



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

VANESSA ERTHAL

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO EVOCADO PELA
ACUPUNTURA ATRAVÉS DAS ESTIMULAÇÕES MECÂNICA
E FOTÔNICA NO ACUPONTO ZUSANLI (E36) EM RATOS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA EM SAÚDE
PUCPR**

**CURITIBA
2009**

PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE

Vanessa Erthal

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO EVOCADO PELA
ACUPUNTURA ATRAVÉS DAS ESTIMULAÇÕES MECÂNICA
E FOTÔNICA NO ACUPONTO ZUSANLI (E36) EM RATOS**

CURITIBA
Outubro/2008

VANESSA ERTHAL

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO EVOCADO PELA
ACUPUNTURA ATRAVÉS DAS ESTIMULAÇÕES MECÂNICA
E FOTÔNICA NO ACUPONTO ZUSANLI (E36) EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Percy Nohama

**CURITIBA
2008**

Aos meus pais, Iraídes Francisca Erthal
e Rubens Erthal

A minha filha Bianca Erthal de Abreu

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao professor Percy Nohama, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho e pela sua orientação.

Ao professor Adair Roberto Soares dos Santos por abrir as portas de seu laboratório e contribuir com todos os materiais para a realização dos experimentos.

À amiga Morgana Duarte, que me ajudou nos estudos e na conclusão dos experimentos.

Minha eterna gratidão aos meus pais e a minha filha que sempre me apoiaram em todos os momentos, principalmente em dificuldades emocionais e ausências.

A Deus, acima de tudo, por iluminar meus caminhos e a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

INSTANTES

“Se eu pudesse viver novamente a minha vida,
Na próxima trataria de cometer mais erros.
Não tentaria ser tão perfeito, relaxaria mais.
Seria mais tolo ainda do que tenho sido;
Na verdade, bem poucas coisas levaria a sério.
Viajaria mais , contemplaria mais entardeceres,
Subiria mais montanhas, nadaria mais rios.
Iria a mais lugares onde nunca fui,
Tomaria mais sorvete e menos lentilha,
Teria mais problemas reais e menos imaginários.
Se eu pudesse voltar a viver,
Trataria de ter somente bons momentos”

Rubens Alves

Efeito Antinociceptivo Evocado pela Acupuntura através das Estimulações Mecânica e Fotônica no Acuponto Zusanli (E36) em Ratos

RESUMO

A dor é um mecanismo de proteção para o corpo, ocorrendo em qualquer tecido que sofra algum tipo de lesão, gerando assim uma experiência emocional e sensorial desagradável. Algumas técnicas podem reduzir este efeito nociceptivo, como a acupuntura, utilizando estímulos mecânico, elétrico ou fotônico. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antinociceptiva da acupuntura e da radiação LASER de baixa potência em modelos de nocicepção química, em ratos. Além disso, foi investigada a participação do sistema opioide e serotoninérgico neste efeito. O estímulo mecânico foi aplicado por meio de agulhas 0,25x0,7 mm, durante 15 min e a foto-estimulação com um equipamento LASER AsGaAl comprimento de onda 830nm, potência de 30mW, durante 6 s, no acuponto E36 (Zusanli). A estimulação deste acuponto tanto mecânica quanto fonicamente foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,001$) o número de contorções abdominais induzida por ácido acético (0,6% i.p), com inibição foi de $42 \pm 6\%$ no acuponto E36 (Zusanli), de $36 \pm 2\%$ com o LASER no acuponto E36 e de $39 \pm 6\%$ na utilização dos dois tratamentos. Da mesma forma, ambos os tipos de estímulos evocados causaram inibições significativas da nocicepção de origem neurogênica (fase I, mecânica: $51 \pm 7\%$, fotônica: $48 \pm 7\%$ e ambos: $54 \pm 4\%$) e inflamatória (fase IIA, mecânica: $49 \pm 3\%$, fotônica: $34 \pm 4\%$ e ambos: $45 \pm 3\%$ e fase IIB, mecânica: $73 \pm 9\%$, fotônica: $83 \pm 6\%$ e ambos: $78 \pm 4\%$) induzida pela formalina. Os sistemas opioide e serotoninérgico (5-HT_{1A/B}, 5HT_{2A} 5HT₃) parecem estar ligados ao efeito da estimulação deste acuponto E36, pois a redução do comportamento nociceptivo foi revertida com o pré-tratamento utilizando naloxona, pindolol, cetanserina e ondasetrona. Os resultados sugerem que tanto a acupuntura realizada com estímulos mecânicos como a radiação fotônica de baixa potência apresentam importante atividade antinociceptiva em modelos experimentais de nocicepção e inflamação em ratos.

Palavras-chaves: antinocicepção, dor, LASER, acupuntura.

Antinociceptive Effect Evoked by Acupuncture through Mechanical and
Photonics Stimulations in Acupoint Zusanli (E36) of Rats

ABSTRACT

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage to the fabric or described in terms of such damage. Some techniques may reduce this nociceptive effect, such as acupuncture, by means of mechanical, electrical or photonic stimulation. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive effect of acupuncture and of low-intensity laser radiation in models of chemical nociception in rats. Additionally, the involvement of the opioidergic and serotonergic systems in this effect was investigated. Mechanical stimulation was carried out with 0.25 X 0.7 mm needles, which were retained for 15 minutes, and photonic stimulation was applied with an AsGaAl laser equipment with a wave length of 830nm, power of 30mW, during 6 seconds, both in acupoint St36 (Zusanli). Both mechanical and photonic stimuli applied to this acupoint were able to significantly reduce ($p < 0,001$) the writhing induced by 0,6% i.p acetic acid ($p < 0,001$); $42 \pm 6\%$ inhibition was induced by acupuncture in St36, $36 \pm 2\%$ by laser stimulation of the same acupoint, and $39 \pm 6\%$ when both stimuli were associated. In the same way, both types of stimuli caused significant inhibition of the neurogenic (phase I, mechanical: $51 \pm 7\%$, photonic: $48 \pm 7\%$, and both: $54 \pm 4\%$) and inflammatory (phase IIA, mechanical: $49 \pm 3\%$, photonic: $34 \pm 4\%$ and both: $45 \pm 3\%$ and phase IIB, mechanical: $73 \pm 9\%$, photonic: $83 \pm 6\%$ and both: $78 \pm 4\%$) nociception induced by formalin. The opioidergic and serotonergic (5-HT1A/B, 5HT2A 5HT3) systems seem to be involved in the effect induced by the stimulation of ST36 acupoint, since the reduction of the nociceptive-induced behavior was reverted with pre-treatment of naloxone, pindolol, ketanserin and ondasetron. The results suggest that mechanical stimulation induced by acupuncture, as well as photonic stimulation induced by low-intensity laser radiation, produce important antinociceptive activity in experimental models of nociception and inflammation in rats.

Key-words: antinociception, pain, LASER, acupuncture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Reações neurofisiológicas da dor..... | 25 |
| Figura 2: Modelo experimental de nocicepção induzida pelo ácido acético em ratos com a realização da contorção abdominal, com extensão de uma pata posterior e a elevação da cauda..... | 35 |
| Figura 3: Reação fisiológica da reação da aplicação dos pontos de acupuntura utilizando agulhas..... | 37 |
| Figura 4: Esquema do mecanismo fisiológico da inibição da dor utilizando os pontos de acupuntura e a demonstração dos três níveis distintos do SNC: medular, mesencefálico e hipotálamo/hipófise..... | 38 |
| Figura 5: Vias aferentes e eferentes envolvidas no efeito anti-inflamatório produzido em resposta a aplicação da acupuntura..... | 40 |
| Figura 6: (1) Átomo passando do estado fundamental para estado instável, (2) Liberação de um fóton, (3) Emissão estimulada de radiação..... | 42 |
| Figura 7: Localização do ponto E36 em animais..... | 50 |
| Figura 8: Localização do ponto E36 (Zusanli) em ratos..... | 51 |
| Figura 9: LASERPULSE, caneta LASER comprimento de onda 830 nm, fabricado pela IBRAMED..... | 51 |
| Figura 10: Medidor de potência Pocket Power..... | 52 |
| Figura 11: Esquema ilustrativo do modelo de nocicepção do ácido acético..... | 53 |
| Figura 12: Esquema ilustrativo das fases do modelo de nocicepção induzido pela Formalina..... | 54 |
| Figura 13: Esquema ilustrativo da avaliação do mecanismo opióide..... | 55 |
| Figura 14: Esquema ilustrativo da avaliação do mecanismo serotoninérgico..... | 55 |
| Figura 15: Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto E36 (Zusanli) com duração do estímulo mecânico de 15 min e o estímulo fotônico 6 s na nocicepção induzida por ácido acético..... | 60 |
| Figura 16: Efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto E36 (Zusanli) com 15 min de retenção se agulha e 6 s de fotoestimulação, em relação à primeira fase (I)da nocicepção induzida por formalina em ratos | 61 |

| | |
|---|----|
| Figura 17: Efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto E36 (Zusanli) com 15 min de retenção se agulha e 6 s de fotoestimulação, em relação à segunda fase (IIA) da nocicepção induzida por formalina em ratos..... | 62 |
| Figura 18: Efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto E36 (Zusanli) com 15 min de retenção se agulha e 6 s de fotoestimulação, em relação à segunda fase (IIB) da nocicepção induzida por formalina em ratos..... | 63 |
| Figura 19: Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona no efeito antinociceptivo do acuponto E36 e morfina contra a indução das contorções abdominais por injeção de ácido acético com 15 min de retenção de agulhas e 6 s de LASER..... | 64 |
| Figura 20: Efeito do pré-tratamento dos animais com pindolol no efeito antinociceptivo do acuponto E36 e bupirona contra a indução das contorções abdominais por injeção de ácido acético com 15 min de retenção de agulhas e 6 s de LASER..... | 65 |
| Figura 21: Efeito do pré-tratamento dos animais com cetanserina sobre a atividade antinociceptiva acupuntura nos estímulos mecânico e LASER no acuponto ponto E36 (Zusanli), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em ratos..... | 66 |
| Figura 22: Efeito do pré-tratamento dos animais com ondasetrona sobre a atividade antinociceptiva da acupuntura nos estímulos mecânico e LASER no acuponto E36 (Zusanli), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em ratos..... | 66 |
| Quadro 1: Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários..... | 28 |
| Quadro 2: Tipos de emissão, comprimentos de onda, pulso e indicações do LASER | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT: 5-hidroxitriptamina
E36: Acuponto Estômago 36
ACTH: hormônio adrenocorticotrófico
ATP: trifosfato de adenosina
BK: bradicinina
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CO: monóxido de carbono
COX ciclooxigenase
E.P.M.: Erro padrão da média
GABA: Ácido gama-amino butírico
GaAs: Arseneto de gálio
GaAsAl: Arseneto de gálio e Alumínio
HeNe: Hélio-neônio
Hz: hertz
i.p.: Intraperitoneal
i.pl.: Intraplantar
IL-8: Interleucina 8
IL-1 β : Interleucina 1 β
LASER amplificação da luz através da emissão estimulada de radiação
LCR: líquido cefalo-raquidiano
K⁺: Íon potássio
mGluR: receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MTC: Medicina Tradicional Chinesa
Na⁺: Íon sódio
NO: Óxido nítrico
PAG: Substância Cinzenta Periaquedutal
PBRP: Ponto de Baixa Resistência Elétrica da Pele
PG: prostaglandina
PKC: fosfolipase C
s.c.: sub-cutâneo

SNA: Sistema nervoso autônomo

SNC: Sistema Nervoso Central

SP: Substância P

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

VIP peptídio intestinal vasoativo

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xii |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | xv |
| | |
| CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1. DEFINIÇÃO DO PROBLEMA..... | 19 |
| 1.2. OBJETIVOS..... | 23 |
| 1.3. ORGANIZAÇÃO DA QUALIFICAÇÃO | 24 |
| | |
| CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA | 25 |
| 2. 1DOR..... | 25 |
| 2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO EM ANIMAIS..... | 34 |
| 2.2.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético..... | 34 |
| 2.2.2 Nocicepção induzida pela formalina..... | 35 |
| 2.3 ACUPUNTURA..... | 36 |
| 2.3.1 Efeito analgésico..... | 38 |
| 2.3.2 Efeito anti-inflamatório..... | 39 |
| 2.4 LASER..... | 41 |
| 2.4.1 Princípios físicos..... | 43 |
| 2.4.2 Efeitos Fisiológicos..... | 45 |
| | |
| CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS | 49 |
| 3.1. ANIMAIS..... | 49 |
| 3.2 CALIBRAÇÃO DO APARELHO..... | 51 |
| 3.3 AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA..... | 52 |
| 3.3.1. Nocicepção induzida pelo ácido acético..... | 52 |
| 3.3.2. Nocicepção induzida pela formalina..... | 53 |
| 3.4 AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA..... | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.1. Envolvimento do sistema opióide..... | 55 |
| 3.4.2 Envolvimento do sistema serotoninérgico..... | 55 |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 57 |
| CAPÍTULO 4: RESULTADOS..... | 59 |
| 4.1 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO ÁCIDO ACÉTICO..... | 59 |
| 4.2 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA..... | 59 |
| 4.3 MECANISMOS DE AÇÃO..... | 62 |
| 4.3.1 Sistema opióide..... | 62 |
| 4.3.2 Sistema serotoninérgico..... | 63 |
| CAPITULO 5: DISCUSSÃO..... | 67 |
| 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 72 |
| CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES..... | 75 |
| REFERÊNCIAS | 77 |
| ANEXO 1 | 93 |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

O corpo humano possui inúmeros mecanismos de controle da homeostasia, e dentre estes, a dor exerce uma função importante, pois seu papel fisiológico é alertar sobre possíveis ameaças ao bem estar e à integridade do organismo, além de reter a atenção até que a causa de sua ativação tenha sido identificada e afastada (CHAPMAN & GAVRIN, 1999 e WALL, 1999). Desta forma, a dor é um sinal vital clinicamente importante para a detecção e avaliação de inúmeras doenças, bem como para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitação de danos (MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA et al., 2004; LOESER & MELZACK, 1999). No entanto, assim como a beleza não é somente inerente a sua imagem visual, mas depende grandemente de seu observador, também a dor é uma experiência complexa que não envolve somente a transdução de estímulos nocivos advindos do ambiente, mas principalmente seu processamento cognitivo e emocional, realizado pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Diante dessas considerações, é possível identificar um componente fisiológico e outro psicológico ou emocional envolvido, e a junção de ambos é o que permite aos seres humanos o entendimento da dor. Já em animais avalia-se a dor de forma indireta, uma vez que não há aparatos que permitam mensurar algum componente emocional, estudando-se somente o componente fisiológico, o qual denomina-se nocicepção (TJOLSEN & HOLE, 1997).

A *International Association for the study of pain* (Associação Internacional do Estudo da Dor) define dor como “uma experiência emocional ou sensorial desagradável, associada a danos reais ou potenciais ao tecido ou descrita em termos de tal lesão”. (LOESER & MELZACK, 1999). Desta forma, as sensações possuem vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a

detecção e medida de um estímulo. Experiências com a sensação de dor, incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais. A nocicepção, que pode ser definida como a resposta fisiológica a uma lesão tecidual, é a precursora da dor que, por sua vez, causa o sofrimento, com uma sensação não uniforme (MILLAN, 1999). A qualidade da dor e o início das respostas protetoras são determinados por variados fatores estimulados pela medula espinhal e por estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (RUSSO e BRODE, 1998). Existem mediadores químicos que participam da perpetuação da resposta dolorosa, dos quais destacam-se os tecidos lesados e adjacentes, o sistema vascular, as células imunes e os nervos simpáticos e sensoriais. Aponta-se também mecanismos complexos pelos quais um transmissor pode agir, via múltiplos receptores que são amplamente distribuídos por meio dos tecidos periféricos ou centrais (MILLAN, 1999).

Atualmente, existem técnicas não medicamentosas que modulam a sensação da dor, dentre as quais, destaca-se a acupuntura. A acupuntura é um procedimento que consiste na inserção de agulhas em regiões específicas do corpo, conhecidas como acupontos. Na Medicina Tradicional Chinesa, os primeiros relatos de uso terapêutico dos pontos de acupuntura datam de aproximadamente 5200 anos, tendo se difundido nos países orientais (BONTA, 2002). Esta técnica, embora milenar no oriente, ainda é relativamente recente como objeto de estudo visando comprovação científica de sua eficácia no ocidente; principalmente, no que tange aos mecanismos de ação como também as diferenças entre os diversos acupontos existentes. Além disso, reduzido número de acupontos foram estudados isoladamente e, segundo a Medicina Tradicional Chinesa, eles são usados com finalidades diferentes uns dos outros (SALAZAR & REYES, 2004).

Han Jisheng no ano de 1965, em Pequim, iniciou uma pesquisa laboratorial com o objetivo de comprovar técnicas que possuíam efeito analgésico sem a utilização de medicamentos, introduzindo, assim, a acupuntura nos experimentos. O estudo foi realizado com pacientes que receberam estímulos álgicos, e estes foram divididos em 2 grupos, dos quais um grupo recebeu aplicação de acupuntura e outro não. Percebeu-se que o limiar álgico permaneceu inalterado nos participantes que

não receberam a acupuntura, enquanto que nos que receberam houve um aumento gradual da resistência a dor (STUX e HAMMERSCHLAG, 2005).

Na acupuntura, a estimulação de determinados acupontos da pele com agulhas, o seu ato de introdução gera um impulso nervoso com uma frequência de 2 a 3 Hz, ativando fibras nervosas, que conduzem estímulos e provocam uma seqüência de reações fisiológicas (FILSHIE, 1998; SALAZAR & REYES, 2004; VALLE e JIN, 2003). Essas reações proporcionaram a liberação de substâncias analgésicas (opióides endógenos), que atuam no cérebro e também reforçam o controle da dor (MELZACK, 1975). Os opióides detectados são a β -endorfina, a metencefalina, a encefalina e a dinorfina, responsáveis por proporcionar um relaxamento mais efetivo podendo levar à sonolência e alívio de tensões proporcionadas pelo estresse (SALAZAR & REYES, 2004; VALLE e JIN, 2003; ERNEST, 1997):

Os locais de introdução das agulhas foram empiricamente descritos e hoje se sabe que o acuponto é uma região da pele em que há uma grande concentração de terminações nervosas sensoriais, as quais produzem uma resposta fisiológica após a sua inserção. Sendo esta região caracterizada pela combinação de nervos, vasos sanguíneos, tendões, periosteos e cápsulas articulares. Os acupontos possuem propriedades elétricas diversas das áreas adjacentes: condutância elevada, menor resistência, padrões de campo organizados e diferenças de potenciais elétricos (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001).

O efeito analgésico da acupuntura é decorrente da ativação do sistema de modulação descendente da dor. Quando um acuponto é acionado, ele ativa fibras aferentes primárias que, por sua vez, nas vias ascendentes estimulam o sistema modulador da via descendente da dor, incluindo a substância cinzenta periaquedutal, *rafe magna*, *locus coeruleus*, núcleo medial central do tálamo e hipotálamo posterior, sendo que opióides endógenos, como as encefalinas e as monoaminas, são mediadores na analgesia induzida pela acupuntura (MEDEIROS et al., 2003).

Em pesquisa recente, demonstrou-se que a acupuntura inibe a liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula espinhal em resposta a estímulos nocivos, inibindo a resposta nociceptiva (RONG et al., 2005). Em modelos

inflamatórios, a acupuntura reduziu o número de células inflamatórias e o volume do exudato. No modelo de peritonite induzida por carragenina, a concentração de interleucina 1 β (IL-1 β) foi inibida pelo tratamento com acupuntura em ratos (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001).

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

Entretanto, Ma (2004), propôs que a analgesia induzida pela acupuntura, também envolve a liberação de substâncias vasoativas através do processo inflamatório, que decorrente da inserção da agulha, melhoram a oxigenação celular, as trocas metabólicas e o aumento do aporte sangüíneo e linfático no acuponto.

Existem outras formas para se estimular os pontos de acupuntura além da agulha, podendo-se utilizar a estimulação elétrica, a dígito-pressão e a radiação LASER de baixa potência (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001).

A radiação LASER ou bioestimulação não invasiva, é uma alternativa associada à técnica da acupuntura sendo utilizada nos últimos 25 anos, pois consiste em um tratamento mais rápido, oferecendo baixo risco de infecção e considerada, como ideal para pacientes com fobia de agulha. Cabrera, Perón e Alfonso (2002) afirmam que o LASER de baixa potência usado nos acupontos proporciona uma energia luminosa, capaz de produzir uma indução fotobiológica que terá como consequência efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos nas células. Esta energia é utilizada como terapia anti-inflamatória, antiálgica e na regeneração celular.

No entanto, pesquisadores e terapeutas têm questionado os benefícios clínicos do LASER nos acupontos, devido aos resultados divergentes encontrados, em razão da carência de padronização metodológica nos estudos. Enquanto alguns pesquisadores defendem seu efeito terapêutico, outros contestam esta propriedade com dúvidas se o mesmo possui uma ação fisiológica ou se apresenta um efeito placebo (SMITH, TANG e RUSSEL, 2005; VALCHINOV e PALLAKARAKIS, 2005). Neste sentido, ao se aplicar o LASER, é preciso descrever detalhadamente os seus parâmetros, como comprimento de onda, tempo de aplicação e energia emitida ao

tecido, para o profissional reproduzir clinicamente os achados encontrados em ensaios experimentais (FUKUDA e MALFATTI, 2008). Desta maneira, vislumbrou-se como objeto de pesquisa a formulação de um estudo experimental em ratos que viesse comparar a ação da acupuntura e da radiação LASER de baixa potência.

A escolha do acuponto E36 (Zusanli) para esse estudo foi definida por sua ampla utilização na prática clínica em casos de dores e pela quantidade de estudos experimentais científicos no mesmo. Este acuponto possui indicação para o tratamento das seguintes patologias: gastrite, úlcera, astenia, lombalgia, dores em membros inferiores e indigestão. Em seres humanos, este ponto situa-se a 6 cm (centímetros) abaixo da patela e 1 cm lateral a crista da tíbia (MACIOCIA, 1996; YAMAMURA, 1995).

1.2 OBJETIVOS

Este estudo experimental tem como objetivo principal investigar o possível efeito antinociceptivo evocado pela acupuntura através das estimulações mecânica e fotônica em ratos.

Para tanto, estabeleceu-se os seguintes objetivos específicos:

- (1) verificar o efeito antinociceptivo evocado pela estimulação mecânica no acuponto “Zusanli” (E36) em ratos, nos modelos de nocicepção química, induzido, pelo ácido acético e pela formalina;
- (2) verificar o efeito antinociceptivo evocado pela estimulação fotônica (aplicação do LASER) em ratos no acuponto “Zusanli” (E36), nos modelos de nocicepção química, induzido pelo ácido acético e a formalina;
- (3) comparar a influência da acupuntura em relação ao LASER de baixa potência sobre o efeito antinociceptivo;
- (4) verificar a possível participação do sistema opióide e serotoninérgico na antinocicepção evocado pelas estimulações mecânica e fotônica do acuponto “Zusanli” (E36), em ratos, no modelo de nocicepção química, induzido pelo ácido acético.

1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Em razão das considerações apresentadas o trabalho foi dividido em 6 capítulos. No primeiro capítulo, apresentam-se os aspectos introdutórios sobre a problemática da dor, a acupuntura, a falta de estudos sobre a foto estimulação na técnica da acupuntura e os objetivos a serem atingidos.

O segundo capítulo trata da revisão de literatura, visando proporcionar o subsídio teórico necessário e no qual apresentam-se considerações sobre a dor, a acupuntura e seus mecanismos de ação. Procurou-se também abordar a radiação LASER e a sua utilização na acupuntura.

Descreveu-se no terceiro capítulo, os materiais e os métodos empregados nesta pesquisa, assim como ressaltam-se os modelos experimentais. No quarto capítulo, apresentam-se os resultados nos protocolos experimentais, os quais são expostos por meio de gráficos e dados estatísticos. No quinto capítulo, discutem-se os métodos e resultados empregados à luz da literatura. No capítulo 6, apresenta-se as considerações finais deste trabalho.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOR

A dor no ponto de vista neurofisiológico, para sua percepção, necessita da participação do sistema nervoso central (SNC) e do Sistema Nervoso Periférico, desencadando as seguintes reações: ativação, através de estímulos mecânicos, térmicos e químicos, e sensibilização dos receptores periféricos (nível periférico), transmissão dos estímulos dolorosos através das vias aferentes primárias, as quais ativam diversos neurotransmissores e neuromoduladores, modulação e integração da resposta da dor a nível medular, na substância cinzenta do corno dorsal, transmissão das vias espino-encefálicas (ascendentes) enviando os estímulos nociceptivos para o tálamo, integração e resposta no nível encefálico (percepção da dor), resposta descendentes das vias espino-encefálicas (nível central); representação na figura1 (ROMERA, et al., 2000).

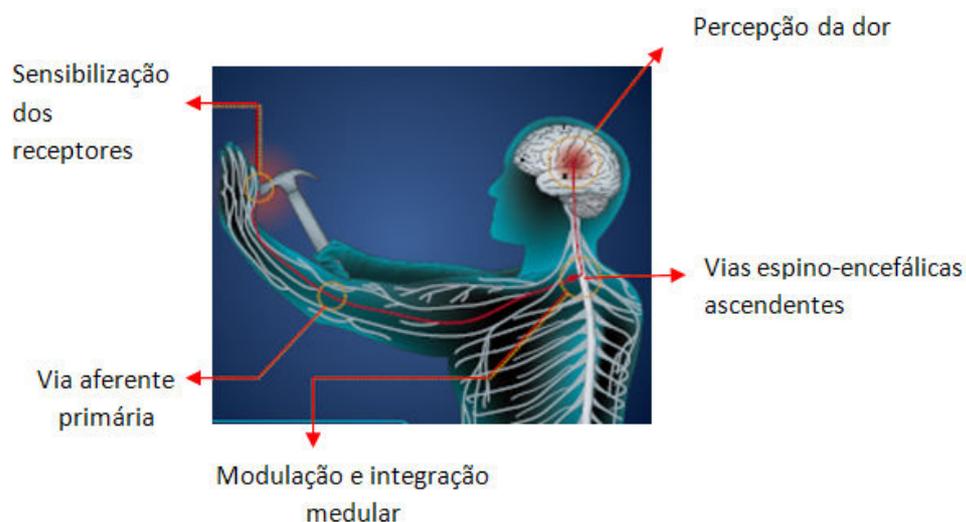


Figura 1: Reações neurofisiológicas da dor. Figura adaptada de Nature Reviews (2007). Disponível em: www.nature.com/nrn/psters/pain/index.html.

Os receptores periféricos realizam a transdução dos estímulos sensoriais em impulsos nervosos, conduzindo-os para o encéfalo. Existem cinco tipos básicos de receptores sensoriais:

- (1) mecanorreceptores: detectam a pressão ou o estiramento (ex: terminações nervosas livres);
- (2) termorreceptores: detectam mudanças na temperatura, frio ou calor (ex: receptores de calor);
- (3) fotorreceptores; detectam alterações da luz na retina do olho (ex: bastonetes);
- (4) quimiorreceptores: detectam mudanças no paladar e olfato (ex: receptores dos corpúsculos gustativos);
- (5) nociceptores: detectam a dor em lesões teciduais (ex: terminações nervosas livres) (TORTORA, 2003).

Cada receptor é sensível a um tipo de estímulo, a função de alerta da dor reflete a ativação de sensores nociceptores, os quais são sensibilizados quando o estímulo é potencialmente perigoso, ou seja, excedem a uma determinada faixa considerada fisiológica (estímulo inócuo) (BURGES & PERL, 1967 e MILLAN, 1999).

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

A sensibilização dos nociceptores ocorrida, por exemplo, em casos de mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), resulta na liberação local de mediadores químicos tais como bradicinina, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, SP, NO, opióides e acetilcolina, entre outros (JULIUS & BASBAUM, 2001; GRIFFIS et al., 2006).

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

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada por meio das fibras aferentes até o SNC. Os longos axônios das fibras nociceptivas, que se localizam em nervos periféricos, estendem-se de seus corpos celulares, reunidos no gânglio da raiz dorsal. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos concomitantemente à medula espinhal e aos tecidos corporais (MILLAN, 1999). Os receptores nociceptivos são ativados por várias substâncias endógenas que iniciam um potencial de ação, conduzidos por fibras nervosas em direção ao corno posterior da medula. Neste sentido, as fibras aferentes primárias são classificadas de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (Quadro 1). Os neurônios mais mielinizados, de maior diâmetro e que apresentam maior velocidade de condução são as fibras A β . Essas fibras respondem ao leve toque ou movimento e são importantes para informar a posição do corpo no espaço (propriocepção), são encontradas basicamente nos nervos que inervam a pele e em condições fisiológicas não contribuem para a sensação dolorosa (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Entretanto, a estimulação desse tipo de fibra pode aliviar a sensação dolorosa, como ocorre quando ativadas por fricção da pele após alguma lesão. No entanto, ainda existem dois outros tipos de aferentes primários responsáveis pela transmissão da nocicepção da periferia à medula espinhal. As fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem fibras C não mielinizadas e fibras pouco mielinizadas A δ . Estas fibras são responsáveis por transmitir o estímulo nociceptivo (PLEUVRY, 1996; SHELLEY, 1994; MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001).

Quadro 1. Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários.

| Tipo de fibra Sensorial | Aα e Aβ | Aδ (I e II) | C |
|--------------------------------|---|---|---|
| Mielinização | Muita | Pouca | Ausente |
| Diâmetro | 10 μ m | 2 - 6 μ m | 0,4 – 1,2 μ m |
| Velocidade condução | 30 – 100m/s | 1,2 – 30m/s | 0,5 – 2 m/s |
| Temperatura | Não reconhece | Tipo I > 53° Tipo II > 43° | > 43° |
| Tipo de sinal | Propriocepção Toque leve (tato), Vibração | Nocicepção (térmica, mecânica, química) | Nocicepção (ardência, térmica, mecânica, química) |

Fonte: Adaptado a partir de Julius & Basbaum, 2001.

Todas as fibras nociceptivas sensoriais primárias fazem conexões sinápticas com neurônios secundários na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal. Os neurotransmissores mais importantes, liberados ao nível medular, são: substância P, asparto, glutamato, serotonina, noradrenalina, acetilcolina, colecistocinina e ácido gamma-aminobutírico (GABA). Os neurônios do corno dorsal, por sua vez, projetam seus axônios e transmitem a informação nociceptiva para os centros encefálicos superiores, que através de neurônios terciários enviam informação ao córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; ALMEIDA et al., 2004). Os principais tratos que carregam a informação nociceptiva da medula para o encéfalo são o espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espinohipotalâmico (CRAIG & DOSTROVSKY, 1999).

Segundo Romera et al. (2000), na transmissão encefálica existem muitas substâncias relacionadas com a transmissão da dor como: substância P, colecistoquinina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), dinorfina, bradicinina, neurotensina, catecolaminas e glutamato.

Em termos de duração, a sensação dolorosa pode ser transitória, aguda ou crônica. Quando transitória, a ativação de nociceptores é feita na ausência de qualquer dano tecidual. Em contrapartida, na dor aguda geralmente ocorre lesão e ativação de nociceptores no sítio lesionado. Por sua vez, a dor crônica, na maioria das vezes, é gerada por lesão ou doença, podendo ser perpetuada por fatores que não os causadores, primários (LOESER & MELZACK, 1999; WOOLF & MANNION, 1999; ZIMERMANN, 2001; MENDELL & SAHENK, 2003).

Quanto à sua origem, a dor pode ser classificada em: nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica e inflamatória.

A dor nociceptiva decorre da estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros tecidos. A dor neurogênica, reflete dano de tecido neuronal na periferia ou no SNC. Quando há disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos, resultando em quadro algico, denomina-se, então, dor neuropática. No entanto, quando a dor não é proveniente de fonte somática identificável e pode refletir fatores psicológicos, diz-se dor psicogênica (MILLAN, 1999). Por fim, na dor inflamatória, ocorre significativo dano tecidual, com dor geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nessas circunstâncias, geralmente ocorre quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos, produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação (DRAY, 1997).

Na ocorrência de uma lesão tecidual no organismo pode gerar uma resposta rápida a dor, denominada de dor aguda. Esta resposta aciona mecanismos de controle com o propósito de limitar os agentes lesivos e auxiliar a regeneração. Estes mecanismos participam de uma reação inflamatória, composta por quatro sinais cardinais: dor, rubor, calor, edema e, mais tarde, um quinto sinal clínico foi acrescentado a perda de função (GALLIN et al., 1982).

A inflamação envolve a participação de diversos sistemas, mediadores e células especializadas. Entre os principais sistemas pode-se destacar o sistema do complemento, de coagulação, de reparo e angiogênese. Dentre as células pode-se citar as células do sistema imune, como linfócitos e mastócitos, e principalmente os macrófagos, que são responsáveis pela expressão de uma gama de mediadores e radicais livres que contribuirão para o processo inflamatório (HAVSTEEN, 2002).

Entre essas substâncias liberadas pelos leucócitos polimorfonucleares merecem destaque as citocinas que, entre outras ações, permitem ao macrófago matar os microrganismos (MASFERRER et al., 1994).

A formação de prostanóides pelas COXs é uma das responsáveis pela sensação de dor (MASFERRER et al., 1994). Além das prostaglandinas, outros mediadores inflamatórios contribuem para a transmissão da nocicepção, bem como para a inflamação e o processo de recuperação. Dentre eles, pode-se citar: histamina, serotonina, cininas, citocinas, neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, prótons, neurotrofinas, ATP, NO e opióides, entre outros; oriundos do sangue, de células do tecido lesado, células adjacentes ou de células inflamatórias (JULIUS & BASBAUM, 2001; GRIFFIS et al., 2006).

No entanto, em alguns casos, o processo inflamatório deixa de ser uma defesa benéfica e se cronifica. Isso decorre de alterações neuroplásticas que começam pela lesão inicial, mas que resultam em eventos que perpetuam o quadro inflamatório, mesmo tendo a lesão primária se cicatrizado. Nessas condições, a inflamação perde sua característica de proteção e torna-se doença. A grande preocupação na busca dos mecanismos que envolvem a inflamação é devido a sua participação em doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e reumatológicas (NAGRA et al., 1997; MIDDLETON et al., 2000; HAVSTEEN, 2002; KAMIYA et al., 2003; MacMAHON et al., 2005; GARCIA, 2005).

Diferentemente da dor aguda, a dor crônica não tem função biológica protetora. Mais que um sintoma, este tipo de dor é a própria doença, pois a sensação de dor é incapacitante e interminável, podendo durar inclusive por décadas após a lesão inicial. Um exemplo de dor crônica intensa é a dor neuropática, a qual pode ser iniciada por múltiplos fatores, tais como: dieta inadequada (excesso ou falta de vitamina B₁₂, por exemplo), *diabetes mellitus* (tipo I ou tipo II), inflamações crônicas, quadros infecciosos (como na neuralgia pós herpética), amputações, compressões nervosas, alterações no sistema nervoso autônomo, entre outras (MacFARLANE et al., 1997; COUTAUX et al., 2005). Dessa forma, a dor neuropática foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da

Dor como “dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso” (ZIMMERMANN, 2001; MENDELL & SAHENK, 2003).

Os principais sintomas clínicos neste tipo de dor são: hiperalgesia, alodínia e paradoxalmente falta de sensibilidade na área afetada, devido, principalmente, às alterações ocorridas na medula espinhal (CODERRE et al., 1993; WOOLF, 2001).

A excitabilidade aumentada ocorre em função de despolarizações repetitivas das fibras não mielinizadas do tipo C, o que resulta de prolongada descarga no corno dorsal da medula espinhal. Esse fenômeno é conhecido como “*wind up*” (DAVIES & LODGE, 1987; HERRERO et al., 2000) e significa um aumento progressivo no número de potenciais de ação por um estímulo que ocorre em neurônios do corno dorsal. Esses episódios repetitivos de “*wind up*” podem levar à potenciação a longo prazo (*long term potentiation, LTP*), a qual envolve um aumento prolongado na transmissão sináptica (POCKETT, 1995). Esses fenômenos irão induzir inúmeras alterações em receptores (principalmente, os de glutamato e taquicininas) e segundo mensageiros intracelulares (destacando-se a PKC) (OTSUKA & YOSHIOKA, 1993; HERRERO et al., 2000).

Quanto à diminuição da neurotransmissão inibitória como mecanismo etiológico da dor neuropática, sabe-se que está associada, principalmente, as anormalidades na neurotransmissão GABAérgica e à redução da eficácia dos opióides endógenos (ZHANG et al., 1998; WOOLF, 2000).

Além dos mecanismos acima descritos, outros que merecem ser citados são: mudanças nos níveis de transcrição de algumas substâncias como citocinas, sintase do óxido nítrico e enzimas envolvidas na síntese das prostaglandinas, além das fibras A β , que invadem a lâmina I do corno dorsal da medula, tornando essas fibras pró-nociceptivas (RAMER et al., 1999; XIAO et al., 2002).

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

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

Sabe-se que os aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, que é encontrado nas fibras C, apresentam um papel fundamental na transmissão da informação nociceptiva da medula espinhal até os centros superiores (MILLAN, 1999; BLEAKMAN et al., 2006). O glutamato exerce suas ações através de dois grupos distintos de receptores, um formado por receptores acoplados a canais iônicos chamados ionotrópicos e outro formado por receptores acoplados à proteína G, denominados metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos compreendem os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), que são canais iônicos permeáveis ao cálcio, sódio e potássio (DICKENSON, 1997). Estudos demonstram que os receptores NMDA, são formados por diferentes subunidades e são amplamente distribuídos no SNC (MARVIZON et al., 2002; BLEAKMAN et al., 2006). Os receptores cainato, assim como os NMDA, encontram-se amplamente distribuídos no SNC, incluindo o corno dorsal da medula, principalmente nas fibras não mielinizadas e pouco mielinizadas, podendo modular a liberação de GABA em neurônios inibitórios (PALECEK et al., 2004; BLEAKMAN et al., 2006). Já o receptor AMPA é o primeiro a ser ativado em qualquer fenda sináptica frente à liberação de glutamato, decorrendo dele a ativação de outros receptores, como, por exemplo, o NMDA, que promove a remoção do íon magnésio que obstrui seu poro (MILLAN, 2002). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (m GluR) dividem-se em oito subtipos classificados em três subgrupos de acordo com sua homologia e mecanismo de transdução de sinal: o grupo I (m GluR 1 e 5) promove ativação da via da fosfolipase C, o grupo II (m GluR 2 e 3) e o grupo III (m GluR 4, 6, 7 e 8) estão acoplados negativamente à adenilato ciclase (OZAWA et al., 1998; GURPREET & STEPHEN, 2006).

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

A serotonina (5HT, 5-hidroxitriptamina) é uma monoamina que também está envolvida na estimulação das vias descendentes de controle da dor. Estudos têm demonstrado que a estimulação de áreas relacionadas à analgesia está associada à elevação dos níveis de serotonina (BASBAUM, 1981). Está bem estabelecido que as vias serotoninérgicas no sistema nervoso central originam-se dos núcleos da rafe, os quais representam uma rica fonte de serotonina neuronal em mamíferos (FIELDS et al., 1991; MILLAN, 2002). O núcleo dorsal da rafe tem sido implicado nos efeitos regulatórios de antidepressivos nos transtornos de humor (ARTIGAS et al., 1996), assim como na modulação da dor (MILLAN, 2002). Já o núcleo magno da rafe é um núcleo serotoninérgico mais importante na modulação do controle descendente da transmissão da dor (FIELDS, 1991; MILLAN, 2002). Além disso, vários estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que medicamentos antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptção de 5-HT são capazes de produzir marcante analgesia tanto em humanos quanto em animais (CARTER e SULLIVAN, 2002; MILLAN, 2002).

Evidências sugerem que os subtipos de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂ e 5-HT₃ modulam a transmissão nociceptiva. A ativação desses receptores na medula espinhal produz antinocicepção no teste da formalina e em outros modelos de nocicepção (BARDIN et al., 2000; MILLAN, 2002). Os distintos subtipos de receptores 5-HT presentes na medula espinhal parecem exercer diferentes funções no controle da nocicepção, resultando em diferentes mecanismos de transdução de sinal pelos quais cada receptor atua (BARDIN et al., 2000). Dessa forma, a atividade dos receptores de 5-HT é complexa e muitas vezes contraditória. Entre os fatores

que podem influenciar sua resposta, pode-se citar: a contribuição de ação pré ou pós-sináptica do receptor; o estímulo nociceptivo em termos de qualidade e intensidade; e o efeito da dose, que pode ser antinociceptiva ou não, dependendo do subtipo de receptor 5-HT que o agonista ou antagonista irá atuar (HYLDEN e WILCOX, 1980; MILLAN, 2002).

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO EM ANIMAIS

2.2.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético

O teste do ácido acético é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER et al., 1959; VINEGAR et al., 1979; TJOLSEN & HOLE, 1997). A resposta nociceptiva é induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) na quantidade de 10 ml/kg de ácido acético (0,6%) em salina nos ratos e 450 µL nos camundongos (GHIA et al., 2004). Após a injeção, os animais são colocados em caixas de acrílico, para a observação individual e o número de contorções é quantificado cumulativamente, durante um período de 60 min. As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com a figura 2.

Os íons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente canais de cátions não seletivos localizados nas vias aferentes primárias (JULIUS & BASBAUM, 2001). Além disso, a injeção de ácido acético na cavidade peritoneal em ratos promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios como PG, BK, SP, TNF- α , IL-1 β e IL-8 entre outros (COLLIER et al., 1968; VINEGAR et al., 1979; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Esses mediadores estimulam neurônios aferentes primários aumentando a liberação de aspartato e glutamato no fluido cerebrospinal (FENG et al., 2003; ZHU et al., 2004). Nesse modelo produz-se uma resposta da interação de vários neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção, o que faz o modelo sensível às substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica com os mais variados mecanismos de ação (KOSTER et al., 1959; SANTOS et al., 1999).



Figura 2: Modelo experimental de nocicepção induzida pelo ácido acético em ratos, com realização da contorção abdominal, com a extensão de uma pata posterior e a elevação da cauda.

2.2.2 Nocicepção induzida por formalina

O modelo de nocicepção induzida pela formalina consiste em injetar uma substância irritante no espaço subcutâneo da pata traseira em ratos ou camundongos, permitindo avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica, fase I (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória, fase II (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). A resposta nociceptiva é avaliada pela observação de alterações comportamentais e por respostas motoras ao estímulo químico, como o animal permanecer lambendo, agitando ou mordendo a pata injetada. Os animais (ratos) recebem 50 μ L da solução de formalina (2,5%), utilizando-se uma micro seringa. Após a aplicação, os animais são colocados em caixas de acrílico transparentes e observados individualmente. O tempo que o animal permanece lambendo, mordendo ou agitando a pata é cronometrado em segundos. A avaliação total é realizada em 60

min, sendo dividida em 2 fases: fase I de 0-9 min, fase IIA é de 10-40 min e fase IIB de 41-60 min (HUNSKAAR & HOLE, 1997, TJOLSEN e HOLE, 1997).

2.3 ACUPUNTURA

A acupuntura consiste em uma prática terapêutica milenar, originada no Oriente e inserida no conjunto de conhecimentos da medicina tradicional chinesa (M.T.C.), que apresenta relatos históricos fundamentados com 5200 anos. O seu emprego visa o “equilíbrio energético” do indivíduo e alívio de dores agudas e o tratamento de diversas situações patológicas (YAMAMURA, 1995).

Esta energia é equilibrada através dos meridianos ou canais que percorrem o corpo. Neles são encontrados os pontos de acupuntura (total de 365 pontos) que são evocados por estímulos gerados por agulhas ou LASER, proporcionando um desbloqueio do fluxo energético (ULETT e HAN, 1998). A acupuntura difundiu-se como terapia complementar de filosofia holística, diferindo do tratamento alopático, com grande vantagem nos resultados, e não possui efeitos colaterais (KNIGHT, MUDGE, OPENSHAW e HART, 2001; VICENT e FURNHAM, 1996; MACLENNAN, WILSON e TAYLO, 1996).

Aproximadamente 20% da população europeia já utilizou a acupuntura como meio de tratamento para os mais diversos tipos de doenças (FISHER e WARD, 1994). Uma das vantagens da aplicação da acupuntura é a redução da utilização de medicamentos (KNIGHT, MUDGE, OPENSHAW e HART, 2001).

Acupuntura é um método chinês antigo que vem se mostrando eficiente no tratamento de doenças e no alívio da dor (ULETT, HAN e HAN, 1998). Representa uma técnica natural, menos agressiva e com menor interferência nos processos fisiológicos. Seu princípio condiz com a aplicação de agulhas de aço em determinados pontos da pele do paciente, que fornece meios do organismo se auto-tratar, sem o uso de medicamentos (YAMAMURA, 1995).

A aplicação de agulhas através da pele gera um incômodo inicial, cuja percepção é reportada como pontadas, queimação e cansaço; sendo fatores limitantes para a escolha deste tratamento, mas as pessoas que optam pela acupuntura relatam que os benefícios são maiores que o desconforto das agulhas (KVORNING et al., 2004).

Para a MTC, essa estimulação na pele, em pontos específicos, deve produzir uma sensação específica denominada “DEQUI” ou “Qi”, sendo obtido pela manipulação manual da agulha consistindo em rotações e pistonagens (movimentos de subida e descida) que podem ser breves (alguns segundos) ou prolongados por minutos dependendo da situação clínica (LANGEVIN e SHERMAN, 2007). Com a aplicação, ativam-se os canais energéticos, provocando uma sensação de choque, queimação ou tumefação na área, desencadeando uma resposta fisiológica pelas vias aferentes A δ (figura 3).

Este estímulo corresponde a uma frequência de 2 Hz e é responsável pela ativação desta via, enviando informações para o sistema nervoso central (SNC), o qual em resposta libera neurotransmissores (FILSHIE e WHITE, 1998; ASTIN et al., 1998).

A medicina ocidental descreve a ação da acupuntura como a ativação de um receptor sensorial dentro do músculo, que envia impulsos para a medula espinhal que ativará o mesencéfalo e o sistema hipotalâmico-hipofisário; o sítio espinhal utiliza a encefalina e a dinorfina para bloquear os estímulos de baixa frequência e outros transmissores como o GABA (ácido gama-amino-butírico) para estímulos de alta frequência (STUX e HAMMERSCHLAG, 2005).



Figura 3: Reação fisiológica pelas vias aferentes A δ na aplicação dos pontos de acupuntura utilizando agulhas.

As respostas da aplicação das agulhas em determinadas regiões, segundo Dumitrescu (1996), desencadeiam efeitos analgésicos, respostas neuro musculares, antiinflamatórias, imunológicas e até mesmo melhora nos aspectos psíquico-emocionais.

2.3.1 Efeito analgésico

Os pontos da acupuntura são áreas onde, histologicamente, existem maiores quantidades de receptores nervosos como terminações nervosas livres, fusos musculares, órgão tendinoso de Goldi e capilares, quando comparadas com áreas circunjacentes tornando o potencial elétrico dessas áreas diferentes. Isto facilita o potencial de ação nas fibras nervosas locais, que conduzem os estímulos para o Sistema Nervoso Central, principalmente através das fibras A- δ e C (ULETT, HAN e HAN, 1998). O estímulo gerado pela acupuntura vai promover analgesia mediante a atuação em três níveis distintos conforme ilustrado no esquema representativo da figura 4:

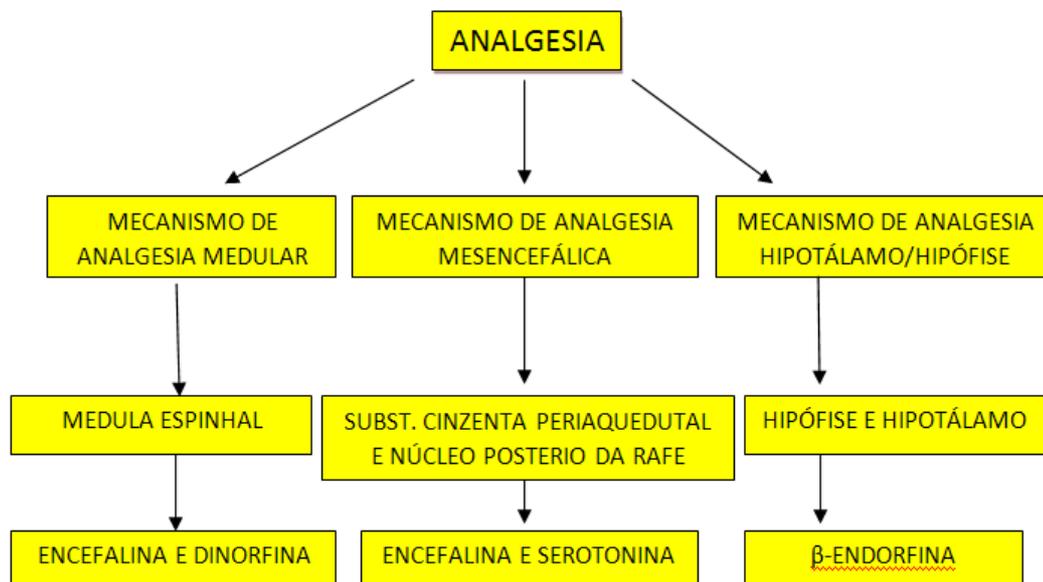


Figura 4: Esquema do mecanismo fisiológico da inibição da dor utilizando os pontos de acupuntura e a demonstração dos três níveis distintos do SNC: medular, mesencefálico e hipotálamo/hipófise.

1. medular: quando uma agulha penetra na pele, ocorre uma estimulação no receptor sensorial existente no interior do músculo este envia impulsos, através das fibras A δ , para a medula espinhal. Na medula ocorre a liberação de encefalina e

dinorfina bloqueando o estímulo aferente nociceptivo. A teoria das comportas da dor, segundo Melzack e Wall explica o efeito medular. O estímulo é conduzido pela substância gelatinosa nas lâminas II e III do corno dorsal da medula espinhal, levando a inibição da primeira célula transmissora do tracto-espinotalâmico (Células T) (SALAZAR e REYES, 2004);

2. mesencefálico: são neurônios da substância cinzenta periaquedutal que vão liberar as encefalinas, as quais ativam o núcleo posterior da rafe, localizado no bulbo, a estimular neurônios do trato descendente dorso lateral para produzir serotonina e noradrenalina inibindo a transmissão ascendente da dor (SALAZAR e REYES, 2004);

3. hipotálamo-hipófise: libera β -endorfina na corrente sanguínea e no líquido cefaloraquidiano (LCR) produzindo analgesia à distância (SALAZAR e REYES, 2004). A β -endorfina está correlacionada em uma base equimolar à produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que vai atuar sobre o córtex da supra-renal causando a liberação de cortisol, explicando a atuação da acupuntura nos processos inflamatórios (STUX e HAMMERSCHLAG, 2005).

Segundo Stux e Hammerschlag, (2005), a acupuntura tem o seu mecanismo neurobiológico explicado pela teoria da β -endorfina, a qual corresponde ao alívio da dor abrangendo hipotálamo e áreas corticais superiores envolvidas na liberação de β -endorfina, bem como opiáceos e neurotransmissores. Porém, quando se inclui o uso de frequências mais altas, associado com a acupuntura, utilizam-se aparelhos de eletroestimulação para manter um nível de estímulo adequado que, por sua vez, aciona as vias aferentes A- β , responsável por ativar o SNC e obter a liberação de dinorfinas e serotoninas (FILSHIE e WHITE,1998; ASTIN et. al., 1998; DUMISTRESCU, 1996).

2.3.2 Efeito anti-inflamatório

Estudos como o de Cho et al. (2006) abordam o efeito da acupuntura em tratamentos inflamatórios. As informações inflamatórias são transmitidas pelos nervos sensoriais para o hipotálamo, estes estímulos são processados e obtém-se como resposta uma ação antiinflamatória pelo sistema humoral do sistema nervoso

autônomo (SNA), através do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal. Tais autores descreveram a interação entre o SNA, a resposta imune e o mecanismo da acupuntura, atuando como um modulador. Pesquisas neuroimunológicas e dos reflexos autônomos serviram de base para o entendimento do mecanismo desta técnica milenar, que atua no fator de necrose tumoral α (TNF- α) e em algumas citocinas, como a IL1 β (interleucinas- 1 β), substâncias que existem no cérebro e interagem diretamente no sistema imune na periferia. Em comunicação com o cérebro, estas citocinas estimulam o SNA, que, por sua vez, age sobre o nervo parassimpático liberando a acetilcolina (ACh), resultando uma resposta reflexo neuroimune, suprimindo a liberação das citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF- α). Esta resposta de supressão colinérgica das citocinas inflamatórias constitui em um importante papel na compreensão da ação da acupuntura. Este mecanismo distinto é realizado por estímulos eferentes induzindo uma resposta do aumento da atividade colinérgica do nervo vago gerando um efeito antiinflamatório (figura 5).

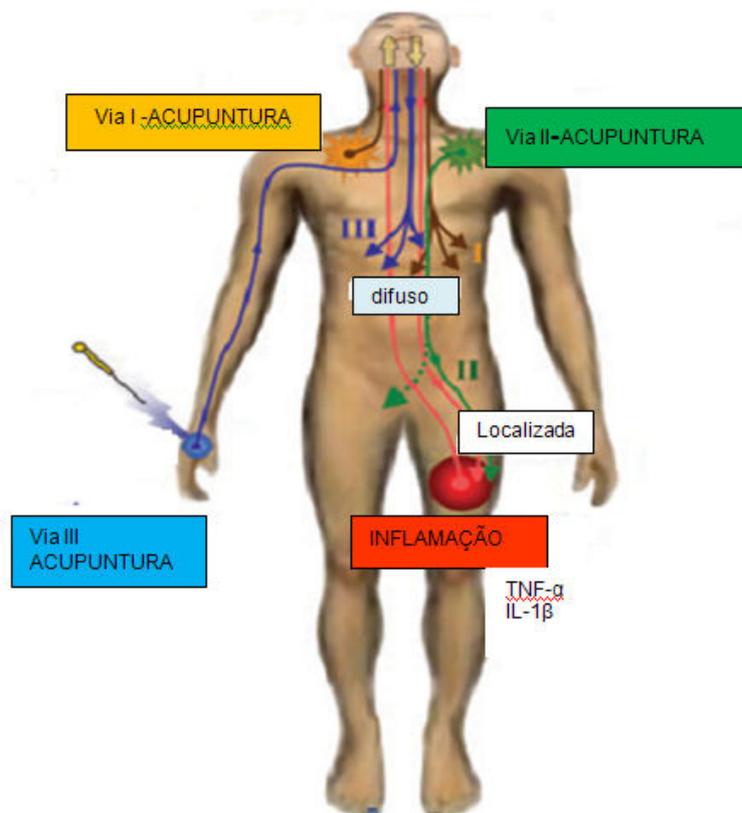


Figura 5: Vias aferentes e eferentes nas possibilidades do efeito anti-inflamatório produzidos em resposta a aplicação da acupuntura. (I) Via eferente anti-inflamatória após estimulação da agulha, resposta via vagal; (II) Via eferente anti-inflamatória direta e local na aplicação da agulha (Liberação de TNF- α) (III) Via eferente S.N.C e medular após a aplicação da acupuntura (adaptada de CHO et al, 2006).

Stux e Hammerschlag, 2005, em pesquisas com modelos animais, demonstraram a liberação de β -endorfina, pela hipófise, no efeito analgésico da acupuntura, sendo que esta molécula também é precursora do hormônio ACTH, o qual desencadeia a síntese e secreção de corticoesteróides fisiológicos (cortisol) pelo córtex da glândula supra-renal. O cortisol é um hormônio que produz propriedades anti-inflamatórias e atua na maioria dos tecidos.

2.4 LASER

O termo 'LASER' é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz através da emissão estimulada de radiação). Embora Albert Einstein, a partir da lei de Radiação de Planck, a qual se refere à energia por unidade de área e unidade de tempo para cada comprimento de onda, tenha delimitado os princípios subjacentes à geração deste tipo de luz, foi em 1960 que o primeiro LASER foi desenvolvido por Theodore H. Maiman. A idéia inicial para a produção do LASER ocorreu através de um material sólido (cristal de rubi) (COLLS, 1984; BAXTER, 1994).

Quando um átomo recebe energia, pode ocorrer a passagem de um elétron na sua camada normal (E1) para uma camada superior (E2) tornando-se instável, como este estado não é normal, existe uma tendência deste elétron voltar para sua camada de origem, o que produz um fóton de energia unidirecional em forma de onda eletromagnética, este fenômeno é conhecido como emissão espontânea de radiação.

Quando a fonte energética fornece mais energia a um átomo, que já está em um estado instável (excitado), este libera então dois fótons com as mesmas características do feixe incidente, caracterizando a emissão estimulada de radiação, ilustrada na figura 6 (COLLS, 1984).

Este processo leva à produção do LASER, o qual se realiza por estar em uma cavidade óptica, composta por dois espelhos cuidadosamente alinhados, para que a radiação reflita de um dos lados ao outro espelho, possibilitando uma emissão de um feixe luminoso (PIMENTA, 1990).

As suas primeiras aplicações foram apontadores de LASER, leitores de código de barra e até dispositivos militares (BAXTER, 1994). Javan, Benett e Herriot em 1960, construíram o LASER de hélio-neônio, sendo a primeira fonte de luz a estar disponível comercialmente, recebendo o nome de *soft* LASER. Porém, no final da década de 70 surgiram os LASERS de arseneto de gálio (Ga-As) e de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As) (BAXTER, 1994).

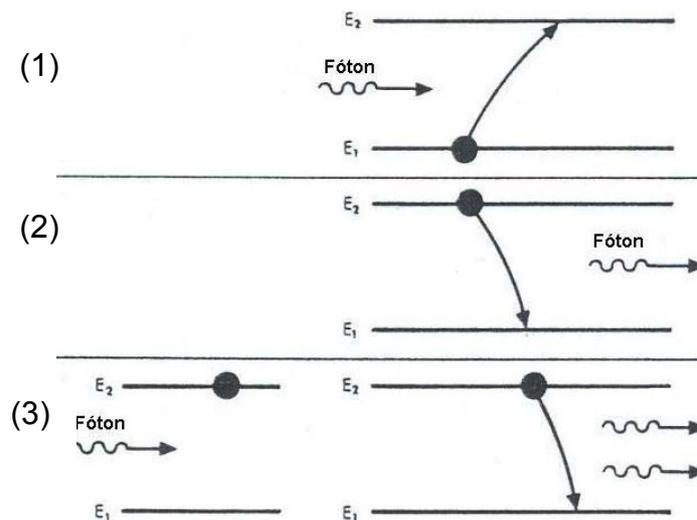


Figura 6: (1) átomo passando do estado fundamental para estado instável, (2) Liberação de um fóton, (3) Emissão estimulada de radiação (adaptada de Colls, 1984).

Desde a sua concepção à sua aplicação, teve grande importância na medicina de modo geral, mas a oftalmologia foi a especialidade que mais preconizou o uso em seres humanos. Os resultados dos estudos indicaram um potencial de irradiação dos LASERS de intensidade relativa baixa, aplicada nos tecidos, chamada de fotobioestimulação obtendo regeneração dos tecidos (MESTER et al., 1985).

Os trabalhos iniciais, no ocidente, com a terapia de baixa potência começaram no ano de 1970, como Dr. Friedrich Plog, do Canadá, baseado no sistema de LASER HeNe, este desenvolveu especificamente um aparelho para tratamento com a técnica da acupuntura. Outros países como Japão e a Rússia utilizam o LASER com sucesso na aplicação de pontos para sintomas de doenças como exoftalmia, hipertireoidismo, inflamação pélvica e, principalmente, para o alívio da dor (BAXTER, 1994).

Após este momento, iniciaram-se as aplicações do LASER de baixa potência em diversos experimentos e tratamentos. Embora a terapêutica da acupuntura à LASER tenha se expandido rapidamente na população, a avaliação de sua eficácia é considerada como difícil devido à ausência de descrições exatas de todos os seus parâmetros, como comprimento de onda, potência e intensidade (WHITTAKER, 2004).

2.4.1 Princípios Físicos

A produção da radiação a LASER, como descrito anteriormente, ocorre quando um átomo se encontra no seu estado excitado e seus elétrons podem retornar para níveis mais baixos de energia emitindo um fóton incidente. Nestas circunstâncias, o elétron libera seu excesso de energia como um fóton de luz sincronizado (BAXTER, 1994). As radiações geradas pelos aparelhos a LASER terapêutico possuem quatro características:

1. monocromaticidade: a luz produzida por um LASER é de cor única, sendo a maior parte da radiação emitida pelo dispositivo de tratamento agrupado em torno de um único comprimento de onda com uma largura de banda muito estreita, este parâmetro é um fator crítico na determinação dos efeitos terapêuticos produzidos por tratamentos por laser. O comprimento de onda possui uma relação inversamente proporcional à sua frequência, ou seja, quanto maior o comprimento de onda utilizado menor será seu aporte energético;
2. colimação: os fótons produzidos pelos aparelhos de LASER quase não possuem divergência da radiação emitida com a distância, essa propriedade mantém uma área relativamente pequena para distâncias consideráveis, mesmo quando passando através de tecidos;
3. coerência: a luz emitida apresenta uma mesma fase; as depressões e picos das ondas se combinam no espaço e no tempo, ou seja, possuem um sincronismo;
4. polarização: esta ocorre quando as ondas de luz estão orientadas em um só plano, de tal modo que as vibrações em seus campos elétricos aconteçam em uma única direção (BAXTER, 1994).

Diversos são os parâmetros que descrevem a radiação emitida pelos equipamentos de LASER, dentre eles: o comprimento de onda, que consiste na distância entre dois picos de uma onda (um ciclo), cuja unidade é expressa em nanômetros (nm); a potência, que é a energia emitida em segundos, cuja unidade é expressa em watts (W); a densidade de potência, a qual é definida como a potência de saída da luz por área de irradiação, cuja unidade é expressa em watts por centímetro quadrado (W/cm^2) e a densidade de energia, a qual expressa dose emitida em joule por centímetro quadrado (J/cm^2). Estes fatores são importantes nos efeitos fisiológicos da radiação LASER, pois determinam principalmente a absorção da radiação pelas biomoléculas e a sua profundidade de penetração (BAXTER, 1994; COOLS, 1984; KARU, 1998; TURNER e HODE, 1999). A radiação LASER penetra no tecido humano em várias profundidades, sendo que a maior parte é absorvida nos primeiros milímetros do tecido. Segundo Ozawa et al. (1998), a maior efetividade na penetração dos tecidos são nos equipamentos com o comprimento de onda de 830 nm.

A laserterapia de baixa intensidade ou de baixa potência é um termo genérico que define a aplicação terapêutica de LASERS e diodos superluminescentes monocromáticos com potência relativamente baixa (< 500 mW) para tratamento de doenças e lesões utilizando dosagens consideradas baixas demais (normalmente < 35 J/cm^2) para efetuar qualquer aquecimento detectável nos tecidos irradiados (BAXTER, 1994). Os LASERS terapêuticos apresentam comprimentos de onda na faixa do visível e do infravermelho. O de emissão visível apresenta o comprimento de onda na faixa de 632,8 nm, as emissões de radiação infravermelha estão compreendidas entre os comprimentos de onda de 730nm e 1300nm, produzidos a partir do Arseneto de Gálio (As-Ga) e do Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) (BAXTER, 1994).

O quadro 2 relaciona os diferentes tipos de emissão, seus respectivos comprimentos de onda, tipos de pulso e indicações de aplicação na área de saúde.

O organismo possui uma função fotorreguladora a partir de fotorreceptores capazes de absorver um fóton de determinado comprimento de onda, chamado de cromóforo, que é uma biomolécula capaz de ser excitada pelos fótons gerando uma atividade funcional e metabólica na célula (KARU, 1998).

O LASER de baixa potência, pela ação de absorção dos cromóforos, possui importantes efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos. Dentre eles, pode-se citar a troca de potenciais de membrana, equilíbrio da bomba sódio e potássio, repolarização e hiperpolarização da membrana, aumento do potencial de ação nervoso, antiinflamatório (estímulo da microcirculação, absorção de exudatos e interferência na síntese de prostaglandinas), aceleração dos processos metabólicos celulares e aumento da síntese de ATP (PÉREZ et al., 2000).

Quadro 2: tipos de emissão, comprimentos de onda, pulso e indicações.

| MATERIAL | COMPRIMENTO DE ONDA (nm) | REGIME DE PULSO | INDICAÇÃO |
|-----------------|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|
| Rubi | 694 | Pulsado/Contínuo | Remoção de tatuagem |
| Alexandrite | 755 | Pulsado | Remoção de pêlos |
| Neodímio-YAG | 1064 | Pulsado | Coagulação de tumores |
| Hólmio-YAG | 2130 | Pulsado | Endodontia |
| Érbio-YAG | 2940 | Pulsado | Peeling |
| AlGaInP | 630-685 | Contínuo | Bioestimulante |
| AsGaAl | 780-870 | Contínuo | Bioestimulante |
| AsGa | 904 | Pulsado | Bioestimulante |
| Exímeros | 193/248/308 | Pulsado | Cirurgia vascular e oftálmica |
| Argon | 350-514 | Contínuo | Cirurgia vascular e oftálmica |
| Vapor de Cobre | 578 | Pulsado/Contínuo | Cirurgia oftálmica e dermatológica |
| HeNe | 632,8 | Contínuo | Bioestimulante |
| CO2 | IR 9.4 e 10.6 | Pulsado/Contínuo | Cirurgia Dermatológica |

Fonte: TUNER e HODE, 1999.

2.4.2 Efeitos Fisiológicos

A aplicação do LASER de baixa potência nos tecidos produz numerosos fenômenos bioquímicos e biológicos, proporcionando efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e de cicatrização tecidual conforme descritos na seqüência (CABRERA, PERÓN e ALFONSO, 2002):

(1) efeito anti-inflamatório: a ação inibitória do LASER de baixa potência sobre o processo inflamatório é explicada pela promoção dos quatro principais efeitos: inibição dos fatores quimiotáticos nas primeiras etapas da lesão (ativação de monócitos e macrófagos), interferência nos mediadores químicos ou superóxidos induzidos pela inflamação, diminuição do volume do exudato alternando a permeabilidade vascular e a normalização da permeabilidade da membrana;

(2) efeito analgésico: os mecanismos envolvidos no efeito analgésico do LASER estão provavelmente relacionados ao relaxamento muscular e aos opióides endógenos. Sua ação atua na diminuição da inflamação e da dor através da reabsorção de exudatos inflamatórios favorecendo, desta forma, a eliminação de substâncias como bradicinina, histamina e acetilcolina. Além disso, ocorre uma elevação do limiar da dor nos nervos periféricos, ocasionando um bloqueio na despolarização das fibras aferentes tipo C. Segundo Suarèz et al. (2003), o efeito analgésico é produzido pela troca de potencial da membrana e equilíbrio da bomba Na/K-atpase (sódio/potássio), devido à repolarização e da hiperpolarização da membrana, previamente despolarizada na situação de dor;

(3) efeito cicatrizante: a radiação emitida pelo equipamento de baixa potência age sobre a proliferação celular, atuando nos processos de reparação tecidual. O seu efeito bioestimulante no processo de cicatrização ocorre por meio do aumento de macrófagos, de granulação de mastócitos, angiogênese, aumento da atividade fagocitária e aumento de fibroblastos e formação do tecido conjuntivo.

O uso do LASER é eficiente, mas depende de uma correta dosificação. Colls (1984) determina algumas dosimetrias em função do efeito desejado: efeito antiálgico de 2 a 4 J/cm²; antiinflamatório de 1 a 3 J/cm²; regenerativo de 3 a 6 J/cm²; circulatório de 1 a 3 J/cm². Este mesmo autor classifica os níveis de dosagem conforme o estágio do processo inflamatório, agudo (1 a 3 J/cm²); subagudo (3 a 4 J/cm²) e crônicos (5 a 7 J/cm²). Já Turner e Rode (2004) em seus estudos, relataram o alívio da dor obtido com intensidades entre 3 e 4 J/cm².

Usualmente, a aplicação do LASER de baixa potência é indicada para lesões ou dores localizadas, mas vários autores têm recomendado o seu uso em tratamentos em pontos de acupuntura como terapêutica, principalmente para o alívio da dor (BAXTER, 1994). A utilização do laser pode substituir o uso das agulhas de

metais com a mesma eficácia (STUX e HAMMERSCHLAG, 2005). A acupuntura empregando LASER possui vantagens em relação à aplicação tradicional porque seu procedimento não possui sensação dolorosa, não é traumático, não invasivo e facilmente utilizado. O mecanismo geral do efeito terapêutico do LASER de baixa potência na acupuntura não é completamente compreendido, mas Kim et al., (2006), em experimento utilizando LASER de baixa potência nos pontos de acupuntura, obtiveram um aumento do limiar da dor (PÉREZ, DIAZ, FALCON e FERNÁNDEZ, 2000).

A redução da dor ou de espasmos musculares é um dos objetivos do tratamento com tecnologia LASER, através da qual irradia-se um feixe de luz na pele ativando a raiz nervosa e levando a uma resposta sobre locais da dor (BAXTER, 1994). Similarmente, a irradiação do laser nos locais onde há maior quantidade de terminações nervosas livres, pode também ser benéfica para tratamento da dor, pois envia o estímulo diretamente para dentro da distribuição sensorial do nervo, depois para o sistema nervoso simpático, desta maneira proporcionando melhora de sintomas.

Os pacientes relatam como resposta a este tratamento uma sensação de calor, formigamento, ferroadada ou agulhada (BAXTER, 1994). Evidências do efeito da acupuntura utilizando fotoestimulação, foram descritas em uma publicação sobre a ativação da área cortical visual após sua aplicação no acuponto B67, por meio de imagens de ressonância magnética (WHITTAKER, 2004) .

Experimentos com tecnologia LASER de baixa potência sugerem que este possui uma penetração nos tecidos biológicos (pele, órgãos e sangue) em uma profundidade de 200-300 μ m (BAXTER, 1994).

O LASER mais utilizado na acupuntura é o AsGaAl, sendo que este emite comprimentos de onda que variam entre 780 a 870 nm, potências entre 20 a 100 mW podem fornecer uma saída contínua ou pulsada, atingindo seu pico de penetração ao redor de 2-3 cm (WHITTAKER, 2004).

Segundo Ghottsching et al., 2007, em experimentos com crianças portadoras de cefaléias severas, utilizou o LASER em pontos de acupuntura, com um comprimento de onda de 830nm e uma potência de 30 mW, obtendo um resultado significativo ($p < 0,0001$) comparado ao placebo. Demonstrou-se que o

efeito fisiológico do LASER além da inibição da bomba Na-K- ATPase, exercendo uma influência no potencial de ação das células pode induzir um bloqueio reversível no transporte mitocondrial, resultando na diminuição de neurotransmissão nas fibras A- δ e C responsáveis pela condução da dor.

Os comprimentos de onda na faixa entre 810 nm e 840 nm apresentam maior profundidade de penetração, enquanto os LASERS AsGa e AsGaAl alcançam a profundidade média de 20 a 50mm, fazendo com que os cromóforos superficiais, que são biomoléculas capazes de serem excitadas por fótons incidentes, transformem a energia em efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos (BAXTER, 1994; KARU, 1998).

Novoselova et al. (2006), em experimento com camundongos utilizaram o equipamento LASER HeNe, com a potência de 0,2mW/cm² e o comprimento de onda de 632,8 nm, durante 30 dias, para efeito de imunoterapia observando a produção do NO e citocinas. Este estudo demonstrou que a exposição constante do laser diminuiu a produção de NO nos macrófagos.

Os efeitos da radiação Laser sobre os tecidos variam conforme a absorção da sua energia e a transformação desta em determinados processos biológicos. Tanto o comprimento de onda da radiação como as características ópticas do tecido considerado, formam parte dos fenômenos que originam a absorção (CABRERA, PERÓN e ALFONSO, 2002).

Mas a aplicabilidade do LASER de arseneto de gálio (infra-vermelho) de baixa potência, em modelos animais, produziu nas células imunes um aumento na produção de citocinas, óxido nítrico, proteínas de proteção e oxigênio. Esses efeitos dependem de sua energia, da área de espectro à qual ele pertence, seu regime de funcionamento e suas qualidades de coerência (EBNESHAHIDI et al., 2005).

Sendo assim, a partir deste referencial teórico passa-se a descrever o modo de desenvolvimento desta pesquisa, evidenciando os materiais e métodos utilizados para avaliar a ação da acupuntura e da radiação LASER de baixa potência em modelo experimental.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo constitui-se de uma pesquisa experimental provocada, randomizada, do tipo duplo cego. Os experimentos foram realizados após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob o registro no CEUA/PUCPR nº 198. Obedeceu-se ao longo do trabalho aos preceitos éticos para o cuidado dos animais de laboratório visando uma investigação científica da dor em animais de experimentação, conforme a Lei 6638/79. Os experimentos foram realizados no laboratório de Neurociência da Universidade Federal de Santa Catarina e o número de animais e a intensidade de estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos. A técnica de eutanásia utilizada no experimento, recomendada pelo comitê de ética em pequenos animais, foi à utilização da câmara de CO₂.

3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos machos (as fêmeas possuem o ciclo hormonal, o qual pode interferir na nocicepção), da linhagem Wistar, pesando entre 250-350g, procedentes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina, com a idade variando entre seis e sete semanas. Os animais permaneciam aclimatizados, sob o ciclo claro e escuro (12 h claro/12 h escuro, claro às 7:00 h), com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e livre acesso à água e comida. Os ratos foram homoganeamente distribuídos entre os grupos. Todos os animais utilizados foram climatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo.

Os animais foram divididos em seis grupos, a saber:

(1) controle é o grupo que não recebeu o tratamento com agulhas ou LASER (n=8);

- (2) grupo *sham*, o qual recebeu estímulo de LASER fora dos pontos de acupuntura (n=8);
- (3) grupo tratamento com agulhas de acupuntura no acuponto E36 (n=8);
- (4) grupo tratamento com LASER de baixa potência no acuponto E36 com o aparelho ligado (n=8);
- (5) grupo tratamento com LASER de baixa potência no acuponto E36 com o aparelho desligado (n=8);
- (6) grupo tratamento com agulhas e com LASER de baixa potência no acuponto E36 (n= 8).

O ponto de acupuntura E36 (Zusanli) fica localizado, em animais, a 5 mm lateral e distal do tubérculo anterior da Tíbia (figura 7).

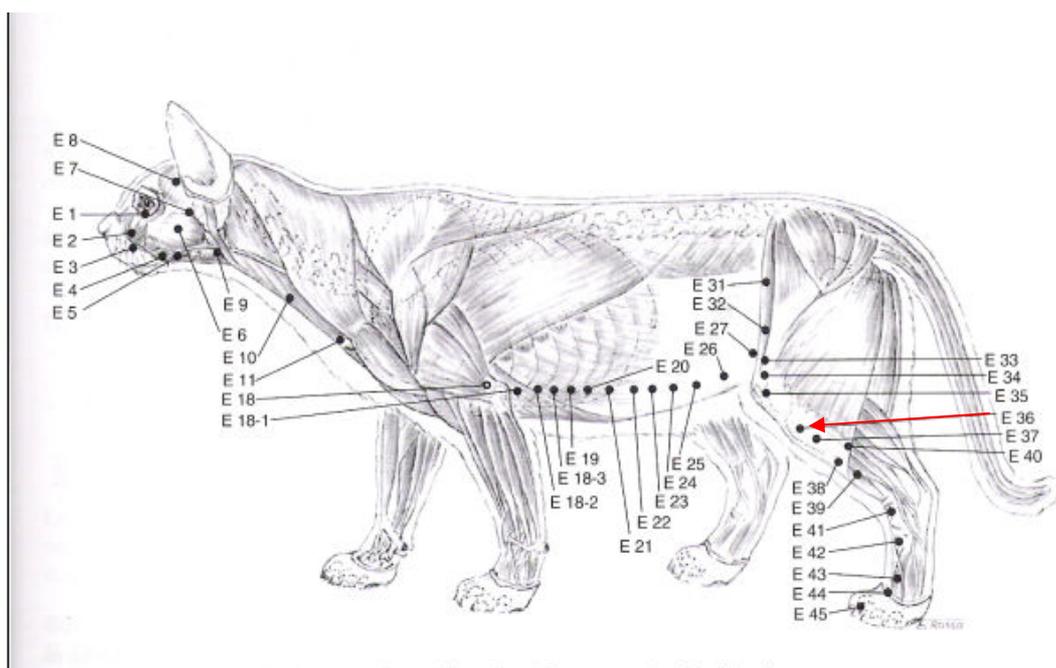


Figura 7: Localização do ponto E36 em animais. Fonte: DRAEHMPAEHL e ZOHMANN, 1997.

Nos grupos 3 e 6, foram utilizadas agulhas estéreis de acupuntura 0,25 (diâmetro) x 0,7 (comprimento) mm inseridas no ponto E36 bilateralmente, conforme ilustrado na figura 8, durante um período de 15 min.

Nos grupos 4 e 6, os animais foram tratados com LASER de baixa potência AsGaAl IBRAMED no ponto E36 bilateralmente, nas seguintes especificações:

comprimento de onda de 830nm (contínuo), dose de 3 J/cm², potência de 30mW e período estimulatório 6 s. O instrumento empregado encontra-se ilustrado na figura 9.

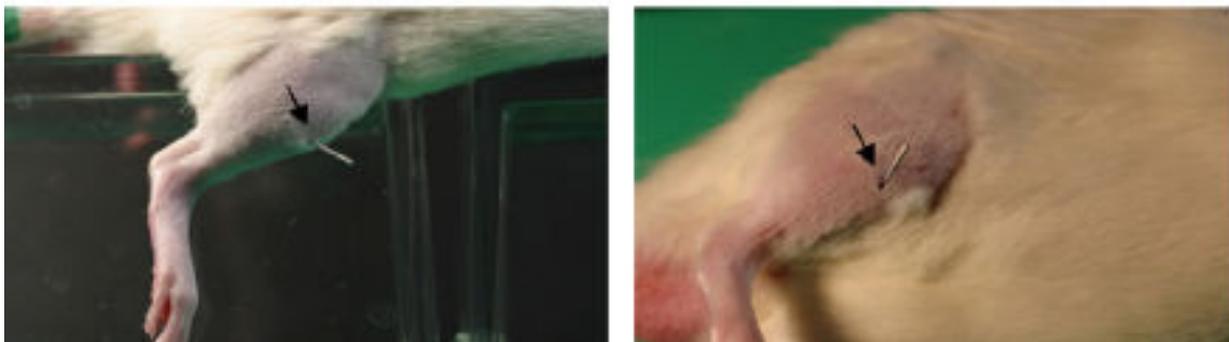


Figura 8: Localização do ponto E36 (Zusanli) em ratos Fonte: YIN et al.,2008.



Figura 9: Aparelho LASERPULSE, caneta LASER comprimento de onda 830 nm, fabricado pela IBRAMED.

3.2 CALIBRAÇÃO DO APARELHO LASER

A potência do aparelho LASER (IBRAMED) foi verificada por meio do medidor *Pocket Power- Handheld Power Meter*, produzido pela Melles Griot, ilustrado na figura 10.



Figura 10: Medidor de potência *Pocket Power* empregado no ensaio de calibração.

O teste foi realizado medindo-se a potência irradiada 3 vezes e depois foi calculada pela média dessas medidas (29,1 mW). A calibração foi realizada irradiando-se o feixe do LASER sobre o sensor do aparelho, o instrumento realiza a leitura após 2 s de exposição mostrando o valor da potência.

3.3 AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA

3.3.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético

Os modelos já descritos no capítulo 2 serão detalhados em procedimentos conforme o transcurso da pesquisa:

- (1) ambientação dos animais durante 60 min em caixas de acrílico;
- (2) animais selecionados aleatoriamente;
- (3) grupo 2 tratados durante 6 s com LASER de baixa potência no ponto *sham*;
- (4) grupo 3 tratados durante 15 min com agulhas de acupuntura 0,25 x 0,7 mm no acuponto E36;
- (5) grupo 4 tratados durante 6 s com LASER de baixa potência no acuponto E36, com o aparelho ligado;
- (6) grupo 5 tratados durante 6 s com LASER de baixa potência no acuponto E36, com o aparelho desligado;
- (7) grupo 6 tratados durante 15 min com agulhas e 6 s com LASER de baixa potência no acuponto E36;
- (8) após os tratamentos foi realizada a injeção de 10 ml/kg de ácido acético i.p.nos ratos;

- (9) os ratos foram colocados individualmente em caixas de acrílico transparente com espelhos na parede posterior para melhor visualização;
- (10) quantificação do número de contorções abdominais durante um período de 60 min foi realizada por um segundo pesquisador (discente do mestrado de Neurociências da UFSC).

A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número das contorções abdominais observadas nos animais tratados sistemicamente com acupuntura e/ou radiação LASER (figura 11).

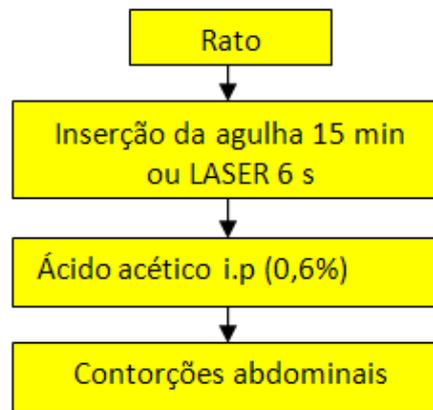


Figura 11: Esquema ilustrativo do modelo de nocicepção do ácido acético.

3.3.2 Nocicepção induzida por formalina

Neste estudo o efeito da acupuntura e da radiação LASER, também foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pela formalina para avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a neurogênica e a inflamatória. As etapas de desenvolvimento da pesquisa experimental foram:

- (1) os animais utilizados foram individualmente ambientados em caixas de acrílico (60 min);
- (2) animais selecionados aleatoriamente;
- (3) grupo 2, tratado durante 6 s com LASER de baixa potência no ponto *sham*;
- (4) grupo 3, tratado durante 15 min com agulhas de acupuntura 0,25 x 0,7 mm no acuponto E36;
- (5) grupo 4, tratado durante 6 s com LASER de baixa potência no acuponto E36, com o aparelho ligado;

- (6) grupo 5, tratado durante 6 s com LASER de baixa potência no acuponto E36, com o aparelho desligado;
- (7) grupo 6, tratado durante 15 min com agulhas e 6 s com LASER de baixa potência no acuponto E36;
- (8) após os tratamentos foi realizada a aplicação de formalina volume de 50 μ L de solução de formalina 2,5% diluída em salina foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal;
- (9) os ratos foram colocados individualmente em caixas de acrílico transparente com espelhos na parede posterior para melhor visualização;
- (10) observação do período de tempo em que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada: (A) de 0-9 min classificada como fase I (fase neurogênica), (B) de 10-40 min como fase II A (fase inflamatória) e (C) de 41-60 min como fase II B (fase inflamatória) após a injeção da formalina (Figura 12), realizada por um segundo pesquisador.

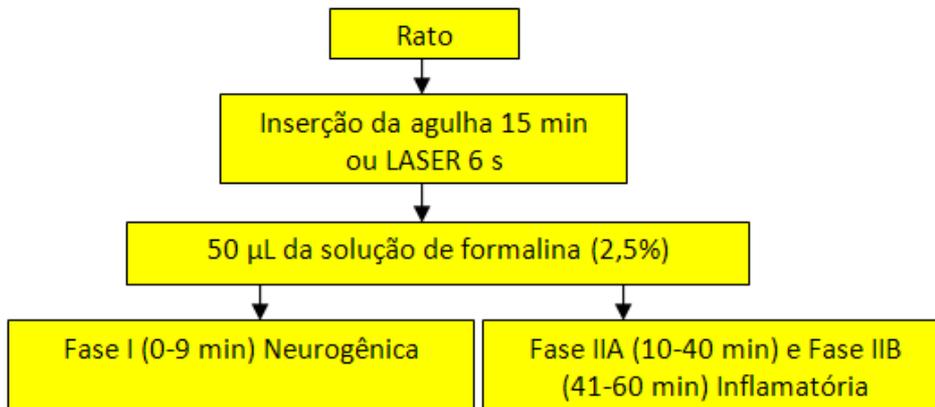


Figura 12: Esquema ilustrativo das fases do modelo de nocicepção induzido pela formalina.

3.4 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA

Após os resultados obtidos nos modelos de nocicepção descritos anteriormente, a etapa seguinte do trabalho foi analisar os mecanismos que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto “Zusanli” (E36), conseguida após o tratamento com agulha e com o estímulo fotônico. Portanto, neste trabalho analisaram-se os mecanismos antinociceptivos desses

tratamentos utilizando o modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético. Desta forma, utilizaram-se antagonistas e metodologias específicas para analisar a participação dos seguintes sistemas: opióide e serotoninérgico.

3.4.1. Envolvimento do sistema opióide

A fim de avaliar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no acuponto E36 (Zusanli), os ratos foram tratados inicialmente com naloxona (antagonista dos receptores opióides, 1 mg/kg, i.p), após 20 min da aplicação deste antagonista, os animais foram tratados durante 15 min, um grupo, com agulhas de acupuntura (0,25 x 0,7mm) bilateralmente no acuponto E36, outro grupo, tratados 6 s com LASER de baixa potência, no acuponto E36, com o aparelho ligado e o terceiro grupo, com a morfina (agonista dos receptores opióides, 5 mg/kg, s.c.) (LEMBERG et al., 2006), conforme ilustrado na figura 13. A possível participação do sistema opióide na ação antinociceptiva desses tratamentos foi investigada no modelo de nocicepção induzida por ácido acético, observando se houve reversão do efeito antinociceptivo do grupo de animais tratados 15 min com agulhas de acupuntura no acuponto E36 e nos animais tratados 6s com LASER de baixa potência neste mesmo acuponto.

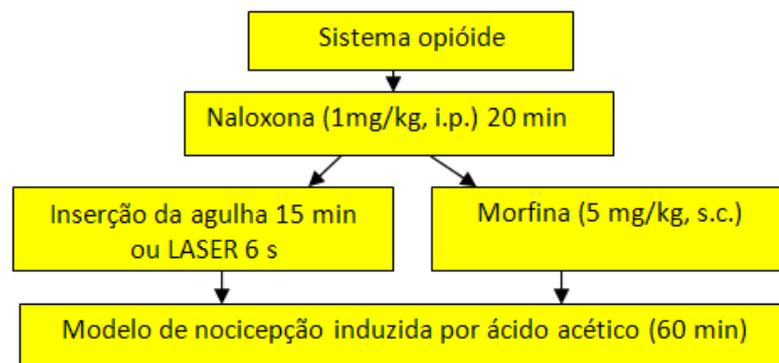


Figura 13: Esquema ilustrativo da avaliação do mecanismo opióide.

3.4.2. Envolvimento do sistema serotoninérgico

Para evidenciar a possível participação do sistema serotoninérgico sobre a atividade antinociceptiva da acupuntura realizada no acuponto E36 (Zusanli), foi

investigada a participação dos seguintes subtipos de receptores serotoninérgicos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT₃. Para isso, os animais foram pré-tratados com pindolol (1 mg/kg s.c., um antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A/B}) (CORRALES et al., 2000), cetanserina (1 mg/kg i.p., um antagonista seletivo do receptor 5-HT_{2A}) (BAEK et al., 2005) e ondansetrona (1 mg/kg i.p., um antagonista seletivo do receptor 5-HT₃) (YOKOGAWA et al., 2002) após 20 min os animais foram tratados durante 15 min. com agulhas de acupuntura (0,25x0,7mm) bilateralmente no acuponto E36 ou tratados 6 s com LASER de baixa potência, no acuponto E36, com o aparelho ligado, ou receberam a administração dos respectivos agonistas: buspirona (1 mg/kg s.c., um agonista parcial do receptor 5-HT₁), DOI (0,5 mg/kg i.p., agonista do receptor 5-HT_{2A}) ou agmatina (1 mg/kg i.p., SANTOS et al., 2005, em seus estudos anteriores demonstraram que seu efeito antinociceptivo reverteu a ondansetrona), (figura 14), 15 min depois os animais foram avaliados no teste do ácido acético (SANTOS et al., 1999; VAZ et al., 1996). A possível participação do sistema serotoninérgico na ação antinociceptiva da acupuntura no ponto “Zusanli” (E36) foi investigada no modelo de nocicepção induzida por ácido acético por meio da contagem do número de contorções abdominais, observando se houve a reversão do efeito antinociceptivo do grupo de animais tratados 15 min com agulhas de acupuntura no acuponto E36 e nos animais tratados 6s com LASER de baixa potência neste mesmo acuponto.

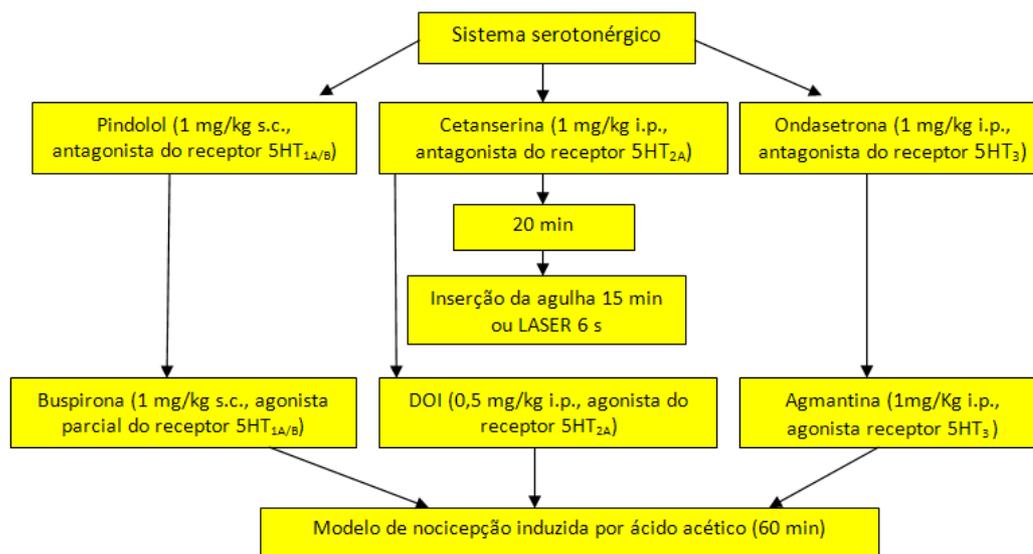


Figura 14: Esquema ilustrativo da avaliação do mecanismo serotoninérgico.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Neste capítulo, apresentam-se os registros gráficos dos resultados. Os dados iniciais referem-se aos efeitos antinociceptivos da acupuntura e do LASER de baixa potência, e os finais expressam seus mecanismos de ação.

4.1 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO ÁCIDO ACÉTICO

Os resultados apresentados em forma de gráfico na figura 15 mostram inicialmente que animais tratados com LASER *on* (ligado) em ponto *sham*, bem como o grupo que recebeu tratamento com LASER *Off* (desligado) no acuponto Zusanli (E36) não demonstraram redução no número de contrações induzidas pelo ácido acético, apresentando um resultado muito próximo ao controle positivo (ácido acético). Em contrapartida, os animais tratados com LASER de baixa potência (6 s), ou os tratados com agulhas de acupuntura bilateralmente no acuponto E36 (15 min), assim como os animais que receberam os dois tratamentos (agulhas de acupuntura bilateralmente por 15 min mais tratamento com LASER de baixa potência por 6 s, ambos no acuponto E36), produziram inibição significativa do número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em ratos, com os seguintes valores da variação de inibição: estímulo fotônico (LASER), $(36 \pm 2)\%$; estímulo mecânico (agulhas), $(42 \pm 6)\%$; e ambos os estímulos (agulhas + LASER), $(39 \pm 6)\%$.

4.2 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA

Os resultados apresentados nas figuras 16, 17 e 18 mostram que os animais tratados com LASER de baixa potência (6 s), ou os animais tratados com agulhas de acupuntura bilateralmente no acuponto E36 (15 min), assim como os animais que receberam os dois tratamentos (agulhas de acupuntura bilateralmente por 15 min mais

tratamento com LASER de baixa potência por 6 s, ambos no acuponto E36), promoveram inibição significativa na nocicepção induzida pela formalina (2,5%), tanto na fase neurogênica (0-9 min, A) quanto na inflamatória (10-40 min, IIA e 41-60 min, IIB). Foi utilizado como tempo de reação, característico de nocicepção, o tempo em que o animal permaneceu lambendo, mordendo ou sacudindo as patas. As variações das inibições causadas pelos tratamentos com LASER de baixa potência (6 s), com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min), no acuponto E36, bem como o grupo que recebeu os dois tratamentos, foram de: $(48 \pm 7)\%$ com o estímulo fotônico (LASER on), $(51 \pm 7)\%$ com o estímulo mecânico (agulhas) e $(54 \pm 4)\%$ ambos os estímulos (agulhas + LASER on), na fase neurogênica da formalina (I), observada na figura 16.

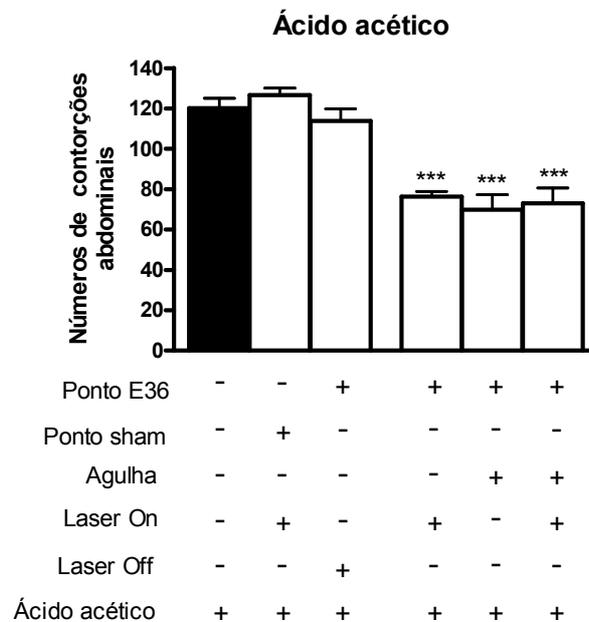


Figura 15: Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no acuponto E36 (Zusanli). Um grupo de animais tratados com LASER de baixa potência (6 s), outro grupo de animais tratados com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min) no E36, bem como um grupo tratado com ambos os estímulos, na nocicepção induzida por ácido acético 0,6% (10ml/kg, i.p.) em ratos. Cada grupo representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (pelo teste de Newman-Keuls), os sinais “+” indicam que foram administrados os respectivos tratamentos nos animais e o sinais “-” que não foram tratados.

Os resultados apresentados na figura 17 mostram uma inibição significativa da fase inflamatória (10-40 min, IIA) da nocicepção induzida pela formalina (2,5 %), causada pelos tratamentos com LASER de baixa potência (6 s), ou com agulhas de

acupuntura bilateralmente (15 min), no acuponto E36, bem como o grupo que recebeu os dois tratamentos. As reduções das inibições foram de: (34±4)% com o estímulo fotônico (LASER), (49±3)% com o estímulo mecânico (agulhas) e (45±3)% com ambos os estímulos (agulhas + LASER), na fase inflamatória da formalina (II A).

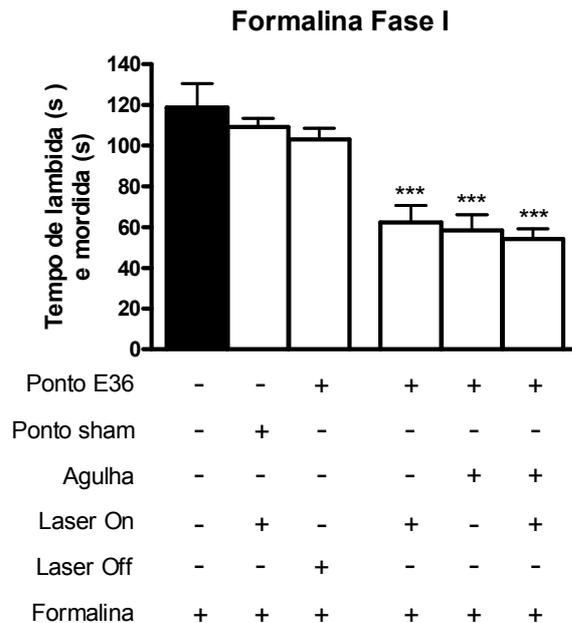


Figura 16: Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no acuponto E36 (Zusanli). Um grupo de animais tratados com LASER de baixa potência (6 s), outro grupo de animais tratados com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min) no E36, bem como um grupo tratado com ambos os estímulos, na primeira fase (I) da nocicepção induzida por formalina (2,5%) em ratos. As barras representam a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (pelo teste de Newman-Keuls), os sinais de “+” demonstram que foram administrados os respectivos tratamentos nos animais e o sinais de “-” que não foram tratados.

Os resultados apresentados na figura 18 demonstram inibição significativa da fase inflamatória (41-60 min, IIB) da nocicepção induzida pela formalina (2,5 %), causada pelos tratamentos com LASER de baixa potência (6 s), ou com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min), no acuponto E36, bem como o grupo que recebeu os dois tratamentos. As variações das inibições foram de: (83 ± 6)% com o estímulo fotônico (LASER), (73 ± 9)% com o estímulo mecânico (agulhas) e (78 ± 4)% com ambos os estímulos (agulhas + LASER), na fase inflamatória da formalina (II B).

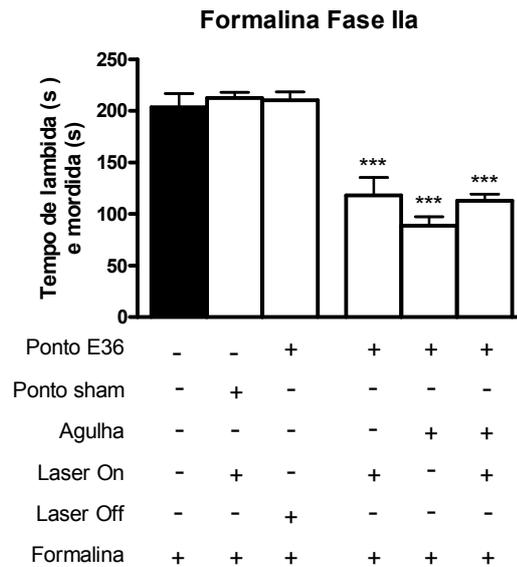


Figura 17: Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no acuponto E36 (Zusanli). Um grupo de animais tratados com LASER de baixa potência (6 s), outro grupo de animais tratados com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min) no E36, bem como um grupo tratado com ambos os estímulos, na segunda fase (IIA) da nocicepção induzida por formalina (2,5%) em ratos. As barras representam a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (pelo teste de Newman-Keuls), os sinais de “+” demonstram que foram administrados os respectivos tratamentos nos animais e o sinais de “-“ que não foram tratados.

4.3 MECANISMOS DE AÇÃO

4.3.1 Sistema Opióide

Inicialmente, os resultados apresentados na figura 19 mostram que os estímulos mecânico, fotônico e a morfina (agonista dos receptores opióides) apresentaram um efeito antinociceptivo significativo evidenciado, principalmente pela ação da morfina através da inibição completa das contorções abdominais quando comparado ao grupo controle. E posteriormente, mostram que o pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores opióides), administrado 20 min antes dos tratamentos com LASER de baixa potência (6 s) no acuponto E36, do tratamento com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min) no acuponto E36 ou da administração de morfina ou veículo, reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina (5 mg/kg, s.c.), bem como o efeito antinociceptivo causado

pelos tratamentos com LASER (estímulo fotônico) e com agulhas (estímulo mecânico), ambos aplicados no acuponto E36, no modelo de contorções induzidas pelo ácido acético (i.p.).

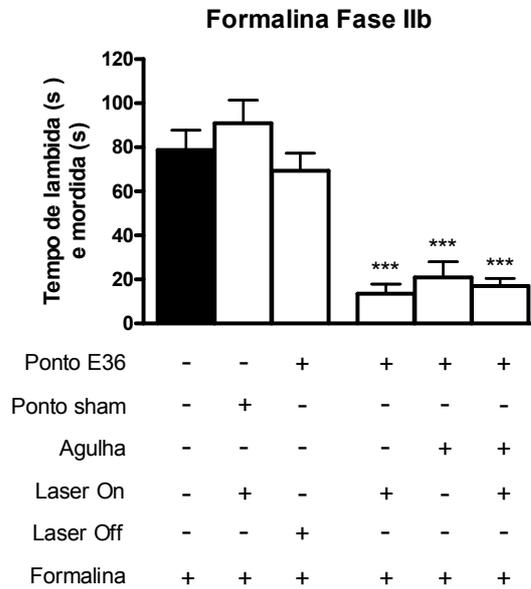


Figura 18: Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no acuponto E36 (Zusanli). Um grupo de animais tratados com LASER de baixa potência (6 s), outro grupo de animais tratados com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min) no E36, bem como um grupo tratado com ambos os estímulos, na segunda fase (IIb) da nocicepção induzida por formalina (2,5%) em ratos. As barras representam a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (pelo teste de Newman-Keuls), os sinais de “+” demonstram que foram administrados os respectivos tratamentos nos animais e o sinais de “-” que não foram tratados.

4.3.2 Sistema Serotonérgico

Na figura 20, os resultados apresentados demonstram que o pré-tratamento com pindolol (1 mg/kg, s.c., antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A/B}), administrado 20 min antes dos tratamentos com LASER de baixa potência (6 s) no acuponto E36, e com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min) no acuponto E36, ou da administração de bupirona, reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela bupirona (1 mg/kg s.c., um agonista parcial do receptor 5HT₁), bem como o efeito antinociceptivo causado pelos tratamentos com LASER (estímulo fotônico) e com agulhas (estímulo mecânico), ambos aplicados no acuponto E36, no modelo de contorções induzidas pelo ácido acético (i.p.).

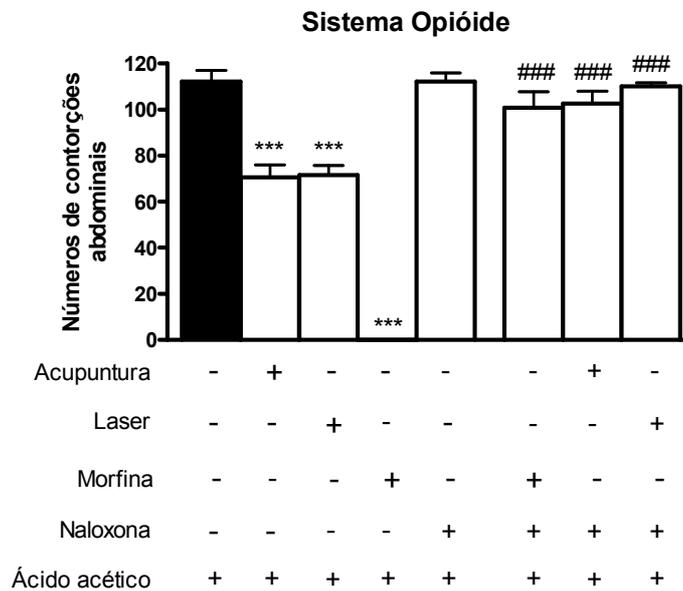


Figura 19: Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) no efeito antinociceptivo do acuponto E36 e morfina (5 mg/kg, s.c.) contra a indução a contorções abdominais por injeção de ácido acético com 15 min de retenção de agulhas e 6 s de LASER. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M, o símbolo ### indica um nível de significância $p < 0.001$ comparando com o grupo agonista (morfina, mecânico e LASER) em relação ao grupo antagonista (naloxona); o símbolo *** um nível de significância $P < 0.001$ dos grupos mecânico (acupuntura), fotônico e morfina comparados com os valores do controle, os sinais de “+” demonstram que foram administrados os respectivos tratamentos nos animais e o sinais de “-” que não foram tratados.

Os resultados ilustrados na figura 21 demonstram que o pré-tratamento com cetanserina (antagonista serotoninérgico 5HT_{2A} 1 mg/kg, i.p.), administrado 20 min antes dos tratamentos com LASER de baixa potência (6 s) no acuponto E36, do tratamento com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min) no acuponto E36, da administração de DOI ou veículo, reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela administração de DOI (agonista serotoninérgico 5HT_{2A}, 0,5 mg/kg i.p.), assim como o efeito antinociceptivo causado pelos tratamentos com LASER (estímulo fotônico) e com agulhas (estímulo mecânico), ambos aplicados no acuponto E36 (Zusanli), no modelo de contorções induzidas pelo ácido acético (i.p.).

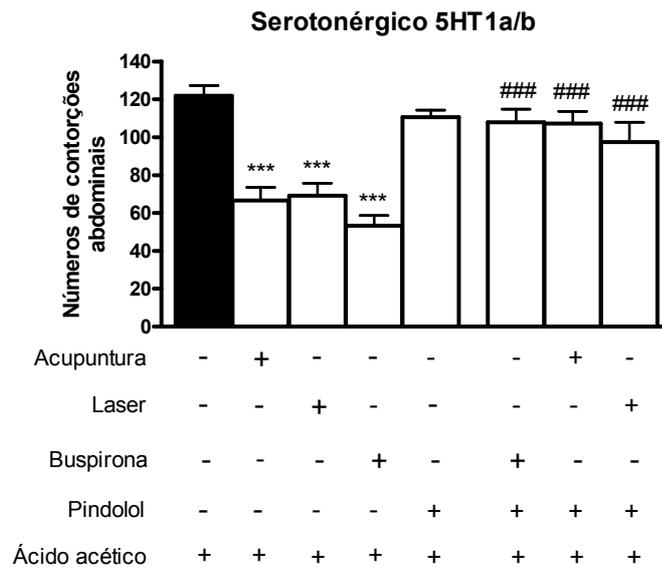


Figura 20: Efeito do pré-tratamento dos animais com pindolol (1 mg/kg, s.c.) no efeito antinociceptivo do ponto E36 e buspirona (1 mg/kg, s.c.) contra a indução a contorções abdominais por injeção de ácido acético, com 15 min de retenção de agulhas e 6 s de LASER. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M, o símbolo ### indica um nível de significância $P < 0.001$ comparando o grupo agonista (buspirona) em relação ao antagonista (pindolol); o símbolo *** significa um nível de significância $P < 0.001$ dos grupos mecânico (acupuntura), fotônico e buspirona comparados com os valores do grupo controle pelo teste de Newman-Keuls, os sinais de “+” demonstram que foram administrados os respectivos tratamentos nos animais e o sinais de “-” que não foram tratados.

Os resultados apresentados na figura 22 mostram que o pré-tratamento com ondasetrona (antagonista serotonérgico 5HT₃, 0,5 mg/kg i.p.) antes do tratamento com LASER de baixa potência (6 s) no acuponto E36, do tratamento com agulhas de acupuntura bilateralmente (15 min) no acuponto E36, e da administração de agmatina (1 mg/kg i.p.), reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pelo tratamento com agulhas (estímulo mecânico) no acuponto E36 (Zusanli), no modelo de contorções induzidas pelo ácido acético (i.p.). Contudo, o mesmo não ocorreu com o tratamento com LASER (estímulo fotônico) no acuponto E36, onde a ondasetrona não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo causado por esse estímulo, no mesmo modelo experimental.

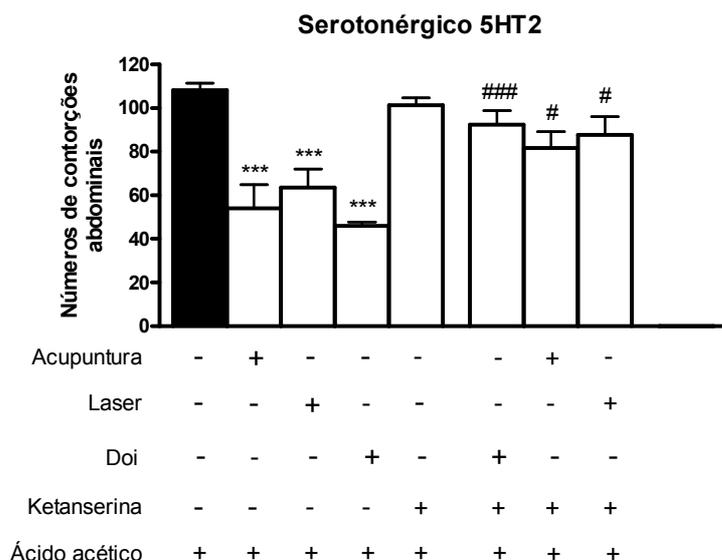


Figura 21: Efeito do pré-tratamento dos animais com cetanserina (1 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva promovidas pelos estímulos mecânico e fotônico no acuponto E36 (Zusanli), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em ratos. As barras representam a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos # e ### indicam o nível de significância $p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente, comparando o antagonista em relação aos agonistas (DOI, acupuntura e LASER) e o símbolo *** indica o nível de significância $p < 0,001$ quando comparado o grupo Controle pelo teste Student de Newman-Keuls, os sinais de “+” demonstram que foram administrados os respectivos tratamentos nos animais e o sinais de “-” que não foram tratados.

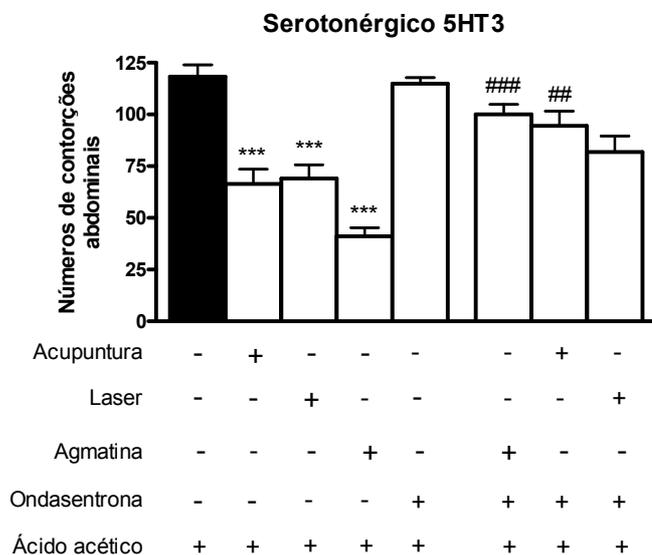


Figura 22: Efeito do pré-tratamento dos animais com ondansetrona (1 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva promovida pelos estímulos mecânico e fotônico no acuponto E36 (Zusanli), no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em ratos. As barras representam a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos ## e ### indicam o nível de significância $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente, comparando o antagonista em relação aos agonistas (acupuntura e agmatina) e o símbolo *** indica o nível de significância $p < 0,001$ quando comparado a grupo Controle com os outros grupos (agmatina, acupuntura e laser) pelo teste Student de Newman-Keuls, os sinais de “+” demonstram que foram administrados os respectivos tratamentos nos animais e o sinais de “-” que não foram tratados.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

As pesquisas com acupuntura apresentam dificuldades metodológicas, poucos estudos mostram a sua eficácia, seus mecanismos de ação e a diferença entre os diversos acupontos, bem como a técnica aplicada. Além disso, dentre os recursos utilizados na acupuntura, pouco se sabe sobre o efeito do LASER de baixa potência em acupontos. A publicação de estudos utilizando o LASER não tem demonstrado eficácia, devido à falta de desenvolvimento de uma metodologia científica na área e um conflito no relato de seus parâmetros como: comprimento de onda, irradiação, tempo, propriedades e espessuras da pele. Existe controvérsia entre os autores e um número reduzido de artigos relacionados à fotoestimulação na acupuntura quando comparado à eletroacupuntura. Como exemplo, Ludeberg e Zhou, concluíram em seus experimentos com LASER *Helium-neon* (632,8 nm) que os resultados para o alívio da dor constituem apenas de efeitos placebos (WHITTAKER, 2004). Entretanto, Okada e Kawakita, 2007, nos seus experimentos com animais, utilizando diferentes técnicas de acupuntura tiveram como resultado a ativação do núcleo centro mediano do tálamo participando do fenômeno da analgesia por acupuntura, concluíram que seu efeito não foi placebo. O presente estudo mostrou resultados antinociceptivos significativos nos modelos de nocicepção do ácido acético e formalina utilizando o LASER AsGaAl, em um comprimento de onda de 830 nm, potência de 30 mW, no tempo de 6 s, da mesma intensidade e proporção que o estímulo utilizando agulhas. Assim como Ghottschling et al., 2007, nos seus resultados em crianças com cefaléias crônicas, mostrou uma diminuição significativa nas dores quando comparado ao placebo, mostrando a eficácia do LASER com uma potência de 30 mW e o comprimento 830 nm.

O primeiro passo desse estudo foi realizar um estudo piloto e verificar se a estimulação do acuponto “Zusanli” (E36) realmente possui propriedade antinociceptiva. Essa verificação foi realizada utilizando-se o teste das contorções

abdominais induzidas pelo ácido acético, que é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral, sendo amplamente utilizado como ferramenta para detecção e avaliação de agentes com propriedades analgésicas e antiinflamatórias (COLLIER et al., 1968; DUARTE et al., 1988; REICHERT et al., 2001). Este modelo apresenta uma boa sensibilidade, embora pouca especificidade, uma vez que a nocicepção induzida pelo ácido acético pode ser prevenida por agentes antiinflamatórios, analgésicos, relaxantes musculares e sedativos (REICHERT et al., 2001; FENG et al., 2003). Já foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de ácido acético induz a liberação de diversos mediadores inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas e citocinas inflamatórias quando injetado intraperitonealmente (RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001).

Normalmente, os trabalhos publicados com acupuntura manual utilizam apenas um período de estimulação pré-estabelecido (RONG et al., 2005; GUIMARÃES et al., 1997; KIM et al., 2006; HAN, 2006; SCOGNAMILLO-SZABÓ, 2001), ou não se referem à duração do período estimulado (SAIDA et al., 2003).

Nos resultados do experimento piloto foi possível observar e conseqüentemente descartar que a antinocicepção causada pela estimulação do acuponto fosse decorrente de estresse de contenção nos animais verificando um melhor período de aplicação. O experimento piloto mostrou claramente que antinocicepção causada pela estimulação do acuponto E36 (Zusanli) foi de rápida instalação e perdurou por até 1h 30 min após a retirada da agulha, que foi mantida por 15 min, no acuponto. Na literatura, encontram-se trabalhos em que o efeito da acupuntura é avaliado durante o estímulo (ROSTED et al., 2006; POHODENKO-CHUDAKOVA, 2005; MORIOKA, 2002) ou foram avaliados após um tempo determinado do estímulo, sem uma avaliação em relação ao tempo. Essa etapa foi muito importante para se escolher o tempo de maior inibição assim como de retenção. Neste estudo, foram utilizados ratos machos, devido à variação do ciclo hormonal das fêmeas interferindo na nocicepção.

Nos resultados deste trabalho, a estimulação deste acuponto foi capaz de reduzir de forma significativa as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo que este efeito é evocado a partir de 15 min de estímulo da agulha e 6 s de estimulação do LASER. Morioka (2002) não encontrou indícios de analgesia com o

uso concomitante dos pontos B60 (Kunlun), E36 (Zusanli) e VB34 (Yanglingquiao) em humanos com a técnica da eletroacupuntura que, segundo ele, intensificaria o efeito da acupuntura. Já Li et al. (2005) utilizou eletroacupuntura nos pontos B60 (Kunlun) e E36 (Zusanli) em camundongos obteve efeito antinociceptivo. No presente estudo utilizou-se somente o ponto E36 (Zusanli), com a inserção da agulha e a aplicação da radiação LASER, observou-se que a estimulação mecânica causou 42% e a fotoestimulação causou 36% de variação da inibição da nocicepção induzida pelo ácido acético em ratos. Deve-se levar em consideração que se tratam de formas distintas de técnicas de acupuntura, seleção de pontos e avaliação entre estes estudos, explicando em parte os diferentes resultados encontrados.

Neste estudo, avaliou-se também se a fotoestimulação em uma região qualquer do corpo do animal que não acuponto (ponto *sham*) produzia ou não o efeito antinociceptivo demonstrado através da estimulação do acuponto E36 (Zusanli). Observou-se que a estimulação do ponto *sham* não causou nenhuma alteração da resposta sensorial nos animais nem mesmo com a administração do ácido acético quando comparada ao grupo controle. Da mesma maneira, apenas com o estímulo causado pelo toque da caneta LASER com o equipamento desligado no acuponto, não ocorreu resposta antinociceptiva. Esses dados estão de acordo com experimentos em roedores e humanos, onde a estimulação de acupontos não produz o mesmo efeito que a estimulação em pontos *sham* (LI et al., 2005; TABOSA et al., 2002; WANG e KAIN, 2002; TAM et al., 2007). Em humanos, um estudo comparando a acupuntura com a inserção de agulhas em pontos *sham* usando tomografia por emissão de pósitrons mostrou a ativação do córtex pré-frontal dorsolateral, córtex cingulado anterior e mesencéfalo, tanto na estimulação de acupontos quanto de pontos *sham*. Além dessas áreas, também foi ativada a insula, que se afirma estar ligada à modulação da dor (QIU, 2005).

Os estímulos mecânico e fotônico produziram um resultado satisfatório na inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético, foi então, realizado um teste onde pudesse ser discriminado se a estimulação do E36 através do LASER ou agulha gerasse uma ação antinociceptiva na dor de origem predominantemente neurogênica ou inflamatória. Assim, utilizou-se o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, que é dividida em duas fases principais, a primeira,

chamada de fase neurogênica (de 0 a 9 min) e a segunda chamada de fase inflamatória (10 a 40 min fase IIA e 41-60 min fase IIB), conforme descrito anteriormente. A estimulação do acuponto E36 (Zusanli) inibiu significativamente ambas as fases. A fase neurogênica decorre da ativação direta dos terminais nervosos nociceptivos, já a fase inflamatória é mediada por uma combinação de mecanismos periféricos e de sensibilização central na medula espinhal (HUNSKAAR & HOLE, 1997; TJOLSEN et al., 1997). Neste sentido, os dados do presente estudo mostram claramente que a estimulação deste acuponto inibiu significativamente ambas as fases.

Alguns trabalhos realizados com eletroacupuntura ou injeção de veneno de abelha no acuponto “Zusanli” (E36) já têm descrito o efeito antinociceptivo deste acuponto em modelos de nocicepção como o teste de formalina, realizados em ratos e camundongos, inclusive demonstrou-se a participação de fibras aferentes primárias e vários mecanismos de ação (CHANG et al., 2004; ROH et al., 2006; KIM et al., 2005).

Procurando identificar por quais mecanismos esse acuponto tem sua ação e se ambos os estímulos mecânico e fotônico possuem a mesma resposta, foram testados os sistemas opióide e serotoninérgico, utilizando-se antagonistas dos receptores desses sistemas como pré-tratamento para verificar se algum deles modificaria os resultados encontrados no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Um dos mecanismos pelos quais a estimulação desse acuponto parece estar envolvida é com o sistema opióide. Peptídeos opióides endógenos são considerados um dos principais candidatos para a ação da acupuntura porque muitas pesquisas mostraram que a eletroacupuntura é revertida pelo antagonista do receptor opióide, a naloxona (KAWAKITA et al., 2006; CHO et al., 2006; HAN et al., 2006; HAHM, 2007). Um aumento de peptídeos opióides no plasma ou no líquido cerebrospinal foi observado após a eletroacupuntura em animais e humanos (KAWAKITA et al., 2006).

Neste estudo, a naloxona (antagonista opióide) reverteu a antinocicepção causada tanto pelo estímulo mecânico como pela fotoestimulação quanto pela morfina. Esses resultados mostram que a estimulação do E36 (Zusanli) induz à

liberação de opióides endógenos, os quais podem atuar tanto em uma resposta periférica quanto central. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

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

No presente estudo, verificou-se que o sistema serotonérgico também está envolvido na ação antinociceptiva da estimulação mecânica e fotônica do acuponto E36 (Zusanli), conforme Salazar e Reyes (2004) evidenciaram em sua publicação, que a liberação de serotonina pelo núcleo posterior da rafe produz um efeito analgésico. A depleção dos níveis neuronais de serotonina através da administração de drogas antagonistas, revertem totalmente o efeito do estímulo mecânico e parcialmente o efeito da fotoestimulação. Avaliou-se também a participação dos diversos receptores serotonérgicos e conseguiu-se evidenciar a participação dos receptores 5HT_{1A}, 5HT_{2A} e 5HT₃, pois a administração de pindolol (antagonista do receptor 5HT_{1A}), cetanserina (antagonista do receptor 5HT_{2A}) e ondasetrona (antagonista do receptor 5HT₃) reverteu a ação da agulha no acuponto “Zusanli” (E36), exceto, conforme os resultados obtidos, o estímulo fotônico, o qual não teve significância na ação da ondasetrona no modelo de nocicepção do ácido acético. Segundo Tong et al. (2000), em seus experimentos em relação aos efeitos biológicos utilizando o LASER de baixa potência, ocorre um aumento na liberação de cálcio nos comprimentos de onda de 532, 632,8 e 650 nm, ao contrário de quando aplicados os comprimentos de 810 e 1300 nm, os quais não produziram nenhum efeito na liberação do cálcio. Os receptores serotonérgicos 5HT_{1A}, 5HT_{2A} são classificados como metabotrópicos, os quais necessitam de uma proteína G para acionar um segundo mensageiro e, posteriormente, liberar o cálcio intracelular, enquanto o receptor 5HT₃ é classificado como ionotrópico, os quais necessitam

diretamente de cálcio para ocorrer um potencial de ação, esta diferença nos tipos de receptores possa justificar a não reversão do LASER no resultado da figura 22.

Em síntese, o presente estudo demonstrou que as estimulações mecânica e fotônica no acuponto E36 (Zusanli) apresentam atividades antinociceptiva em modelos de nocicepção induzidas por ácido acético e formalina e que esta ação parece estar envolvida com os sistemas opióide e serotoninérgico. Também mostrou que a utilização das duas técnicas em conjunto não potencializam o efeito, quando realizadas sequencialmente estímulo mecânico (15 min, inicialmente) e, posteriormente, 6 s de estímulo fotônico. Além disso, os dados apresentados neste estudo indicam que o acuponto E36 (Zusanli) tem ação antinociceptiva em modelos de nocicepção aguda.

5.1 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

A interpretação da sensação dolorosa envolve aspectos físico-químicos, componentes sócio-culturais dos indivíduos e particularidades do ambiente, evoca emoções, incapacidades que traduzem sofrimentos, assim como, limita as execuções das atividades da vida diária, profissional, social e familiar. Apesar das diversas terapias antiálgicas, como a associação de novos fármacos, meios físicos e equipamentos, muitas vezes estes procedimentos são agressivos, custos elevados e produzem efeitos colaterais que podem causar complicações. O tratamento com acupuntura e laserpuntura seria um excelente recurso, apesar de promoverem o alívio da dor, necessitam de mais estudos, já que os resultados dependem de inúmeras variáveis, principalmente a técnica com LASER, que possui um número limitado de estudos realizados e falta divulgação de suas experiências clínicas.

Sugere-se a extensão de estudos em: (1) utilização de outros acupontos descritos na literatura como analgésicos, por exemplo: “Hegu” (IG4), que é utilizado na clínica como um importante acuponto para dores agudas; (2) aplicação de outros comprimentos de onda e potências do LASER AsGaAl, para verificar a eficácia de novos parâmetros nos modelos antinociceptivos; (3) comparação do LASER HeNe com o LASER AsGa, pois há uma enorme carência científica de estudos relacionados aos LASERS de baixa potência na área de acupuntura, existindo a

necessidade de aplicabilidade de mais de um tipo de equipamento, no modo contínuo e pulsado; (4) modelos experimentais térmicos de nocicepção em ratos, objetivando avaliar outros resultados nociceptivos das técnicas mecânica e fotônica; (5) avaliação de outros mecanismos de ação como o sistema alfa-adrenérgico e o dopaminérgico, pois existe a possibilidade da acupuntura e da radiação LASER de baixa potência também influenciar nesses mecanismos; (6) utilização da fotoestimulação em humanos no acuponto “Zusanli” (E36), com diferentes comprimentos de onda, potências, densidades energéticas, assim como diferentes frequências, devido ao tecido humano possuir características diferentes do tecido dos ratos; (7) realização de novos estudos no acuponto “Zusanli” (E36) visando avaliar sua ação em dores crônicas, pois há necessidade de demonstrar se este acuponto também possui o mesmo efeito antinociceptivo nesse tipo de dor, proporcionando assim, tratamento em outras doenças; (8) o uso do LASER comparado com a eletroacupuntura, para verificar se ocorre um aumento ou diferenciação da sua ação no acuponto “Zusanli” (E36), já que há indícios que mostram significância da analgesia produzida pela eletroacupuntura neste acuponto, tornando-se por este motivo, importante a investigação comparativa das duas técnicas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Um dos maiores temores que aflige a humanidade é a dor. Por este motivo, a ciência busca através de pesquisas no mundo uma solução para este problema. Atualmente, a acupuntura tem sido um método eficaz na modulação da dor, tanto de origem aguda como crônica.

Neste trabalho, avaliou-se o possível efeito antinociceptivo na aplicabilidade dos estímulos: mecânico, caracterizado pela utilização de agulhas, e fotônico, por meio da radiação LASER; ambos empregados como técnicas de acupuntura, no acuponto Zusanli (E36). Após a avaliação dos resultados, verificou-se por qual mecanismo de ação a acupuntura participa. Para atingir tais objetivos, elaborou-se uma pesquisa experimental utilizando modelos de nocicepção (ácido acético e formalina) e de mecanismos de ação (opiodérgico e serotoninérgico), com ratos machos da linhagem Wistar.

As principais conclusões oriundas desta pesquisa contribuem para um maior conhecimento do tema abordado, revisão de conceitos básicos, sugestões de novos trabalhos científicos e conhecimentos do mecanismo fisiológico pelo qual agem os estímulos mecânico e fotônico. Dentre as conclusões, destacam-se:

- (1) o estímulo mecânico padronizado pela agulha possui ação antinociceptiva nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético e pela formalina;
- (2) a tecnologia LASER de baixa potência possui uma ação antinociceptiva nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético e formalina;
- (3) a aplicação conjunta, primeiramente, a estimulação mecânica e, secundariamente, o LASER, não potencializa resposta na inibição dos modelos ácido acético e formalina;
- (4) comparando as duas técnicas, ambas são analgesicamente eficazes e equivalentes; porém, o período de aplicação da técnica LASER, 6 s, é bem menor quando comparado aos 15 min da estimulação mecânica por meio da agulha;

(5) o acuponto Zusanli (E36) apresenta ação antinociceptiva nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético e pela formalina. A estimulação de um ponto *sham* não é capaz de inibir significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético ou o tempo de lambidas e mordidas da pata no modelo da formalina, assim como o estímulo do toque da caneta no acuponto Zusanli (E36) com o aparelho LASER desligado;

(6) os sistemas opioidérgico e serotoninérgico estão envolvidos na ação da acupuntura no acuponto Zusanli (E36). O estímulo mecânico teve uma resposta positiva nos dois sistemas (opiódérgico e serotoninérgico) e em todos os receptores serotoninérgicos; em contrapartida, o estímulo fotônico apresentou uma resposta negativa no receptor 5HT₃.

A tecnologia LASER de baixa potência é utilizada em diversas aplicações da área da saúde, contudo, quando associada à acupuntura seus efeitos fisiológicos não estão bem determinados. Essa situação acontece principalmente pela dificuldade de reprodução metodológica dos experimentos. Assim, pesquisas futuras devem ser realizadas para definir parâmetros dosimétricos da radiação LASER e sua possível aplicabilidade para tratamentos em humanos.

Por fim, pode-se inferir que a maior contribuição científica do estudo realizado recai sobre a comprovação dos efeitos analgésicos proporcionados pela radiação LASER de baixa potência na técnica da acupuntura, demonstrando, desse modo, uma efetiva resposta fisiológica (desmistificando a idéia de um possível efeito placebo), e vislumbrando, assim, um futuro promissor para a integração das modernidades tecnológicas com a milenar e tradicional prática da acupuntura.

REFERÊNCIAS

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

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

ASTIN, J.A.; MARIE, A.; PELLETIER, K.R.; HANSEN, E.; HASKELL, W. A review of the incorporation of complementary and alternative medicine by mainstream physicians. **Arch Intern Med.**; 158:2303-10, 1998.

BAEK, Y.H.; CHOI, D.Y.; YANG, H.I.; PARK, D.S. Analgesic effect of electroacupuncture of inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: mediation by cholinergic and serotonergic receptors. **Brain research**, 1057: 181-185, 2005.

BARDIN, L.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, 86: 11-18, 2000.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.**, 7:309-338, 1981.

BAXTER, D.G. Therapeutic lasers. Theory and practice. **Churchill Livingstone**. 1ed., 1994.

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

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

BONTA, I.L. Acupuncture beyond the endorphin concept? **Medical Hypotheses**, 58(3), 221-224, 2002.

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

CABRERA, E.B.A.; PERÓN, J.M.R.; ALFONSO, L.E. Laseracupuntura con Helio-Neón en el tratamiento de pacientes traumatizados. **Rev. Cubana Med. Milit.**, 31(1):5-12, 2002.

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

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

CHANG, F.C.; TSAI, H.Y.; YU, M.C.; YI, P.L.; LIN, J.G. The central serotonergic system mediates the analgesic effect of electroacupuncture on Zusanli (ST36) acupoints. **J Biomed Sci.**, 11(2): 179-85, 2004.

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

CHO, Z.H., HAWANG, S.C.; WONG, E.K.; SON, Y.O.; KANG, C.K.; PARK, T.S.; BAI, S.J.; KIM, Y.B.; LEE, Y.B.; SUNG, K.K.; LEE, B.H.; SHERPP, L.A.; MIN, K.T. Neural substrates, experimental evidences and functional hypothesis of acupuncture mechanisms. **Acta Neurol Scand**, 113: 370-377, 2006.

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

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

COLLS, J. **La terapia Láser, hoy**. Barcelona: Mallorca 206, 1984.

CORRALES, M.O.R.; ALVARO, A.O.; RAHOLA, J.G.; VINARDELL, A.R.; MICÓ, J.A. Pindolol, a beta-adrenoceptor blocker/5-hydroxytryptamine 1A/1B antagonist, enhances the analgesic effect of tramadol. **Pain**, 88 119-124, 2000.

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

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

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

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

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

DRAEHMPAEHL, D; ZOHMANN, A. Acupuntura no cão e no gato: princípios básicos e prática científica. **Editora Roca**, São Paulo, 1º ed., 1997.

DRAY, A.; Peripheral mediators of pain. **The Pharmacology of pain.**, 130:21-41, 1997.

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

DUMISTRESCU, I.F. Acupuntura científica moderna. **Editora Andrei**, 1996.

EBNESHAHIDI, N.; HESHMATIPOUR, M.; MOGHADDAMI, A.; ARAGHI, P. The effects of laser acupuncture on chronic tension headache – a randomised controlled trial. **Acupuncture in medicine**; 23:13-18, 2005.

ERNEST, E.; WHILTE, A. Life-threatening adverse reactions after acupuncture. A systematic review. **Pain**; 71:123-6, 1997.

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

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

FILSHIE, J.; WHITE, A. Medical acupuncture, a western scientific approach. **Singapore, Churchill Livingstone**, 3:3-9, 1998.

FISHER, P.; WARD, A. Complementary medicine in Europa. **B.M.J.** 309:107-10, 1994.

FUKUDA, T.Y.; MALFATTI, C.A. Análise da dose de laser de baixa potência em equipamentos nacionais. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, 12: 1-7, 2008.

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

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

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

GHIA, J.E.; CRENNER, F.; BOUTIGUE, M.H.M.; AVINS, D.; ANGEL, F. The effect of chromogranin A-derived peptide (CgA4-16) in the writhing nociceptive response induced by acetic acid in rats. **Life Sciences**, 75: 1787-1799, 2004.

GHOTTSCHLING, S.; MEYER, S.; GRIBOVA, I.; DISTLER, L.; BERRANG, J.; GORTNER, L.; GRAG, N.; SHAMDEEN, M.G. Laser acupuncture in children with headache: a double-blind, randomized, bicenter, placebo-controlled trial. **Pain**, 10:1-8, 2007.

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

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

GURPREET, K.D.; STEPHEN, S.G.F. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. **Pharmacol Therap.**, 111: 260-271, 2006.

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

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

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

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

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30:103,1997.

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

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

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

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

KAWAKITA K, SHINBARA H, FUKUDA F, YANO T, KURIYAMA K. How do acupuncture act? – Focusing on the progress in Japanese acupuncture research – **Journal of Pharmacological Sciences** 100: 443-459, 2006.

KARU, T. **The Science of low power laser therapy**. Amesterdam: Gorden & Breach, 1998.

KIM, K.S.; LEE, K.W.; IM, J.Y.; YOO, J.Y.; KIM, S.W.; LEE, J.K.; NESTLER, E.J.; HAN, P.L. Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 103: 3908-3913, 2006.

KIM, H.W.; KWON, Y.B.; HAN, H.J.; YANG, I.S.; BEITZ, A.J.; LEE, J.H. Antinociceptive mechanisms associated with diluted bee venom acupuncture (apipuncture) in the rat formalin test: involvement of descending adrenergic and serotonergic pathways. **Pharmacol Res.**, 51(2): 183-8, 2005.

KNIGHT, B.; MUDGE, C.; OPENSHAW, S.; HART, A. Effect of acupuncture on nausea of pregnancy: a randomized, contolled trial. **Obstetrics e Gynecology**; 97:184-9, 2001.

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

KVORNING, N.; HOLMERM, C.; GRENNET, L.; ABERG, A.; KENSON, J. Acupuncture relieves pelvic and low back pain in late pregnancy. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**;83:246-50, 2004.

LANGEVIN, H.M.; SHERMAN, K.J. Pathophysiological model for chronic low back pain integrating connective tissue and nervous system mechanisms. **Medical Hypotheses**, 68: 74-80, 2007.

LEMBERG, K.; KONTINEN, V.K.; VILJAKKA, K.; KYLANLAHTI, I.; KAUALUOMA, J.Y.; KALSO, E. Morphine, oxycodone, methadone and its enantiomers in different models of nociception in the rat. **Anesth Analg**, 102: 1768-1774, 2006.

LI A.H., ZHANG J.M., XIE, Y. K. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin–nerve complexes with enriched nerve endings. **Brain Res.**, 1012, 154–159, 2005.

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

MA, S. X. Neurobiology of Acupuncture: Toward CAM. **ECAM** ; 1(1):41-7, 2004.

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

MACIOCIA G. Os Fundamentos da Medicina Chinesa. **Editora Roca**, 1996.

MACLENNAM, H.; WILSON, H.; TAYLO, W. Prevalence and cost of alternative medicine in Australia. **Lancet.**; 347:569-73, 1996.

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

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

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

MEDEIROS, M.A.; CANTERAS, N.S.; SUCHECKI, D.; MELLO, L. C-Fos expression induced by electroacupuncture at Zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 36: 1673-1684, 2003.

MELZACK, R. The McGill pain questionnaire: major properties and scoring methods. **Pain**; 1:1-277, 1975.

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

MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Laser surg. Med.**, 5: 31-39, 1985.

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

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

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, 66:355-474, 2002.

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

NAGRA, R.M., BECHER, B.; TOURTELLOTTE, W.W.; ANTEL, J.P.; GOLD, D.; PALADINO, T.; SMITH, R.A.; NELSON, J.R.; REYNOLDS, W.F.

Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.**, 78: 97-107, 1997.

NATURE REVIEWS NEUROSCIENSE. **Pain mechanisms.** Disponível em www.nature.com/nrn/posters/index.html.2007. Acesso em out. 2008.

NOVOSELOVA, E.; GLUSHKOVA, O.; CHERENKOV, D.; CHUDNOVSKI, V.; FESENKO, E. Effects of lower power laser radiation on mice immunity. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.** 22:33-38; 2006.

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

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

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol.**, 54: 581-618,1998.

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

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

PÉREZ, G.; DÍAZ, I.G.; FALCON, N.D.; FERNÁNDEZ, O.L. Analgesia acupuntural y bloqueos terapéuticos en pacientes con lumbociatalgia. Labor de enfermería. **Rev. Cubana Enfermer.**;16(2):111-16, 2000.

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

PIMENTA, L.H.M. **Laser em medicina e biologia**. V-1- Generalidades. São Paulo: Roca, 1990.

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

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

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

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

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

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

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

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.V.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S. FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells

in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 387: 111-118, 2000.

ROH, D.H.; KIM, H.W.; YOON, S.Y.; KANG, S.Y.; KWON, Y.B.; CHO, K.H.; HAN, H.J.; RYU, Y.H.; CHOI, S.M.; LEE, H.J.; BEITZ, A.J.; LEE, J.H. Bee venom injection significantly reduces nociceptive behavior in the mouse formalin test via capsaicin-insensitive afferents. *J Pain*, 7(7): 500-12, 2006.

ROMERA, E. ; PERENA, M.J. ; PERENA, M.F. ; RODRIGO, M.D. Neurofisiologia del dolor. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 7 :11-17, 2000.

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

RUSSO, C.M., BRODE, W.G. Chronic pain. *Ann. Rev. Med.* 49:123-133, 1998.

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

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

SALAZAR, J.; REYES, R. Analgesia por acupuntura. *Rev. Cubana Méd milit.*; 33(1):1-6, 2004.

SANTOS, A.R.S.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive

properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-Npropyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 289:417-426, 1999.

SANTOS, A.R.S.; GODOTTI, V.M.; OLIVEIRA, G.; TIBOLA, D.; PASZUK, A.N.; NETO, A.; SPINDOLA, H.M.; SOUZA, M.M.; RODRIGUES, A.P.; CALISTO, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuro Pharmacology**, 48: 1021-1034, 2005.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R.; BECHARA, G.H. Acupuncture: Scientific basis and applications. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.31, n.6, 1091-1099, 2001.

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

SMITH, J., TANG, W., RUSSEL, J. Laser acupuncture for mild to moderate depression in a primary care setting - a randomised controlled trial. **Acupuncture in Medicine**; 23(3):103-111, 2005.

SUÁREZ, B.G.; VALDES, F.; RABI, M.; ARTEGAS, H., SUAREZ, L. Laser y dolor neuropático. **Rev. Cubana de anestesiología y reanimación**; 2(3):37-41, 2003.

STUX, G., HAMMERSCHLAG R. **Acupuntura clínica**. Editora Manole, 2005.

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

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

7:35, 2007.

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

TONG, M.; LIU, Y. Effects of different wave lengths of low level laser irradiation on murine immunological activity and intracellular Ca²⁺ in human lymphocytes and cultures cortical neurogliaocytes. **Lasers Med Sci.**, v 15:3, p. 201-206, 2000.

TORTORA, G.J. Corpo Humano, Fundamentos de Anatomia e Fisiologia. **Editora Artmed**, 4º ed.,260-262, 2003.

TUNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy**. Clinical practice and scientific background. Sweden: Prima books; 1999.

TUNER, J.; HODE, L. **The laser therapy handbook**. Tallinn: Prima Book, 2004.

ULETT, G.A.; HAN, S.; HAN, J. Electracupuncture: Mechanisms and Clinical Application. **Society of Biological Psychiatry**, 44:129-138, 1998.

VALCHINOV, E.S.; PALLAKARAKIS, N.E. Desing and testing of low intensity laser bioestimulator. **Biomedical Engheerning online**; 4(5):1-10, 2005.

VALLE, J.; JIN, H.P. Mecanismos analgésicos da acupuntura. **Soc. Médica de Acupuntura de São Paulo**, 1-8, 2003.

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

VAZ, Z.R., CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-Bromobenzoyl)-3-Methyl-4,6-Dimethoxy Benzofuran, a novel

Xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **278**: 304-312, 1996.

VICENT, C.; FURNHAM, A. Why do patients turn to complementary medicine? An empirical study. **Brit.J. of Clinical Psychology**.; 35:37-48, 1996.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHSTON, P.R. Antagonism of pain and hyperalgesia. Anti-inflammatory drugs in: VANE, J.R.; FERREIRA, S.H., editors. **Handbook of experimental pharmacology**, 50/11: 208-222, 1979.

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

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

WHITTAKER, P. Laser acupuncture: past, present, and future. **Laser in medical Science**, 1-16, 2004.

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

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

YAMAMURA, Y. Acupuntura tradicional- a arte de inserir. São Paulo, **Editores Roca LTDA**, 1995.

YIN, C.S.; JEONG, H.; PARK, H.; BAIK, Y.; YOON, M.; CHOI, C.; KOH, H.G. A proposed transpositional acupoint system in mouse and rat model. **Research in**

veterinary Science, 84; 159-165, 2008.

YOKOGAWA, F.; KIUCHI, Y.; ISHIKAWA, Y.; OTSUKA, N.; MASUDA, Y.; OGUCHI, Y.; HOSOYAMADA, A. An investigation of monoamine receptors involved in antinociceptive effects of antidepressants. **Anesth Analg**, 95:163-8, 2002.

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

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

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16: 109–110, 2001.

ANEXO 1



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer nº: 250/08 CEUA PUCPR

Registro do projeto no CEUA: 198 2ª versão

Data do parecer: 24/04/2008

Título do Projeto:

Estudo experimental sobre a influência da Mecano e da Foto Estimulação empregadas em acupuntura no efeito antinoceptivo.

Pesquisador responsável:

Vanessa Erthal

Equipe da pesquisa:

Percy Nohama

Instituição:

PUCPR

Categoria do Experimento - Categoria B

| Espécie de Animal | Sexo | Idade ou peso | Quantidade |
|--------------------------------------|-------|--------------------------------------|------------|
| Rattus norvegicus, Rodentia mammalia | Macho | Entre seis e sete semanas 200 a 230g | 24 |

O colegiado do CEUA em reunião no dia 13/03/2008, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Curitiba, 24 de abril de 2008.

Atenciosamente



Profa. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora do CEUA
PUC PR