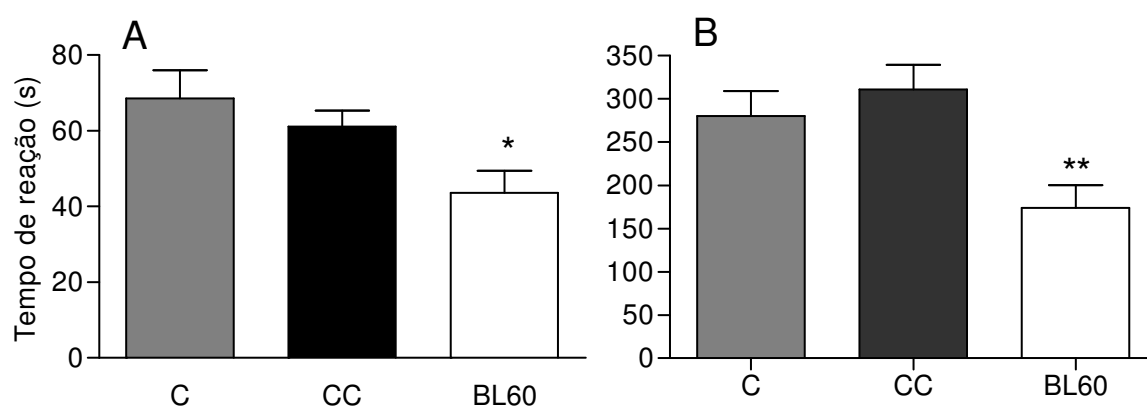


Figura 11: Efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) com 10 minutos de retenção da agulha, em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nociceção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados ao grupo controle contido (CC) (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls).

4.4. Análise dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva

4.4.1. Envolvimento do sistema opióide

Os resultados apresentados na figura 12 demonstram que a administração de morfina e a estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) reduziram o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo de receptores opióides), administrado 20 min antes da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) ou da administração de morfina ou salina, reverteu de forma significativa a antinocicepção causada pela morfina (1 mg/kg, s.c.) ou pela acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.

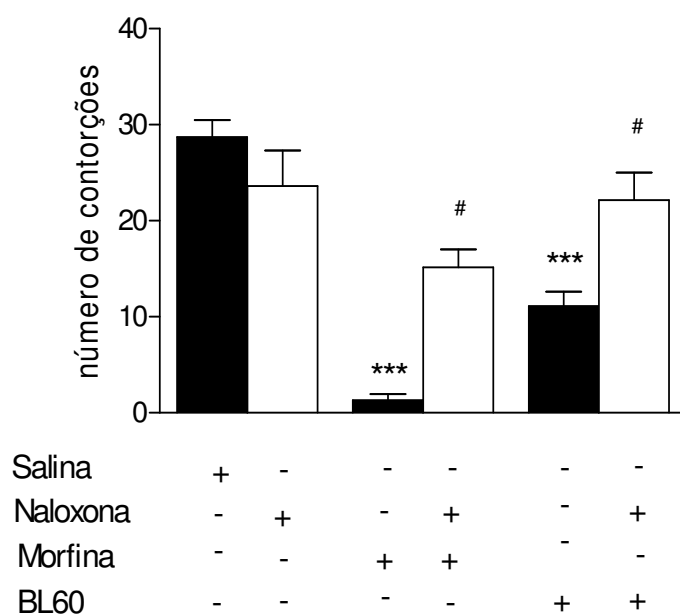


Figura 12: Influência do pré-tratamento dos camundongos com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com 10 minutos de estímulo, em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (salina e naloxona) e # P < 0,05 difere significativamente do grupo morfina e do grupo acupuntura (BL60) (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Os resultados apresentados na figura 13 demonstram que o pré-tratamento dos animais com naloxona metiodida (antagonista não seletivo de receptores opióides que não atravessa a barreira hemato-encefálica, 1 mg/kg, s.c.), administrado 20 min antes acupuntura no ponto BL60 (Kunlun) ou da administração de morfina ou salina, reverteu significativamente a antinocicepção causado pela morfina (1 mg/kg, s.c.) e pela acupuntura, no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.

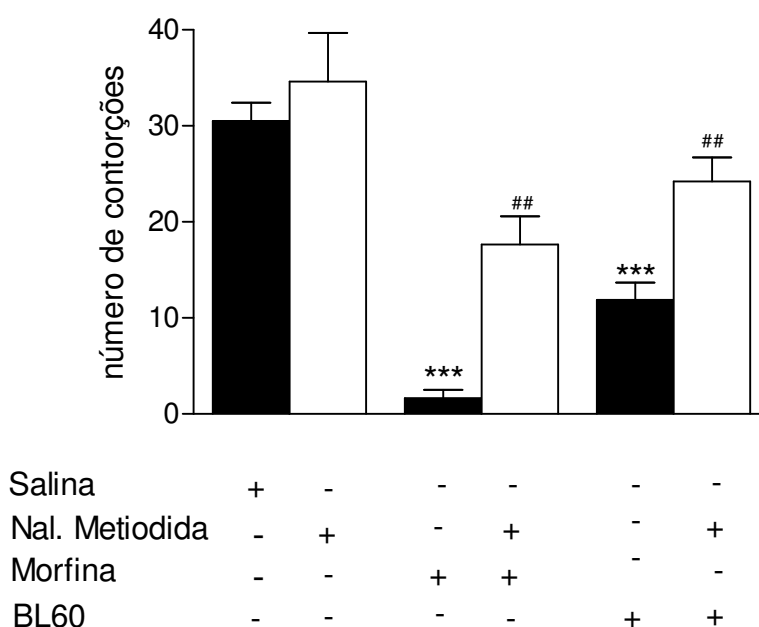


Figura 13: Influência do pré-tratamento dos camundongos com naloxona metiodida (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com 10 minutos de estímulo, em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (salina e naloxona metiodida) e ## P < 0,01 difere significativamente do grupo morfina e do grupo acupuntura (BL60) (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4.4.2. Envolvimento do sistema serotoninérgico

A figura 14 demonstra que o pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg/dia, i.p.) durante 4 dias (o qual promove uma depleção significativa dos níveis neuronais de 5HT) foi capaz de produzir uma reversão significativa da antinocicepção causada pela morfina (usado como controle) e pela acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com 10 minutos de estímulo, no modelo do ácido acético. O PCPA não tem efeito *per se*, enquanto a morfina e a estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) reduzem o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

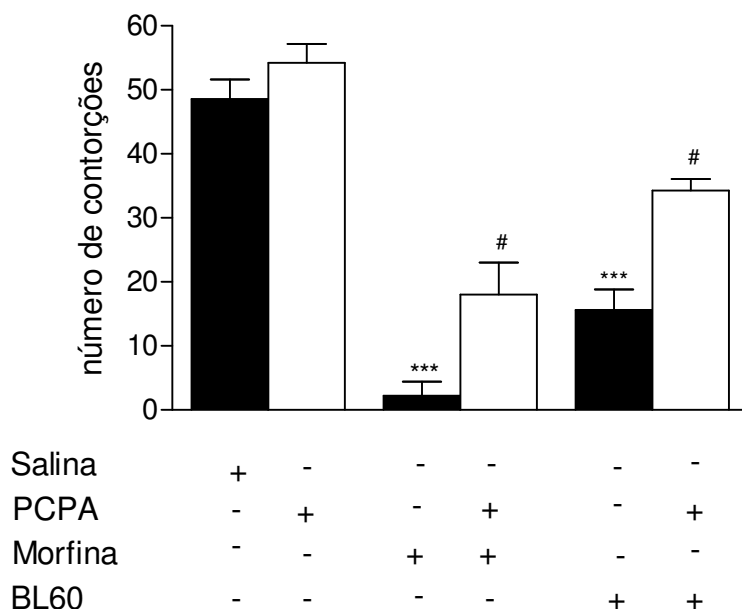


Figura 14: Influência do pré-tratamento dos camundongos com PCPA (100 mg/kg/dia, i.p., por 4 dias consecutivos) sobre o efeito antinociceptivo acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com 10 minutos de estímulo, em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (salina e PCPA) e # P < 0,05 difere significativamente do grupo morfina e do grupo acupuntura (BL60) (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Os resultados apresentados na figura 15 demonstram que o pré-tratamento com cetanserina (antagonista de receptores serotoninérgico 5-HT_{2A/2C}, 1 mg/kg, i.p.) e ondansetron (antagonista de receptores 5-HT₃, 0,5 mg/kg i.p.) administrado 20 min antes da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) por 10 minutos não foi capaz de reverter de forma significativa a antinocicepção causada pelo acuponto. Contudo, o tratamento dos animais com WAY100635 (antagonista de receptores 5-HT_{1A}, 1 mg/kg, i.p.) reverteu de maneira significativa o efeito antinociceptivo causado pela acupuntura, no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.

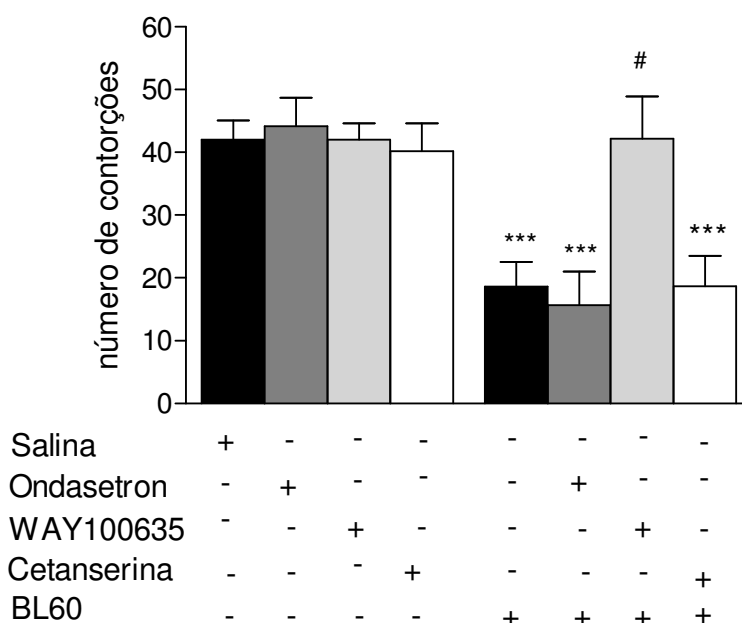


Figura 15: Influência do pré-tratamento dos camundongos com cetanserina (1mg/kg, i.p.), ondansetrona (0,5mg/kg, i.p.) e WAY100635 (1mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com 10 minutos de estímulo, em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (salina, ondansetron, WAY100635 e cetanserina) e # P < 0,05 difere significativamente do grupo acupuntura (BL60) (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4.4.3. Envolvimento dos receptores α_1 -adrenérgicos

A figura 16 mostra que o pré-tratamento dos animais com prazosina (antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos, 0,15 mg/kg, i.p.), não reverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado pela acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com 10 minutos de estimulação, em relação à nocicepção causada pelo ácido acético. No entanto, o mesmo tratamento dos animais com prazosina foi capaz de reverter significativamente a antinocicepção causada pela fenilefrina (agonista de receptores α_1 -adrenérgicos, 1mg/Kg i.p.).

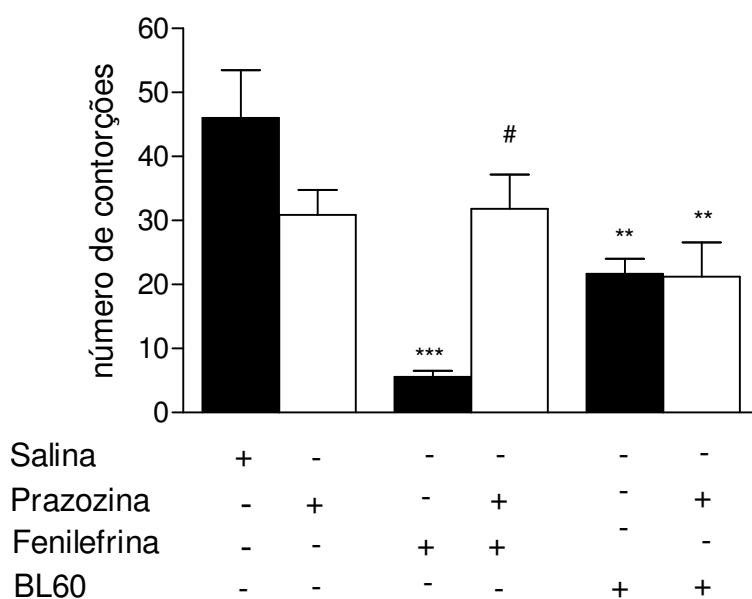


Figura 16: Influência do pré-tratamento dos camundongos com prazosina (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com 10 minutos de estímulo, em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** P < 0,001, ** P < 0,05 difere significativamente dos grupos controles (salina e prazosina) e # P < 0,05 difere significativamente do grupo fenilefrina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4.4.4. Envolvimento dos receptores α_2 -adrenérgicos

A figura 17 mostra que o pré-tratamento dos animais com ioimbina (antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, 0,15 mg/kg, i.p.), não reverteu significativamente o efeito antinociceptivo acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), porém reverteu a antinocicepção causada pela injeção de clonidina (agonista de receptores α_2 -adrenérgicos, 0,5mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção causada pelo ácido acético.

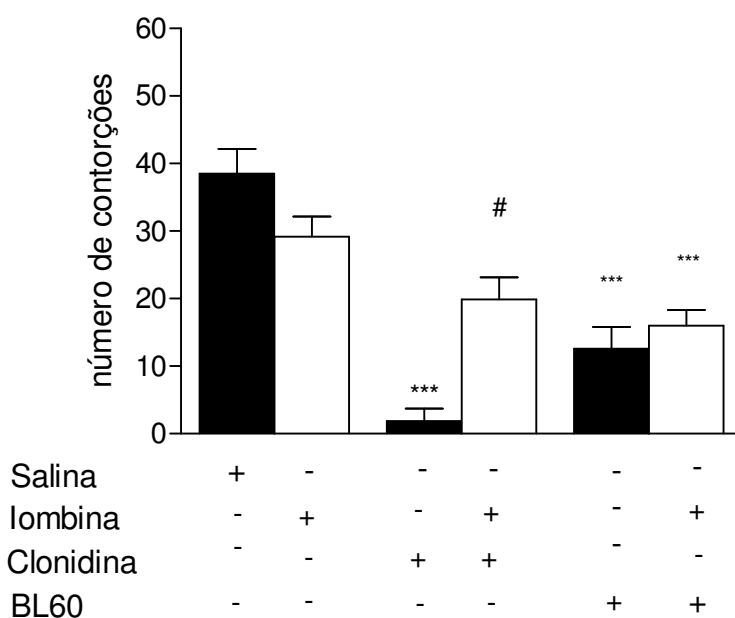


Figura 17: Influência do pré-tratamento dos camundongos com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com 10 minutos de estímulo em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (salina e ioimbina) e # P < 0,01 difere significativamente do grupo clonidina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4.4.5. Envolvimento do sistema dopaminérgico

A figura 18 mostra que o pré-tratamento dos animais com sulpiride (antagonista de receptores D₂, 0,15 mg/kg, i.p.), não reverteu significativamente o efeito antinociceptivo acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), porém reverteu parcialmente a antinocicepção causada pela apomorfina (agonista não seletivo de receptores dopaminérgicos, 5 mg/kg, i.p.), em relação a nocicepção causada pelo ácido acético.

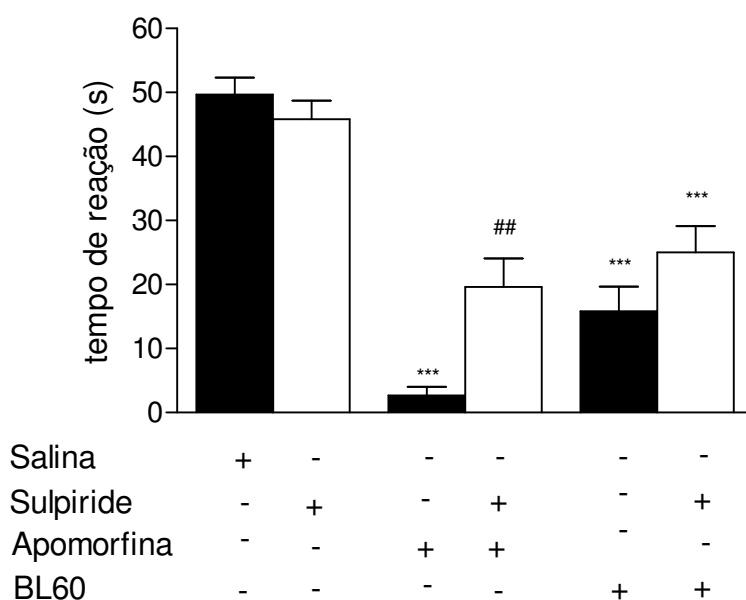


Figura 18: Influência do pré-tratamento dos camundongos com sulpiride (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto BL60 (Kunlun), com 10 minutos de estímulo em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (salina e sulpirida) e ## P < 0,01 difere significativamente do grupo apomorfina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

Apesar de ser uma técnica milenar no oriente, ainda é relativamente recente o estudo da acupuntura e sua comprovação científica no ocidente. De fato, existem ainda poucos estudos mostrando a eficácia, os mecanismos de ação e a diferença entre os diversos acupontos na literatura científica. Além disso, um pequeno número de acupontos foi estudado isoladamente, o que reforça a importância da avaliação isolada de cada um deles, pois segundo a Medicina Tradicional Chinesa, eles são usados com finalidades diferentes uns dos outros.

Outro fator importante de se avaliar é a técnica utilizada, pois a maioria dos trabalhos emprega o uso da eletroacupuntura, enquanto poucos utilizam somente o estímulo da agulha (conhecida como acupuntura manual).

A escolha do acuponto BL60 (Kunlun) para esse estudo foi feita por sua ampla utilização na prática clínica em casos de dores e por não haver ainda estudos utilizando este ponto isoladamente. Para isso, o efeito da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) foi verificado nos modelos clássicos de nocicepção induzida pelo ácido acético, glutamato e formalina. Além disto, no presente estudo foi analisado alguns dos possíveis mecanismos de ação que o acuponto BL60 (Kunlun) poderia estar ativando para produzir seu efeito antinociceptivo, entre os quais destacam-se os sistemas opióide, serotoninérgico, α -adrenérgico e dopaminérgico.

O primeiro passo desse estudo foi verificar se a estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) realmente possui propriedade antinociceptiva e se o tempo em que a agulha permanece retida no ponto leva a diferenças nesta ação. Essa verificação foi feita utilizando-se o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, que é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral, sendo

amplamente utilizado como ferramenta para detecção e avaliação de agentes com propriedades analgésicas e antiinflamatórias (COLLIER *et al.*, 1968; DUARTE *et al.*, 1988; REICHERT *et al.*, 2001). Os prótons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente canais de cátions não seletivos localizados nas vias aferentes primárias (JULIUS & BASBAUM, 2001). Além disso, a injeção de ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PG), bradicinina (BK), SP, TNF- α , IL-1 β e IL-8 entre outros (COLLIER *et al.*, 1968; VINEGAR *et al.*, 1979; RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001). Estes mediadores estimulam neurônios aferentes primários aumentando a liberação de aspartato e glutamato no fluido cerebrospinal (FENG *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2004). Em função disto, este modelo apresenta uma boa sensibilidade, embora pouca especificidade, uma vez que a nocicepção induzida pelo ácido acético pode ser prevenida por agentes antiinflamatórios, analgésicos, relaxantes musculares e sedativos (REICHERT *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2003).

No presente estudo foi demonstrado, pela primeira vez, que a estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) foi capaz de reduzir de forma significativa às contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo que este efeito inicia-se a partir de 5 minutos de estímulo da agulha. Morioka e colaboradores (2002) não encontraram indícios de analgesia com o uso concomitante dos pontos BL60 (Kunlun), ST36 (Suzanli) e GB34 (Yanglingquiao) em associação com a técnica da eletroacupuntura em humanos a qual, segundo ele, aumentaria o efeito da acupuntura. Por outro lado, Li e colaboradores (2005) utilizaram eletroacupuntura nos pontos BL60 (Kunlun) e ST36 (Suzanli) observaram um efeito antinociceptivo em camundongos. No presente estudo utilizou-se somente o ponto BL60 (Kunlun), apenas com a

inserção da agulha, e foi observado que sua estimulação causou 70% de inibição da nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos. Deve-se levar em consideração que se trata de formas distintas de técnicas de acupuntura, seleção de pontos e avaliação entre estes estudos, o que poderia explicar, em parte, os diferentes resultados encontrados.

Normalmente, os trabalhos publicados com acupuntura manual utilizam apenas um tempo de estimulação pré-estabelecido (RONG et al, 2005; UM et al, 2005; GUIMARÃES et al, 1997; KIM et al, 2006; KIM et al, 2000; LINDE et al, 2004; SCOGNAMILLO-SZABÓ, 2005), ou não se referem ao tempo de duração dos estímulos (WANT e KAIN, 2002; SAIDAH et al, 2003). Neste sentido, no presente estudo procurou-se também analisar qual o melhor tempo de retenção da agulha no acuponto, bem como a duração deste efeito após a retirada da agulha. Além disso, para cada grupo punturado foi analisado um grupo contido da mesma forma que os animais que receberam a acupuntura. Assim, foi possível observar e conseqüentemente descartar que a antinocicepção causada pela estimulação do acuponto fosse decorrente de estresse pela contenção dos animais.

Os resultados do presente trabalho mostram claramente que a antinocicepção causada pela estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) foi de rápida instalação (inicia com 5 min) e perdurou por até 2 h após a retirada da agulha, a qual foi mantida por 10 min, no acuponto. Na literatura encontram-se trabalhos em que o efeito da acupuntura é avaliado durante a estimulação com a agulha (ROSTED et al, 2006; POHODENKO-CHUDAKOVA, 2005; MORIOKA,2002) ou que foram avaliados em um determinado tempo após o estímulo, sem uma avaliação em relação ao tempo. Essa etapa foi muito importante para se escolher o tempo de

maior inibição da resposta nociceptiva (30 minutos) bem como de retenção da agulha para ser utilizado nos experimentos posteriores.

Neste estudo também foi analisado se a simples inserção de uma agulha de acupuntura em um ponto qualquer do corpo do animal que não fosse um acuponto (ponto Sham) não produziria o efeito antinociceptivo que foi observado através da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun). Assim, pode se observar no presente estudo que a estimulação do ponto Sham não reduziu a resposta nociceptiva induzida pelo o ácido acético quando comparado com o controle. Esses dados estão de acordo com experimentos em roedores e humanos, onde a estimulação de pontos sham não produz o mesmo efeito que a estimulação dos acupontos (LI et al, 2005; TABOSA et al, 2002; WANG e KAIN, 2002; TAM et al, 2007). Em humanos, um estudo comparando a inserção de agulhas em acupontos com a inserção de agulhas em pontos sham usando tomografia por emissão de pósitrons mostrou a ativação de regiões do cérebro que são associadas à expectativa, tais como do córtex pré-frontal dorsolateral, córtex cingulado anterior e mesencéfalo, tanto na estimulação de acupontos quanto de pontos sham. No entanto, na estimulação dos acupontos verdadeiros, além dessas áreas também foi ativada a ínsula, uma região que se acredita estar ligada a modulação da dor (QIU, 2005).

O presente estudo também demonstrou que a estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) foi capaz de reduzir de forma significativa a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato. A resposta nociceptiva induzida pelo glutamato parece envolver sítios periféricos, espinhais e supra-espinhais, tendo ação mediada amplamente por receptores NMDA e não NMDA, assim como pela liberação de óxido nítrico (NO) ou por algumas vias de transmissão moduladas por nitro derivados (BEIRITH *et al.*, 2002, 2003; ROSA *et al.*, 2005). De fato, vários estudos têm

demonstrado que os receptores de aminoácidos excitatórios estão envolvidos na transmissão aferente primária nociceptiva, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da resposta dolorosa (AANONSEN & WILCOX, 1987, 1990; COGGESHAL & CARLTON, 1997; FERREIRA *et al.*, 1999).

Visto que se obteve um resultado bastante satisfatório na inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o acuponto BL60 (Kunlun) foi então submetido a um teste onde pudesse ser discriminado, se o seu efeito antinociceptivo era de origem predominantemente neurogênica ou inflamatória. Assim, utilizou-se o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, que é dividido em duas fases, a primeira, chamada de fase neurogênica (de 0 a 5 min) e a segunda chamada de fase inflamatória (15 a 30 min). A estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) inibiu significativamente ambas as fases, sendo que a fase neurogênica decorre da ativação direta dos terminais nervosos nociceptivos, enquanto a fase inflamatória é mediada por uma combinação de mecanismos periféricos e de sensibilização central na medula espinhal (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992).

Procurando identificar por quais mecanismos esse acuponto promove sua ação antinociceptiva, foram testados os sistemas opióide, serotoninérgico, alfa-adrenérgico e dopaminérgico, utilizando-se antagonistas dos receptores desses sistemas como pré-tratamento para avaliar se algum deles modificaria os resultados encontrados no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Um dos mecanismos pelo qual a estimulação desse acuponto parece estar envolvida é com o sistema opióide. Peptídeos opióides endógenos são considerados um dos principais candidatos para a ação da acupuntura, uma vez que muitas pesquisas mostraram que o efeito da eletroacupuntura é revertido pela naloxona,

um antagonista de receptores opióides (KAWAKITA et al, 2006; CHO et al, 2006; HAHM, 2007). Além disso, um aumento de peptídeos opióides no plasma e no fluido cerebrospinal foi observado após a eletroacupuntura em animais e humanos (KAWAKITA et al, 2006).

Neste estudo, tanto a naloxona, quanto a naloxona metiodida (antagonista de receptores opióides que não atravessa a barreira hemato-encefálica) foram capazes de reverter a antinocicepção causada tanto pela acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun) quanto pela morfina. Esses resultados demonstram que a estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) parece induzir a liberação de opióide endógenos, que podem atuar tanto periférica quanto centralmente. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

A estimulação de sítios através da substância cinzenta periaquedutal (PAG) pode provocar antinocicepção/analgesia em ratos, gatos, macacos e humanos. Essa analgesia é mediada, pelo menos em parte, por vias descendentes que inibem as respostas dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal para estímulos nocivos. Evidências indicam que neurônios de projeção noradrenérgicos e serotoninérgicos bulboespinais medeiam, pelo menos parte da antinocicepção produzida pela PAG (CUI et al, 1999).

Está bem estabelecido que as vias serotoninérgicas no SNC originam-se dos núcleos da rafe, os quais representam em mamíferos rica fonte de serotonina neuronal (FIELDS et al., 1991; MILLAN, 2002). O núcleo dorsal da rafe (DRN) tem sido implicado nos efeitos regulatórios de antidepressivos nos transtornos de humor (ARTIGAS et al., 1996), bem como na modulação da dor (MILLAN, 2002) e o núcleo magno da rafe (MRN) é provavelmente o núcleo serotoninérgico mais importante em modular o controle descendente da transmissão da dor (BASBAUM e FIELDS, 1984;

MILLAN, 2002). No presente estudo, também se verificou o envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun). A depleção dos níveis neuronais de serotonina através da administração de PCPA, reverteu parcialmente o efeito da acupuntura. Avaliou-se também a participação dos diversos receptores serotoninérgicos e evidenciou-se a participação dos receptores 5-HT_{1A}, pois a administração de WAY100635 reverteu a ação do acuponto BL60 (Kunlun).

Muitos estudos demonstraram que a dopamina exerce uma importante função no controle da nocicepção em modelos de dor crônica e aguda (DALBÓ et al, 2006). Quando ocorre um estímulo nocivo, há um aumento de impulsos no corno dorsal da medula espinhal, sugerindo um aumento na atividade de vias descendentes dopaminérgicas (MILLAN, 2002). Vias dopaminérgicas mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal estão envolvidas na inibição da nocicepção em nível supraespinhal. Dessa maneira, essas vias são responsáveis pela ação antinociceptiva central e pela modulação dos controles dopaminérgicos descendentes, agindo em receptores D₂. A estimulação de receptores D₂ promove uma inibição da adenilato-ciclase, via ativação de proteínas G_{i/o}. A ativação de receptores D₂ suprime correntes de Ca²⁺ e potencializa correntes de K⁺ promovendo a redução da excitabilidade neuronal (DALBÓ et al, 2006).

Contudo, embora a ativação do sistema dopaminérgico também seja importante em promover analgesia, nas nossas condições experimentais não observamos sua participação na ação antinociceptiva do acuponto BL60 (Kunlun), pois o pré-tratamento com sulpirida (antagonista de receptores dopaminérgicos D₂) não reverteu seu efeito antinociceptivo, embora tenha mostrado uma tendência à

reversão. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar esses resultados.

Envolvendo esses três sistemas existe um mecanismo chamado “cascata de recompensa” que, em condições normais, opera da seguinte forma: neurônios no hipotálamo liberam serotonina, a qual ativa o peptídeo opióide encefalina, que é liberada da região tegmental ventral e interage com receptores inibitórios controlando a liberação de GABA. O papel principal do GABA é controlar a liberação de dopamina na região tegmental ventral. O resultado da inibição da atividade do GABA é um aumento do suprimento de dopamina (SCOTT e SCOTT, 1997). Alguns estudos propõem que o uso da acupuntura para o tratamento de vícios por substâncias de abuso, além de atuar via sistema opióide, possa atuar também no mecanismo da “cascata de recompensa” (SCOTT e SCOTT, 1997).

Pesquisadores mostraram que a acupuntura ativa vias serotoninérgicas descendentes via trato anterolateral. Essa estimulação pode levar a um aumento nos níveis de dopamina pelo mecanismo da “cascata de recompensa” (SCOTT e SCOTT, 1997). No entanto, no nosso estudo não foi demonstrada a participação da via dopaminérgica na antinocicepção causada pela estimulação do acuponto BL60 (Kunlun).

Também implicadas com antinocicepção, as vias α -adrenérgicas descendentes são recrutadas a partir de estímulos em estruturas cerebrais como a PAG (MILLAN, 2002). As propriedades antinociceptivas de agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos refletem a modulação da influência excitatória das fibras aferentes primárias nos neurônios de projeção (MILLAN, 2002). Evidências também sugerem que os receptores α_1 -adrenérgicos modulam o processamento nociceptivo no corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 2002). Utilizando injeção de veneno de abelha

no acuponto CV12 (Zhongwan), Kwon e colaboradores (2001) evidenciaram a participação de receptores α_2 -adrenérgicos nesta antinocicepção. No entanto, no presente estudo, foram testados os receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos e estes não parecem estar envolvidos na ação antinociceptiva da estimulação do acuponto BL60 (Kunlun).

Em síntese, o presente estudo demonstrou que a estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) apresenta atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção induzida por ácido acético, glutamato e formalina e que esta ação parece estar envolvida com a ativação dos sistemas opióide e serotoninérgico. Além disso, os dados apresentados neste estudo demonstram que realmente o acuponto BL60 (kunlun) tem ação antinociceptiva em modelos de nocicepção aguda. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar seu efeito em dores crônicas, bem como se sua associação com outros pontos ou mesmo se o uso de eletroestimulação podem resultar nem efeito sinérgico ou numa ação antinociceptiva diferenciada.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- O acuponto BL60 (Kunlun) apresenta efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção química induzida por ácido acético, glutamato e formalina.
- A acupuntura no acuponto BL60 (Kunlun) apresentou efeito antinociceptivo com estímulos da agulha a partir de 5 minutos. A antinocicepção observada iniciou-se imediatamente após a retirada da agulha e se manteve por até 2 horas após o estímulo no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético. A estimulação de um ponto sham não foi capaz de inibir significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.
- Os sistemas opioiédrgico e serotoninérgico parecem estar envolvidos na ação antinociceptiva da acupuntura em BL60 (Kunlun). Os sistemas dopaminérgico e α -adrenérgico não parecem estar envolvidos na ação antinociceptiva da estimulação deste acuponto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. **J Pharmacol Exp Ther.**, 1: 9-19, 1987.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, 1000: 40-56, 2004.

ALTMAN, S. Acupuncture as an emergency treatment. **California vet.**, v.15, n.1, p.6-8, 1979.

ARTIGAS, F., ROMERO, L., DE MONTIGNY, C., BLIER, P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. **Trends Neurosci.**, 19: 378-383, 1996.

BARDIN, L., LAVARENNE, J., ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, 86: 11-8, 2000.

BASBAUM, A.L. Descending control of pain transmission: possible serotonergic-enkephalinergic interactions. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 133: 177-189, 1981.

BASBAUM, A.I., FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.**, 7 : 309-338, 1984.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, 924: 219-228, 2002.

BESSON, J.M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**. 53: 1-9, 1997.

BHARGAVA VK, SAHA L. Serotonergic mechanism in imipramine induced antinociception in rat tail flick test. **Indian J. Physiol. Pharmacol.** 45 : 107-110, 2001.

BLEAKMAN, D.; ALT, A.; NISENBAUM E.S. Glutamate receptors and pain. **Semin Cell Dev Biol.**, 17: 592-604, 2006.

BURGESS, P.R.; PERL, E.R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **J. Physiol.**, 190: 541-562, 1967.

CARLTON, S.M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R.E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. **Brain Res.**, 790: 160-169, 1998.

CARTER, G.T., SULLIVAN, M.D. Antidepressants in pain management. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, 3: 454-458, 2002.

CHA M.H., CHOI J. S., BAI S.J., SHIM I., LEE H.J., CHOI S.M., LEE B.H. Antiallodynic effects of acupuncture in neuropathic rats. **Yonsei Med. J.** 47; 3: 359-366. 2006.

CHAE H.Y., BONG H.L., SUNG H.S. A Possible Mechanism Underlying the Effectiveness of Acupuncture in the Treatment of Drug Addiction. **eCAM**, p 1, 2007

CHAPMAN, C.R.; GRAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, 353: 2233-2237, 1999.

CHO ZH, HWANG SC, WONG EK, SON YD, KANG CK, PARK TS, BAI SJ, KIM YB, LEE YB, SUNG KK, LEE BH, SHEPP LA, MIN KT. Neural substrates, experimental evidences and functional hypothesis of acupuncture mechanisms. **Acta Neurol Scand**,113: 370-377, 2006.

CODERRE, T.J.; KATZ, J.; VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, 52: 259-285, 1993.

COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res Rev.**, 24: 28-66, 1997.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, J.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**,32: 295-310, 1968.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, 72: 359-371, 2005

CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (eds) **Textbook of pain**. Churchill Livingstone, Edinburgo. p.183-214, 1999.

CUI M., FENG Y., MCADOO D.J., WILLIS W.D. Periaqueductal Gray Stimulation-Induced Inhibition of Nociceptive Dorsal Horn Neurons in Rats Is Associated with the Release of Norepinephrine, Serotonin, and Amino Acids. **JPET** 289:868-876, 1999

DALBÓ S., JÜRGENSEN S., HORST H., SOETHE D.N., SANTOS A.R.S., PIZZOLATTI M.G., RIBEIRO-DO-VALLE R.M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: Evidence for a role of the dopaminergic system. **Pharmacol., Biochem. and Behav.** 85, 317-323, 2006.

DAVIES, S.N.; LODGE, D. Evidence for involvement N-methylaspartate receptors in “wind-up” of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. **Brain Res.**, 424: 402-406, 1987.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: BESSON, M.J., DICKENSON, A. **The Pharmacol. pain**. Springer-Verlag, Berlim. p.21-41, 1997.

DING L. Acupuntura, teoria do meridiano e pontos de acupuntura. São Paulo: **Roca**. 1996, p 265.

DRAY A. 1997. Peripheral Mediators of Pain. In: Dickenson, A., Besson, J., -M., editors. **The Pharmacol. Pain**. Vol.130/1., Springer: Verlag, Berlin. 21-41

DUARTE, I.D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz J Med Res**. 21: 341-343,1988.

DUMAN EN, KESIM M, KADIOGLU M, YARIS E, KALYONCU NI. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. **J. Pharmacol. Sci**. 161-165, 2004.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**, 98: 729-733, 2003.

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacol.**, 38: 835-842, 1999.

FIELDS, H.L., HEINRICHER, M.M., MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu. Rev. Neurosci.**, 14: 219-245, 1991.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, 15: 29-58, 2001.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, 48:129-141, 1999.

GALANTINO ML, EJE-OKORO ST, FINDLEY TW, CONDOLUCI D. Use of noninvasive electroacupuncture for the treatment of HIV-related peripheral neuropathy: a pilot study. **J Altern Complement Med.**, 5(2):135-42, 1999.

GALLIN, J.I.; FLETCHER, M.P.; SELIGMANN, B.E.; HOFFSTEIN, S.; CEHRS, K.; MOUNESSA, N. Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. **Blood**, 59: 1317-1329, 1982.

GARCIA, T.J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N. Engl. J. Med.**, 353: 429-430, 2005.

GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biol Res Nurs.**, 7: 297-312, 2006.

GUIMARÃES, C.M., PINGE, M.C.M., YAMAMURA, Y., MELLO, L.E.A.M., 1997. Effects of acupuncture on behavioral, cardiovascular and hormonal responses in restraint-stressed Wistar rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 30: 1445-1450, 1997.

HAHM T. S. The Effect of 2 Hz and 100 Hz Electrical Stimulation of Acupoint on Ankle Sprain in Rats. **J Korean Med Sci**; 22: 347-51, 2007.

HAN, P.L. Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 103: 3908-3913, 2006.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.**, 96: 67-202, 2002.

HUNT SP, MANTYH PW. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci.**, 2(2):83-91, 2001.

JI, R.R.; WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction on nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol Dis.**, 8: 1-10, 2001.

HERRERO, J.F.; LAIRD, J.M.A.; LOPEZ-GARCIA, J.A. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? **Prog Neurobiol.**, 61: 169-203, 2000.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30: 103, 1987.

HYLDEN, J. L., WILCOX, G. L. Intrathecal serotonin in mice: analgesia and inhibition of a spinal action of substance P. **Life Sci.**, 33:789-795, 1983.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.** 69: 2911-2919, 2001.

JAGGAR, D. History and basic introduction to veterinary acupuncture. **Problems Vet. Med.**, v.4, n.1, p.13-15, 1992

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

KAMIYA, H.; NAKAMURA, J.; HAMADA, Y.; NAKASHIMA, E.; NARUSE, K.; KATO, K.; YASUDA, Y.; HOTTA, N. Polyol pathway and protein kinase C activity of rat Schwannoma cells. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, 19:131-139, 2003.

KAWAKITA K, SHINBARA H, FUKUDA F, YANO T, KURIYAMA K. How do acupuncture act? - Focusing on the progress in Japanese acupuncture research - **J. Pharmacol. Sci.**, 100: 443-459, 2006.

KIM H-W, KWON Y-B, HAM T-W, ROH D-H, YOON S-Y, LEE H-J, HAN H-J, YANG I-S, BEITZ AJ, LEE J-H. Acupoint Stimulation Using Bee Venom Attenuates Formalin-Induced Pain Behavior and Spinal Cord Fos Expression in Rats. **Med Vet Science** 65(3): 349-355, 2003

KIM H.Y., KWON O.K., NAM T.C. Effect of BL-21 (Wei-Yu) acupoint stimulation on gastric motility following preanesthetic treatment in dogs. *J. Vet. Sci.* 1(2): 133-138, 2000.

KIM, K.S.; LEE, K.W.; IM, J.Y.; YOO, J.Y.; KIM, S.W.; LEE, J.K.; NESTLER, E.J.; KIM M.S.; NAM T.C. Electroencephalography (EEG) Spectral Edge Frequency for Assessing The Sedative Effect of Acupuncture in Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 68(4): 409-411, 2006.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18: 412, 1959.

KWON Y.B., KANG M.S., HAN H.J., BEITZ A.J., LEE J.H. Visceral antinociception produced by bee venom stimulation of the Zhongwan acupuncture point in mice: role of α_2 adrenoceptors. *Neuroscience Letters* 308: 133-137, 2001.

LI A.H., ZHANG J.M., XIE, Y. K., 2004. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin-nerve complexes with enriched nerve endings. *Brain Res.*, 1012, 154-159, 2004.

LI W.M., CUI K.M., LI N., GU Q.B., SCHWARZ W., DING G.H., WU G.C. Analgesic Effect of Electroacupuncture on Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain in Mice: A Model of Antipain Treatment by Acupuncture in Mice. *Jap. J. Physiol.*, 55, 339-344, 2005

LINDE M., FJELL A., CARLSSON J., DAHLÖF C. Role of needling per se in acupuncture as prophylaxis for menstrually related migraine: a randomized placebo-controlled study. *Cephalalgia*, 25: 41-47, 2004.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet*, 353: 1607-1609, 1999.

MacFARLANE, B.V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H.A. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. *Pharmacol. Ther.*, 75: 1-19, 1997.

MACIOCIA G. Fundamentos da Medicina Chinesa. Um texto abrangente para acupunturistas e fitoterapeutas. São Paulo: Roca. 1996, p559, 560.

MacMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol.*, 192: 444- 462, 2005.

MANTOVANI M., KASTER M.P., PERTILE R., CALIXTO J.B., RODRIGUES A.L.S., SANTOS A.R.S. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. *J. Pineal Res.*; 41:382-389, 2006.

MARVIZON, J.C.; MCROBERTS, J.A.; ENNES, H.S.; SONG, B.; WANG, X.; JINTON, L.; CORNELIUSSEN, B.; MAYER, E.A. Two *N*-methyl-d-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. *J Comp Neurol.*; 446: 325-241, 2002.

MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; MANNING, P.T.; HAUSER, S.D.; LEAHY, K. M.; SMITH, W.G.; ISAKSON, P.C.; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is noninflammatory and non-ulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3228-3232, 1994.

MEDEIROS MA, CANTERAS NS, SUCHECKI D, MELLO LEAM. C-Fos expression induced by electroacupuncture at Zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 1673-1684, 2003

MELZACK R. From the gate to the neuromatrix. *Pain* 1999;Suppl 6:S121-126.

MELZACK R., WAAL P.D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*.150: 971-979, 1965.

MENDELL, J.R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. *N. Engl. J. Med.*, 348: 1243-1255, 2003.

MENDES GL, SANTOS ARS, MALHEIROS A, FILHO VC, YUNES RA, CALIXTO JB. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 164-172, 2000.

MIDDLETON, E.Jr.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52: 673-751, 2000.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.*, 57: 1-164, 1999.

MILLAN MJ. 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66: 355-474.

MOFFET H.H. How might acupuncture work? A systematic review of physiologic rationales from clinical trials. *BCM Complementary and Alternative Medicine.* 6:25, 2006

MORIOKA N., AKÇA O., DOUFAS A.G., CHERNYAK G., SESSLER D.I. Electro-Acupuncture at the Zusanli, Yanglingquan, and Kunlun Points Does Not Reduce Anesthetic Requirement *Anesth Analg.* 95:98-102, 2002.

NAGRA, R.M., BECHER, B.; TOURTELLOTTE, W.W.; ANTEL, J.P.; GOLD, D.; PALADINO, T.; SMITH, R.A.; NELSON, J.R.; REYNOLDS, W.F. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 78: 97-107, 1997.

OKADA, K., KAWAKITA, K. Analgesic Action of Acupuncture and Moxibustion: a Review of Unique Approaches in Japan. *eCAM*, 1-7, 2007.

OTSUKA, M. & YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.*, 73: 229-308, 1993.

PALECEK, J.; NEUGEBAUER, V.; CARLTON, S.M.; IYENGAR, S.; WILLIS, W.D. The effect of a kainate GluR5 receptor antagonist on responses of spinothalamic tract neurons in a model of peripheral neuropathy in primates. **Pain**, 111: 151-161, 2004.

PASERO, C.; PAICE, J.; McCAFFERY, M. Basic mechanisms underlying the causes and effects of pain. Em: McCaffery & Pasero, C. (eds). **Pain Clinical Manual St. Louis, MO: Mosby**, pp. 15-34, 1999.

PLEUVRY, B.J.; LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol Ther.**, 71: 313-324, 1996.

POCKETT, S. Spinal cord sympathetic plasticity and chronic pain. **Anesth Analg.**, 80: 173-179, 1995.

POHODENKO-CHUDAKOVA I.O. Acupuncture analgesia and its application in cranio-maxillofacial surgical procedures. **J. Cranio-maxillofacial Surg.**, 33:118-122, 2005.

QIU J. Yin and Yang of acupuncture. **Res. highlights.** 6:498, 2005.

RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of pain.** Churchill Livingstone: Londres. 1-8, 1999.

RAMER, M.S.; THOMPSON, S.W.; MacMAHON, S.B. Causes and consequences of sympathetic basket formation in dorsal root ganglia. **Pain**, 6: 111-120, 1999.

RANG HP. Pharmacology. Edinburgh: **Churchill Livingstone**, 2003.

REICHERT, J.A.; DAUGHTERS, R.S.; RIVARD, R.; SIMONE, D.A. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. **Pain**, 89: 221-227, 2001.

REN, K. & DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, 100:1-6, 2002.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.V.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S. FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 387: 111-118, 2000.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol.**, 60: 404-15, 2001.

RONG P-J, ZHU B, HUANG Q-F, GAO X-Y, BEN H, LI Y-H. Acupuncture inhibition on neuronal activity of spinal dorsal horn induced by noxious colorectal distention in rat. **World J. Gastroenterol.** 11(7): 1011-1017, 2005

ROSA, K.A.; GADOTTI, V.M.; ROSA, A.O.; RODRIGUES, A.L. CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neurosci Lett.**, 381: 185-8, 2005.

ROSTED P., BUNDGAARD M., FISKE J. PEDERSEN A.M.L. The use of acupuncture in controlling the gag reflex in patients requiring an upper alginate impression. **British Dental J.**, 201 (11): 721-725, 2006.

SAIDAH R., CHUEIRE A.G., REJAIU W.A., PERES N.R., SILVA J.B.G., SCHIAVO F. Use of acupuncture after arthroscopic knee surgery and its relationship to pain, physical activity and need of walking aid. **Acta ortop bras** 11(1) jan/mar, 2003

SANTOS ARS, FILHO VC, YUNES RA, CALIXTO JB. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen Pharmacol.** 26:1499-506, 1995.

SANTOS, A.R.S. & CALIXTO, J.B. Rhutenium red and capzasepine antinociceptiva effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci Lett.**, 235: 73-76, 1997.

SANTOS, A.R.S.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-Npropyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J Pharmacol Exp Ther.**, 289: 417-426, 1999.

SCHOEN, A.M. Introduction to veterinary acupuncture: scientific basis and clinical applications. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 39, 1993. California. **Proceedings**. California, p.39, 1993.

SCHOEN, A.M. Acupuntura Veterinária. Da arte antiga à medicina moderna. São Paulo: **Roca**, 2006.

SCOGNAMILLO-SZABÓ MVR, BECHARA GH. Acupuncture: Scientific basis and applications. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.31, n.6, 1091-1099, 2001

SCOGNAMILLO-SZABÓ MVR, BECHARA GH, CUNHA FQ. Effect of acupuncture on TNF- α , IL-1 β and IL-10 concentrations in the peritoneal exudates of carrageenan-induced peritonitis in rats. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.35, n.1, 103-108, 2005

SCOTT S., SCOTT W.N. A Biochemical Hypothesis for the Effectiveness of Acupuncture in the Treatment of Substance Abuse: Acupuncture and the Reward Cascade. **American Journal of Acupuncture**, Vol. 25, No. 1, 1997.

SHELLEY, A. & CROSS, M.D. Pathophysiology of pain. **Mayo Clin. Proc.**, 69: 375-383, 1994.

TABOSA A., YAMAMURA Y., FORNO E.R., MELLO L.E.A.M., Effect of the acupoints ST-36 (*Zusanli*) and SP-6 (*Sanyinjiao*) on intestinal myoelectric activity of Wistar rats. **Braz. J. med. Biol. Res.** 35: 731-739, 2002.

TAKESHITA N, YAMAGUSHI I. Meta-chlorophenylpiperazine attenuates formalin-induced nociceptive responses through 5-HT_{1/2} receptors in both normal and diabetic mice. **Br. J. Pharmacol.** 116: 3133-3138, 1995

TAM L.S., LEUNG P.C., LI T.K.; ZHANG L., LI E.K. Acupuncture in the treatment of rheumatoid arthritis: a double-blind controlled pilot study. **BMC Compl. Altern. Méd.**, 7:35, 2007.

TJØLSEN A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. (eds). **Pharmacol. pain**, Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. p. 1-20, 1997.

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

UM S.W., KIM M.S, LIM J.H., KIM S.Y., SEO K.M., NAM T.C. Thermographic Evaluation for the Efficacy of Acupuncture on Induced Chronic Arthritis in the dog. **J. Vet. Med. Sci.** 67(12): 1283-1284, 2005.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev.**, 46: 295-309, 2004.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHSTON, P.R. Antagonism of pain and Hyperalgesia. Anti-inflammatory Drugs. In: VANE, J.R.; FERREIRA, S.H., editors. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol. 50/II,. Springer: Verlag, Berlin. 208-222, 1979.

WALL, P.D. Introduction to the fourth edition. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1-8, 1999.

WANG S.M., KAIN Z.N. P6 Acupoint Injections Are Effective as Droperidol in Controlling Early Postoperative Nausea and Vomiting in Children. **Anesthesiology**. 97(2): 359-366, 2002.

WEN, T.S. *Acupuntura clássica chinesa*. 2.ed. São Paulo: Cultrix, 1989. 225p.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Pain*, 353: 1959-1964, 1999.

WOOLF, C.J. Pain. *Neurobiol Dis.*, 7: 504-510, 2000.

WOOLF, C.J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci.*, 74: 2605-2610, 2004.

XIAO, H.S.; HUANG, Q.H.; ZHANG, F.X.; BAO, L.; LU, Y.J.; GUO, C.; YANG, L.; HUANG, W.J.; FU, G.; XU, S.H.; CHENG, X.P.; YAN, Q.; ZHU, Z.D.; ZHANG, X.; CHEN, Z.; HAN, Z.G.; ZHANG, X. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 99: 8360-8365, 2002.

XING G.G., LIU F.Y., QU X.X., HAN J.S., WAN Y. Long-term synaptic plasticity in the spinal dorsal horn and its modulation by electroacupuncture in rats with neuropathic pain. *Experim. Neurol.* 10.1016, 2007

YAKSH TL. Regulation of spinal nociceptive processing: where we went when we wandered onto the path marked by the gate. *Pain* 1999;Suppl 6:S149-152.

YIM Y.K, LEE H., HONG K.E., KIM Y.I., LEE B.R., SON C.G., KIM J.E. Electroacupuncture at acupoint ST36 reduces inflammation and regulates immune activity in Collagen-Induced Arthritic Mice. *eCAM*;4(1)51-57, 2007

ZHANG, X.; BAO, L.; SHI, T.J.; JU, G.; ELDE, R.; HOKFELT, T. Down-regulation of μ -opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neurosci.*, 82: 223-240, 1998.

ZHU, C.Z.; WILSON, S.G.; IKUSA, J.P.; WISMER, C.T.; GAUVIN, D.M.; LYNCH III, J.J.; WADE, C.L.; DECKER, M.W.; HONORE, P. Assessing the role of metabotropic glutamate receptor 5 in multiple nociceptive modalities. **Eur J Pharm.**, 506: 107-118, 2004.

ZIMMERMANN M. 1983. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** 16: 109-110.

--- Fundamentos Essenciais da Acupuntura Chinesa. São Paulo: Ícone.1995, p206.