

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA SHIZUE NATUME
THAINA CALDEIRAS WATANABE

**O EFEITO ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ACUPUNTURA EM RATOS
DEPENDE DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS NA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL**

CURITIBA

2017

PRISCILA SHIZUE NATUME
THAINA CALDEIRAS WATANABE

**O EFEITO ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ACUPUNTURA EM RATOS
DEPENDE DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS NA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina TCC II como requisito parcial à conclusão do curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Fischer
Co-orientadora: Ms. Glauca Tobaldini

CURITIBA
2017

RESUMO

O efeito antinociceptivo induzido pela acupuntura depende de estruturas do Sistema Nervoso Central e, de especial interesse nesse trabalho, a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG). Recentemente, estudos vêm demonstrando que mecanismos dopaminérgicos contribuem para a analgesia induzida pela PAG. Portanto, o objetivo desse trabalho foi testar a hipótese de que o efeito antinociceptivo induzido pela acupuntura depende da ativação de mecanismos dopaminérgicos na PAG. Para isso, avaliamos a habilidade de antagonistas seletivos dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 ou D2 microinjetados na PAG em bloquear o efeito antinociceptivo induzido pela acupuntura. Carragenina, um agente inflamatório clássico, ou salina foi injetada na pata traseira e o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado como medida de nocicepção. O agulhamento ou procedimento sham da acupuntura foi realizado (por 30 minutos) bilateralmente no ponto E36, localizado na região tibial proximal, antes ou duas horas e trinta minutos depois da injeção de carragenina. O efeito antinociceptivo da acupuntura, que teve duração de pelo menos 30 horas, foi significativamente reduzido após a injeção intra-PAG de antagonistas do tipo D1 ou D2 e foi abolido com a coadministração dos antagonistas. Esses dados demonstram um novo mecanismo pelo qual a acupuntura induz analgesia e, portanto, contribuem para fundamentar a base neurobiológica desta importante técnica de suporte no tratamento e controle da dor.

Palavras-chave: Acupuntura. Dor. Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG). Dopamina.

ABSTRACT

The antinociceptive effect induced by acupuncture depends on Central Nervous System structures and, of special interest in this study, the Periaqueductal Gray (PAG). Recently, studies have shown that dopaminergic mechanisms contribute to PAG-induced analgesia. Therefore, the aim of this study was to test if the antinociceptive effect induced by acupuncture depends on the activation of PAG dopaminergic mechanisms. We evaluated the ability of D1 and D2-like dopaminergic receptor antagonists microinjected into the PAG to block the antinociceptive effect induced by acupuncture. Carrageenan, a classic inflammatory agent, or saline was injected in the hind paw of the rats and the mechanical nociceptive threshold was evaluated as a nociceptive measure. The needling or sham procedure of acupuncture was done bilaterally on the E36 acupoint, situated on the proximal tibial region, before or two hours and thirty minutes after the carrageenan injection. The antinociceptive effect induced by acupuncture, that lasted for at least 30 hours, was significantly reduced after intra-PAG injection of D1 and D2-like antagonists, and it was abolished by the coadministration of D1 and D2-like antagonists. Furthermore, these data show a new mechanism to support the neurobiological basis of this important technique in pain management and treatment.

Key-words: Acupuncture. Pain. Periaqueductal Gray (PAG). Dopamine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
1.1	JUSTIFICATIVA.....	10
1.2	OBJETIVOS	11
1.2.1	Objetivo Geral.....	11
1.2.2	Objetivos Específicos	11
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1	ANIMAIS.....	12
2.2	DROGAS	12
2.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA IMPLANTAÇÃO DAS CÂNULAS GUIAS PARA AS INJEÇÕES NA PAG	12
2.4	ACUPUNTURA.....	13
2.5	TESTE DE LIMIAR MECÂNICO DE NOCICEPÇÃO	13
2.6	TESTE DO OPEN FIELD	14
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
2.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
3	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	18
3.1	ACUPUNTURA PREVENIU A HIPERALGESIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA	18
3.2	A ACUPUNTURA REVERTEU A HIPERALGESIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA	19
3.3	A ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ACUPUNTURA DEPENDE DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS NA PAG	20
3.4	AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO NO OPEN FIELD	23
3.5	MAPEAMENTO HISTOLÓGICO	24
4	DISCUSSÃO	26
	REFERÊNCIAS.....	29
	ANEXO 1 – CERTIFICADO DO CEUA	33

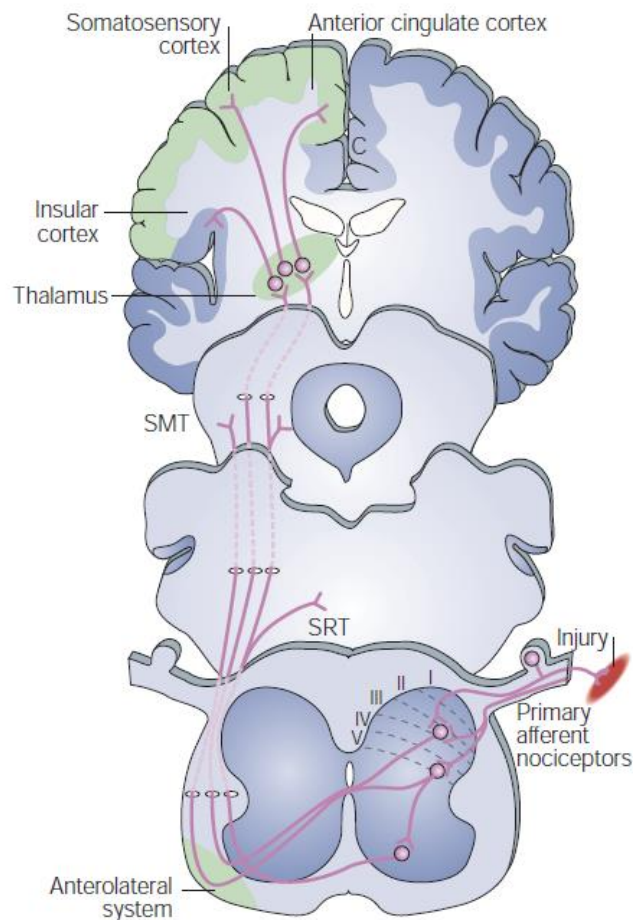
1 INTRODUÇÃO

Dor pode ser definida como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial” (IASP, 2012). Como sugere a definição, a experiência dolorosa extrapola seu componente sensorial, sendo influenciada por fatores emocionais, comportamentais e cognitivos, que compõem o componente afetivo da dor e fazem com que a experiência de cada indivíduo seja essencialmente individual (DE FELICE; OSSIPOV, 2016). A sensação dolorosa aguda tem como objetivo principal a sinalização para o aprendizado (JOHANSEN; FIELDS, 2004), por exemplo, alertar para a necessidade de evitar estímulos nocivos ou qualquer situação que possa vir a gerar dano. Além disso, a sensação dolorosa que se mantém em resposta a uma lesão tecidual faz com que o local afetado fique imobilizado, ajudando na recuperação do tecido. Portanto, a dor é vital para a sobrevivência, entretanto, sob condições persistentes ou patológicas, a dor perde seu caráter protetor, tornando-se crônica e transformando-se em uma doença (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Se extrapolarmos dados da população norte americana para a brasileira, chegaremos ao número de cento e dezesseis milhões de pessoas sofrendo com algum tipo de dor persistente no Brasil (NAHIN, 2015). Certamente este é um grande problema de saúde pública, que além de afetar diretamente a qualidade de vida de milhões de pessoas, está associado a um gigantesco impacto econômico. Só nos Estados Unidos, a estimativa de custo com tratamento e perda de produtividade relacionadas à dor em 2010 foi estimada em 635 bilhões de dólares (GASKIN; RICHARD, 2012).

Sendo assim, muitos pesquisadores investiram – e ainda investem – em estudos sobre mecanismos envolvidos no processamento e na modulação da dor. Os circuitos envolvidos na percepção da sensação dolorosa envolvem receptores que detectam estímulos potencialmente nocivos, os nociceptores. Esses nociceptores aferentes primários estão presentes em todo o corpo, e transformam esses estímulos em sinais elétricos que são levados ao corno dorsal da medula espinhal, onde farão sinapses nas lâminas I-II e IV-VI (WALL, 1967), liberando glutamato e neuropeptídeos que ativam neurônios de segunda ordem. Estes, por sua vez, levam a informação a diferentes áreas do tronco encefálico e tálamo (FIELDS, 2004). No tálamo, neurônios de terceira ordem levam a informação para as áreas corticais envolvidas no processamento e interpretação dos aspectos

sensoriais (córtex sensorial primário) e emocionais/motivacionais da dor (córtex da ínsula e córtex cingulado anterior, entre outras regiões), como evidenciado na FIGURA 1 (FIELDS, 2004). Além disso, há mecanismos de modulação da dor, que podem ter função tanto facilitatória quanto inibitória da dor. Um dos mais importantes e estudados é o sistema descendente da modulação da dor.

FIGURA 1 – TRANSMISSÃO DO ESTÍMULO NOCICEPTIVO



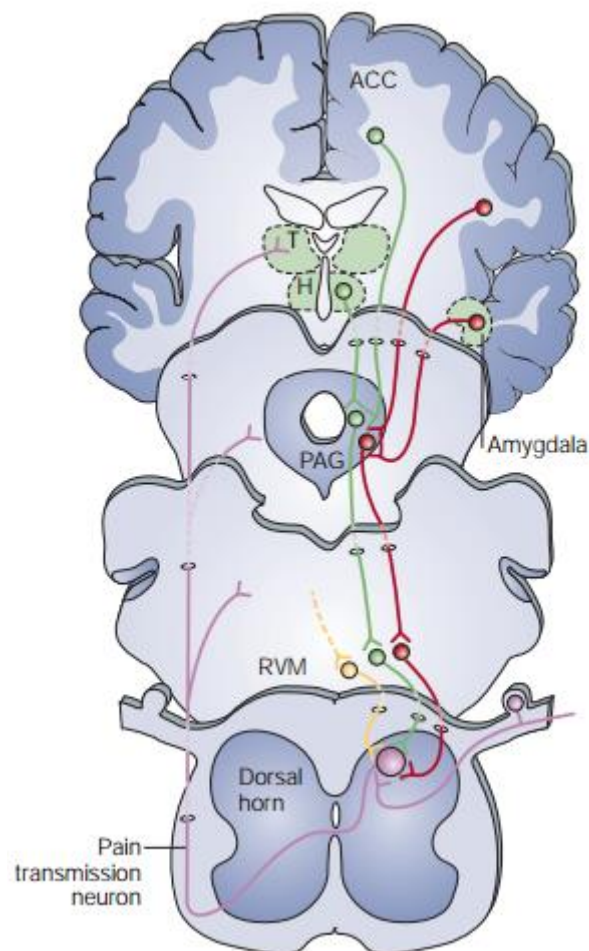
FONTE: FIELDS (2004).

FIGURA 1: Nociceptores aferentes primários convertem o estímulo nociceptivo em sinais elétricos, que são levados a lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal, onde ativam neurônios de segunda ordem. Os axônios desses neurônios ascendem contralateralmente para diversas áreas do tálamo, que por sua vez, projetam para várias regiões corticais que possuem diferentes papéis na percepção da dor.

A substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês *periaqueductal grey*), é o principal núcleo de controle desse sistema. Estudos em animais iniciados na década de 60 mostraram que a estimulação elétrica ou a administração de opioides na PAG induzem um potente efeito antinociceptivo através da inibição de neurônios GABAérgicos, desinibindo o sistema descendente (MILLAN, 2002; FIELDS, 2004).

Ao integrar múltiplas aferências provenientes de diversas regiões prosencefálicas, a PAG ativa vias que se projetam ao bulbo rostro ventral (RVM) e núcleos adrenérgicos da ponte, de onde partem vias descendentes – serotoninérgicas e noradrenérgicas, respectivamente – que trafegam pelo funículo dorsolateral da medula espinhal e se projetam para lâminas superiores do corno dorsal da medula espinhal onde modulam a transmissão da informação nociceptiva, como ilustrado pela FIGURA 2 (FIELDS, 2004; MILLAN, 2002).

FIGURA 2 – SISTEMA DESCENDENTE DA MODULAÇÃO DA DOR



FONTE: FIELDS (2004).

FIGURA 2: A PAG recebe aferências de regiões encefálicas como a amígdala, o hipotálamo e o córtex cingulado anterior e, por sua vez, controla a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal. A via descendente de modulação da dor se encontra em verde. ACC: córtex cingulado anterior; T: tálamo; H: hipotálamo.

Embora os mecanismos responsáveis pela antinociceção mediada pela PAG sejam relativamente bem conhecidos (LAU; VAUGHAN, 2014; MILLAN, 2002), pouco se sabe a respeito do papel de mecanismos dopaminérgicos nessa região.

Evidências recentes sugerem um importante e até então desconhecido papel da dopamina na analgesia mediada pela PAG (TAKESHIGE et al., 1992; LI, 2016; FLORES, 2004; MEYER, 2009). Existem cinco subtipos de receptores dopaminérgicos. Os receptores D1 e D5 estão acoplados a proteínas G estimulatórias, sendo dessa forma agrupados na subfamília *D1-like* (tipo D1). Os receptores D2, D3 e D4 estão acoplados a proteínas G inibitórias, compondo a subfamília *D2-like* (tipo D2) (WOOD, 2008). Um estudo de 2004 revelou que quando neurônios dopaminérgicos da PAG são lesados com 6-OHDA, existe uma diminuição significativa do efeito antinociceptivo de opioides (FLORES et al., 2004). O mesmo resultado é obtido quando antagonistas de receptores dopaminérgicos do tipo D1 são administrados na PAG (FLORES et al., 2004). Além disso, a antinocicepção induzida pela morfina foi significativamente reduzida após a injeção de um antagonista dopaminérgico não-seletivo na PAG, e a injeção na PAG de apomorfina, agonista de receptores dopaminérgicos, causou antinocicepção, que pode ser bloqueada pela administração de antagonistas de receptores tipo D2, mas não tipo D1 (MEYER, 2009). Recentemente, um estudo eletrofisiológico demonstrou que neurônios dopaminérgicos localizados na PAG e cuja ativação está associada à analgesia, estão sob inibição GABAérgica que pode ser reprimida por opioides (LI et al., 2016).

O tratamento e controle da dor ainda são um grande desafio. Inúmeros estudos indicam que a dor é mal controlada (RESNIK; MINARD, 2001), o que se deve, ao menos em parte, a baixa eficácia dos fármacos disponíveis e aos importantes efeitos colaterais que limitam seu uso a longo prazo (CARTER, 2014). Nesse sentido, a abordagem não farmacológica tem se mostrado eficaz como terapia de suporte no controle da dor (NAHIN et al., 2016). Uma das terapias de suporte mais utilizadas e com ampla fundamentação científica no controle da dor é a acupuntura (GAO et al., 2015). A acupuntura promove analgesia sistêmica a partir da inserção de agulhas em partes específicas do corpo. A prática de agulhamento vem sendo realizada desde pelo menos sete mil anos antes do Período Neolítico, com agulhas feitas de pedra. A acupuntura faz parte do sistema conhecido como Medicina Tradicional Chinesa (VEITH, 1973), sendo que o primeiro documento a descrever um sistema organizado de diagnóstico e tratamento posteriormente reconhecido como acupuntura foi o Tratado de Medicina Interna do Imperador Amarelo (100 A.C.). Nele encontram-se técnicas baseadas na filosofia Taoísta, que

propunham que o Qi (energia vital) flui pelos canais (meridianos) do corpo. Tais conceitos filosóficos norteiam até hoje boa parte da prática clínica em acupuntura (WHITE, 2004).

Ao longo do tempo, a acupuntura se tornou uma das terapias padrões na China e, durante a Dinastia Ming (1368-1644), a publicação do Tratado Clássico de Acupuntura e Moxabustão, formou a base da acupuntura moderna. Durante o século XVII, a acupuntura passou a ser considerada supersticiosa e irracional e, em 1929, várias práticas da Medicina Tradicional Chinesa foram proibidas na China devido à influência da medicina ocidental. Essa situação só foi revertida após a instalação do governo Comunista em 1949, quando a acupuntura volta a ser praticada na China. Já na década de 50, institutos de pesquisa sobre a acupuntura foram criados, trazendo as primeiras explicações científicas sobre a técnica – envolvendo liberação de neurotransmissores. Só na última década do século XX, foram publicadas várias revisões mostrando evidências mais confiáveis sobre a acupuntura no tratamento de náuseas, duralgia, dor nas costas e cefaléia (WHITE, 2004).

Atualmente, a acupuntura é notoriamente utilizada como tratamento para o controle da dor. A estimulação dos acupontos (ou pontos de acupuntura), é essencial a fim de obter-se os efeitos terapêuticos da técnica, sendo a analgesia por acupuntura um dos seus principais efeitos (CHENG, 2014). Seus mecanismos fisiológicos responsáveis pelo efeito antinociceptivo sobre o componente sensorial da dor vêm sendo amplamente investigados (ZHAO, 2008), inclusive em nosso laboratório (TOBALDINI et al., 2014). Os mecanismos da acupuntura demonstrados em estudos com animais se correlacionam com aqueles em humanos, uma vez que as regiões encefálicas associadas à analgesia induzida pela acupuntura em animais vêm sendo confirmadas por estudos de imagem funcional em humanos (ZHAO, 2008).

Anos de estudos sobre a base neurobiológica da acupuntura culminaram com o entendimento de que seu mecanismo de ação depende da ativação de fibras aferentes primárias – especialmente as fibras nociceptivas do tipo C, já que a depleção dessas fibras pela administração de capsaicina impede a analgesia induzida pela acupuntura (KAGITANI et al., 2010; TOBALDINI et al., 2014). Além disso, a condução da informação proveniente da ativação dessas fibras aos centros superiores é essencial para a analgesia, uma vez que a secção dos funículos

ventrolaterais da medula espinhal, por onde a informação nociceptiva ascende, a abole (CHEN-YU et al., 1975).

Vários mecanismos centrais que reconhecidamente participam da modulação da informação nociceptiva, medeiam a analgesia induzida pela acupuntura. Entre eles podemos citar o mais conhecido sistema endógeno de modulação da dor, o sistema descendente PAG-RVM (LI et al., 2007). Entre as várias evidências que apontam o sistema descendente como um importante mecanismo associado a analgesia induzida pela acupuntura podemos citar aquelas que demonstram que os mesmos procedimentos que bloqueiam a função desse sistema - como a microinjeção de antagonistas opioides na PAG (BAI et al., 1999; LIU, W. et al., 1997; LIU, X., 1996) e no RVM (LIU, X., 1996) ou a lesão do funículo dorsolateral da medula espinhal (SHEN; MA; LAN, 1978), por onde trafegam as vias descendentes - inibem a analgesia induzida pela acupuntura. Embora esses dados forneçam uma inquestionável e sólida base neurobiológica para os mecanismos recrutados pela acupuntura no sistema nervoso central, muitos possíveis mecanismos permanecem inexplorados. Por exemplo, embora estudos recentes apontem para um importante papel da dopamina na analgesia mediada pela PAG (LI, 2016; FLORES, 2004; MEYER, 2009) e a PAG seja um núcleo central na analgesia mediada pela acupuntura (TAKESHIGE, 1992; LI et al., 2007; BAI et al., 1999; LIU, W. et al., 1997; LIU, X., 1996), ainda não há dados consistentes na literatura sobre o envolvimento de mecanismos dopaminérgicos na PAG na analgesia induzida pela acupuntura.

1.1 JUSTIFICATIVA

Embora não exista dúvida de que a PAG é uma região essencial à analgesia induzida pela acupuntura, não se sabe se mecanismos dopaminérgicos na PAG contribuem para essa analgesia.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Verificar se mecanismos dopaminérgicos na PAG contribuem para a analgesia induzida pela acupuntura.

1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Comparar o efeito da acupuntura em prevenir a dor inflamatória (acupuntura realizada antes da injeção de carragenina na pata) e revertê-la (acupuntura realizada após a injeção de carragenina na pata), determinando a duração desse efeito.
- b) Determinar se a administração de antagonistas seletivos para receptores dopaminérgicos do tipo D1 ou D2 na PAG afeta o efeito antinociceptivo da acupuntura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Para realização deste trabalho foram utilizados ratos Wistar pesando entre 260-300g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (5 por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12h) com alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as diretrizes propostas pela IASP (Associação Internacional para Estudo da Dor) para pesquisa em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

2.2 DROGAS

Carragenina (20 ou 100 μ g) (BONET et al., 2013); SCH23390, antagonista seletivo de receptores do tipo D1 (4 μ g); Raclopride, antagonista seletivo de receptores do tipo D2 (6 μ g). As doses dos antagonistas dopaminérgicos foram determinadas a partir de experimentos prévios conduzidos em nosso laboratório, e se demonstraram eficazes em bloquear a analgesia induzida por agonista μ -opioide. Todas as drogas foram obtidas da Sigma-Aldrich (SP, Brasil) e serão dissolvidas em salina.

2.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA IMPLANTAÇÃO DAS CÂNULAS GUIAS PARA AS INJEÇÕES NA PAG

Os ratos foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e quetamina (80mg/kg) e posicionados em aparelho estereotáxico. O crânio foi exposto e foi feito um pequeno acesso para introduzir uma cânula guia (agulha 26-gauge) na PAG ventrolateral direita. As coordenadas utilizadas a partir de lambda foram: 0mm antero-posterior, -2.0mm lateral, e -3.8mm dorsoventral e ângulo de 1.8°.

Em todos os experimentos foi realizado o mapeamento histológico com o objetivo de confirmar o sítio da injeção. Para isso os animais foram anestesiados e submetidos a perfusão cardíaca, com solução salina 0,9%. A seguir, a solução padrão azul de Evans foi injetada através da cânula guia, o cérebro foi removido e

congelado. O sítio de injeção foi mapeado de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2007).

2.4 ACUPUNTURA

As sessões de acupuntura ou acupuntura-sham (sham) tiveram duração de 30 minutos. A acupuntura foi feita antes ou depois da injeção de carragenina, dependendo do grupo, para avaliar sua habilidade em prevenir ou reverter, respectivamente a resposta hiperalgésica. Quando realizadas após a injeção de carragenina, as sessões de acupuntura ou sham foram iniciadas 30 minutos antes do pico da resposta hiperalgésica (BONET et al., 2013), ou seja, 2 horas e 30 minutos após a injeção intraplantar de carragenina. Todos os animais tiveram as patas direita e esquerda tricotomizadas ao nível da articulação do joelho, permitindo a exposição do ponto E36. O ponto E36 está localizado no músculo tibial anterior anterolateral a tuberosidade tibial anterior (TOBALDINI et al., 2014). Os animais dos grupos acupuntura receberam agulhamento bilateral no ponto E36, e um esparadrapo de aproximadamente 2 x 2cm foi colocado sobre o ponto. Os animais nos grupos sham receberam apenas o esparadrapo. Foram utilizadas agulhas da marca Dong Bang, tamanho 0,18mm x 8mm.

O ponto E36 foi escolhido por ser amplamente utilizado para induzir analgesia e por produzir analgesia em modelos de inflamação induzida por carragenina (CHEN et al., 2011).

2.5 TESTE DE LIMIAR MECÂNICO DE NOCICEPÇÃO

A carragenina é um agente inflamatório amplamente utilizado em estudos animais de dor e inflamação e numa perspectiva clínica seu uso experimental satisfaz os critérios para simular a dor inflamatória em humanos (MORRIS, 2003). Ao induzir a formação de bradicinina e a liberação de citocinas inflamatórias, a carragenina induz a produção de prostaglandinas e a liberação de aminas simpatomiméticas que medeiam, em última instância, a hiperalgésia observada nesse modelo (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993). O auge da sensibilização inflamatória ocorre três horas após a administração e o limiar nociceptivo mecânico

retorna progressivamente ao valor basal no decorrer das 24 horas após a injeção (BONET et al., 2013).

A resposta hiperalgésica inflamatória induzida pela carragenina foi avaliada através da quantificação do limiar nociceptivo mecânico, pelo teste de Randall-Selitto (RANDALL; SELITTO, 1957). Nesse teste utiliza-se um analgesímetro (Insight, Brasil), que aplica uma força mecânica linear com aumento gradual na face dorsal da pata dos ratos. Quando o animal exhibe o comportamento de retirada da pata, a força aplicada é imediatamente interrompida, seu valor é registrado e utilizado como medida do limiar nociceptivo mecânico. O limiar nociceptivo mecânico foi definido pela média de três medidas obtidas em diferentes tempos durante o experimento.

2.6 TESTE DO OPEN FIELD

Esse teste avalia a atividade locomotora e foi utilizado para averiguar se as drogas injetadas na PAG afetam o comportamento motor dos animais e sua resposta aos testes nociceptivos. A arena do campo aberto consiste em uma área circular, com diâmetro de 90cm, dividido em 12 quadrantes, limitada por uma parede de 50cm. O comportamento exploratório foi medido pela quantificação do número de quadrantes cruzados durante 1 minuto.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey. E para os dados do campo aberto, utilizamos ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância igual ou menor a 0,05 foi utilizado. Os resultados foram apresentados como média \pm e.p.m. Para realização dos cálculos estatísticos utilizamos o programa Jandel Scientific composto pelo Sigma Stat e Sigma Plot.

2.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os grupos experimentais foram divididos de acordo com a TABELA 1. Ratos que apresentaram erro de posicionamento da cânula ou apresentaram comportamento basal fora do padrão foram excluídos do estudo.

TABELA 1 - SUMÁRIO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

INJEÇÃO NA PATA	INTERVENÇÃO	INJEÇÃO NA PAG	N
Carragenina 100 μ g	AC antes da injeção na pata	-	9
Veículo (NaCl 0,9%)	AC antes da injeção na pata	-	6
Carragenina 100 μ g	AC SHAM antes da injeção na pata	-	6
Carragenina 100 μ g	AC após a injeção na pata	-	6
Veículo (NaCl 0,9%)	AC após a injeção na pata	-	6
Carragenina 100 μ g	AC SHAM após a injeção na pata	-	6
Carragenina 100 μ g	AC após a injeção na pata	Veículo (NaCl 0,9%)	6/6
Carragenina 100 μ g	AC SHAM após a injeção na pata	Veículo (NaCl 0,9%)	6/8
Carragenina 100 μ g	AC após a injeção na pata	SCH23390 6 μ g	7/10
Carragenina 100 μ g	AC após a injeção na pata	Raclopride 4 μ g	7/11
Carragenina 100 μ g	AC após a injeção na pata	SCH23390 6 μ g + Raclopride 4 μ g	7/8
Carragenina 20 μ g	AC SHAM após a injeção na pata	Veículo (NaCl 0,9%)	5/5
Carragenina 20 μ g	AC SHAM após a injeção na pata	SCH23390 6 μ g	6/6
Carragenina 20 μ g	AC SHAM após a injeção na pata	Raclopride 4 μ g	6/6

TABELA 1: AC = acupuntura.

Os experimentos estão esquematizados nas figuras 3, 4 e 5.

FIGURA 3 – EXPERIMENTO 1

EXPERIMENTO 1: AVERIGUAR SE A ACUPUNTURA PREVINE A INSTALAÇÃO DA HIPERALGESIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA



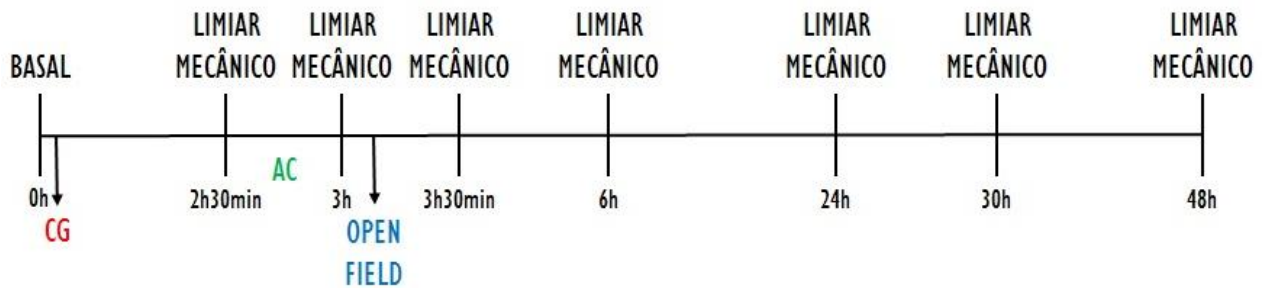
LEGENDA:

AC = ACUPUNTURA

CG = CARRAGENINA

FIGURA 4 – EXPERIMENTO 2

EXPERIMENTO 2: AVERIGUAR SE A ACUPUNTURA REVERTE A HIPERALGESIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA



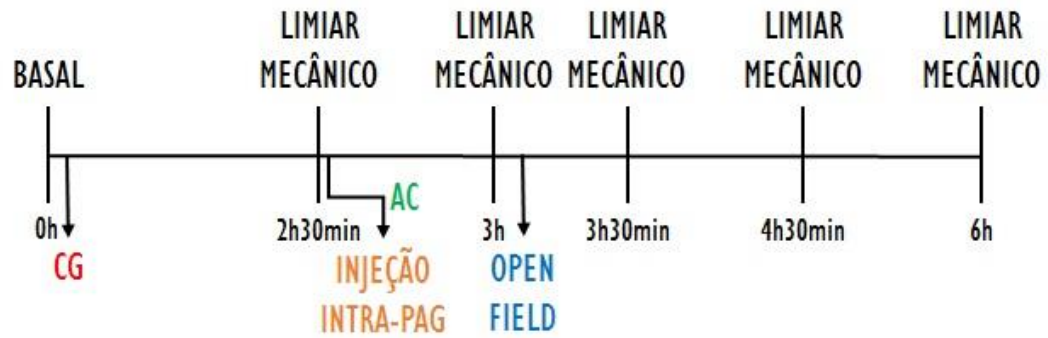
LEGENDA:

AC = ACUPUNTURA

CG = CARRAGENINA

FIGURA 5 – EXPERIMENTO 3

EXPERIMENTO 3: DETERMINAR SE A ADMINISTRAÇÃO DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DO TIPO D1 OU D2 NA PAG AFETA O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ACUPUNTURA



LEGENDA:

AC = ACUPUNTURA

CG = CARRAGENINA

3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

3.1 ACUPUNTURA PREVENIU A HIPERALGESIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

A administração de carragenina na pata traseira reduziu significativamente o limiar nociceptivo mecânico (2,5h vs basal $p < 0,001$). A acupuntura realizada antes da injeção de carragenina não só preveniu a hiperalgesia (Acupuntura vs Sham $p < 0,001$ no tempo 2,5h), mas também aumentou o limiar nociceptivo em comparação ao basal pré-injeção (2,5h vs basal $p < 0,001$). Em animais que receberam salina na pata, a acupuntura levou a um intenso e persistente aumento do limiar nociceptivo ($p < 0,001$ nos tempos 0h, 2,5h, 3h e 6h em relação à basal) (GRÁFICO 1: [$F_{\text{tratamento}}(2,18) = 386,216$; $p < 0,001$] [$F_{\text{tempo} \times \text{tratamento}}(8,72) = 78,598$; $p < 0,001$]).

GRÁFICO 1 – EFEITO DA ACUPUNTURA ANTES DA INJEÇÃO DE CARRAGENINA SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MÊCANICO (TESTE DE RANDALL-SELITTO)

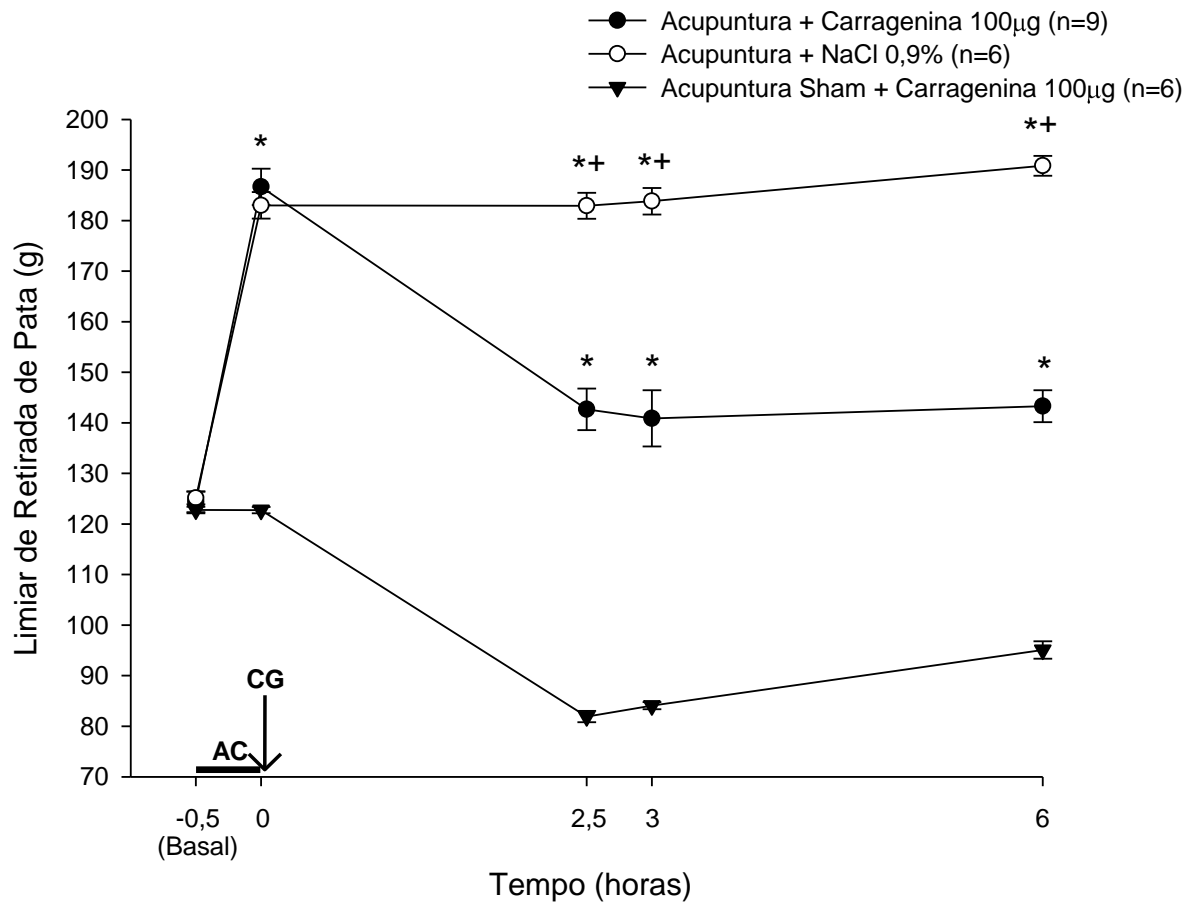


GRÁFICO 1: A acupuntura antes da injeção de carragenina (100µg) preveniu a hiperalgisia e induziu aumento do limiar nociceptivo em comparação ao basal pré-injeção. O símbolo “*” indica limiar nociceptivo mecânico significativamente maior que o grupo que recebeu carragenina e sham acupuntura. O símbolo “+” indica limiar nociceptivo mecânico significativamente maior que o grupo que recebeu carragenina e acupuntura. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. Nesta e nas demais figuras os dados estão expressos como média \pm EPM. AC = acupuntura: agulhamento bilateral no ponto E36, região tibial anterior proximal, a barra sobre o eixo x indica a duração da sessão de acupuntura (30 minutos). CG = carragenina, a seta indica o momento da injeção de carragenina.

3.2 A ACUPUNTURA REVERTEU A HIPERALGESIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

A administração de carragenina na pata traseira reduziu significativamente o limiar nociceptivo mecânico ($p < 0,001$ no tempo 2,5h, 3h, 3,5h e 6h vs basal), mas a acupuntura reverteu completamente esse efeito hiperalgésico, uma vez que após a acupuntura o limiar nociceptivo mecânico retornou aos níveis basais pré-injeção (3h vs basal $p = 1,0$). O acompanhamento da evolução temporal do efeito da acupuntura demonstrou que o limiar nociceptivo mecânico permanece elevado 30h após a

acupuntura em animais que receberam salina na pata (30h vs basal $p < 0,001$), o que indica um duradouro efeito antinociceptivo que só se extingue após 48h (48h vs basal $p = 0,981$) (GRÁFICO 2: [$F_{\text{tratamento}} (2,15) = 431,351$; $p < 0,001$] [$F_{\text{tempo} \times \text{tratamento}} (14, 105) = 49,671$; $p < 0,001$]).

GRÁFICO 2 – EFEITO DA ACUPUNTURA APÓS A INJEÇÃO DE CARRAGENINA NO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO.

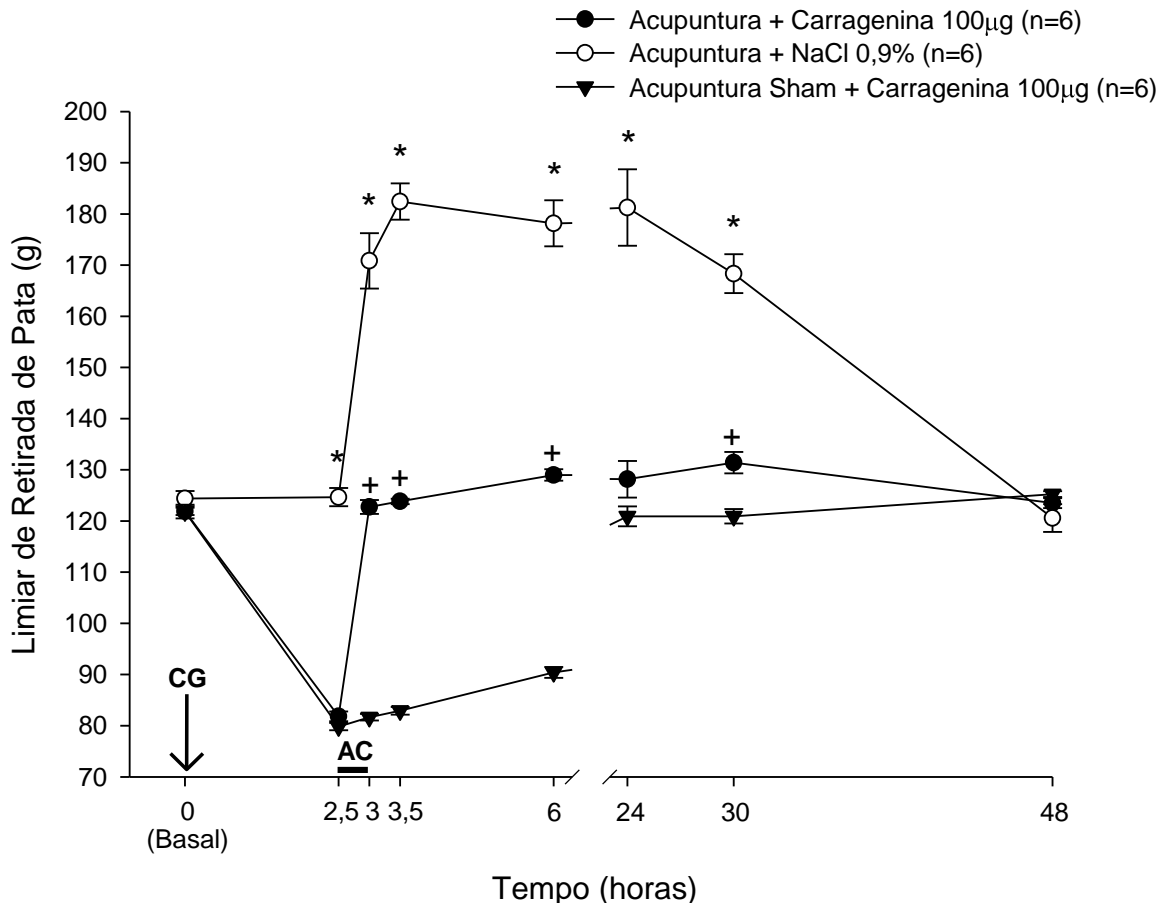


GRÁFICO 2: A acupuntura reverteu a hiperalgesia induzida pela carragenina. O símbolo “*” indica limiar nociceptivo mecânico significativamente maior que aquele dos demais grupos. O símbolo “+” indica limiar nociceptivo mecânico significativamente maior que aquele do grupo que recebeu acupuntura SHAM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. AC = acupuntura: agulhamento bilateral no ponto E36, região tibial anterior proximal, a barra sobre o eixo x indica a duração da sessão de acupuntura (30 minutos). CG = carragenina, a seta indica o momento da injeção de carragenina.

3.3 A ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ACUPUNTURA DEPENDE DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS NA PAG

O efeito antinociceptivo induzido pela acupuntura após a injeção de carragenina foi significativamente reduzido pela administração do antagonista seletivo de receptores dopaminérgicos do tipo D1 SCH23390 ($p < 0,001$) ou do tipo

D2 Raclopride ($p < 0,001$) na PAG. O pequeno efeito antinociceptivo residual que permaneceu após a administração de cada antagonista isoladamente foi suprimido pela coadministração de ambos os antagonistas ($p < 0,001$) na PAG (GRÁFICO 3a: $[F_{\text{tratamento}}(4, 28) = 78,863; p < 0,001]$ $[F_{\text{tempo} \times \text{tratamento}}(20, 140) = 23,264; p < 0,001]$).

Importante, para confirmar que cada antagonista não afeta a resposta da carragenina por si só, eles foram administrados na PAG de animais que receberam uma dose intermediária de carragenina ($20\mu\text{g}$). A administração de Raclopride ($p = 0,992$) ou de SCH23390 ($p = 0,833$) não afetou a resposta hiperalgésica induzida pela carragenina, o que demonstra que seu efeito se restringe a animais sob efeito analgésico da acupuntura (GRÁFICO 3b: $[F_{\text{tratamento}}(2, 14) = 0,305; p = 0,742]$ $[F_{\text{tempo} \times \text{tratamento}}(10, 70) = 0,937; p = 0,505]$).

GRÁFICO 3a – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ISOLADA OU CONJUNTA DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DO TIPO D1 OU D2 NA PAG SOBRE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ACUPUNTURA

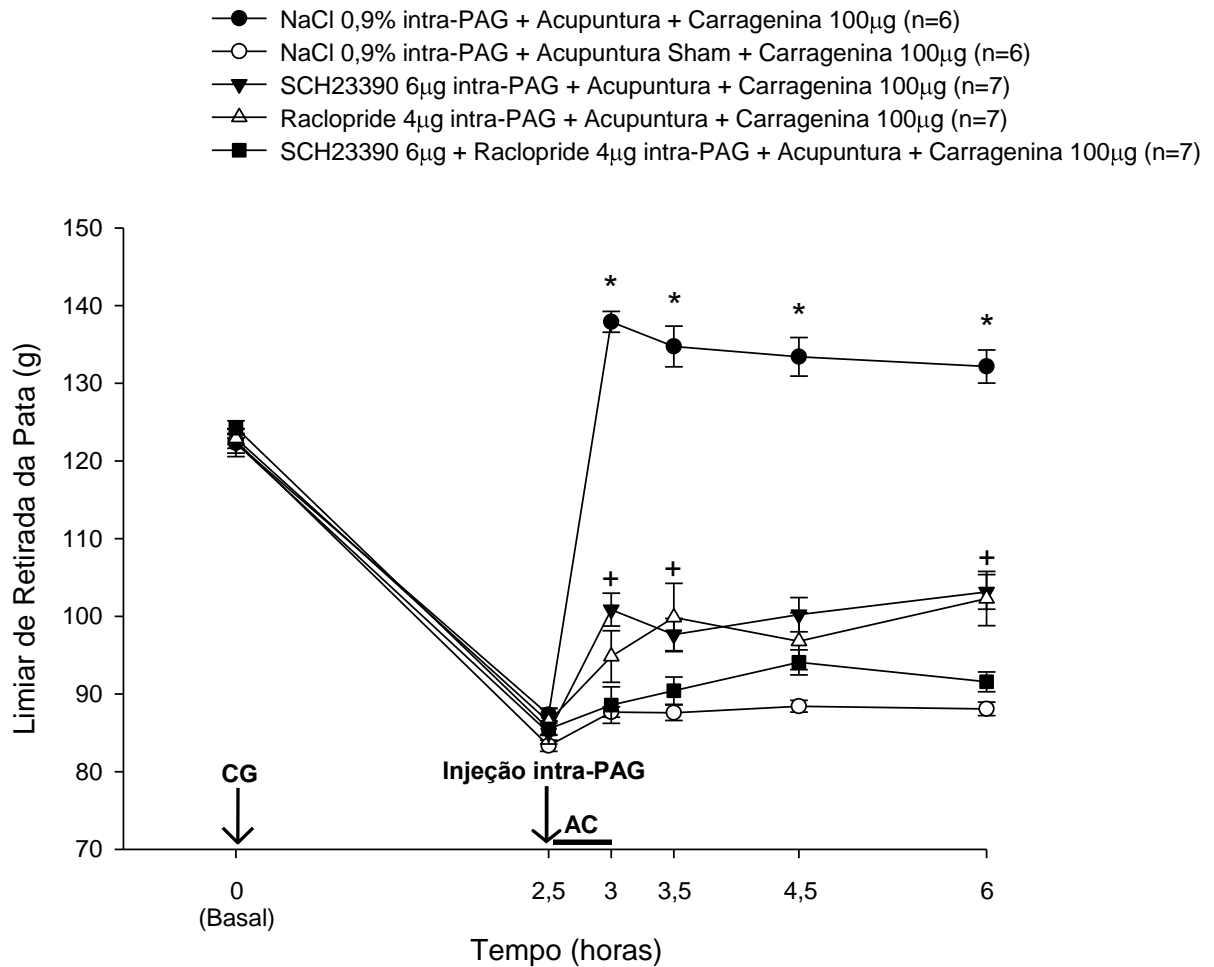


GRÁFICO 3a: A administração do antagonista de receptores dopaminérgicos do tipo D1 SCH23390 ou do tipo D2 Raclopride na PAG reduziu significativamente a analgesia induzida pela acupuntura. A co-administração dos dois bloqueou a analgesia induzida pela acupuntura. O símbolo “*” indica onde o grupo controle divergiu significativamente dos demais grupos. O símbolo “**” indica limiar nociceptivo mecânico significativamente maior que o dos outros grupos. O símbolo “+” indica limiar nociceptivo mecânico significativamente maior que aquele do grupo que recebeu acupuntura SHAM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. AC = acupuntura: agulhamento bilateral no ponto E36, região tibial anterior proximal, a barra sobre o eixo x indica a duração da sessão de acupuntura (30 minutos). CG = carragenina, a seta indica o momento da injeção de carragenina. PAG= Substância cinzenta periaquedutal.

GRÁFICO 3b – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAG DE SALINA OU ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SOBRE O EFEITO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR DOSE INTERMEDIÁRIA DE CARRAGENINA

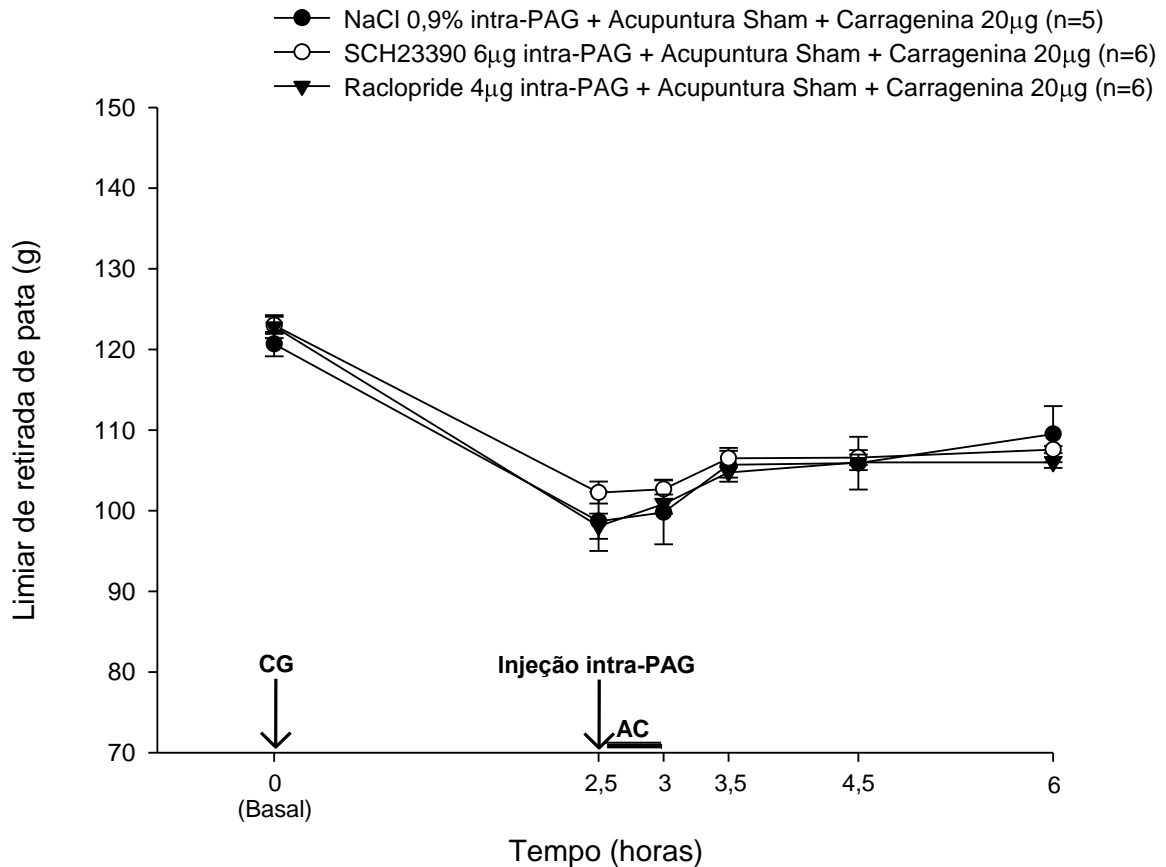


GRÁFICO 3b: A administração de antagonistas dopaminérgicos na PAG ou acupuntura SHAM não tiveram diferença significativa na nocicepção induzida pela carragenina. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. AC = acupuntura: agulhamento bilateral no ponto E36, região tibial anterior proximal, a barra sobre o eixo x indica a duração da sessão de acupuntura (30 minutos). CG = carragenina, a seta indica o momento da injeção de carragenina. PAG= Substância cinzenta periaquedutal.

3.4 AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO NO OPEN FIELD

A locomoção no campo aberto não foi afetada pela acupuntura ($p = 0,663$) ou pelas injeções na PAG.

TABELA 2 - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA

TRATAMENTO			QUADRANTES (média ± EPM)
INJEÇÃO NA PATA	INTERVENÇÃO	INJEÇÃO NA PAG	
Carragenina 100µg	AC antes da injeção na pata	-	18,889 ± 3,164
Veículo (NaCl 0,9%)	AC antes da injeção na pata	-	20,167 ± 1,400
Carragenina 100µg	AC SHAM antes da injeção na pata	-	15,500 ± 2,527
Carragenina 100µg	AC após a injeção na pata	-	17,167 ± 3,331
Veículo (NaCl 0,9%)	AC após a injeção na pata	-	21,000 ± 1,633
Carragenina 100µg	AC SHAM após a injeção na pata	-	16,000 ± 2,422
Carragenina 100µg	AC após a injeção na pata	Veículo (NaCl 0,9%)	17,500 ± 2,705
Carragenina 100µg	AC SHAM após a injeção na pata	Veículo (NaCl 0,9%)	14,833 ± 2,482
Carragenina 100µg	AC após a injeção na pata	SCH23390 6µg	25,714 ± 5,609
Carragenina 100µg	AC após a injeção na pata	Raclopride 4µg	15,429 ± 2,202
Carragenina 100µg	AC após a injeção na pata	SCH23390 6µg + Raclopride 4µg	15,714 ± 2,942
Carragenina 20µg	AC SHAM após a injeção na pata	Veículo (Salina)	21,400 ± 4,812
Carragenina 20µg	AC SHAM após a injeção na pata	SCH23390 6µg	19,333 ± 1,647
Carragenina 20µg	AC SHAM após a injeção na pata	Raclopride 4µg	16,000 ± 1,549

TABELA 2: ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. Os dados estão expressos como média ± erro padrão das médias. AC = acupuntura.

3.5 MAPEAMENTO HISTOLÓGICO

Os sítios de injeção na PAG estão representados na figura 6, mapeados de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2007).

FIGURA 6 – MAPEAMENTO HISTOLÓGICO

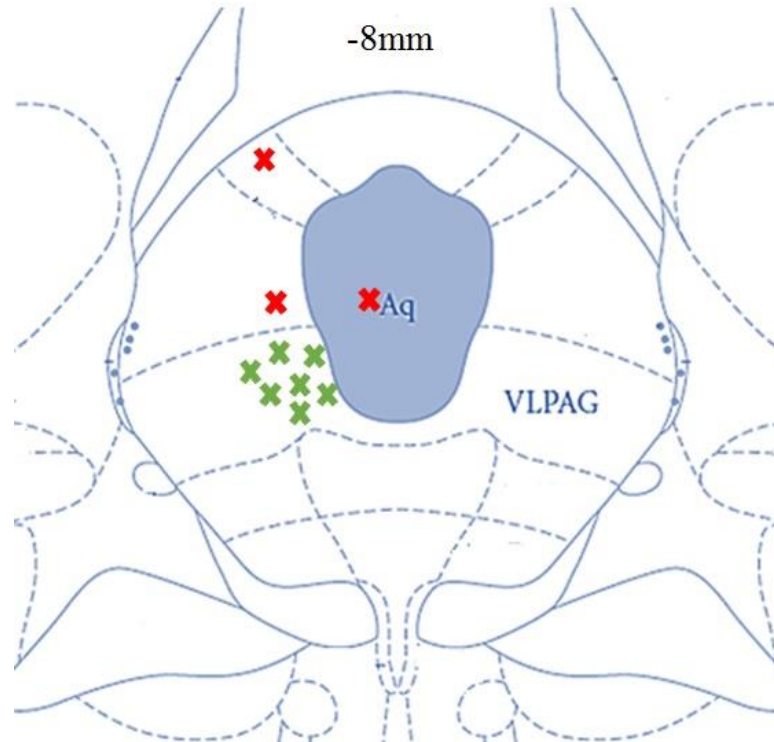


FIGURA 6: O símbolo "x" em verde representa os sítios de injeção intra-PAG. O símbolo "x" em vermelho representa os sítios *off-site*. Figura adaptada de Paxinos (PAXINOS; WATSON, 2007), o número em milímetros representa a distância caudal a partir de bregma.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo o efeito antinociceptivo induzido pela acupuntura foi avaliado mensurando-se o limiar nociceptivo mecânico em um modelo clássico de dor inflamatória, a injeção de carragenina na pata de ratos. A acupuntura realizada antes da injeção de carragenina não só preveniu a hiperalgesia, mas também aumentou o limiar nociceptivo mecânico acima do valor basal pré-injeção. A acupuntura realizada após a injeção de carragenina, quando a resposta hiperalgésica já se encontrava no valor máximo esperado no modelo da carragenina, reverteu completamente a hiperalgesia. Portanto, a acupuntura foi eficaz em prevenir e reverter a dor inflamatória no modelo da carragenina. Importante, o efeito da acupuntura em animais que não tiveram a pata inflamada persistiu por pelo menos 30 horas, sendo extinto apenas após 48 horas. Finalmente, o principal dado deste estudo demonstrou que a analgesia induzida pela acupuntura em ratos depende da ativação de receptores dopaminérgicos na PAG. Isso foi demonstrado pela habilidade dos antagonistas seletivos para receptores dopaminérgicos do tipo D1 (SCH23390) ou D2 (Raclopride) em diminuir significativamente o efeito analgésico da acupuntura. A coadministração de ambos os antagonistas na PAG bloqueou a analgesia induzida pela acupuntura, eliminando o pequeno efeito analgésico residual que permanecia após a administração de cada um deles isoladamente.

Nossos dados que demonstram um potente efeito da acupuntura em prevenir a dor inflamatória (GRÁFICO 1) estão de acordo com dados anteriores, que demonstraram que essa técnica pode ser benéfica utilizada como procedimento pré-operatório, diminuindo o consumo de morfina em até 50% durante a recuperação do paciente, comparado com o grupo controle, e facilitando o controle da dor pós-operatória (PENNICK et al., 2013; CHERNYAK; SESSLER, 2005; KOTANI, 2001). Interessante notar que a acupuntura realizada antes da injeção de carragenina não só preveniu a dor inflamatória, mas também elevou o limiar nociceptivo acima do valor basal pré experimento, o que sugere que a acupuntura tem uma notável habilidade de controlar os mecanismos associados a dor inflamatória. Nesse sentido, mais estudos são necessários para avaliar esse possível potencial.

A acupuntura também se mostrou eficaz em reverter a dor inflamatória já instalada, uma vez que a aplicação de acupuntura no auge da resposta hiperalgésica da carragenina a reverteu completamente (GRÁFICO 2). Estes dados

estão de acordo com estudos da literatura que utilizaram diferentes modelos de dor inflamatória (LI et al., 2005; ZHANG et al., 2012; TAGUCHI; TAGUCHI; KITAKOJI, 2010) e, portanto, suportam o valor terapêutico da acupuntura no controle da dor inflamatória. A duração do efeito analgésico da acupuntura é pouco investigada, mas nossos dados apontam para uma duração bastante prolongada, uma vez que o efeito ainda se mostra significativo 30 horas após a acupuntura e se extingue apenas após 48 horas. Pelo menos mais um estudo avaliou sistematicamente a evolução temporal do efeito antinociceptivo da acupuntura e encontrou um efeito bastante prolongado em modelo de osteoartrite (YANG et al., 2011).

A PAG e o sistema descendente de modulação da dor é o mais estudado mecanismo envolvido tanto na analgesia opioide (FIELDS, 2004) quanto na analgesia induzida pela acupuntura (MILLAN, 2002; TAKESHIGE et al., 1992; LI et al., 2007). Desde a década de 1960, sabe-se que a ativação de receptores opióides na PAG resulta em analgesia mediada pela ativação do sistema descendente de modulação da dor (BUDAI; FIELDS, 1998). Recentemente demonstrou-se que a analgesia induzida por opióides na PAG também depende de mecanismos dopaminérgicos supra-espinais (FLORES et al., 2004; MEYER, 2009; LI et al., 2016). Este estudo concilia esses dados, mostrando que a analgesia induzida pela acupuntura também depende de mecanismos dopaminérgicos na PAG. De fato, nossos dados sugerem que a liberação de dopamina na PAG tem um efeito central na analgesia induzida pela acupuntura, uma vez que ela foi significativamente reduzida pela administração intra-PAG de antagonista de receptores dopaminérgicos tanto do tipo D1 quanto do tipo D2 (GRÁFICO 3). Quando coadministrados, esses antagonistas bloquearam o efeito da acupuntura. Esses dados parecem contrastar com um estudo prévio que demonstrou que a eletroacupuntura não aumenta significativamente os níveis de dopamina na PAG (MUROTANI et al., 2010). Essa possível discrepância pode refletir a dificuldade técnica em dosar dopamina em tecidos neurais.

Em resumo, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que mecanismos dopaminérgicos na PAG medeiam a analgesia induzida pela acupuntura. Tais resultados contribuem para o conhecimento a respeito dos mecanismos de ação da acupuntura e da participação da dopamina na modulação da dor. Portanto, salientam o potencial terapêutico da acupuntura como uma das

alternativas não farmacológicas para o controle da dor e demonstram um novo mecanismo neurobiológico envolvido em seu efeito analgésico.

REFERÊNCIAS

- BAI, B. et al. [Effect of anti-opioid peptide sera on the enhancement of electroacupuncture analgesia induced by neurotensin in PAG of rats]. **Sheng Li Xue Bao**, v. 51, n. 2, p. 224-8, Apr 1999.
- BONET, I. J. et al. The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. **Neuropharmacology**, v. 65, p. 206-12, Feb 2013.
- BUDAI, D.; FIELDS, H. L. Endogenous opioid peptides acting at mu-opioid receptors in the dorsal horn contribute to midbrain modulation of spinal nociceptive neurons. **J Neurophysiol**, v. 79, n. 2, p. 677-87, Feb 1998.
- CARTER, G. T. et al. Side effects of commonly prescribed analgesic medications. **Phys Med Rehabil Clin N Am**, v. 25, n. 2, p. 457-70, May 2014.
- CHEN, W. H. et al. Acid-sensing ion channel 3 mediates peripheral anti-hyperalgesia effects of acupuncture in mice inflammatory pain. **J Biomed Sci**, v. 18, p. 82, Nov 09 2011.
- CHENG, K. J. Neurobiological mechanisms of acupuncture for some common illnesses: a clinician's perspective. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 7, n. 3, p. 105-14, Jun 2014.
- CHEN-YU, C. et al. Studies on spinal ascending pathway for effect of acupuncture analgesia in rabbits. **Sci Sin**, v. 18, n. 5, p. 651-8, Sep-Oct 1975.
- CHERNYAK, G. V.; SESSLER, D. I. Perioperative acupuncture and related techniques. **Anesthesiology**, v. 102, n. 5, p. 1031-49; quiz 1077-8, May 2005.
- DE FELICE, M.; OSSIPOV, M. H. Cortical and subcortical modulation of pain. **Pain Manag**, v. 6, n. 2, p. 111-20, Apr 2016.
- FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 110, n. 3, p. 1227-31, Nov 1993.
- FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 7, p. 565-75, Jul 2004.
- FLORES, J. A. et al. Opiate anti-nociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D1 (not D2) dopamine receptors. **Pain**, v. 110, n. 1-2, p. 205-14, Jul 2004.
- GAO, P. et al. Acupuncture: Emerging evidence for its use as an analgesic (Review). **Exp Ther Med**, v. 9, n. 5, p. 1577-1581, May 2015.
- GASKIN, D. J.; RICHARD, P. The economic costs of pain in the United States. **J Pain**, v. 13, n. 8, p. 715-24, Aug 2012.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Pain>>. Acesso em: 8 jun. 2016.

JOHANSEN, J. P.; FIELDS, H. L. Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 398-403, Apr 2004.

KAGITANI, F.; UCHIDA, S.; HOTTA, H. Afferent nerve fibers and acupuncture. **Auton Neurosci**, v. 157, n. 1-2, p. 2-8, Oct 28 2010.

KOTANI, N. et al. Preoperative intradermal acupuncture reduces postoperative pain, nausea and vomiting, analgesic requirement, and sympathoadrenal responses. **Anesthesiology**, v. 95, n. 2, p. 349-56, Aug 2001.

LAU, B. K.; VAUGHAN, C. W. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. **Curr Opin Neurobiol**, v. 29, p. 159-64, Dec 2014.

LI, A. et al. Electroacupuncture suppresses hyperalgesia and spinal Fos expression by activating the descending inhibitory system. **Brain Res**, v. 1186, p. 171-9, Dec 2007.

LI, C. et al. Mu Opioid Receptor Modulation of Dopamine Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: A Role in Regulation of Pain. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 8, p. 2122-32, Jul 2016.

LI, W. M. et al. Analgesic effect of electroacupuncture on complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in mice: a model of antipain treatment by acupuncture in mice. **Jpn J Physiol**, v. 55, n. 6, p. 339-44, Dec 2005.

LIU, W. et al. [The role of periaqueductal gray neurotensin in electroacupuncture analgesia]. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**, v. 13, n. 3, p. 253-6, Aug 1997.

LIU, X. [The modulation of cerebral cortex and subcortical nuclei on NRM and their role in acupuncture analgesia]. **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 21, n. 1, p. 4-11, 1996.

MEYER, P. J. et al. Contribution of dopamine receptors to periaqueductal gray-mediated antinociception. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 204, n. 3, p. 531-40, Jun 2009.

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

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol Biol**, v. 225, p. 115-21, 2003.

MUROTANI, T. et al. Possible involvement of histamine, dopamine, and noradrenalin in the periaqueductal gray in electroacupuncture pain relief. **Brain Res**, v. 1306, p. 62-8, Jan 08 2010.

NAGER, A. L. et al. Effects of acupuncture on pain and inflammation in pediatric emergency department patients with acute appendicitis: a pilot study. **J Altern Complement Med**, v. 21, n. 5, p. 269-72, May 2015.

NAHIN, R. L. Estimates of pain prevalence and severity in adults: United States, 2012. **J Pain**, v. 16, n. 8, p. 769-80, Aug 2015.

NAHIN, R. L. et al. Evidence-Based Evaluation of Complementary Health Approaches for Pain Management in the United States. **Mayo Clin Proc**, v. 91, n. 9, p. 1292-306, Sep 2016.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 8, n. 2, p. 143-51, Jun 2014.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **New York: Academic Press**. 2007.

PENNICK, V.; LIDDLE, S. D. Interventions for preventing and treating pelvic and back pain in pregnancy. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 8, p. CD001139, Aug 01 2013.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 111, n. 4, p. 409-19, Sep 01 1957.

RESNIK, D. B.; REHM, M.; MINARD, R. B. The undertreatment of pain: scientific, clinical, cultural, and philosophical factors. **Med Health Care Philos**, v. 4, n. 3, p. 277-88, 2001.

SHEN, E.; MA, W. H.; LAN, C. Involvement of descending inhibition in the effect of acupuncture on the splanchnically evoked potential in the orbital cortex of cat. **Sci Sin**, v. 21, n. 5, p. 677-85, Sep-Oct 1978.

TAGUCHI, R.; TAGUCHI, T.; KITAKOJI, H. Involvement of peripheral opioid receptors in electroacupuncture analgesia for carrageenan-induced hyperalgesia. **Brain Res**, v. 1355, p. 97-103, Oct 08 2010.

TAKESHIGE, C. et al. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. **Brain Res Bull**, v. 29, n. 5, p. 617-34, Nov 1992.

TOBALDINI, G. et al. Ascending nociceptive control contributes to the antinociceptive effect of acupuncture in a rat model of acute pain. **J Pain**, v. 15, n. 4, p. 422-34, Apr 2014.

VEITH, I. Acupuncture in traditional Chinese medicine. An historical review. **Calif Med**, v. 118, n. 2, p. 70-9, Feb 1973.

WALL, P. D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **J Physiol**, v. 188, n. 3, p. 403-23, Feb 1967.

WHITE, A.; ERNST, E. A brief history of acupuncture. **Rheumatology (Oxford)**, v. 43, n. 5, p. 662-3, May 2004.

WOOD, P. B. Role of central dopamine in pain and analgesia. **Expert Rev Neurother**, v. 8, n. 5, p. 781-97, May 2008.

YANG, E. J. et al. Contralateral electroacupuncture pretreatment suppresses carrageenan-induced inflammatory pain via the opioid-mu receptor. **Rheumatol Int**, v. 31, n. 6, p. 725-30, Jun 2011.

ZHANG, Y. et al. Electroacupuncture inhibition of hyperalgesia in an inflammatory pain rat model: involvement of distinct spinal serotonin and norepinephrine receptor subtypes. **Br J Anaesth**, v. 109, n. 2, p. 245-52, Aug 2012.

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

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-10, Jun 1983.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DO CEUA



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1035

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.164750/2016-14

APROVADO/APPROVAL: 06/12/2016 – R.O. 11/2015

TÍTULO/TITLE: Envolvimento de mecanismos dopaminérgicos na Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) no efeito da Acupuntura sobre os componentes sensorial e afetivo da dor em ratos

AUTORES/AUTHORS: Luana Fischer, Priscila Shizue Natume, Thaina Caldeiras Watanabe, Glaucia Tobaldini, Natalia Sardi

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia

Ana Vitória Fischer da Silva

Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA