

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

**Ari Ojeda Ocampo Moré**

**EFEITO DA ACUPUNTURA NO MODELO DE DOR PÓS-  
OPERATÓRIA EM CAMUNDONGOS: INVESTIGAÇÃO DO  
SISTEMA ADENOSINÉRGICO UTILIZANDO A  
FARMACOPUNTURA**

**Florianópolis**

**2012**



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

**Ari Ojeda Ocampo Moré**

**EFEITO DA ACUPUNTURA NO MODELO DE DOR PÓS-  
OPERATÓRIA EM CAMUNDONGOS: INVESTIGAÇÃO DO  
SISTEMA ADENOSINÉRGICO UTILIZANDO A  
FARMACOPUNTURA**

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

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

**Florianópolis**

**2012**

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da  
Universidade Federal de Santa Catarina

M835e Moré, Ari Ojeda Ocampo

Efeito da acupuntura no modelo de dor pós-operatória em camundongos [dissertação] : investigação do sistema adenosinérgico utilizando a farmacopuntura / Ari Ojeda Ocampo Moré ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos. - Florianópolis, SC, 2012.  
89 p.: il., grafs.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Acupuntura. 3. Dor pós-operatória. 4. Nocicepção. 5. Eletroacupuntura. I. Santos, Adair Roberto Soares dos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

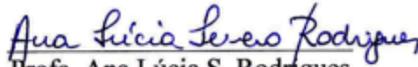
CDU 612.82

**ARI OJEDA OCAMPO MORÉ**

**“EFEITO DA ACUPUNTURA NO MODELO DE DOR  
PÓS-OPERATÓRIA EM CAMUNDONGOS:  
INVESTIGAÇÃO DO SISTEMA ADENOSINÉRGICO  
UTILIZANDO A FARMACOPUNTURA”**

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

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2012.

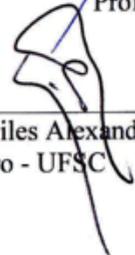


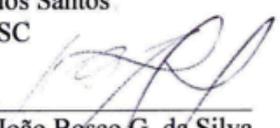
Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues  
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:



Prof. Adair Roberto S. dos Santos  
Orientador – UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Giles Alexander Rae  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. João Bosco G. da Silva  
Membro da Banca Externo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Li Shih Min  
Membro - UFSC



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Adair Roberto Soares dos Santos por ter me acolhido no seu Laboratório nestes últimos anos. Deixo aqui o registro de toda minha admiração pelo Professor Adair que é para mim um exemplo superação e força de vontade. Pois, mesmo com todas as dificuldades referentes ao meio da pesquisa, ele com muita humildade, está sempre disposto a escutar novas idéias e criar oportunidades para formação de seus alunos.

Agradeço aos meus colegas da “Família LANDI” por todo carinho e atenção que me foram prestados durante o tempo que passamos juntos:

- Ao Daniel e à Leidi pela dedicação, pelas idéias e prestatividade na condução deste trabalho. Um casal “exemplo de eficiência” com quem aprendi muito.

- Ao Francisco pela companhia sempre divertida.

- Ao Ney pelas idéias, auxílio no trabalho, na parceria do consumo da caféina e por ter sido o primeiro a abrir as portas do LANDI para mim.

- À Fran por ter me auxiliado na etapa de conclusão deste trabalho e por não ter medido esforços quando precisava de auxílio nos experimentos.

- À Marina Córdova pelo auxílio no laboratório e por ter sido sempre uma referência de amizade e segurança nos momentos alegres e difíceis compartilhados neste período.

- À Débora Lanznaster pelo privilégio ter sido seu companheiro de M1.

- Ao Gaúcho por me fazer pensar fora da minha área de conforto e mostrar que o que acreditamos saber nem sempre é o que parece.

- À Deise pela parceria no karaokê e pelo auxílio no laboratório.

- À Morgana pelo auxílio e por ter mantido abertas as portas do laboratório para a Acupuntura

- Ao Serginho, Murilo, Celeste e Marcieli pelo auxílio. Aos demais colegas do Laboratório Bira, Wladimir, Vanessa, Fernanda, Ana Paula, Cris, Daniela que também contribuíram na minha formação.

Aos professores e funcionários do CCB e do programa de Pós-graduação em Neurociências pela amizade e auxílio.

Ao Dr. Li, Dra. Jéssica, Dr. Ricardo e residentes da Acupuntura pelo apoio.

Aos meus pais e meu irmão pelo carinho e apoio durante a realização do Mestrado.

À minha Noiva Gherusa por fazer com que os meus dias sejam mais claros e a vida mais bela.

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



## RESUMO

A acupuntura é uma modalidade terapêutica comumente utilizada no tratamento da dor. Apesar da grande quantidade de estudos que investigaram os efeitos da acupuntura, seus mecanismos neurobiológicos não foram completamente elucidados. Com o objetivo de avaliar a influência do sistema adenosinérgico no efeito da acupuntura camundongos Swiss fêmeas foram submetidos ao modelo de dor pós-operatória (incisão plantar) e tratados com duas modalidades de estímulo: a farmacopuntura (FP) e a eletroacupuntura (EA); o primeiro consiste na injeção de fármacos nos acupontos e o segundo no estímulo elétrico. Ambos os estímulos foram realizados no acuponto SP6 bilateral. Vinte e quatro horas após a incisão plantar o animais, que desenvolveram hipersensibilidade mecânica da pata operada, foram tratados com farmacopuntura com adenosina ou eletroacupuntura. Depois de investigar diferentes parâmetros de dose na FP, e tempo de estímulo na EA; verificou-se que a dose de 30  $\mu\text{g}$  na FP com adenosina e o tempo de 10 minutos na EA inibiram significativamente a hipersensibilidade mecânica dos animais por até 60 minutos após o tratamento. Foi verificado também que a pré-administração intraperitoneal de cafeína (inibidor não seletivo dos receptores adenosinérgicos, 10 mg/kg) reverteu tanto o efeito da FP quanto da EA sobre a hipersensibilidade mecânica. Além disso, foi demonstrado que a pré-administração periférica de DPCPX (antagonista dos receptores A1 adenosinérgicos, 30  $\mu\text{g}$ /sítio), injetado bilateralmente no acuponto SP6 reverteu os efeitos da FP e da EA. Por outro lado, a pré-administração espinal do DPCPX (3 e 5  $\mu\text{g}$ ), injetado intratecalmente, reverteu o efeito da FP mas não o da EA. Estes dados sugerem que há influência do sistema adenosinérgico sobre o efeito do tratamento com acupuntura. Adicionalmente, estes dados fornecem, pela primeira vez, evidências que o receptor A1 adenosinérgico periférico está envolvido no efeito da EA.

**Palavras- chaves:** acupuntura, adenosina, receptores de adenosina, dor pós-operatória, nocicepção, eletroacupuntura, farmacopuntura



## ABSTRACT

Acupuncture is a treatment modality commonly used to treat pain. Despite the large number of studies that investigated the effects of acupuncture, its neurobiological mechanisms have not been fully elucidated. In order to evaluate the influence of the adenosinergic system in the effect of acupuncture, female Swiss mice were submitted to the model of postoperative pain (plantar incision) and treated with two types of stimulus: pharmacopuncture (FP) and electroacupuncture (EA); the first involves the injection of drugs into acupoints and the second electrical stimulation. Both stimuli were performed in the SP6 acupoint bilaterally. Twenty-four hours after plantar incision the animals that developed mechanical hypersensitivity in the operated foot, were treated with adenosine FP or EA. After investigating different parameters of the FP dose, and duration of stimulation in the EA, it was found that an adenosine FP dose of 30  $\mu\text{g}$  as well as 10 minute EA stimulation, significantly inhibited mechanical hypersensitivity of the animals for 60 minutes after treatment. We also observed that intraperitoneal pre-administration of caffeine (a nonselective inhibitor of adenosinergic receptors, 10 mg / kg) reversed both FP and EA effects upon mechanical hypersensitivity. Moreover, our results demonstrate that peripheral pre-administration of DPCPX (A1 adenosinergic receptor antagonist, 30 mg / site), injected bilaterally in the SP6 acupoint, reversed the effects of FP and EA. On the other hand, intrathecal pre-administration of DPCPX (3 and 5  $\mu\text{g}$ ) reversed the effect of FP but not of EA. These data suggest that the adenosinergic system is involved in the effect of acupuncture treatment. Additionally, these data provide, for the first time, evidence that the adenosinergic A1 receptor is involved in the peripheral effect of EA.

**Key words:** acupuncture, adenosine, adenosine receptors, post-operative pain, nociception, electroacupuncture



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema de tratamento na segunda etapa da pesquisa..	40
<b>Figura 2</b>	Esquema de tratamento na terceira etapa da pesquisa...	41
<b>Figura 3</b>	Sequência do procedimento cirúrgico.....	42
<b>Figura 4</b>	Avaliação da hipersensibilidade mecânica.....	43
<b>Figura 5</b>	Ilustração do procedimento de farmacopuntura.....	45
<b>Figura 6</b>	Ilustração dos volumes injetados no acuponto.....	45
<b>Figura 7</b>	Quantificação da área corada pelo azul de Evans.....	45
<b>Figura 8</b>	Localização do acuponto SP6.....	47
<b>Figura 9</b>	Isoflurano inalatório e ilustração do procedimento de eletroacupuntura.....	48
<b>Figura 10</b>	Volume utilizado no modelo de farmacopuntura.....	51
<b>Figura 11</b>	Coloração do membro posterior com azul de Evans ....	52
<b>Figura 12</b>	Efeito da farmacopuntura com adenosina sobre a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor pós-operatória.....	53
<b>Figura 13</b>	Efeito da injeção de salina ou de adenosina no acuponto SP6 e da injeção de adenosina no não-acuponto.....	54
<b>Figura 14</b>	Efeito da eletroacupuntura sobre a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor pós-operatória.....	55
<b>Figura 15</b>	Influência da sedação com isoflurano por 10 min em grupos de animais não operados e grupos de animais submetidos à incisão plantar.....	57
<b>Figura 16</b>	Influência da cafeína no efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura.....	46
<b>Figura 17</b>	Influência da pré-administração de DPCPX em diferentes doses injetado no acuponto SP6, sobre o efeito do tratamento da farmacopuntura com adenosina.....	58
<b>Figura 18</b>	Influência da injeção do DPCPX no acuponto SP6 sobre o efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura.....	59
<b>Figura 19</b>	Influência da injeção intratecal do DPCPX sobre o efeito da farmacopuntura com adenosina e eletroacupuntura.....	60
<b>Figura 20</b>	Avaliação da atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto.....	61
<b>Figura 21</b>	Esquema ilustrativo do efeito periférico da acupuntura no receptor A <sub>1</sub> adenosinérgico.....	74



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitros
A1	Receptor de adenosina do subtipo 1
A2	Receptor de adenosina do subtipo 2
A2A	Receptor de adenosina do subtipo 2A
A2B	Receptor de adenosina do subtipo 2B
A3	Receptor de adenosina do subtipo 3
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ANOVA	Análise estatística de uma variância
AC	Adenilato ciclase
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMPE	Corno posterior da medula espinal
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
EA	Eletroacupuntura
EPM	Erro padrão da média
FP	Farmacopuntura
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GABA	Ácido-gama aminobutírico
Gi/0	Proteína G subfamília i/0
Gs	Proteína G subfamília s
GV1	Acuponto vaso-governador um
K <sup>+</sup>	Íon Potássio
mg	Miligrama
mm	Milímetro
min	Minuto
ml	Mililitro
NA	Não acuponto
Na <sup>2+</sup>	Íon sódio
PAG	Substância cinzenta periqueadutal
P1	Receptor de purina tipo 1
P2	Receptor de purina tipo 2
PC6	Acuponto pericárdio seis
PKA	Proteína quinase A

PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
SP	Substância P
SP6	Acuponto baço-pâncreas seis
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
ST36	Acuponto estômago trinta e seis
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UDP	Difosfato de uracila
UTP	Trifosfato de uracila
i.m	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
s.c.	Subcutânea

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1	Dor e nocicepção.....	19
1.2	Neurofisiologia da nocicepção.....	21
1.3	Mecanismos endógenos de controle da nocicepção.....	23
1.4	Sinalização purinérgica e o sistema adenosinérgico.....	24
1.5	Acupuntura.....	27
1.6	Eletroacupuntura.....	30
1.7	Farmacopuntura.....	31
1.8	Bases neurofisiológicas da acupuntura no controle da nocicepção.....	32
1.9	Modelo de dor pós-operatória.....	33
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos Específicos.....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1	Animais.....	39
4.2	Delineamento experimental.....	39
4.3	Modelo experimental de dor pós-operatória.....	42
4.4	Mensuração da hipersensibilidade mecânica.....	42
4.5	Tratamento com farmacopuntura.....	44
4.5.1	Determinação do volume de injeção.....	44
4.5.2	Tratamento com farmacopuntura com adenosina.....	46
4.6	Tratamento com acupuntura.....	48
4.7	Antagonistas do sistema adenosinérgico.....	48
4.7.1	Cafeína administrada intraperitonealmente.....	48
4.7.2	Farmacopuntura com DPCPX.....	48
4.7.3	DPCPX administrado intratecalmente.....	50
4.8	Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto.....	50
4.9	Reagentes.....	50
4.10	Análise Estatística.....	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1	Caracterização do volume utilizado no modelo de farmacopuntura.....	51
5.2	Efeito da farmacopuntura com adenosina sobre a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor pós-operatória.....	52

5.3	Efeito da eletroacupuntura sobre a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor pós-operatória.....	54
5.4	Influência da cafeína no efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura.....	56
5.5	Influência da injeção do DPCPX no acuponto SP6 sobre o efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura.....	57
5.6	Influência da injeção intratecal do DPCPX sobre o efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura.....	48
5.7	Isoflurano e tratamentos com farmacopuntura e eletroacupuntura não modificam a atividade locomotora dos camundongos.....	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor e nocicepção

A dor é uma submodalidade sensorial que faz parte de um conjunto de funções fisiológicas relacionadas à proteção do organismo exposto a estímulos nocivos (JULIUS; BASBAUM, 2001). A sinalização destes estímulos, que inicia em receptores localizados no sistema nervoso periférico (SNP) e é conduzida até diferentes estruturas do sistema nervoso central (SNC), pode fazer com que ocorra uma reação neurosensorial descrita como percepção dolorosa ou sensação dolorosa (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009).

Existe uma série de fatores constitucionais, situacionais, comportamentais e emocionais que influenciam a fisiologia da percepção dolorosa no ser humano e, por isso, um estímulo nocivo de mesma intensidade pode provocar diferentes reações. Assim, com base nestas características, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008).

O estímulo nocivo é definido pela IASP como “um evento presente ou potencialmente causador de dano aos tecidos” e o estímulo nociceptivo foi considerado como “um evento presente ou potencialmente causador de dano aos tecidos que é traduzido e codificado por nociceptores”. Apesar de um dano tecidual presente ou potencial ser o denominador comum de estímulos que podem causar dor, existem alguns tipos de danos teciduais que não são detectados por qualquer receptor sensorial, e que, portanto não causam dor (LOESER; TREEDE, 2008).

Na reunião realizada em Kyoto em 2007, a IASP revisou os conceitos de termos relacionados à dor e definiu-se nocicepção como “os processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo” (LOESER; TREEDE, 2008). É importante ressaltar que dor e nocicepção são eventos que podem ocorrer de forma independente, tem definições distintas e devem ser diferenciados nos contextos de pesquisa e prática clínica. As definições de dor e termos associados citadas acima evitam atrelar diretamente dor ao estímulo, portanto a atividade induzida no nociceptor e a condução de sinais pelas vias nociceptivas não são consideradas dor, pois esta última está sempre relacionada a fatores multidimensionais.

A dor pode ser classificada de várias maneiras, uma delas é de acordo com a sua duração. A dor aguda se dá pela ativação direta de nociceptores (estruturas especializadas na codificação de estímulos nociceptivos) na eminência ou após uma lesão substancial de algum tecido. Quando a dor persiste por semanas ou meses é classificada como dor crônica. A dor aguda tem caráter de proteção e geralmente não é mais percebida após a recuperação da estrutura lesada. Por outro lado, a dor crônica pode permanecer mesmo após a recuperação da lesão e caracteriza-se pela incapacidade do organismo em restabelecer suas funções fisiológicas (MILLAN, 1999).

A dor também pode ser classificada de quatro formas quanto à sua origem (WOOLF, 2004):

(1) Nociceptiva: ocorre devido a ativação de nociceptores com terminações na pele, vísceras e outros órgãos. Esta modalidade de dor é uma experiência sensorial aguda causada por um estímulo nociceptivo e é mediada por um sistema de alto limiar sensorial especializado, o sistema nociceptivo.

(2) Inflamatória: ocorre na presença de lesão tecidual ou inflamação. Caracteriza-se pela presença de uma série de mediadores químicos liberados por células lesadas e por fibras aferentes primárias, incluindo substância P (SP), neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, que têm efeitos diretos sobre a excitabilidade de fibras sensoriais e simpáticas. Estes mediadores também promovem vasodilatação com extravasamento de proteínas plasmáticas e o recrutamento de células inflamatórias. Mastócitos, macrófagos, linfócitos e plaquetas contribuem para a formação de um ambiente complexo, composto por mediadores inflamatórios como íons hidrogênio, norepinefrina, bradicinina, histamina, íons potássio, citocinas, serotonina, fator de crescimento neural, óxido nítrico e produtos das vias da ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase do metabolismo do ácido araquidônico. Esta “cascata” de eventos promove uma alteração no limiar de transdução dos nociceptores e é chamada de sensibilização periférica.

(3) Neuropática: esta modalidade de dor caracteriza-se pela lesão ou disfunção do sistema nervoso periférico ou central, e tem como consequência a ativação anormal da via nociceptiva. Esta lesão ou disfunção do sistema nervoso promove mudanças funcionais, estruturais e bioquímicas ao longo de toda a via nociceptiva. Em geral, devido ao seu caráter mal adaptativo, a dor neuropática pode tornar-se crônica,

resultando na aparição de hiperalgesia, dor espontânea, parestesia e alodinia.

(4) Funcional: nesta modalidade não é detectada anomalia estrutural ou dano ao sistema nervoso. Nesse caso, a dor é resultante do processamento central anormal dos estímulos, os quais podem ser amplificados e gerar uma sensação dolorosa desproporcional. A fisiopatologia da dor funcional ainda não está completamente esclarecida, porém, é notória a influência de fatores emocionais sobre as várias condições clínicas relacionadas a esta modalidade de dor, como por exemplo: fibromialgia, síndrome do intestino irritável, algumas formas de dor torácica não cardíaca e cefaléia do tipo tensional

O estudo, a avaliação e o tratamento de condições dolorosas são considerados complexos, pois envolvem aspectos subjetivos e processos fisiopatológicos não bem elucidados. Assim, a compreensão dos conceitos e da taxonomia referente aos aspectos da dor é de fundamental importância nesta área de pesquisa.

## **1.2 Neurofisiologia da nocicepção**

No início do século XX um pesquisador chamado Sherrington propôs a existência de um neurônio sensorial primário que seria ativado por um estímulo capaz de causar dano tecidual, o qual foi denominado de “Nociceptor” (JULIUS; BASBAUM, 2001). De acordo com o modelo descrito por Sherrington, nociceptores teriam limiares ou sensibilidades características que os distinguiriam de outras fibras nervosas sensoriais. Posteriormente, estudos eletrofisiológicos confirmaram a existência de neurônios sensoriais primários que podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa ou irritantes químicos, mas não por estímulos inócuos, tais como um contato morno ou um leve toque. Assim a dor pôde ser caracterizada como uma submodalidade sensorial somestésica semelhante ao toque, pressão e propriocepção, na qual um estímulo de uma certa qualidade ou intensidade é detectado por células especializadas (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os diferentes aspectos que envolvem a neurofisiologia da dor podem ser divididos didaticamente em quatro processos: transdução, transmissão, modulação e percepção (KELLY et al., 2001).

(1) Transdução: constitui-se na codificação de estímulo mecânico, térmico e químico em impulsos elétricos por terminais nervosos especializados presentes na extremidade periférica do nociceptor, denominados terminações nervosas livres. Estas terminações

são encontradas na pele, mucosas, membranas, fâscias, tecido conjuntivo de órgãos viscerais, ligamentos, cápsulas articulares, periosteio, músculos, tendões e vasos arteriais (MILLAN, 1999).

(2) Transmissão: refere-se à propagação do impulso elétrico do sistema nervoso periférico até o sistema nervoso central. A transmissão tem início nas fibras de axônios dos nociceptores, que podem ser classificadas de acordo com seu diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução. As fibras classificadas como do tipo C e do tipo A $\delta$  são responsáveis pela transmissão do estímulo nociceptivo. As fibras A $\delta$  são pouco mielinizadas, conduzem o impulso elétrico em uma velocidade entre 12 e 30 m/s e são responsáveis pela chamada “primeira dor” (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001). As fibras C não possuem bainha, conduzem estímulo à uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, em torno de 0,5 a 2 m/s e são responsáveis pela chamada “segunda dor” (MILLAN, 1999).

Os nociceptores (neurônios aferentes primários) têm seus corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal e emitem projeções axonais em duas direções: para a periferia e para a medula espinal (BESSON, 1999). Após os impulsos chegarem através dos aferentes primários ao corno dorsal da medula espinal, a informação nociceptiva é transmitida do corno dorsal para estruturas supra-espinhais através de neurônios de segunda ordem, que constituem as chamadas vias ascendentes. Os neurônios sensoriais secundários recebem seus sinais pela liberação de neurotransmissores (glutamato e SP) dos aferentes primários. Além disso, este processo também é mediado por canais de cálcio e sódio, sendo os canais de cálcio os principais reguladores da liberação de neurotransmissores nas sinapses. Dentre as vias ascendentes, a via espinotalâmica é a principal na propagação do estímulo nociceptivo. Os neurônios de segunda ordem desta via emitem suas projeções diretamente ao tálamo, onde a informação é inicialmente processada. Posteriormente, o estímulo é transmitido do tálamo até o córtex sensorial primário, no encéfalo (BESSON, 1999).

(3) Modulação: etapa onde ocorre modificação da propagação do estímulo nociceptivo através de mecanismos endógenos. É mediada por interação entre neurônios medulares e impulsos das vias descendentes originadas no tronco encefálico e encéfalo. Esta interação ocorre através da ativação de diferentes sistemas de neurotransmissores como opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, GABAérgico e glutamatérgico (MILLAN, 2002).

(4) Percepção: é a etapa final do processo de sinalização nociceptiva no encéfalo e reflete a experiência física e emocional

provocada pelo estímulo nociceptivo. Diferentes grupos funcionais de neurônios encefálicos recebem a sinalização da via nociceptiva que, além de definirem a percepção das características somáticas do estímulo, são responsáveis pelos aspectos cognitivo e afetivo da sensação de dor (TRACEY; MANTYH, 2007).

### **1.3 Mecanismos endógenos de controle da nocicepção**

A transmissão do estímulo nociceptivo pode ser modulada em vários níveis, desde os nervos periféricos até regiões medulares e encefálicas no SNC. Em 1965, Melzack e Wall sugeriram que o estímulo nociceptivo conduzido pelo SNP ao sistema SNC sofreria a atuação de sistemas moduladores, mesmo antes da percepção dolorosa ser evocada. Essa modulação ocorreria na substância gelatinosa do corno posterior da medula espinal (CPME), após ativação de fibras aferentes de grosso calibre. Estas fibras poderiam ativar interneurônios que inibiriam a transmissão do estímulo nociceptivo. O balanço entre a atividade das fibras de grosso calibre, transmitindo estímulos não-nociceptivos, e das fibras de pequeno calibre, transmitindo estímulos nociceptivos, no CPME resultaria na sensação dolorosa.

Essa teoria recebeu o nome de “Teoria da Comporta” e foi o marco inicial para o atual entendimento da inter-relação entre as vias ascendentes de transmissão dos impulsos nociceptivos e o complexo sistema endógeno de modulação da dor (MELZACK; WALL, 1965). Posteriormente verificou-se que, além dos mecanismos da teoria da comporta, existe uma complexa via neural descendente que se origina em diversas estruturas do SNC e, quando ativada, induz a liberação de opióides endógenos na substância gelatinosa do CPME, inibindo a transmissão do impulso nociceptivo a regiões superiores do SNC. Esta via neural é conhecida como via inibitória descendente da dor e inicia-se a nível supra-espinal.

Há demonstrações experimentais que a estimulação elétrica do córtex pré-frontal ou da substância cinzenta periaquedutal (SCP) inibe a resposta nociceptiva em ratos (MILLAN, 2002). Os estímulos aplicados tanto no córtex quanto na SCP induzem a liberação, nesta última região, de opióides endógenos que inibem interneurônios inibitórios GABAérgicos, ativando a via descendente. Estímulos no núcleo magno da rafe e no locus coeruleus são conduzidos ao CPME por fibras serotérgicas e noradrenérgicas, respectivamente, onde, na substância

gelatinosa, estimulam a liberação de opióides endógenos (MILLAN, 2002).

Outras substâncias, além dos opióides endógenos, desempenham papel importante na fisiopatologia da dor, tais como a adenosina, acetilcolina, o óxido nítrico, a serotonina, as catecolaminas, o ácido gama-aminobutírico, a SP e a colecistocinina, anandamida, entre outros. Todos esses mediadores podem exercer efeitos facilitatórios ou inibitórios no processamento das informações nociceptivas, dependendo de fatores, como a sua concentração e o local de sua ação (SAWYNOK, 1998; BASBAUM et al., 2009).

#### **1.4 Sinalização Purinérgica e o Sistema Adenosinérgico**

A sinalização purinérgica caracteriza-se pela atividade de purinas extracelulares (ATP, ADP e adenosina) e pirimidinas (UTP e UDP) como moléculas sinalizadoras. Estas moléculas exercem seus efeitos por meio da interação com receptores de membrana específicos, denominados receptores purinérgicos ou purinoceptores (BURNSTOCK, 2009).

O conceito da sinalização purinérgica foi proposto em 1972, após a demonstração que o nucleotídeo ATP era a molécula sinalizadora em nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos de intestino e bexiga. Ainda na década de 70, houve a identificação e caracterização dos purinoceptores, enfatizando ainda mais a sinalização mediada por nucleotídeos. Diferentemente dos demais neurotransmissores “clássicos”, o ATP é liberado não só pelos terminais pré-sinápticos dos neurônios, mas também pelos terminais pós-sinápticos (BURNSTOCK, 2007).

O ATP, além de atuar diretamente em determinados receptores purinérgicos serve de molécula precursora de vários outros metabólitos relacionados à sinalização purinérgica. No interior da célula o ATP pode ser convertido em AMP bidirecionalmente através da adenilato quinase e da ATPase. AMP pode ser convertido em adenosina através da enzima intracelular 5-nucleotidase e, em seguida, a adenosina pode ser transportada para o meio extracelular através de transportadores bidirecionais de nucleosídeos, podendo ativar receptores de adenosina em células adjacentes. O ATP pode também sair para o meio extracelular, e ativar seus respectivos receptores do tipo P2. Uma parte deste ATP pode gerar adenosina via ecto-nucleotidases, pelo metabolismo de nucleotídeos. A adenosina por sua vez, pode atuar nos

receptores purinérgicos do tipo P1 ou ser convertida em inosina. Existe uma família de ecto-nucleotidases, sendo a ecto-5-nucleotidase a principal enzima responsável em realizar estas reações sob condições fisiológicas (SAWYNOK; LIU, 2003). A adenosina ou o AMP também podem ser sintetizados a partir de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que é gerado dentro da célula a partir da ativação de GPCRs (receptores acoplado à proteína G) de superfície celular, com posterior conversão para a AMP sob ação da fosfodiesterase (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1997).

Com o avanço das pesquisas constatou-se que os receptores purinérgicos não estão presentes apenas em tecidos neurais, eles também são encontrados no tecido adiposo, rim, adrenais, coração, fígado, olhos, entre outros. Atualmente a sinalização purinérgica é foco de estudo em diversos mecanismos fisiológicos, incluindo secreção endócrina e exócrina, resposta imune, dor, inflamação, agregação plaquetária, vasodilatação, proliferação e diferenciação celular (BURNSTOCK, 2007). Desta forma os receptores purinérgicos são considerados importantes alvos terapêuticos no contexto da modulação farmacológica (SAWYNOK; REID, 1997).

Os purinoceptores são compostos por duas subfamílias, os receptores de adenosina (também chamados de receptores P1) e os receptores que reconhecem primariamente ATP, ADP, UTP e UDP (receptores P2) (SAWYNOK, 2007). O sistema adenosinérgico engloba a família de receptores P1, cujo agonista endógeno é a adenosina. Até o momento quatro diferentes subtipos de receptores adenosinérgicos (P1) foram clonados e caracterizados: A1 , A2A , A2b e A3. Todos eles fazem parte do grupo de receptores ligados à proteína G (BURNSTOCK, 2007).

A adenosina, que é um nucleosídeo formado pela união de uma adenina e uma ribose, atua no sistema nervoso como um modulador. Ela não é considerada um neurotransmissor clássico, visto que esta não se encontra estocada em vesículas no terminal pré- sináptico e não é liberada para a fenda sináptica como um neurotransmissor clássico (BURNSTOCK, 2006). Apesar da adenosina não ser liberada por vesículas sinápticas, há três principais formas desta molécula atingir a fenda sináptica ou regiões extra-celulares: (1) através da degradação do ATP extracelular por ecto-nucleotidases; (2) por meio da sua liberação para a fenda sináptica promovida por transportadores bidirecionais, que também têm a função de captar a adenosina presente no meio extracelular; (3) através da conversão enzimática de AMPC extracelular em adenosina (BURNSTOCK, 2007).

O primeiro efeito fisiológico documentado da adenosina foi a inibição de condução átrio-ventricular no coração de mamíferos e ocorreu há mais de 80 anos. Posteriormente verificou-se que a adenosina está envolvida na modulação de diferentes processos fisiopatológicos, e seus efeitos têm sido estudados em doenças do SNC, como epilepsia e isquemia cerebral, além de processos neurodegenerativos como a doença de Parkinson (BURNSTOCK, 2006). No SNP, a adenosina tem o potencial de modular respostas nociceptivas, inflamatórias e imunológicas (SAWYNOK, 1998).

A liberação de adenosina em sítios espinais ocorre na presença de altas concentrações de glutamato, SP (substância P), íons potássio, capsaicina, morfina, serotonina e inibidores da adenosina quinase (SAWYNOK, 1998). No sistema nervoso periférico a adenosina pode ser liberada nos terminais de neurônios sensoriais na presença de capsaicina, glutamato, formalina e inflamação local (LIU et al., 2002). O ATP, o qual é importante fonte de adenosina extracelular, pode ser liberado por neurônios e células gliais tanto dos sítios espinais quanto periféricos, a partir da despolarização causada por altas concentrações de  $K^+$ , bem como por inflamação local (CAHILL et al., 1993).

A concentração de adenosina no meio extracelular é um fator determinante dos efeitos desta molécula. Quando encontra-se neste meio, a adenosina pode ligar-se aos quatro tipos de receptores do sistema adenosinérgico, os quais diferem entre si quanto à afinidade pela adenosina, estruturas moleculares, distribuição tecidual e perfil farmacológico (FREDHOLM et al., 2001). Os receptores A1 e A2A apresentam alta afinidade pela adenosina, enquanto os receptores A2B e A3 são de baixa afinidade (RIBEIRO et al., 2003). É importante ressaltar que até o momento somente os receptores A1 e A2A foram identificados nos tecidos neurais, enquanto os receptores A2B e A3 são encontrados nos tecidos não neurais e em células do sistema imune (SAWYNOK, 2007).

Em relação à atividade dos receptores de adenosina, os receptores A1 e A3 interagem com proteínas G inibitórias ( $G_i/o$ ) sensíveis à toxina pertussis, promovendo uma inibição da atividade da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, redução dos níveis de AMPc. Por outro lado, a ativação dos receptores A2 (A2A e A2B) desencadeia uma resposta antagonica àquela dos receptores do tipo A1 e A3, pois os receptores A2 estão acoplados a proteínas G estimulatórias ( $G_s$  ou  $G_{olf}$ ), levando a um aumento na atividade da enzima adenilato ciclase e nos níveis de AMPc (FEOKTISTOV; BIAGGIONI, 1997; SAWYNOK, 2007).

Em relação à expressão de receptores do sistema adenosinérgico no sistema nervoso, os receptores A1 são os mais abundantes e tem expressão no córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tálamo, tronco cerebral e medula espinal (FREDHOLM et al., 2001). Quanto à localização celular dos receptores A1 nos neurônios, estes são encontrados nas regiões pré-sináptica, pós-sináptica e no axônio, inclusive nas terminações nervosas livres de neurônios peptidérgicos (SWANSON et al., 1995).

A adenosina possui diferentes efeitos na modulação da dor. Ela pode atuar aumentando ou diminuindo a nocicepção dependendo do local de atuação e do subtipo de receptor ativado (SAWYNOK, 1998; SAWYNOK & LIU, 2003). A transmissão da dor pode ser influenciada pela adenosina por sua atuação em neurônios espinais, primariamente através de receptores A1, ou em neurônios periféricos através dos receptores A1 e A2A (POON; SAWYNOK, 1998). Adicionalmente, a administração central (intratecal) ou a injeção periférica (na pata submetida ao estímulo nociceptivo) de agonista de receptores A1 em ratos promove antinocicepção. Por outro lado, a injeção periférica de agonista A2A tem efeito pró-nociceptivo (SAWYNOK, 1998). Desta forma, apesar de ainda não estarem completamente esclarecidos a influência dos receptores de adenosina na nocicepção, há evidências que indicam que o receptor A1 tem efeito antinociceptivo enquanto o receptor A2A tem efeito pró-nociceptivo (SAWYNOK; LIU, 2003).

A cafeína é uma metilxantina conhecida pela sua propriedade de bloquear de forma não específica os receptores A1, A2A e A2B. O bloqueio destes receptores pode ser alcançado pelo consumo de doses de cafeína presentes em duas ou três xícaras de café (FREDHOLM et al., 1999). Como a cafeína tem um expressivo consumo na população mundial, o efeito desta substância nas condições clínicas relacionadas a dor é tema de grande debate na comunidade científica (SAWYNOK, 2011).

## **1.5 Acupuntura**

A acupuntura é um método terapêutico utilizado na medicina tradicional chinesa há mais de 3000 anos (ULETT et al., 1998). Há registros de que este é um dos procedimentos mais antigos da história da medicina (DORFER et al., 1999). Ao contrário de outros procedimentos utilizados na antiguidade que caíram em desuso, a acupuntura nunca

deixou de ser praticada e atualmente é um dos tratamentos mais populares em todo mundo (MACPHERSON et al., 2007).

Até 1970 as evidências para o uso da acupuntura restringiam-se a uma enorme coleção de casos advindos de um quarto da população mundial (STUX; HAMMERSCHALG, 2005) – a população da China. Havia poucos experimentos à luz do conhecimento científico ocidental para convencer os céticos (KAPTCHUK, 2002); porém, nos últimos 25 anos essa situação mudou consideravelmente. Estudos clínicos e pré-clínicos nos moldes atuais vêm demonstrando a eficácia e efetividade da acupuntura em diversas condições (STUX; HAMMERSCHALG, 2005). Em 2003 a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma revisão indicando a terapia com acupuntura para uma relação de mais de cem doenças (WHO, 2003).

Atualmente o tratamento com acupuntura no ocidente está deixando de ser considerado alternativo. Essa consolidação junto à chamada “prática convencional” da medicina se dá na medida em que o acupunturista, dentro do modelo biomédico vigente, realiza o diagnóstico médico de maneira convencional, e utiliza as agulhas para modular as respostas do organismo, ou seja, a fisiologia do corpo, para o tratamento de doenças, de acordo com a ótica biomédica. É importante salientar que a acupuntura pode ser utilizada como um tratamento convencional de maneira isolada ou em associação com fármacos, cirurgia ou outros procedimentos, de acordo com as necessidades do paciente (WHITE et al., 2008).

A acupuntura nesta última década vem se tornando uma opção terapêutica cada vez mais utilizada no tratamento da dor. Apesar do progresso no desenvolvimento de fármacos que auxiliam no manejo das condições álgicas, há uma crescente preocupação com os efeitos colaterais que ocorrem com uso de medicamentos (LAO et al., 2001). Nesse sentido, a acupuntura, quando praticada por profissionais qualificados, tem se revelado uma medida não farmacológica efetiva para o tratamento da dor (WITT et al., 2006).

Um dos desafios enfrentados pelos praticantes da acupuntura é o ceticismo por parte da comunidade científica em relação à presença de efeitos fisiológicos específicos que justifiquem a sua utilização (STUX; HAMMERSCHALG, 2005). Assim, diferente de outros tratamentos que passaram por diversas fases de estudos pré-clínicos e clínicos até serem praticados em humanos, a acupuntura seguiu o caminho inverso, sendo utilizada primeiro no homem para depois ser estudada em animais (MACPHERSON et al., 2007). O resultado disso foi uma vasta

compilação de dados empíricos sobre como utilizar os pontos de acupuntura e sua aplicação na prática clínica.

O tratamento com acupuntura baseia-se na inserção de agulhas em pontos específicos na superfície corporal. Os pontos de acupuntura são conhecidos em chinês com o nome de Shu Xue. A palavra Shu significa passagem ou comunicação, enquanto a palavra Xue significa cavidade ou buraco. Portanto, Shu Xue representa aberturas ou buracos na pele de comunicação ou transporte (WEN, 1985). Os pontos de acupuntura foram descritos através do conhecimento empírico adquirido na prática clínica no decorrer dos séculos. No período neolítico, as pedras Bian (agulhas de pedra) eram utilizadas para puncionar, promover sangria ou drenar abscessos. Com o passar do tempo, percebeu-se que a manipulação em determinados locais do corpo aliviava os desconfortos e/ou curava determinadas doenças (GONGWANG, 2004).

Por meio de observação criteriosa e sistemática, os chineses notaram que havia uma sensação peculiar de entorpecimento, peso ou choque, relacionada com o estímulo dos pontos, a qual chamaram de De Qi. Também perceberam que havia um padrão comum do trajeto de irradiação dessa sensação para regiões distantes do corpo. A sensação de De Qi geralmente percorria pequenos trechos; assim, se o local onde terminava a sensação fosse agulhado havia a transmissão por mais um trecho. Dessa maneira novos pontos foram descritos, e as linhas traçadas entre eles, acabaram delimitando o trajeto dos meridianos (GONGWANG, 2005).

Inicialmente, os pontos não possuíam localização bem definida nem nomes próprios. No terceiro século a.C., descobertas arqueológicas trouxeram os mais antigos registros escritos dos pontos de acupuntura e trajeto de meridianos (LI et al., 2004). A compilação de conhecimentos sobre os pontos e meridianos encontram-se em capítulos de livros chineses como Nei Jing (Estados Combatentes, 475 a.C.) com registros de 160 pontos, Jia Yi Jing (dinastia Jin, 256 d.C.) com localização e indicação de 349 pontos, e no Zheng Jiu Feng Yuan (dinastia Qing, 1817 d.C.) com registros de 361 pontos localizados nos 14 meridianos, que são os aplicados até os dias atuais (GONGWANG, 2004).

Segundo a teoria da medicina tradicional chinesa, os meridianos, que foram traduzidos do termo Jing (que significa via de transporte), formam um sistema que abrange todo corpo e ligam-se uns aos outros em sequência. Eles estabelecem conexões e comunicações entre órgãos e vísceras (Zang-Fu), pele, membros e orifícios, e assim permitem a integração de diferentes partes do corpo de forma a manter uma condição harmoniosa no organismo (WEN, 1985). Por outro lado, não

foi comprovada do ponto de vista anatômico a existência de pontos e meridianos, apesar de alguns autores conseguirem demonstrar parte de seu trajeto através do mapeamento de radioisótopos injetados no corpo e fotografias infravermelhas (STUX; HAMMERSCHALG, 2005). Na pesquisa dos efeitos da acupuntura com o uso de animais, a maioria dos autores utiliza a localização de pontos a partir de anatomia comparada ao humano. Assim, as agulhas de acupuntura são inseridas nos animais em regiões do corpo e estruturas anatômicas análogas às do ser humano (YIN et al., 2008).

No campo da ciência básica, apesar das muitas descobertas realizadas nas últimas décadas, os mecanismos fisiológicos da analgesia por acupuntura não foram completamente elucidados (STUX; HAMMERSCHALG, 2005). A maioria dos pesquisadores concentrou-se em estudar a analgesia produzida pela eletroacupuntura em suas diferentes formas de estímulo (ZHAO, 2008).

## **1.6 Eletroacupuntura**

A eletroacupuntura (EA) consiste na estimulação dos pontos de acupuntura através da passagem de corrente elétrica local. Além da EA, outras técnicas podem ser utilizadas para estimulação dos pontos de acupuntura, tais como acupuntura manual (estímulo manual das agulhas de acupuntura), acupressão (massagem dos pontos de acupuntura), moxabustão (estímulo térmico com calor), fotoestimulação com LASER ou LED (estímulo fotônico dos pontos de acupuntura) e farmacopuntura (injeção de substâncias nos pontos) (ULETT et al., 1998; WHITTAKER, 2004; ZHAO, 2008).

O efeito analgésico da estimulação elétrica tem sido reconhecido há muitos séculos. Em 2.500 a.C., os Egípcios já utilizavam peixes elétricos para tratamento de artrite. A eletroestimulação ganhou mais ênfase no século XX, na década de 60, quando os pesquisadores Melzack e Wall fundamentaram uma teoria (Teoria da Comporta) que dava suporte a estimulação elétrica no auxílio do controle e da modulação da dor por meio do aparelho de estimulação nervosa elétrica transcutânea (TENS) (MILES, 1984). Ao longo dos estudos sobre a utilização do aparelho de TENS surgiram outras técnicas de aplicação da eletroterapia, incluindo a eletroacupuntura (ISHIMARU et al., 1995).

O aparelho de eletroacupuntura é composto por reguladores dos parâmetros do estímulo elétrico que incluem: frequência do estímulo, tipo de estímulo, intensidade do estímulo, largura de pulso, morfologia

do pulso e polarização das saídas. Dentre estes parâmetros os mais estudados são os parâmetros de frequência do estímulo, que são classificados em estímulos de baixa (2 a 15 Hz) e alta frequência (100 Hz).

As séries de experimentos mais abrangentes que investigaram a analgesia induzida pela EA em animais foram realizadas pelos professores Chifuyu Takeshige no Japão e Ji Sheng Han na China. O primeiro, através do estímulo elétrico de baixa frequência em pontos de acupuntura, não apenas descobriu que os pontos falsos de acupuntura (sham) falharam em produzir analgesia, como também apresentou uma explicação plausível para essa falha (TAKESHIGE, 1985). O segundo descobriu que a eletroacupuntura, além de liberar endorfinas, era capaz de induzir a produção de opióides endógenos específicos através da variação da frequência do estímulo (HAN, 2003). Foi demonstrado que estímulos de baixas frequência liberam encefalina, beta-endorfina e endomorfina, que se ligam aos receptores opióides  $\mu$  e  $\delta$  no cérebro e medula; seus efeitos são cumulativos, se prolongam horas ou dias e são revertidos por antagonistas opióides, como a naloxona em dose baixa. Estímulos de alta frequência por sua vez, liberam dinorfina na medula, que se ligam aos receptores  $\kappa$  e têm maior potência analgésica, mas seu efeito é fugaz e não é inibido pela naloxona, a não ser em altas doses (quando a mesma bloqueia indistintamente todos os receptores opióides) (POMERANZ, 1996; HAN, 2004).

## 1.7 Farmacopuntura

A farmacopuntura é outra técnica de estimulação dos pontos de acupuntura que consiste na injeção de fármacos nos acupontos. Alguns autores sugerem que o uso de sub-doses de fármacos com a técnica de farmacopuntura produz um efeito terapêutico similar à dose convencional, com a vantagem de causar menos efeitos colaterais (ZHOU et al., 2005; ZHANG et al., 2008).

A técnica tem demonstrado resultados promissores principalmente na área da medicina veterinária, onde tem sido utilizada como adjuvante na sedação de animais submetidos à procedimento cirúrgicos. Aplicação de sub-dose de acepromazina (0,01mg/kg) no ponto GV1, induziu sedação semelhante à sua dose convencional (0,1 mg/kg) aplicada intramuscularmente em cavalos. Porém, diferentemente da dose convencional, a farmacopuntura não provocou depressão respiratória (LUNA et al., 2008). Em relação à analgesia, a injeção de fitoterápicos

(Hominis placenta ou Ephedra sínica) no acuponto ST36 foi capaz de reduzir significativamente a resposta inflamatória e nociceptiva em ratas submetidas ao modelo de poliartrite induzida por *Mycobacterium tuberculosis* (YEOM et al., 2006). Outros autores também verificaram que uso da apicuntura, aplicação de veneno de abelha nos pontos de acupuntura, também tem mostrado atividade antinociceptiva em modelos animais (KIM et al., 2003). No tratamento de humanos, um autor chinês relatou que a farmacopuntura com 2 mg de morfina no acuponto PC6 (localizado no punho) teve efeito analgésico superior ao uso de 5 mg de morfina endovenosa ou subcutânea, em pacientes com dor torácica relacionada ao infarto agudo do miocárdio (ZHANG et al., 2008).

### **1.8 Bases neurofisiológicas da acupuntura no controle da nocicepção**

A acupuntura pode influenciar a aferência nociceptiva por diversos mecanismos, os quais podem ser didaticamente divididos em 4 tipos: local, segmentar, extra-segmentar e regulatório central (WHITE et al., 2008).

Os efeitos locais da acupuntura são os que apresentam a menor quantidade de estudos na literatura. Inicialmente relacionou-se os efeitos locais da acupuntura à liberação de CGRP pelos terminais dos nociceptores ao redor da região onde a agulha é inserida. Esta liberação foi associada a efeitos de vasodilatação local os quais teriam um papel importante no tratamento de pacientes com xerofthalmia (olho seco) e xerostomia (boca seca) (JANSEN et al., 1989). Posteriormente, verificou-se que o estímulo com EA poderia modular a nocicepção na periferia através da influência de receptores opióides e canabinóides presentes nos terminais dos nociceptores (ZHANG et al., 2005; CHEN et al., 2009).

Recentemente, Goldman et al ( 2010) verificaram a participação de receptores A1 adenosinéricos no efeito antinociceptivo local da acupuntura manual em camundongos. Neste estudo foi demonstrado que há liberação de adenosina no sitio de inserção da agulha de acupuntura. Foi também verificado que a acupuntura não exerce influência no comportamento nociceptivo de animais que não expressam o receptor A1 adenosinérgico. Os mesmos autores demonstraram que a administração de um fármaco agonista de receptores A1 no ponto de acupuntura ST36 (músculo tibial anterior) produz efeito antinociceptivo que mimetiza o tratamento com acupuntura no mesmo ponto. Além

disso, ambos os tratamentos com agonista A1 ou acupuntura só foram efetivos quando realizados no acuponto ipsilateral à pata submetida ao estímulo nociceptivo. Ao final desse estudo foi observado que a pré-administração sistêmica de um fármaco que inibe a conversão da adenosina em seu metabólito aumenta em cerca de três vezes a duração do efeito antinociceptivo da acupuntura (GOLDMAN et al., 2010). Estas contribuições na elucidação da influência do sistema adenosinérgico no efeito da acupuntura promoveram novas perspectivas no contexto da pesquisa experimental em acupuntura.

Os efeitos segmentares da acupuntura estão associados à inibição da atividade de neurônios transmissores da nocicepção em nível medular, segundo mecanismo da teoria da comporta proposta (MELZACK & WALL, 1994). Assim como o TENS, o estímulo com EA poderia despolarizar fibras nervosas de mais grosso calibre, as quais através de interneurônios inibitórios medulares influenciariam a transmissão do estímulo nociceptivo (WHITE et al., 2008).

A ativação das vias inibitórias descendentes da dor estão associadas aos efeitos extra-segmentares da acupuntura. Existem demonstrações experimentais que neurônios de áreas relacionadas às vias descendentes, como a SCP, núcleo magno da rafe e lócus coeruleos, têm sua atividade aumentada por estímulo com eletroacupuntura (LI et al., 2007; SILVA, J. R. et al., 2011). Adicionalmente foi verificado que a lesão do trato lateral da medula espinal, o qual transmite o impulso das vias descendentes, inibe o efeito analgésico da acupuntura (LI et al., 2007).

Estudos com ressonância funcional magnética em humanos demonstram que o tratamento com acupuntura pode modular áreas do sistema límbico, como hipocampo e amígdala (DHOND et al., 2007). A capacidade da acupuntura exercer efeito específico sobre estas áreas encefálicas, relacionadas às emoções e integração da informação nociceptiva, foi denominada de efeito regulatório central. Este efeito sobre o sistema límbico, associado à modulação de outras áreas encefálicas, também faz parte do substrato neurobiológico da acupuntura no tratamento de outros processos não nociceptivos como depressão, náuseas e vômitos, dependência química, entre outros (DHOND et al., 2007).

### **1.9 Modelo de dor pós-operatória**

A dor pós-operatória é uma modalidade comum de dor aguda. Em geral, ocorre em repouso e pode ser exacerbada por tosse, deambulação

e estímulos mecânicos (MOGENSEN et al., 1992; TVERSKOY et al., 1994; APFELBAUM et al., 2003). O tratamento adequado deste tipo de dor aumenta a satisfação do paciente com o tratamento recebido e diminui a morbidade e a mortalidade decorrentes da cirurgia (APFELBAUM et al., 2003).

O estudo da dor pós-operatória tem grande relevância no contexto da pesquisa, pois esta condição além de apresentar alta prevalência na população é um fator de risco para diversas complicações. Na área da pesquisa básica Brennan et al (1996) desenvolveram um modelo animal para o estudo da dor pós-operatória. O modelo consiste na realização de incisão na face plantar do membro posterior, sob anestesia inalatória. Nesse modelo, ratos submetidos à incisão apresentaram hipersensibilidade mecânica na pata operada, que persistiu por vários dias, sendo essa uma das similaridades com o estado pós-operatório em seres humanos (BRENNAN et al., 1996).

Posteriormente trabalhos que investigaram a fisiopatologia deste modelo demonstraram a participação de aminoácidos excitatórios como glutamato e aspartato (ZAHN et al., 2002), ativação das células do corno dorsal e sensibilização central (VANDERMEULEN; BRENNAN, 2000), além de redução do comportamento nociceptivo por injeção sistêmica ou intratecal de morfina (ZAHN et al., 1997). Observou-se também que as fibras A $\delta$  e C continuavam sensibilizadas um dia após a incisão, e que a atividade espontânea dessas fibras poderia contribuir na amplificação da resposta nociceptiva (POGATZKI et al., 2002).

O uso da cupuntura no controle da dor pós-operatória foi popularizada em 1971 quando, em uma viagem à China, o jornalista do The New York Times, James Reston, informou que a acupuntura tinha aliviado o seu desconforto abdominal no pós-operatório de uma apendicectomia. Nos anos seguintes estudos verificaram que o tratamento com acupuntura poderia ser utilizado como um adjuvante que minimiza os efeitos indesejáveis associados à dor pós-operatória (MEISSNER, 2009). Em 1997 foi realizada uma conferência no Estados Unidos para discutir as recomendações para o uso da acupuntura, e a dor pós-operatória foi designada como uma condição de potencial tratamento pela acupuntura, mas que necessitaria de mais estudos para ser recomendada (SCHNYER et al., 2008). Assim, os dados até aqui descritos sugerem que o modelo de dor pós-operatória seja um método adequado no estudo dos efeitos do tratamento com acupuntura, bem como dos mecanismos neurobiológicos que envolvem este efeito.

## 2 JUSTIFICATIVA

A acupuntura é uma modalidade de tratamento não farmacológico comumente utilizada no tratamento de pacientes com queixa de dor. Apesar do uso da acupuntura na prática clínica sugerir que esta modalidade de tratamento seja efetiva no controle da dor, ainda há ceticismo por parte da comunidade científica em relação à recomendação do tratamento com acupuntura. Parte desse ceticismo é justificado pela falta evidências neurobiológicas que estejam especificamente relacionadas ao estímulo com acupuntura.

Diversos pesquisadores já demonstraram que o efeito da acupuntura no tratamento de condições dolorosas está associado à ativação de sistemas endógenos de controle da nocicepção no SNC como o opióide, o serotoninérgico e o noradrenérgico. Porém a forma de ativação destes sistemas ou de outros possíveis mecanismos ainda não está completamente esclarecida.

Recentemente foi demonstrada a participação de receptores periféricos do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual. Este sistema tem sido extensivamente estudado nas últimas décadas devido ao seu envolvimento em diversos processos de modulação da nocicepção, tanto no SNC como periférico. Adicionalmente, poucos trabalhos estudaram a relação do sistema adenosinérgico ao tratamento com eletroacupuntura e nenhum estudou os efeitos periféricos da eletroacupuntura neste sistema.

A dor pós-operatória é uma modalidade de dor prevalente na população mundial e que vem sendo tratada pela acupuntura com bons resultados. Além disso, na área da ciência básica existem modelos animais que reproduzem aspectos fisiopatológicos da dor pós-operatória em humanos.

Neste sentido o presente estudo propõe-se investigar uma possível influência do sistema adenosinérgico sobre os efeitos neurobiológicos da eletroacupuntura, utilizando o modelo dor pós-operatória em camundongos. O estudo também propõe-se a utilizar a técnica de farmacopuntura, com a administração de fármacos agonista e antagonista do sistema adenosinérgico, na metodologia de estudo.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Verificar o efeito da acupuntura na dor pós-operatória e investigar o possível envolvimento do sistema adenosinérgico através da farmacopuntura em camundongos.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

Determinar em camundongos submetidos ou não a incisão plantar:

1- o volume adequado para farmacopuntura, através da injeção de solução de azul de Evans em diferentes volumes.

2- curva dose resposta com a adenosina no acuponto (farmacopuntura) capaz de reduzir hipersensibilidade mecânica, através do teste de von Frey.

3- o melhor tempo de eletroestimulação do acuponto que reduza a hipersensibilidade mecânica, avaliado pelo teste de von Frey.

4- se cafeína administrada sistemicamente influencia no efeito da farmacopuntura realizada com adenosina e da eletroacupuntura, avaliados pelo teste de von Frey.

5- curva dose resposta com DPCPX no acuponto (farmacopuntura) capaz de reverter o efeito produzido pela farmacopuntura com adenosina e pela eletroacupuntura, através do teste de von Frey.

6- se o DPCPX administrado intratecalmente é capaz de reverter o efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura, através do teste de von Frey.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Os experimentos foram conduzidos com camundongos Swiss fêmeas pesando entre 30 e 40g com 90 dias de idade no início dos experimentos. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas (6:00 às 18:00 h) em temperatura de  $20\pm 2$  °C, com acesso à água e comida ad libitum. Todos os animais utilizados foram aclimatizados no laboratório pelo menos uma hora antes do início dos testes, sempre entre 9:00 a 12:00 h. Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) (protocolo 00574), UFSC e seguiram as diretrizes para o cuidado dos animais de laboratório e as normas éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

### **4.2 Delineamento experimental**

Para avaliar o envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito da acupuntura sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar no modelo de dor pós-operatória em camundongos. Os experimentos realizados foram conduzidos em três etapas:

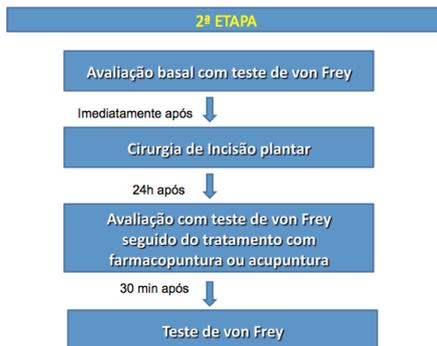
1a ETAPA: Caracterização do método de farmacopuntura adaptado a camundongos.

O método de farmacopuntura foi adaptado do método descrito por Goldman et al. (2010), no qual um fármaco ou solução salina é injetada em um ponto de acupuntura. Esta etapa teve como objetivo a padronização do volume (em microlitros) da solução a ser injetada para delimitar precisamente o acuponto. Nesta etapa cada grupo experimental foi constituído por 5 animais que receberam a injeção em ambos os membros posteriores.

2a ETAPA: Determinação da dose de agonista ou antagonista do sistema adenosinérgico a ser utilizada na farmacopuntura e do tempo de estimulação com acupuntura.

Nesta etapa procurou-se determinar a dose necessária do agonista capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar. Neste sentido diferentes concentrações de adenosina foram testadas, uma vez que não havia referências na literatura do uso da farmacopuntura com adenosina. Além disto foi também determinado qual o tempo de estímulo com eletroacupuntura necessário e adequado para reduzir a hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar.

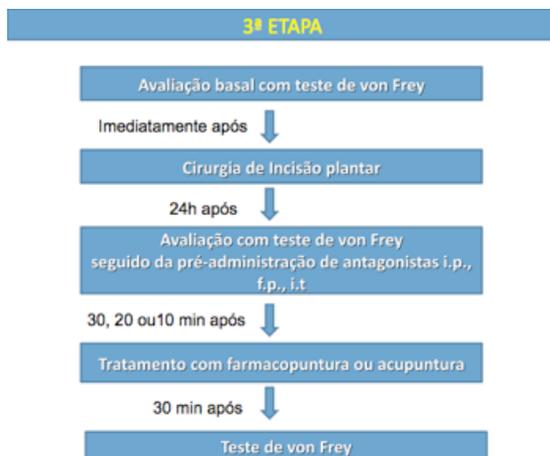
Inicialmente, para obtenção de valores basais, foi realizada uma avaliação da resposta de retirada da pata dos animais através do teste de von Frey, utilizando-se uma carga de 0,4 g. Em seguida os animais foram submetidos ao procedimento de incisão da superfície plantar da pata, exceto no grupo de animais controles (falso-operados). Vinte e quatro horas após a incisão plantar, o teste de von Frey foi novamente realizado para verificar a indução da hipersensibilidade mecânica. Em seguida os animais submetidos à incisão plantar receberam o tratamento com farmacopuntura com adenosina, farmacopuntura com solução salina ou eletroacupuntura. Analisou-se o decurso temporal do efeito dos tratamentos através do teste de von Frey nos tempos de 30, 60, 120 e 180 min (figura 1). Nesta etapa cada grupo experimental foi composto por 8 animais.



**Figura 1.** Esquema de tratamento dos animais na determinação da dose do agonista ou antagonista do sistema adenosinérgico utilizada na farmacopuntura e do tempo de estimulação com eletroacupuntura.

3a ETAPA: Avaliação da influência da pré-administração de antagonistas do sistema adenosinérgico no efeito do tratamento da farmacopuntura com adenosina ou com eletroacupuntura.

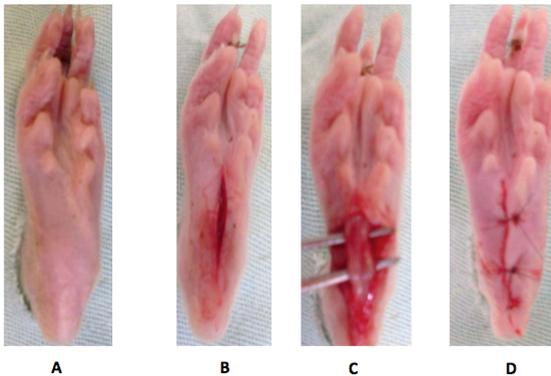
Com o objetivo de investigar a participação do sistema adenosinérgico sobre o efeito do tratamento da farmacopuntura com adenosina ou com acupuntura, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos de incisão plantar e avaliação com teste de von Frey como descritos na etapa 2, porém, antes do tratamento com farmacopuntura ou acupuntura, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de cafeína, farmacopuntura com DPCPX (f.p.) ou DPCPX intratecal (i.t.). Os tempos de 30, 20 e 15 min, respectivamente, de pré-administração foram selecionados conforme procedimento descrito anteriormente (KHANDWALA et al., 1998; LIMA et al., 2010; SAWYNOK et al., 2010). A hipersensibilidade mecânica dos animais foi avaliada 30 minutos após os respectivos tratamentos com os antagonistas (figura 2). Nesta etapa cada grupo experimental foi composto por 8 animais.



**Figura 2.** Esquema de tratamento dos animais na avaliação da influência da pré-administração de antagonistas do sistema adenosinérgico no efeito do tratamento da farmacopuntura com adenosina ou com eletroacupuntura.

### 4.3 Modelo experimental de dor pós-operatória

O modelo de dor pós-operatória foi realizado conforme descrito por Pogatzki e Raja (2003). Os animais foram levemente sedados com 1–2% de isoflurano (100% de O<sub>2</sub>) aplicado através de uma máscara nasal (JACKSON et al., 2010). Após a antisepsia com solução de POLVIDINE-IODO® da pata traseira direita realizou-se uma incisão longitudinal de 5 mm na pele e fáscia da parte plantar da pata com um bisturi de lâmina número 11. A incisão plantar iniciava a 2 mm da extremidade proximal do calcâneo em direção aos dedos da pata. O músculo plantar foi elevado com um fórceps, mantendo a origem e inserção do músculo intacto (Figura 3). Após a incisão, a pele foi suturada com um fio de nylon 8.0 e a sutura coberta com 10% de solução POLVIDINE-IODO®. Um grupo controle recebeu apenas aplicação da sedação com isoflurano sem receber a incisão plantar.



**Figura 3.** Sequência do procedimento cirúrgico realizado no modelo de dor pós-operatória, descrito por Brennan e adaptado por Pogatzky (BRENNAN et al., 1996; POGATZKI; RAJA, 2003). (A) Pata antes da cirurgia; (B) Incisão plantar; (C) Exposição do músculo subplantar com fórceps; (D) Sutura da incisão.

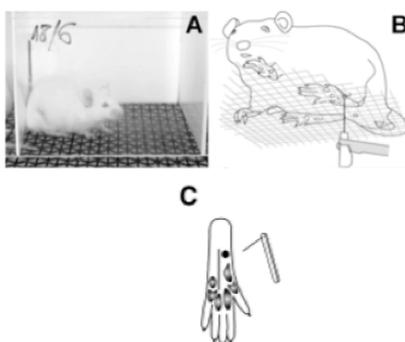
### 4.4 Mensuração da hipersensibilidade mecânica

A mensuração da hipersensibilidade mecânica foi realizada utilizando-se os registros de frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de von Frey de 0,4 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA) (SOMMER; SCHAFERS, 1998; BORTALANZA et al., 2002; BOBINSKI et al., 2011).

Para facilitar a aplicação do filamento na superfície plantar da pata posterior direita, os animais foram aclimatados individualmente por uma hora em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com tampa. A câmara ficava sobre uma plataforma (70 x 40 cm) de tela de arame com malha de 6 mm (Figura 4).

O filamento foi aplicado na pata posterior direita (operada), atendendo alguns critérios:

- Aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento (obtendo-se assim pressão total);
- Avaliação dos animais quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela;
- A resposta de retirada era considerada quando o animal removia totalmente a pata da tela de apoio.



**Figura 4.** Avaliação da hipersensibilidade mecânica. (A) Camundongo sobre a plataforma de fundo gradeado; (B) Esquema de avaliação da hipersensibilidade mecânica com filamento de von Frey; (C) Local adjacente a incisão plantar onde o filamento de von Frey foi aplicado. (Figura adaptada de Brennan et al, 2005)

## 4.5 Tratamento com Farmacopuntura

A farmacopuntura consiste em um procedimento no qual é realizada a injeção de solução salina, água destilada ou de fármacos em um ponto de acupuntura (KIM; KANG, 2010).

### 4.5.1 Determinação do volume de injeção

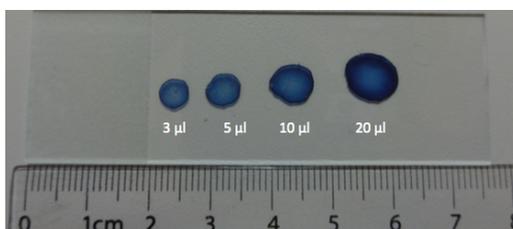
Inicialmente realizou-se a caracterização de um modelo de farmacopuntura que pudesse ser efetuado em camundongos. Para isto os animais foram levemente sedados com isoflurano inalatório (1 a 2%) e, utilizando uma micro-seringa Hamilton de 25 µl conectada a uma agulha de insulina (Med Goldman 13 x 0,45 mm), foi realizada a punção do acuponto SP6 em ambos os membros posteriores dos animais, sendo que primeiro foi puncionado o membro posterior direito e logo em seguida o membro posterior esquerdo. A agulha de insulina foi inserida obliquamente em direção cranial formando um ângulo de 45° com a superfície do membro do animal. A agulha penetrava aproximadamente 3 mm no membro posterior com o orifício do bisel voltado para região lateral do membro puncionado (Figura 5). O procedimento de farmacopuntura durava cerca de 3 minutos por animal e foi realizado por 2 pesquisadores.

Diferentes volumes de azul de Evans foram injetados bilateralmente no acuponto SP6, em 20 animais divididos em 4 grupos. Nos grupos 1, 2, 3 e 4 foram administrados 3, 5, 10 e 20 µl de Azul de Evans, respectivamente (Figura 6). Trinta minutos após a injeção os animais foram sacrificados e ambos os membros posteriores foram dissecados com objetivo de quantificar a área do membro que ficou corada em azul.

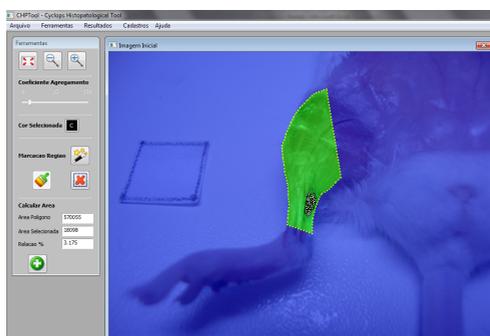
Para quantificação da área corada, os membros posteriores de cada animal foram fotografados, na mesma posição, com uma câmera digital (Sony Cybershot 12MP) posicionada a 10 cm de distância do animal. Utilizou-se o programa Ciclop Histopatological Tool (CHPTool) para determinar o percentual da área corada em azul da região medial da perna do animal (Figura 7).



**Figura 5.** Ilustração do procedimento de farmacopuntura. (A) Seringa de Hamilton conectada à agulha de insulina. (B) Imagem ampliada do local de inserção da agulha no procedimento de farmacopuntura.



**Figura 6.** Representação dos volumes injetados no experimento para a determinação do volume para a farmacopuntura. Diferentes volumes colocados sobre uma lâmina de microscópio.



**Figura 7.** Ilustração da quantificação da área corada pelo azul de Evans analisada pelo programa Ciclop Histopatological Tool (CHPTTool).

#### **4.5.2 Tratamento com Farmacopuntura com adenosina**

A adenosina, agonista não-seletivo dos receptores adenosinérgicos, foi utilizada para tratar os animais submetidos ao modelo de dor pós-operatória.

A adenosina nas doses de 3, 10, 30 e 100 µg/3 µl, sítio (diluídas em veículo, 3 µl) foram injetadas no acuponto SP6 em ambos os membros inferiores dos animais. Um grupo controle de animais foi submetido aos mesmos procedimentos, porém com a injeção de 3 µl de veículo. Para descartar a possibilidade de um efeito inespecífico da farmacopuntura, outro grupo de animais recebeu a farmacopuntura com adenosina em um não-acuponto, localizado na região glútea, na altura da crista ilíaca a 5 mm da linha média (SILVA, M. D. et al., 2011), bilateralmente.

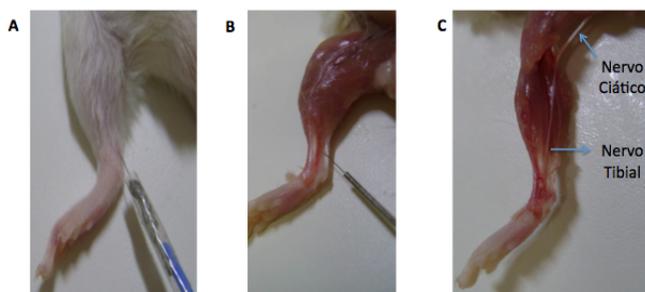
Durante o procedimento de farmacopuntura os animais foram sedados com isoflurano inalatório (1 a 2%) por um tempo total de 10 minutos.

#### **4.6 Tratamento com acupuntura**

O tratamento com acupuntura foi realizado com uma modalidade de estímulo conhecida como eletroacupuntura, que consiste na estimulação elétrica dos pontos de acupuntura através de eletrodos conectados às agulhas de acupuntura.

Os animais foram levemente sedados com 1–2% (100% de O<sub>2</sub>) de isoflurano aplicado através de uma máscara nasal (Figura 9A). Em seguida uma agulha de acupuntura (0,18 x 8 mm) de aço inoxidável foi inserida bilateralmente no acuponto análogo ao SP6 (Figura 8A). Este acuponto está localizado na face medial do terço distal do membro posterior, entre a borda anterior do tendão calcâneo e a margem posterior da tíbia (YIN et al., 2008). A agulha inserida no acuponto SP6 penetra as fibras do músculo flexor dos dedos e a ponta da agulha fica próxima ao nervo tibial (Figura 8B e 8C). Um eletrodo conectava as agulhas de acupuntura ao aparelho de eletroacupuntura NKL-608 (NKL produtos eletrônicos LTDA, Brusque, SC, Brasil) (Figura 13B). Os parâmetros de estímulo com eletroacupuntura seguiram adaptações dos padrões descritos por Lao et al (2004): frequência de 10 Hz, pulso de 0,1 ms, tempos de estimulação de 1, 5, 10 e 30 minutos com corrente contínua, morfologia do pulso assimétrico balanceado e alternando os pólo positivo e negativo dos eletrodos. A intensidade da corrente

utilizada foi a mínima necessária para que se observasse uma leve contração dos músculos flexores dos dedos da pata posterior (geralmente atingida com uma corrente de 2 a 3 mA). Durante todo o período da eletroacupuntura o grupo de animais tratados com eletroacupuntura permaneceu sedado com o isoflurano inalatório (figura 9B). Após o término do tratamento as agulhas foram retiradas e os animais continuaram sendo observados até a recuperação dos efeitos da sedação. Outro grupo de animais utilizado como controle foi submetido a sedação com isoflurano por 10 minutos, porém, não foi realizada a inserção de agulhas de acupuntura.



**Figura 8.** Localização do acuponto SP6. (A) Agulha de acupuntura inserida no acuponto SP6 ligada ao eletrodo do aparelho de eletroacupuntura. (B) Visualização da inserção da agulha de acupuntura após dissecação da pele do animal. (C) Dissecação mais profunda do membro posterior com visualização do trajeto dos nervos ciático e tibial.



**Figura 9.** (A) Administração do isoflurano inalatório nos animais. (B) Visualização do procedimento de eletroacupuntura com os animais sedados com isoflurano à direita e aparelho de eletroacupuntura à esquerda.

## 4.7 Antagonistas do sistema adenosinérgico

### 4.7.1 Cafeína administrada intraperitonealmente

Com o objetivo de evidenciar a participação do sistema adenosinérgico no efeito do tratamento com farmacopuntura com adenosina ou com acupuntura, os animais submetidos ao modelo de dor pós-operatória foram pré-tratados com cafeína (antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgicos, 10 mg/kg, i.p., (SAWYNOK et al., 2010) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 minutos antes do tratamento com farmacopuntura com adenosina (30  $\mu$ g/3 $\mu$ l.) ou eletroacupuntura (10 minutos). Trinta minutos após o término do tratamento a hipersensibilidade mecânica da pata dos animais foi avaliada com teste de von Frey.

### 4.7.2 Farmacopuntura com DPCPX

A possível participação dos receptores periféricos A1 de adenosina no efeito do tratamento com farmacopuntura com adenosina ou com acupuntura foi investigada. Para isto, o DPCPX (antagonista seletivo do receptor A1) foi pré-administrado nos animais 20 minutos

antes do tratamento com farmacopuntura ou eletroacupuntura (LIMA et al., 2010).

O DPCPX nas doses de 0,1, 1 e 10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  (diluídas em veículo, 10  $\mu\text{l}$ ) foram injetadas no acuponto SP6 em ambos os membros inferiores dos animais. Um grupo controle de animais foi submetido aos mesmos procedimentos, porém somente 10  $\mu\text{l}$  de veículo foi injetado.

Com o objetivo de avaliar se a dose utilizada de DPCPX poderia ter efeito sistêmico, outros grupos de animais receberam uma injeção intramuscular de DPCPX (10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ ) no músculo tríceps braquial e 20 minutos após receberam tratamento de farmacopuntura com adenosina ou eletroacupuntura.

#### **4.7.3 DPCPX administrado intratecalmente**

A possível participação dos receptores espinais A1 de adenosina no efeito do tratamento da farmacopuntura com adenosina ou com eletroacupuntura foi investigada. Para isto, os animais foram pré-tratados intratecalmente com DPCPX (3 ou 5  $\mu\text{g}$ , antagonista seletivo do receptor A1) 15 minutos antes do tratamento com farmacopuntura ou eletroacupuntura (KHANDWALA et al., 1998). Os animais submetidos a incisão plantar receberam DPCPX (3 ou 5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ ) ou veículo (5  $\mu\text{L}$ ) intratecalmente. As injeções foram aplicadas conforme o método descrito na literatura (HYLDEN; WILCOX, 1980). Os animais foram contidos manualmente, e uma agulha injetora conectada por uma cânula de polipropileno à uma Microseringa Hamilton de 25  $\mu\text{L}$  foi inserida através da pele e entre as vértebras L5 e L6 no espaço subdural. As injeções foram aplicadas durante um período de 5 segundos aproximadamente.

#### **4.8 Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto**

O teste do campo aberto foi usado para excluir a possibilidade de um possível efeito inespecífico induzido pelo isoflurano inalatório que pudesse estar interferindo no efeito dos tratamentos ou na atividade locomotora dos animais no momento das avaliações. O comportamento dos animais foi verificado conforme descrito previamente por (RODRIGUES et al., 2002). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais, e o número de cruzamentos com todas as patas (crossing) foi contado cumulativamente durante 6 minutos. Três grupos de animais submetidos ao modelo de dor pós-operatória foram tratados

com farmacopuntura com adenosina, eletroacupuntura (ambos recebendo sedação com isoflurano por 10 min) ou somente receberam sedação com isoflurano por 10 minutos. Estes animais foram avaliados no teste de campo aberto 30 minutos após o término da sedação. Outro grupo de animais que passou pelo mesmo procedimento de incisão plantar, e que não recebeu qualquer tipo de tratamento, também foi avaliado.

#### **4.9 Reagentes**

As seguintes substâncias foram utilizadas: adenosina e cafeína (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foram dissolvidas em solução fisiológica 0,9% de cloreto de sódio. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) (Tocris Cookson Inc., Ellisville, EUA) foi dissolvido em solução fisiológica 0,9% de cloreto de sódio com DMSO. A concentração final de DMSO nas soluções não excedeu 20%. Isoflurano líquido foi administrado através de vaporizador (Cristália Ind. São Paulo, Brasil).

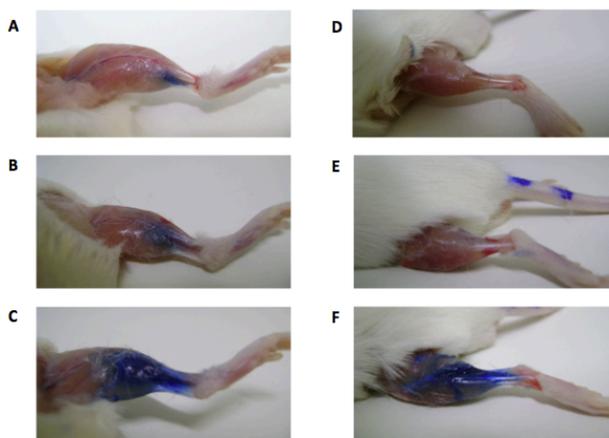
#### **4.10 Análise estatística**

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão das médias (E.P.M.). Para análise estatística dos dados de decurso temporal foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni para múltiplas comparações. A análise estatística dos demais dados foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls. Em todas as análises valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para o cálculo estatístico foi utilizado o programa Graph-Pad Prisma 5 (San Diego, CA, EUA).

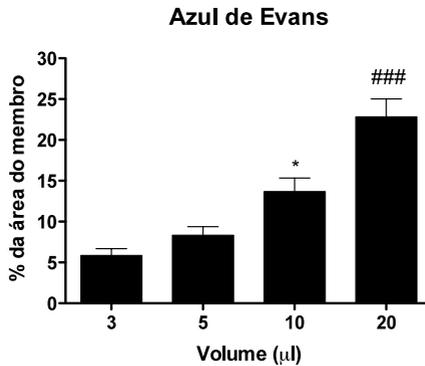
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação do volume utilizado no modelo de farmacopuntura

A injeção de azul de Evans no acuponto SP6 difundiu-se corando parte do membro posterior do animal. A proporção da área corada do membro aumentou de acordo com o aumento do volume injetado, conforme demonstrado nas figuras 10 e 11. O volume de 20  $\mu\text{l}$  difundiu-se para 22,8% da área do membro injetado, enquanto os volumes de 10, 5 e 3  $\mu\text{l}$  difundiram-se para 13,7, 8,3 e 5,8%, respectivamente. A análise estatística revelou uma diferença estatística entre a proporção da área corada pelo volume de 5, 10 e 20  $\mu\text{l}$ , no entanto não ocorreu diferença estatística significativa entre os volumes de 5 e 3  $\mu\text{l}$ . Baseado nestes resultados o volume de 3  $\mu\text{l}$  foi considerado adequado para a continuação dos experimentos com farmacopuntura para as injeções de adenosina e de 10  $\mu\text{l}$  para as injeções de DPCPX.



**Figura 10.** Registros fotográficos das áreas coradas 30 minutos após a injeção de diferentes volumes de azul de Evans no SP6. As figuras A, B e C representam o aspecto medial do membro posterior dos animais injetados com os volumes de 3, 10 e 20  $\mu\text{l}$ , respectivamente. As figuras D, E e F representam o aspecto lateral do membro posterior dos animais injetados com os volumes de 3, 10 e 20  $\mu\text{l}$ , respectivamente.

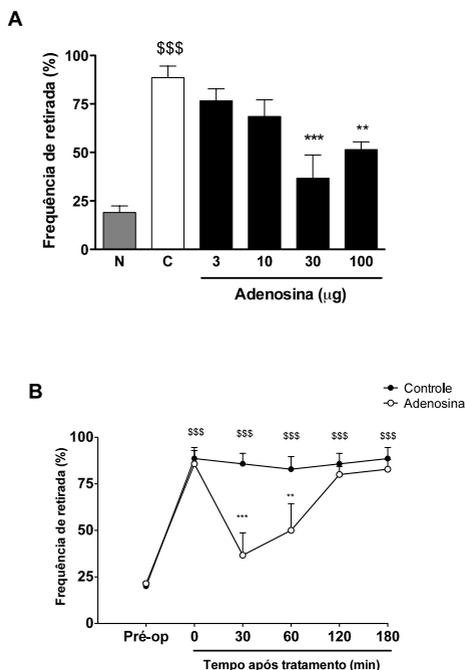


**Figura 11.** Representação gráfica do percentual da área corada com azul de Evans no membro posterior do animal. Cada coluna representa a média de 10 membros posteriores (5 animais) e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância \* $P < 0,05$  comparado ao grupo 5  $\mu\text{l}$ ; ### $P < 0,001$  comparado ao grupo 10  $\mu\text{l}$  ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls.

## 5.2 Efeito da farmacopuntura com adenosina sobre a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor pós-operatória

Os resultados apresentados na figura 12A mostram o efeito de diferentes doses de adenosina, administradas através da farmacopuntura no acuponto SP6, sobre a hipersensibilidade mecânica avaliada 30 min após o tratamento. O uso da adenosina nas doses de 30 e 100  $\mu\text{g}$  inibiu a hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar, com valores de inibição de  $64 \pm 13\%$  e  $49 \pm 8\%$ , respectivamente.

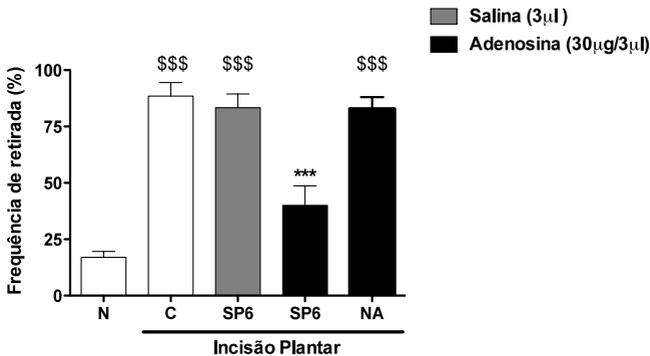
A figura 12B demonstra que a farmacopuntura com adenosina na dose de 30  $\mu\text{g}$  reduziu a hipersensibilidade mecânica dos animais por um período de até 60 minutos após o tratamento. Com base nestes resultados selecionou-se a dose de 30  $\mu\text{g}$  para continuar os demais experimentos propostos neste estudo.



**Figura 12.** (A) Efeito da farmacopuntura com adenosina (3 – 100 µg) sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar em camundongos avaliada trinta minutos após o tratamento. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância: \*\*\* $P < 0,001$  e \*\* $P < 0,01$  comparado ao grupo controle C (farmacopuntura com salina); \$\$\$ $P < 0,001$  comparado ao grupo N (não operado). ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls. (B) Decurso temporal do efeito da farmacopuntura com 30 µg de adenosina. Cada ponto representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância \*\*\* $P < 0,001$  e \*\* $P < 0,01$  comparado ao grupo controle (farmacopuntura com salina); \$\$\$ $P < 0,001$  comparado ao grupo controle com os valores basais do grupo controle antes da cirurgia de incisão plantar (Pré-op), ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

A figura 13 demonstra que a farmacopuntura com salina no acuponto SP6 ou a farmacopuntura com adenosina em um não-acuponto não alteraram a hipersensibilidade mecânica dos animais avaliados 30

minutos após os procedimentos. Por outro lado, a farmacopuntura com adenosina no acuponto SP6 foi capaz de inibir a hipersensibilidade mecânica, com valor de inibição de  $60 \pm 10\%$ .

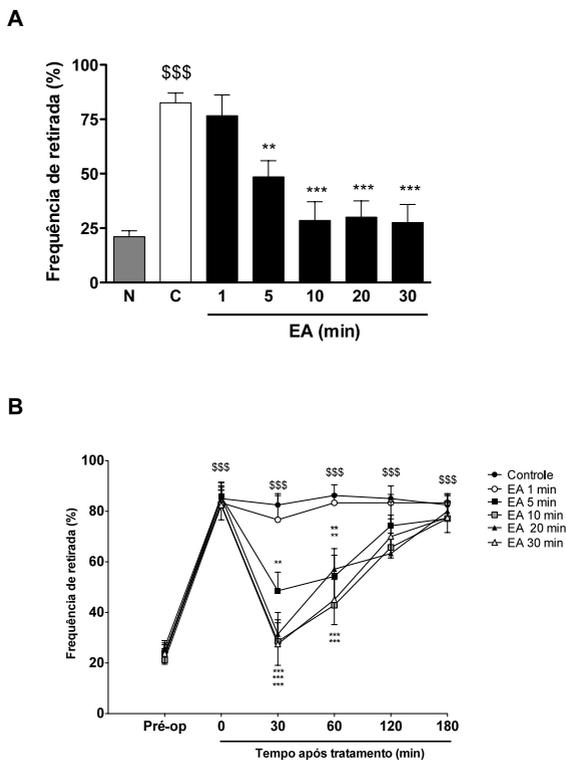


**Figura 13.** Efeito da injeção de salina ou de adenosina no acuponto SP6 e da injeção de adenosina no não acuponto (NA) na hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância: \*\*\* $P < 0,001$  comparado ao grupo controle C (farmacopuntura com salina); \$\$\$ $P < 0,001$  comparado ao grupo N (não operado), ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

### 5.3 Efeito da eletroacupuntura sobre a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor pós-operatória

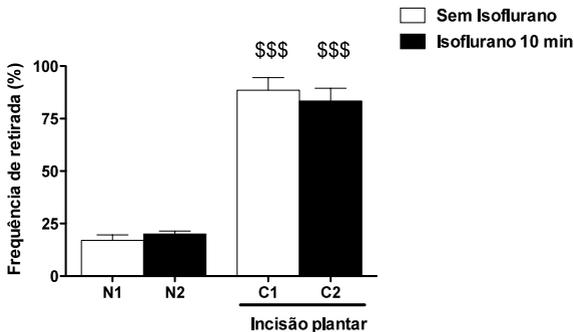
Os resultados apresentados na figura 14A mostram o efeito de diferentes tempos de estimulação com eletroacupuntura sobre a hipersensibilidade mecânica avaliada 30 minutos após o tratamento. Os tempos de estimulação de 5, 10, 20 e 30 minutos inibiram de forma significativa a hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar, com valores de inibição de  $48 \pm 11\%$ ,  $69 \pm 10\%$ ,  $68 \pm 9\%$  e  $70 \pm 10\%$ , respectivamente.

A figura 14B demonstra que a eletroacupuntura com tempos de estimulação de 5, 10, 20 e 30 minutos inibiram de forma significativa a hipersensibilidade mecânica dos animais por um período de até 60 minutos após o tratamento. Com base nestes resultados selecionou-se o tempo de estimulação de 10 minutos para continuar os demais experimentos propostos neste estudo.



**Figura 14.** (A) Efeito do tratamento com diferentes tempos de eletroacupuntura (1 – 30 min) sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar em camundongos, avaliada trinta minutos após o término do tratamento. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância: \*\*\* $P < 0,001$  e \*\* $P < 0,01$  comparado ao grupo controle C (farmacopuntura com salina); \$\$\$ $P < 0,001$  comparado ao grupo N (não operado ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls. (B) Decurso temporal do efeito de diferentes tempos de eletroacupuntura sobre hipersensibilidade mecânica. Cada ponto representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância: \*\*\* $P < 0,001$  e \*\* $P < 0,01$  comparado ao grupo controle (farmacopuntura com salina); \$\$\$ $P < 0,001$  comparado ao grupo controle com os valores basais do grupo controle antes da cirurgia de incisão plantar (Pré-op), ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

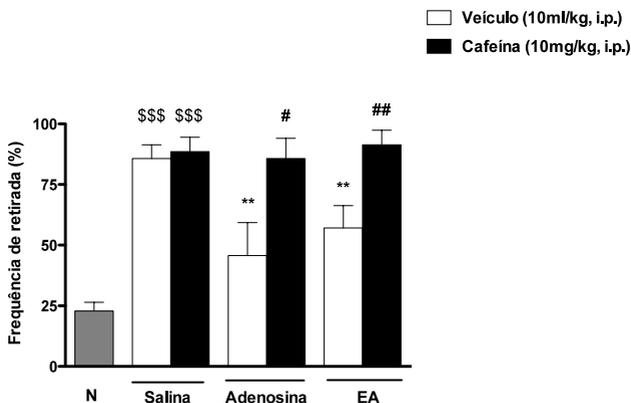
A figura 15 demonstra que a sedação dos animais com isoflurano por 10 minutos não alterou a frequência de retirada da pata dos animais não operados ou operados com o modelo de incisão plantar, avaliados 30 minutos após o término da sedação com isoflurano.



**Figura 15.** Avaliação da influência da sedação com isoflurano por 10 minutos em grupos de animais não operados (N1 e N2) e grupos de animais submetidos à incisão plantar (C1 e C2). A avaliação da hipersensibilidade mecânica ocorreu trinta minutos após o término da sedação com isoflurano. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância \$\$\$ $P < 0,001$  comparado ao grupo N1, ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

#### 5.4 Influência da cafeína no efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura

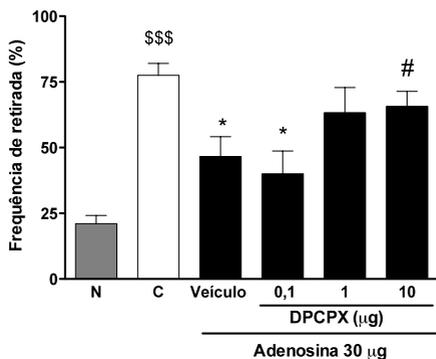
A figura 16 mostra que a pré-administração de cafeína (antagonista de receptores adenosinérgicos, 10 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do tratamento dos animais reverteu de forma significativa o efeito da farmacopuntura com adenosina ou da eletroacupuntura sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar. Observa-se também que não houve diferença estatística entre e os grupos de animais controle (tratados com injeção de salina no acuponto SP6) que receberam pré-administração de veículo ou cafeína, assim não observou-se um efeito “per se” da cafeína sobre a hipersensibilidade mecânica (Figura 16).



**Figura 16.** Influência da pré-administração de cafeína (10 mg/kg, i.p.) sobre o efeito do tratamento da farmacopuntura com adenosina (Adenosina) ou eletroacupuntura (EA) no modelo de dor pós-operatória em camundongos. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância: \*\* $P < 0,01$  comparado ao grupo Salina-veículo; #  $P < 0,05$  comparado ao grupo Adenosina-veículo; ## $P < 0,01$  comparado ao grupo EA-veículo; \$\$\$ $P < 0,001$  comparado ao grupo N (não operado). ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

### 5.5 Influência da injeção do DPCPX no acuponto SP6 sobre o efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura

Os resultados apresentados na figura 17 demonstram que o pré-tratamento dos animais com a injeção de veículo ou DPCPX, na dose de 0,1  $\mu\text{g}$  no acuponto SP6, 20 minutos antes do tratamento da farmacopuntura com adenosina, não interferiu na redução da hipersensibilidade mecânica induzida pela farmacopuntura com adenosina. No entanto, quando a dose de DPCPX injetada no acuponto foi aumentada para 10  $\mu\text{g}$ , observou-se uma reversão significativa do efeito do tratamento com farmacopuntura. Também é observado que a dose de 1  $\mu\text{g}$  de DPCPX injetada no acuponto, apesar de reduzir o efeito da farmacopuntura com adenosina, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo que recebeu veículo e foi tratado com farmacopuntura. Desta forma, selecionou-se a dose de 10  $\mu\text{g}$  de DPCPX para continuar a investigação dos efeitos da injeção deste antagonista de receptor A1 adenosinérgico no acuponto SP6.



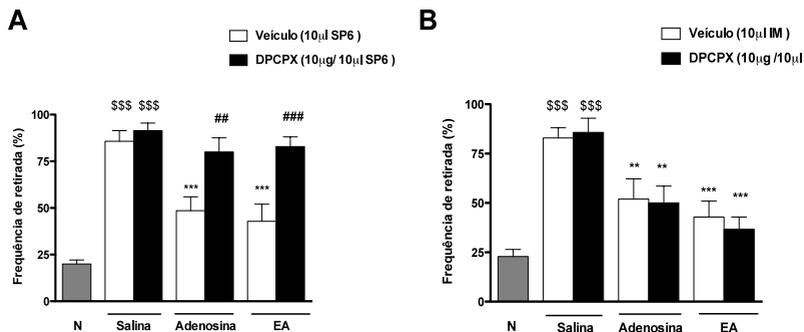
**Figura 17.** Influência da pré-administração de DPCPX em diferentes doses injetado no acuponto SP6, sobre o efeito do tratamento da farmacopuntura com adenosina no modelo de dor pós-operatória. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância: \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle C (farmacopuntura com salina); #  $P < 0,05$  comparado ao grupo Veículo. \$\$\$ $P < 0,001$  comparado ao grupo N (não operado). ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

Os resultados apresentados na figura 18A demonstram que tanto a farmacopuntura quanto a eletroacupuntura reduziram a hipersensibilidade mecânica induzida pela incisão plantar. O pré-tratamento com DPCPX (10  $\mu\text{g}$ ) injetado no acuponto SP6 bilateral, administrado 20 minutos antes do tratamento da farmacopuntura com adenosina ou eletroacupuntura, reverteu de forma significativa os seus efeitos.

Na figura 18B observa-se que o pré-tratamento com DPCPX (10  $\mu\text{g}$ ) no músculo tríceps braquial, administrado 20 minutos antes do tratamento com farmacopuntura com adenosina ou eletroacupuntura, não reverteu o efeito de ambos os tratamentos. Desta forma o DPCPX, administrado em um local distante da região do acuponto SP6 não teve influência nos tratamentos realizados, assim foi afastando um possível efeito sistêmico da dose utilizada do antagonista.

Nos resultados apresentados na figura 18A e 18B não houve diferença estatística entre e os grupos de animais controle (tratados com injeção de salina no acuponto SP6) que receberam pré-administração

com veículo ou com DPCPX 10  $\mu$ g no acuponto SP6, assim, não sendo observado um efeito “per se” do DPCPX sobre a hipersensibilidade mecânica.

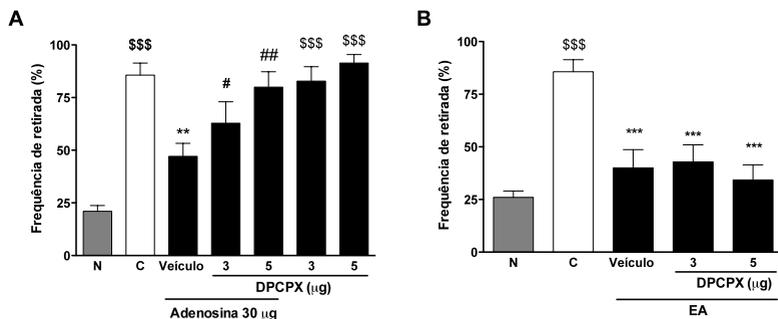


**Figura 18.** (A) Influência da pré-administração de DPCPX (10  $\mu$ g) no acuponto SP6 sobre o efeito do tratamento da farmacopuntura com adenosina (Adenosina) ou eletroacupuntura (EA) no modelo de dor pós-operatória. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância: \*\*\*  $P < 0,001$  comparado ao grupo Salina-veículo; ##  $P < 0,01$  comparado ao grupo Adenosina-veículo; ###  $P < 0,01$  comparado ao grupo EA-veículo; \$\$\$  $P < 0,001$  comparado ao grupo N (não operado). ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls. (B) Pré-administração de DPCPX (10  $\mu$ g) no músculo tríceps braquial dos animais tratados com farmacopuntura com adenosina (Adenosina) ou eletroacupuntura (EA) no modelo de dor pós-operatória. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância: \*\*  $P < 0,01$  comparado ao grupo controle Salina-veículo; \*\*\*  $P < 0,001$  comparado ao grupo controle Salina-veículo. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls.

### 5.6 Influência da injeção intratecal do DPCPX sobre o efeito da farmacopuntura com adenosina e eletroacupuntura

Os resultados apresentados na figura 19A e B demonstram que o pré-tratamento com DPCPX nas doses de 3 ou 5  $\mu$ g (i.t.), administrado 10 minutos antes do tratamento de farmacopuntura com adenosina ou eletroacupuntura, reverteu de forma significativa o efeito da farmacopuntura sobre a hipersensibilidade mecânica, mas, não reverteu o efeito da eletroacupuntura. Nos resultados apresentados na figura 19A

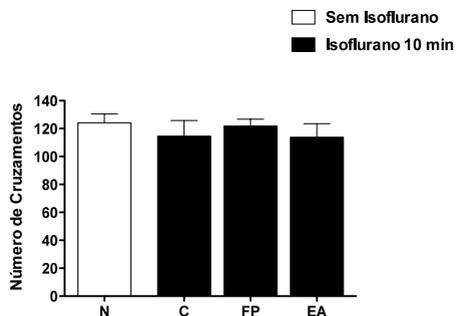
não houve diferença estatística entre o grupo controle ou aqueles que receberam pré-administração de DPCPX (3 e 5  $\mu\text{g}$ , i.t.), assim, não sendo observado um efeito “per se” do DPCPX sobre a hipersensibilidade mecânica.



**Figura 19.** Influência da pré-administração de diferentes doses de DPCPX, injetado intratecal, sobre o efeito do tratamento da farmacopuntura com Adenosina (A) ou eletroacupuntura (EA) (B) no modelo de dor pós-operatória. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância: \*\* $P < 0,01$  comparado ao grupo controle C (farmacopuntura com salina); \*\*\* $P < 0,001$  comparado ao grupo controle C (farmacopuntura com salina); #  $P < 0,05$  e ##  $P < 0,01$  comparados ao grupo Veículo-Adenosina; \$\$\$ $P < 0,001$  comparado ao grupo N (não operado). ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls.

### 5.7 Isoflurano e tratamentos com farmacopuntura e eletroacupuntura não modificam a atividade locomotora dos camundongos

Podemos observar pela figura 20 que o isoflurano não foi capaz de afetar a atividade locomotora no campo aberto quando comparamos o grupo que não recebeu isoflurano com os grupos que receberam isoflurano.



**Figura 20.** Avaliação da atividade locomotora, evidenciada pelo número de cruzamentos no teste do campo aberto, em camundongos submetidos a incisão plantar que não receberam isoflurano (N) ou que receberam isoflurano e foram tratados. Os grupos Controle com farmacopuntura com salina no SP6 (C); Farmacopuntura com adenosina no SP6 (FP); Eletroacupuntura (EA), receberam 10 min de isoflurano inalatório e foram avaliados 30 minutos após. Cada coluna representa a média de 8 animais e as barras indicam o E.P.M. ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls.



## 6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram, pela primeira vez, que a farmacopuntura com adenosina e a eletroacupuntura, ambas realizadas no acuponto SP6, reduzem a hipersensibilidade mecânica característica do modelo de dor pós-operatória em camundongos. Os achados mais relevantes encontrados foram: (1) a eletroacupuntura e a farmacopuntura com adenosina no acuponto SP6 causaram redução significativa da hipersensibilidade mecânica (efeito antinociceptivo) observada no modelo de dor pós-operatória, sendo este efeito revertido pelo pré-tratamento sistêmico com a cafeína; (2) o efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura também foi revertido pela pré-administração de DPCPX (antagonista seletivo do receptor A1 adenosinérgico) no acuponto SP6; (3) O efeito da farmacopuntura com adenosina, mas não o da eletroacupuntura, foi revertido pela pré-administração intratecal de DPCPX. Estes dados sustentam a hipótese que o receptor A1 adenosinérgico, localizado periféricamente, está envolvido na analgesia induzida pela eletroacupuntura.

A acupuntura é um método terapêutico que, nas últimas três décadas, tem sido utilizado de forma crescente no tratamento de pacientes com dor (HAN, 2011). Um dos motivos da procura pela acupuntura é a preocupação com os efeitos colaterais relatados com uso de fármacos, principalmente os anti-inflamatórios e analgésicos (SUN et al., 2008). Dentre as medidas não farmacológicas para o tratamento da dor, a acupuntura tem se mostrado um método seguro, com baixos índices de efeitos colaterais e custo-efetivo (WITT et al., 2009). Uma das dificuldades encontradas na prática clínica da acupuntura é o ceticismo de parte da comunidade científica em relação à presença de efeitos fisiológicos específicos que justifiquem a utilização do método (ERNST et al., 2011). Neste contexto, o presente estudo buscou contribuir na elucidação dos mecanismos neurobiológicos de controle da dor relacionados ao estímulo com acupuntura.

No presente estudo optou-se pela utilização do modelo de dor pós-operatória em camundongos, pois este mimetiza o componente fisiopatológico presente na dor pós-operatória em humanos (BRENNAN, 2005). Estima-se que oitenta e seis por cento dos pacientes operados queixam-se de dor pós-operatória moderada ou severa e com o melhor manejo desta modalidade de dor, poder-se-ia evitar complicações clínicas, como a evolução para dor crônica (APFELBAUM et al., 2003). Além disso, apesar de estudos clínicos

demonstrarem que acupuntura pode ser usada como um tratamento complementar na dor pós-operatória (SUN et al., 2008), poucos trabalhos pré-clínicos investigaram o efeito da acupuntura na dor pós-operatória.

Neste estudo utilizou-se o modelo de dor pós-operatória, descrito por Pogatzki e Srinivasa (2003), que induziram um quadro de hiperalgesia caracterizado por hipersensibilidade mecânica e térmica da pata operada, quantificadas através dos testes de von Frey e Hargreaves, respectivamente. Os autores do modelo verificaram que os camundongos submetidos à incisão plantar iniciavam um quadro de hiperalgesia mecânica a partir da segunda hora após o procedimento, atingindo a intensidade máxima entre seis e vinte quatro horas. É importante ressaltar que a hipersensibilidade mecânica reduziu gradualmente a partir do segundo dia e foi completamente abolido no quinto dia após a incisão plantar (Pogatzki e Srinivasa, 2003). Assim, no presente estudo foi selecionado o tempo de vinte e quatro horas após a incisão da pata para iniciar os diferentes tipos de tratamento e observar a influência destes tratamentos sobre a hipersensibilidade mecânica. Neste estudo, os animais submetidos à incisão plantar apresentaram aumento significativo da frequência de retirada da pata quando submetidos ao estímulo pelo filamento de von Frey em comparação aos animais falso operados (que receberam somente sedação), o que confirma que o modelo de dor pós incisão foi reproduzido adequadamente.

Em relação ao estudo dos mecanismos neurobiológicos da acupuntura no controle da dor, há uma extensa literatura que demonstra a influência da acupuntura sobre o sistema opióide no sistema nervoso central (ULETT et al., 1998; HAN, 2004). Há menor quantidade de trabalhos que demonstram os efeitos da acupuntura sobre sistemas não-opióides no sistema nervoso central (ZHAO, 2008). Ainda mais escassa é a literatura que descreve os efeitos da acupuntura sobre o sistema nervoso periférico e são recentes os trabalhos mostrando o efeito dos sistemas opióide, canabinóide e adenosinérgico na periferia (ZHANG et al., 2005; GOLDMAN et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

Inicialmente, com base nestas observações, o presente estudo buscou caracterizar um método que pudesse investigar a relação entre sistema adenosinérgico e os efeitos da acupuntura sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pelo modelo de dor pós-operatória em camundongos. Utilizou-se o método de farmacopuntura (injeção de fármacos no ponto de acupuntura) com adenosina com o objetivo de mimetizar o estímulo do agulhamento no ponto de acupuntura. Selecionou-se a adenosina, pois foi demonstrado no trabalho de

Goldman et al. (2010) que o estímulo mecânico com agulha de acupuntura no acuponto ST36 de camundongos promovia aumento da concentração de local de adenosina, avaliado através de microdiálise da região do ponto de acupuntura.

A técnica de farmacopuntura é utilizada na medicina oriental principalmente para injeção de ervas medicinais. Alguns pesquisadores utilizam técnica de farmacopuntura com a apamina (substância derivada do veneno de abelha) para mimetizar uma modalidade terapêutica chamada de apicuntura (aplicação de picadas de abelhas nos pontos de acupuntura com fins terapêuticos) (KIM et al., 2003). Outros autores demonstraram que a farmacopuntura utilizando o CCPA, agonista A1 do sistema adenosinérgico, produz efeito antinociceptivo em camundongos semelhante ao estímulo com acupuntura (GOLDMAN et al., 2010).

Uma característica comum entre os estudos realizados com farmacopuntura é o volume de solução injetada que geralmente é de 20 microlitros, independentemente de o estudo ser em camundongos ou ratos (KIM et al., 2003; KANG et al., 2011). Com base nesta informação, foi investigado inicialmente se o volume de vinte microlitros poderia ser excessivo para os camundongos, difundindo-se para uma região muito maior do que a de um ponto de acupuntura. Assim, diferentes volumes de azul de Evans foram injetados no acuponto SP6 dos camundongos. O corante azul de Evans tem como característica corar os tecidos biológicos e também apresentar alta afinidade por proteínas plasmáticas. Quando administrado sistemicamente via corrente sanguínea, todo o animal fica com coloração azulada; quando injetado localmente, sem atingir a corrente sanguínea, apenas a região da aplicação se torna corada (WOODDELL et al., 2010).

O resultado da injeção de 3 e 5 microlitros do azul de Evans no acuponto SP6 foi uma distribuição da área corada em azul na região em torno do acuponto. O volume de 10 microlitros também distribuiu-se em torno do acuponto, porém a sua área de dispersão no membro foi significativamente maior do que as dos volumes de 3 e 5 microlitros. Por outro lado, o volume de 20 microlitros corou uma área muito maior do que a região do acuponto, este volume difundiu-se para quase 25 % da área do membro posterior do animal e, além disso, corou parte região lateral da perna.

Com base nas características de distribuição dos volumes injetados, selecionou-se o volume de 10 microlitros para injeção de DPCPX (antagonista seletivo dos receptores adenosinérgico do tipo A1) e o volume de 3 microlitros para injeção de adenosina (agonista não

seletivo dos receptores adenosinérgicos) para dar seguimento aos experimentos. Desta forma, com a pré-administração de um volume maior na injeção do antagonista, pode-se esperar que a injeção do agonista não se disperse por uma área maior que a obtida pela administração do antagonista. Assim, os volumes de 3 ou 5 microlitros tendem a ser mais adequados para farmacopuntura com drogas agonistas e o volume de 10 microlitros parece ser adequado na farmacopuntura com drogas antagonistas. Estes volumes são considerados adequados no sentido de proporcionar a avaliação de um possível efeito específico da administração de fármacos na região do acuponto. Observou-se também que a injeção do volume de 20 microlitros foi excessiva por corar uma área extensa do membro do animal, e este fator poderia prejudicar a especificidade do estímulo farmacológico na região do acuponto, apesar deste volume ser o mais utilizado na literatura (KIM et al., 2003; YOON et al., 2009).

O acuponto SP6 foi selecionado para o estudo porque é um acuponto indicado para tratamento de distúrbios dolorosos, seu agulhamento é de fácil execução e estudos prévios mostraram que este ponto possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (MA et al., 2010; SILVA, M. D. et al., 2011). O SP6 (sigla alfa-numérica da OMS para o acuponto Spleen 6) tem o nome chinês de Sanyinjiao, que significa encontro dos três yin, e ele tem essa denominação porque é nele que os três meridianos yin da perna se encontram. Este ponto pertence ao meridiano do zu tai yin, que possui 21 pontos (LI et al., 2004). O SP6 localiza-se no terço distal da região medial da perna e estimula fibras do músculo flexor longo dos dedos, que é inervado pelo nervo tibial, e para localização deste ponto nos camundongos utiliza-se anatomia comparativa com os pontos do ser humano (YIN et al., 2008). Outro motivo pela seleção deste ponto foi o fato da região plantar da pata (local onde foi feita a incisão) ser predominantemente inervada por ramos do nervo tibial e que o estímulo do SP6 poderia ter influência sobre este nervo.

Uma vez que a utilização do volume de 3 microlitros foi caracterizada como sendo ideal para farmacopuntura com adenosina, questionou-se qual seria a dose de adenosina necessária para reduzir a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor pós-operatória. Como não havia na literatura relatos de farmacopuntura com adenosina, realizou-se um experimento com a utilização de doses crescentes de adenosina para verificar o efeito sobre a hipersensibilidade mecânica dos animais. Foram injetadas doses de 3, 10, 30 e 100 µg de adenosina bilateralmente no acuponto SP6. As doses de 30 e 100 µg reduziram

significativamente a hipersensibilidade mecânica em comparação aos animais injetados com salina no acuponto, com valores de inibição de  $64 \pm 13\%$  e  $49 \pm 8\%$ , respectivamente (figura 12A). A dose de  $30 \mu\text{g}$  foi selecionada para continuar os experimentos porque foi a dose que apresentou maior valor de inibição. O decurso temporal após a farmacopuntura com adenosina mostrou que o efeito sobre a hipersensibilidade mecânica permaneceu por até 1h após o tratamento (figura 12B).

O papel analgésico da adenosina ainda é controverso na literatura, pois existe divergência nos resultados dos estudos que investigaram seu efeito em condições dolorosas. O trabalho de Goldman et al. (2010) demonstrou, através da utilização do HPLC (high performance liquid chromatography), que a estimulação com acupuntura manual do acuponto ST36 em camundongos promoveu aumento significativo da quantidade de adenosina na região do acuponto ST36 trinta minutos após o estímulo. Além disso, este estímulo correlacionou-se à redução da hipersensibilidade mecânica nos animais. Por outro lado, o estudo de Sawynok et al (1998) mostrou que a adenosina co-administrada com formalina na pata de ratos aumentou a resposta nociceptiva dos animais. Uma das explicações para esta divergência são as diferentes ações dos receptores de adenosina. Enquanto o receptor A1 está relacionado a antinocicepção, os receptores A2A e A3 estão relacionados a pró-nocicepção (HABIB et al., 2008). A adenosina é um agonista não seletivo de receptores adenosinérgicos que possui maior afinidade para os receptores A1 adenosinérgicos, porém em altas doses, as moléculas de adenosina podem ligar-se em maior quantidade aos receptores A2A e A3 adenosinérgicos (ZYLKA, 2011). A dose de  $30 \mu\text{g}$  de adenosina utilizada neste estudo, que inibiu a hipersensibilidade mecânica dos animais, provavelmente ativa os receptores A1 adenosinérgicos, que estão associados a efeitos analgésicos (SAWYNOK, 1998).

Outro achado relevante deste estudo foi a verificação de que tanto a injeção de solução salina no acuponto SP6 (bilateral) quanto a farmacopuntura com adenosina em um não acuponto (localizado no glúteo do animal) não alteraram a hipersensibilidade mecânica dos animais (figura 13). Estes achados são importantes porque não só demonstram a especificidade do efeito induzido pelo estímulo do acuponto SP6 como também a necessidade da presença da adenosina para estabelecimento desse efeito. Além disto, como não houve diferença estatística de hipersensibilidade mecânica entre o grupo de animais que recebeu salina no acuponto e o grupo não tratado, foi

definido que os grupos controles para os experimentos seguintes receberiam injeção de solução salina no acuponto SP6 (bilateral).

Quando comparado a dados da literatura observa-se que no estudo de Goldman et al. (2010) a injeção de salina no acuponto também não foi capaz de alterar a hipersensibilidade mecânica dos animais nos modelos de dor inflamatória e neuropática. Outros autores também utilizaram a injeção de solução salina nos acupontos estudados como tratamento para grupos controles em estudos de farmacopuntura com veneno de abelha. Utilizando o modelo de formalina, Kim et al (2003) demonstraram que a farmacopuntura com 20 µl de salina no acuponto ST36 - localizado no músculo tibial anterior - não alterou a nocicepção dos ratos estudados e nem a expressão medular de c-Fos (marcador de atividade celular). Kang et al (2011) também demonstraram que o uso de farmacopuntura com 20 µl de salina não alterou a nocicepção induzida pelo teste de formalina em camundongos.

Por outro lado, alguns autores referem que o uso de injeção de salina nos acupontos pode potencializar o efeito da acupuntura (WANG; KAIN, 2002; STRUDWICK et al., 2007). Uma das justificativas é que a presença de um fluido no ponto de acupuntura pode manter uma estimulação mecânica mais prolongada na região do acuponto e, por isso, prolongar ou aumentar o efeito da acupuntura. Assim, um dos fatores que pode ser determinante na farmacopuntura com salina é o volume de líquido injetado. Volumes maiores, de 1 a 3 ml (1000 a 3000 µl), poderiam efetivamente prolongar o estímulo mecânico; porém volumes menores, de 3 a 100 µl, não seriam capazes de produzir este efeito. A idéia do presente estudo foi realizar uma estimulação química no acuponto e avaliar especificamente o efeito da interação dos fármacos no local do acuponto, desta forma optou-se pela utilização de pequenos volumes de solução. Com a injeção de pequenos volumes de salina no acuponto não houve alteração da hipersensibilidade mecânica induzida pelo modelo de dor pós-operatória.

Como um dos objetivos do estudo foi investigar os mecanismos periféricos da eletroacupuntura - que necessita do estímulo de duas regiões para fechar a corrente elétrica - a farmacopuntura com adenosina ou DPCPX foi realizada bilateralmente. Em alguns estudos a eletroacupuntura é realizada com a estimulação de dois acupontos diferentes, geralmente os acupontos estimulados são SP6 e ST36 (HAN, 2003; ZHAO, 2008). Porém não utilizou-se esta metodologia, tendo em vista que uma das hipóteses do nosso grupo de pesquisa é a de que existe especificidade dos pontos de acupuntura em relação aos seus mecanismos neurobiológicos. Desta forma, o estímulo de acupontos

distintos ao mesmo tempo não permitiria a avaliação de uma possível atividade intrínseca específica de cada ponto. Para confirmação desta hipótese de especificidade, novos estudos que comparem os efeitos neurobiológicos da estimulação isolada ou conjunta de diferentes acupontos são necessários.

No presente estudo foi demonstrado que a hipersensibilidade mecânica dos animais submetidos à incisão plantar foi reduzida através da estimulação com eletroacupuntura do acuponto SP6 por 5, 10, 20 ou 30 min, mas não por 1 min, (figura 14A). Além disto, pôde-se observar que a duração do efeito da eletroacupuntura perdurou por até 60 min após a estimulação (figura 14B). Assim, para a continuidade dos experimentos seguintes foi selecionado o tempo de estimulação de 10 min, uma vez que este tempo apresentou efeito semelhante às estimulações de 20 e 30 minutos, com a vantagem de manter o animal exposto por tempo menor à sedação com isoflurano.

Comparando com dados da literatura, a duração do efeito da eletroacupuntura e da farmacopuntura no modelo de dor pós-operatória em camundongos foi próxima a da morfina, a qual é um dos fármacos mais utilizados na abordagem desta modalidade de dor. Pogatsky et al. (2003) demonstraram que a administração subcutânea de 10 mg/kg de morfina em camundongos submetidos à incisão plantar reduz a hipersensibilidade mecânica por 90 minutos. Por outro lado, neste mesmo estudo a dose de 3 mg/kg de morfina não tem efeito sobre a hipersensibilidade mecânica. Desta forma, foi verificado que são necessárias doses consideradas altas de morfina para controle da nocicepção no modelo de dor pós-operatória. Outro dado relevante é a demonstração, no modelo de dor inflamatória por carragenina, que animais tratados com eletroacupuntura tem a duração do efeito antinociceptivo prolongada quando uma dose sub-ativa de morfina é associada ao tratamento (ZHANG et al., 2004). Assim, pode-se sugerir que a eletroacupuntura pode ser utilizada com um adjuvante no tratamento da dor pós-operatória, tanto pelo auxílio no controle da nocicepção quanto pelo seu potencial de reduzir a necessidade de opióides.

Poucos estudos realizam a avaliação de diferentes tempos de estimulação na investigação do efeito do tratamento com acupuntura em modelos experimentais. Geralmente o tempo de 30 min é utilizado na maioria dos trabalhos, muitas vezes com a justificativa de que este é o tempo padrão utilizado nas sessões de acupuntura na prática clínica (CHEN et al., 2009). Alguns estudos, que utilizaram o tempo de estimulação de 10 min ou 15 min, obtiveram efeitos anti-inflamatório e

anti-hiperalgésico em modelos animais de peritonite e de dor pós-operatória (OLIVEIRA; PRADO, 2000; SILVA, M. D. et al., 2011).

Em relação ao parâmetro de eletroacupuntura, selecionou-se a frequência de 10 Hz com 0.1ms de largura de pulso, baseado no estudo realizado por Lao et al (2004). Este estudo foi o único encontrado na revisão bibliográfica que investigou o efeito de diferentes frequências e larguras de pulso, tratando os animais após a indução da nocicepção com a injeção de carragenina na pata (LAO et al., 2004). O resultado do estudo acima citado demonstrou que a frequência de 10 Hz com largura de pulso de 0.1 ms obteve maior atividade anti-hiperalgésica quando comparado ao estímulo com outros parâmetros. Por outro lado, é importante ressaltar que a maioria dos estudos experimentais em animais utiliza os parâmetros de 2 ou 100 Hz, descritos por Han (2003). No trabalho de revisão de seus experimentos, Han demonstrou que estímulos de baixa frequência (2 a 10 Hz) diferem dos estímulos de alta frequência (100 Hz) através da liberação de beta-endorfina e encefalina no primeiro e dinorfina no segundo (HAN, 2003). Apesar destes estudos de Han terem sido feitos com o tratamento com acupuntura antes da indução da nocicepção em ratos e com uma intensidade de corrente elétrica considerada alta, a maior parte dos autores e praticantes da acupuntura utiliza os parâmetros de 2 ou 100 Hz em pesquisas e na prática clínica. Posteriormente, foi demonstrado que este modelo explicativo de Han poderia não se aplicar às metodologias que utilizam o tratamento com acupuntura após a indução da dor, pois não foi observado a atividade de receptores opióides relacionados à dinorfina com estímulos de alta frequência (ZHANG et al., 2004). Como o presente trabalho estudou o tratamento com eletroacupuntura e farmacopuntura após a indução da dor foi optado por seguir os parâmetros de eletroacupuntura de Lao, e não os parâmetros descritos por Han.

É importante mencionar que no presente estudo os procedimentos de eletroacupuntura e de farmacopuntura foram realizados através da utilização da sedação dos animais com isoflurano inalatório (1 a 2%). Este tipo de sedação é utilizada por alguns autores para realização da eletroacupuntura, haja vista que os animais permanecem imóveis e por isso não retiram ou deslocam a agulha. Outros autores optam pelo modelo de contenção dos animais para que eles permaneçam imóveis durante o tratamento (KUNG et al., 2011; LI et al., 2011). Contudo, há controvérsias na utilização dos dois modelos, sendo que no primeiro poder-se-ia considerar que o isoflurano tenha interferência nos efeitos da acupuntura e, no segundo, que a contenção dos animais poderia gerar

um efeito de estresse que influenciaria o resultado da pesquisa. De fato, Medeiros et al. 2003 demonstraram que a contenção de ratos para realização de tratamento com eletroacupuntura interfere na expressão de c-fos (marcador de atividade neuronal) em áreas da medula espinal, do tronco encefálico e do encéfalo relacionadas a modulação do estímulo nociceptivo. No presente estudo foi realizada a comparação de animais que receberam isoflurano inalatório por 10 minutos com animais que não receberam o anestésico, em relação ao comportamento nociceptivo – avaliado pelo teste de retirada da pata com o filamento de von Frey - e à atividade locomotora dos animais – avaliada pelo teste de campo aberto. Verificou-se que o uso de isoflurano inalatório durante 10 min não interferiu no comportamento nociceptivo e nem na atividade locomotora dos animais avaliados 30 min após o término da sua administração (figuras 15 e 20). Assim, optou-se pela sedação dos animais para execução dos experimentos.

Após a avaliação do efeito do tratamento da farmacopuntura com adenosina ou com eletroacupuntura no modelo de dor pós-operatória, investigou-se a influência da pré-administração de antagonistas de receptores adenosinérgicos sobre estes tratamentos. Inicialmente, verificou-se que tanto a farmacopuntura com adenosina quanto a eletroacupuntura tiveram seu efeito sobre a hipersensibilidade mecânica revertido com a pré-administração sistêmica de cafeína (figura 16). Isto pode indicar que tanto a adenosina administrada no ponto de acupuntura quanto a eletroacupuntura estão reduzindo a hipersensibilidade mecânica dos animais através da ativação de receptores adenosinérgicos, uma vez que a cafeína administrada na forma sistêmica bloqueia receptores adenosinérgicos centrais e periféricos (SAWYNOK, 2011). Esse efeito já era esperado em relação ao tratamento com farmacopuntura, pois como a adenosina é um agonista de receptores adenosinérgicos provavelmente tem seus efeitos influenciados pela pré-administração de um antagonista do mesmo sistema. Em relação a eletroacupuntura, este dado vai ao encontro de pesquisadores chineses que verificaram que o efeito analgésico da eletroacupuntura em ratos foi revertido pela cafeína (LIU et al., 1994).

Outro dado que corrobora com a inibição do efeito da acupuntura com uso de cafeína são as observações realizadas por Zylka (2010) e Sawynok (2011), que sugerem que a cafeína poderia influenciar o tratamento com acupuntura devido as demonstrações experimentais da participação de receptores adenosinérgicos no efeito antinociceptivo da acupuntura (ZYLKA, 2010; SAWYNOK, 2011).

O papel da cafeína no tratamento de condições dolorosas ainda é controverso na literatura, pois há condições nas quais a cafeína auxilia no tratamento, como no caso da sua associação com analgésicos para cefaléia (SAWYNOK, 2011). Por outro lado, há dados mostrando que o uso concomitante da cafeína à amitriptilina ou à oxycarbamazepina reverte o efeito analgésico destas drogas no tratamento de modelos de dor neuropática (ESSER; SAWYNOK, 2000; SAWYNOK et al., 2010). Recentemente, foi demonstrado que a cafeína administrada na água de beber dos animais reverteu o efeito antinociceptivo do paracetamol no modelo da formalina (SAWYNOK; REID, 2012). Com base nestes dados, associado ao fato da cafeína ser um dos ingredientes mais comuns na dieta da população mundial (HECKMAN et al., 2010), perguntar sobre o consumo de cafeína a pacientes que procuram tratamento com acupuntura para condições dolorosas pode ser um importante fator no plano terapêutico. Para confirmação desta hipótese, novos estudos devem ser conduzidos com enfoque nesta temática.

Após a verificação que a pré-administração da cafeína - antagonista não seletivo dos receptores A1 e A2A adenosinérgicos - reverteu o efeito da farmacopuntura com adenosina e da acupuntura, investigou-se a influência da pré-administração de DPCPX (antagonista seletivo de receptores A1) sobre este efeito. Primeiramente foi estudado a influência do bloqueio de receptores A1 periféricos na região do ponto de acupuntura. Para executar este experimento, optou-se pela pré-administração do DPCPX através método de farmacopuntura (bilateral). Como não havia dados na literatura sobre doses de antagonistas A1 injetados em pontos de acupuntura, diferentes doses de DPCPX foram testadas, e verificou-se que dose de 10 µg foi capaz de reverter os efeito da farmacopuntura com adenosina sobre a hipersensibilidade mecânica (Figura 17A). Também foi observado que esta mesma dose do antagonista A1 reverteu o efeito da eletroacupuntura (figura 18B). Para investigar a hipótese de que o DPCPX estivesse bloqueando somente o receptores da região do ponto de acupuntura, foi pré-administrada a mesma dose 10 µg no músculo tríceps braquial (localizados no membros anteriores) dos camundongos. Observou-se que a esta administração do DPCPX não influenciou o efeito da farmacopuntura com adenosina ou da acupuntura. Assim, o resultado destes experimentos sugerem que os receptores A1 periféricos, no local do ponto de acupuntura, estejam mediando a redução da hipersensibilidade mecânica induzida pelo tratamento com eletroacupuntura.

A participação dos receptores A1 no efeito anti-nociceptivo da acupuntura manual já foi demonstrada com utilização de animais knock

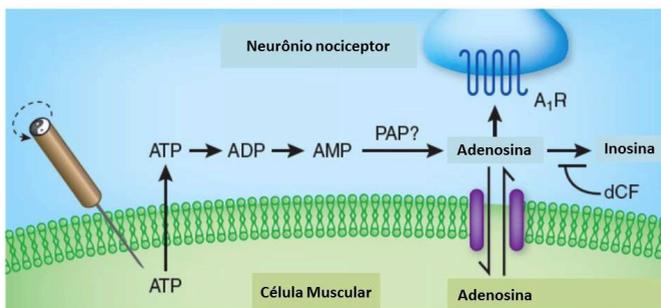
out para o receptor A1 (animais que não expressam o gene A1). O mesmo grupo de pesquisa também verificou que os receptores A2A não estavam envolvidos no efeito da acupuntura (GOLDMAN et al., 2010). Na literatura, o envolvimento de receptores A1 no efeito da eletroacupuntura não havia sido investigado. Assim, o presente estudo demonstrou pela primeira vez a participação destes receptores no efeito da eletroacupuntura. Adicionalmente, a abordagem farmacológica através da técnica farmacopuntura, na investigação do efeito periférico da eletroacupuntura também é inédita na literatura.

A utilização da técnica de farmacopuntura apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos, como por exemplo: o custo e uma provável maior especificidade. O uso de animais knock out é uma forma elegante de mostrar o envolvimento de receptores específicos, no entanto a obtenção destes animais com alteração de expressão gênica é de alto custo e a alteração pode não apresentar seletividade para receptores periféricos, além do que os animais podem modificar o seu padrão de resposta à nocicepção por meio de processos adaptativos (SAWYNOK, 1998; GOLDMAN et al., 2010). Outra técnica que investiga os receptores periféricos é a injeção de fármacos no local onde ocorre o estímulo nociceptivo. Com esta técnica verificou-se que a co-administração de carragenina com DPCPX na pata de ratos aumenta o comportamento nociceptivo dos animais (LIMA et al., 2010). Também já foi demonstrado que a pré-administração de antagonistas opióides e canabinóides na pata de animais submetidos ao modelo de injeção plantar de carragenina reverteu o efeito anti-nociceptivo da eletroacupuntura. Esta última técnica, apesar de mostrar os efeitos periféricos da acupuntura sobre o terminal periférico do nociceptor no local da lesão, não avalia os efeitos sobre a região submetida ao estímulo com acupuntura.

Tendo como contexto as informações acima expostas, pode-se levantar duas hipóteses sobre o mecanismo periférico da eletroacupuntura: 1- Ativação de receptores localizados no terminal periférico do nociceptor no local da lesão. Considerando esta hipótese, alguns autores sugerem que estímulos com eletroacupuntura podem ativar queratinócitos ou monócitos que liberam canabinóides ou opióides endógenos no terminal nociceptor do local da lesão (ZHANG et al., 2005; STEIN; LANG, 2009; ZHANG et al., 2010); 2- Ativação de receptores localizados no terminal periférico do neurônio sensorial na região do ponto de acupuntura. Em anuência com esta hipótese, Zylka (2010) sugere que o estímulo com acupuntura manual (movimentos de rotação da agulha) pode causar micro-traumas nas fibras musculares na

região do ponto de acupuntura. Estes micro-traumas causariam liberação de ATP do músculo que seria convertido em adenosina, que por sua vez se ligaria nos receptores A1 de neurônios sensoriais primários presentes no local onde realizou-se o estímulo (figura 21).

Os resultados do presente estudo sugerem que os efeitos periféricos obtidos com o estímulo com eletroacupuntura estejam relacionados principalmente à segunda hipótese. Pois, durante a eletroacupuntura ocorre uma pequena contração muscular no local onde agulha de acupuntura está inserida. Esta contração, que ocorre durante todo período de estimulação, também poderia causar micro-trauma muscular e resultar no aumento da concentração extra-celular de adenosina no local do acuponto. Por outro lado, não podemos descartar completamente a primeira hipótese, porque não foi utilizada uma metodologia que verificasse o bloqueio específico de outros receptores (ex. opióide, canabinóide) no local onde o estímulo nociceptivo foi evocado (incisão plantar).



**Figura 21.** Esquema ilustrando o estímulo da agulha de acupuntura (à esquerda) estimulando a célula muscular, o ATP sendo liberado da célula e convertido em adenosina, que pode ligar-se ao receptor A1 adenosinérgico (A1R) do neurônio nociceptivo. (Adaptado de ZYLKA, 2010)

Outro fenômeno que ocorre na região dos pontos de acupuntura é a alteração na expressão de receptores periféricos. Foi demonstrado que há aumento de receptores TRPV1 após estímulo de pontos de acupuntura e que este aumento não ocorre quando não-acupontos são estimulados. Como o receptor TRPV1 tem uma importante função de modulação da atividade dos neurônios sensoriais periféricos, o efeito local da acupuntura poderia influenciar a transmissão e estímulo

nociceptivo dos neurônios periféricos para os neurônios centrais (ABRAHAM et al., 2011).

Uma abordagem alternativa dos efeitos periféricos da acupuntura é a injeção de ectonucleostidases nos pontos de acupuntura. Estas substâncias podem regular a concentração extra-celular de algumas moléculas produzidas pelo estímulo com acupuntura e, conforme sugerido por Zylka 2011, poder-se-ia realizar um procedimento denominado “Papupuntura”. O procedimento consiste em injetar um ectonucleosídeo chamado de PAP (fosfatase ácida prostática) nos pontos de acupuntura. Esse ectonucleosídeo, ao aumentar a conversão local do ATP em adenosina, poderia potencializar o efeito da acupuntura (ZYLKA, 2011). Ainda há muito para se investigar sobre os efeitos periféricos da acupuntura, contudo a técnica de farmacopuntura, demonstrada no presente estudo e sugerida por outros autores, mostra-se uma estratégia promissora no contexto da pesquisa e prática da acupuntura.

Diferentemente do resultado verificado com o bloqueio dos receptores A1 periféricos, foi observado que o bloqueio dos receptores A1 espinais reverteu somente o efeito da farmacopuntura com adenosina. Esta observação foi demonstrada através da utilização das doses de doses de 3 e 5 µg de DPCPX, administrado pela via intratecal, as quais reverteram o efeito antinociceptivo causado pelo tratamento com farmacopuntura, porém não modificaram o efeito da eletroacupuntura (Figuras 19A e B).

Avaliando a influencia do DPCPX intratecal sobre o efeito da farmacopuntura com adenosina, notou-se que, além da ativação dos receptores adenosinérgicos periféricos pela administração local da adenosina, receptores espinais parecem estar participando na redução da hipersensibilidade mecânica proporcionada pela farmacopuntura. Cabe ressaltar, que a administração da mesma dose de adenosina realizada em um não-acuponto (na região glútea) não teve efeito sobre o modelo de pós-operatória, excluindo assim um possível efeito sistêmico da droga. Uma das hipóteses que pode estar relacionada a este efeito da farmacopuntura com adenosina é um fenômeno, descrito por Funez et al (2008), conhecido como teleantagonismo. Os experimentos de Funez et al. demonstraram que a ação anti-nociceptiva induzida por morfina administrada na pata de ratos, submetidos a um modelo de dor inflamatória por injeção plantar de prostaglandina, foi revertida pela administração de antagonistas opióides pela via intratecal. No presente estudo, um resultado semelhante foi observado quando o antagonista de receptor A1 reverteu o efeito da adenosina administrada no ponto de

acupuntura. Apesar do fenômeno de teleantagonismo ainda não ter sido completamente compreendido, sugere-se que uma modulação local do neurônio nociceptivo primário possa espalhar-se por toda célula através de propriedades farmacodinâmicas ainda não bem elucidadas deste grupo de neurônios (FUNEZ et al., 2008).

Diferentemente da farmacopuntura com adenosina, a eletroacupuntura não teve seu efeito revertido pela pré-administração intratecal de DPCPX. No entanto, não foi encontrado na literatura trabalhos que tenham utilizado antagonistas adenosinérgicos na via intratecal no estudo dos efeitos da acupuntura. Em relação as doses do antagonista, é provável que administração de 3 e 5 µg de DPCPX intratecal tenham bloqueado efetivamente os receptores 1 adenosinérgicos espinais, pois estas doses também já foram utilizadas em outros trabalhos nos quais observou-se o bloqueio destes receptores (KHANDWALA et al., 1998; DE SARRO et al., 1999).

Apesar de já ter sido demonstrada a participação do sistema adenosinérgico, através dos receptores A1 espinais, no controle da nocicepção induzida pelo modelo de dor pós-operatória (ZAHN et al., 2007), outros sistemas também estão envolvidos neste controle (BRENNAN et al., 2005). Assim, o tratamento com eletroacupuntura realizado no presente estudo pode ter influenciado outros sistemas de controle da nocicepção espinal, como por exemplo, o serotoninérgico, noradrenérgico e opioidérgico. Estes sistemas estão envolvidos nas vias inibitórias descendentes da dor, as quais são ativadas pela eletroacupuntura (LI et al., 2007).

Em resumo, os resultados aqui apresentados fornecem evidências da participação do sistema adenosinérgico no efeito da eletroacupuntura. Estes experimentos são os primeiros a demonstrar que a eletroacupuntura inibe a hipersensibilidade mecânica induzida pelo modelo de dor pós-operatória em camundongos. Além disso, através da técnica de farmacopuntura, demonstrou-se que os receptores A1 adenosinérgicos periféricos estão envolvidos no efeito da eletroacupuntura.

## 7 CONCLUSÕES

O presente estudo permite concluir que:

- 1- A acupuntura reduz a hipersensibilidade mecânica induzida pelo modelo de dor pós-operatória e a técnica de farmacopuntura evidencia a participação do sistema adenosinérgico no efeito da acupuntura;
- 2- Os volumes de 3 e 5 microlitros são adequados na administração de fármacos agonistas enquanto que o de 10 microlitros é adequado para fármacos antagonistas na aplicação da técnica de farmacopuntura em camundongos;
- 3- A farmacopuntura com adenosina reduz, de forma dose dependente, a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor pós-operatória;
- 4- A eletroacupuntura reduz, de forma tempo dependente, a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor pós-operatória, sendo que o tempo de 10 min mostra-se adequado;
- 5- A cafeína (i.p) reverte o efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura no modelo de dor pós-operatória;
- 6- O DPCPX (antagonista dos receptores A1 adenosinérgicos), administrado no local do acuponto, reverte o efeito da farmacopuntura com adenosina e da eletroacupuntura no modelo de dor pós-operatória;
- 7- O DPCPX, administrado intratecalmente, reverte o efeito da farmacopuntura com adenosina, mas não altera o efeito da eletroacupuntura;

Em síntese, os resultados apresentados neste trabalho demonstram a participação dos receptores A1 adenosinérgicos periféricos no efeito da eletroacupuntura. Além disso, o conjunto dos dados fornece novas evidências neurobiológicas que fundamentam o uso da acupuntura no tratamento da dor pós-operatória na prática clínica.



## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, T. S. *et al.* TRPV1 expression in acupuncture points: response to electroacupuncture stimulation. **J Chem Neuroanat**, v. 41, n. 3, p. 129-36. 2011.
- APFELBAUM, J. L. *et al.* Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. **Anesth Analg**, v. 97, n. 2, p. 534-40, table of contents. 2003.
- BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84. 2009.
- BESSION, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-5. 1999.
- BOBINSKI, F. *et al.* Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337-48. 2011.
- BORTALANZA, L. B. *et al.* Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 453, n. 2-3, p. 203-8. 2002.
- BRENNAN, T. J. Incisional sensitivity and pain measurements: dissecting mechanisms for postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 103, n. 1, p. 3-4. 2005.
- BRENNAN, T. J. *et al.* Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, v. 64, n. 3, p. 493-501. 1996.
- BRENNAN, T. J. *et al.* Mechanisms of incisional pain. **Anesthesiol Clin North America**, v. 23, n. 1, p. 1-20. 2005.
- BRUNDEGE, J. M.; DUNWIDDIE, T. V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. **Adv Pharmacol**, v. 39, p. 353-91. 1997.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 1, p. 58-86. 2006.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev**, v. 87, n. 2, p. 659-797. 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: past, present and future. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 1, p. 3-8. 2009.

CAHILL, C. M. *et al.* Influence of calcium on the release of endogenous adenosine from spinal cord synaptosomes. **Life Sci**, v. 53, n. 6, p. 487-96. 1993.

CHEN, L. *et al.* Endogenous anandamide and cannabinoid receptor-2 contribute to electroacupuncture analgesia in rats. **J Pain**, v. 10, n. 7, p. 732-9. 2009.

DE SARRO, G. *et al.* Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on audiogenic seizure-sensible DBA/2 mice. **Eur J Pharmacol**, v. 371, n. 2-3, p. 137-45. 1999.

DHOND, R. P. *et al.* Neuroimaging acupuncture effects in the human brain. **J Altern Complement Med**, v. 13, n. 6, p. 603-16. 2007.

DORFER, L. *et al.* A medical report from the stone age? **Lancet**, v. 354, n. 9183, p. 1023-5. 1999.

ERNST, E. *et al.* Acupuncture: does it alleviate pain and are there serious risks? A review of reviews. **Pain**, v. 152, n. 4, p. 755-64. 2011.

ESSER, M. J.; SAWYNOK, J. Caffeine blockade of the thermal antihyperalgesic effect of acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 399, n. 2-3, p. 131-9. 2000.

FEOKTISTOV, I.; BIAGGIONI, I. Adenosine A2B receptors. **Pharmacol Rev**, v. 49, n. 4, p. 381-402. 1997.

FREDHOLM, B. B. *et al.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 527-52. 2001.

FREDHOLM, B. B. *et al.* Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 1, p. 83-133. 1999.

FUNEZ, M. I. *et al.* Teleantagonism: A pharmacodynamic property of the primary nociceptive neuron. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 49, p. 19038-43. 2008.

GOLDMAN, N. *et al.* Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 883-8. 2010.

GONGWANG, L. **Meridianos e Pontos de Acupuntura - Tratado Contemporâneo de Acupuntura e Moxibustão**. São Paulo: Rocca, 2004.

GONGWANG, L. **Tratado Contemporâneo de Acupuntura e Moxibustao**. São Paulo: CEIMEC, 2005.

HABIB, A. S. *et al.* Phase 2, double-blind, placebo-controlled, dose-response trial of intravenous adenosine for perioperative analgesia. **Anesthesiology**, v. 109, n. 6, p. 1085-91. 2008.

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

HAN, J. S. Acupuncture and endorphins. **Neurosci Lett**, v. 361, n. 1-3, p. 258-61. 2004.

HAN, J. S. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy. **Pain**, v. 152, n. 3 Suppl, p. S41-8. 2011.

HECKMAN, M. A. *et al.* Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **J Food Sci**, v. 75, n. 3, p. R77-87. 2010.

HYLDEN, J. L.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol**, v. 67, n. 2-3, p. 313-6. 1980.

ISHIMARU, K. *et al.* Analgesic effects induced by TENS and electroacupuncture with different types of stimulating electrodes on deep tissues in human subjects. **Pain**, v. 63, n. 2, p. 181-7. 1995.

JANSEN, G. *et al.* Acupuncture and sensory neuropeptides increase cutaneous blood flow in rats. **Neurosci Lett**, v. 97, n. 3, p. 305-9. 1989.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10. 2001.

KANG, S. Y. *et al.* Chemical stimulation of the ST36 acupoint reduces both formalin-induced nociceptive behaviors and spinal astrocyte activation via spinal alpha-2 adrenoceptors. **Brain Res Bull**, v. 86, n. 5-6, p. 412-21. 2011.

KAPTCHUK, T. J. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. **Ann Intern Med**, v. 136, n. 5, p. 374-83. 2002.

KELLY, D. J. *et al.* Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities. **Can J Anaesth**, v. 48, n. 10, p. 1000-10. 2001.

KHANDWALA, H. *et al.* Inhibition of strychnine-allodynia is mediated by spinal adenosine A(1)- but not A(2)-receptors in the rat. **Brain Research**, v. 808, n. 1, p. 106-109. 1998.

KIM, H. W. *et al.* Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. **J Vet Med Sci**, v. 65, n. 3, p. 349-55. 2003.

KIM, J.; KANG, D. I. A descriptive statistical approach to the Korean pharmacopuncture therapy. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 3, n. 3, p. 141-9. 2010.

KUNG, H. H. *et al.* Electroacupuncture analgesia, stress responses, and variations in sensitivity in rats anesthetized with different sub-MAC anesthetics. **Eur J Pain**, v. 15, n. 6, p. 600-7. 2011.

LAO, L. *et al.* Electro-acupuncture attenuates behavioral hyperalgesia and selectively reduces spinal Fos protein expression in rats with persistent inflammation. **J Pain**, v. 2, n. 2, p. 111-7. 2001.

- LAO, L. *et al.* A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats. **Brain Res**, v. 1020, n. 1-2, p. 18-29. 2004.
- LI, A. *et al.* Electroacupuncture suppresses hyperalgesia and spinal Fos expression by activating the descending inhibitory system. **Brain Res**, v. 1186, p. 171-9. 2007.
- LI, A. *et al.* Serotonin Receptor 2A/C Is Involved in Electroacupuncture Inhibition of Pain in an Osteoarthritis Rat Model. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 619650. 2011.
- LI, S. M. *et al.* **Acupuntura e Medicina Tradicional Chinesa**. Florianópolis: Instituto de Ensino e Pesquisa em Medicina Tradicional Chinesa, 2004.
- LIMA, F. O. *et al.* Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 506-15. 2010.
- LIU, C. *et al.* [Involvement of purines in analgesia produced by weak electro-acupuncture]. **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 19, n. 1, p. 59-62, 54. 1994.
- LIU, X. J. *et al.* Intraplantar injection of glutamate evokes peripheral adenosine release in the rat hind paw: involvement of peripheral ionotropic glutamate receptors and capsaicin-sensitive sensory afferents. **J Neurochem**, v. 80, n. 4, p. 562-70. 2002.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7. 2008.
- LUNA, S. P. *et al.* Comparison of pharmacopuncture, aquapuncture and acepromazine for sedation of horses. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, n. 3, p. 267-72. 2008.
- MA, Y. X. *et al.* A comparative study on the immediate effects of electroacupuncture at Sanyinjiao (SP6), Xuanzhong (GB39) and a non-meridian point, on menstrual pain and uterine arterial blood flow, in

primary dysmenorrhea patients. **Pain Med**, v. 11, n. 10, p. 1564-75. 2010.

MACPHERSON, H. *et al.* **Acupuncture Research**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2007.

MEDEIROS, M. A. *et al.* c-Fos expression induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 12, p. 1673-84. 2003.

MEISSNER, W. The role of acupuncture and transcutaneous-electrical nerve stimulation for postoperative pain control. **Curr Opin Anaesthesiol**, v. 22, n. 5, p. 623-6. 2009.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-9. 1965.

MILES, J. Electrical stimulation for the relief of pain. **Ann R Coll Surg Engl**, v. 66, n. 2, p. 108-12. 1984.

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

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355-474. 2002.

MOGENSEN, T. *et al.* Epidural clonidine enhances postoperative analgesia from a combined low-dose epidural bupivacaine and morphine regimen. **Anesth Analg**, v. 75, n. 4, p. 607-10. 1992.

OLIVEIRA, R.; PRADO, W. A. Anti-hyperalgesic effect of electroacupuncture in a model of post-incisional pain in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 8, p. 957-60. 2000.

POGATZKI, E. M. *et al.* Characterization of Adelta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. **J Neurophysiol**, v. 87, n. 2, p. 721-31. 2002.

POGATZKI, E. M.; RAJA, S. N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 1023-7. 2003.

POMERANZ, B. Scientific research into acupuncture for the relief of pain. **J Altern Complement Med**, v. 2, n. 1, p. 53-60; discussion 73-5. 1996.

POON, A.; SAWYNOK, J. Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. **Pain**, v. 74, n. 2-3, p. 235-45. 1998.

RIBEIRO, J. A. *et al.* Participation of adenosine receptors in neuroprotection. **Drug News Perspect**, v. 16, n. 2, p. 80-6. 2003.

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

SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **Eur J Pharmacol**, v. 347, n. 1, p. 1-11. 1998.

SAWYNOK, J. Adenosine and ATP receptors. **Handb Exp Pharmacol**, n. 177, p. 309-28. 2007.

SAWYNOK, J. Caffeine and pain. **Pain**, v. 152, n. 4, p. 726-9. 2011.

SAWYNOK, J.; LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 5, p. 313-40. 2003.

SAWYNOK, J.; REID, A. Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhances nociception in the formalin test via activation of a purinergic p2X receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 330, n. 2-3, p. 115-21. 1997.

SAWYNOK, J.; REID, A. R. Caffeine inhibits antinociception by acetaminophen in the formalin test by inhibiting spinal adenosine A(1) receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 674, n. 2-3, p. 248-54. 2012.

SAWYNOK, J. *et al.* Caffeine reverses antinociception by oxcarbazepine by inhibition of adenosine A1 receptors: insights using knockout mice. **Neurosci Lett**, v. 473, n. 3, p. 178-81. 2010.

SCHNYER, R. *et al.* Society for Acupuncture Research: 2007 conference report: "The status and future of acupuncture research: 10

years post-NIH Consensus Conference". **J Altern Complement Med**, v. 14, n. 7, p. 859-60. 2008.

SILVA, J. R. *et al.* Analgesia induced by 2- or 100-Hz electroacupuncture in the rat tail-flick test depends on the activation of different descending pain inhibitory mechanisms. **J Pain**, v. 12, n. 1, p. 51-60. 2011.

SILVA, M. D. *et al.* Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 217946. 2011.

SOMMER, C.; SCHAFERS, M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. **Brain Res**, v. 784, n. 1-2, p. 154-62. 1998.

STEIN, C.; LANG, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 1, p. 3-8. 2009.

STRUDWICK, M. W. *et al.* Point injection as an alternative acupuncture technique--an exploratory study of responses in healthy subjects. **Acupunct Med**, v. 25, n. 4, p. 166-74. 2007.

STUX, G.; HAMMERSCHALG, R. **Acupuntura Clínica - Bases Científicas**. São Paulo: Manole, 2005.

SUN, Y. *et al.* Acupuncture and related techniques for postoperative pain: a systematic review of randomized controlled trials. **Br J Anaesth**, v. 101, n. 2, p. 151-60. 2008.

SWANSON, T. H. *et al.* Adenosine A1 receptors are located predominantly on axons in the rat hippocampal formation. **J Comp Neurol**, v. 363, n. 4, p. 517-531. 1995.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377-91. 2007.

TVERSKOY, M. *et al.* Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia. **Anesth Analg**, v. 78, n. 2, p. 205-9. 1994.

ULETT, G. A. *et al.* Electroacupuncture: mechanisms and clinical application. **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 2, p. 129-38. 1998.

VANDERMEULEN, E. P.; BRENNAN, T. J. Alterations in ascending dorsal horn neurons by a surgical incision in the rat foot. **Anesthesiology**, v. 93, n. 5, p. 1294-302; discussion 6A. 2000.

WANG, S. M.; KAIN, Z. N. P6 acupoint injections are as effective as droperidol in controlling early postoperative nausea and vomiting in children. **Anesthesiology**, v. 97, n. 2, p. 359-66. 2002.

WEN, T. S. **Acupuntura Clássica Chinesa**. São Paulo: Editora Cultrix, 1985.

WHITE, A. *et al.* **An Introduction to Western Medical Acupuncture**. London: Churchill Livingstone, 2008.

WHITTAKER, P. Laser acupuncture: past, present, and future. **Lasers Med Sci**, v. 19, n. 2, p. 69-80. 2004.

WHO. **Acupuncture: Review and Analysis of Reports on Controlled Clinical Trials**. 2003.

WITT, C. M. *et al.* Pragmatic randomized trial evaluating the clinical and economic effectiveness of acupuncture for chronic low back pain. **Am J Epidemiol**, v. 164, n. 5, p. 487-96. 2006.

WITT, C. M. *et al.* Safety of acupuncture: results of a prospective observational study with 229,230 patients and introduction of a medical information and consent form. **Forsch Komplementmed**, v. 16, n. 2, p. 91-7. 2009.

WOODDELL, C. I. *et al.* Use of Evans blue dye to compare limb muscles in exercised young and old mdx mice. **Muscle Nerve**, v. 41, n. 4, p. 487-99. 2010.

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Ann Intern Med**, v. 140, n. 6, p. 441-51. 2004.

YEOM, M. J. *et al.* Anti-arthritic effects of Ephedra sinica STAPF herb-acupuncture: inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation and adjuvant-induced polyarthritis. **J Pharmacol Sci**, v. 100, n. 1, p. 41-50. 2006.

YIN, C. S. *et al.* A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Res Vet Sci**, v. 84, n. 2, p. 159-65. 2008.

YOON, S. Y. *et al.* Acupoint stimulation with diluted bee venom (apipuncture) potentiates the analgesic effect of intrathecal clonidine in the rodent formalin test and in a neuropathic pain model. **J Pain**, v. 10, n. 3, p. 253-63. 2009.

ZAHN, P. K. *et al.* Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 86, n. 5, p. 1066-77. 1997.

ZAHN, P. K. *et al.* Mechanisms for pain caused by incisions. **Reg Anesth Pain Med**, v. 27, n. 5, p. 514-6. 2002.

ZAHN, P. K. *et al.* Adenosine A1 but not A2a receptor agonist reduces hyperalgesia caused by a surgical incision in rats: a pertussis toxin-sensitive G protein-dependent process. **Anesthesiology**, v. 107, n. 5, p. 797-806. 2007.

ZHANG, G. G. *et al.* Involvement of peripheral opioid mechanisms in electroacupuncture analgesia. **Explore (NY)**, v. 1, n. 5, p. 365-71. 2005.

ZHANG, J. *et al.* Electroacupuncture increases CB2 receptor expression on keratinocytes and infiltrating inflammatory cells in inflamed skin tissues of rats. **J Pain**, v. 11, n. 12, p. 1250-8. 2010.

ZHANG, R. X. *et al.* Involvement of opioid receptors in electroacupuncture-produced anti-hyperalgesia in rats with peripheral inflammation. **Brain Res**, v. 1020, n. 1-2, p. 12-7. 2004.

ZHANG, X. Y. *et al.* [Clinical observation on injection of small dose of morphine into Neiguan (PC 6) for treatment of chest pain in the patient with acute myocardial infarction]. **Zhongguo Zhen Jiu**, v. 28, n. 9, p. 642-4. 2008.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Prog Neurobiol**, v. 85, n. 4, p. 355-75. 2008.

ZHOU, W. *et al.* Afferent mechanisms underlying stimulation modality-related modulation of acupuncture-related cardiovascular responses. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 3, p. 872-80. 2005.

ZYLKA, M. J. Needling adenosine receptors for pain relief. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 783-4. 2010.

ZYLKA, M. J. Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. **Trends Mol Med**, v. 17, n. 4, p. 188-96. 2011.