

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ KOCHER MARTIN

ANÁLISE DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO ATRAVÉS DA ASSOCIAÇÃO DA
ACUPUNTURA TRADICIONAL E A LASER ACUPUNTURA COM A PREGABALINA
NO ACUPONTO E36 (ZUSANLI) EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2018

BEATRIZ KOCHEM MARTIN

**ANÁLISE DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO ATRAVÉS DA ASSOCIAÇÃO DA
ACUPUNTURA TRADICIONAL E A LASER ACUPUNTURA COM A
PREGABALINA NO ACUPONTO E36 (ZUSANLI) EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Biomedicina da Universidade Federal do
Paraná como requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profª Dra. Maria Fernanda de Paula
Werner

Co-orientadora: Profª Dra. Vanessa Erthal

CURITIBA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

BEATRIZ KOCHER MARTIN

ANÁLISE DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO ATRAVÉS DA ASSOCIAÇÃO DA ACUPUNTURA TRADICIONAL E A LASER ACUPUNTURA COM A PREGABALINA NO ACUPONTO E36 (ZUSANLI) EM CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de biomédico, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Fernanda Paula Werner
Orientadora-Departamento de Farmacologia
Setor Ciências Biológicas - UFPR

Profa. Dra. Joice Maria da Cunha
Departamento de Farmacologia
Setor Ciências Biológicas - UFPR

Profa. Dra. Cristina Aparecida Jark Stern
Departamento de Farmacologia
Setor Ciências Biológicas - UFPR

Curitiba, 14 de Dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que me inspira fé e confiança no amanhã. Além disso, criou esse universo maravilhoso para ser investigado e estudado.

Agradeço à minha família, principalmente meus pais, por todo sacrifício, apoio e carinho nessa minha caminhada. É muito gratificante saber que estão junto comigo e torcem pela minha felicidade.

Agradeço pelo apoio, carinho e paciência do Lucas Skocynski Lopes, meu namorado e companheiro, que acompanhou mais uma fase da minha vida.

Agradeço a minha professora e orientadora Maria Fernanda de Paula Werner pela orientação, paciência, carinho e dedicação comigo e para com todos. Sem o apoio e sua ajuda, com certeza esse trabalho não seria possível.

Agradeço ao Laboratório 201 pelo apoio, opiniões e auxílio nos experimentos, principalmente a Bruna Barbosa da Luz, Daniele Maria Ferreira, Jorge Luiz Dallazen, Paula Giovana Ciapparini, Luiza Ferreira e Fernando Tonholi Dal'Lin.

Agradeço a Vanessa Erthal pelo fornecimento do equipamento ASGaAl (830 nm) e pelo material da acupuntura manual. Foi de grande importância todo esse material para realização desse projeto científico.

Agradeço também a Monica, companheira de TCC, pela ajuda nos experimentos. Com certeza, sua ajuda foi muito importante.

Às vidas dos animais que foram utilizados neste estudo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradeço esta instituição pelo auxílio financeiro, e principalmente pelo interesse nesse estudo.

“Somente os tolos e os fanáticos estão sempre certos de tudo enquanto os sábios alimentam dúvidas. A ignorância traz muito mais certezas do que o conhecimento “.

Charles Darwin

RESUMO

A dor crônica é uma condição multifatorial que possui alta frequência populacional, com difícil diagnóstico e formas de intervenção muito limitadas pelos profissionais da saúde. Os tratamentos farmacológicos disponíveis para tratamentos de dores neuropática e inflamatória trazem muitos efeitos colaterais, dificultando a adesão do paciente a terapia, ou são ineficazes. Desse modo, terapias complementares como a acupuntura manual e a laser acupuntura podem ser uma alternativa para proporcionar melhoria na qualidade de vida do paciente. O objetivo desse trabalho foi analisar a atividade antinociceptiva da acupuntura manual e do laser acupuntura, no acuponto E36 (Zusanli), e também da Pregabalina. Além disso foi feita a associação da acupuntura manual e do laser acupuntura com baixas doses de Pregabalina (1 mg/kg e 10 mg/kg), afim de observar se existe uma interação farmacológica quando os animais foram submetidos ao teste de nocicepção. Os animais, camundongos Swiss machos, foram pré-tratados com a acupuntura manual, laser acupuntura e a Pregabalina e suas respectivas associações. Completados 30 minutos de pré-tratamento os animais foram submetidos ao teste de nocicepção química induzido por formalina. Nos resultados foi demonstrado que a Pregabalina reduziu a nocicepção nas doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg em 26 %, 29 % e 43 % na fase neurogênica, e em 34 %, 47 % e 52 % na fase inflamatória, respectivamente. A acupuntura manual foi capaz de reduzir em 59 % a nocicepção na fase inflamatória. A laser acupuntura apresentou atividade antinociceptiva em 43 % e 48 % na segunda fase, nas doses 10 J/cm² e 12 J/cm², respectivamente. A associação Pregabalina (1 mg/kg) - acupuntura manual e Pregabalina (10 mg/kg) - laser acupuntura não promoveu efeito antinociceptivo no teste da formalina em ambas as fases. A associação da Pregabalina (10 mg/kg) – acupuntura manual reduziu a nocicepção na fase neurogênica (28 %) e na fase inflamatória (66 %). Assim, a associação da Pregabalina (10 mg/kg) com a acupuntura manual apresentou uma tendência em promover uma maior redução da nocicepção em comparação ao tratamento feito isoladamente com a acupuntura manual e a Pregabalina (10 mg/kg). Estudos futuros são necessários para melhorar a compreensão da associação da Pregabalina com a acupuntura manual e a laser acupuntura, uma vez que o efeito antinociceptivo observado não foi estatisticamente diferente dos tratamentos isolados.

Palavras-chave: Acupuntura manual. Laser acupuntura. Pregabalina. Formalina. Nocicepção.

ABSTRACT

Chronic pain is a multifactorial condition that has a high frequency in population, with difficult diagnosis and very limited forms of intervention by health professionals. Pharmacological treatments for neuropathic and inflammatory pain have many side effects, difficulting patient's adherence to therapy, or sometimes are ineffective. Thus, complementary treatments such as manual acupuncture and laser acupuncture may be an alternative to provide improvement in the quality of life of the patient. The aim of this study was to analyze the antinociceptive activity of manual acupuncture and acupuncture laser, in acupuncture E36 (Zusanli), and also of Pregabalin. In addition, the combination of acupuncture and laser acupuncture with low doses of Pregabalin (1 mg/kg and 10 mg/kg) was performed in order to observe if there exists a pharmacological interaction when the animals were submitted to the nociception test. The animals, male Swiss mice, were pre-treated with manual acupuncture, acupuncture laser and Pregabalin and their respective associations. After 30 minutes of pretreatment, the animals were submitted formalin-induced chemical nociception test. The results showed that pregabalin at doses of 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg reduced the nociception in the neurogenic phase in 26%, 29% and 43%, and inflammatory phase in 34%, 47% and 52% respectively. Manual acupuncture reduce the nociception in the inflammatory phase in 59%. Laser acupuncture present an antinociceptive activity in the second phase in 43 % and 48 %, at doses of 10 J/cm² and 12 J/cm², respectively. The association Pregabalin (1 mg/kg) - manual acupuncture and Pregabalin (10 mg/ kg) - laser acupuncture did not reduce the formalin-induced nociception in both phases. The association of Pregabalin (10 mg/kg) - manual acupuncture reduced the nociception in the neurogenic phase (28%) and in the inflammatory phase (66%). Thus, the combination of Pregabalin (10 mg/kg) with manual acupuncture showed a tendency to promote a greater reduction of nociception compared to the treatment alone with acupuncture manual and Pregabalin (10 mg/kg). Further studies are necessary to improve the understanding about the association between Pregabalin with manual acupuncture and laser acupuncture since the antinociceptive effect observed was not statistically different when compared the isolated treatments.

Keywords: Manual acupuncture. Laser acupuncture. Pregabalin. Formalin. Nociception.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Vias descendentes da modulação da dor. Adaptado de PATHAN e WILLIAMS (2012).....	18
Figura 2. Localização do acuponto E36 em humanos. Adaptado de YOU et al., 2015.....	25
Figura 3. Localização anatômica do acuponto E36 em camundongos. Adaptado de ERTHAL (2016).....	25
Figura 4. Tratamento com acupuntura manual em camundongos.....	27
Figura 5. Aplicação do laser perpendicularmente no acuponto E36. Adaptado de ERTHAL (2016).....	28
Figura 6. Esquema representativo da associação da Pregabalina com a acupuntura manual.....	28
Figura 7. Esquema representativo da associação da Pregabalina com a laser acupuntura.....	29
Figura 8. Efeito do tratamento com acupuntura manual no acuponto E36 no teste de formalina.....	31
Figura 9. Efeito do tratamento com doses crescentes da laser - acupuntura no acuponto E36 no teste de formalina.....	32
Figura 10. Efeito do tratamento com Pregabalina no teste de formalina.....	33
Figura 11. Efeito da associação da Pregabalina (1 mg/kg) com a acupuntura manual no teste de formalina.....	34
Figura 12. Efeito da associação da Pregabalina (10 mg/kg) com a acupuntura manual no teste de formalina.....	35
Figura 13. Efeito da associação da Pregabalina (10 mg/kg) com a laser acupuntura no teste de formalina.....	36

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Parâmetros da Terapia Laser de Baixa potência que foram utilizados nesse estudo. Adaptado de ERTHAL et al., 2013.....	23
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS:

ROS – Espécies reativas de oxigênio
LOOH –Hidroperóxidos lipídicos
PGE2 –Prostaglandina E2
TNF- α – Fator de necrose tumoral
COX –Ciclooxigenase
LOX – Lipooxigenase
PGI2 –Prostaciclina E2
TXA2 –Tromboxano
COX-1 –Ciclooxigenase 1
COX-2 –Ciclooxigenase 2
AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais
 δ – delta
PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal
COX – Citocromo C oxidase
LLLT –Terapia laser de baixa potência
E36 – Estômago 36
ST36 – Stomach 36
i.pl – via intraplantar
i.p – via intraperitoneal
GSH – Glutathione forma reduzida
J – Joules
SNC – Sistema Nervoso Central
PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal
NRM – Núcleo Magno da Rafe
LC – Locus Ceruleus
NRPG - Núcleo Reticular Paragigantocelular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1.CONTEXTO E PROBLEMA.....	11
1.2. OBJETIVO	14
1.2.1. OBJETIVO GERAL	14
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
1.3. JUSTIFICATIVA.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. SINALIZAÇÃO NOCICEPTIVA.....	16
2.2. TRATAMENTO ATUAL DA DOR.....	18
2.3. ACUPUNTURA	21
2.3.1 Acupuntura Manual.....	22
2.3.2. Laser Acupuntura.....	22
2.4. ACUPONTO E36 (E36)	24
3. METODOLOGIA	26
3.1.ANIMAIS.....	26
3.2. NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA	26
3.3. ACUPUNTURA MANUAL NO ACUPONTO E36	27
3.4. LASER ACUPUNTURA NO ACUPONTO E36	28
3.5. DOSES DE PREGABALINA	28
3.6. ASSOCIAÇÃO DAS BAIXAS DOSES DE PREGABALINA COM A ACUPUNTURA MANUAL.....	29
3.7. ASSOCIAÇÃO DA BAIXA DOSE DE PREGABALINA COM A LASER ACUPUNTURA.....	29
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4. RESULTADOS	31
4.1. NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA	31

4.1.1. Acupuntura Manual.....	31
4.1.2. Laser Acupuntura.....	32
4.1.3. Pregabalina.....	32
4.1.4 Associação da Pregabalina com acupuntura manual	34
4.1.6 Associação da Pregabalina com a laser acupuntura	35
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTO E PROBLEMA

A dor é um dos principais motivos que leva os pacientes a procurarem atendimento médico, pois a condição dolorosa promove limitações físicas e funcionais, interferindo na qualidade de vida, na vida social, no trabalho e no bem-estar dos pacientes. A farmacoterapia convencional disponível nem sempre é a melhor opção para o paciente, pois surgem muitos efeitos colaterais e o efeito analgésico não é como esperado. Uma modalidade terapêutica alternativa é a acupuntura, que substitui ou complementa os tratamentos convencionais (YAMAMURA, 2004).

Desde 1979, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês, *International Association for the Study of Pain*) definiu a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano real ou potencial ao tecido ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER e MELZACK, 1999). No entanto, recentemente, a IASP adotou uma redefinição para conceituar dor: “A dor é uma experiência somática mutuamente reconhecível que reflete a apreensão de uma pessoa de ameaça à sua integridade física ou existencial” (COHEN; QUINTNER; VAN RYSEWYK, 2018). Segundo a IASP, a nova definição integra o nível de experiência pessoal ou da “primeira pessoa” (subjetivo) com a “segunda pessoa” referente à avaliação clínica (intervenção) para metas objetivas envolvendo outras pessoas. Esta redefinição é filosoficamente mais sólida, biologicamente relevante, clinicamente aplicável e significativa para pessoas com dor e para os profissionais de saúde envolvidos no tratamento da dor.

Segundo Kuner e Flor (2017), a dor é um importante fator de proteção, como quando encostamos em uma placa quente e retiramos rapidamente o local lesionado. Desta forma, a dor possui um papel biológico importante, pois é um processo adaptativo, que pode servir como um aviso de uma injúria sendo de extrema importância para a sobrevivência (SMITH; ANAND; RICE, 2016). De acordo com a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), 30 % da população brasileira (homens e mulheres) sofre ou se queixa de dores crônicas (DOR, 2014). A experiência dolorosa de cada indivíduo é subjetiva sendo influenciada pela interação de fatores

sociais, psicológicos e biológicos (MERSKEY, 1994; GATCHEL, 2004; PULVERS e HOOD, 2013).

A dor caracteriza-se pela sua complexidade. A susceptibilidade da dor não envolve apenas o estímulo nocivo, mas também é caracterizada pelos componentes emocional e sensorial, que podem influenciar o humor, motivação, expectativas e atenção (SMITH et al., 2017). Pacientes que se queixam de dor muitas vezes tem problemas sociais, depressão, incapacidade e perdas financeiras, o que leva a diminuição em sua qualidade de vida (PATEL, 2009). As abordagens existentes para o tratamento de dores crônicas comumente não são eficazes, necessitando de uma interação multidimensional da área da saúde para proporcionar o bem-estar do indivíduo de maneira efetiva.

Os tratamentos farmacológicos surgem como primeira opção de tratamento para dores agudas e crônicas. A utilização de medicamentos como anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais e analgésicos opioides são eficazes, porém apresentam tratamento clínico limitado devido a seus efeitos colaterais. Além disso, muitas vezes o paciente não responde aos tratamentos farmacológicos comuns.

Na dor crônica novos fármacos surgem como outra opção de tratamento. Um fármaco com ação principal anticonvulsivante, e mais recentemente aprovado para o tratamento de dores crônicas é a Pregabalina. Além disso, estudos demonstram sua eficácia no tratamento da fibromialgia. Porém, muitos pacientes não aderem ao tratamento de maneira adequada, por ocorrência de efeitos colaterais, como sonolência e problemas cognitivos (MOORE et al., 2009).

O *National Institutes of Health* (NIH) referendou a indicação da acupuntura, de forma isolada ou como coadjuvante, em várias doenças e agravos à saúde, tais como odontalgias pós-operatórias, náuseas e vômitos pós-quimioterapia ou cirurgia em adultos, dependências químicas, reabilitação após acidentes vasculares cerebrais, dismenorréia, cefaléia, epicondilite, fibromialgia, dor miofascial, osteoartrite, lombalgias e asma, entre outras (NIH Consensus Conference, 1997). Além disso, reforça que a técnica de acupuntura deve ser feita de maneira correta, com agulhas esterilizadas, pois caso feita de maneira inapropriada pode trazer sérios efeitos colaterais, injúria no sistema nervoso central, órgãos puncionados, infecções e pulmões colapsados (NIH, 2016).

Na laserterapia de baixa potência (LLLT), os acupontos da acupuntura são estimulados através da radiação laser, é uma técnica não invasiva, e o tempo de

duração da sessão é menor, apresentando muitas vantagens em relação a utilização da acupuntura tradicional. Além disso, a laser-acupuntura possui efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. Erthal e colaboradores (2016) demonstraram que a laser acupuntura no acuponto E36 apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos animais, diminuindo o edema e permeabilidade vascular, diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e glutatona na forma reduzida (GSH). Também, Erthal e colaboradores (2013) demonstraram que a radiação LASER de baixa potência no acuponto E36 apresentou efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção química no teste de formalina.

Dessa maneira a terapia complementar surge como uma alternativa para o tratamento de pacientes que não respondem a terapia farmacológica ou possuem muitos efeitos colaterais. Ou seja, empregar terapias não farmacológicas, como a acupuntura, associada ao tratamento farmacológico proporciona uma melhora na qualidade de vida do paciente.

Nesse contexto, uma abordagem ainda não explorada consiste em associar a laser acupuntura e a acupuntura manual com baixas doses de Pregabalina com a intenção de analisar se essa associação é benéfica em comparação ao tratamento farmacológico isolado. Dessa maneira, diminuindo as doses de Pregabalina, e fazendo sua associação com a acupuntura manual pode-se levar a hipótese que os efeitos colaterais seriam diminuídos e a analgesia aumentada.

1.2. OBJETIVO

1.2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto foi avaliar o efeito antinociceptivo da acupuntura manual e da laser acupuntura de baixa intensidade aplicadas no acuponto E36, bem como da Pregabalina, e da associação da acupuntura manual e da laser acupuntura com baixas doses de Pregabalina, afim de observar se existe uma interação farmacológica e uma redução da nocicepção nos animais submetidos ao teste da formalina 2,5 % (20 µL).

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto E36 (Zusanli) no modelo de nocicepção química induzida pela administração intraplantar de formalina 2,5 % (20 µL) em camundongos.

- Analisar o efeito antinociceptivo da radiação laser no acuponto E36 (Zusanli) no modelo de nocicepção química induzida pela administração intraplantar de formalina 2,5 % (20 µL) em camundongos.

- Investigar o efeito antinociceptivo de Pregabalina no modelo de nocicepção química induzida pela administração intraplantar de formalina 2,5 % (20 µL) em camundongos.

- Investigar se ocorre uma interação farmacológica do efeito antinociceptivo com a associação da acupuntura manual no acuponto E36 (Zusanli) com baixas doses de Pregabalina no modelo de nocicepção química induzida pela administração intraplantar de formalina 2,5 % (20 µL) em camundongos.

- Investigar se ocorre interação farmacológica do efeito antinociceptivo com a associação da aplicação do laser no acuponto E36 (Zusanli) com baixa dose de Pregabalina, no modelo de nocicepção química induzida pela administração intraplantar de formalina 2,5 % (20 µL) em camundongos.

1.3. JUSTIFICATIVA

A dor é a principal queixa que leva os indivíduos a procurarem serviços de saúde, pois se não tratada adequadamente, causa uma série de problemas físicos e sociais. A farmacoterapia surge então para tratar pacientes com dores agudas e crônicas, visto que ainda é o método mais utilizado pelo SUS. Tendo em vista que muitos indivíduos não respondem a terapia farmacológica de maneira adequada ou apresentam muitos efeitos colaterais que provocam desconforto e risco aos pacientes, a acupuntura tem sido considerada uma terapia complementar segura e eficaz. Porém, muitos pesquisadores ainda discutem sobre a efetividade e os benefícios que podem ser proporcionados pela acupuntura. A acupuntura manual é o método mais tradicional, e representa uma técnica já estabelecida, além dos efeitos conhecidos da sua terapêutica. Contudo, além de ser considerada uma técnica invasiva, muitos pacientes têm fobia de agulhas e preferem aderir a outro tipo de tratamento existente, como o farmacológico. Com isso, uma maneira alternativa seria usar a laser acupuntura, que consiste em tratamento rápido e com baixo risco de infecção. Estudos demonstram os benefícios que podem existir com a laser acupuntura, mas aspectos como o tipo de dor e a dose de exposição do laser (J/cm^2) podem interferir na sua eficácia. É importante diferenciar os conceitos de dose em farmacologia e dose do laser. Na laser acupuntura, o termo “dose” refere-se a densidade de energia por centímetro quadrado de luz que é direcionada para uma área (J/cm^2). Embora não tenha sido cientificamente comprovado, tem sido sugerido que a acupuntura tende a ser mais efetiva quando associada a outros tipos de tratamentos. Desse modo, a associação de terapias complementares, como a acupuntura manual e a laser acupuntura com o tratamento farmacológico pode ser uma alternativa para proporcionar uma melhor qualidade de vida. Devido aos benefícios associados à acupuntura manual e a laser acupuntura é válido comparar o efeito antinociceptivo promovido por esses métodos, como também analisar a correta dose de energia de exposição (J/cm^2). Nesse sentido, a realização do presente estudo é relevante em virtude da necessidade de pesquisa que abrange as novas técnicas terapêuticas existentes com o método tradicional da Medicina. Desta forma, objetivo geral desse trabalho é avaliar o efeito antinociceptivo da associação das baixas doses da Pregabalina com a acupuntura manual e a laser acupuntura no acuponto E36 (Zusanli).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. SINALIZAÇÃO NOCICEPTIVA

Os nociceptores são terminações nervosas sensoriais livres, responsáveis pela detecção do estímulo nocivo. Além de atuar de maneira a proteger o organismo de qualquer injúria, também garante proteção através da sensibilização, processo que ocorre após o estímulo nocivo ocorrer repetidamente ou de maneira intensa (LATREMOLIERE e WOOLF, 2009; GOLD e GEBHART, 2010). Assim, o mecanismo de proteção garante que o membro lesionado não entre em contato com estímulos que causem dor. A sensibilização representa o fenômeno em que ocorre uma modificação funcional dos neurônios e das vias nociceptivas (DACH, 2010). Quando a sensibilização passa a ser persistente, começa a prejudicar o organismo. Nesses casos, a dor pode ser ocasionada por um estímulo que antes não era percebido como doloroso ou nocivo (alodinia) ou a sensibilidade dolorosa pode ser aumentada frente a um estímulo que causa dor (hiperalgesia). Podem ocorrer dois tipos de sensibilização: periférica e central. A sensibilização periférica ocorre em decorrência da estimulação persistente e/ou redução do limiar de sensibilidade dos nociceptores, levando ao aparecimento de hiperalgesia primária e secundária. Já na sensibilização central ocorre modificações no estado funcional dos neurônios centrais (plasticidade neuronal), devido a redução do limiar ou aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do corno dorsal. (LATREMOLIERE e WOOLF, 2009).

O componente sensorial doloroso pode ser compreendido quando o estímulo nocivo é reconhecido pelos nociceptores, os quais traduzem essa informação em potenciais de ação e o impulso nervoso é transmitido ao Sistema Nervoso Central (FEIN, 2012). Os nociceptores apresentam terminações nervosas livres, representados por fibras aferentes sensoriais do tipo C e A δ , cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios trigeminiais e nos gânglios da raiz dorsal (GRD). (KUNER e FLOR, 2017).

Neurônios aferentes primários detectam estímulos dolorosos (químicos, térmicos e/ou mecânicos), conduzem e transmitem essa informação ao corno dorsal da medula, realizando sinapses com neurônios nociceptivos secundários. Os neurônios de segunda ordem são ativados através da liberação de

neurotransmissores (glutamato, substância P, TNF- α , prostaglandinas, entre outros), que emitem suas projeções ao tálamo. Posteriormente, estes realizam outra sinapse com um terceiro neurônio encefálico, que emite projeções para o sistema límbico (emocional) e para o córtex cerebral (onde ocorre a discriminação da qualidade, intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo). Além da liberação desses neurotransmissores que ativam fibras aferentes que levam a informação nociceptiva, existem os neurotransmissores que inibem a excitação dos neurônios de segunda ordem na presença do estímulo nocivo. Esse mecanismo é conhecido como via descendente inibitória da dor, da qual fazem parte a substância cinzenta periaquedutal (PAG), Hipotálamo, Tálamo, Núcleo Reticular Paragigantocelular (NRPG), Núcleo Magno da Rafe (NRM), Locus Ceruleus (LC) e Corno Dorsal da Medula, os quais expressam receptores opioides que participam da modulação da dor. A alta expressão de receptores opioides e seus ligantes endógenos nas regiões supracitadas promovem analgesia através da via descendente inibitória, mais especificamente na PAG e NRPG. Na PAG, LC e no NRPG, neurônios descendentes inibitórios são ativados e aumentam a liberação de neurotransmissores como serotonina, noradrenalina e encefalinas no NRM cuja projeções são emitidas ao corno dorsal da medula. Assim, diminuem a transmissão nociceptiva de fibras aferentes em direção ao tálamo. Portanto, esse ligantes endógenos atuam indiretamente inibindo a transmissão na medula espinhal ou ligam-se aos receptores opioides na periferia, inibindo diretamente a fibra nociceptiva aferente, conforme demonstrado na Figura 1 (PATHAN e WILLIAMS, 2012).

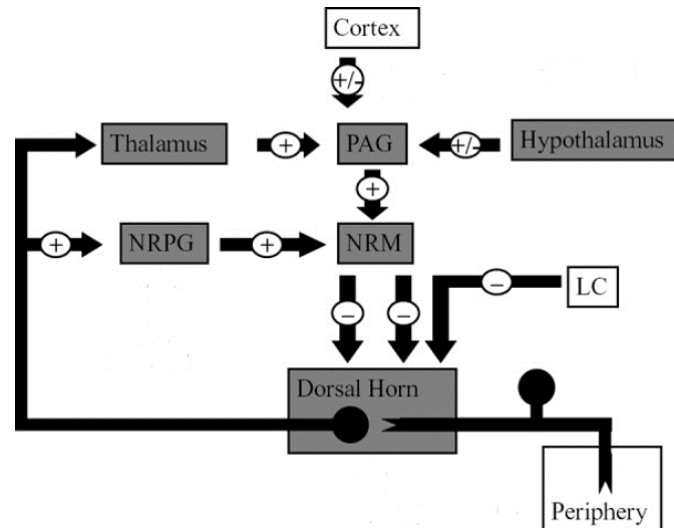


Figura 1. Vias descendentes da modulação da dor. Adaptado de PATHAN e WILLIAMS (2012).

2.2. TRATAMENTO ATUAL DA DOR

Existem diferentes classificações para a dor. Podem ser classificadas conforme sua natureza: dor nociceptiva, neuropática ou inflamatória. Na dor nociceptiva o estímulo nocivo (térmico, mecânico ou químico) faz a transdução do sinal na periferia, em que fibras aferentes nociceptivas C e A δ conduzem esse sinal à medula espinhal e depois em direção ao córtex. Na inflamação, mediadores inflamatórios são liberados que ativam ou modificam a resposta desse estímulo por fibras aferentes que por consequência modificam a percepção desse estímulo no Sistema Nervoso Central. Na dor neuropática uma lesão ou doença que acomete o Sistema Nervoso Central ou Periférico ocasionando modificações no funcionamento do sistema somatossensorial. Outra classificação para dor é a duração do fenômeno. A dor aguda ou fisiológica tem duração limitada, induz respostas protetoras, como o reflexo de retirada, e sua intensidade tende a diminuir com o tempo (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

A resposta inflamatória é caracterizada por 5 sinais cardinais: calor, rubor, edema, dor e perda de função. Quando ocorre lesão tecidual os fosfolípidios de membrana são metabolizados por duas vias: a das ciclo-oxigenases (COX) e as lipooxigenases (LOX). O ácido araquidônico é metabolizado gerando prostaglandinas (PGE₂), prostaciclina (PGI₂) e tromboxano (TXA₂) pela via da COX. Para o tratamento da dor resultante de doenças inflamatórias, são usados os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que bloqueiam a COX, impedindo a conversão

do ácido araquidônico para prostaglandinas, e conseqüentemente diminuindo a inflamação. A COX possui duas isoformas, COX-1 (associada à produção de prostaglandinas e resulta em diversos efeitos fisiológicos) e COX-2 (presente em sítios inflamatórios). Inibidores não seletivos para as isoformas COX-1 e COX-2 apresentam efeitos colaterais, principalmente no trato gastrointestinal (úlceras). Com o desenvolvimento de novos fármacos com maior seletividade para COX-2 (Celecoxibe, nome comercial **Celebra®**) os efeitos colaterais gástricos tendem a diminuir devido a produção de COX-1 não ser inibida, assim as prostaglandinas produzidas levam a produção de muco. Esse mecanismo é essencial para proteger o estômago dos efeitos corrosivos dos ácidos produzidos. Contudo, essa classe deve ser usada com cautela ou evitada em pacientes com problemas cardiovasculares (OLIVEIRA et al., 2016; MATHEW; KIM; ZEMPSKY, 2016). Nesse sentido, os AINEs causam muitos efeitos colaterais (úlceras pépticas, disfunção renal, insuficiência cardíaca), limitando seu uso.

Além dos AINEs, podem ser utilizados anti-inflamatórios esteroidais como a dexametasona. Sua ação anti-inflamatória é devida sua ligação no receptor intracelular que regula a transcrição gênica, inibindo a síntese de vários mediadores pró- inflamatórios (PGE₂, citocinas, entre outros) (OLIVEIRA et al., 2016; CARNEIRO et al., 2014).

Os analgésicos opioides, como morfina, fentanil e codeína, atuam por meio de receptores metabotrópicos acoplados a proteína Gi, abrem canais de K⁺ (hiperpolarizando os neurônios nociceptivos) e inibem canais de Ca²⁺ na membrana, diminuindo a liberação de neurotransmissores excitatórios. São utilizados pela sua ação analgésica potente, com destaque para a morfina, com uso hospitalar. Possui muitos efeitos colaterais que limitam seu uso, como dependência, euforia/disforia, depressão respiratória, constipação e náuseas (HILAL-DANDAN e BRUNTON, 2013; PATHAN e WILLIAMS, 2012).

As dores crônicas resultantes de lesão ou doenças que acometem o sistema somatosensorial, comprometendo estruturas do sistema nervoso periférico ou central são conhecidas como dores neuropáticas (IASP, 2017). As dores neuropáticas exibem uma característica comum, ou seja, alteram a relação entre o estímulo (doloroso ou não) e a resposta. Segundo a SBED, cerca de 50 a 60 % de pessoas que sofrem com dores crônicas ficam parcialmente ou totalmente incapacitados, afetando sua qualidade de vida de modo significativo.

A dor neuropática pode apresentar manifestações de várias formas, como sensação de queimação, peso, agulhadas, ferroadas ou choques. Existem alguns fatores que podem levar ao surgimento de dores neuropáticas como doenças infecciosas, traumas, diabetes mellitus, acidentes, entre outros fatores. O tratamento farmacológico varia conforme a doença e o estágio em que se encontra. O efeito do tratamento farmacológico pode variar conforme o paciente, pela tolerância aos fármacos com propriedades analgésicas. Entre as opções de tratamento disponíveis encontram-se os fármacos os antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes (ZHANG; DENG; MCALONAN, 2017; YADAV e WENG, 2017).

Para o tratamento de dores neuropáticas foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) o anticonvulsivante Pregabalina. A Pregabalina é usada como terapia adjuvante em dores neuropáticas e no tratamento da fibromialgia. A administração desse fármaco é feita por via oral e as doses diárias que promovem analgesia podem variar entre 300 a 600 mg/kg. Contudo, sonolência, tontura, visão turva, boca seca, edema e ganho de peso são alguns efeitos colaterais que podem ser observados (CROSS e SHERMAN, 2017). Dados clínicos mostram o aumento do uso de Pregabalina para o tratamento de dores neuropáticas e fibromialgia. Em 2016, a Pregabalina, conhecida como Lyrica[®], vendeu cerca de \$ 4,4 bilhões de dólares (EIPE et al., 2015). Embora a estrutura química da Pregabalina apresente semelhança com o GABA, este fármaco não interage com receptores GABAérgicos, mas atua por meio da modulação da subunidade $\alpha 2\delta$ de canais de cálcio voltagem dependente, diminuindo o influxo de cálcio e consequentemente a despolarização neuronal, reduzindo a liberação de neurotransmissores excitatórios. Dessa maneira, a Pregabalina apresenta propriedades analgésicas, anti-epilépticas e ansiolíticas (MOORE et al., 2009). O aumento da prescrição da Pregabalina é devido a sua eficácia, que por consequência diminui o uso de opioides (HILAL-DANDAN e BRUNTON, 2013). Porém, casos clínicos indicam tolerância e dependência no uso de gabapentinóides (BONNET e SCHERBAUM, 2017; GOODMAN e BRETT, 2017). Portanto, estudos de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da dor crônica e aguda são muito relevantes. Nesse sentido, existem técnicas não medicamentosas, como a acupuntura, que são capazes de produzir efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, e que pode constituir uma potencial terapia para esses pacientes (TING e SCHUG, 2016; FUDIN e ATKINSON, 2017).

2.3.ACUPUNTURA

A acupuntura é uma técnica terapêutica da medicina tradicional chinesa em que pontos do corpo, chamados de acupontos, são estimulados por meio de agulhas, ventosas, moxas ou radiação laser. A acupuntura é considerada uma terapia complementar segura e tolerável, sendo amplamente utilizada para tratar doenças neurológicas, distúrbios musculoesqueléticos e inclusive para o tratamento da dor (SUN et al., 2017; YUAN et al., 2016). Já existem estudos que demonstram resultados positivos para o tratamento de dores lombares, osteoartrite, dor associada ao câncer e para dor pós-operatória (XIANG et al., 2017). O tratamento pela acupuntura envolve várias teorias para obtenção do equilíbrio corporal como a Yin-Yang, como princípio a renovação do fluxo de energia “deqi” e Xue (sangue) que percorre os canais de energia (YUAN et al., 2016). Caso ocorra algum desequilíbrio nessa passagem pelos canais de energia, seja pelo excesso ou deficiência, leva a surgir a doença (O’CONNOR e BENSKY, 1981).

Os acupontos são localizados no trajeto dos meridianos, próximos a locais onde existem muitas terminações nervosas, existindo aproximadamente 361 acupontos ao longo do corpo (ZHAO, 2008). A estimulação do acuponto ativa fibras nervosas aferentes e produz efeitos terapêuticos como analgesia. Os tipos de fibras que serão ativadas dependem da maneira como ocorre a manipulação da agulha, além da sensibilização dos indivíduos (MEYER et al., 2005). Além disso, outras práticas de acupuntura foram desenvolvidas, em que todos os pontos de tratamento são localizados num único lugar, podendo ser orelha, pé ou mão, e podem ser utilizados juntamente com a acupuntura tradicional (O’CONNOR e BENSKY, 1981; SOLIMAN et al., 1999).

Os mecanismos analgésicos e anti-inflamatórios da acupuntura podem ser explicados pela ativação do eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal), e o controle descendente inibitório da dor, que envolve a liberação de opioides endógenos. A acupuntura ativa esse eixo HPA, em conjunto com uma interação neuroimune dependente de vias colinérgicas e anti-inflamatórias (CHO et al., 2006). A analgesia decorrente da estimulação da via descendente inibitória é provocada pela liberação principalmente dos seguintes peptídeos opioides endógenos: β -endorfinas, dinorfinas e encefalinas que irão atuar em receptores Mu (μ), Delta (δ) e Kappa (κ). O sistema

opioidérgico endógeno está distribuído pelo SNC e periférico, modulando a percepção do estímulo doloroso (CHO et al., 2006; CHO; HWANG; WONG, 2006).

Na clínica, o acupunturista realiza uma anamnese do paciente e conforme seu histórico realiza o tratamento mais adequado. É o acupunturista que interpreta as informações fornecidas pelo paciente e determina quais pontos de tratamento serão utilizados. O tratamento dos acupontos envolve a inserção da agulha e sua manipulação, podendo variar o tempo de duração e sua intensidade. Portanto, o acupunturista determina o tratamento mais adequado para restaurar o fluido energético (WHITTAKER, 2004).

2.3.1 Acupuntura Manual

A acupuntura manual é uma técnica em que agulhas metálicas finas são inseridas e manipuladas na pele em pontos específicos do corpo (acupontos) conforme as necessidades do indivíduo. A inserção da agulha constitui um estímulo sensorial físico, cuja intensidade, frequência, duração e intervalo levam inicialmente a ativação de fibras C e A δ , liberando mediadores pró-inflamatórios, como a histamina, a bradicinina, prostaglandinas, serotonina ATP, entre outros (ZHANG et al, 2012). Durante o agulhamento, a sensação percebida pelo paciente é descrita como dor, peso, distensão e dormência ao redor do acuponto estimulado (LANGEVIN et al., 2001; KONG et al., 2005; MACPHERSON e ASHGAR, 2006; ZHAO, 2008). A analgesia provocada pela agulha ao estimular as fibras periféricas é obtida pela modulação do sistema ascendente e descendente da dor. A nível encefálico, a analgesia é modulada pelo o sistema descendente inibitório endógeno da dor, como citado anteriormente. Participam dessa modulação regiões do encéfalo: como a PAG com a liberação de GABA e opioides; NMR com a liberação de serotonina e LC que libera noradrenalina. Além disso, opioides endógenos também promovem analgesia ao atuar nas fibras nociceptivas periféricas (ZHAO, 2008; OKADA; KAWAKITA, 2009; HU et al., 2017; GOLDMAN; CHEN; FUJITA, 2010).

2.3.2. Laser Acupuntura

A laser acupuntura é a técnica em que os pontos de acupuntura tradicionais são estimulados usando uma radiação laser não térmica e de baixa intensidade

(NAMAZI et al., 2017; ERTHAL E BAGGIO, 2013). O LASER mais utilizado na acupuntura e que será utilizado nesse estudo é o que usa fonte radioativa de arsenieto de gálio de alumínio (AsGaAl), podendo emitir comprimento de onda 780-870 nm, potência entre 20-100 mW, luz contínua ou pulsada e atingindo um pico de penetração de 2-3 cm (WITTAKER, 2004), conforme ilustrado na Tabela 1. No acuponto, o laser produz energia luminosa capaz de induzir uma ação que provoca efeitos fotobiológicos nas células e tecidos. É um tratamento rápido, não invasivo, não provoca dor e tem baixo risco de infecção. (DE OLIVEIRA et al., 2016). É uma técnica alternativa associada a acupuntura, principalmente quando pacientes apresentam fobias de agulhas. Além disso, o tratamento com acupuntura manual pode trazer algumas complicações com transmissão de hepatite e pneumotórax (ERNEST e WHITE, 1997; PEUKER et al., 1999).

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Modelo	Laserpulse (IBRAMED)	Potência	30 mW
Aparelho	GaAlAs	Tempo irradiação	24" 40" 48"
Comprimento de onda	830 nm	Radiação	6 J/cm ² 10 J/cm ² 12 J/cm ²
Modo de operação	Contínuo	Área irradiada	2 mm ²

Tabela 1. Parâmetros da Terapia Laser de Baixa potência que foram utilizados nesse estudo. Adaptado de ERTHAL et al., 2013.

Lanvegin e colaboradores (2001 e 2002) sugerem em seus estudos que embora a ativação das fibras periféricas ocorra de maneira diferente na acupuntura manual e na LASER acupuntura, a conversa cruzada das vias de transdução de sinal ocorre de maneira similar. Por exemplo, a reorganização do colágeno, através da penetração da agulha na pele, é importante para ativação das vias de transdução do sinal. Do mesmo modo ocorre para o laser, que o efeito mediado por fótons também se faz importante para os processos seguintes.

Baxter (1994) e Karu (1998) demonstraram que os comprimentos de onda na faixa entre 810-840 nm possuem uma maior capacidade de penetração na pele, sendo que o LASER AsGaAl alcança uma profundidade média de 2 a 5 cm. Os cromóforos superficiais (biomoléculas excitáveis por fótons) transformam essa energia em determinados processos biológicos. Os cromóforos, principalmente o citocromo C oxidase (COX) acceptor primário, absorve a luz UV e converte oxigênio em energia (ATP) através da fosforilação oxidativa. O óxido nítrico impede o funcionamento normal da fosforilação oxidativa. A laser terapia de baixa intensidade (LLLT) é capaz de reverter esse bloqueio da fosforilação oxidativa e impede a ligação do óxido nítrico, que está em excesso, com o citocromo C. A longo prazo, a luz emitida pela LLLT tem sua faixa ótima em 810 nm, a qual leva a mitocôndria a gerar moléculas sinalizadoras que ativam fatores transcricionais promovendo deposição matriz extracelular, proliferação e motilidade celular (COTLER et al., 2015).

Em relação à comunidade científica, muitas dúvidas ainda persistem em relação ao seu efeito analgésico para dores agudas e crônicas, principalmente em relação aos parâmetros usados como comprimento de onda, frequência de exposição e tempo de aplicação (ERTHAL et al., 2013; HUANG et al., 2009).

2.4. ACUPONTO E36 (E36)

Segundo YIM e colaboradores (2007), o acuponto E36 (estômago 36) ou ST36 (do inglês *stomach* 36), também conhecido como ZUSANLI é utilizado na clínica para o tratamento da asma, hipertensão, gastrite, inflamação e dor (TORRES-ROSAS et al., 2014). Esse acuponto em humanos se localiza abaixo do joelho, quatro dedos abaixo da margem inferior da patela e um dedo lateral da crista anterior da tíbia, ilustrado na Figura 2 (YOU et al., 2015). Em animais localiza-se entre a tíbia e a fíbula, aproximadamente 5 mm lateral ao tubérculo anterior da tíbia, conforme demonstrado na Figura 3 (MEDEIROS et al., 2003). Os acupontos dos animais são transpostos dos humanos e cada acuponto pertence a um meridiano por onde fluem os canais de energia.

O acuponto E36 pertence ao meridiano do estômago, que possui 45 acupontos, distribuídos da cabeça ao pé. Estudos demonstram que o tratamento com a acupuntura no acupontos E36 traz efeitos: diminuição de crises asmáticas (WOU e LIU, 2007), prevenção de infecções (YUAN et al., 2016) e atenua a resposta

inflamatória (XIA et al., 2014). Dessa maneira, o acuponto E36 foi selecionado para investigação neste estudo, principalmente pela sua atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, como já visto na literatura (ERTHAL et al., 2014; XIA et al., 2014).

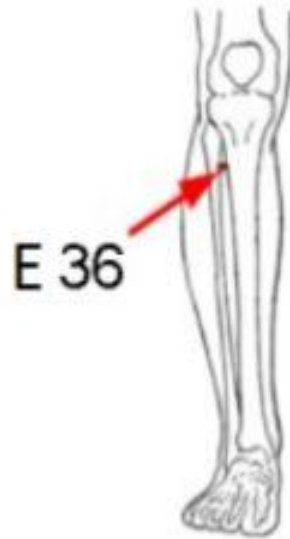


Figura 2. Localização do acuponto E36 em humanos. Adaptado de YOU et al., 2012.

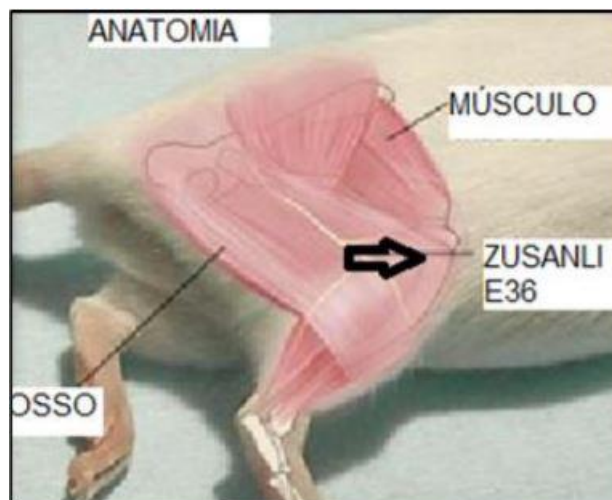


Figura 3. Localização anatômica do acuponto E36 em camundongos. Adaptado de ERTHAL (2016).

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos com camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) adultos pesando 30-40 g, alojados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sob um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 07:00 horas), com acesso a ração (Nuvilab CR-1, Quimtia S/A, Brasil) e água. Os animais foram aclimatados no laboratório durante pelo menos 1 h antes do teste.

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Universidade Federal do Paraná e foram submetidos ao Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (protocolo aprovado nº 1189).

3.2. NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

O modelo de nocicepção química usado para investigação dos efeitos antinociceptivos da Pregabalina e acupuntura (manual ou laser) foi o teste de formalina, de acordo com o método proposto por TJØLSEN e colaboradores (1992). Para tanto, os animais foram aclimatizados em funis de vidro, em uma superfície plana com espelhos posicionados atrás dos funis, durante 20 minutos antes da injeção intraplantar de formalina. Completado o tempo de pré-tratamento foi injetada pela via intraplantar 20 μL de uma solução de formalina a 2.5 % na superfície dorsal da pata traseira direita. Os animais foram recolocados individualmente nos funis de vidro e foi contabilizado o número de vezes que ocorre o comportamento de lambidas, reação que corresponde ao comportamento nociceptivo, sendo que a fase 1 (dor neurogênia ou aguda) é considerada no intervalo de 0-5 minutos, estando relacionada com a estimulação direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e A δ , e a fase 2 (inflamatória) é considerada no intervalo de 15-30 minutos, relacionado a liberação de mediadores pró-inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas, entre outros.

3.3.ACUPUNTURA MANUAL NO ACUPONTO E36

De acordo com YIM e colaboradores (2007) o acuponto E36 é um acuponto bem caracterizado e conhecido na Medicina Tradicional Chinesa. Localiza-se entre a tíbia e a fíbula, aproximadamente 5 mm lateral ao tubérculo anterior da tíbia (MEDEIROS et al., 2003). Os animais foram contidos em funis de vidro, onde a estimulação da acupuntura manual foi na pata direita e feita com agulha de aço inoxidável (0,17 X 7 mm). A inserção da agulha foi realizada de maneira oblíqua e houve a manipulação da agulha, girada 180 graus no sentido horário e anti-horário por 1-2 segundos. Depois o animal retornou ao funil de vidro onde permaneceu num intervalo de tempo 10 minutos com a agulha posicionada no acuponto E36, conforme demonstrado na Figura 4. Aconteceu a observação do comportamento dos animais, evitando assim sinais de estresse e também se permaneceram acordados. Completados 30 minutos de pré-tratamento, foi injetado via intraplantar nos animais formalina 2,5% (20 µL) e a nocicepção foi avaliada conforme descrita anteriormente. Animais do grupo controle não receberam a acupuntura.

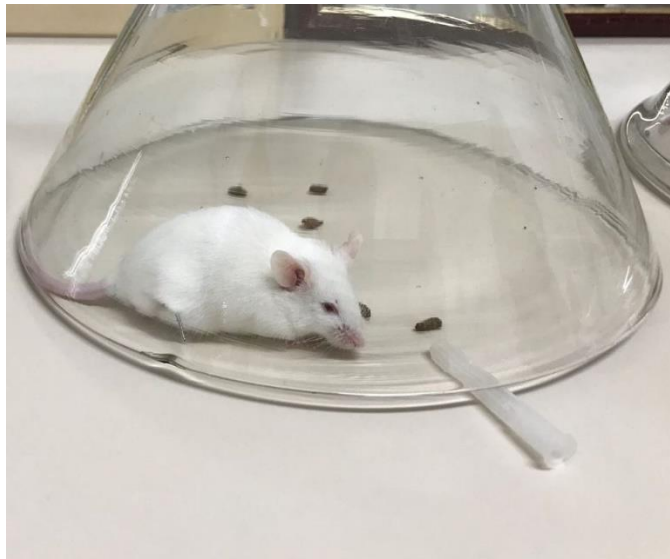


Figura 4. Tratamento com acupuntura manual em camundongos.

3.4. LASER ACUPUNTURA NO ACUPONTO E36

Neste experimento, foi utilizado o equipamento LASER AsGaAl, modelo LASERPULSE, fabricado pela IBRAMED, Brasil. Este equipamento possui dois canais de laser vermelho com as seguintes características: comprimento de onda 830 nm (modo contínuo), densidade de energia em 6 J/cm², 10 J/cm² e 12 J/cm² e potência de 30 mW, área de irradiação em 2 mm². A aplicação do laser acupuntura teve duração de 24 segundos (6 J/cm²), 40 segundos (10 J/cm²) e 48 segundos (12 J/cm²), como demonstrado na Figura 5. Após 30 minutos, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 2,5% (20 µL) e a nocicepção foi avaliada conforme descrito anteriormente. Estudos prévios demonstram que grupos SHAM e laser off não tiveram diferença na resposta do comportamento nociceptivo (ERTHAL et al., 2013). Para diminuir o uso de animais foi utilizado apenas o grupo controle, que não receberam acupuntura.



Figura 5. Aplicação do laser perpendicularmente no acuponto E36. Adaptado de ERTHAL (2016).

3.5. DOSES DE PREGABALINA

Os camundongos foram pré-tratados com Pregabalina (1, 10, 100 mg/kg, i.p) ou veículo (salina, 10 ml/kg) e completados 30 minutos os animais receberam uma

injeção intraplantar de formalina 2,5% (20 μ L) e a nocicepção foi avaliada conforme descrita anteriormente. Nos experimentos foi utilizado Pregabalina (Dorene®, Achê), diluída em solução salina (cloreto de sódio 0,9%).

3.6. ASSOCIAÇÃO DAS BAIXAS DOSES DE PREGABALINA COM A ACUPUNTURA MANUAL

Os animais foram pré-tratados com Pregabalina (1 mg/kg ou 10 mg/kg i.p) e então receberam a acupuntura manual no acuponto E36, conforme descrito anteriormente, durante 10 minutos (Figura 6). Passados 30 minutos, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 2,5 % (20 μ L) e foi avaliado se ocorreu uma maior redução da atividade nociceptiva.

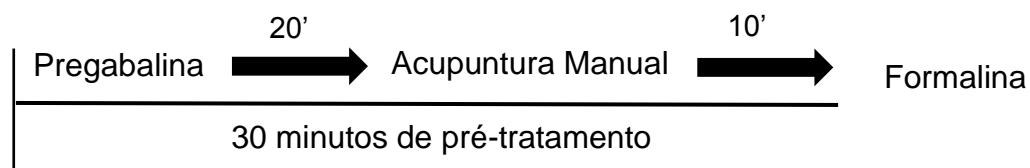


Figura 6. Esquema representativo da associação da Pregabalina com a acupuntura manual.

3.7. ASSOCIAÇÃO DA BAIXA DOSE DE PREGABALINA COM A LASER ACUPUNTURA

Os animais foram pré-tratados com Pregabalina (10 mg/kg i.p) e então receberam a laser acupuntura no acuponto E36, 10 J/cm², por 40 segundos (Figura 7). Completados 30 minutos, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 2,5 % (20 μ L) e foi avaliado se ocorreu uma maior redução efeito antinociceptivo.

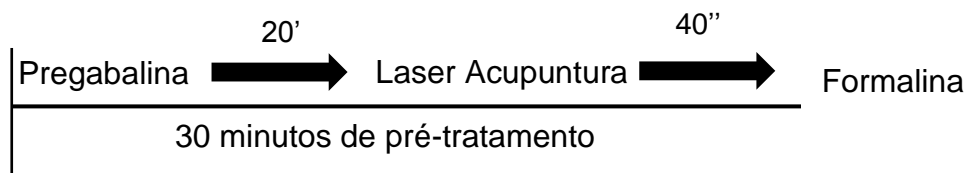


Figura 7. Esquema representativo da associação da Pregabalina com a laser acupuntura.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística entre os grupos dos experimentos que receberam a acupuntura manual e a laser acupuntura, e as associações entre acupuntura manual e Pregabalina, e a laser acupuntura e Pregabalina foram feitas pelo teste T de Student não pareado. A análise do pré-tratamento das doses de Pregabalina (1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg) e da laser acupuntura (6 J/cm², 10 J/cm² e 12 J/cm²) foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Os valores de $P < 0.05$ foram considerados como indicativo de significância. Foi utilizado o software GraphPad Prism® versão 5.0 (San Diego, CA: 2008) para análise e representação gráfica dos resultados

4. RESULTADOS

4.1. NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

4.1.1. Acupuntura Manual

O tratamento dos animais com a acupuntura manual (AM) não modificou o comportamento nociceptivo na fase I (Figura 8A). Já na fase II a acupuntura manual inibiu o comportamento nociceptivo em 59 % (Figura 8B).

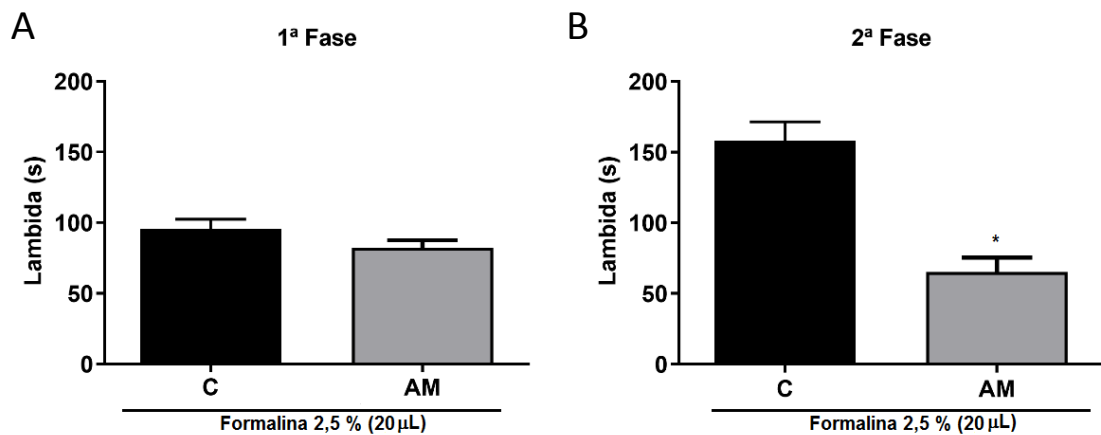


Figura 8. Efeito do tratamento com acupuntura manual no acuponto E36 no teste de formalina. Animais foram pré-tratados com a acupuntura manual por um tempo de 10 minutos antes da injeção da formalina (2,5%, 20 μL i.pl). Completados 30 minutos foi feito a contagem do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada durante as fases I (fase neurogênica, Figura 8A) e II (fase inflamatória, Figura 8B). Os dados foram analisados pelo teste T de Student não pareado e cada ponto ou barra representa a média ± E.P.M do tempo de lambida da pata em s (n=8). Grupo C representa animais controle, que não receberam pré-tratamento com a acupuntura manual, e grupo AM representa acupuntura manual. Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo C (*P≤0,05).

4.1.2. Laser Acupuntura

A aplicação de diferentes doses do Laser não reduziu a nocicepção na fase I (Figura 9A). Contudo, na segunda fase o laser acupuntura reduziu o comportamento nociceptivo em 43 %, quando aplicado na dose de 10 J/cm² e em 48 % na dose de 12 J/cm² (Figura 9B).

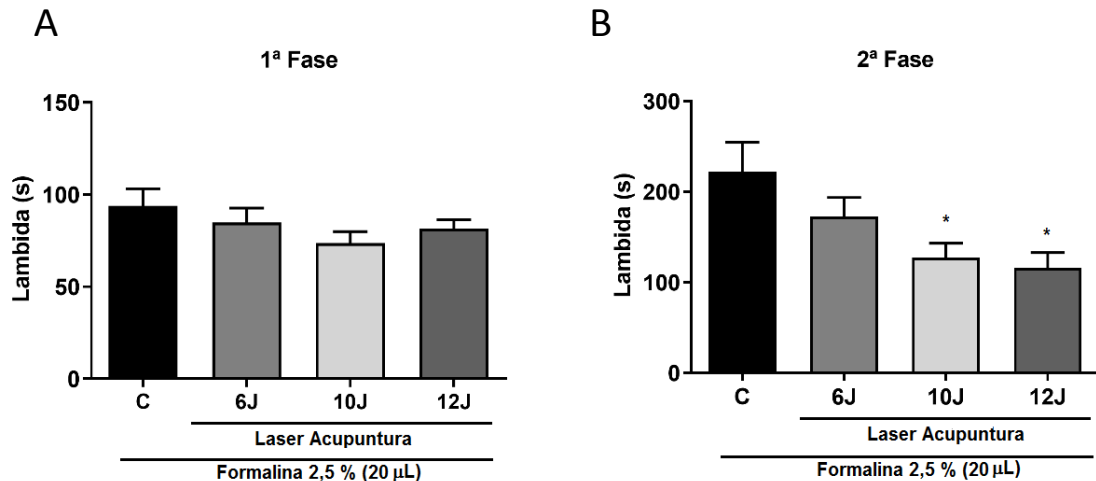


Figura 9. Efeito do tratamento com doses crescentes da laser - acupuntura no acuponto E36 no teste de formalina. Animais foram pré-tratados com laser (6 J/cm², 10 J/cm² e 12 J/cm²) pelo tempo de 24, 40 e 48 segundos, respectivamente, antes da injeção da formalina (2,5%, 20 µL i.pl). Completados 30 minutos foi feito a contagem do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada durante as fases I (fase neurogênica, Figura 9A) e II (fase inflamatória, Figura 9B). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni e cada ponto ou barra representa \pm E.P.M do tempo de lambida da pata em s (n=8). Grupo C representa animais controle, que não receberam pré-tratamento com o laser. Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo C (* P \leq 0,05).

4.1.3. Pregabalina

A injeção de formalina via i.pl induziu uma resposta característica que pode ser dividida em duas fases: fase I (0-5 min, Figura 10A) e fase II (15-30 min, Figura 10B). O tratamento dos animais com Pregabalina, nas doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg reduziu o comportamento nociceptivo nos primeiros 5 minutos (26 %, 29 % e

43 %, respectivamente) quando comparados ao grupo veículo. Na fase II as doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg também foram capazes de reduzir o comportamento nociceptivo em 34 %, 47 % e 52 % respectivamente.

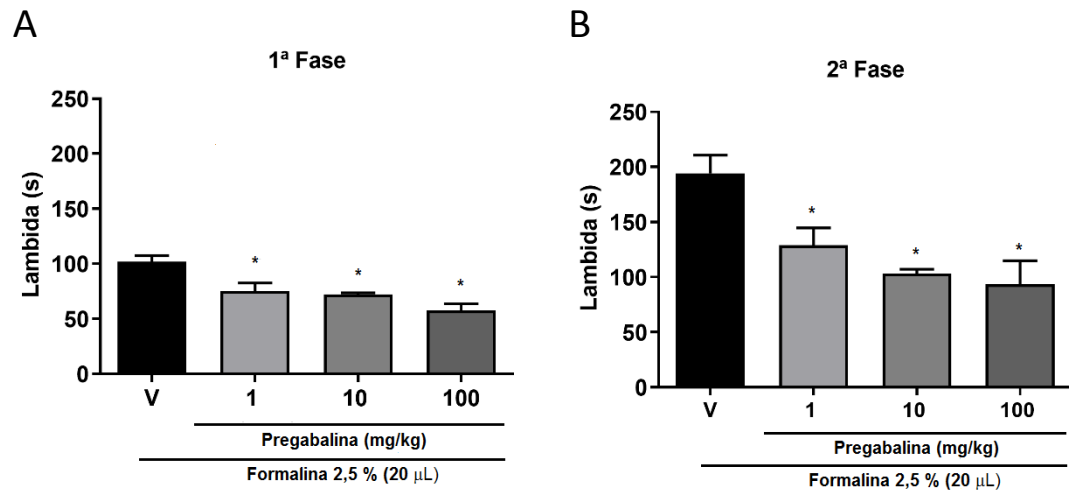


Figura 10. Efeito do tratamento com Pregabalina no teste de formalina. Animais foram pré-tratados com Pregabalina (1, 10 ou 100 mg/kg, i.p.) ou veículo 30 minutos antes da injeção da formalina (2,5%, 20 µL i.p.) e foi feito a contagem do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada durante as fases I (fase neurogênica, Figura 10A) e II (fase inflamatória, Figura 10B). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni e cada ponto ou barra representa a média \pm E.P.M do tempo de lambida da pata em s (n=7). Grupo V representa animais que foram pré-tratados com salina (10 ml/kg). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V (* $P \leq 0,05$).

4.1.4 Associação da Pregabalina com acupuntura manual

A associação da Pregabalina (1 mg/kg) com a acupuntura manual não reduziu a nocicepção induzida pela formalina em ambas as fases (Figura 11).

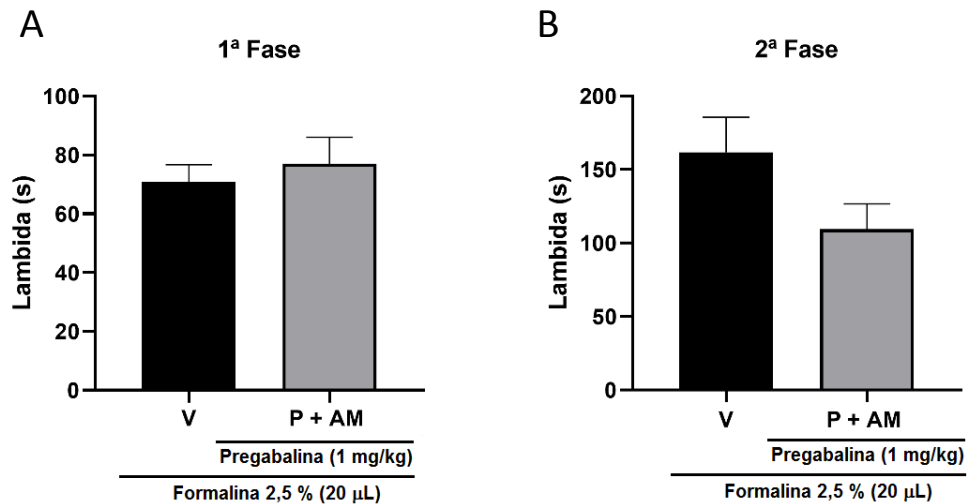


Figura 11. Efeito da associação da Pregabalina (1 mg/kg) com a acupuntura manual no teste de formalina. Animais foram pré-tratados com Pregabalina (1 mg/kg, i.p.), por 20 minutos, e em seguida com a acupuntura manual, por 10 minutos. Completados 30 minutos os animais receberam injeção de formalina (2,5 %, 20 μ L i.pl) e foi feito a contagem do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada durante as fases I (fase neurogênica, Figura 11A) e II (fase inflamatória, Figura 11B). Grupo V representa animais que foram pré-tratados com salina (10 ml/kg). Os dados foram analisados pelo teste T de Student não pareado e cada ponto ou barra representa a média \pm E.P.M do tempo de lambida da pata em s (n=8).

Por outro lado, a associação da Pregabalina (10 mg/kg, i.p.) com a acupuntura manual modificou ambas as fases do teste da formalina. Na fase neurogênica (Figura 12A) houve redução da nocicepção em 28 %, enquanto que na fase inflamatória a nocicepção foi reduzida em em 66 % (Figura 12B).

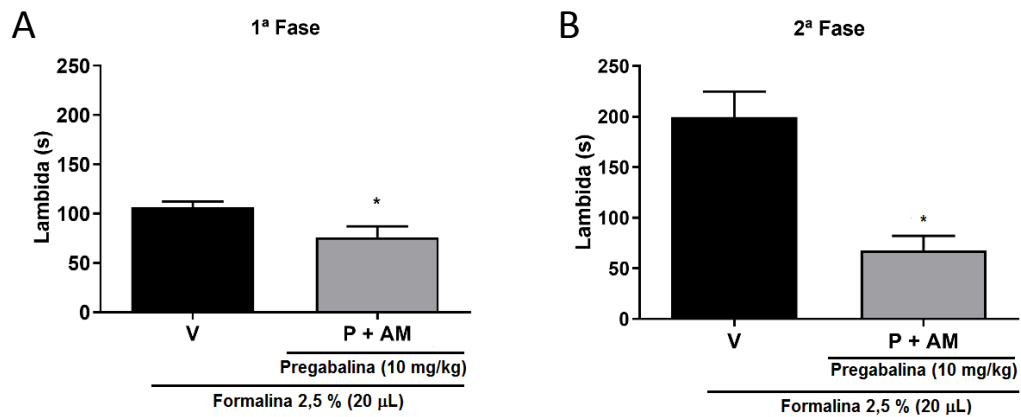


Figura 12. Efeito da associação da Pregabalina (10 mg/kg) com a acupuntura manual no teste de formalina. Animais foram pré-tratados com Pregabalina (10 mg/kg, i.p.), por 20 minutos, e em seguida a acupuntura manual, por 10 minutos. Completados 30 minutos os animais receberam injeção de formalina (2,5 %, 20 µL i.pl) e foi feito a contagem do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada durante as fases I (fase neurogênica, Figura 12A) e II (fase inflamatória, Figura 12B). Os dados foram analisados pelo teste T de Student não pareado e cada ponto ou barra representa a média ± E.P.M do tempo de lambida da pata em s (n=7). Grupo V representa animais que foram pré-tratados com salina (10 ml/kg). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V (*P≤0,05).

4.1.6 Associação da Pregabalina com a laser acupuntura

A associação da Pregabalina (10 mg/kg) com a laser acupuntura não reduziu a nocicepção em nenhuma das fases do teste da formalina.

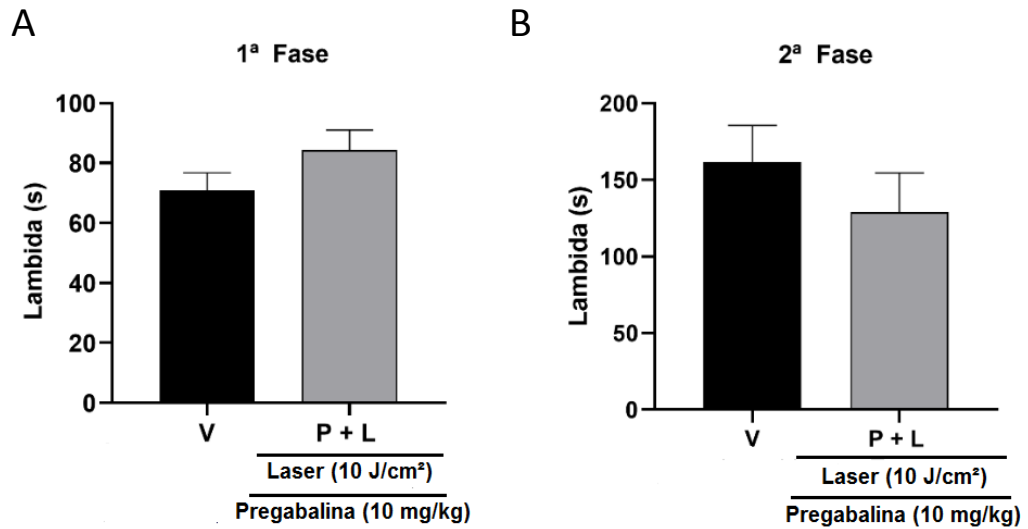


Figura 13. Efeito da associação da Pregabalina (10 mg/kg) com a laser acupuntura no teste de formalina. Animais foram pré-tratados com Pregabalina (10 mg/kg, i.p.), por 20 minutos, e em seguida a laser acupuntura (10 J/cm²), por 40 segundos. Completados 30 minutos os animais receberam injeção de formalina (2,5 %, 20 μ L i.pl) e foi feito a contagem do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada durante as fases I (fase neurogênica, Figura 13A) e II (fase inflamatória, Figura 13B). Os dados foram analisados pelo teste T não pareado e cada ponto ou barra representa a média \pm E.P.M do tempo de lambida da pata em s (n=8). Grupo V representa animais que foram pré-tratados com salina (10 ml/kg).

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Primeiramente, neste trabalho foi demonstrado a atividade antinociceptiva da acupuntura manual, quando aplicada no acuponto E36, no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos. Como resultado, na acupuntura manual, foi observado a redução do comportamento de lambidas na segunda fase do teste, ou fase inflamatória. Por outro lado, Kim et al. (2010) demonstraram que o tratamento dos animais com a manipulação da agulha, no acuponto E36 reduziu a nocicepção em ambas as fases em comparação ao grupo controle (animais que não receberam acupuntura manual) e ao grupo de animais que receberam acupuntura manual sem manipulação. Foram utilizados quatro grupos: controle; animais que receberam a acupuntura manual sem manipulação; animais que receberam acupuntura manual e a agulha foi manipulada, girando 180 graus; e animais que receberam acupuntura manual e a agulha foi manipulada, elevando e empurrando a agulha. Esse resultado corrobora parcialmente com nossos dados, visto que o tratamento com a acupuntura manual reduziu a nocicepção na fase inflamatória. Porém, não houve redução da nocicepção na primeira fase do teste, ou neurogênica. Este resultado foi o oposto do demonstrado por Kim et al. (2010), e é possível que nosso resultado negativo possa ser explicado devido a manipulação excessiva dos animais. Neste estudo, inicialmente, houve uma grande dificuldade para encontrar a localização precisa do acuponto E36, somado ao fato de que muitas vezes o camundongo removia a agulha, dificultando o tempo de inserção da agulha que era de 10 minutos. Outro tipo de acupuntura, a eletroacupuntura (estimulação elétrica através de agulhas) nas frequências de 2 Hz, 10 Hz e 100 Hz, aplicado no E36, reduziu a nocicepção em camundongos no teste de formalina. Esse resultado evidencia que outras modalidades de acupuntura apresentam efeito antinociceptivo no teste de formalina (KIM et al., 2006).

Uma outra modalidade de acupuntura, alternativa ao uso de agulha, é a laser acupuntura. ERTHAL et al. (2013) demonstrou o efeito antinociceptivo do laser (3 J/cm², 830 nm) na fase neurogênica e na fase inflamatória, aplicado no acuponto E36, em comparação ao grupo controle, que não recebeu o tratamento com a laser acupuntura. Além disso tanto o grupo sham (recebeu o tratamento com laser aplicado bilateralmente no acuponto) quanto o grupo laser off não apresentaram redução da atividade nociceptiva.

Em relação ao laser foi aplicado a dose de 4 J/cm², porém não houve redução da nocicepção de ambas as fases. Para a realização dos experimentos foram usadas as doses de 6 J/cm², 10 J/cm² e 12 J/cm². Como resultado, a aplicação das doses de 10 J/cm² e de 12 J/cm² reduziram a fase inflamatória no teste da formalina. A dose de 6 J/cm² não demonstrou efeito antinociceptivo. Portanto, novos experimentos são necessários, uma vez que Erthal e colaboradores comprovaram que a dose de 3 J/cm² reduziu a nocicepção no teste de formalina. Além disso, deve-se realizar uma análise do equipamento AsGaAl periodicamente, utilizando um potenciômetro Lasercheck visto que os aparelhos utilizados na LLLT apresenta alterações na potência real média (PmR) (FUKADA et al., 2010).

A Pregabalina é um fármaco anticonvulsivante e mais recentemente tem sido utilizada no tratamento de dores crônicas. Neste trabalho foi demonstrado que a Pregabalina em todas as doses testadas (1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg) reduziu a nocicepção tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória. Existem dados na literatura que mostram o efeito antinociceptivo da Pregabalina, na dose de 100 mg/kg na fase neurogênica, e nas doses de 30 mg/kg e 100 mg/kg na fase inflamatória (KUMAR et al., 2010). De maneira semelhante, Bardin et al. (2010) observou o efeito antinociceptivo da Pregabalina na dose 40 mg/kg na fase inflamatória. Este conjunto de resultados permite sugerir que doses crescentes de Pregabalina apresentam efeito antinociceptivo, indicando sua potencial atividade em modelos de dor aguda e inflamatória.

Faltam dados na literatura que reportem a associação de medicamentos aprovados para o tratamento de dores crônicas, como a Pregabalina, e sua associação com uma terapia não farmacológica. Desse modo, neste estudo foi avaliado a associação das baixas doses da pregabalina com a acupuntura manual e a laser acupuntura. A associação da acupuntura manual com a Pregabalina (10 mg/kg) reduziu a atividade antinociceptiva em 66 % na fase inflamatória. Porém, quando associadas a menor dose (1 mg/kg) com a acupuntura manual não foi observado a redução da nocicepção induzida pela formalina. Como a associação da Pregabalina (1 mg/kg) e acupuntura manual não apresentou diferença estatística, foi utilizada a dose de 10 mg/kg da Pregabalina nas associações com a acupuntura manual e laser acupuntura. Em comparação com o tratamento isolado da acupuntura manual, que reduziu a nocicepção em 59 % na fase inflamatória, a associação do fármaco na dose de 10 mg/kg com a acupuntura manual apresentou uma discreta

redução da nocicepção na fase inflamatória em 66 %, porém não significativo quando comparado com o tratamento farmacológico isolado. Por outro lado, a associação da laser acupuntura, na dose de 10 J/cm² com a Pregabalina (10 mg/kg) não reduziu a nocicepção de ambas as fases. Esse dado não era esperado, e um fator bastante considerável é a dose (J/cm²) adequada (BAXTER, 2014), pois quando os animais foram pré-tratados apenas com a laser acupuntura foi observada a redução da nocicepção com as doses de 10 J/cm² e 12 J/cm² na fase inflamatória.

Em experimentos futuros, com um período de tempo maior para realização dos experimentos, talvez seja possível repetir essas associações da Pregabalina (10 mg/kg) com a acupuntura manual e a laser acupuntura, afim de confirmar os resultados obtidos.

Nesse contexto, a associação da Pregabalina (10 mg/kg) - acupuntura manual apresentou uma redução da nocicepção, comparado ao tratamento da acupuntura manual e da Pregabalina (10 mg/kg) separadamente. Mas, essa redução não ocorreu de maneira expressiva, pois reduziu apenas 66 % em comparação a Pregabalina 10 mg/kg (47 %) e acupuntura manual (59 %), na fase inflamatória. Nesse sentido, pode-se inferir que a utilização de doses baixas de Pregabalina associado a acupuntura poderia diminuir os efeitos colaterais, sendo necessário a realização de testes para avaliar a atividade motora dos animais, como o teste de campo aberto, que comprove esse efeito. Além disso, faltam dados na literatura que comprovem efeitos benéficos ou não da associação de terapias farmacológicas com terapias complementares. Novos estudos são necessários para comprovar que essa associação é benéfica em comparação ao tratamento farmacológico.

REFERÊNCIAS

- BARDIN, L.; GREGOIRE, S.; ALIAGA, M.; et al. Comparison of milnacipran, duloxetine and pregabalin in the formalin pain test and in a model of stress-induced ultrasonic vocalizations in rats. **Neuroscience research**, v. 66, n. 2, p. 135-140, 2010.
- BAXTER, G. David. Laser acupuncture: effectiveness depends upon dosage. **Acupuncture in Medicine**, v. 27, n. 3, p. 92-92, 2009.
- BONNET, U.; SCHERBAUM, N. On the risk of dependence on gabapentinoids. **Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie**, 2017.
- CARNEIRO, R. M. F. M.; CUNHA, R. S. D.; SOUZA, L. M. A.; et al. Preemptive analgesia of dexamethasone as compared to ketorolac tromethamine in simple tooth extractions. **Revista Dor**, v. 15, n.2, p.83-86, 2014.
- COTLER, H. B.; CHOW, R. T.; HAMBLIN, M. R.; et al. The use of low level laser therapy (LLLT) for musculoskeletal pain. **MOJ orthopedics & rheumatology**, v. 2, n. 5, 2015.
- CHANG, F. C.; TSAI, H. Y.; YU, M. C.; et al. The central serotonergic system mediates the analgesic effect of electroacupuncture on ZUSANLI (ST36) acupoints. **Journal Biomedical Science** v. 11, p. 179-185, 2004.
- CHO, Z. H; HWANG, S. C.; WONG, E. K.; et al. Neural substrates, experimental evidences and functional hypothesis of acupuncture mechanisms. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 113, p. 370-377, 2006.
- COHEN, M.; QUINTNER, J.; VAN RYSEWYK, S. Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain. **PAIN Reports**, v. 3, issue 2, p. e634, 2018.
- CROSS, A. L.; SHERMAN, A. I. **Pregabalin**. Disponível em: <<http://https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470341/>>. Acesso em: 15/03/2018.
- DACH, F. **Sensibilização Central**. Fisiologia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: < <https://edisciplinas.usp.br/> >. Acesso em: 22/04/2018.
- DOR, S. P. O. E. D. **Jornal da Dor**. 2015 2014.
- ERNEST, E.; WHITE, A. Life-threatening adverse reactions after acupuncture? A systematic review. **Pain**, n. 71, p. 123–126, 1997.
- EIPE, N.; PENNING, J.; YAZDI, F.; et al. Perioperative use of pregabalin for acute pain—a systematic review and meta-analysis. **Pain**, v. 156, n. 7, p. 1284-1300, 2015.

ERTHAL, V. S.; DA SILVA, M. D.; CIRDRAL-FILHO, F. J.; et al. ST36 laser acupuncture reduces pain-related behavior in rats: involvement of the opioidergic and serotonergic systems. **Laser Medical Science**, vol. 28, pp. 1345-51, Sep 2013.

ERTHAL, V. Mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória e antinociceptiva por meio da radiação laser no acuponto E36 (Zusanli) em camundongos, Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

ERTHAL, V.; NOHAMA, P.; WERNER, M. F. D. P.; et al. The anti-inflammatory effects of laser acupuncture at ST36 (Zusanli) acupoint in the model of acute inflammation induced by Carrageenan in the paw of mice. **Laser Medical Science**, v. 36, p. 30-33, 2014.

ERTHAL, V.; BAGGIO, C. H.; Laserpuntura: um Estudos dos Efeitos Antinociceptivos. Ed. Omnipax, cap. 11, p. 162-167, 2013.

FEIN, A. Nociceptors and the perception of pain. **University of Connecticut Health Center**, v. 4, p. 61-67, 2012.

FUDIN, J.; ATKINSON, T. Pharmacogenetics: to test or not to test? **PAINWeek 2017**; September 5-9, 2017; Las Vegas, NV.

FUKUDA, T. Y.; JESUS, J. F.; SANTOS, M. G.; et al. Aferição dos equipamentos de laser de baixa intensidade. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 14, n. 4, p. 303-308, 2010.

GATCHEL, R. J. Psychosocial factors that can influence the self-assessment of function. **Journal of Occupational Rehabilitation**, v. 14, n. 3, p. 197-206, 2004

GOODMAN, C. W.; BRETT, A. S. Gabapentin and Pregabalin for Pain—Is Increased Prescribing a Cause for Concern? **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, p. 411-414, 2017.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1248, 2010.

GOLDMAN, N.; CHEN, M.; FUJITA, T.; et al. Adenosine A1 receptors mediate local antinociceptive effects of acupuncture. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 883-888, 2010.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. **Goodman and Gilman manual of pharmacology and therapeutics**. Estados Unidos: McGraw Hill Professional, 2ª edição, 2013.

HU, B.; BAI, F.; XIONG, L.; et al. The endocannabinoid system, a novel and key participant in acupuncture's multiple beneficial effects. **Neuroscience Biobehavioral Reviews** v. 77, p.340-357, 2017

HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C.; CARROLL J. D.; et al. R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, vol. 7, pp. 358-83, 2009.

KIM, J. H.; GWAK, Y. S.; LEE, I; et al. Antinociceptive effects of heterotopic electroacupuncture in formalin-induced pain. **American Journal Chinese Medicine**, v. 34, p. 565-574, 2006.

KIM, G. H.; YEOM, M.; YIN, C. S.; et al. Acupuncture manipulation enhances anti-nociceptive effect on formalin-induced pain in rats. **Neurological Research**, v. 32, n. sup1, p. 92-95, 2010.

KUMAR, N.; LAFERRIERE, A.; YU, J. S. C.; et al. Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. **Journal of neurochemistry**, v. 113, n. 2, p. 552-561, 2010.

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

KONG, J.; FUFA, D. T.; GERBER, A. J.; et al. Psychophysical outcomes from a randomized pilot study of manual, electro, and sham acupuncture treatment on experimentally induced thermal pain. **Journal of Pain**, v. 6, p. 55-64, 2005.

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

LANGEVIN, H. M.; CHURCHILL, D. L.; WU, J.; et al. Evidence of connective tissue involvement in acupuncture. **FASEB Journal**, n. 16, p. 872–874, 2002.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

MACPHERSON, H.; ASGHAR, A. Acupuncture needle sensations associated with De Qi: a classification based on experts' ratings. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 12, p. 633-637, 2006.

MATHEW, E.; KIM, E.; ZEMPSKY, W. Pharmacologic treatment of pain. In: **Seminars in pediatric neurology**. Elsevier, p. 209-219, 2016.

MEDEIROS, M. A.; CANTERAS, N. S.; SUCHECKI, D.; et al. c-Fos expression induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. **Braz J Med Biol Res**, n. 12, v. 36, p.1673–1684, 2003.

MERSKEY, H. Logic, truth and language in concepts of pain. **Quality of Life Research**, v. 3, n. 1, p. S69-S76, 1994.

MEYER, R. A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J. N.; et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: **Wall & Melzack's Textbook of Pain**, 6th Edition. Elsevier, p. 1-23, 2005.

MOORE, R. A.; STRAUBE, S.; WIFFEN, P. J.; et al. Pregabalin for acute and chronic pain in adults. **The Cochrane Library**, 2009.

NAMAZI, N.; KHODAMORADI, K.; LARIJANI, B.; et al. Is laser acupuncture an effective complementary therapy for obesity management? A systematic review of clinical trials. **Acupuncture in Medicine**, p. acupmed-2017-011401, 2017.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). Acupuncture: In Depth. National Center for Complementary and Integrative Health, 2016.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). Acupuncture. NIH Consensus Statement, n. 15, p. 1-34, 1997.

O'COONOR, J.; BENSKY, D. Acupuncture: a comprehensive text. Eastland Press, Seattle, 1981.

OKADA, K.; KAWAKITA, K. Analgesic Action of Acupuncture and Moxibustion: A Review of Unique Approaches in Japan. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 11-7, 2009.

OLIVEIRA, de. R. F.; SILVA, da. C. V.; CERSOSIMO, M. C. P.; BORSATTO, M. C.; DE FREITAS, P. M. Laser therapy on points of acupuncture: Are there benefits in dentistry? **Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology**, v.151, p.76-82, Jul 11, 2016.

PATEL, N. B. Fisiologia da Dor. In: KOPF, A. Associação Internacional Para O Estudo da Dor. Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos. Seattle: **iasp** Press, 2009.

PATHAN, H; WILLIAMS, J. Basic opioid pharmacology: an update. **British journal of pain**, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2012.

PEUKER, E. T.; WHITE, A.; ERNEST E.; et al. Traumatic complications of acupuncture: therapists need to know human anatomy. **Archives Family Medicine**, n. 8, p. 553–558, 1999.

PULVERS, K.; HOOD, A. The role of positive traits and pain catastrophizing in pain perception. **Current pain and headache reports**, v. 17, n. 5, p. 330, 2013.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain?. **Nature neuroscience**, v. 5, p. 1062, 2002.

SMITH, A.; CARLOW, K.; BIDDULPH, T.; et al. Contextual modulation of pain sensitivity utilising virtual environments. **British journal of pain**, v. 11, n. 2, p. 71-80, 2017.

SMITH, M. T.; ANAND, P.; RICE, A. S. C. Selective small molecule angiotensin II type 2 receptor antagonists for neuropathic pain: preclinical and clinical studies. **Pain**, v. 157, p. S33-S41, 2016.

SOLIMAN, N.; FRANK, B. L.; NAKAZAWA, H.; et al. Acupuncture reflex systems of the ear, scalp, and hand. **Physical medicine and Rehabilitation Clinics North America**, v.3, n. 10, p. 547-571, 1999.

SUN, L.; KOU, R.; LIU, L.; et al. Acupuncture direction and analgesia. **Zhongguo zhen jiu= Chinese acupuncture & moxibustion**, v. 37, n. 3, p. 279-283, 2017.

TING, S.; SCHUG, S. The pharmacogenomics of pain management: prospects for personalized medicine. **Journal of Pain Research**, v. 9, p. 49, 2016.

TJØLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p.5-17, 1992.

TORRES-ROSAS, YEHIA, G.; PEÑA, G.; MISHRA, P.; et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. **Nature medicine**, v. 20, n. 3, p. 291, 2014.

WITTAKER, P. Laser acupuncture: past, present, and future. **Lasers in Medical Science**, v. 19, n.2. p. 69–80, 2004.

World Association for Laser Therapy. Recommended anti-inflammatory dosage for low level laser therapy. WALT, 2005. Disponível em: <<http://www.walt.nu>>. Acesso em: 30 de Nov de 2018

XIANG, A.; CHENG, K.; SHEN, X.; et al. The Immediate Analgesic Effect of Acupuncture for Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

XIA, H.; GUAN, L.; YANG, Y. Effect of Zusanli (ST 36) moxibustion on rat mesenteric microvascular system. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 34, n. 4, p. 491-497, 2014.

YADAV, R.; WENG, H. EZH2 regulates spinal neuroinflammation in rats with neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 349, p. 106-117, 2017.

YAMAMURA, Y. Acupuntura tradicional. A arte de inserir. São Paulo: Ed. Roca, 2004.

YIM, YUN-KYOUNG; LEE, H.; HONG, KWON-EUI; et al. Electro-acupuncture at acupoint ST36 reduces inflammation and regulates immune activity in collagen-induced arthritic mice. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 51-57, 2007.

YOU, Y.; BAI, L.; DAI, R.; ZHONG, C.; et al. Acupuncture Induces Divergent Alterations of Functional Connectivity within Conventional Frequency Bands: Evidence from MEG Recordings. **PLoS One**, v.7, n.11, Nov, 2012.

YUAN, QI-LING; WANG, P.; LIU, L.; SUN, F.; CAI, YONG-SONG; WU, WEN-TAO, MA, JIANG- TAO; XU, BANG-BANG; ZHANG, YIN-GANG. Acupuncture for musculoskeletal pain: A meta-analysis and meta-regression of sham-controlled randomized clinical trials. **Scientific reports**, v. 6, p. 30675, 2016.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 85 n. 4, p. 355–75, 2008.

ZHANG, J; DENG, X. Bupivacaine effectively relieves inflammation induced pain by suppressing activation of the NF κ B signalling pathway and inhibiting the activation of spinal microglia and astrocytes. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 3, p. 1074-1080, 2017.

ZHANG, Z. J.; WANG, X. M.; MCALONAN, G. M. Neural Acupuncture Unit: A New Concept for Interpreting Effects and Mechanisms of Acupuncture. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, Mar 8, 2012.