UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DAIANA CRISTINA SALM

A ELETROESTIMULAÇÃO PERCUTÂNEA DO RAMO AURICULAR DO NERVO VAGO ATENUA A HIPERALGESIA PELA ATIVAÇÃO DA VIA ANXA1- FPR2/ALX PERIFÉRICA EM UM MODELO DE INFLAMAÇÃO PERSISTENTE EM CAMUNDONGOS

Palhoça
2022

DAIANA CRISTINA SALM

A ELETROESTIMULAÇÃO PERCUTÂNEA DO RAMO AURICULAR DO NERVO VAGO ATENUA A HIPERALGESIA PELA ATIVAÇÃO DA VIA ANXA1- FPR2/ALX PERIFÉRICA EM UM MODELO DE INFLAMAÇÃO PERSISTENTE EM CAMUNDONGOS

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Coorientador: Prof. Ari O. O. Moré, Dr.

Palhoça

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

A eletroestimulação percutânea do ramo auricular do nervo vago atenua a hiperalgesia pela ativação da via AnxA1- FPR2/ALX periférica em um modelo de inflamação persistente em camundongos

DAIANA CRISTINA SALM
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 25 de fevereiro de 2022.

Doutor Daniel Fernandes Martins (Orientador) _____

Doutor Afonso Shiguemi Inoue Salgado (Avaliador externo - Instituto Salgado de Saúde Integral) – *presente por videoconferência*

Doutora Morgana Duarte da Silva (Avaliador externo - UFSC) – *presente por videoconferência*

Doutora Anna Paula Piovezan (Avaliador interno – PPGCS) – *presente por videoconferência*

Doutora Franciane Bobinski (Avaliador interno - PPGCS) – *presente por videoconferência*

Professor Doutor Jefferson Luiz Traebert
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

S16 Salm, Daiana Cristina, 1987-
A eletroestimulação percutânea do ramo auricular do nervo vago atenua a hiperalgesia pela ativação da via ANXA1- FPR2/ALX periférica em um modelo de inflamação persistente em camundongos / Daiana Cristina Salm. – 2022.
105 f. : il. color.; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins
Coorientação: Prof. Dr. Ari O. O. Moré

1. Inflamação - Tratamento. 2. Nervo vago. 3. Estimulação elétrica transcutânea do nervo. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Moré, Ari O. O. III. Universidade do Sul de Santa Catarina. IV. Título.

CDD (21. ed.) 616.0473

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus [por ser minha base, meu tudo!] e a espiritualidade amiga [por me reestabelecer e guiar], por me darem a oportunidade de ter conhecido pessoas tão importantes ao longo desses 10 anos de laboratório.

Agradeço aos queridos animais, por possibilitar e colaborar com o conhecimento. Muito obrigada.

Agradeço a minha família (mãe Bete e irmã Simone, sobrinho e cunhado), ao meu maridinho Rodrigo [por me zelar, resguardar e cuidar] e meu cachorrinho Theozinho [que eu amo mais que tudo] por serem meu porto seguro. Amo vocês do tamanho de todo o universo [e veja que não é pequeno] e devo tudo o que sou a vocês! Obrigada por me reestabelecerem, quando eu mais precisei [nem todos os dias foram de flores, mas quem tem amor, plantar amor e só colhi amor]. Obrigada por tudo e mais um pouco. Agradeço aos meus professores (graduação, pós-graduação), a amada secretária Carol, banca examinadora deste trabalho [que foi escolhida com muito amor], assim como amigos de jornada por terem me guiado e iluminado até aqui.

Agradeço ao meu orientador prof. Daniel pela dedicação e cuidado sempre, assim como o meu coorientador Ari por sua disponibilidade e sempre solícito em ajudar. Além disso, agradecer aos meus colegas e amigos de laboratório, que fizeram com que tudo que venho hoje mostrar nessas folhas pudessem dar certo. Não preciso nem citar nomes, porque eles esboçam o nosso artigo indexado neste trabalho. NUNCA teria conseguido sozinha; visto que pra algo dar MUITO certo é necessário companheirismo e muita união. Que bom que tive vocês.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e agradeço pela oportunidade da bolsa, que nos possibilitou realizar este trabalho, assim como a minha amada UNISUL.

Com amor de todo o mundo, daqui do meu coraçãozinho .... para vocês!

RESUMO

Introdução: A dor inflamatória persistente é um sintoma que acomete diferentes condições patológicas e costumar apresentar perfil refratário a diferentes formas de tratamentos.

Objetivo: Este estudo avaliou os efeitos anti-hiperalgésicos e anti-inflamatórios da eletroestimulação percutânea do nervo vago (EPNV) comparando os efeitos de frequências alternadas e aleatórias em um modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente.

Métodos: O modelo foi induzido por injeção intraplantar (i.pl.) de Adjuvante Completo de Freund (CFA). Os camundongos foram tratados com diferentes protocolos de tempo (10, 20 ou 30min), lateralidade da orelha (direita, esquerda ou ambas) e frequência (alternativa ou randômica). A hiperalgesia mecânica foi avaliada e alguns grupos receberam i.pl. WRW4 (antagonista de FPR2/ALX) para determinar o envolvimento. Edema, temperatura da superfície da pata e atividade locomotora espontânea foram avaliados. Os níveis de interleucina (IL) 1β, IL-6, IL-10 e IL4 foram verificados por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. AnxA1, FPR2/ALX, marcadores de neutrófilos, macrófagos e células apoptóticas foram identificados usando Western blotting.

Resultados: O efeito anti-hiperalgésico da EPNV da frequência alternada e randômica depende do tipo de frequência, tempo e orelha tratada. A frequência randômica na orelha esquerda por 10min teve efeito anti-hiperalgésico mais duradouro, superior a estimulação com frequência alternada e o receptor FPR2/ALX esteve envolvido nesse efeito. Houve redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumento do imunoconteúdo de AnxA1 e CD86 na pata de camundongos.

Conclusão: EPNV com frequência randômica na orelha esquerda por 10min induziu efeito anti-hiperalgésico. Assim, a frequência randômica mostrou-se mais eficaz, do que a frequência alternada. Portanto, a EPNV pode ser um importante tratamento adjuvante para a dor inflamatória persistente.

Descritores: Nervo vago. Eletroestimulação. Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Persistent inflammatory pain is a symptom that affects different pathological conditions and tends to present a refractory profile to different forms of treatment.

Objective: This study evaluated the antihyperalgesic and anti-inflammatory effects of percutaneous vagus nerve electrical stimulation (pVNS) by comparing the effects of alternating and random frequencies in an animal model of persistent inflammatory hyperalgesia.

Methods: The model was induced by Freund's Complete Adjuvant (CFA) intraplantar (i.pl.) injection. Mice were treated with different protocols of time (10, 20 or 30min), ear laterality (right, left or both) and frequency (alternating or random). Mechanical hyperalgesia was evaluated, and some groups received i.pl. WRW4 (FPR2/ALX antagonist) to determine the involvement. Edema, paw surface temperature and spontaneous locomotor activity were evaluated. Interleukin 1β, IL-6, IL-10 and IL4 levels were verified by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. AnxA1, FPR2/ALX, neutrophil, macrophage and apoptotic cells markers were identified using Western blotting.

Results: The anti-hyperalgesic effect pVNS with alternating and random frequency effect is depending on the type of frequency, time and ear treated. The pVNS random frequency in the left ear for 10min had a longer lasting antihyperalgesic effect, superior to classical stimulation using alternating frequency and the FPR2/ALX receptor was involved in this effect. There was a reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines and an increase in the immunocontent of AnxA1 and CD86 in mice paw.

Conclusion: pVNS with random frequency in the left ear for 10min were shown to be optimal for inducing an antihyperalgesic effect. Thus, the random frequency proved to be more effective than the alternating frequency. Therefore, pVNS may be an important adjunctive treatment for persistent inflammatory pain

Keywords: Vagus nerve. Electrostimulation. Inflammation.

LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas

AA Ácido araquidônico (do inglês, *Arachidonic acid*)

ACh Acetilcolina

ADAMTS Desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina (do inglês, *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*)

AnxA1 Anexina A1

ANOVA Análise de variância

Ac2-26 Peptídeo N-terminal ativo de AnxA1

AP-1 Ativador da proteína 1

Arg-1 Arginase 1

C Cervical

CCL2 Ligante 2 da quimiocina

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA Adjuvante Completo de *Freund* (do inglês, *Complete Freund Adjuvant*)

CFMV Conselho Federal de Medicina Veterinária

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX-2 Cicloxigenase-2 (do inglês, *Cyclooxygenase-2*)

CXC8 Ligante 8 da quimiocina

EPNV Eletroestimulação percutânea do nervo vago

ERK quinases reguladas pelo sinal extracelular (do inglês, *Extracellular signal-regulated kinase*)

ERN Espécies reativas de nitrogênio

EROs Espécies reativas de oxigênio

ETNV Estimulação transcutânea do nervo vago

FDA Agência internacional de administração de alimentos e medicamentos (do inglês, *Food and Drug administration*)

Fr Frequência

FcγR Receptores para imunoglobulina G (do inglês, *Receptors for immunoglobulin G*)

FPR Receptores de formil peptídeo ((do inglês, *Formyl peptide receptor*)

FPR1 Receptor formil peptídeo tipo I (do inglês, *Formyl peptide receptor like 1*)

FPR2/ALX	Receptor formil peptídeo tipo II (do inglês, *Formyl Peptide Receptor like 2/Aspirin-Trigged Lipoxin*)
FPR3	Receptor formil peptídeo tipo III (do inglês, *formyl peptide receptor like 3*)
GluN1	Subunidade 1 para os receptores NMDA (do inglês, *N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1*)
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (do inglês, *G protein coupled receptor*)
HMGB1	Proteína box 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1, do inglês *High Mobility Group Box-1*)
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal (do inglês, *Hypothalamus-pituitary-adrenal*)
Ig3	Imunoglobulina 3
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IFN-y	Interferon gama (do inglês, *Interferon gamma*)
iNOS	Óxido nítrico sintetase
LaNEx	Laboratório de Neurociências Experimental
LOX	Lipoxigenase (do inglês, *lipoxygenase*)
LPS	Lipopolissacarídeo (do inglês, *lipopolysaccharide*)
LTA_4	Leucotrieno A_4 (do inglês, *Leukotriene* A_4)
LXA_4	Lipoxina A_4 (do inglês, *Lipoxin* A_4)
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês, *Mitogen-activated protein kinases*)
MIA	Morte indolor assistida
MLA	Metilacocotinina
MPO	Mieloperoxidase
M1	Fenótipo M1 de macrófagos
M2	Fenótipo M2 de macrófagos

N	Número de animais
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NF-kB	Fator nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear factor kappa B*)
NV	Nervo vago
NO	Óxido nítrico (do inglês, *Nitric oxide*)
PGD_2	Prostaglandina D_2
PGE_2	Prostaglandina E_2
PLA_2	Fosfolipase A_2 (do inglês, *Phospholipase A_2*)
PMN	Polimorfonucleares
rpm	Rotações por minuto
SN	Sistema nervoso
TCR	Teceptores de células T
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta (do inglês, *Transforming growth factor beta*)
TLR	Receptor do tipo Toll-like (do inglês, *Toll-like receptor*)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor necrosis factor*)
vF	Von Frey
UA	Unidades arbitrárias
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNISUL	Universidade do Sul de Santa Catarina
5-LO	Lipoxigenase 5
15-LO	Lipoxigenase 5
12 – LO	Lipoxigenase 12
15-HETE	15-ácido-hidroxieicosatetraenoico (do inglês, *15-Hydroxyeicosatetraenoic acid*)
cm	centímetros
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
pg	picogramas
mm	Milímetros
α7nAChR	Receptor nicotínico para acetilcolina subunidade α7 (do inglês, *Alpha nicotinic receptor*)

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sumarização de artigos que utilizaram como um dos tratamentos a eletrostimulação percutânea do ramo auricular do NV..... 43

Lista de quadros

Quadro 1 - Avaliação do melhor tempo de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV na orelha esquerda..... 59
Quadro 2 - Avaliação do melhor tempo de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV na orelha direita..... 59
Quadro 3 -. Avaliação do melhor tempo de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV em ambas as orelhas..... 60
Quadro 4 - Avaliação da tolerância anti-hiperalgésica induzida pelo tratamento com a eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV e atividade locomotora espontânea..... 60
Quadro 5 - Avaliação do efeito do tratamento da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV na temperatura da superfície da pata e edema..... 61
Quadro 6 - Avaliação farmacológica/comportamental do papel do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV..... 62
Quadro 7 - Avaliação dos efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV utilizando a frequência alternada *vs* randômica sobre as concentrações teciduais de citocinas em 6h e 96h após injeção CFA..... 62
Quadro 8 - Avaliação dos efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* randômica sobre o imunoconteúdo expressão (FPR2/ALX; AnxA1; Arg-1; NOS-2; Ly6G; CD206; CD286; Bax) em 6 h e 96 h após injeção CFA..... 63
Quadro 9 - Variavéis do estudo experimental..... 70

Lista de figuras

Figura 1 - Componentes da via inflamatória..... 17
Figura 2 - Resposta natural da inflamação..... 18

Figura 3 - Resolução completa (fisiológico) e Falha (patológico)..... 21
Figura 4 - Polarização de macrófagos e suas regulações..... 23
Figura 5 - Mobilização da AnxA1 e mecanismos distintos de ativações celulares..... 25
Figura 6 - Mecanismo da AnxA1 por meio do FPR2/ALX..... 26
Figura 7 - Via anti-inflamatória colinérgica..... 31
Figura 8 - Reflexo anti-inflamatório colinérgio na osteoartrite de joelho..... 34
Figura 9 - Eixo HPA..... 36
Figura 10 - Via anti-inflamatória simpática esplênica..... 37
Figura 11 - Representação das áreas de inervação do pavilhão auricular..... 42
Figura 12 - Representação das áreas de superfície da orelha de um rato..... 49
Figura 13 - Representação do delineamento do estudo..... 58
Figura 14 - Injeção intraplantar de CFA..... 64
Figura 15 - Ponto de estimulação do nervo vago..... 65
Figura 16 - Avaliação da hiperalgesia mecânica..... 66
Figura 17 - Avaliação da temperatura de superfície da pata..... 66
Figura 18 - Avaliação do edema da pata..... 67
Figura 19 – Avaliação da atividade locomotora espontânea..... 68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO 17
1.1.1 Processo inflamatório 17
1.1.1.1 Fase aguda 19
1.1.1.2 Fase crônica 20
1.1.2 Resolução da inflamação 20
1.1.3 Modelo animal de dor inflamatória 28
1.1.4 Nervo vago 28
1.1.4.1 Aspectos neurofisiológicos do NV 29
1.1.4.2 Via anti-inflamatória colinérgica 32
1.1.4.3 A influência do NV sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal 35
1.1.4.4 A influência do NV sobre a via anti-inflamatória simpática esplênica 37
1.1.4.5 NV e resolução da inflamação 38
1.1.5 Eletroestimulação periférica percutânea 39
1.1.5.1 Eletroestimulação do NV 41
2. OBJETIVOS 52
2.1 OBJETIVO GERAL 52
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 52
3. MÉTODOS 54
3.1 TIPO DE ESTUDO 54
3.2 EQUIPAMENTOS, FÁRMACOS E REAGENTES 54
3.3 ANIMAIS 55
3.3.1 Cálculo da amostra 56
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 57
3.5 TESTES 63
3.5.1 Modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente 63
3.5.2 Protocolo da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV 64
3.6 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS 65
3.6.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica 65
3.6.2 Avaliação da temperatura da superfície da pata 66
3.6.3 Avaliação do edema da pata 67

3.6.4 Avaliação da atividade locomotora espontânea em um modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente 67
3.6.5 Investigação do envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico produzido pela eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV em um modelo animal de hiperalgesia inflamatória 68
3.6.6 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) 68
3.6.7 Análise do imunoconteúdo do receptor FPR2/ALX, AnxA1, macrófago M1 e M2, neutrófilos e células apoptóticas por imunoeletroforese - *Western Blotting* 69
3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO 70
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS 71
3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA 72
4. ARTIGO 74
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 77
REFERÊNCIAS 78
ANEXOS 98
ANEXOS A - Parecer Aprovação da CEUA 99
ANEXOS B – Produção científica publicada durante o período do Doutorado 100

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo frente a insultos[1], que desencadeiam eventos vasculares e celulares. Estes por sua vez, promovem alterações no tecido alvo[2] e quando não há um adequado manejo ocorre o retardo da resolução do processo inflamatório[3]; o que pode colaborar com quadros de dor inflamatória persistente, sendo este um sintoma comum a diferentes condições musculoesqueléticas[4–7]. Neste sentido, torna-se desafiador para os pesquisadores a busca por novas intervenções, que minimizem os efeitos associados a sintomas clínicos limitantes, como a dor[8,9].

Desde a década de 60 com o avanço da área de neurotecnologia na Alemanha tem-se aprofundado o estudo dos efeitos da neuroestimulação, tanto por métodos de estimulação a nível do sistema nervoso (SN) central quanto do SN periférico, para o controle da dor. Porém, a estimulação do SN periférico que utilizam em especial o nervo vago (NV), tem intrigado a comunidade científica e proporcionado uma melhor compreensão de diversas questões, em razão da sua ampla conectividade encefálica com vias importantes no controle da dor[10]. Alinhado a essa afirmação, já está bem descrito na literatura que a estimulação do NV apresenta um potencial terapêutico anti-inflamatório por meio da ativação de vias neuroimunológicas[11].

A eletroestimulação do NV tem sido amplamente estudada de forma invasiva[12] e não-invasiva[13–19]. Inclusive, o NV é um componente importante para a ativação de diferentes vias que produzem efeitos analgésico e anti-inflamatório[20,21], bem como efeitos pró-resolutivos[22,23] que ainda tem sido pouco explorado. A resolução da inflamação é mediada por um grupo de moléculas, que seguem alguns critérios como a reprogramação dos macrófagos em fenótipo M1 com característica inflamatória e o fenótipo M2 com ação pró-resolutiva, assim como na regulação de citocinas[24]. O NV tem sido descrito como um potencial terapêutico pró-resolutivo, sendo este mediado pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh)[1], inclusive a estimulação vagal estaria regulando vias imunológicas em patologias como artrite reumatoide e artrite psoriática[25]. Além disso, o NV parece influenciar a regulação de corticosterona[26,27], que é um dos principais hormônios dentro das classes de glicocorticoides; estes por sua vez desempenham um papel importante na regulação

de outra molécula pró-resolutiva como a anexina A1 (AnxA1)[28,29], além de apresentarem papel importante na expressão do receptor formil peptídeo tipo II (FPR2/ALX)[30].

Os métodos de eletroestimulação muitas vezes apresentam alto grau de invasividade, o que diminuiu a adesão dos indivíduos. Enquanto, que nos métodos não-invasivos ou menos invasivos, mesmo apresentando melhor adesão dos indivíduos, ainda não se chegou a um consenso sobre os parâmetros (tempo, frequência e local de estimulação) para se obter o melhor resultado analgésico[31].

Além disso, a acomodação do efeito analgésico (tolerância analgésica) é um fator limitante na prática clínica, inclusive há evidências de que determinados estímulos induzem a uma adaptação neuronal[32]. A maioria dos estudos são realizados com frequências menores do que 20 Hertz (Hz) e com corrente alternada[14,33,34]. Contudo, no intuito de modificar a adaptação neuronal[32], geralmente se utiliza na prática clínica a estimulação com frequência alternada de forma sistemática (por exemplo, alternar entre 2Hz e 10Hz). Ainda assim, recentemente foram desenvolvidos aparelhos de estimulação, que já possuem a programação chamada de randômica onde a frequência é gerada automaticamente pelo equipamento variando entre 2Hz a 10Hz. Essa estimulação do nervo a partir de frequências geradas randomicamente parece aumentar os efeitos da eletroestimulação[35,36]. Porém essa afirmação, bem como a comparação entre frequência alternada e randômica necessita ser investigada.

Com base no exposto, a presente tese apresenta a seguinte pergunta: Quais os melhores parâmetros de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV na hiperalgesia mecânica e existem fenômenos anti-inflamatórios, bem como o envolvimento da via AnxA1-FPR2/ALX periférica neste efeito?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Processo inflamatório

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico frente a insultos, tais como: cirurgias (lesão tecidual/mecânica), traumas e patógenos[1,37]. Neste sentido, a resposta é orquestrada por ação de diversas células e moléculas[37], que facilitam o controle do processo inflamatório de forma adequada dentre elas são: indutores, sensores, mediadores e efetores nos tecidos-alvos[38].

Os indutores podem ser endógenos ou exógenos e são responsáveis em iniciar a resposta inflamatória, como exemplo: lipopolissacarídeos, alérgenos, cristais de urato monossódico[39], Adjuvante Completo de *Freund* (CFA)[40]. Enquanto que os sensores [exemplo: receptor do tipo *Toll-like* (TLR), imunoglobulina 3 (Ig3)] são ativados pelos indutores que provocam a liberação de mediadores [exemplo: fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6), prostaglandina E_2 (PGE_2), interleucina 1 beta (IL-1β) e bradicinina], onde culminará na alteração da função da região afetada (órgão/tecido), que são os tecidos-alvos (células endoteliais, leucócitos, hipotálamo, células musculares) da inflamação (Figura 1)[38,39].

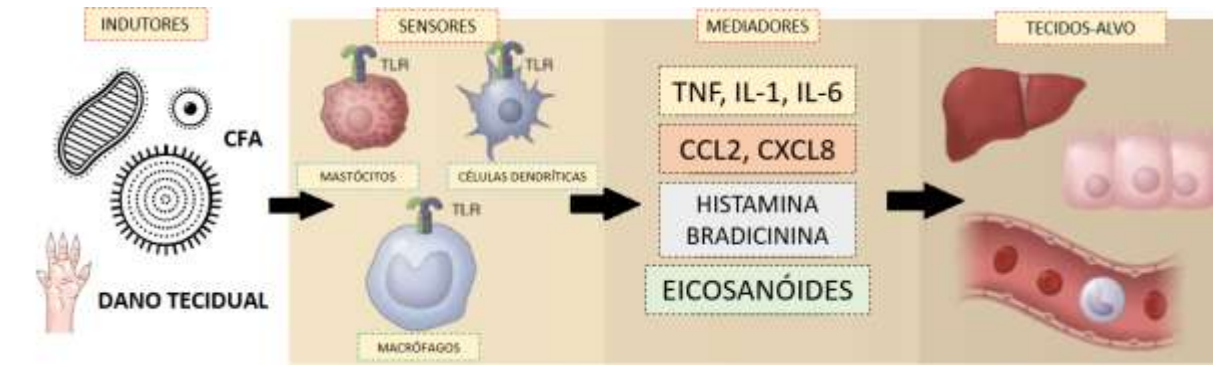


Figura 1 - Componentes da via inflamatória.

Após a indução da inflamação ocorre a ativação dos sensores, que induzem a liberação de mediadores e alteram a função do tecido alvo. *TLR: receptores Toll-like; TNF: Fator de necrose tumoral; IL-1: interleucina-1, IL-6: interleucina 6, CCL2: ligante 2 da quimiocina; CXCL8: ligante 8 da quimiocina.

Fonte: Adaptada de Medzhitov, 2010[39]

As moléculas envolvidas na resposta natural da inflamação desencadeiam eventos vasculares e celulares que promovem alterações no tecido alvo, estes por

sua vez são responsáveis pelos sinais locais e sistêmicos observados principalmente na fase aguda do processo inflamatório[2]. Em condições normais ocorre a remoção das células apoptóticas e detritos, com a finalidade de retorno a homeostase do tecido (Figura 2, painel A e B). Ainda assim, a resposta inflamatória aguda é influenciada por diversos eventos celulares (infiltrado celular, apoptose) que podem levar a cronicidade ou resolução da inflamação. A resolução da inflamação é orquestrada por mediadores como resolvinas, lipoxinas, protectinas, maresinas entre outros (Figura 2, painel C)[3].

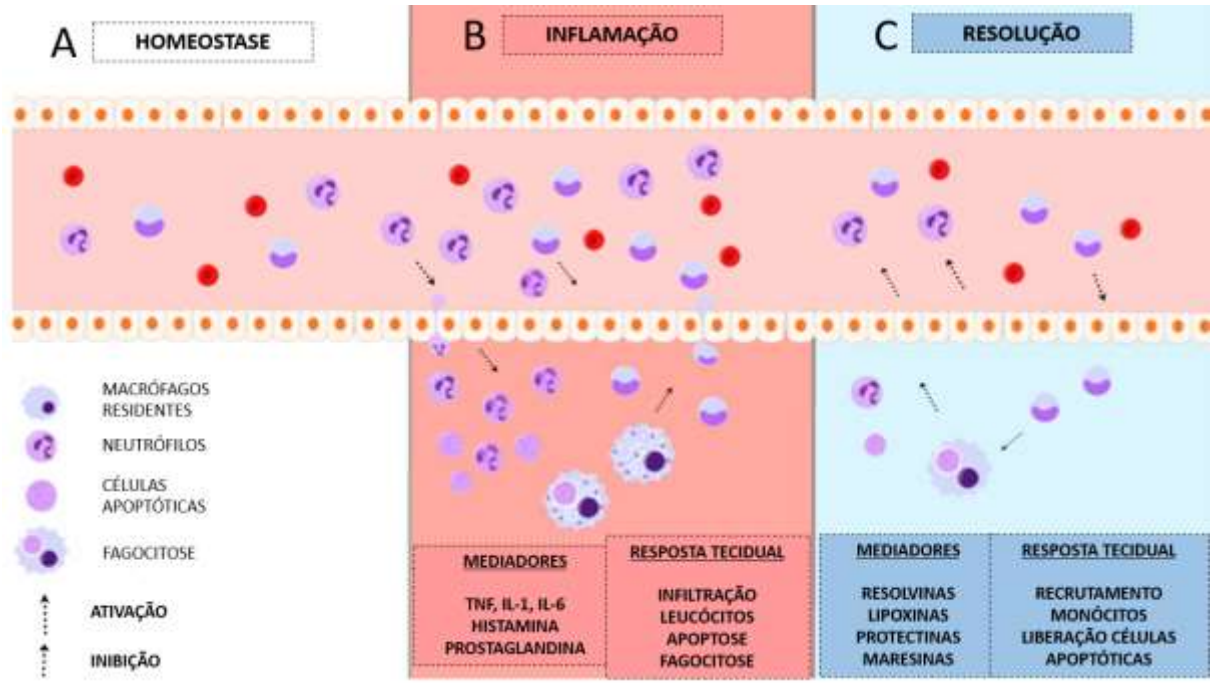


Figura 2 - Resposta natural da inflamação.

Na fase inicial da inflamação ocorre a indução e remoção de moléculas, para que então na fase resolutiva há ação de moléculas pró-resolutivas para o recrutamento de monócitos e liberação de células apoptóticas, por exemplo.*TNF: Fator de necrose tumoral; IL-1: interleucina-1, IL-6: interleucina 6.

Fonte: Adaptado de Freire e Dyke, 2013[3]

Por fim, a inflamação apresenta fases importantes para que ocorra a resolução adequada do processo inflamatório. Esses eventos serão explanados nos próximos tópicos.

1.1.1.1 Fase aguda

A fase aguda do processo inflamatório se dá por início rápido e de curta duração, com infiltrado celular principalmente de neutrófilos. Apresenta exsudação de líquido e proteínas plasmáticas, o que denota sinais locais e sistêmicos proeminentes, dentre eles: o calor, rubor, edema, dor (hiperalgesia inflamatória) e perda de função[3].

A hiperalgesia inflamatória é uma das respostas fisiológicas decorrentes dos estímulos que provocaram a quebra da homeostase do tecido[38,41,42]. Inicialmente, os mediadores inflamatórios que são liberados por meio da resposta imune inata, podem ser classificados como mediadores hiperalgésicos intermediários, que são liberados (citocinas e quimiocinas) no início e durante a inflamação e os mediadores hiperalgésicos finais promovem modificações moleculares por meio da interação com receptores específicos, o que culmina na sensibilização neuronal devido a ativação de vias de sinalização intracelulares[41,42].

Ainda assim, a produção de citocinas pró-inflamatórias de forma exacerbada (IL-6, IL-1β, TNF) é considerada uma das principais causas da hiperalgesia, já que esses fatores inflamatórios reduzem o limiar da membrana neuronal e sensibilizam os neurônios sensoriais, que compõem a via da nocicepção[43,44], bem como induzem edema devido ao extravasamento de líquido para o meio extracelular[44–46]. Essas citocinas tem sido amplamente descritas em modelos de hiperalgesia inflamatória como mediadores importantes da inflamação, assim como a bradicinina ou prostaglandinas[47–49].

Diante disso, os eventos celulares ocorrem por meio, principalmente, da migração dos neutrófilos para o local lesionado. Neste local, eles são ativados pelo contato com o patógeno ou pela ação de mediadores quimiotáticos que foram liberados pelas células residentes. Em seguida, liberam o conteúdo tóxico de seus grânulos, como as espécies reativas de nitrogênio (ERN), proteinase[50], e um dos principais constituintes dos grânulos são as enzimas denominadas mieloperoxidase (MPO). A MPO é considerada um importante marcador indireto de neutrófilos[51,52], apesar da sua atividade catalítica ela evita a apoptose dos neutrófilos, o que contribuí para prolongar a inflamação[53].

O tempo de vida dos neutrófilos na circulação em condições normais é de 6 a 8 horas e após migração para o tecido apresentam meia-vida de três a cinco dias[29].

Durante o processo inflamatório ocorre um retardo da apoptose mediante estímulos pró-inflamatórios[54–56]. Após a apoptose os detritos dos neutrófilos são fagocitados pelos macrófagos. Assim espera-se, que ocorra o início da restauração do local lesionado. No entanto, se o organismo não for capaz de resolver a resposta inflamatória, pode-se evoluir para uma inflamação crônica[24,57].

1.1.1.2 Fase crônica

A fase crônica é caracterizada quando a resposta da inflamação aguda não apresenta resolução adequada. Neste sentido, há mobilização de células imunológicas a longo prazo, onde a descrição didática deste processo denomina-se inflamação crônica. O processo inflamatório na fase crônica apresenta um conjunto de alterações como a infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos), destruição tecidual, com processo de angiogênese e fibrose. A duração nesta fase é prologada e há predominância de infiltrados de monócitos/macrófagos e linfócitos[3,58].

Os macrófagos e linfócitos interagem de forma que ocorra a manutenção da inflamação crônica, com a liberação de mediadores quimiotáticos que estimulam o processo de cronicidade[59]. Porém, com o processo apoptótico adequado, ocorre a indução da produção das lipoxinas e resolvinas que auxiliam no processo resolutivo[60], inclusive há evidência de que o marcador apoptótico fosfatidilserina promove a produção de moléculas como o fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) pelos macrófagos que reduz a inflamação[61] e mediadores pró-resolutivos como a AnxA1, que se ligam aquele marcador apoptótico potencializando a captação fagocitária[62]. Diante disso, é importante destacar que as etapas envolvidas no processo resolutivo são mediadas por diferentes moléculas, as quais determinam o início e final da resolução da inflamação.

1.1.2 Resolução da inflamação

A resolução da inflamação tem sido descrita de forma passiva desde a década de 60[63]. Atualmente, é descrita como um processo endógeno ativo, com mediação de múltiplas substâncias e células com a finalidade de proteger o hospedeiro contra uma resposta inflamatória exacerbada[64]. A resolução é a

capacidade de promover a troca ativa de mediadores pró-resolutivos, apoptose e remoção de células inflamatórias[65].

É importante compreender que o processo anti-inflamatório é distinto da resolução da inflamação, visto que este apresenta um papel ativo e não só regulador[66]. Dentre os processos desempenhados pela resolução da inflamação, destacam-se: redução da infiltração de neutrófilos, regulação de moléculas (citocinas/quimiocinas), regulação da mudança fenotípica dos macrófagos e drenagem das células para o sistema vascular/linfático, com a finalidade de promover a homeostase do tecido agredido[1,67].

O resultado esperado de uma inflamação aguda é a restauração da homeostase tecidual, por meio de mediadores lipídicos como Prostaglandina D_2 (PGD_2) e PGE_2, que além de serem indutores essenciais no início da inflamação são capazes de induzir a expressão de enzimas e evocar respostas anti-inflamatórias. Porém, uma resposta reduzida ou falha no processo pró-resolutivo desencadeia inflamação crônica em condições patológicas[67], conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3 - Resolução completa (fisiológico) e Falha (patológico).

Após a inflamação aguda espera-se que ocorra a resolução adequada (fisiológico), contudo se ocorre uma falha no processo observa-se que a inflamação crônica é instalada e induz a uma condição patológica. *PGD_2: prostaglandina D_2; PGE_2: prostaglandina E_2.

Fonte: Adaptado de Gudernatsch, 2020[67].

Para que as moléculas sejam classificadas como mediadores pró-resolutivos é necessário apresentar alguns critérios, como: limitar ou cessar a infiltração de neutrófilos para o tecido; apresentar capacidade de contra-regular a liberação de quimiocinas e citocinas; induzir apoptose nos neutrófilos e eferocitose nos macrófagos; reprogramar macrófagos; promover o retorno das células não

apoptóticas para o sistema vascular/linfático; preparar células imunossupressoras e resposta imunoadaptativa para lidar com os eventos patológicos e induzir o reparo tecidual[24]. Neste sentido, as moléculas que apresentam os critérios citados, são geralmente: mediadores lipídicos (lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas)[65], proteínas (AnxA1)[29], hormônios e neuromoduladores (ACh e outros neuropeptídios) que apresentam a liberação controlada pelo nervo vago[22].

Com base nisso, no estágio inicial da resolução da inflamação, ocorre uma mudança na produção dos mediadores lipídicos diminuindo as concentrações de prostaglandinas e aumentando as concentrações de lipoxinas, que inibem o recrutamento de neutrófilos e promovem a migração de monócitos[64,65], bem como induzem a mudança de fenótipo de macrófago M1 para macrófago M2[68].

Os macrófagos destacam-se pela capacidade de polarização, ou seja, de adquirir fenótipos funcionais distintos (M1 e M2) que o permite direcionar as respostas imunoadaptativas de formas diferentes. Assim, o fenótipo M1 apresenta função inibitória da proliferação celular (pró-inflamatório) e o M2 função de crescimento (reparo e proliferação celular, com efeito anti-inflamatório)[69,70].

Ainda assim, dependendo do estímulo os macrófagos desempenham papéis distintos. Na figura 4 é possível verificar que o fenótipo M1 aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias; enquanto que o fenótipo M2 apresenta características distintas para cada subtipo de macrófago M2a, M2b e M2c porém com o objetivo em comum de induzir uma resposta anti-inflamatória[71].

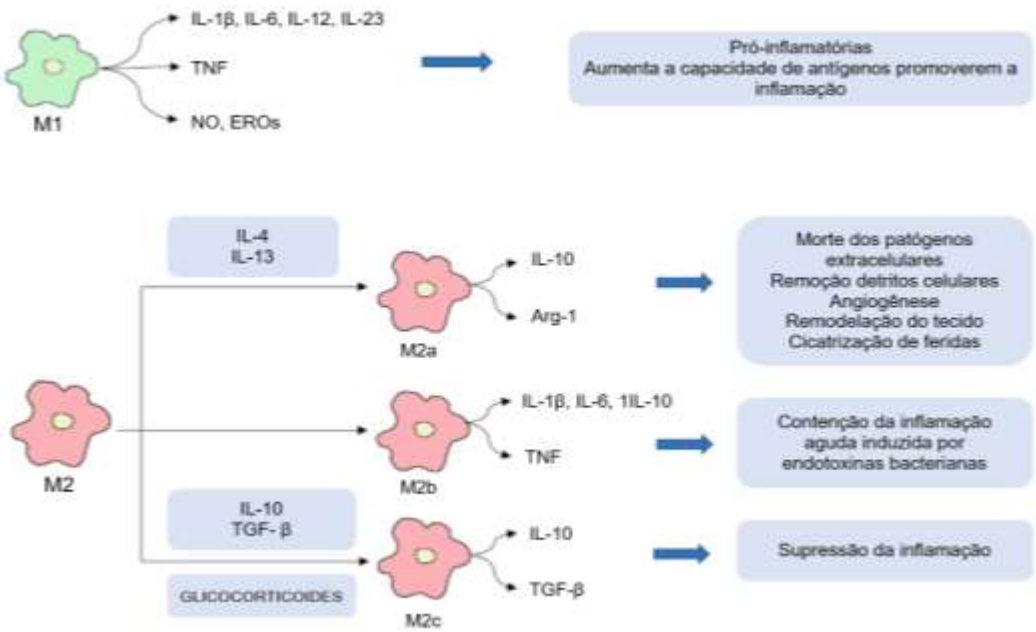


Figura 4: Polarização dos macrógafos e suas regulações.

Os fenótipos de macrófagos apresentam funções distintias, enquanto M1 caracteriza-se mais pró-inflamatório e aumenta a capacidade de antígenos promoverem a inflamação. Em contrapartida, o fenótipo M2 possui a função de induzir uma resposta anti-inflamatória. *IL: interleucina; TNF: Fator de necrose tumoral; TGF-β: fator de transformação de crescimento beta; M2: fenótipo 1 do macrófago; M2: fenótipo 2 do macrófago; NO: óxido nítrico; EROs: espécies reativas de oxgiênio; Arg-1: Arginase 1.

Fonte: Adaptado de Wang et al., 2021[71].

A polarização dos macrófagos é amplificada por meio de citocinas e microrganismos infecciosos, no caso de M1, estudos *in vitro* demonstraram uma amplificação dessa polarização por bactérias ou TNF, Interferon gama (IFN-γ), assim como são produtos de moléculas efetoras [EROs, óxido nítrico (NO)] e citocinas inflamatórias (IL-1β, TNF, IL-6)[72–75]. Já os macrófagos com fenótipo M2 produzem citocinas anti-inflamatórias como interleucina-10 (IL-10), fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) e glicocorticoides[76], bem como expressam a enzima Arg-1[73–75]. Ainda assim, há uma classificação funcional para o subtipo M2: (a) M2a induzem a (IL-4); (b) M2b são induzidos por imunocomplexos e receptores para imunoglobulinas G (FcγR); (c) M2c são induzidos por IL-10, TGF-β e glicocorticoides[73,75]. Em ensaios bioquímicos, estudos demonstraram que a molécula CD16/32, que caracteriza o receptor de baixa afinidade para Fc de imunoglobulina é mais expressa em populações de macrófagos M1[77,78], bem como a molécula CD206 é densamente expressa em populações de macrófagos M2[79]. Neste sentido, ambos

marcadores (CD16/32 e CD206) têm sido utilizados para auxiliar na diferenciação fenotípica dos macrófagos M1 e M2, respectivamente.

Por fim, a resposta inflamatória inicial é mediada por macrófagos ativados na sua forma clássica, enquanto na fase de resolução ocorre a desativação dos macrófagos clássicos (M1), para a ativação de macrófagos M2 com função de promover angiogênese e reparo tecidual[80]. Inclusive, o processo resolutivo é conduzido ainda assim, por moléculas denominadas: resolvinas, protectinas, maresinas, lipoxinas, AnxA1, gases (sulfeto de hidrogênio, monóxido de carbono), adenosina ou neurotransmissores que são liberados pelo sistema vagal[1,57]. Essas moléculas são responsáveis por ativar mecanismos específicos que promovem o equilíbrio tecidual. Além disso, dentre elas, destacam-se as lipoxinas que foram os primeiros mediadores endógenos reconhecidos com atividade dual: anti-inflamatória e pró-resolutiva[81].

As lipoxinas são derivadas do ácido araquidônico (AA), a biossíntese é por ação sequencial de lipoxigenase (LOX) e enzimas distintas[82]. Os locais de maior produção são em mucosas e vasos sanguíneos[83]. Na mucosa as lipoxinas são geradas pelos neutrófilos, principalmente, a partir do 15-ácido-hidroxieicosatetraenoico (15-HETE), que é produzido pelas células do epitélio. Enquanto que, nos vasos sanguíneos, ocorre a oxigenação do AA pela 5-lipoxigenase (5-LO) nos leucócitos e a liberação é mediada pelo leucotrieno A_4 (LTA_4) que através da 12-lipoxigenase (12-LO) converte em lipoxina nas plaquetas. Neste contexto, os neutrófilos podem interagir nos tecidos onde há o processo inflamatório e produzir lipoxinas, bem como células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais[84].

Ainda assim, outra molécula pró-resolutiva que tem se destacado é a AnxA1. É uma proteína, que é liberada por indução dos glicocorticoides e encontra-se abundante no citoplasma de células polimorfonucleares (PMN)[29,85], macrófagos e monócitos[86,87]. Inclusive, quando há o estímulo inflamatório os macrófagos são recrutados e a AnxA1 desencadeia seu efeito biológico regulando a inflamação por meio da inibição da enzima fosfolipase A_2 (PLA_2), que inibe assim a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios[88,89].

A estrutura da proteína da AnxA1 apresenta o N-terminal que é sensível a íons de cálcio, logo encontra-se inativa na ausência do cálcio[88]. Após a sua ativação, a AnxA1 intracelular é mobilizada para a superfície da membrana plasmática. Logo,

conforme o tipo de célula a AnxA1 é mobilizada ou secretada de forma distinta, ou seja, quando ocorre a ativação autócrina a AnxA1 é liberada por meio do transportador ABC e age na mesma célula que a liberou via receptor FPR2/ALX[90]; na ativação parácrina ocorre a fosforilação do resíduo de serina da AnxA1 e antes de se mover para o meio extracelular é secretada pelo neutrófilo, logo após se liga no receptor da célula vizinha, monócito[91]. Por fim, na sinalização justácrina há interação entre AnxA1 contida em neutrófilos com a célula-alvo via receptor FPR2/ALX, cuja expressão é induzida por glicocorticoides. Neste sentido, o manejo de glicocorticoide pode aumentar os efeitos deste circuito anti-inflamatório, visto que induz a expressão de AnxA1 em neutrófilos e de FPR2/ALX em monócitos, conforme Figura 5[29].

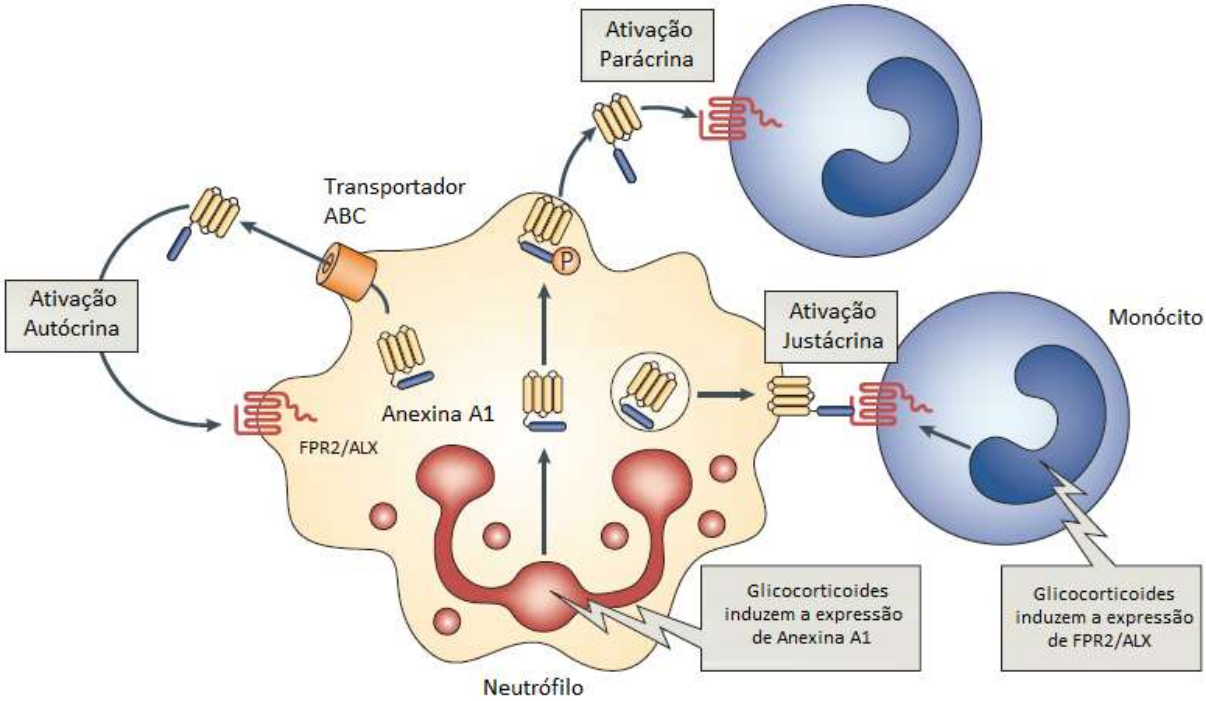


Figura 5 - Mobilização da AnxA1 e mecanismos distintos de ativações celulares.

A anxA1 é mobilizada ou secretada de forma distinta (ativação autócrina, justácrina e parácrina). * FPR2/ALX: receptor formil peptídeo tipo II.

Fonte: Adaptado de Perretti e D`Acquisto, 2009[29]

Ainda neste contexto, a AnxA1 quando interage com FPR2/ALX promove a regulação e sinalização de quinases reguladas pelo sinal extracelular (ERK) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que afetam nas funções dos fatores de transcrição ativador de proteína 1 (AP-1), NF-kB e fator nuclear de células

T ativadas (NFAT). Por sua vez, provoca a regulação da proliferação, atividade e diferenciação de células T, o que gera efeitos anti-inflamatórios; em contrapartida há os efeitos regulados pelos glicocorticoides nos receptores das células T (TCR)[29,92]. Logo em seguida, a AnxA1 inibe a PLA_2 e previne que precursores inflamatórios do AA se formem[93], ainda assim inibe a formação da cicloxigenase-2 (COX-2), atividade da óxido nítrico sintetase (iNOS), migração de neutrófilos e síntese/liberação de mediadores inflamatórios (TNF, IL-6). Por fim, com a AnxA1 externalizada há ativação de um mecanismo de defesa que promove a remoção de células apoptóticas e inibe a secreção de mediadores pró-inflamatórios (Figura 6)[92].

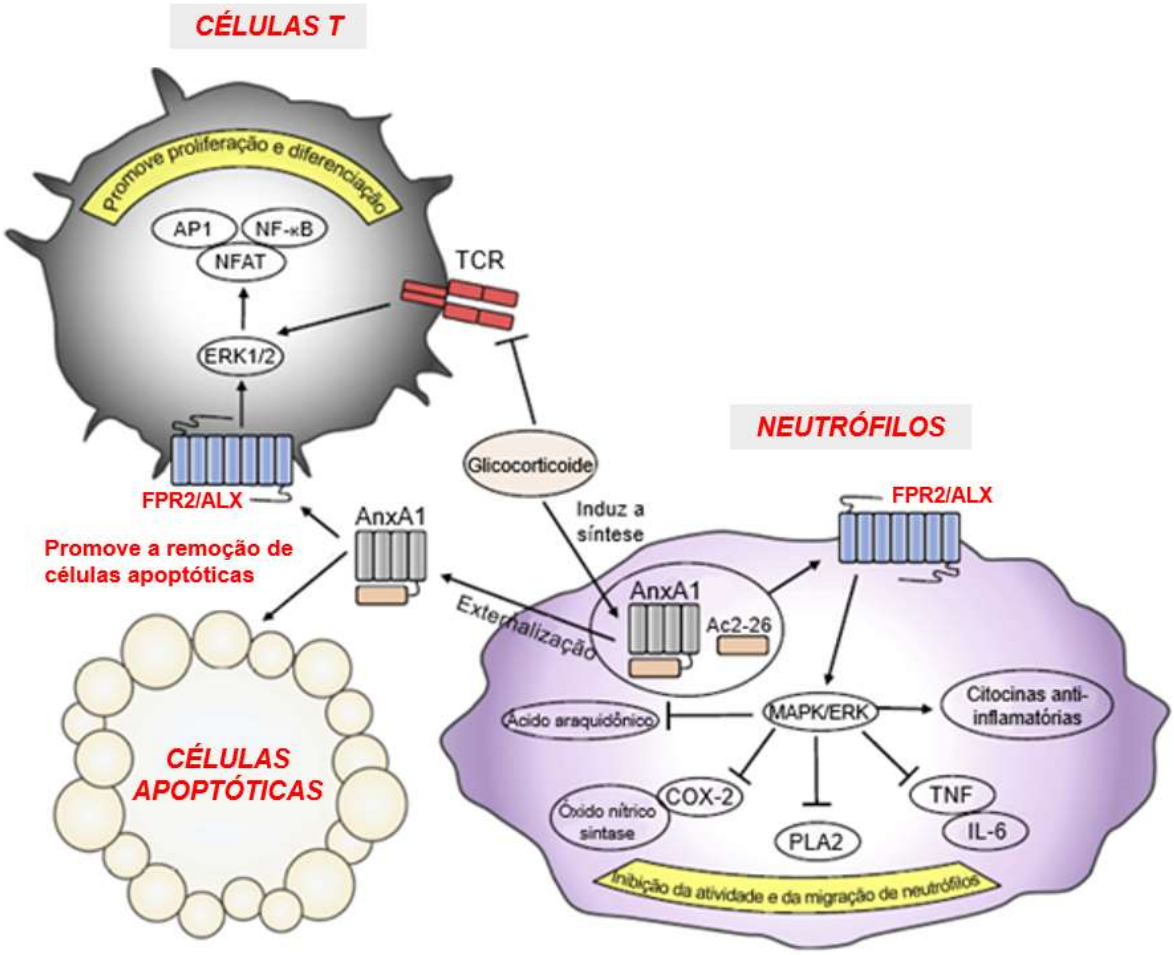


Figura 6 - Mecanismo da AnxA1 por meio do FPR2/ALX.

Ativação de diferentes vias de sinalização através da interação da AnxA1 com o FPR2/ALX; sendo que a externalização da proteína AnxA1 induz ação sobre células apoptóticas e células T. *FPR2/ALX: receptor formil peptídeo tipo II; ERK: quinases reguladas pelo sinal extracelular; MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos; AnxA1: Anexina A1; AP-1: ativador de proteina 1; NF-kB: fator nuclear kappa B; COX-2: cicloxigenase-2; PLA_2: fosfolipase 2; TCR: receptores das células T;

TNF: fator de necrose tumoral; IL-6: interleucina 6; Ac2-26: peptídeo N-terminal ativo de AnxA1; NFAT: fator nuclear de células T ativadas.
Fonte: Adaptado de Shao et al., 2019[92]

Os glicocorticoides regulam a AnxA1 tanto em humanos saudáveis, onde observou-se aumento nos níveis de AnxA1 expressos por monócito e neutrófilos[28,29], quanto em condições patológicas[29,94]. Além disso, os glicocorticoides têm demonstrado papel importante na indução da expressão do FPR2/ALX, onde foi possível observar em incubação de monócitos humanos, que o uso de dexametasona e outros glicocorticoides sintéticos induziram a síntese de FPR2/ALX[95]. Inclusive os glicocorticoides endógenos controlam os níveis de depuração de neutrófilos apoptóticos por macrófagos[30].

Ainda assim, tem sido descrito que a interação da AnxA1 com o seu receptor FPR2/ALX apresenta função importante no controle da apoptose e depuração de leucócitos por macrófagos[29], assim como exerce efeito antinociceptivo ao nível do gânglio da raiz dorsal[96]. Pei e colaboradores[97] verificaram em um modelo animal de CFA na pata traseira, que há o envolvimento da via AnxA1-FPR2/ALX no efeito antinociceptivo a nível do gânglio da raiz dorsal. Além disso, a AnxA1 e as lipoxinas também medeiam a resolução da inflamação por distintos mecanismos, que envolvem principalmente a ativação do receptor FPR2/ALX[29,83]. Este é um receptor acoplado a proteína G (GPCR), que pertence a família dos receptores de formil peptídeo (FPR). Em humanos há três deles, que foram identificados por técnicas de clonagem: FPR do tipo I (FPR1), FPR2/ALX e FPR do tipo III (FPR3)[83,84].

O FPR2/ALX é expresso em alguns tecidos como pulmão[98], baço e em células como: macrófagos, neutrófilos e micróglia[99]. Os ligantes para esse receptor são: Lipoxina A_4 (LXA_4), AnxA1, epímeros de lipoxinas derivados da aspirina[83], entre outros. Com a ativação desse receptor observa-se alguns efeitos pró-resolutivos, tais como: redução da expressão de moléculas de adesão em leucócitos/células endoteliais e da produção das citocinas IL-1β/IL-6, inibição da infiltração de neutrófilos, aumento do fluxo de saída de fagócitos e estimulação da expressão de células antimicrobianas e reequilíbrio tecidual[100,101]. Além disso, estudos têm observado os efeitos de moléculas pró-resolutivas em patologias que apresentam como característica clínica a dor inflamatória[102,103].

1.1.3. Modelo animal de dor inflamatória

Pesquisas buscando novas abordagens para o tratamento da dor inflamatória, vem utilizando amplamente modelos experimentais, dentre eles, o CFA ou carragenina[104]. O modelo de CFA induz hiperalgesia inflamatória persistente em uma das articulações e isto é feito por meio de uma injeção subcutânea, neste caso na pata do animal, sendo que o composto é constituído por micobactérias (*Mycobacterium butyricum ou Mycobacterium tuberculosis*) mortas pelo calor e suspensas em um veículo de óleo mineral, que induz a destruição da cartilagem, inflamação das articulações, hiperalgesia mecânica, assim como edema adjacente ao local da injeção. Neste sentido, parece ser um modelo animal com excelente utilidade para estudos de dor e inflamação[105,106].

No modelo de CFA observa-se o aumento de diferentes células imunológicas ao longo do tempo. Inclusive, estudo demonstrou que seis horas após a injeção do CFA há um aumento de neutrófilos e 96 horas após a injeção ocorre um aumento de células mononucleares[40]. Sendo assim, existe um perfil celular diferenciado nas diferentes fases do processo inflamatório[107,108,109]. Ainda neste sentido, tem sido utilizado como modelo de artrite induzida na articulação temporomandibular em ratos[110] e outro estudo utilizou o CFA para induzir a artrite na articulação tibiotársica em ratos[111].

Com isso, este mesmo modelo de indução por CFA tem sido utilizado em outros estudos para a investigação da eficácia de diferentes formas de tratamentos, dentre eles o efeito da estimulação do NV[112,113]. Com base no exposto, para responder os objetivos do presente estudo elegeu-se o modelo animal de inflamação periférica induzido pelo CFA, pois induz inflamação (edema e dor), que são sinal e sintoma comum de diversas doenças musculoesqueléticas.

1.1.4 Nervo vago

Neste tópico foi abordado os aspectos fisiológicos do NV, bem como as vias neuromodulação do sistema vagal e o uso da eletroestimulação no intuito de restabelecer ou potencializar suas funções.

1.1.4.1 Aspectos neurofisiológicos do NV

O NV é o décimo par de nervo craniano, inerva a maioria dos órgãos e está envolvido na regulação de múltiplos sistemas[114,115]. É um nervo misto, onde 80% das fibras são aferentes (sensações somáticas, gustativas e viscerais) e 20% das fibras são eferentes, que representam o ramo parassimpático do SN autônomo, assim como desencadeia a liberação de ACh[116,117].

O NV destaca-se por apresentar influência na maioria dos sistemas, principalmente sobre o baço e fígado que são fontes de citocinas pró-inflamatórias, assim como também controla a inflamação[118,119]. Devido a esse fato, iniciou-se a investigação do papel do NV na inibição da produção de citocinas inflamatórias. Em seguida, observou-se que a estimulação do NV invasiva reduziu citocinas inflamatórias em modelos não clínicos de isquemia miocárdica, sepse, pancreatite, isquemia/reperfusão, choque hemorrágico e artrite[120–123].

A inibição da produção de citocinas por meio da atividade do NV está associada a liberação de ACh, que é o principal neurotransmissor utilizado pelo NV nas suas sinapses[124,125]. Esse efeito se dá pela ação da ACh em seu receptor nicotínico expresso na membrana de células produtoras de citocinas, tais como: macrófagos, micróglia e linfócitos[125–127]. Especificamente, nessas células a ACh se liga ao receptor nicotínico para acetilcolina α7 (α7nAChR) o qual é importante na supressão da produção de citocinas, como demonstrado em camundongos tanto nocaute para essa subunidade, quanto submetidos a vagotomia visto que apresentaram concentrações aumentadas de citocinas como TNF[124,125]. Em contrapartida, a estimulação deste nervo ou administração de agonistas para os receptores de ACh inibiram a síntese de TNF, IL-1, IL-6, interleucina 8 (IL-8)[126].

Assim, é possível entender a importância da sinalização colinérgica na resposta anti-inflamatória produzida pelo NV e o balanço de produção de citocina, sendo que este fenômeno é denominado de via anti-inflamatória colinérgica. A figura 7 está representando a via anti-inflamatória colinérgica, onde os sinais eferentes do NV podem controlar este mecanismo inibindo a síntese de citocinas por meio de vias dependentes de receptores para ACh (α7nAChR) em macrófagos ou outras células. Enquanto, os agonistas para receptores colinérgicos promovem tanto o aumento da atividade anti-inflamatória colinérgica, quanto o aumento da variabilidade cardíaca.

Então, os sinais eferentes do NV promovem a inibição de liberação de citocinas, que se denomina como reflexo anti-inflamatório colinérgico[128].

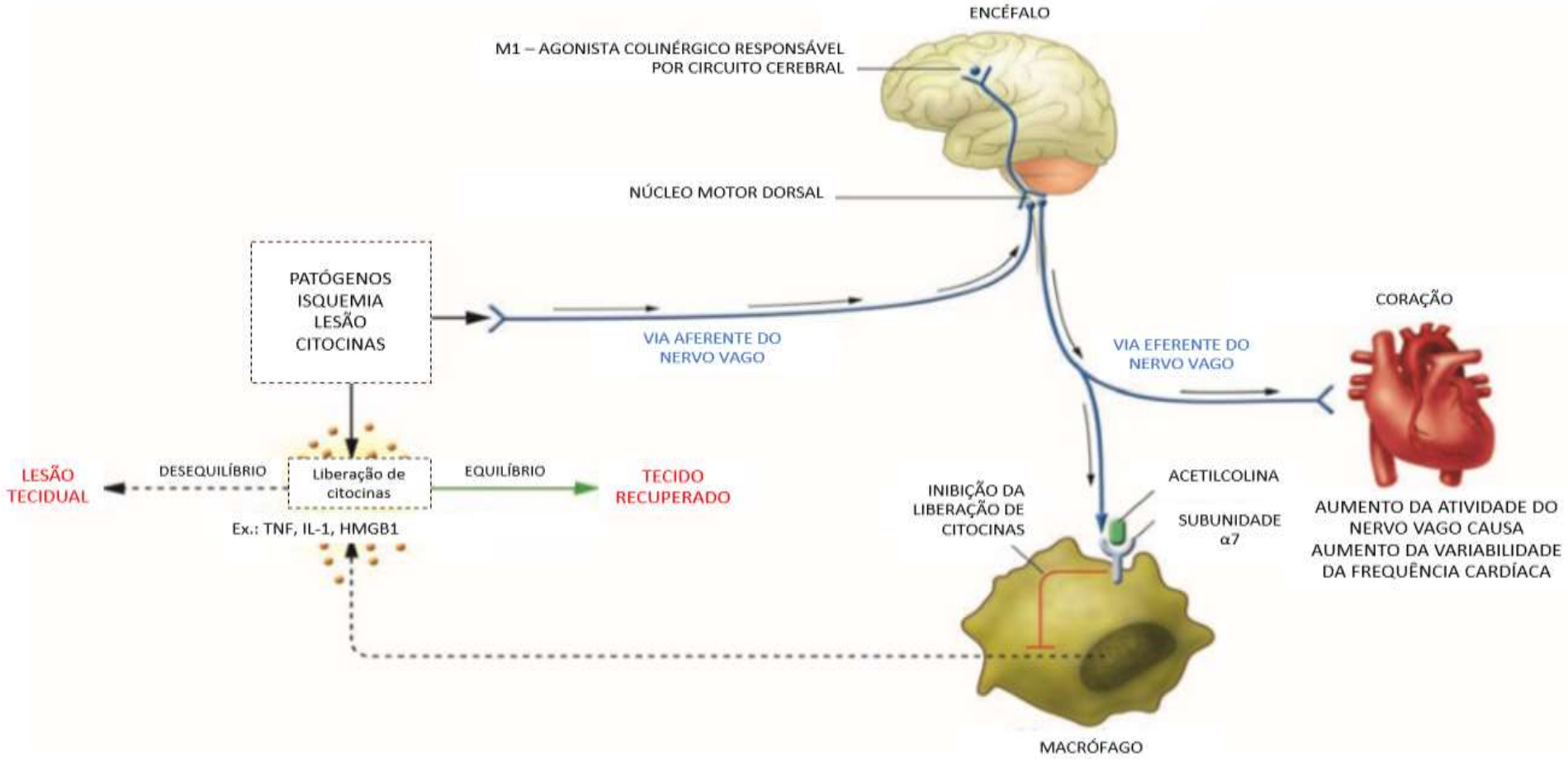


Figura 7 - Via anti-inflamatória colinérgica.

A via eferente do nervo vago induz a inibição de citocinas pró-inflamatórias via receptor para acetilcolina e ainda assim promove aumento da variabilidade da frequência cardíaca. *M1: receptor muscarínico tipo 1; TNF: fator de necrose tumoral; IL-1: interleucina 1; HMGB1: proteína 1 de alta mobilidade.

Fonte: Adaptado de Tracey, 2007[128].

Então, os achados demonstram a importância crucial do reflexo colinérgico para produzir os efeitos anti-inflamatórios orquestrados pela estimulação do NV. Por este motivo, torna-se importante compreender a via do reflexo anti-inflamatório colinérgico.

1.1.4.2 Via anti-inflamatória colinérgica

Os primeiros achados sobre a existência do reflexo anti-inflamatório colinérgico ou também denominada reflexo vago-vagal foi através de um estudo, onde verificaram que a hipertermia induzida por IL-1β era bloqueada quando realizado a vagotomia subdiafragmática[118,129]. Logo após, identificou-se que a estimulação da via anti-inflamatória colinérgica por métodos farmacológicos ou não-farmacológicos (estimulação elétrica) atenuava a resposta inflamatória sistêmica em ratos submetidos a endotoxina[120].

O reflexo anti-inflamatório colinérgico é ativado quando o arco aferente vagal detecta mediadores pró-inflamatórios, como: citocinas, padrões moleculares associados a patógenos, padrões moleculares associados a danos, receptores de reconhecimento padrão[128,130]. Logo após, o estímulo é conduzido até o SN central que ativa o arco eferente vagal com a finalidade de controlar as respostas imunológicas. Este controle é também realizado por meio de receptores colinérgicos (nicotínicos e muscarínicos), que apresentam amplo envolvimento em circuitos ou arcos reflexos anti-inflamatórios associados ao NV[128], a exemplo o neurotransmissor ACh que atua por meio de receptores muscarínicos e nicotínicos e participa de processos fisiológicos, como: proliferação e diferenciação de queratinócitos, relaxamento dos músculo liso dos vasos sanguíneos[131] e auxilia na inibição da degradação da cartilagem na osteoartrite via α7nAChR[132].

Estudo demonstrou que a administração intracerebroventricular de agonistas para receptores muscarínicos foram capazes de reduzir os níveis séricos de TNF durante a endotoxemia, o que sustenta mais uma vez a regulação da síntese de citocinas por meio do NV[133]. Neste sentido, as vias reguladoras da magnitude da resposta inflamatória são mediadas por citocinas liberadas no local da inflamação, que ativam as fibras aferentes do NV e o estímulo segue até o núcleo do trato solitário no tronco encefálico, que tem a finalidade de informa o SN central o estado inflamatório periférico. Assim, uma resposta é transmitida pelas fibras eferentes do

NV que enviam sinais compensatórios para o local da inflamação e promovem ação sobre as regiões e células imunológicas, a fim de atenuar a resposta inflamatória, promovendo a homeostase[109].

A atenuação ou interrupção da via anti-inflamatória vagal tem sido relacionada a vários distúrbios inflamatórios e/ou autoimunes, como a artrite reumatoide, doenças pancreáticas e intestinais[109,134,135]. No estudo de Goldstein e colaboradores[136] verificou-se a associação da via anti-inflamatória colinérgica com a proteína box 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) em pacientes com artrite reumatoide e observou-se que a redução da atividade da via anti-inflamatória colinérgica, aumenta a HMGB1 nos pacientes avaliados. Ainda assim, no estudo de Li e colaboradores[137] realizado em um modelo animal de artrite induzida por colágeno em camundongos; verificou que os níveis de TNF e IL-6 reduziram no grupo nicotina, quando comparado ao controle e ao grupo vagotomia. Além disso, o pré-tratamento com a nicotina reduziu a expressão de HMGB1 na articulação dos camundongos com a artrite induzida. Isto denota importante papel da via anti-inflamatória colinérgica na fisiopatologia de doenças reumatológicas, como a artrite.

Ainda assim, estudo fornece evidência de que a estimulação da via anti-inflamatória colinérgica mediada pelo NV, por até quatro vezes ao dia em pacientes com artrite reumatoide foi capaz de inibir a produção de TNF por até 84 dias após, bem como houve melhora nos escores clínicos padronizados no respectivo estudo[138], o que torna-se um alvo terapêutico não farmacológico interessante para o manejo da artrite reumatóide[4].

Outra doença reumatológica é a osteoartrite, que apresenta uma inflamação persistente que leva a produção tanto de citocinas no tecido adiposo (obesidade), quanto na sinóvia. As citocinas promovem a degradação da cartilagem por meio da ativação de vias como MAPK e NF-kB, que induzem a secreção de metaloproteinases (MMPs) e desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina (ADAMTS) colaborando efetivamente com a degradação. Além disso, as citocinas podem colaborar com a ativação do arco aferente do NV, que como resposta (arco eferente) libera ACh e ativa o α7nAChR nos condrócitos, com o intuito de promover a inibição de vias importantes para a degradação da cartilagem. Ainda assim, este reflexo anti-inflamatório colinérgico pode ser ativado por eletroestimulação do NV[132], conforme demonstrado na figura 8.

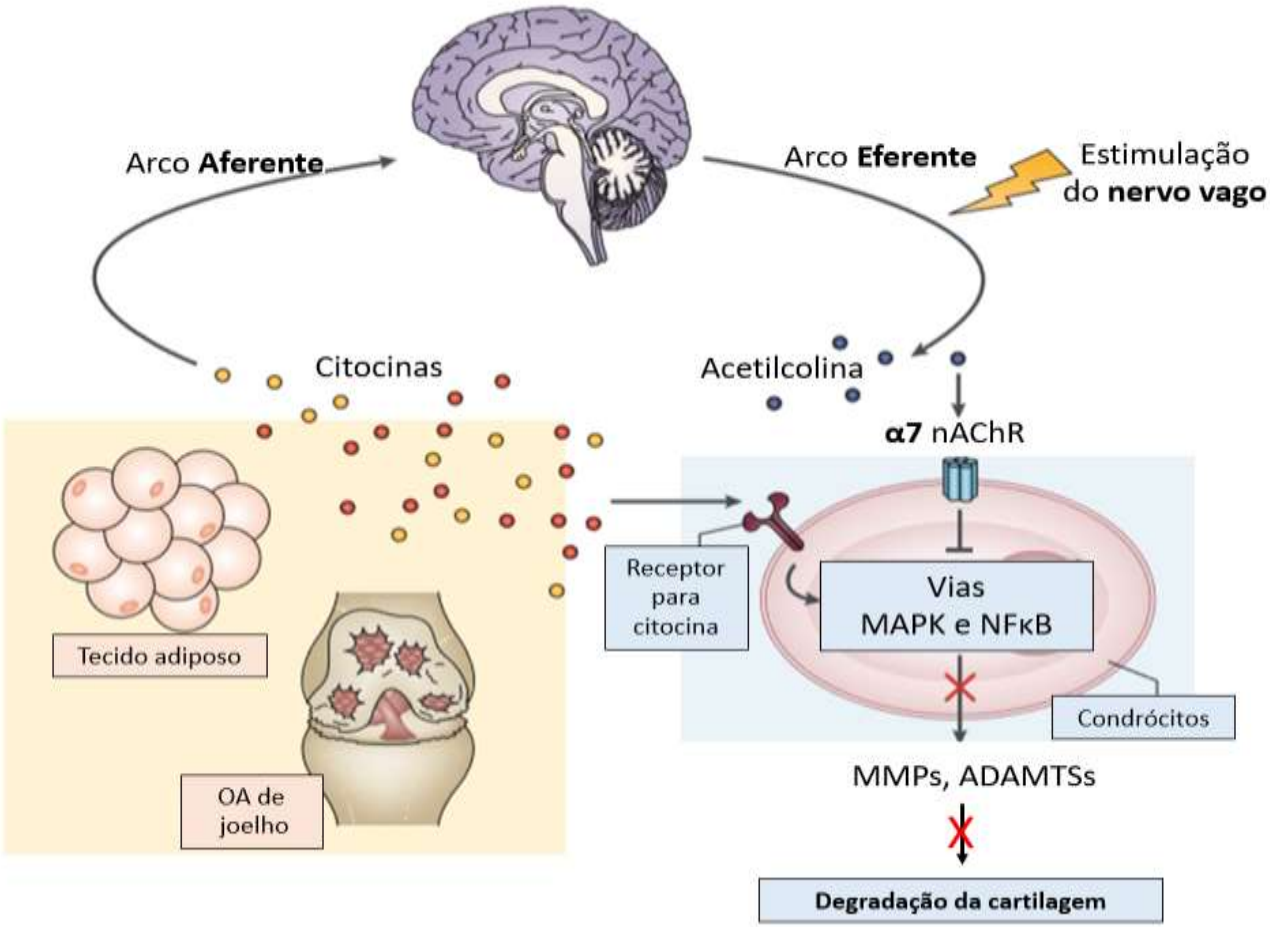


Figura 8 - Reflexo anti-inflamatório colinérgico na osteoartrite de joelho.

A estimulação do nervo vago é capaz de inibir a degradação de cartilagem em osteoartrite de joelho via receptor para acetilcolina em condrócitos. *MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos; NF-kB: fator nuclear kappa B; MMPs: metaloproteinases; ADAMTs: desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina; α7nAChR: receptor nicotínico para acetilcolona α7; OA: osteoartrite.

Fonte: Adaptado de Berenbaum e Meng, 2016[132]

As vias de manutenção do processo fisiopatológico apresentam como alicerce a produção de citocinas pelo sistema imunológico, que contribuí tanto para um estado fisiológico, quanto patológico[109]. Além disso, há a participação da ACh mediando a inibição de respostas inflamatórias, através do reflexo anti-inflamatório colinérgico[116]. Neste sentido, torna-se interessante compreender o papel do NV no processo resolutivo, visto que sua ação anti-inflamatória já tem sido descrita anteriormente.

1.1.4.3 A influência do NV sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

O NV é um componente fundamental para o eixo neuroimunoendócrino, visto que fornece respostas importantes para a defesa e restauração da homeostase do corpo[116]. Inclusive, observa-se que este mecanismo humoral através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) inicialmente detecta as citocinas pró-inflamatórias pelas fibras aferentes vagais e a informação é projetada para áreas encefálicas. Após, é induzido a liberação do hormônio adrenocorticotrófico que por sua vez induz a liberação de glicocorticoides pelas glândulas suprarrenais. Os glicocorticoides favorecem a polarização de macrófagos e ocorre a inibição de citocinas pró-inflamatórias, conforme observado na figura 9[4].

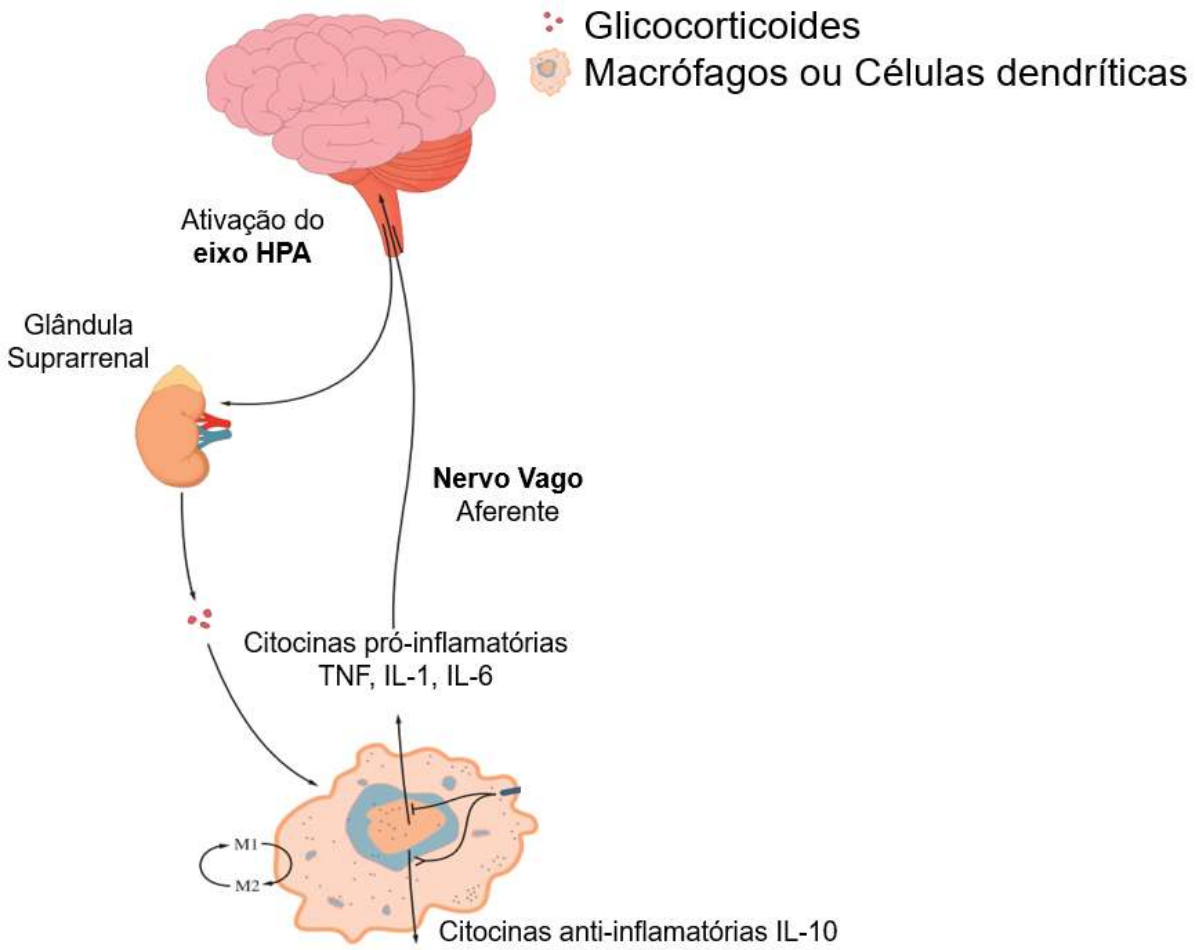


Figura 9 – Eixo HPA.

As fibras aferentes do nervo vago detectam citocinas pró-inflamatórias e através de uma resposta humoral induzem a polarização de macrófagos e inibem as citocinas pró-inflamatórias. *IL-10: interleucina 10; TNF: fator de necrose tumoral; IL-6: interleucina 6; HPA: hipotálamo-hipófise-adrenal. Fonte: Adaptado de Rasmussen et al., 2017[4]

Ainda assim, há evidências científicas neuroanatômicas que, por meio da técnica de vagotomia, têm demonstrado uma íntima relação do NV com a ativação do eixo HPA, sendo que em algumas dessas situações a mediação é por receptores nicotínicos e muscarínicos[139–141]. Inclusive, foi demonstrado em estudo pré-clínico com ratos, que a vagotomia subdiafragmática reduziu a secreção do hormônio adrenocorticotrófico induzida por nicotina (agonista nicotínico), o que pode ter o envolvimento do arco aferente vagal. Enquanto que, a vagotomia subdiafragmática aumentou a secreção do hormônio adrenocorticotrófico e a corticosterona induzida por carbacol (agonista muscarínico)[139].

Corroborando ainda com os efeitos da vagotomia sobre o eixo HPA, Fleshner e colaboradores[26] verificaram que a vagotomia subdiafragmática reduziu a resposta a febre e a corticosterona produzida pela administração intravenosa de TNF e IL-1β. Além disso, outro estudo identificou que a vagotomia inibiu a estimulação da secreção do hormônio adrenocorticotrófico após injeção intraperitoneal de IL-1β[142].

Neste sentido, observa-se que o NV apresenta forte influência sobre o eixo HPA[139], assim como tem sido descrito os seus efeitos no reflexo anti-inflamatório colinérgico[128] e pouco explorada a via anti-inflamatória simpática esplênica.

1.1.4.4 A influência do NV sobre a via anti-inflamatória simpática esplênica

A via anti-inflamatória simpática esplênica ocorre quando as fibras aferentes vagais detectam as citocinas pró-inflamatórias e as informações são transmitidas ao núcleo do trato solitário e subsequentemente ao núcleo motor dorsal. Ainda assim ocorre a ativação de fibras eferentes vagais que resultam na liberação de norepinefrina via nervo esplênico. A norepinefrina se liga a receptor β2 adrenérgicos, que por sua vez induz a liberação de ACh que se ligará ao α7-nAChR em macrófagos esplênicos, atenuando consequentemente a liberação de citocinas pró-inflamatórias e induzindo a liberação de citocinas anti-inflamatórias, conforme figura 10[4].

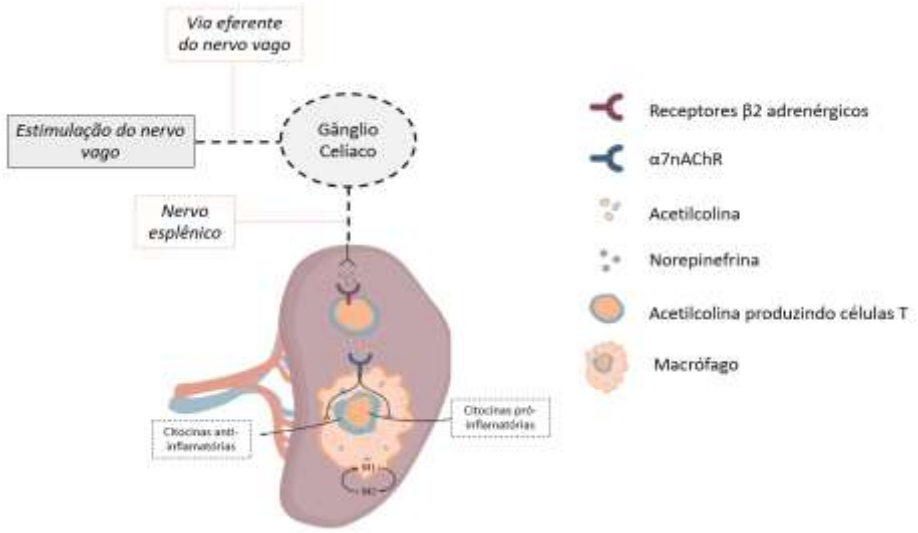


Figura 10 – Via anti-inflamatória simpática esplênica.

A estimulação do nervo vago parece inibir citocinas pró-inflamatórias via simpática esplênica. M1: fenótipo de macrófagos M1 pró-inflamatório; M2: fenótipo de macrófagos M2 anti-inflamatório..

Fonte: Adaptado de Rasmussen et al., 2017[4]

Ainda corroborando com esses achados, Breit e colaboradores[143] relata que o NV estimula o nervo simpático esplênico e a inibe de citocinas pró-inflamatórias como TNF. Ainda assim, Bonaz e colaboradores[116] reforça que é importante a compreensão dessas vias sob o ponto de vista terapêutico, visto que podem ser redirecionadas para a regulação anti-inflamatória de diversas condições patológicas.

1.1.4.5 NV e resolução da inflamação

O NV tem sido descrito como um interessante alvo terapêutico para o controle do processo inflamatório[22,144] e resolução da inflamação via reflexo anti-inflamatório colinérgico. Além disso, a ACh é descrita como uma molécula pró-resolutiva[1], cuja função é de regular a síntese de citocinas via supressão do NF-kB[145].

A ACh é um neurotransmissor expresso em queratinócitos, células imunológicas, bexiga urinária, células epiteliais das vias aéreas, células endoteliais vasculares, órgãos reprodutivos e outros[131]. Deste modo, tem sido demonstrado os efeitos anti-inflamatórios mediados pela ACh, visto que foi possível verificar redução de ACh no exsudato de animais submetidos a vagotomia cervical a direita[22].

Ainda assim, a ação da ACh é por meio dos receptores α7nAChR. Inclusive, tem foi demonstrado que há aumento da expressão desses receptores na sinóvia de pacientes com artrite reumatoide e artrite psoriática; o que propõe que a estimulação vagal possa aumentar a formação de moléculas pró-resolutivas (lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas) e a hipótese é de que terapias como a estimulação vagal possam regular a interrupção e/ou melhorar a inflamação em condições reumatológicas (artrite reumatoide, lúpus)[25].

Além da ACh, outra molécula pró-resolutiva é a netrina-1[22] que é uma proteína neuronal, que auxilia no controle da inflamação e atua como quimioatraente na migração axonal[146]. A netrina-1 apresenta função de estimular a resolução endógena, porém ainda é pouco explorado[22]. A expressão da netrina-1 tem sido demonstrada reduzida em órgãos inervados pelo NV (pulmão e peritônio), após vagotomia unilateral em camundongos, quando comparados ao controle. Ainda assim, moléculas pró-resolutivas como resolvina D1, lipoxina A4 e protectina D1 também estavam reduzidas no exsudatos de camundongos vagotomizados[22].

Contudo, tem sido demonstrado que o NV produz mediadores pró-resolutivos especializados. Inclusive, quando realizado a eletroestimulação auricular em um

modelo animal de dor neuropática induzida por quimioterápico foi possível verificar um aumento do nível de resolvina D1 no gânglio da raíz dorsal dos camundongos tratados; bem como a redução da alodinia mecânica 14 dias após o tratamento com o quimioterápico (paclitaxel)[147]. Ainda assim, Serhan e colaboradores[148] sugerem que o NV controla a inflamação por meio da produção de moléculas pró-resolutivas especializadas. Ainda neste sentido, estudo demonstrou que a estimulação do NV em humanos produz moléculas pró-resolutivas como: resolvina E1, maresina M1, resolvina D5, lipoxina A4. Enquanto que, em camundongos observou-se a produção de resolvina D3, resolvina D6 e resolvina E3[144]. Portanto, foi possível observar que é ainda pouco explorado a associação dos efeitos do NV e moléculas pró-resolutivas, contudo a literatura já apresenta interesse na eletroestimulação do NV como um potencial terapêutico para a dor inflamatória[148].

1.1.5 Eletroestimulação periférica percutânea

A utilização da estimulação elétrica periférica percutânea (por exemplo, eletroacupuntura) tem demonstrado efeitos consistentes para o controle da dor, bem como melhora na função física e rigidez na patologia de osteoartrite de joelho[149]. Ainda assim, além da estimulação elétrica, a escolha do ponto/área para o controle da condição dolorosa e os parâmetros utilizados, como frequência e tempo de aplicação são importantes para aumentar a eficácia da técnica. A maioria dos estudos experimentais inviabilizam a reprodução e translação clínica por falta de padronização nos parâmetros de estimulação elétrica[31].

Nas últimas décadas buscou-se entender os mecanismos envolvidos na eletroestimulação sobre a hiperalgesia inflamatória persistente, neuropática, visceral e no câncer[150]. Visto que, a dor é um problema de saúde pública com consequências econômicas e sociais de relevância[8,151,152]. Os mecanismos estudados em modelos de hiperalgesia inflamatória foram principalmente reproduzidos em modelos animais utilizando o CFA sendo então, o mais comumente utilizado. Além disso, os mecanismos analisados foram identificados desde o nível periférico até ao nível espinal, sendo que o tipo de técnica de eletroestimulação percutânea mais utilizada e estabelecida na literatura é a eletroacupuntura. Neste sentido os mecanismos propostos para efeito analgésico ou antinociceptivo da eletroacupuntura são: (a) periférico: ativação de moléculas de adesão celular, que

promove o aumento de β-endorfinas e o aumento de corticosterona por estimulação da glândula hipófise e induz a inibição da COX-2; (b) espinal: norepinefrina inibe a ação glutamatérgica; a serotonina que reduz a fosforilação da subunidade 1 de receptores NMDA (GluN1) e os opioides que induzem a liberação de neurotransmissor inibitório e suprime a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF)[150].

Ainda assim, em modelo animal de dor inflamatória (carragenina injetada no joelho) o pré-tratamento com eletroacupuntura com frequência de 10Hz melhorou a resposta anti-hiperalgésica[153]. Enquanto que a nível espinal demonstraram efeitos benéficos envolvendo o sistema adrenérgico com a utilização de baixas frequências como 10Hz na dor inflamatória[34].

Por fim, a utilização de diferentes frequências tem sido uma abordagem terapêutica comum para a investigação dos mecanismos envolvidos nos efeitos da eletroestimulação. Assim como, a preocupação com o efeito de acomodação do estímulo, por isso o uso alternado de frequências torna-se interessante, visto que os padrões e frequências do disparo neuronal irão influenciar na informação que será codificada pelo neurônio[32].

A frequência randômica é utilizada para variar a frequência aleatoriamente dentro de um intervalo de frequências ajustadas, sendo assim, o equipamento pode variar as frequências aleatoriamente a cada intervalo de 1 segundo. Diferente da alternada que varia da frequência mínima (2Hz) para a máxima (10Hz) pré-ajustadas. A frequência randômica alterna aleatoriamente da frequência mínima até a máxima [por exemplo: se a mínima for 2Hz e a máxima 10Hz, a aleatoriedade poderá ser [(2,9,7,6..., assim por diante)]. A morfologia do pulso das frequências apresenta característica bifásica alternada e para essas frequências é gerada apenas uma única duração de pulso[154].

A utilização da frequência randômica está sendo aos poucos introduzida no ambiente clínico, assim poucas pesquisas foram realizadas. Neste sentido, em ensaios clínicos, observou-se que a estimulação transcraniana por corrente pulsada teve melhor efeito no aumento da conectividade funcional, quando utilizada a frequência randômica de 1 a 5Hz por 20 minutos em uma única sessão[155] e melhora da cognição com possível efeito autonômico[156]. Em estudo utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente observaram que não houve mudança significativa nos padrões fisiológicos, porém o tempo de resposta, para a avaliação

da tarefa com mudança de atenção apresentou efeito mais pronunciado, em comparação com o controle[35].

Ainda assim, com o uso de estimulação transcraniana pulsada foram testados os seguintes tipos de frequências randômicas: 1-5Hz; 6-10Hz e 11-15Hz. Observou-se que a frequência randômica de 6-10Hz apresentou melhor efeito sobre a conectividade funcional da área cortical[36]. Por fim, foi realizado um estudo com 40 voluntários saudáveis com a estimulação transcraniana por corrente pulsada e receberam apenas uma sessão em 3 tempos (10, 20 e 30 minutos) com frequência randômica (6-10Hz). Observou-se que o tempo de 10 e 20 minutos apresentaram melhor efeito sobre os padrões de eletroencefalografia na região frontal, enquanto que 30 minutos não obteve nenhuma alteração[157]. Além disso, os efeitos adversos da estimulação do NV pode estar associada a parâmetros com intensidade acima de 10mA e frequências acima de 50Hz[114,158,159].

Apesar da limitada literatura sobre os efeitos da frequência randômica no manejo da dor, ainda assim foi possível identificar que os estudos com as frequências randômicas são predominantemente com baixas frequências e o tempo de tratamento é em torno de 10 a 30 minutos.

1.1.5.1 Eletroestimulação do NV

A eletroestimulação do NV apresenta aprovação para a utilização pela agência internacional de administração de alimentos e medicamentos (FDA) nos Estados Unidos nas condições clínicas: epilepsia refratária e depressão. Contudo ainda há investigação sobre seu potencial terapêutico em dores de cabeça, artrite, asma, dor, fibromialgia, transtorno bipolar e demência[115,160]. Ainda assim, a eletroestimulação da orelha externa tem sido avaliado como proposta terapêutica para o tratamento de comorbidades como diabetes[161], depressão[162], Covid-19[163] e epilepsia[164]. Neste sentido, sob o ponto de vista anatômico em humanos a região da orelha denominada concha cava recebe 45% de inervação do ramo auricular do NV e 55% de inervação do nervo auricular maior. Além disso, a concha cimba e cava apresentam grande número de terminações nervosas com 100% de suprimento do NV nestas regiões[114,165]. Além da concha auricular, há inervação do NV na anti-hélice (73%) e tragos (45%) da orelha, sendo que essas regiões não são exclusivamente inervadas pelo NV[159,165].

O mapa cutâneo da orelha pode apresentar variações anatômicas, quanto a distribuição da raíz nervosa, há cruzamento de fibras nervosas ao longo do curso intracraniano e os limites de dermátomos costumam ter sobreposição[166]. A orelha apresenta inervação com a sobreposição de pelo menos quatro nervos: o nervo auriculotemporal, que origina-se no ramo mandibular do nervo trigêmeo e inerva a porção anterossuperior e ântero-medial da orelha externa; o ramo auricular do NV encontra-se na concha auricular e ao redor do conduto auditivo; o nervo occipital menor origina-se no ramo de cervical (C) 2 do plexo cervical e fornece a inervação de caráter sensorial para um terço superior da orelha externa; e o nervo auricular maior origina-se dos ramos de C2 e C3 do plexo cervical e inerva o lobo da orelha externa, conforme figura 11[10,165,167].

Figura 11 - Representação das áreas de inervação do pavilhão auricular.

Ilustração dos quatro nervos responsáveis pela inervação cutânea da orelha externa: o nervo auriculotemporal (vermelho), ramo auricular do nervo vago (verde), nervo auricular maior (amarelo) e nervo occipital menor (azul).

Fonte: Adaptado de He, 2012[167].

As técnicas de neuromodulação não invasiva, como a eletroestimulação do ramo auricular do NV tem demonstrado efeitos interessantes para o manejo de diversas condições clínicas tanto em humanos, quanto em animais conforme está descrito na tabela 1. Inclusive, observa-se que há predominância por frequências entre 1 a 20Hz, tempo de tratamento 10 a 30min, sítio de estimulação concha cimba e cava e predileção por estimulação transcutâneo.

Tabela 1 - Sumarização de artigos que utilizaram como um dos tratamentos a eletrostimulação percutânea do ramo auricular do NV.

Referência	**Amostra (Humano/rato/ camundongo)**	**Método de estimulação / orelha**	**Sítio de estimulação**	**Parâmetros de estimulação**	**Condição**	**Desfechos**
Merchant et al.[168]	Humanos	Transcutâneo/ Esquerda	Concha cimba	30Hz, 300µs, até 2,5mA, 5min diários	Síndrome nefrótica pediátrica	Redução de proteinúria, Redução de TNF
Cao et al.[169]	Humanos	Transcutâneo/ Esquerda	Concha cimba e concha cava	8min, 1Hz ou 20Hz, 0,2ms	Enxaqueca	1Hz produziu mais conectividade com a substância cinzenta periaquedutal, córtex cingulado anterior, ínsula esquerda, do que 20Hz. Sugere-se que diferentes frequências geram efeitos distintos quanto a modulação do sistema descendente da dor

Continuação da Tabela 1.

Referência	Amostra (Humano/rato/ camundongo)	Método de estimulação / orelha	Sítio de estimulação	Parâmetros de estimulação	Condição	Desfechos
Steidel et al.[170]	Humanos	Transcutâneo/ Esquerda	Concha cimba	4h, 25Hz ou 1Hz, 250ms	Motilidade gástrica	25Hz foi mais eficiente para aumentar a motilidade gástrica, quando comparado a 1Hz
Boezaart et al.[171]	Humanos	Transcutâneo/ Esquerda e direita	Concha [não especificou]	1h, 25Hz	Covid-19	Reduziu IL-6
Guo et al.[172]	Ratos	Transcutâneo/ Esquerda e Direita	Concha [não especificou]	30min diários, 15Hz, 2mA	Depressão e Dor somática crônica	Antidepressivo e analgésico, supressão TNF

Continuação da Tabela 1

Referência	Amostra (Humano/rato/ camundongo)	Método de estimulação / orelha	Sítio de estimulação	Parâmetros de estimulação	Condição	Desfechos
Aranow et al.[173]	Humanos	Transcutâneo/ Esquerda	Concha [não especificou]	5min, 30Hz, 300µs	Lúpus eritematoso	Redução da dor, Redução de substância P, Melhorou a fadiga
Li et al.[174]	Ratos	Transcutâneo/ -	Concha cimba e concha cava	30min, 5Hz / 20Hz / 100 Hz, 2mA	Estresse crônico [leve]	Somente 20Hz demonstrou efeito antidepressivo.
Jiao et al. 2020[175]	Humanos	Transcutâneo/ -	Concha cimba e concha cava	2x/dia 30min, 20Hz e 4Hz [alternada]	Insônia	Aliviou a insônia ao longo de 4 semanas, melhorou fadiga, depressão, ansiedade e qualidade de vida
Zhang et al.[176]	Humanos	Transcutâneo/ Esquerda	Concha cimba	1Hz, 0,2ms 1,5-3mA	Enxaqueca	Reduziu a atividade de regiões de modulação da dor [locus coeruleus]

Continuação da Tabela 1.

Referência	Amostra (Humano/rato/ camundongo)	Método de estimulação / orelha	Sítio de estimulação	Parâmetros de estimulação	Condição	Desfechos
Hong et al.[177]	Camundongos	Transcutâneo/ Direita	Concha cimba e concha cava	10min, 1mA, 10Hz	Endotoxemia e pós-operatório íleo	Preveniu a inflamação intestinal sistêmica, reduziu TNF e IL-6
Li et al.[178]	Ratos	Transcutâneo/ Esquerda e Direita	Concha cimba e concha cava	30min, 2 e 15Hz, 2mA, 67 a 500ms	Neuropatia diabética	30min diário reduziu o desenvolvimento da neuropatia diabética e hipersensibilidade nociceptiva
Jiang et al.[179]	Ratos	Percutânea/ Esquerda	Concha cava	2x/dia 1h, 20Hz, 0,5mA	Isquemia artéria cerebral [AVC]	Melhorou a angiogênese neurovascular
Rong et al.[180]	Humanos	Transcutâneo/ -	Concha cimba e concha cava	2x/dia, 30min, 20Hz, 0,2ms, até 6mA	Transtorno depressivo maior	Melhora na resposta clínica até doze semanas

Continuação da Tabela 1.

Referência	Amostra (Humano/rato/ camundongo)	Método de estimulação / orelha	Sítio de estimulação	Parâmetros de estimulação	Condição	Desfechos
Ma et al.[181]	Ratos	Percutânea/ Esquerda	Concha cava	1h, 20Hz, 0,5mA	Oclusão e reperfusão da artéria cerebral média direita	Induziu a angiogênese, melhorou a recuperação motora neurológica e reduziu o volume do infarto
Straube et al.[182]	Humanos	Transcutâneo/ Esquerda	Concha [não especificou]	4h/dia 25Hz ou 1Hz, 250µs	Enxaqueca crônica	1Hz apresentou maior redução na frequência das dores de cabeça por 28 dias, quando comparado a 25Hz
Lin Han et al.[183]	Ratos	Transcutâneo/ Esquerda e Direita	Concha cimba e concha cava	30min, 2 e 15Hz, 2mA	Obesidade	Reduziu peso corporal e gordura visceral

Continuação da Tabela 1.

Referência	Amostra (Humano/rato/ camundongo)	Método de estimulação / orelha	Sítio de estimulação	Parâmetros de estimulação	Condição	Desfechos
Li et al.[184]	Ratos	Transcutâneo/ Direita	Concha [não especificou]	30min, 2 e 15Hz, 2mA	Depressão	Induziu a secreção de melatonina e apresentou efeito antidepressivo
Napadow et al.[185]	Humanos	Transcutâneo/ Esquerda	Concha cimba e concha cava	30Hz, 450µs	Dor pélvica crônica	Reduziu a ansiedade, efeito antinociceptivo
Zhao et al.[186]	Ratos	Transcutâneo/ Esquerda e Direita	Concha cimba e concha cava	20min, 1mA, 10Hz	Endotoxemia	Reduziu TNF, IL-1β, IL-6 e NF-κB em tecidos pulmonares

TNF: fator de necrose tumoral; IL-1β: interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; NF- κB: fator nuclear Kappa B.

Ainda assim, há evidências de que pontos auriculares (acupuntura) podem corresponder a área de baixa impedância[20,187] e os pontos com menor impedância foram encontrados na região A (em orelha de ratos) que corresponde a região da concha cimba em humano. Inclusive, além dos pontos identificados com menor impedância encontrados em outros locais B, C, D, (Figura 12) verificou-se que o ponto A2 reduziu o edema na pata de ratos injetados com carragenina, quando comparado ao controle[20].

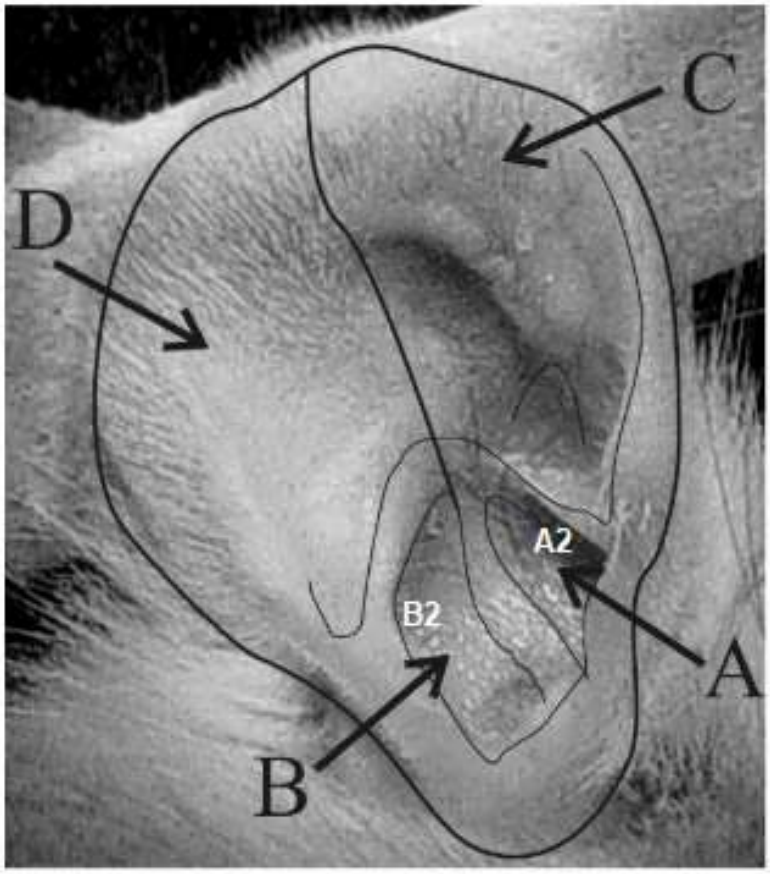


Figura 12 - Representação das áreas de superfícies da orelha de um rato.

Ilustração de dois pontos auriculares (A2, B2) em regiões distintas, que correspondem a áreas comuns na orelha humana (concha cimba e concha cava). *A: região ântero medial da concha cimba; B: região póstero-medial da concha cava; C: região póstero-lateral; D: região ântero-lateral.

Fonte: Adaptado de Chung, 2011[20].

Com isso, pesquisas tem investigado os benefícios da estimulação do NV prevenindo o desenvolvimento da inflamação por meio da ativação da via anti-inflamatória colinérgica[124,136]. Em estudo experimental em ratos, onde realizaram a estimulação elétrica do NV de forma invasiva verificaram a redução dos níveis

séricos e hepáticos de TNF, assim como atenuação da produção de citocinas inflamatórias esplênicas e plasmáticas em um modelo animal induzido por lipopolissacarídeo (LPS)[188].

A estimulação transcutânea do nervo vago (ETNV) não invasiva para o manejo da dor já tem sido descrita em alguns estudos, visto que a abordagem não invasiva tem sido realizada, de forma mais recorrente, na superfície externa do conduto auditivo onde é inervado pelo ramo auricular do NV (Figura 8)[165,189]. Os efeitos analgésicos tanto em indivíduos saudáveis, quanto em pacientes parecem ser promissores[189], como foi observado em estudo com 48 indivíduos saudáveis e tratados com a ETNV utilizando frequência de 25Hz e itensidade de 1,5mA durante 1 hora obteve-se dentre outros efeitos a redução da sensibilidade a dor mecânica[190]. Por outro lado, a ETNV com frequência de 8Hz com intensidade média de 7,6mA em 20 indivíduos saudáveis não alterou a sensibilidade ao calor[191]. A estimulação não invasiva do NV a nível cervical e auricular com frequências de 25Hz no tratamento de dores de cabeça (enxaqueca) apresentou redução da intensidade[192] e na frequência das dores de cabeça[182,193].

Ainda neste contexto, no manejo da dor através da estimulação do NV de forma invasiva tem sido utilizado em estudos de dor lombar/depressão com uso de frequência de 10Hz ou 20Hz e intensidade de até 0,75mA foi possível identificar redução da dor lombar[194]; assim como em dores de cabeça com a utilização de frequência 30Hz houve redução da dor[195]. Em indivíduos com artrite reumatóide foi realizado a estimulação do NV de forma invasiva o que levou a inibição da produção de TNF por até 84 dias após o tratamento e os escores clínicos melhoraram; entretanto 50% da amostra apresentou efeitos adversos leves a moderados associados ao implante do estimulador do NV cervical esquerdo[138], o que denota os riscos inerentes ao uso de terapias invasivas.

Com base nos estudos apresentados foi possível verificar, que o tratamento com a eletroestimulação do NV ainda necessita de melhor compreensão dos mecanismos envolvidos sobre os efeitos obtidos, bem como os parâmetros utilizados. Para isso, se faz ainda necessário entender como os parâmetros podem influenciar nos efeitos promovidos pela eletroestimulação. Estudo de Kaniusas e colaboradores[159] apresentou uma hipótese de como ocorre a modulação cerebral por estimulação elétrica do ramo auricular do NV; sugerindo que a estimulação seria capaz de substituir uma informação perdida/prejudicada devido a uma patologia de

base. Logo, estaria induzindo processos de regeneração sistêmica e recuperação da homeostase de órgãos e funções corporais.

Com base no exposto é possível verificar a importância do presente estudo, visto que a dor inflamatória persistente promove significante comprometimento para o indivíduo, assim como melhorar os parâmetros e doses quanto a frequência e tempo de eletroestimulação, sugerindo uma padronização no tratamento. Neste sentido, e dentre os aspectos de originalidade este trabalho buscou-se compreender o envolvimento da via AnxA1-FPR2/ALX periférica a partir da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV, bem como os efeitos da estimulação com frequência alternada ou randômica em diferentes tempos de estimulação, que até o nosso conhecimento ainda não foi determinado.

Ainda assim, o estudo buscou entender os efeitos da frequência randômica comparada a alternada (já descrita na literatura), verificar os efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV sobre sinais clínicos da dor inflamatória: dor (hiperalgesia mecânica), calor (temperatura de superfície da pata), edema (edema da pata), comprometimento funcional (atividade locomotora). Ainda, para melhor compreensão da via AnxA1-FPR2/ALX, foi realizado análises comportamentais/farmacológicas e bioquímicas para identificar as modificações celulares causadas pela eletroestimulação percutânea do ramo auricular NV.

Com isso, o trabalho apresenta importância não só para a comunidade e meio acadêmico, como para a literatura científica uma vez que os estudos se concentram na sua maioria na frequência alternada e os poucos estudos encontrados com frequência randômica investigam somente os efeitos a nível do SN central. Então, para responder os questionamentos e colaborar para o delineamento do estudo, a seguir serão explanados os objetivos, seguido dos métodos necessários para o andamento do estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos anti-hiperalgésico e anti-inflamatório da eletroestimulação do ramo auricular do NV e o envolvimento da via AnxA1-FPR2/ALX periférica neste efeito, em um modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Verificar o melhor parâmetro da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV (tempo e lateralidade da orelha) comparando frequência alternada *vs* randômica sobre a hiperalgesia mecânica no modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente induzida por CFA;

b) Comparar os efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV com frequência alternada *vs* randômica sobre o desenvolvimento de tolerância ao efeito anti-hiperalgésico em camundongos com hiperalgesia inflamatória persistente induzida por CFA;

c) Analisar o efeito da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* randômica no edema e temperatura de superfície da pata, no modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente induzida por CFA;

d) Avaliar o envolvimento dos receptores FPR2/ALX periféricos na anti-hiperalgesia induzida pela eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* randômica no modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente induzida por CFA;

e) Analisar os efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* randômica sobre as concentrações teciduais de citocinas em camundongos com hiperalgesia inflamatória persistente induzida por CFA;

f) Verificar os efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* randômica sobre o imunoconteúdo do receptor FPR2/ALX, AnxA1, dos fenótipos M1 e M2 de macrófagos, neutrófilos e células apoptóticas no modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente induzida por CFA.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa é caracterizada como um estudo não clínico, experimental e analítico de natureza quantitativa e qualitativa[196].

3.2 EQUIPAMENTOS, FÁRMACOS E REAGENTES

Para a realização dos experimentos foram necessários os seguintes equipamentos, substâncias e/ou drogas.

i) **Equipamentos/Softwares**: von Frey (VHF, Stoelting, Chicago USA); Micrômetro (Insize®, São Paulo, SP, Brasil); Agitador de tubos vórtex (modelo Q-220B1, Quimis, Diadema, SP, Brasil); caixa de acrílico com dimensões de 9cm x 7cm x 11cm (Alumecril, São José, SC, Brasil); caixa com dimensões de 40cm x 40cm x30 cm; Balança digital alta precisão eletrônica (Sf-400 1g a 10 Kg, Adria laboratórios, PR, Brasil); Câmera termográfica Thermal Imager (Texto 880® FLIR-E63900, T198547 com precisão de ± 2°C, resolução de 19200, 160 x 120 da FLIR Systems Suécia); Equipamento de anestesia inalatória (Scienlabor Equipamentos Industriais LTDA, Ribeirão Preto - SP), Aparelho de eletroestimulação (Modelo EL-608, NKL Produtos Eletrônicos Ltda); fotodocumentador iBright Imaging Systems (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA); programa Image Studio Lite (LI-COR, Biosciences, EUA); tela de arame com malha de 6mm (70 x 40cm); micrômetro universal digital da marca Insize (Loganville, Georgia, EUA); Graphpad Prism, versão 6.0 e 8.0 (Graphpad Software, La Jolla, CA, EUA); software ANYmaze (Stoelting, EUA).

ii) **Substâncias**: Salina (LBS Laborasa Indústria Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil); Tween (Lote 1000422, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EA), solução de cloreto de sódio 0,9% 100ml – NaCl (0800 11 6032, LBS, BR); anticorpo secundário conjugado com peroxidase (cabra anti-coelho-HRP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); anticorpo policlonal Goat anti-MMR/CD206 (AF2535, R&D Systems®, Minneapolis, EUA); anticorpo monoclonal mouse anti-

CD86 (ab213044, Abcan, Cambridge, MA, EUA), anticorpo monoclonal rabbit anti-arginase-1 (93668S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); anticorpo primário contra β-actina-HRP (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA); anti-iNOS (NOS-2) (NBP1-33780, Novus Biologicals, Centennial, CO, EUA); anticorpo monoclonal de coelho anti-AnxA1 (1:1000, v/v, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA); anticorpo primário contra FPR2/ALX (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anticorpo anti-Bax (Biolegend, EUA); membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); tampão de lise RIPA (composto por Nonidet P-40 1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); coquetel de inibidores de proteases 1% (P8340 - Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA); Salina tamponada com fosfato (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil); fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF, 0,1 mM, SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA); ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA, 10 mM); aprotinina (2 ng/ml); cloreto de benzetônio (0,1 mM); Kits de Elisa para camundongos: IL-1β (número catálogo DY401-05, R&D, EUA), IL-4 (número catálogo DY404-05, R&D, EUA), IL-6 (número catálogo DY406-05, R&D, EUA), IL-10 (número catálogo DY417, R&D, EUA); Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA) e leitor de placas (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China); Albumina de soro bovino (Inlab, São Paulo, SP, Brasil); Tween 20 (0,05%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

iii) **Drogas**: isoflurano (2-cloro-2- (difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano (Bio-Chimico, BR); xilazin 50ml - cloridrato de xilazina 2% (Syntec, São Paulo, Brasil); cetamina 50ml – cloridrato cetamin 10% (Syntec, São Paulo, Brasil); Adjuvante Completo de Freund (CFA, 50%, 20 µl/sítio), WRW4 (Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-NH2, Tocris, Bioscience, Bristol, RU).

3.3 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) e os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Neurociências Experimental (LANEX) - Campus Universitário Grande Florianópolis, Unidade Pedra Branca, Bloco I2, na UNISUL. Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (30 a 45 gramas),

obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), aclimatados a 22 ± 2 ºC, no ciclo 12 horas-claro/12 horas-escuro (claro a partir das 7h), com acesso livre a ração e água, sem enriquecimento ambiental.

No dia do experimento, os animais foram randomicamente distribuídos entre os grupos e aclimatados no laboratório por pelo menos uma hora antes dos testes sobre a bancada, ou quando em tratamento, dentro da capela de exaustão. Além disso, todos os experimentos de curva/dose e resposta foram realizados em duplicata, em 2 blocos (n = 4, para cada bloco), com a finalidade de aumentar a reprodutibilidade dos resultados.

3.3.1. Cálculo da amostra

O número de animais utilizados foram o mínimo necessário para demonstrar os efeitos obtidos pelo tratamento. Diante disso, neste estudo foi utilizado *n* = 8 animais por grupo, com base no cálculo de Daniel[197], que apresenta as seguintes equações, para a obtenção de um coeficiente de confiança de 95. Sendo assim, o cálculo utilizado para determinar o *n* = 8 por grupo:

$$\mathbf{n = \{[(z\ alfa + z\ beta) * s]/\ sigma\}^2}$$

O teste baseia-se no cálculo do intervalo de confiança da diferença entre as médias ou entre proporções (sigma), do desvio-padrão (s) do parâmetro alfa que é a probabilidade aceitável de achar uma diferença quando na verdade ela não existe (erro do Tipo I; falso verdadeiro; quanto menor for o alfa escolhido, maior será a amostra necessária) e do parâmetro beta que é o risco aceitável de estar perdendo uma diferença que realmente existe (erro do Tipo II). Segue um roteiro para o cálculo:

1. O valor de alfa será fixado em 0,05. Assim o valor de z alfa baseado na tabela de valores de z para distribuição bicaudal é 1,96.
2. O valor de beta será fixado em 0,10. Assim o valor de z beta baseado na tabela de valores de z (distribuição unicaudal) é 1,28.
3. O valor da diferença entre as médias dos grupos como sendo pelo menos 40% (baseado em dados experimentais do nosso laboratório). Experimentos biológicos têm embutido um erro da ordem de 10-15% (resultantes de variações individuais, erro no procedimento cirúrgico, erros de dosagem, etc.), diferenças entre dois

grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo podem aumentar a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II.

4. O valor do desvio padrão como sendo em média 35% do valor das médias. (baseado em dados experimentais do nosso laboratório).

Assim, aplicando os valores a fórmula acima temos:

$$n= \{[(1,96 + 1,28) * 35]/40\}^2 = \textbf{8 animais por grupo}.$$

Com isso, para garantir que os dados que foram obtidos nos experimentos sejam adequados foram necessários 8 animais por grupo.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste tópico serão descritos os experimentos e as etapas que foram necessárias para responder os objetivos específicos, bem como o objetivo geral. Ainda assim, para melhor compreensão dos experimentos, a figura 13 ilustra os testes e ensaios bioquímicos utilizados no presente estudo. Em seguida são descritas as **6 etapas** e grupos experimentais que foram utilizados.

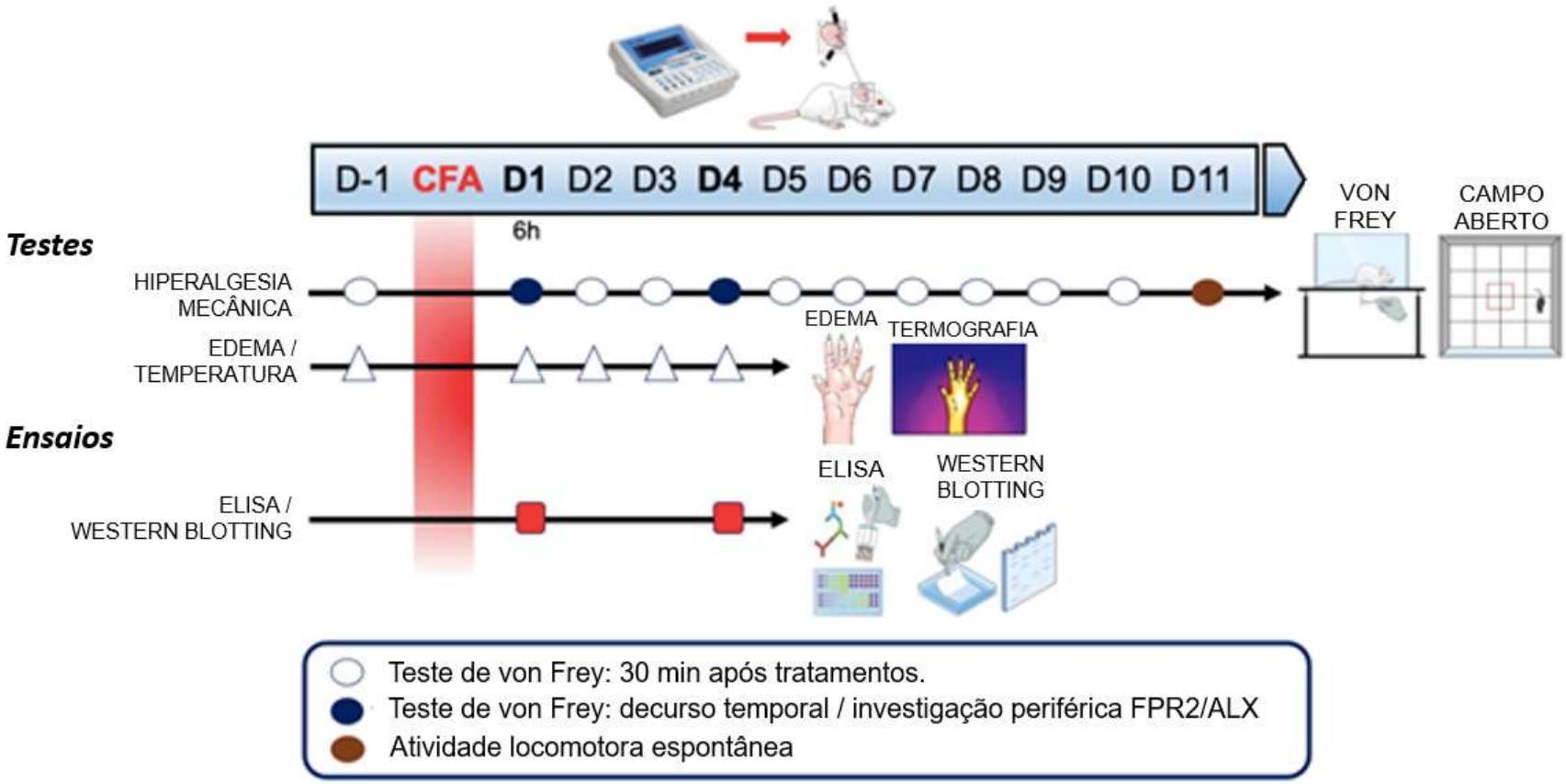


Figura 13 - Representação do delineamento do estudo.

Na figura está demonstrado os tempos dos respectivos testes e ensaios bioquímicos. CFA: adjuvante completo de *Freund*; D: dia.

Primeira etapa: Os experimentos foram realizados para investigar os melhores parâmetros de tempo (10, 20 ou 30 min) e lateralidade da orelha (direita, esquerda ou ambas) de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* frequência randômica sobre a hiperalgesia mecânica. As avaliações foram realizadas em 6 h e 96 h após a injeção de CFA na pata, sendo que a hiperalgesia foi avaliada até 4 h após tratamentos (decurso temporal). Os grupos e procedimentos estão descritos nos quadros 1-3:

Quadro 1 - Avaliação do melhor tempo de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV na orelha esquerda.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	8	CFA	Sem eletroestimulação Orelha E/30 min
2	8	CFA	Fr Randômica Orelha E/10 min
3	8	CFA	Fr Alternada Orelha E/10 min
4	8	CFA	Fr Randômica Orelha E/20 min
5	8	CFA	Fr Alternada Orelha E/20 min
6	8	CFA	Fr Randômica Orelha E/30 min
7	8	CFA	Fr Alternada Orelha E/30 min
Total de animais = 56 fêmeas.			

*Fr: frequência; N: número de animais; CFA: adjuvante completo de *Freund*; E: esquerda.

Quadro 2 - Avaliação do melhor tempo de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV na orelha direita.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	8	CFA	Sem eletroestimulação Orelha D/30 min
2	8	CFA	Fr Randômica Orelha D/10 min
3	8	CFA	Fr Alternada Orelha D/10 min
4	8	CFA	Fr Randômica Orelha D/20 min
5	8	CFA	Fr Alternada Orelha D/20 min
6	8	CFA	Fr Randômica Orelha D/30 min
7	8	CFA	Fr Alternada Orelha D/30 min
Total de animais = 56 fêmeas.			

*Fr: frequência; N: número de animais; CFA: adjuvante completo de *Freund*; D: direita.

Quadro 3 - Avaliação do melhor tempo de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV em ambas as orelhas.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	8	CFA	Sem eletroestimulação Orelha D e E /30 min
2	8	CFA	Fr Randômica Orelha D e E /10 min
3	8	CFA	Fr Alternada Orelha D e E /10 min
4	8	CFA	Fr Randômica Orelha D e E /20 min
5	8	CFA	Fr Alternada Orelha D e E /20 min
6	8	CFA	Fr Randômica Orelha D e E /30 min
7	8	CFA	Fr Alternada Orelha D e E /30 min
Total de animais = 56 fêmeas.			

*Fr: frequência; N: número de animais; CFA: adjuvante completo de *Freund*; D: direita; E: esquerda.

Neste sentido, foram necessários *n* = **168** animais fêmeas.

Segunda etapa: Os experimentos foram realizados para comparar os efeitos de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* randômica no desenvolvimento de tolerância ao efeito anti-hiperalgésico em camundongos com hiperalgesia inflamatória persistente. As avaliações foram realizadas em: basal (-1 dia) e após 6 h da injeção de CFA na pata traseira direita e então os animais foram tratados e avaliados quanto a hiperalgesia mecânica diariamente até o 10º dia, quando o efeito anti-hiperalgésico da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV cessou. No 11º dia, foi realizada avaliação da atividade locomotora desses animais 30 min após tratamentos (melhor tempo). Para isso, os grupos e procedimentos foram explanados no quadro 4:

Quadro 4 - Avaliação da tolerância anti-hiperalgésica induzida pelo tratamento com a eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV e atividade locomotora espontânea.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	8	Naive	Sem tratamento
2	8	CFA	Sem estimulação Orelha E/10 min, sendo o mesmo controle para Fr alternada e randômica
3	8	CFA	Fr Randômica Orelha E/10 min
4	8	CFA	Fr Alternada Orelha E/10 min
Total de animais = 24 fêmeas.			

*Fr = frequência; N = número de animais; CFA = adjuvante completo de *Freund*.

Neste sentido, foram necessários *n* = **24** animais fêmeas.

Terceira etapa: Os experimentos foram realizados para verificar os efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* randômica na temperatura da superfície da pata e edema. As avaliações foram realizadas em: basal (-1 dia), 6 h, 24 h, 48 h e 96 h antes e após (quarta hora) dos tratamentos, diariamente até 96 h. Para isso, os grupos e procedimentos foram explanados no quadro 5:

Quadro 5 - Avaliação do efeito do tratamento da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV na temperatura da superfície da pata e edema.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	8	Naive	Sem tratamento
2	8	CFA	Sem tratamento
3	8	CFA	Sem eletroestimulação Orelha E/10 min, sendo o mesmo controle para alternada ou randômica
4	8	CFA	Fr Randômica Orelha E/10 min
5	8	CFA	Fr Alternada Orelha E/10 min
Total de animais = 40 fêmeas.			

*Legenda: Fr = frequência; N = número de animais; CFA = adjuvante completo de *Freund.*

Neste sentido, foram necessários *n* = **40** animais fêmeas.

Quarta etapa: Os experimentos foram realizados para verificar se a eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada vs randômica apresenta efeito anti-hiperalgésico por mecanismo envolvendo ativação do receptor FPR2/ALX a nível periférico. As avaliações aconteceram em: basal (-1 dia), 6 h e 96 h após injeção de CFA na pata traseira direita. Para isso, os grupos e procedimentos foram explanados no quadro 6:

Quadro 6 - Avaliação farmacológica/comportamental do papel do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	8	CFA	Sem estimulação Orelha E/10 min, sendo o mesmo controle para Fr alternada ou Fr randômica
2	8	CFA	Sem eletroestimulação + WRW4 (10µg/20µl/ i.pl.)
3	8	CFA	Fr Alternada Orelha E/10 min
4	8	CFA	Fr Randômica Orelha E/10 min
5	8	CFA	WRW4 (10µg/20µl/ i.pl.) + Fr Alternada Orelha E/10 min
6	8	CFA	WRW4 (10µg/20µl/i.pl.) + Fr Randômica Orelha E/10 min
Total de animais = 56 fêmeas.			

*Fr = frequência; N = número de animais; CFA = adjuvante completo de *Freund*; i.pl.: intraplantar.

Para este experimento foram necessários *n* = **56** animais fêmeas.

Quinta etapa: Os experimentos foram realizados para verificar os efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* randômica sobre as concentrações teciduais de citocinas IL-1β e IL-6 nas 6h e IL-4 e IL-10 nas 96 h após injeção de CFA na pata, 30 min após tratamento. A coleta das amostras para as avaliações bioquímicas foram: pele da pata traseira direita e medula espinal. Para isso, os grupos e procedimentos foram explanados no quadro 7:

Quadro 7 - Avaliação dos efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV utilizando a frequência alternada *vs* randômica sobre as concentrações teciduais de citocinas em 6 h e 96 h após injeção CFA.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	8	Naive	Sem tratamento
2	8	CFA	Sem tratamento
3	8	CFA	Sem eletroestimulação Orelha E/10 min, sendo o mesmo controle para Fr alternada e randômica
4	8	CFA	Fr Alternada Orelha E/10 min
5	8	CFA	Fr Randômica Orelha E/10 min
Total de animais = 80 fêmeas [40 animais em cada tempo].			

*Fr = frequência; N = número; CFA = adjuvante completo de *Freund*.

Sexta etapa: Os experimentos foram realizados para verificar os efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência

alternada *vs* randômica sobre o imunoconteúdo (FPR2/ALX; AnxA1; Arg-1; NOS-2; Ly6G; CD206; CD286; Bax) em 6 h e 96 h após injeção de CFA na pata, 30 min após tratamentos. A coleta das amostras para as avaliações bioquímicas foram: pele da pata traseira direita nas 6 h e 96 h e o baço nas 96 h. Para isso, os grupos e procedimentos foram explanados no quadro 8:

Quadro 8 - Avaliação dos efeitos da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV comparando frequência alternada *vs* randômica sobre o imunoconteúdo expressão (FPR2/ALX; AnxA1; Arg-1; NOS-2; Ly6G; CD206; CD286; Bax) em 6 h e 96 h após injeção CFA.

Grupos	N	Lesão	Tratamentos
1	8	Naive	Sem tratamento
2	8	CFA	Sem tratamento
3	8	CFA	Sem eletroestimulação Orelha E/10 min, sendo o mesmo controle para Fr alternada ou randômica
4	8	CFA	Fr Alternada Orelha E/10 min
5	8	CFA	Fr Randômica Orelha E/10 min
Total de animais = 80 fêmeas [40 animais em cada tempo].			

*Fr = frequência; N = número de animais; CFA = adjuvante completo de Freund.

Por fim, foram necessários um total de **448** camundongos fêmeas, visto que foram necessárias 6 etapas e cada uma teve duas técnicas de tratamento nas análises comportamentais, assim foi possível otimizar um grupo controle para cada experimento.

3.5 TESTES

3.5.1 Modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente

A indução do modelo animal de inflamação periférica, que induz hiperalgesia inflamatória persistente, foi realizada por uma injeção i.pl. de 20 microlitros (µl) de CFA (0,5 mg) a 50% na superfície ventral da pata traseira direita do animal (Figura 14A), que por consequência produz hiperalgesia mecânica persistente[198] , conforme figura 14B.

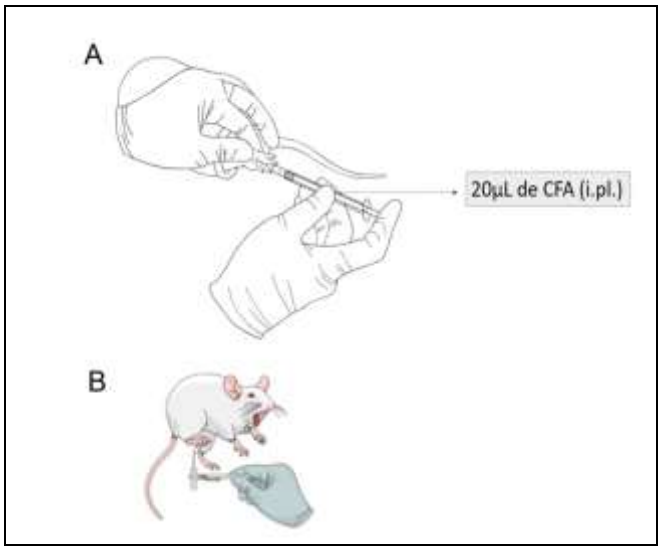


Figura 14 - Injeção intraplantar de CFA.

CFA: Adjuvante Completo de *Freund*; i.pl.: intraplantar.

3.5.2 Protocolo da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV

Os grupos de animais que receberam o tratamento com a eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV foram levemente sedados com isoflurano inalatório a 2% e oxigênio a 100%, com o auxílio de uma máscara nasal. Assim que sedados, foi realizado o agulhamento (0,18 mm x 8 mm) na orelha direita ou esquerda ou ambas na região A2, B2 da cavidade da concha[20], conforme figuras 12 e 15. Cada agulha foi conectada a um cabo do aparelho de eletroestimulação da marca NKL modelo 608. As duas programações de estímulo utilizadas foram: (1) Frequência alternada (mista) entre F1 e F2 e (2) Frequência aleatorizada em um intervalo entre F1 e F2.

Na frequência alternada, F1 consiste em estímulo de 2 Hz mantido durante 5 segundos e F2 consiste em estímulo de 10 Hz mantido durante 5 segundos (parâmetros detalhados de programação do aparelho: estimulação tipo avançada; Frequência de F1 = 2 Hz; não polarizado, Largura de pulso de F1: 700 microssegundos (µs); Tempo "*on*" de F1: 5 segundos; Tempo de repouso de F1: 0 segundo e F2 = 10 Hz; não polarizado; Largura de pulso de F2: 200 µs; Tempo "*on*" de F2: 5 segundos; Tempo de repouso de F2: 0 segundo).

Na frequência randômica os estímulos programados variam em frequências randômicas em um intervalo estabelecido entre 2 Hz a 10 Hz (parâmetros detalhados de programação do aparelho: estimulação do tipo avançada;

Frequência de F1 = 2 Hz; Frequência de F2 = 10 Hz; forma de pulso não polarizado; largura de pulso: 200 µs. Em ambas as programações de frequência alternada ou randômica a morfologia de pulso é do tipo bifásica alternada[154].

Os tempos de tratamentos foram 10, 20 e 30 min[33,199] e a intensidade foi de 0,8 mA tanto para o tratamento com a frequência alternada, quanto com a frequência randômica. O grupo controle da intervenção passou pelos mesmos procedimentos de preparo, sedação e inserção de agulha nos mesmos pontos auriculares, contudo não foi realizada a eletroestimulação do controle.

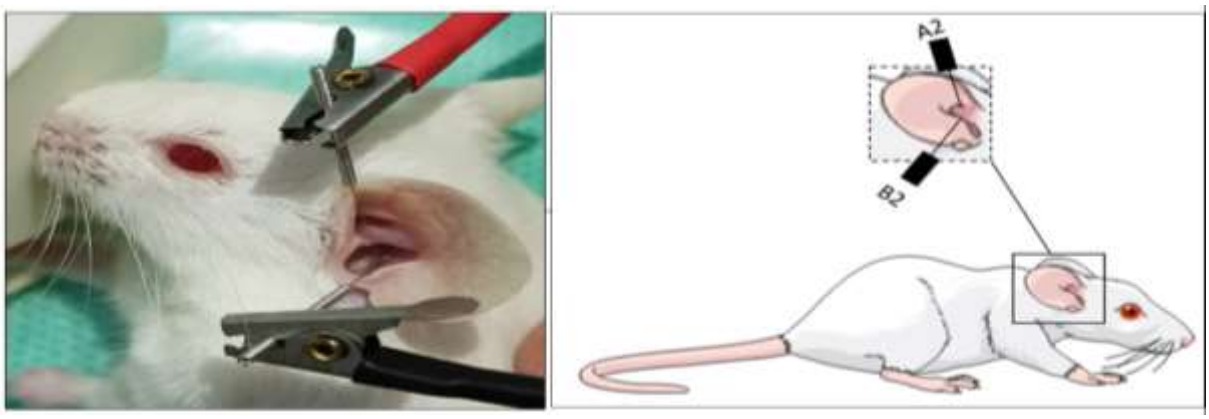


Figura 15 - Ponto de estimulação do nervo vago.
Encontra-se na região da concha auricular em duas áreas distintas (A2 e B2).

3.6 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS

3.6.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando um monofilamento de von Frey (vF) (0,6 g) conforme descrito por Martins e colaboradores[200]. Para aplicação do teste, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação de acrílico (9 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre uma plataforma de tela de arame com malha de 6 mm (70 x 40 cm), conforme figura 16. A frequência de resposta de retirada da pata traseira direita foi expressa em valores percentuais (até 100%) e interpretada como comportamento nociceptivo. As avaliações foram realizadas nos tempos descritos anteriormente na figura 13 (curva dose resposta, tolerância e mecanismo periférico).

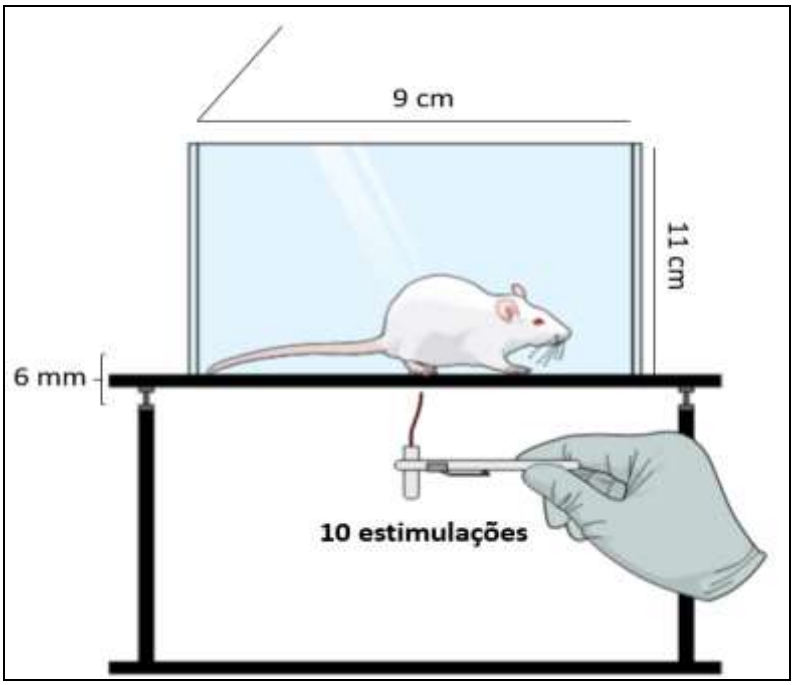


Figura 16 - Avaliação da hiperalgesia mecânica.

3.6.2 Avaliação da temperatura da superfície da pata

A temperatura da superfície ventral da pata traseira direita dos animais foi avaliada por meio de uma câmera termográfica (Figura 17) com precisão de ± 0,1°C e intervalo de espectro do infravermelho de 7,5 a 13 m. Ainda assim, foi utilizado paleta fria / quente com variação de temperatura entre 20 a 40 °C. O resultado foi expresso conforme o valor obtido com a mensuração na região central da superfície ventral da pata traseira direita de cada animal[33,201]. As avaliações foram realizadas nos tempos descritos anteriormente na figura 13.

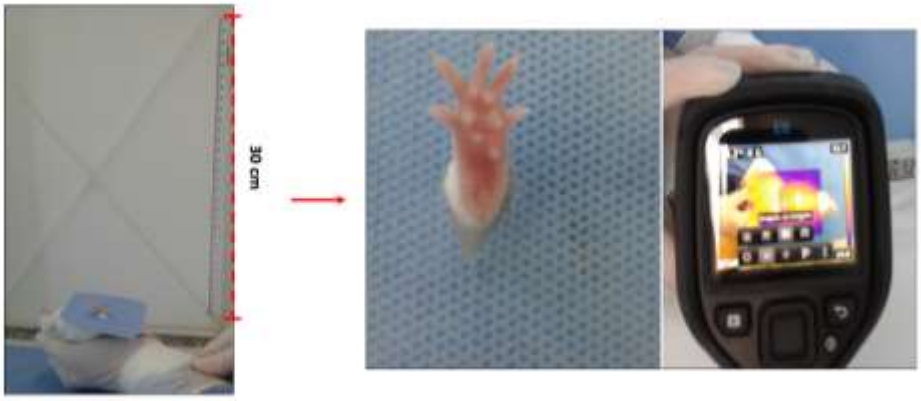


Figura 17 - Avaliação da temperatura de superfície da pata.

3.6.3 Avaliação do edema da pata

A avaliação do edema foi realizada através da mensuração da espessura da pata direita (porção medial) por meio de um micrômetro digital[33], conforme figura 18. Os valores foram expressos conforme o valor bruto obtido com a mensuração na região mencionada da pata traseira direita de cada animal. As avaliações foram realizadas nos tempos descritos anteriormente na figura 13.

Figura 18 - Avaliação do edema da pata.

3.6.4 Avaliação da atividade locomotora espontânea em um modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente

A atividade locomotora espontânea, assim como: entradas no centro e tempo gasto no centro do aparato e velocidade máxima foram registradas no 11º dia após a última intervenção do experimento da tolerância, onde por um período de 5 minutos os animais foram alocados em um recipiente quadrado com as seguintes dimensões 40 cm x 40 cm x 40 cm[202]. Ainda assim, a distância total percorrida, o tempo total gasto na área central [20 cm x 20 cm] em um número de entradas na zona central e velocidade máxima foi mensurada através software ANYmaze (Stoelting, EUA). O aparato era higienizado com solução etanol (10%) a cada troca dos animais com o intuito de minimizar as possíveis pistas induzidas pelos odores dos animais, conforme figura 19[203].

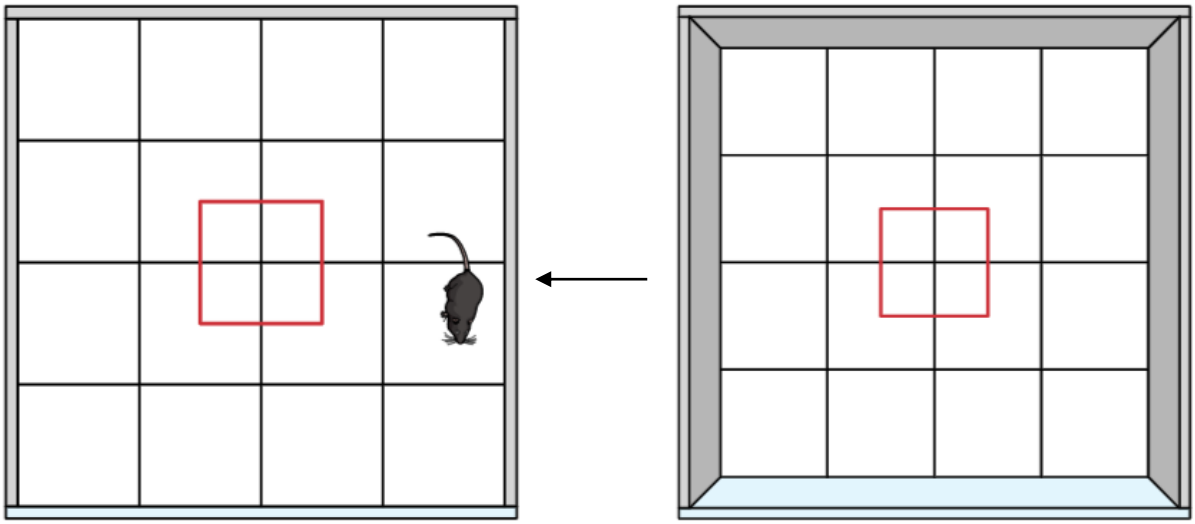


Figura 19 – Avaliação da atividade locomotora espontânea.

3.6.5 Investigação do envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico produzido pela eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV em um modelo animal de hiperalgesia inflamatória

A participação do receptor FPR2/ALX periférico no efeito anti-hiperalgésico produzido pelo tratamento com eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV foi realizada em 6h e 96 h após a injeção do CFA na pata traseira direita dos camundongos. A curva das doses do antagonista WRW4 (periférico) no modelo de CFA na pata foram estabelecidas previamente[204]. Inicialmente, os animais foram pré-tratados via i.pl. com WRW4 (antagonista para o receptor FPR2/ALX) na dose de 10µg/20µl/sítio; enquanto o controle foi pré-tratado com salina (20 µl/sítio.). Logo após 15 min dos pré-tratamentos, os animais receberam o tratamento com a eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV e foi avaliada a hiperalgesia mecânica após 30 min dos tratamentos.

3.6.6 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Amostras dos tecidos foram coletadas no primeiro dia (6 h) ou quarto dia (96 h) após a injeção de CFA e 30 min após o término dos tratamentos (Figura 13). Todos os animais dos diferentes grupos foram submetidos a morte indolor assistida (MIA). Em seguida foi coletado as amostras da pele da pata traseira direita e medula espinal (segmento L3-L5) dos animais. As amostras foram coletadas em tubos de 2

mL, para serem armazenadas no freezer - 80 ºC até a realização das análises por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Posteriormente as amostras foram pulverizadas por congelamento em nitrogênio líquido, trituradas com pistilo e incubadas em tampão de lise por 30 min, contendo o tampão de LISE e as amostras foram centrifugadas para a coleta do sobrenadante e foi utilizado 100 µL pra dosagem. O método de Bradford[205] foi utilizado para quantificar a proteína total da amostra, utilizando uma curva padrão de calibração com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL). Então, alíquotas de 100 µL foram utilizadas para mensurar as concentrações teciduais de IL-6 e IL-1β (6 h) IL-10 e IL-4 (96 h) por meio de Kits de ELISA para camundongos. Os valores obtidos foram estimados por meio de uma curva padrão (ensaio colorimétrico) mensurado a 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em picogramas/mg de proteína[206].

3.6.7 Análise do imunoconteúdo do receptor FPR2/ALX, AnxA1, macrófago M1 e M2, neutrófilos e células apoptóticas por imunoeletroforese - *Western Blotting*

Amostras dos tecidos foram coletadas no primeiro dia (6h) ou quarto dia (96h) após a injeção de CFA e 30 minutos após o término dos tratamentos. As amostras foram pulverizadas e incubadas em tampão de lise (100 mM Na2VO4, 100 mM fenilmetilsulfonil fluoreto e um coquetel de inibidor de protease a 1%) com T-Per e, em seguida, incubados em gelo por 30 min. Após centrifugação a 6000 ×g por 20 min (4°C) o sobrenadante foi recolhido, separado e armazenado e freezer -80 °C. O conteúdo proteico foi mensurado pelo método de Bradford[207], utilizando uma curva padrão de calibração com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL). Alíquotas de proteína total (50 µg) foram fervidas a 95°C por 5min em 25% do volume em tampão Laemmli (fosfato de sódio 1M pH 7,0, 10% Docecil Sulfato de Sódio (SDS), 10% β-mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) em voltagem constante de 90 V por 2 h. Depois de uma hora de bloqueio com 5% de leite desnatado (Molico) as membranas foram incubadas overnight (4 °C) com os seguintes anticorpos primários: anti-AnxA1 (1:1000, v/v); FPR2/ALX (1:500); anti-Bax

(1:1000); anti-arginase-1 (1:1000); anti-CD86 (1:1000); anti-MMR/CD206 (1:1000); anti-Ly-6G (1:1000); anti-iNOS (NOS-2, 1:2000); anti-β-actina-HRP (1:45000). Após o período de incubação as membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:10000) (exceto para anti-actina-HRP) durante 1h em temperatura ambiente. Após esse período, uma nova lavagem de 30 min com TBS-T foi realizada, seguida pela exposição das membranas ao kit de quimiluminescência (ECL) e reveladas através de um fotodocumentador. As análises semi-quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa *Image Studio Lite*. Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a β-actina e expressos graficamente como unidades arbitrárias (UA).

3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 9 – Variáveis de estudo experimental.

Variáveis	**Tipo**	**Natureza**	**Proposta de utilização**
CFA (modelo de hiperalgesia inflamatória persistente)	Independente	Qualitativa nominal	Sim ou Não (induz ou não induz)
Frequência de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV (tratamento)	Independente	Quantitativa continua	Frequência alternada e randômica Sim ou Não
Tempo de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV (tratamento)	Independente	Quantitativa continua	10, 20 e 30 min Sim ou Não
Lateralidade da orelha de eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV (tratamento)	Independente	Quantitativa continua	Orelha Direita, Orelha Esquerda ou ambas as orelhas Sim ou Não
WRW4 (envolvimento do receptor FPR2/ALX - tratamento)	Independente	Qualitativa nominal	Sim ou não
Frequência de resposta de retirada da pata ao estímulo mecânico	Dependente	Quantitativa continua	Porcentagem da frequência de resposta (%)

(hiperalgesia mecânica)			(média ± desvio padrão)
Temperatura de superfície da pata	Dependente	Quantitativa continua	(°C) Média ± Desvio padrão
Edema de pata	Dependente	Quantitativa continua	Espessura da pata (µm) Média ± Desvio padrão
Atividade locomotora espontânea, entradas no centro e tempo gasto no centro do aparato e velocidade máxima	Dependente	Quantitativa Discreta	Velocidade máxima (m/s), entradas no centro (números), tempo gasto no centro (s), total de distância percorrida (m) Média ± Desvio padrão
Concentração de citocinas (IL-1β, IL-4, IL-6 e IL-10)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	pg/mg de proteína Média ± Desvio padrão
Imunoconteúdo de AnxA1 e do receptor FPR2/ALX	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Unidade arbitrárias. Média ± Desvio padrão
Imunoconteúdo dos marcadores para macrófagos M1 (NOS-2 e CD86)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Unidade arbitrárias. Média ± Desvio padrão
Imunoconteúdo dos marcadores para macrófagos M2 (CD206 e arginase-1)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Unidade arbitrárias. Média ± Desvio padrão
Imunoconteúdo do marcador Apoptose (BAX)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Unidade arbitrárias. Média ± Desvio padrão

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram analisados e utilizado o programa estatístico GraphPadPrism (versão 6.0 e 8.0, La Jolla, Califórnia, EUA). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e os dados foram identificados como paramétricos. Os dados foram apresentados como Média ± Desvio Padrão e comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via (dados da

atividade locomotora espontânea, citocinas, western blotting) ou duas vias (dados das curvas de tratamento da eletroestimulação percutânea do ramo auricular do NV e tolerância, edema, temperatura da superfície da pata, mecanismo periférico) seguido pelo teste de Bonferroni ou Tukey. Na comparação entre os grupos CFA e salina foi utilizado o teste t não pareado (citocinas e western blotting). Em todas as análises, valores de *P* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi submetido ao Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) e aprovado sob o número de protocolo 18.048.2.07.IV e 20.007.4.08.IV. Todos os experimentos realizados estavam de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório, bem como o guia de ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes[208]. O uso dos animais foram os mínimos possíveis, bem como a intensidade dos estímulos expostos durante os tratamentos e avaliações. Todos os animais foram submetidos a MIA, por um profissional habilitado (Médico Veterinário responsável pelo Biotério Experimental do LaNeX, Geraldo Jorge Severgnini Bernardes, CRMV/SC 0452) ao final dos experimentos, conforme as disposições da resolução número 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) de 12 de maio de 2012, assim como da Instrução Normativa número 13 – Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) de 20 de setembro de 2013. O método utilizado foi por meio de uma overdose anestésica (cloridrato de xilazina 30 mg/kg associado a cloridrato de cetamina 150 mg/kg pela via intraperitoneal) seguida de aplicação de solução eutanásica T61®, por via intraperitoneal. Após a MIA dos animais, as carcaças foram armazenadas no freezer -20°C do LaNeX até a coleta das mesmas pela empresa responsável (Ecoeficiência).

Ao longo dos experimentos foram respeitados todos os preceitos éticos, de acordo com o protocolo (RN 30 de 02/02/2016 do CONCEA). Foram utilizados o mínimo de animais, por meio de diferentes estratégias: utilizar um mesmo grupo de animais para realizar outros testes, sem que isso interferisse na fidedignidade dos resultados ou provocasse distresse e dor em demasia aos animais. Além disso, o modelo de dor da proposta do estudo apresenta outro ponto positivo, que se dá pela

condução breve das avaliações e tratamentos após a indução do modelo, o que reduz o sofrimento dos animais.

Ainda assim, foi garantido a capacidade técnica e competência de todos os envolvidos no processo de execução dos experimentos, bem como o cuidado no manejo diário dos animais no biotério, sempre com acesso livre a água e ração. Portanto, ao final dos experimentos foram utilizados métodos apropriados e rápido encaminhamento para os profissionais habilitados executarem a MIA. Neste sentido, os envolvidos na proposta foram diariamente assegurando com rigorosidade os preceitos básicos dos pontos humanitários em resguardar o mínimo de dor possível, assim como reduzir os níveis de estresse e distresse. Por isso, a qualquer momento que fosse verificado qualquer sinal dos animais como (imobilidade, incapacidade de ingesta de água/ração, lesão epidérmica, crises convulsivas ou vocalização sem ser estimulados) os animais foram descontinuados do estudo e encaminhados para MIA.

4. ARTIGO

O artigo da tese foi submetido para a revista *The Journal of Pain*. O fator de impacto da revista é 5.82 e na área de Medicina II é Qualis/CAPES A1. O artigo está formatado, conforme as normas da revista neste link: https://www.elsevier.com/journals/the-journal-of-pain/1526-5900/guide-for-authors

Evidence for a role of peripheral annexin A1-formyl peptide receptor 2/ALX pathway on antihyperalgesic effect from percutaneous electrical stimulation of the auricular branch vagus nerve in a mouse model of persistent inflammatory hyperalgesia

Daiana C. Salm[a,b]; Verônica V. Horewicz[a,b]; Fernanda Tanaka[a,c]; Júlia F. Koerich[a]; Bruna H. de Oliveira[a,b]; Julia Maio[a]; Nathalia N. Donatello[a,b]; Daniela D. Ludtke[a,b]; Leidiane Mazzardo-Martins[a,c]; Aline R. Dutra[a]; Josiel M. Mack[a]; Deborah de C. H. Kunzler[d]; Eduardo C. Ferreira[e]; Afonso S. I. Salgado[f]; Edsel B. Bittencourt[g]; Gianluca Bianco[g,h]; Anna Paula Piovezan[a,b]; Franciane Bobinski[a,b]; Ari O. O. Moré[a,i]; Daniel F. Martins[a,b,*]

[a]Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of South Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil
[b]Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil
[c]Postgraduate Program in Neuroscience, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil
[d]Department of Physiotherapy, State University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil
[e]Federal Institute of Santa Catarina, Campus Garopaba, Santa Catarina, Brazil
[f]Natural Quanta Wellness Center, Windermere-FL, USA.
[g]Coastal Health Institute, Central Parkway Suite 201, Jacksonville, FL, USA
[h]Research Laboratory of Posturology and Neuromodulation RELPON, Department of Human Neuroscience, Sapienza University, Rome, Italy
[i]Istituto di Formazione in Agopuntura e Neuromodulazione IFAN, Rome, Italy
[j]Integrative Medicine and Acupuncture Division, University Hospital, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

*** Corresponding author:**
Corresponding Author: Daniel F. Martins, PT, PhD.
Experimental Neuroscience Laboratory, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil.
Telephone: +55 48 3279-1144
E-mail: danielmartinsfisio@hotmail.com;
daniel.f.martins@institutoanimaeducacao.org.br

Abstract

This study evaluated the antihyperalgesic and anti-inflammatory effects of percutaneous vagus nerve electrical stimulation (pVNS) by comparing the effects of alternating and random frequencies in an animal model of persistent inflammatory hyperalgesia. The model was induced by Freund's Complete Adjuvant (CFA) intraplantar (i.pl.) injection. Mice were treated with different protocols of time (10, 20 or 30min), ear laterality (right, left or both) and frequency (alternating or random). Mechanical hyperalgesia was evaluated, and some groups received i.pl. WRW4 (FPR2/ALX antagonist) to determine the involvement. Edema, paw surface temperature and spontaneous locomotor activity were evaluated. Interleukin 1β, IL-6, IL-10 and IL4 levels were verified by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. AnxA1, FPR2/ALX, neutrophil, macrophage and apoptotic cells markers were identified using Western blot. The anti-hyperalgesic effect pVNS with alternating and random frequency effect is depending on the type of frequency, time and ear treated. The pVNS random frequency in the left ear for 10min had a longer lasting antihyperalgesic effect, superior to classical stimulation using alternating frequency and the FPR2/ALX receptor was involved in this effect. There was a reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines and an increase in the immunocontent of AnxA1 and CD86 in mice paw.

Perspective: pVNS with a random frequency in the left ear for 10min showed to be optimal for inducing an antihyperalgesic effect. Thus, the random frequency was more effective than the alternating frequency. Therefore, pVNS may be an important adjunctive treatment for persistent inflammatory pain.

Keywords: Electrical stimulation; Inflammation; Vagus nerve; Annexin; Hyperalgesia.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, sobre a eletroestimulação do ramo auricular do NV, os achados do presente estudo sugerem que:

1) A frequência randômica por 10min na orelha esquerda apresentou efeito anti-hiperalgésico mais duradouro, sendo superior a frequência alternada.
2) As frequências alternada e randômica induziram tolerância anti-hiperalgésica até o nono dia após injeção do CFA.
3) Houve redução do edema no terceiro dia com o tratamento apenas da frequência alternada.
4) Houve redução da temperatura da pata nas 48h tanto na frequência alternada, quanto randômica.
5) Não houve comprometimento funcional motor após o tratamento diário nos camundongos tratados diariamente com eletroestimulação do ramo auricular do NV.
6) A via AnxA1-FPR2/ALX periférica parece estar envolvida no efeito tanto na eletroestimulação do ramo auricular do NV com corrente alternada, quanto randômica.
7) Houve o aumento do imunoconteúdo de AnxA1 na pele da pata nas 6h e 96h, apenas na frequência randômica por 10min na orelha esquerda.
8) Houve o aumento do imunoconteúdo de fenótipo M1 de macrófago nas 6h tanto na frequência alternada, quanto randômica.
9) Houve redução de citocinas pró-inflamatórios na pele da pata nas 6h e 96h quando tratadas com a frequência randômica por 10min na orelha esquerda.

Desta forma, as contribuições deste estudo são importantes não só para melhorar o suporte científico acerca do tema, mas para padronizar e propiciar maior segurança na aplicação prática desta terapia, que já tem sido amplamente utilizada na clínica. Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos relacionados a mecanismos periféricos e efeitos obtidos quanto aos diferentes parâmetros utilizados como: tempo, localização do ponto e lateralidade da orelha. Ainda assim, é importante que estudos futuros possam ser realizados como ensaios clínicos, com o intuito da melhorar compreensão desses achados em humanos, bem como avaliar os efeitos pró-resolutivos da eletroestimulação do ramo auricular do NV na dor inflamatória persistente.

REFERÊNCIAS

1. Headland SE, Norling L V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. Semin Immunol [Internet]. 2015;27(3):149–60. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014
2. Barton GM, Barton GM. A calculated response : control of inflammation by the innate immune system Find the latest version : Review series A calculated response : control of inflammation by the innate immune system. 2008;118(2):413–20.
3. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. Periodontol 2000. 2013;63(1):149–64.
4. Rasmussen SE, Pfeiffer-Jensen M, Drewes AM, Farmer AD, Deleuran BW, Stengaard-Pedersen K, et al. Vagal influences in rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 2017 Jan 2;47(1):1–11.
5. Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPJG. Osteoarthritis: An update with relevance for clinical practice. Lancet. 2011;377(9783):2115–26.
6. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2010;6(11):625–35. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.159
7. Goldring MB, Berenbaum F. Emerging targets in osteoarthritis therapy. Curr Opin Pharmacol. 2015 Jun 1;22:51–63.
8. Lamer TJ, Deer TR, Hayek SM. Advanced Innovations for Pain. Mayo Clin Proc [Internet]. 2016;91(2):246–58. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.12.001
9. Leder D. The Experiential Paradoxes of Pain. J Med Philos (United Kingdom). 2016;41(5):444–60.
10. Mercante B, Ginatempo F, Manca A, Melis F, Enrico P, Deriu F. Anatomo-Physiologic Basis for Auricular Stimulation. Med Acupunct. 2018 Jun 1;30(3):141–50.
11. Kuwabara S, Goggins E, Tanaka S. Neuroimmune Circuits Activated by Vagus Nerve Stimulation. Nephron. 2021;
12. Kox M, van Eijk LT, Verhaak T, Frenzel T, Kiers HD, Gerretsen J, et al. Transvenous vagus nerve stimulation does not modulate the innate immune response during experimental human endotoxemia: A randomized controlled

study. Arthritis Res Ther [Internet]. 2015;17(1):1–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0667-5

13. Ness TJ, Fillingim RB, Randich A, Backensto EM, Faught E. Low intensity vagal nerve stimulation lowers human thermal pain thresholds. Pain. 2000;86(1–2):81–5.
14. La Marca R, Nedeljkovic M, Yuan L, Maercker A, Ehlert U. Effects of auricular electrical stimulation on vagal activity in healthy men: Evidence from a three-armed randomized trial. Clin Sci. 2010;118(8):537–46.
15. Laqua R, Leutzow B, Wendt M, Usichenko T. Transcutaneous vagal nerve stimulation may elicit anti- and pro-nociceptive effects under experimentally-induced pain - A crossover placebo-controlled investigation. Auton Neurosci Basic Clin [Internet]. 2014;185:120–2. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2014.07.008
16. Bauer S, Baier H, Baumgartner C, Bohlmann K, Fauser S, Graf W, et al. Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation (tVNS) for Treatment of Drug-Resistant Epilepsy: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial (cMPsE02). Brain Stimul. 2016 May 1;9(3):356–63.
17. Goadsby PJ, de Coo IF, Silver N, Tyagi A, Ahmed F, Gaul C, et al. Non-invasive vagus nerve stimulation for the acute treatment of episodic and chronic cluster headache: A randomized, double-blind, sham-controlled ACT2 study. Cephalalgia. 2018;38(5):959–69.
18. Trimboli M, Al-Kaisy A, Andreou AP, Murphy M, Lambru G. Non-invasive vagus nerve stimulation for the management of refractory primary chronic headaches: A real-world experience. Cephalalgia. 2018;38(7):1276–85.
19. Grazzi L, Tassorelli C, De Tommaso M, Pierangeli G, Martelletti P, Rainero I, et al. The practical and clinical utility of non-invasive vagus nerve stimulation (nVNS) as an acute treatment for episodic migraine: a post hoc analysis of the randomised sham-controlled PRESTO trial. J Headache Pain [Internet]. 2018;19(Supplement 1) (no pagination):1–9. Available from: https://www.cochranelibrary.com/central/doi/10.1002/central/CN-01653051/full
20. Chung WY, Qi Zhang H, Ping Zhang S. Peripheral muscarinic receptors mediate the anti-inflammatory effects of auricular acupuncture. Chin Med [Internet]. 2011;6(3):1–8. Available from: http://www.cmjournal.org/content/6/1/3

21. Kaddumi EG. Cervical vagotomy increased the distal colon distention to urinary bladder inhibitory reflex in male rats. Clin Auton Res. 2016;26(1):33–9.
22. Mirakaj V, Dalli J, Granja T, Rosenberger P, Serhan CN. Vagus nerve controls resolution and pro-resolving mediators of inflammation. J Exp Med. 2014;211(6):1037–48.
23. Dalli J, Serhan CN. Pro-resolving mediators in regulating and conferring macrophage function. Front Immunol. 2017;8(NOV):1–9.
24. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: What controls its onset? Front Immunol. 2016;7(APR).
25. Das UN. Can vagus nerve stimulation halt or ameliorate rheumatoid arthritis and lupus? Lipids Health Dis [Internet]. 2011;10(1):19. Available from: http://www.lipidworld.com/content/10/1/19
26. Fleshner M, Goehler LE, Schwartz BA, McGorry M, Martin D, Maier SF, et al. Thermogenic and corticosterone responses to intravenous cytokines (IL- 1β and TNF-α) are attenuated by subdiaphragmatic vagotomy. J Neuroimmunol. 1998;86(2):134–41.
27. Wieczorek M, Swiergiel AH, Pournajafi-Nazarloo H, Dunn AJ. Physiological and behavioral responses to interleukin-1β and LPS in vagotomized mice. Physiol Behav. 2005;85(4):500–11.
28. Goulding NJ, Godolphin JL, Sharland PR, Maddison PJ, Sampson M, Peers SH, et al. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. Lancet. 1990;335(8703):1416–8.
29. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. 2009;9(1):62–70.
30. Gilmour JS, Coutinho AE, Cailhier J-F, Man TY, Clay M, Thomas G, et al. Local Amplification of Glucocorticoids by 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Promotes Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Leukocytes. J Immunol. 2006;176(12):7605–11.
31. Hubacher J, Niemtzow RC, Corradino MD, Dunn JCY, Ha DH. Standards for Reporting Electroacupuncture Parameters. Med Acupunct. 2016;28(5):249–55.
32. Ha GE, Cheong E. Spike frequency adaptation in neurons of the central nervous system. Exp Neurobiol. 2017;26(4):179–85.
33. Mazzardo-Martins L, Salm DC, Winkelmann-Duarte EC, Ferreira JK, Lüdtke DD, Frech KP, et al. Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect

through endothelin-B receptor in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2018;470(12).

34. Zhang Y, Zhang RX, Zhang M, Shen XY, Li A, Xin J, et al. Electroacupuncture inhibition of hyperalgesia in an inflammatory pain rat model: Involvement of distinct spinal serotonin and norepinephrine receptor subtypes. Br J Anaesth. 2012;109(2):245–52.
35. Morales-Quezada L, Leite J, Carvalho S, Castillo-Saavedra L, Cosmo C, Fregni F. Behavioral effects of transcranial pulsed current stimulation (tPCS): Speed-accuracy tradeoff in attention switching task. Neurosci Res [Internet]. 2016;109:48–53. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2016.01.009
36. Morales-Quezada L, Castillo-Saavedra L, Cosmo C, Doruk D, Sharaf I, Malavera A, et al. Optimal random frequency range in transcranial pulsed current stimulation indexed by quantitative electroencephalography. Neuroreport. 2015;26(13):747–52.
37. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: The role and consequences. Neurosci Res [Internet]. 2014;79(1):1–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004
38. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008;454(7203):428–35.
39. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Cell. 2010;140(6):771–6.
40. Rittner HL, Brack A, Machekska H, Mousa S, Bauer M, Shafer M, et al. Opioid Peptide – expressing Leukocytes. Anesthesiology. 2001;95(2):500–8.
41. Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. J Neurosci. 1999;19(6):2181–6.
42. Ronchetti S, Migliorati G, Delfino D V. Association of inflammatory mediators with pain perception. Biomed Pharmacother. 2017;96(August):1445–52.
43. Inglis JJ, Nissim A, Lees DM, Hunt SP, Chernajovsky Y, Kidd BL. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. Arthritis Res Ther. 2005;7(4):807–16.
44. Fonseca JE, Santos MJ, Canhão H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in

systemic inflammation and joint destruction. Autoimmun Rev [Internet]. 2009;8(7):538–42. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2009.01.012

45. Choy EH PG. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. New England Journal of Medicine 344: 907-916. N Engl J Med. 2001;344(12):907–16.
46. Rossato MF, Hoffmeister C, Tonello R, de Oliveira Ferreira AP, Ferreira J. Anti-inflammatory Effects of Vitamin E on Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. Inflammation. 2015;38(2):606–15.
47. Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: Peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. Neurosci Lett. 2004;361(1–3):184–7.
48. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. Int Anesth Clin. 2007;69(2):482–9.
49. Cunha TM, Verri WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(5):1755–60.
50. Nathan C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. Nat Rev Immunol. 2006;6(3):173–82.
51. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, Lau D, Mollnau H, Ortak M, et al. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. Free Radic Biol Med. 2004;37(6):902–11.
52. Bailey PJ, Sturm A, Lopez-Ramos B. A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. Biochem Pharmacol. 1982;31(7):1213–8.
53. El Kebir D, József L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. Circ Res. 2008;103(4):352–9.
54. Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. Autoimmun Rev [Internet]. 2010;9(8):531–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2009.12.013
55. Pruchniak MP, Arazna M, Demkow U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. Respir Physiol Neurobiol [Internet]. 2013;187(1):68–73. Available from:

http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.02.023

56. Wang J, Arase H. Regulation of immune responses by neutrophils. Ann N Y Acad Sci. 2014;1319(1):66–81.
57. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: An integrated view. EMBO Mol Med. 2013;5(5):661–74.
58. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. Nat Rev Immunol. 2002;2(12):965–75.
59. Schindl MJ, Millar AM, Redhead DN, Fearon KCH, Ross JA, Dejong CHC, et al. The adaptive response of the reticuloendothelial system to major liver resection in humans. Ann Surg. 2006;243(4):507–14.
60. Erwig LP, Henson PM. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. Am J Pathol [Internet]. 2007;171(1):2–8. Available from: http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.070135
61. Huynh MLN, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-β1 secretion and the resolution of inflammation. J Clin Invest. 2002;109(1):41–50.
62. Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LP. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. J Immunol Res. 2016;2016.
63. Spector WG, Willoughby DA. The inflammatory response. Bacteriol Rev. 1963;27:117–54.
64. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, Neill L a JO, et al. Resolution of inflammation : state of the art , definitions and terms. FASEB J. 2007;21(2):325–32.
65. Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2005;73(3–4):141–62.
66. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. Nature. 2007;447(7146):869–74.
67. Gudernatsch V, Stefańczyk SA, Mirakaj V. Novel Resolution Mediators of Severe Systemic Inflammation . ImmunoTargets Ther. 2020;Volume 9:31–41.
68. Titos E, Rius B, González-Périz A, López-Vicario C, Morán-Salvador E,

Martínez-Clemente M, et al. Resolvin D1 and Its Precursor Docosahexaenoic Acid Promote Resolution of Adipose Tissue Inflammation by Eliciting Macrophage Polarization toward an M2-Like Phenotype. J Immunol. 2011;187(10):5408–18.

69. Mills CD. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. Crit Rev Immunol. 2012;32(6):463–88.
70. Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: The chicken and the egg of immunity. J Innate Immun. 2014;6(6):716–26.
71. Wang J, Lu S, Yang F, Guo Y, Chen Z, Yu N, et al. The role of macrophage polarization and associated mechanisms in regulating the anti-inflammatory action of acupuncture: a literature review and perspectives. Chinese Med (United Kingdom) [Internet]. 2021;16(1):1–16. Available from: https://doi.org/10.1186/s13020-021-00466-7
72. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2005;5(12):953–64.
73. Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol. 2003;3(1):23–35.
74. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. Immunity [Internet]. 2010;32(5):593–604. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007
75. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. Bioscience [Internet]. 2008;13(4):453–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981560
76. Verreck FAW, De Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(13):4560–5.
77. Arkhipov SA, Shkurupy VA, Akhramenko ES, Solomatina M V., Iljine DA. In vitro study of phenotypical characteristics of BCG granuloma macrophages over the course of granuloma development. Bull Exp Biol Med. 2013;155(5):655–8.
78. Anower AKMM, Shim JA, Choi B, Kwon HJ, Sohn S. The role of classical and alternative macrophages in the immunopathogenesis of herpes simplex virus-induced inflammation in a mouse model. J Dermatol Sci [Internet].

2014;73(3):198–208. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.11.001

79. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. J Exp Med. 1992;176(1):287–92.
80. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. Nat Rev Immunol [Internet]. 2011;11(11):750–61. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nri3088
81. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting Edge: Lipoxins Rapidly Stimulate Nonphlogistic Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Monocyte-Derived Macrophages. J Immunol. 2000;164(4):1663–7.
82. Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, Leslie CC. Intracellular Calcium Signals Regulating Cytosolic Phospholipase A 2 Translocation to Internal Membranes. J Biol Chem. 2001;276(32):30150–60.
83. Scannell M, Maderna P. Lipoxins and annexin-1: Resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells. ScientificWorldJournal. 2006;6:1555–73.
84. Sordi R, Menezes de Lima Jr O, Assreuy J. Biossíntese e funções das lipoxinas na resolução da inflamação. Publ UEPG Ciencias Biol e da Saude. 2012;18(1):7–13.
85. Huang P, Zhou Y, Liu Z, Zhang P. Interaction between ANXA1 and GATA-3 in Immunosuppression of CD4+ T Cells. Mediators Inflamm. 2016;2016.
86. Sugimoto MA, Ribeiro ALC, Costa BRC, Vago JP, Lima KM, Carneiro FS, et al. Phagocytes, granulocytes, & myelopoiesis: Plasmin & plasminogen induce macrophage reprogramming & regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1. Blood. 2017;129(21):2896–907.
87. Damazo AS, Sampaio ALF, Nakata CMAG, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. BMC Immunol. 2011;12:1–13.
88. Han PF, Che X Da, Li HZ, Gao YY, Wei XC, Li PC. Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. Chinese J Traumatol - English Ed [Internet]. 2020;(xxxx):1–6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2020.02.002

89. Sakaguchi M, Murata H, Sonegawa H, Sakaguchi Y, Futami JI, Kitazoe M, et al. Truncation of annexin A1 is a regulatory lever for linking epidermal growth factor signaling with cytosolic phospholipase A2 in normal and malignant squamous epithelial cells. J Biol Chem. 2007;282(49):35679–86.
90. Wein S, Fauroux M, Laffitte J, De Nadaï P, Guaïni C, Pons F, et al. Mediation of annexin 1 secretion by a probenecid-sensitive ABC-transporter in rat inflamed mucosa. Biochem Pharmacol. 2004;67(6):1195–202.
91. Solito E, Christian HC, Festa M, Mulla A, Tierney T, Flower RJ, et al. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. FASEB J. 2006;20(9):1498–500.
92. Shao G, Zhou H, Zhang Q, Jin Y, Fu C. Advancements of Annexin A1 in in fl ammation and tumorigenesis. Onco Targets Ther. 2019;12:3245–54.
93. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(SUPPL. 1):39–48.
94. Mulla A, LeRoux C, Solito E, Buckingham JC. Correlation between the antiinflammatory protein annexin 1 (lipocortin 1) and serum cortisol in subjects with normal and dysregulated adrenal function. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(1):557–62.
95. Sawmynaden P, Perretti M. Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2006;349(4):1351–5.
96. Zhang Y, Ma S, Ke X, Yi Y, Yu H, Yu D, et al. The mechanism of Annexin A1 to modulate TRPV1 and nociception in dorsal root ganglion neurons. Cell Biosci [Internet]. 2021;11(1):1–17. Available from: https://doi.org/10.1186/s13578-021-00679-1
97. Pei L, Zhang J, Zhao F, Su T, Wei H, Tian J, et al. Annexin 1 exerts anti-nociceptive effects after peripheral inflammatory pain through formyl-peptide-receptor-like 1 in rat dorsal root ganglion. Br J Anaesth. 2011;107(6):948–58.
98. Gan N, Zhang R, Xu X, Wang Y, Qi A, Zhang Y, et al. Effects of the ALX/FPR2 receptors of lipoxin A 4 on lung injury induced by fat embolism syndrome in rats. Biomed Pharmacother [Internet]. 2019;112(January). Available from: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.056
99. Kain V, Jadapalli JK, Tourki B, Halade G V. Inhibition of FPR2 impaired

leukocytes recruitment and elicited non-resolving inflammation in acute heart failure. Pharmacol Res [Internet]. 2019;146(June). Available from: https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104295

100. Campbell EL, Louis NA, Tomassetti SE, Canny GO, Arita M, Serhan CN, et al. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. FASEB J. 2007;21(12):3162–70.
101. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators. Annu Rev Pathol Dis. 2008;3:279–312.
102. Yu C, Ko C, Hsieh C, Chien C. ScienceDirect Proteomic analysis of osteoarthritic chondrocyte reveals the hyaluronic acid-regulated proteins involved in chondroprotective effect under oxidative stress ☆. J Proteomics [Internet]. 2014;99:40–53. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.016
103. Ruiz-romero C, Carreira V, Rego I, Remeseiro S, López-armada MJ, Blanco FJ. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. Proteomics. 2008;8:495–507.
104. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. Neuroscience [Internet]. 2012;211:39–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041
105. Larson AA, Brown DR, El-Atrash S, Walser MM. Pain threshold changes in adjuvant-induced inflammation: A possible model of chronic pain in the mouse. Pharmacol Biochem Behav. 1986;24(1):49–53.
106. Chillingworth NL, Donaldson LF. Characterisation of a Freund’s complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. J Neurosci Methods. 2003;128(1–2):45–52.
107. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. Nature. 2001;413:203–10.
108. Reginster J-Y. The prevalence and burden of arthritis. Rheumatology. 2002;41(90001):3–6.
109. Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. In: Journal of Internal Medicine. 2009. p. 663–79.
110. Lemos GA, da Silva PLP, Batista AUD, Palomari ET. Experimental model of temporomandibular joint arthritis: Evaluation of contralateral joint and masticatory muscles. Arch Oral Biol [Internet]. 2018;95:79–88. Available from:

https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.07.003

111. Maresca M, Micheli L, Cinci L, Bilia AR, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L. Pain relieving and protective effects of Astragalus hydroalcoholic extract in rat arthritis models. J Pharm Pharmacol. 2017;69(12):1858–70.
112. Lucena F, Foletto V, Mascarin LZ, Tonussi CR. Analgesic and anti-edematogenic effects of oral trypsin were abolished after subdiaphragmatic vagotomy and spinal monoaminergic inhibition in rats. Life Sci. 2016 Dec 1;166:60–5.
113. Labouesse MA, Stadlbauer U, Weber E, Arnold M, Langhans W, Pacheco-López G. Vagal Afferents Mediate Early Satiation and Prevent Flavour Avoidance Learning in Response to Intraperitoneally Infused Exendin-4. J Neuroendocrinol. 2012 Dec;24(12):1505–16.
114. de Gurtubay IG, Bermejo P, Lopez M, Larraya I, Librero J. Evaluation of different vagus nerve stimulation anatomical targets in the ear by vagus evoked potential responses. Brain Behav. 2021;11(11):1–9.
115. Yuan H, Silberstein SD. Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a Comprehensive Review: Part II. Headache. 2016 Feb 1;56(2):259–66.
116. Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. Vol. 594, Journal of Physiology. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 5781–90.
117. Zagon A. Does the vagus nerve mediate the sixth sense ? Trends Neurosci. 2001;24(11):671–3.
118. Watkins LR, Goehler LE, Busch CR, Tartaglia N, Relton J, Sisk D, et al. Blockade of cytokine induced conditioned taste aversion by subdiaphragmatic vagotomy: further evidence for vagal mediation of immune-brain communication. Neurosci Lett. 1995;185(3):163–6.
119. Hansen MK, O'Connor KA, Goehler LE, Watkins LR, Maier SF. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1β-induced fever is dependent on dose. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol. 2001;280(4 49-4):929–34.
120. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. J Exp Med. 2002;195(6):781–8.
121. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage

activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. Nat Immunol. 2005;6(8):844–51.

122. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, LaRosa GJ, Ulloa L, et al. The Vagus Nerve and Nicotinic Receptors Modulate Experimental Pancreatitis Severity in Mice. Gastroenterology. 2006;130(6):1822–30.
123. Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, et al. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. J Exp Med. 2005;201(7):1113–23.
124. Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature. 2000;405(May):458–62.
125. Wang H, Yu M, Ochani M, Amelia CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor α7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature. 2003;421(6921):384–8.
126. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. Nat Med. 2004;10(11):1216–21.
127. Tracey KJ. The inflammatory reflex. Nature. 2002;420:853–9.
128. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. Vol. 117, Journal of Clinical Investigation. 2007. p. 289–96.
129. Tanaka S, Hammond B, Rosin DL, Okusa MD. Neuroimmunomodulation of tissue injury and disease : an expanding view of the inflammatory reflex pathway. Bioelectron Med. 2019;5:1–11.
130. Hosoi T, Okuma Y, Matsuda T, Nomura Y. Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation : Possible role of nodose ganglion. Auton Neurosci. 2005;120:104–7.
131. Kawashima K, Fujii T. Basic and Clinical Aspects of Non-neuronal Acetylcholine : Overview of Non-neuronal Cholinergic Systems and Their Biological Significance. J Pharmacol Sci 106,. 2008;173:167–73.
132. Berenbaum F, Meng QJ. The brain-joint axis in osteoarthritis: Nerves, circadian clocks and beyond. Nat Rev Rheumatol. 2016 Sep 1;12(9):508–16.
133. Pavlov VA, Ochani M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Huston JM, Czura CJ, et al. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(13):5219–

23.

134. Abboud FM. In search of autonomic balance: the good, the bad, and the ugly. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol [Internet]. 2010;298:1449–67. Available from: www.ajpregu.org
135. Jänig W. Sympathetic nervous system and inflammation: A conceptual view. Auton Neurosci Basic Clin. 2014;
136. Goldstein RS, Bruchfeld A, Yang L, Qureshi AR, Gallowitsch-puerta M, Patel NB, et al. Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway Activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. Mol Med. 2007;13(3–4):210–5.
137. Li T, Zuo X, Zhou Y, Wang Y. The Vagus Nerve and Nicotinic Receptors Involve Inhibition of HMGB1 Release and Early Pro-inflammatory Cytokines Function in Collagen-Induced Arthritis. J Clin Immunol. 2010;30:213–20.
138. Koopman FA, Chavan SS, Miljko S, Grazio S, Sokolovic S, Schuurman PR. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. PNAS. 2016;113(29).
139. Bugajski AJ, Thor P. Effect of subdiaphragmatic vagotomy and cholinergic agents in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. J Fhysiology Pharmacol. 2007;58(2):335–47.
140. Bugajski J, Gądek-Michalska A, Bugajski AJ. Involvement of prostaglandins in the nicotine-induced pituitary-adrenocortical response during social stress. J Physiol Pharmacol. 2002;53(4 II):847–57.
141. Bugajski J, Bugajski AJ. Effec of constitutive and inducible Cyclooxygenase in the carbachol-induced pituitary-adrenocortical response during social stress. J Physiol Pharmacol. 2002;53(3):453–62.
142. Kapcala LP, He JR, Gao Y, Pieper JO, DeTolla LJ. Subdiaphragmatic vagotomy inhibits intra-abdominal interleukin-1β stimulation of adrenocorticotropin secretion. Brain Res. 1996;728(2):247–54.
143. Breit S, Kupferberg A, Rogler G, Hasler G. Vagus Nerve as Modulator of the Brain - Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. Front Psychiatry. 2018;9:44–15.
144. Serhan CN, de la Rosa X, Jouvene CC. Cutting Edge: Human Vagus Produces Specialized Proresolving Mediators of Inflammation with Electrical Stimulation Reducing Proinflammatory Eicosanoids. J Immunol. 2018;201(11):3161–5.

145. Andersson U, Tracey KJ. Neural reflexes in inflammation and immunity. J Exp Med. 2012;209(6):1057–68.
146. Van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, Ramkhelawon B, Ray TD, Rayner KJ, et al. The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. Nat Immunol. 2012;13(2):136–43.
147. Tao X, Lee MS, Donnelly CR, Ji R. Neuromodulation , Specialized Proresolving Mediators , and Resolution of Pain. Neurotherapeutics. 2020;17:886–99.
148. Serhan CN, de la Rosa X, Jouvene C. Novel mediators and mechanisms in the resolution of infectious inflammation: evidence for vagus regulation. J Intern Med. 2019;286(3):240–58.
149. Li S, Xie P, Liang Z, Huang W, Huang Z, Ou J, et al. Efficacy comparison of five different acupuncture methods on pain, stiffness, and function in osteoarthritis of the knee: A network meta-analysis. Evidence-based Complement Altern Med. 2018;2018(Figure 1).
150. Zhang R, Lao L, Ren K, Berman BM. Mechanisms of Acupuncture–Electroacupuncture on Persistent Pain. Anesthesiology. 2014;120(2):482–503.
151. Smith BH, Elliott AM, Alastair Chambers W, Smith WC, Hannaford PC, Penny K. The impact of chronic pain in the community. Fam Pract. 2001;18(3):292–9.
152. Simon LS. Relieving Pain in America: a Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research. J Pain Palliat Care Pharmacother. 2012;26(2):197–8.
153. Yang A chao, Zhang J guo, Rong P jing, Liu H guang, Chen N, Zhu B. A new choice for the treatment of epilepsy: Electrical auricula-vagus-stimulation. Med Hypotheses [Internet]. 2011;77(2):244–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2011.04.021
154. NKL. El-608 Instruções Operacionais. Brasil; 2018. 1–62 p.
155. Castillo Saavedra L, Morales-Quezada L, Doruk D, Rozinsky J, Coutinho L, Faria P, et al. QEEG indexed frontal connectivity effects of transcranial pulsed current stimulation (tPCS): A sham-controlled mechanistic trial. Neurosci Lett [Internet]. 2014;577:61–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.06.021
156. Morales-Quezada L, Cosmo C, Carvalho S, Leite J, Castillo-Saavedra L, Rozisky JR, et al. Cognitive effects and autonomic responses to transcranial

pulsed current stimulation. Exp Brain Res. 2014;233(3):701–9.

157. Vasquez A, Malavera A, Doruk D, Morales-Quezada L, Carvalho S, Leite J, et al. Duration Dependent Effects of Transcranial Pulsed Current Stimulation (tPCS) Indexed by Electroencephalography. Neuromodulation. 2016;19(7):679–88.
158. Kaniusas E, Kampusch S, Tittgemeyer M, Panetsos F, Gines RF, Papa M. Current Directions in the Auricular Vagus Nerve Stimulation II – An Engineering Perspective. Front Neurosci. 2019;13:1–16.
159. Kaniusas E, Kampusch S, Tittgemeyer M, Panetsos F, Gines RF, Papa M, et al. Current directions in the auricular vagus nerve stimulation I – A physiological perspective. Front Neurosci. 2019;13(AUG):1–23.
160. Ruffoli R, Giorgi FS, Pizzanelli C, Murri L, Paparelli A, Fornai F. The chemical neuroanatomy of vagus nerve stimulation. J Chem Neuroanat. 2011 Dec;42(4):288–96.
161. Gomolka RS, Kampusch S, Kaniusas E, Thürk F, Széles JC, Klonowski W. Higuchi fractal dimension of heart rate variability during percutaneous auricular vagus nerve stimulation in healthy and diabetic subjects. Front Physiol. 2018;9(AUG):1–8.
162. Hein E, Nowak M, Kiess O, Biermann T, Bayerlein K, Kornhuber J, et al. Auricular transcutaneous electrical nerve stimulation in depressed patients: A randomized controlled pilot study. J Neural Transm. 2013;120(5):821–7.
163. Kaniusas E, Szeles JC, Kampusch S, Alfageme-Lopez N, Yucuma-Conde D, Li X, et al. Non-invasive Auricular Vagus Nerve Stimulation as a Potential Treatment for Covid19-Originated Acute Respiratory Distress Syndrome. Front Physiol. 2020;11(July):1–11.
164. Bauer S, Baier H, Baumgartner C, Bohlmann K, Fauser S, Graf W, et al. Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation (tVNS) for Treatment of Drug-Resistant Epilepsy: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial (cMPsE02). Brain Stimul [Internet]. 2016;9(3):356–63. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2015.11.003
165. Peuker ET, Filler TJ. The nerve supply of the human auricle. Clin Anat. 2002;15(1):35–7.
166. Butt MF, Albusoda A, Farmer AD, Aziz Q. The anatomical basis for transcutaneous auricular vagus nerve stimulation. J Anat. 2020;236(4):588–

611.

167. He W, Wang X, Shi H, Shang H, Li L, Jing X, et al. Auricular acupuncture and vagal regulation. Evidence-based Complement Altern Med. 2012;2012.
168. Merchant K, Zano S, Datta-Chaudhuri T, Deutschman C, Sethna C. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation for the treatment of irritable bowel syndrome: a pilot, open-label study. Bioelectron Med. 2022;8(1):1–8.
169. Cao J, Zhang Y, Li H, Yan Z, Liu X, Hou X, et al. Different modulation effects of 1 Hz and 20 Hz transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on the functional connectivity of the periaqueductal gray in patients with migraine. J Transl Med [Internet]. 2021;19(1):1–11. Available from: https://doi.org/10.1186/s12967-021-03024-9
170. Steidel K, Krause K, Menzler K, Strzelczyk A, Immisch I, Fuest S, et al. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation influences gastric motility: A randomized, double-blind trial in healthy individuals. Brain Stimul [Internet]. 2021;14(5):1126–32. Available from: https://doi.org/10.1016/j.brs.2021.06.006
171. Boezaart AP, Botha DA. Treatment of Stage 3 COVID-19 With Transcutaneous Auricular Vagus Nerve Stimulation Drastically Reduces Interleukin-6 Blood Levels: A Report on Two Cases. Neuromodulation. 2021;24(1):166–7.
172. Guo X, Zhao Y, Huang F, Li S, Luo M, Wang Y, et al. Effects of Transcutaneous Auricular Vagus Nerve Stimulation on Peripheral and Central Tumor Necrosis Factor Alpha in Rats with Depression-Chronic Somatic Pain Comorbidity. Neural Plast. 2020;2020(2).
173. Aranow C, Atish-Fregoso Y, Lesser M, Mackay M, Anderson E, Chavan S, et al. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation reduces pain and fatigue in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, sham-controlled pilot trial. Ann Rheum Dis. 2020;80(2):203–8.
174. Li S, Wang Y, Gao G, Guo X, Zhang Y, Zhang Z, et al. Transcutaneous Auricular Vagus Nerve Stimulation at 20 Hz Improves Depression-Like Behaviors and Down-Regulates the Hyperactivity of HPA Axis in Chronic Unpredictable Mild Stress Model Rats. Front Neurosci. 2020;14(July):1–8.
175. Jiao Y, Guo X, Luo M, Li S, Liu A, Zhao Y, et al. Effect of transcutaneous vagus nerve stimulation at auricular concha for insomnia: A randomized clinical trial. Evidence-based Complement Altern Med. 2020;2020.
176. Zhang Y, Liu J, Li H, Yan Z, Liu X, Cao J, et al. Transcutaneous auricular

vagus nerve stimulation at 1 Hz modulates locus coeruleus activity and resting state functional connectivity in patients with migraine: An fMRI study. NeuroImage Clin [Internet]. 2019;24(August):101971. Available from: https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.101971

177. Hong GS, Zillekens A, Schneiker B, Pantelis D, de Jonge WJ, Schaefer N, et al. Non-invasive transcutaneous auricular vagus nerve stimulation prevents postoperative ileus and endotoxemia in mice. Neurogastroenterol Motil. 2018;31(3):1–11.
178. Li S, Sun C, Rong P, Zhai X, Zhang J, Baker M, et al. Auricular vagus nerve stimulation enhances central serotonergic function and inhibits diabetic neuropathy development in Zucker fatty rats. Mol Pain. 2018 Jul 1;14.
179. Jiang Y, Li L, Ma J, Zhang L, Niu F, Feng T, et al. Auricular vagus nerve stimulation promotes functional recovery and enhances the post-ischemic angiogenic response in an ischemia/reperfusion rat model. Neurochem Int [Internet]. 2016;97:73–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.02.009
180. Rong P, Liu J, Wang L, Liu R, Fang J, Zhao J, et al. Effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on major depressive disorder: a nonrandomized controlled pilot study. J Affect DIsord. 2016;195:172–9.
181. Ma J, Zhang L, He G, Tan X, Jin X, Li C. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation regulates expression of growth differentiation factor 11 and activin-like kinase 5 in cerebral ischemia/reperfusion rats. J Neurol Sci [Internet]. 2016;369:27–35. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.08.004
182. Straube A, Ellrich J, Eren O, Blum B, Ruscheweyh R. Treatment of chronic migraine with transcutaneous stimulation of the auricular branch of the vagal nerve (auricular t-VNS): a randomized, monocentric clinical trial. J Headache Pain [Internet]. 2015;16(1). Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s10194-015-0543-3
183. Lin Han M, Jian-Bin Z, Chen X, Qing-Qing T, Wei-Xing S, Jing-Zhu Z, et al. Effects and mechanisms of auricular vagus nerve stimulation on high-fat-diet-induced obese rats. Nutrition [Internet]. 2015;31(11–12):1416–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2015.05.007
184. Li S, Zhai X, Rong P, McCabe MF, Zhao J, Ben H, et al. Transcutaneous

auricular vagus nerve stimulation triggers melatonin secretion and is antidepressive in zucker diabetic fatty rats. PLoS One. 2014;9(10):1–6.

185. Napadow V, Edwards RR, Cahalan CM, Mensing G, Valovska A, Li A, et al. Evoked Pain Analgesia in Chronic Pelvic Pain Patients using Respiratory-gated Auricular Vagal Afferent Nerve Stimulation. Pain Med. 2012;13(6):777–89.
186. Zhao YX, He W, Jing XH, Liu JL, Rong PJ, Ben H, et al. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation protects endotoxemic rat from lipopolysaccharide-induced inflammation. Evidence-based Complement Altern Med. 2012;2012.
187. Kawakita K, Kawamura H, Keino H, Hongo T, Kitakohji H. Development of the Low impedance points in the auricular Skin of Experimental peritonitis Rats. Am J Chin Med. 1991;19(3–4):199–205.
188. Van Westerloo DJ, Giebelen IAJ, Meijers JCM, Daalhuisen J, de Vos AF, Levi M, et al. Vagus nerve stimulation inhibits activation of coagulation and fibrinolysis during endotoxemia in rats. J Thromb Haemost. 2006;4(9):1997–2002.
189. Frangos E, Richards EA, Bushnell MC. Do the psychological effects of vagus nerve stimulation partially mediate vagal pain modulation? Neurobiol Pain [Internet]. 2017;1:37–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ynpai.2017.03.002
190. Busch V, Zeman F, Heckel A, Menne F, Ellrich J, Eichhammer P. The effect of transcutaneous vagus nerve stimulation on pain perception-An experimental study. Brain Stimul [Internet]. 2013;6(2):202–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2012.04.006
191. Usichenko T, Laqua R, Leutzow B, Lotze M. Preliminary findings of cerebral responses on transcutaneous vagal nerve stimulation on experimental heat pain. Brain Imaging Behav [Internet]. 2016;11(1):30–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11682-015-9502-5
192. Kinfe TM, Pintea B, Muhammad S, Zaremba S, Roeske S, Simon BJ, et al. Cervical non-invasive vagus nerve stimulation (nVNS) for preventive and acute treatment of episodic and chronic migraine and migraine-associated sleep disturbance: preliminary findings from a prospective observational cohort study. J Headache Pain [Internet]. 2015;16(1):1–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s10194-015-0582-9

193. Nesbitt AD, Marin JCA, Tompkins E, Ruttledge MH, Goadsby PJ. Initial use of a novel noninvasive vagus nerve stimulator for cluster headache treatment. Neurology. 2015;84(12):1249–53.
194. Borckardt JJ, Anderson B, Kozel FA, Nahas Z, Smith AR, Thomas KJ, et al. Acute and long-term VNS effects on pain perception in a case of treatment-resistant depression. Neurocase. 2006;12(4):216–20.
195. Proietti Cecchini A, Mea E, Tullo V, Curone M, Franzini A, Broggi G, et al. Vagus nerve stimulation in drug-resistant daily chronic migraine with depression: Preliminary data. Neurol Sci. 2009;30(SUPPL. 1):101–4.
196. Marconi M, Lakatos E. Fundamentos de metodologia científica. Editora Atlas S. A. 2003. 310 p.
197. Daniel W. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. 9th ed. New York; 2008.
198. de Oliveira BH, Horewicz VV, da Silva RH, Salm DC, Salgado ASI, Cidral-Filho FJ, et al. ET-B receptors involvement in peripheral opioid analgesia induced by light-emitting diode photobiomodulation in male and female mice. J Photochem Photobiol B Biol. 2021;214(July 2020).
199. Lao L, Zhang RX, Zhang G, Wang X, Berman BM, Ren K. A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats. Brain Res. 2004;
200. Martins DF, Brito RN, Stramosk J, Batisti AP, Madeira F, Turnes BL, et al. Peripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. J Neurosci Res. 2015;93(1):157–66.
201. Moura DJ, Maia AP de A, Vercellino R do A, Medeiros BBL, Sarubbi J, Griska PR. Use of infrared thermography in the analysis of horse thermoregulation in training. Eng Agric. 2011;31(1):23–32.
202. Prediger RDS, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (Ilex paraguariensis) in animal models of learning and memory. J Ethnopharmacol. 2008;120(3):465–73.
203. Mack JM, Moura TM, Lanznaster D, Bobinski F, Massari CM, Sampaio TB, et al. Intranasal administration of sodium dimethyldithiocarbamate induces motor deficits and dopaminergic dysfunction in mice. Neurotoxicology [Internet].

2018;66:107–20. Available from: https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.011

204. Vieira C, Salm DC, Horewicz V V., Ludtke DD, Emer AA, Koerich JF, et al. Electroacupuncture decreases inflammatory painthrough a pro-resolving mechanism involving the peripheral annexinA1-formyl peptide receptor 2/ALX-opioid receptor pathway. Eur J Physiol. 2021;473:683–95.
205. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72:248-54, 1976.
206. Martins DF, Martins TC, Batisti AP, dos Santos Leonel L, Bobinski F, Belmonte LAO, et al. Long-Term Regular Eccentric Exercise Decreases Neuropathic Pain-like Behavior and Improves Motor Functional Recovery in an Axonotmesis Mouse Model: the Role of Insulin-like Growth Factor-1. Mol Neurobiol. 2018;55(7):6155–68.
207. Horewicz VV, Crestani S, De Sordi R, Rezende E, Assreuy J. FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. Eur J Pharmacol [Internet]. 2015;746:267–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.11.026
208. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain. 1983;16(2):109–10.

ANEXOS

ANEXO A- Parecer Aprovação da Comissão de Ética

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais — UNISUL

Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 12 de dezembro de 2018
Registro na CEUA (código): 18.048.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Estudo translacional dos efeitos da neuroeletroestimulação auricular no nervo vago na dor inflamatória", registrada com o 18.048.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 12 de dezembro de 2018.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

UNISUL - Campus Grande Florianópolis,
Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária, CEP 88137-270, Palhoça, SC
Fone: (48) 3279-1036 / E-mail: ceua@unisul.br

ANEXO B – Produção científica publicada durante o período do Doutorado

Complementary Therapies in Clinical Practice 31 (2018) 320–324

Contents lists available at ScienceDirect

Complementary Therapies in Clinical Practice

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ctcp

Pain-related encephalic regions influenced by yoga meditation: An integrative review

Petra Jurisic[a], Daiana Cristina Salm[a,b], Cintia Vieira[a,b], Francisco José Cidral-Filho[a,b], Leidiane Mazzardo-Martins[a,c], Daniel Fernandes Martins[a,b,*]

[a] Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina, at Palhoça, Santa Catarina, Brazil
[b] Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, at Palhoça, Santa Catarina, Brazil
[c] Postgraduate Program in Neuroscience, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Accepted Manuscript

Effects of different parameters of continuous training and high-intensity interval training in the chronic phase of mouse model of complex regional pain syndrome type I

Luiz Augusto Oliveira Belmonte , Thiago César Martins , Daiana Cristina Salm , Aline Armiliato Emer , Bruna Hoffman de Oliveira , Khiany Mathias , Mariana Pereira Goldim , Verônica Vargas Horewicz , Anna Paula Piovezan , Franciane Bobinski , Fabrícia Petronilho , Daniel Fernandes Martins

PII: S1526-5900(18)30327-4
DOI: 10.1016/j.jpain.2018.06.008
Reference: YJPAI 3605

To appear in: *Journal of Pain*

Received date: 9 March 2018
Revised date: 15 June 2018
Accepted date: 26 June 2018

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology
https://doi.org/10.1007/s00424-018-2192-2

NEUROSCIENCE

Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I

Leidiane Mazzardo-Martins[1,2] · Daiana Cristina Salm[1,2] · Elisa C. Winkelmann-Duarte[1] · Júlia Koerich Ferreira[2] · Daniela Dero Lüdtke[2,3] · Kamilla Pamplona Frech[1] · Luiz Augusto Oliveira Belmonte[2,3] · Verônica Vargas Horewicz[2,3] · Anna Paula Piovezan[2,3] · Francisco José Cidra-Filho[2,3] · Ari Ojeda Ocampo Moré[4] · Daniel Fernandes Martins[2,3]

Received: 14 March 2018 / Revised: 12 July 2018 / Accepted: 2 August 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Journal of Neuroscience Methods 308 (2018) 192–196

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth

Short communication

A non-reflexive method based on the variability of temperature and bioimpedance in measuring inflammatory hyperalgesia and analgesia in mice

Felipe Reitz[a], Daiana C. Salm[a,b], Daniela Dero Ludtke[a], Aureo dos Santos[a,b], Jefferson Traebert[b], Daniel F. Martins[a,b,*]

[a] Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina at Palhoça, Santa Catarina, Brazil
[b] Postgraduate Program of Health Sciences. University of Southern Santa Catarina at Palhoça, Santa Catarina, Brazil

brain sciences

MDPI

Article

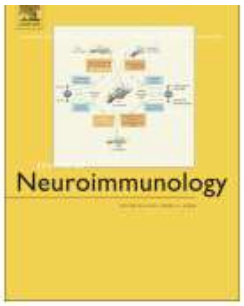
Manual Therapy Reduces Pain Behavior and Oxidative Stress in a Murine Model of Complex Regional Pain Syndrome Type I

Afonso S. I. Salgado [1,2], Juliana Stramosk [2], Daniela D. Ludtke [2,3], Ana C. C. Kuci [2], Daiana C. Salm [2,3], Lisandro A. Ceci [2,3], Fabricia Petronilho [4], Drielly Florentino [4], Lucineia G. Danielski [4], Aline Gassenferth [5], Luana R. Souza [6], Gislaine T. Rezin [7], Adair R. S. Santos [5,6], Leidiane Mazzardo-Martins [6], William R. Reed [7] and Daniel F. Martins [1,2,*]

1. Coordinator of Integrative Physical Therapy Residency–Philadelphia University Center, Londrina 86020-000, Paraná, Brazil
2. Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina, Palhoça 88137-270, Santa Catarina, Brazil
3. Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça 88137-270, Santa Catarina, Brazil
4. Laboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of South Santa Catarina, Tubarão 88704-900, Santa Catarina, Brazil
5. Laboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, University Federal of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Santa Catarina, Brazil
6. Postgraduate Program in Neuroscience, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Santa Catarina, Brazil
7. Department of Physical Therapy, School of Health Professions, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294-1212, USA

* Correspondence: daniel.martins4@unisul.br; Tel.: +55-(48)-3279-1144

Aquatic exercise and Far Infrared (FIR) modulates pain and blood cytokines in fibromyalgia patients: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study



Daiana Cristina Salm, Luiz Augusto Oliveira Belmonte, Aline Armiliato Emer, Larissa Leonel, Rômulo Nolasco de Brito, Cinthia Calheiros da Rocha, Thiago César Martins, Diogo Cunha dos Reis, Antônio Renato Pereira Moro, Leidiane Mazzardo-Martins, Maicon Roberto Kviecinski, Franciane Bobinski, Afonso Shiguemi Inoue Salgado, Francisco José Cidral-Filho, Daniel Fernandes Martins

PII:	S0165-5728(19)30316-9
DOI:	https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.577077
Reference:	JNI 577077
To appear in:	*Journal of Neuroimmunology*
Received date:	25 June 2019
Revised date:	27 August 2019
Accepted date:	27 September 2019

Journal of Neuroimmunology 340 (2020) 577145

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim

Lavandula angustifolia essential oil inhalation reduces mechanical hyperalgesia in a model of inflammatory and neuropathic pain: The involvement of opioid and cannabinoid receptors

Nathalia Nahas Donatello[a,b], Aline Armiliato Emer[a,b], Daiana Cristina Salm[a,b], Daniela Dero Ludtke[a,b], Silvana Aparecida Strapazzon Ribeiro Bordignon[b], Júlia Koerich Ferreira[b], Afonso Shiguemi Inoue Salgado[a,b,c], Dalila Venzke[d], Lizandra C. Bretanha[d], Gustavo A. Micke[d], Daniel F. Martins[a,b,*]

[a] Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina 88137-270, Brazil
[b] Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina 88137-270, Brazil
[c] Integrative Physical Therapy Residency Program, Philadelphia University Center, Londrina, PR, Brazil
[d] Department of Chemistry, Center of Physical and Mathematical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

Research paper

Journal of Orthopaedics, Trauma and Rehabilitation
1–9
© The Author(s) 2020
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/2210491720935614
journals.sagepub.com/home/otr
SAGE

Antihyperalgesic effect of exercise is augmented by the oral pretreatment with extract of *Casearia sylvestris* in an animal model of osteoarthritis

Shayany Dalbem Pascoalino[1], Daniela Dero Lüdtke[2,3], Ana Caroline Heymanns[1,2,3], Daiana Salm[2,3], Déborah M Costa[4], Daniel Fernandes Martins[2,3], Verônica V Horewicz[2,3], Franciane Bobinski[2,3] and Anna Paula Piovezan[2,3]

An Acad Bras Cienc (2020) 92(4): e20191155 DOI 10.1590/0001-3765202020191155
Anais da Academia Brasileira de Ciências | *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*
Printed ISSN 0001-3765 I Online ISSN 1678-2690
www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

HEALTH SCIENCES

Role of the endocannabinoid system on the antihyperalgesic action of gabapentin in animal model of neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation

ALEXANDRE C. BUFFON, MARCELO A. JAVORNIK, ANA C. HEYMANNS, DAIANA C. SALM, VERÔNICA V. HOREWICZ, DANIEL F. MARTINS & ANNA P. PIOVEZAN

ELSEVIER
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology
Volume 214, January 2021, 112104

ET-$_B$ receptors involvement in peripheral opioid analgesia induced by light-emitting diode photobiomodulation in male and female mice

Bruna Hoffmann de Oliveira [a], Verônica Vargas Horewicz [a, b], Rafaela Hardt da Silva [a], Daiana Cristina Salm [a, b], Afonso S.I. Salgado [a, c], Francisco José Cidral-Filho [a], Franciane Bobinski [a, b], Anna Paula Piovezan [a, b], Daniel F. Martins [a, b]

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology (2021) 473:683–695
https://doi.org/10.1007/s00424-020-02502-1

NEUROSCIENCE

Electroacupuncture decreases inflammatory pain through a pro-resolving mechanism involving the peripheral annexin A1-formyl peptide receptor 2/ALX-opioid receptor pathway

Cintia Vieira[1,2] · Daiana C. Salm[1,2] · Verônica V. Horewicz[1,2] · Daniela D. Ludtke[1,2] · Aline A. Emer[1,2] · Júlia F. Koerich[1,2] · Gustavo Mazzardo[1] · Sayron Elias[1] · Ari O. O. Moré[4] · Leidiane Mazzardo-Martins[1,3] · Francisco J. Cidral-Filho[1,2] · William R. Reed[5,6] · Anna Paula Piovezan[1,2] · Daniel F. Martins[1,2]

Received: 13 June 2020 / Revised: 28 October 2020 / Accepted: 3 December 2020 / Published online: 20 January 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

ELSEVIER

Neuroscience & Biobehavioral Reviews
Volume 131, December 2021, Pages 1136-1149

Review article

The role of the vagus nerve in fibromyalgia syndrome

Daniel F. Martins [a, b], Frederic J.F. Viseux [c, d], Daiana C. Salm [a, b], Anny Caroline Avelino Ribeiro [a], Helen Kassiana Lopes da Silva [a], Lynsey A. Seim [e], Edsel B. Bittencourt [f], Gianluca Bianco [g, h], Ari Ojeda Ocampo Moré [i], William R. Reed [j, k], Leidiane Mazzardo-Martins [l]

Show more