



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
CINTIA VIEIRA CARON

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALXR PERIFÉRICO E
ESPINAL NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELA
ELETROACUPUNTURA

Palhoça
2018

CINTIA VIEIRA CARON

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALXR PERIFÉRICO E
ESPINAL NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELA
ELETROACUPUNTURA**

LINHA DE PESQUISA: Neurociências

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestra em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. DANIEL FERNANDES MARTINS, Dr.

Palhoça

2018

- C29 Caron, Cintia Vieira, 1977-
Avaliação do envolvimento do receptor FPR2/ALXR periférico e
espinal no efeito anti-hiperalgésico induzido pela eletroacupuntura /
Cintia Vieira Caron. – 2018.
101 f. : il. color. ; 30 cm
- Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-
graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Prof. Daniel Fernandes Martins
1. Inflamação. 2. Medicina integrativa. 3. Neurociências. 4.
Eletroacupuntura. I. Martins, Daniel Fernandes, 1982-. II. Universidade
do Sul de Santa Catarina. III. Título.
- CDD (21. ed.) 616.0473

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Avaliação do envolvimento do receptor ALX/EP2 periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico induzido pela eletroacupuntura

CINTIA VIEIRA CARON
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 28 de fevereiro de 2018.

Doutor Daniel Fernandes Martins (orientador)

Doutor Adair Roberto Soares dos Santos (avaliador externo)

Doutora Anna Paula Piovezan (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

AGRADECIMENTOS

Procuro na vida a felicidade! A plenitude na entrega diante das possibilidades que a vida me oferece e naquelas que corro atrás porque percebo que poderão me fazer ainda mais feliz...mas realmente a felicidade foi o caminho! Este caminho me sintonizou com minha essência...conhecendo um pouco da tristeza, dificuldades e superação nesta trajetória do Mestrado...assim reconheci a felicidade. Tantos agradecimentos a pessoas que me incentivaram, bem como me fortaleceram quando eu desesperava nas dificuldades internas e/ou externas do Mestrado.

Agradeço a Deus pela força interna incontável que me fez enfrentar tudo e todos para finalizar este ciclo. Esta força Divina me impulsionava aos afazeres, e com prazer e amor realizar todas as atividades referentes ao Mestrado.

Uma gratidão infinita de reconhecimento pelo encorajamento vindo do colega e amigo Professor Dr. Fernando Hellmann, que pegou na minha mão literalmente em uma ocasião, e me fez encarar este desafio saindo da minha zona de conforto de docente especialista para a oportunidade de Mestre.

O maior agradecimento ao colega, amigo, professor e orientador Dr. Daniel Fernandes Martins que, na mesma ocasião, convidou-me e esteve sempre incondicionalmente ao meu lado, fortalecendo e incentivando para conseguir finalizar com conhecimento e sabedoria todas etapas do Mestrado.

Ao aprendizado constante teórico e prático e a disponibilidade contínua do Doutor e Professor Ari Ojeda Ocampo Moré, que orientou procedimentos seguros e científicos sobre a acupuntura manual e eletroacupuntura em animais e humanos e participou da banca de qualificação deste Projeto. Nas bancas de qualificação e defesa, agradeço imensamente as orientações da Profa. Anna Paula Piovezan, sempre disponível aos ensinamentos e com doçura e leveza lapidaram meu aprendizado e interesse pela pesquisa continuada.

Aos camundongos que contribuíram significativamente para mais esta pesquisa e para a ciência, bem como proporcionaram vivência, experiência e aprendizado singular na prática do LANEX.

Todos os 'louros e ouros' a esta unida e competente equipe do LANEX da UNISUL – Daniel Fernandes Martins, Leidiane Mazzardo Martins, Daiana Salm, Daniela Lüdtke, Aline Emer, Verônica Vargas Horewicz, Júlia Koerich Ferreira, Nathália Nahas Donatello, Kamilla Pamplona Frech, Rômulo Nolasco de Brito, Bruna de Oliveira Hoffmann, Sayron Elias, Gustavo Mazzardo - que sempre estiveram disponíveis ao ensino das atividades da rotina do Laboratório, bem como, com muito amor envolvido e dedicação extrema com sorriso promissor e encorajador realizam os experimentos juntamente com os pesquisadores com inteira responsabilidade e profissionalismo.

Ao meu filho Matheus Vieira Caron, amor infinito da minha vida, que ao meu lado todos os dias e noites, me fortaleceu com suas piadinhas, cócegas e teve muita paciência nas minhas ausências para mergulhar nas descrições e ações do Mestrado. Assim, cresceu ainda mais na altura e na autonomia. A afilhada Isadora Vieira Zacarias, amor infinito da Dinda, que acompanhou com alegria e amor incondicional entendendo o processo do Mestrado.

A minha família, mãe Vânia Maria Inês Vieira, pai Rubens Vieira, irmãs Christiane Vieira, Patrícia Vieira e Úrsula Margaux Gonçalves (de coração) presentes como torcida incondicional, incentivadora, apoiadora, fortalecedora e amorosa que acreditou em mim e me impulsionou a vencer acima de tudo.

Aos colegas professores e colaboradores das Instituições da UNISUL/Pedra Branca e do CIEPH/Florianópolis, que renovavam as minhas energias com sorriso, abraço, uma palavra amiga, que fortaleceu a intensa rotina de trabalhar como docente e estudar concomitantemente.

Aos alunos, motivo maior da educação continuada, para ofertar a eles o meu melhor como docente facilitadora do conhecimento no ensino, pesquisa e extensão.

RESUMO

Introdução: Apesar dos efeitos analgésicos da eletroacupuntura (EA) na dor e inflamação serem semelhantes aos efeitos da ativação do receptor 2 para peptídeos formilados (FPR2/ALX) mediada por substâncias pró-resolutivas, o envolvimento deste receptor no efeito anti-hiperalgésico da EA ainda não tinha sido investigado. Objetivo: Avaliar o envolvimento do receptor FPR2/ALX periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA de baixa frequência em um modelo animal de inflamação periférica persistente. Métodos: Camundongos machos Suíços (30 a 40 g) foram submetidos a injeção intraplantar (i.pl.) de 20 µl adjuvante completo de Freund (CFA). A hiperalgesia mecânica foi avaliada pelo teste de von Frey. Os animais foram tratados com EA (nos acupontos SP6 e ST36) ou BML-111 nas doses 100 µl / animal: testados 0,3, 1 e 3 µg (um análogo da lipoxina A₄ [LXA₄]) por 5 dias consecutivos. Na análise do mecanismo de ação os camundongos foram tratados no primeiro e no quinto dia. O edema foi avaliado no quarto dia após CFA por meio da mensuração da espessura da pata. Administração i.pl. e intratecal (i.t.) do antagonista para o receptor FPR2/ALX (WRW4 nas doses de 3 ou 10 µg/i.pl) ou de naloxona foram realizadas no primeiro e quinto dia após CFA. A expressão do receptor FPR2/ALX na pata e na medula espinal foi realizada no segundo dia após CFA por meio da técnica de Western Blotting. Resultados: EA e BML-111 reduziram a hiperalgesia mecânica. O tratamento diário por 4 dias consecutivos com EA ou BML-111 não reduziram o edema de pata. O pré-tratamento i.pl. ou i.t. dos animais com WRW4 ou naloxona preveniram o efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA ou BML-111. A injeção de CFA aumentou a expressão do receptor FPR2/ALX na pata, mas não na medula espinal. O tratamento dos animais com EA ou BML-111 não alterou a expressão do receptor FPR2/ALX na pata ou medula espinal, embora os animais tratados com EA ou BML-111 quando pré-tratados com WRW4 apresentaram menor expressão do receptor FPR2/ALX na medula espinal. No entanto, menor expressão do receptor FPR2/ALX na pata foi evidenciada somente nos animais pré-tratados com WRW4 que receberam EA. Conclusão: O tratamento com EA ou BML-111 reduziram a hiperalgesia mecânica, mas não o edema, e este efeito pode ser dependente da ativação do receptor FPR2/ALX periférico e central.

Descritores: Inflamação crônica, Medicina Integrativa, Mediadores pró-resolutivos.

ABSTRACT

Introduction: Although the effects of electroacupuncture (EA) on pain and inflammation are similar to the activation effects of formyl peptide receptor 2 (FPR2/ALXR) mediated by pro-resolving substances, the involvement of this receptor in the antihyperalgesic effect of EA had not yet been investigated. Objective: To evaluate the involvement of the peripheral and spinal FPR2/ALXR receptor in the antihyperalgesic effect induced by low frequency EA in an animal model of persistent peripheral inflammation. Methods: Swiss male mice (30 to 40 g) underwent intraplantar (i.pl.) injection with complete Freund's adjuvant (CFA). Mechanical hyperalgesia was assessed by the von Frey test. The animals were treated with EA (in SP6 and ST36 acupoints) or BML-111 (an analog of lipoxin A4 [LXA4]) for 5 consecutive days. In the analysis of the mechanism of action the mice were treated on the first and fifth day. The edema was evaluated on the fourth day after CFA by measuring the thickness of the paw. Intraplantar (i.pl.) and intrathecal (i.t.) administration of the FPR2/ALXR receptor antagonist (WRW4) or naloxone were performed on the first and fifth day after CFA. Expression of the FPR2/ALXR receptor in the paw and spinal cord was performed on the second day after CFA by the Western Blotting technique. Results: EA and BML-111 reduced mechanical hyperalgesia. Daily treatment for 4 consecutive days with EA or BML-111 did not reduce paw edema. The i.pl. or i.t. pre-treatment of animals with WRW4 or naloxone prevented the antihyperalgesic effect induced by EA or BML-111. The CFA i.pl. injection increased FPR2/ALXR receptor expression in the paw, but not in the spinal cord. Treatment of animals with EA or BML-111 did not alter FPR2/ALXR receptor expression in the paw or spinal cord, although animals treated with EA or BML-111 when pretreated with WRW4 had lower FPR2/ALXR receptor expression in the spinal cord. However, lower expression of the FPR2/ALXR receptor in the paw was evidenced only in animals pretreated with WRW4 that received EA treatment. Conclusion: Treatment with EA or BML-111 reduced mechanical hyperalgesia, but not edema, and this effect might be mediated by activation of peripheral and central FPR2/ALXR receptor.

Key words: Chronic Inflammation, Integrative Medicine, Pro-Resolving Mediators.

LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas

AA – Ácido araquidônico (do inglês, *arachidonic acid*)

AM - Acupuntura manual

ALXR - Receptor para lipoxina A₄ (do inglês, *receptor lipoxin A₄*)

AnxA1 – Anexina A1 (do inglês, *annexin 1*)

ASIC3 - canal iônico sensível ao ácido (do inglês, *acid-sensing ion channel*)

BML-111 - (5S,6R) methyl 5,6,7-trihydroxyheptanoate

CEUA – Comissão de Ética de Uso dos Animais

CFA – Adjuvante Completo de Freund (do inglês, *complete Freund's adjuvant*)

CRF – Fator Liberador de Corticotrofina (do inglês, *corticotrophin-releasing fator*)

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2 (do inglês, *cyclooxygenase 2*)

DHA – Ácido docosahexanóico (do inglês, *docosahexanoic acid*)

EA – Eletroacupuntura

EFA – Ácidos graxos essenciais (do inglês, *essential fatty acids*)

EPA – Ácido eicosapentanoico (do inglês, *eicosapentanoic acid*)

E.P.M. – Erro Padrão da Média

FPR – Receptor para peptídeos formilados (do inglês, *formyl peptide receptor*)

FPR2/ALXR - receptor 2 de peptídeos formilados (do inglês, *formyl peptide receptor 2*) para lipoxina A₄

GB30 – Vesícula biliar 30 (do inglês, *gallbladder*) ou *Huantiao*

GC – Glicocorticóide

GRE - elementos responsivos aos GCs (do inglês, *glucocorticoid responsive elements*)

HPA - hipotálamo-hipófise-adrenal (do inglês, *hypothalamus-pituitary-adrenal axis*)

IL – Interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase induzida (do inglês *inducible nitric oxide synthase*)

i.p. – intraperitoneal

i.pl. – intraplantar

i.t. –intratecal

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International*

Association for the Study of Pain)

LANEX – Laboratório de Neurociências Experimental

LPS – Lipossacarídeos (do inglês, *lipopolysaccharide*)

LOX – lipoxigenase (do inglês, *lipoxygenase*)

LXs - Lipoxinas (do inglês, *lipoxins*)

LXA4 - Lipoxina A₄ (do inglês, *lipoxin A₄*)

LXB4 – Lipoxina B₄ (do inglês, *lipoxin B₄*)

MaRs – Maresinas (do inglês, *maresinas*)

M2 – Macrófagos 2

MIA – Morte indolor assistida

MTC – Medicina Tradicional Chinesa

MS - Ministério da Saúde

N- Naive

NF-kB - fator nuclear kappa B (do inglês, *nuclear factor kappa B*)

NO – Óxido Nítrico (do inglês, *nitric oxide*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PDs - Protectinas

PD1 – Protectina 1 (do inglês, *protectin 1*)

PGs- Prostaglandina (do inglês, *prostaglandin*)

PI3K - enzima fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês, *phosphatidylinositol-3-kinase*)

PMN – Polimorfonucleares (do inglês, *polymorphonuclear*)

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

RvD1 - Resolvinas D1 (do inglês, *resolvins D1*)

SAA – proteína amiloide sérica A (do inglês, *serum amyloid A protein*)

s.c. - subcutânea

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SP6 – Baço Pâncreas 6 (do inglês, *spleen pâncreas 6*) ou *Sanyinjiao*

ST36 – Estômago 36 (do inglês, *stomach 36*) ou *Zu San Li*

TENS - Estimulação Elétrica Transcutânea do Nervo (do inglês, *transcutaneous electrical nerve stimulation*)

TGF- β - fator de crescimento transformador-beta (do inglês, *Transforming Growth Factor-beta*)

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês, *Tumoral Necrosis Factor Alpha*)

TRPV1 - receptores de potencial transiente vanilóide 1 (do inglês, *receptors of transient vanilloid potential 1*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

VCAM - Moléculas de adesão das células vasculares (do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule*)

vF – von Frey

WRW4 – Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-NH₂

Lista de Figuras

Figura 1 – Vias de formação dos mediadores lipídicos pró-resolução.....	20
Figura 2 - Representação esquemática do receptor ALX-FPR2.....	22
Figura 3 – Representação esquemática da mobilização e secreção da AnxA1 em células ativadas.....	25
Figura 4 – Efeitos dos GCs e AnxA1 na resposta inflamatória.....	26
Figura 5 – Topografia do acuponto ST36 no modelo animal.....	28
Figura 6 – Topografia do acuponto SP6 no modelo animal.....	30
Figura 7 – Modelo esquemático da localização dos acupontos ST36 e SP6.....	33
Figura 8- Representação esquemática temporal dos procedimentos experimentais.....	40
Figura 9 – Tratamento com a EA.....	42
Figura 10 – Teste de von Frey.....	44
Figura 11 – Mensuração do edema.....	45
Figura 12 – Efeito da EA na hiperalgesia mecânica.....	51
Figura 13 - Efeitos do tratamento com BML-111 na hiperalgesia mecânica.	53
Figura 14 – Efeito do tratamento com EA e BML-111 no edema de pata.....	54
Figura 15 - Envolvimento do receptor FPR2/ALXR periférico no efeito antihiperalgésico da EA e do BML-111.....	55

Figura 16- Efeitos dos tratamentos com EA, BML-111 ou WRW4 sobre a expressão do receptor FPR2/ALXR na pata.....	57
Figura 17 - Efeitos dos tratamentos com EA, BML-111 ou WRW4 sobre a expressão do receptor FPR2/ALXR na pata.....	58
Figura 18 - Efeitos dos tratamentos com EA, BML-111 ou WRW4 sobre a expressão do receptor FPR2/ALXR na medula espinal.....	60
Figura 19 - Envolvimento dos receptores opioides periféricos no efeito antihiperálgico da EA e do BML-111.....	61
Figura 20 - Envolvimento dos receptores opioides centrais no efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111.....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
1.1.1 Resolução da inflamação e mediadores pró-resolutivos.....	18
1.1.1.1 A LXA4 como mediador anti-inflamatório e pró-resolutivo.....	19
1.1.1.2 O receptor FPR2/ALXR	21
1.1.1.3 A AnxA1 como mediador anti-inflamatório e pró-resolutivo.....	23
1.1.2 EA na dor e na inflamação.....	27
1.1.2.1 EA na resolução da inflamação.....	34
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3. MÉTODOS.....	38
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	38
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	38
3.3 ANIMAIS.....	39
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	39
3.5 TESTES.....	41
3.5.1 Modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente	41
3.5.2 Tratamento com a EA ou BML-111 (análogo da LXA4).....	41
3.5.3 Mensuração da hiperalgesia mecânica.....	43
3.5.4 Mensuração do edema da pata	44
3.5.5 Avaliação do envolvimento dos receptores FPR2/ALXR periféricos e espinais no efeito anti-hiperalgésico da EA.....	45
3.5.6 Avaliação do envolvimento dos receptores opioides periféricos e espinais no efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111.....	46
3.5.7 Análise da expressão do receptor FPR2/ALXR por imunoeletroforese – Western Blotting.....	46
3.5.7.1 Preparação das amostras.....	46
3.5.7.2. Separação de proteínas e imunodeteção.....	47

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	48
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	48
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1 EFEITO DA EA NA HIPERALGESIA MECÂNICA.....	50
4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM BML-111 NA HIPERALGESIA MECÂNICA.....	52
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EA E DO BML-111 NO EDEMA DE PATA.....	54
4.4 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALXR PERIFÉRICO NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA E DO BML-111.....	54
4.5 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EA, BML-111 OU WRW4 SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR FPR2/ALXR NA PATA.....	56
4.6 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALXR ESPINAL NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA E DO BML-111.....	57
4.7 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EA, BML-111 OU WRW4 SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR FPR2/ALXR NA MEDULA ESPINAL.....	59
4.8 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDES PERIFÉRICOS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA E DO BML-111.....	60
4.9 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDES CENTRAIS (ESPINAIS) NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA E DO BML-111.....	62
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÃO.....	73
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE.....	93
APÊNDICE A – Produções científicas publicadas durante o Mestrado.....	94
ANEXO.....	99
ANEXO A - Parecer de aprovação do CEUA.....	100

1. INTRODUÇÃO

A dor persistente ou crônica é um problema de saúde comum que gera altos custos de cuidados, uma vez que está associada ao comprometimento funcional levando à diminuição da qualidade de vida dos indivíduos^{1,2}. A dor é um dos sintomas prevalentes das doenças inflamatórias. Mediadores pró-inflamatórios conhecidos causam sensibilização dos neurônios nociceptivos primários possibilitando o aparecimento da dor².

Geralmente, o processo inflamatório finaliza com a reparação tecidual, na qual ocorre a indução do reparado tecidual e o retorno à homeostase sem formação de fibrose ou cicatriz marcando o passo final da inflamação/resolução³. A resolução da inflamação é o restabelecimento da homeostase tecidual a partir de um programa regulado ativamente⁴. Este processo é coordenado por mediadores pró-resolutivos que promovem tanto ações anti-inflamatórias quanto pró-resolutivas. Esses mediadores diferem dos agentes anti-inflamatórios tradicionais que somente inibem a produção de mediadores pró-inflamatórios chaves. São várias as moléculas com ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas, as quais possuem natureza muito diversa, incluindo mediadores lipídicos especializados [lipoxinas (LXs do inglês, *lipoxins*) (por exemplo, LXA₄), resolvinas (por exemplo, RvD₁ do inglês, *resolvins D1*), protectinas e maresinas), proteínas e peptídeos [por exemplo, anexina A1 (AnxA1 do inglês, *annexin 1*), hormônio adrenocorticotrópico, peptídeos chemerina e galectina-1], entre outros³.

Apesar da LXA₄ e AnxA1 apresentarem diferentes naturezas, elas são fundamentais na modulação da dor inflamatória por meio da ativação do receptor FPR2/ALXR (receptor 2 para peptídeos formilados, do inglês, *formyl peptide receptor 2*)³. Dentre os diversos tipos de tecidos ou sistemas, o receptor FPR2/ALXR também é expressado no sistema nervoso e em distintos tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos e microglia, tendo vias de sinalização específicas para cada tipo celular. Por exemplo, em neutrófilos, a ativação do receptor FPR2/ALXR impede a migração de neutrófilos; enquanto em monócitos/macrófagos estimula a quimiotaxia e fagocitose sem que liberem citocinas ou quimiocinas⁵. No entanto, a incapacidade do organismo em

produzir quantidades adequadas destes mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, ou ainda a incapacidade desses mediadores em se ligar aos seus respectivos receptores pode levar à persistência da inflamação, desempenhando um papel etiopatogênico significativo nas doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes³.

Além dos efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos mediados pela ativação do receptor FPR2/ALXR sobre as células inflamatórias, a ativação desse receptor pela AnxA1 também pode exercer ação analgésica por: 1) facilitar a liberação tônica de opioides pelos neutrófilos no sítio inflamatório e 2) interromper a transmissão nociceptiva periférica por suprimir a excitabilidade neuronal⁶. No entanto, a interação da LXA₄ com o receptor FPR2/ALXR local pode atenuar a dor através de diversas maneiras, como por atuar em diferentes células reduzindo a inflamação, ativação glial e plasticidade sináptica na medula espinal⁷.

Dentre as terapêuticas não-farmacológicas na resolução da inflamação, estudos investigaram nos últimos trinta anos, a relação entre a acupuntura e os opioides endógenos. A acupuntura tem sido utilizada há mais de 3.000 anos na Ásia para tratar a dor, e a eficácia analgésica da acupuntura é reconhecida mundialmente⁸. A Acupuntura Manual (AM) é a inserção de agulhas filiformes que estimulam pontos específicos. Esta é uma forma de estimulação levantando, empurrando ou girando a agulha manualmente para manipular a sensação de *qi* (uma sensação de dor, peso, entorpecimento ou distensão)⁹.

A eletroacupuntura (EA) é a estimulação das agulhas de acupuntura por meio de corrente elétrica. O estímulo elétrico pode proporcionar reações fisiológicas diferenciais¹⁰. A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1979 recomendou a utilização da EA para tratar dores músculo-esqueléticas^{11,12}. Em 2006, o Ministério da Saúde (MS) brasileiro integrou a acupuntura ao SUS, com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)¹², na qual ratifica e incentiva o crescente uso clínico e de estudos científicos brasileiros nestes tratamentos.

Mais recentemente, tem sido demonstrado que fenômenos/eventos não opioides estão envolvidos no mecanismo analgésico da acupuntura¹³. Além disso, houve um aumento nas pesquisas pré-clínicas que investigam o mecanismo da EA em lesão tecidual persistente (inflamatória), lesão nervosa (neuropática), câncer e dor visceral.

Esses estudos mostraram que a EA a 2-10 Hz reduziu a dor inflamatória e inibiu a dor inflamatória e neuropática de forma mais eficaz quando comparada a 100 Hz¹⁴. A analgesia induzida pela EA promove a liberação de uma variedade de substâncias químicas bioativas por meio de eventos periféricos, espinais e supra-espinais¹¹.

Quanto aos resultados de estudos com EA pode-se perceber que há correlação pela qual a EA exerce seus efeitos benéficos sobre a inflamação e conseqüentemente na dor inflamatória, que pode envolver a liberação de mediadores pró-resolutivos com a possível ativação do receptor FPR2/ALXR. A exemplo dos efeitos dos mediadores pró-resolutivos (LXA₄, AnxA1 e RvD₁), tem sido demonstrado que a AM e/ou EA é capaz de reduzir a expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2 do inglês, *cyclooxygenase 2*) na medula espinal em modelo animal de dor crônica, estimular a apoptose de neutrófilos, regular o sistema imunológico promovendo atividade de imunidade humoral e celular, bem como a atividade das células *natural killer* (NK) em seres humanos¹⁵.

Além disso, a hipótese de que a EA possa promover a liberação de AnxA1 está baseada no fato de que pesquisas demonstraram que a acupuntura é capaz de reduzir o infiltrado de leucócitos¹⁶. Interessantemente, a adrenalectomia preveniu a redução do infiltrado de leucócitos induzida pela AM, na qual a AnxA1 é induzida por glicocorticoides (GCs)¹⁷. Corroborando com estes dados, pode reduzir a dor muscular inflamatória por meio do aumento de IL-10 no tecido muscular, efeito observado em paralelo com a polarização do fenótipo dos macrófagos para M2, demonstrando assim a ação com perfil pró-resolutivo¹⁸.

Apesar dos notáveis efeitos da EA sobre o processo inflamatório e nociceptivo, poucos estudos avaliaram se a EA também participa do processo resolutivo da inflamação. Neste contexto, questionou-se: Existe a participação do receptor FPR2/ALXR periférico e espinal na analgesia induzida pela eletroacupuntura em um modelo animal de inflamação periférica persistente?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Resolução da inflamação e mediadores pró-resolutivos

A partir da reação dinâmica à defensiva contra a invasão dos patógenos ou no processo do reparo das lesões teciduais, a inflamação quando nos organismos superiores, especialmente aqueles com vasculatura desenvolvida, é capaz de reagir e reparar o tecido proporcionando o retorno para o fenótipo pré-inflamação¹⁹. Esta resolução da inflamação, na última década, deixou de ser interpretada como uma reação passiva e foi evidenciada como um processo biosintético proativo, com respostas endógenas que controlam a magnitude e a duração dos sinais cardinais da inflamação^{20,21}.

Os processos fundamentais para a resolução da inflamação e retorno da homeostase tecidual incluem: a redução ou cessação da infiltração de neutrófilos nos tecidos; a contra-regulação da quimiocinas e citocinas; a indução de apoptose de neutrófilos migrados e extenuados e sua subsequente eferocitose (fagocitose de células apoptóticas) por macrófagos; a transformação de macrófagos da forma clássica para alternativamente ativada; o retorno de células não apoptóticas por vasos linfáticos e, finalmente, a eliminação do agente patogênico^{19,20, 22}.

Mediadores pró-resolutivos da inflamação são proteínas como: lipídeos especializados (LXs, resolvinas, protectinas e maresinas); AnxA1; gases, incluindo o sulfeto de hidrogênio, monóxido de carbono; purina (adenosina) ou neuromoduladores (neurotransmissor / neuropeptídeo) liberados sob controle vagal^{19, 21, 22}.

Na resolução da inflamação os macrófagos desenvolvem uma plasticidade aparente. Após a apoptose das células, os macrófagos reduzem a produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e lipídeos, e começam a liberar substâncias anti-inflamatórias, como a liberação de IL-10 e do fator de crescimento transformador-beta (TGF- β , do inglês *Transforming Growth Factor-beta*)^{20,21}.

1.1.1.1 A LXA₄ como mediador anti-inflamatório e pró-resolutivo

A LXA₄ é um lipídeo pró-resolutivo gerado a partir da biossíntese transcelular (ver Figura 1)²³. Mediadores lipídicos são mensageiros químicos com efeitos no curso da inflamação e são geralmente derivados de ácidos graxos essenciais (EFA do inglês, *essential fatty acids*) que incluem ácido araquidônico (AA do inglês, *arachidonic acid*), ácido eicosapentanoico (EPA do inglês, *eicosapentanoic acid*) e ácido docosahexanoico (DHA do inglês, *docosahexanoic acid*)²⁴. As dietas a longo prazo enriquecidas com EPA e DHA reduzem as concentrações de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α do inglês, *Tumoral Necrosis Factor Alpha*) e IL-6²⁵.

A EPA é o precursor do mediador lipídico de resolução da inflamação resolvina E1 (RvE1) e o DHA é o precursor da resolvina D1 (RvD1 do inglês, *resolvins D1*) e protectina D1 (PD1 do inglês, *protectin 1*)²⁴. Em concentrações nanomolares a RvE1 reduz a migração transendotelial de polimorfonucleares (PMNs) em humanos, e assim promove a resolução da inflamação²⁶. A RvD1 e PD1 têm efeitos pró-resolutivos, especialmente na redução da infiltração de PMN na inflamação da pele em murinos²⁷, peritonite²⁸ e lesão cerebral²⁹. Adicionalmente, PD1 promove cicatrização e reparo epitelial³⁰ e reduz a inflamação das vias aéreas em um modelo de asma em camundongos³¹. Deste modo, demonstrou-se que estes mediadores químicos controlam a magnitude e a duração de inflamação em animais e funcionam como agonistas nas diferentes etapas da resolução da inflamação³².

As LXs são produzidas nos locais de inflamação geradas por uma via diferente. A interação de células polimorfonucleares (PMNs) com plaquetas ou células residentes, tais como, células epiteliais, exemplifica a interação célula-célula e demonstra a complexidade da sinalização da formação das LXs³³. Para os leucotrienos, o AA é o precursor deles, e a ação combinada de duas ou mais lipoxigenases, a 5 LOX e a 15-lipoxigenase (15 LOX do inglês, *lipoxxygenase*) ou a 12-lipoxigenase (12 LOX) produzem LXs por uma das vias biossintéticas (Figura 1)³⁴. Curiosamente, a biossíntese das LXs concomitantemente bloqueia a formação de leucotrienos no nível 5 LOX, levando a uma regulação oposta da biossíntese das LXs e dos leucotrienos³⁵.

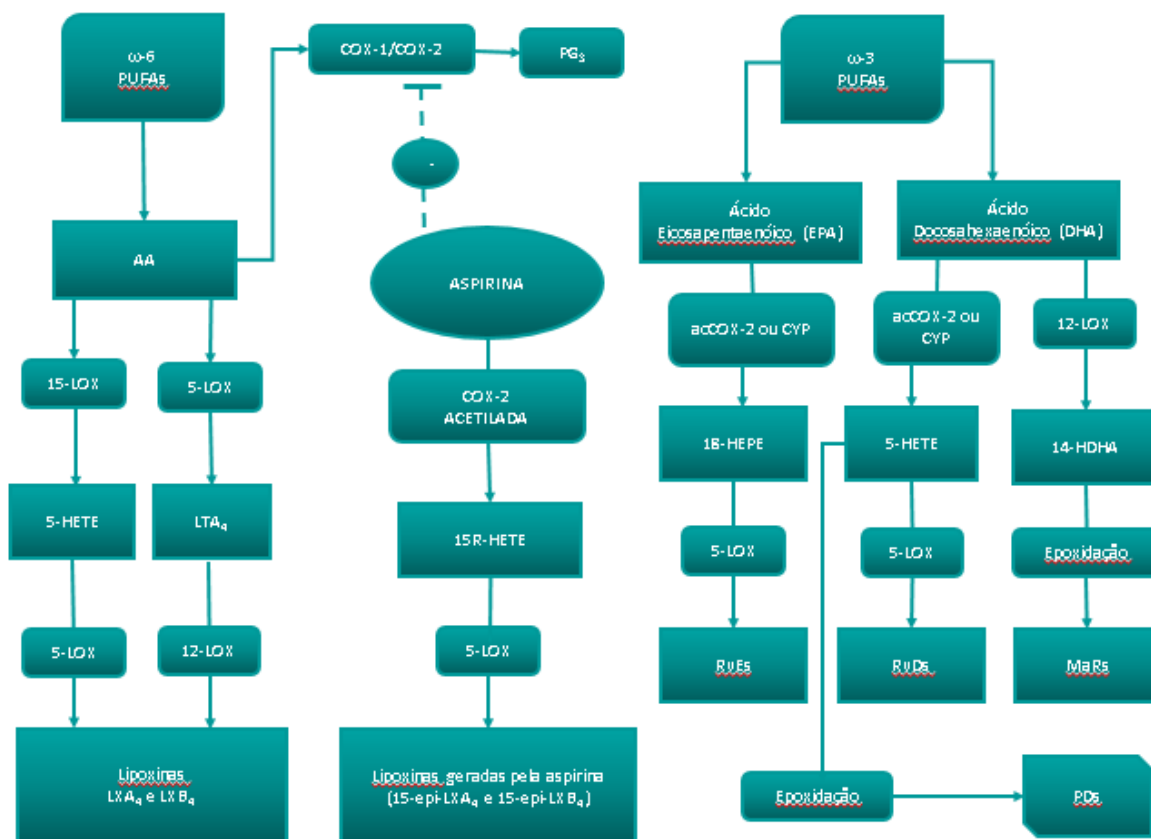


Figura 1 - Vias de formação dos mediadores lipídicos pró-resolução.

Legenda: O ácido araquidônico (AA) é derivado do derivado do lipídeo ômega-6 (ω -6) e pode ser convertido em lipoxinas pela ação das lipoxigenases. O lipídeo ômega-3 (ω -3) dá origem aos ácidos eicosapentaenóico, que forma as resolvins da série E, e docosahexaenóico, responsável pela formação das resolvins da série D, protectinas e maresinas que levam à formação das resolvins da série E e D, respectivamente. COX: ciclooxygenase; LOX: lipoxigenase; HETE: ácido eicosatetraenóico; acCOX-2: COX-2 acetilada; CYP: citocromo P450; LXA₄: lipoxina A₄; RvEs: resolvins série E; RvD: resolvins série D; MaRs: maresinas; PDs: protectinas.

Fonte: Adaptada de Martini e cols³⁴.

As LXs pertencem a uma classe de eicosanóides, geradas a partir do AA por meio da sequência de lipoxigenases e reações subsequentes para produzir eicosanóides específicos contendo trihidroxitetraeno. As LXs medeiam uma série de processos, incluindo: a redução de citocinas pró-inflamatórias; produção e inibição da proliferação celular; promoção do recrutamento dos monócitos e a estimulação da fagocitose dos leucócitos apoptóticos por macrófagos derivados de monócitos, sugerindo que LXs possam atuar como 'sinais de travagem' endógenos na defesa do hospedeiro, na

inflamação e reações de hipersensibilidade. Tem sido descrito em pesquisas com animais que injeções intratecais de LXs pode atenuar dor inflamatória e dor neuropática³⁶.

Em geral, as LXs bloqueiam a produção e a ação de LTB₄ e LTC₄ em leucócitos humanos^{37,38}. Uma das fundamentais funções das LXs é inibir o recrutamento de PMNs, a quimiotaxia e a transmigração por meio do endotélio, que são características importantes do processo anti-inflamatório. De fato, a transmigração de PMN por meio de monocamadas de células epiteliais polarizadas, bem como a adesão a células endoteliais vasculares, foi inibida por diferentes tipos de análogos de LXA₄³⁹. A LXA₄ e LXB₄ bloqueiam a migração de PMN inibindo a adesão dos PMN dependente de integrina β 2 e a mobilização de P-selectina dos corpos de Weibel-Palade, que medeia a adesão do PMN a célula endotelial⁴⁰. Além disso, os análogos de LXA₄ reduzem o rolamento e aderência de leucócitos atenuando a expressão de P-selectina⁴¹.

1.1.1.2 O receptor FPR2/ALXR

Os resultados obtidos a partir de diferentes experimentos indicam que peptídeos específicos, bem como mediadores lipídicos podem funcionar como ligantes para o mesmo receptor. A família dos genes receptores para peptídeos formilados (FPR, do inglês, *formyl peptide receptor*) em humanos possui três membros identificados: FPR1, FPR2 e FPR3, os quais codificam três receptores distintos^{42,43,44}. Nos seres humanos os 3 FPRs (FPR1, FPR2 e FPR3) regulam naturalmente as respostas inflamatórias. Os FPRs são a primeira linha de defesa contra a infecção, tais como granulócitos, neutrófilos e fagócitos da linhagem dos monócitos / macrófagos. Suas funções têm sido investigadas no contexto de recrutamento e ativação de leucócitos, na qual os FPRs promovem a motilidade celular por meio da quimiotaxia^{45,46}(Figura 2).

O FPR2/ALXR é o receptor de ligação das LXs com vias de sinalização específicas para cada tipo celular em tecidos como baço e pulmão, e em distintos tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos e micróglia. A interação da LXA₄ e FPR2 impede a migração de neutrófilos, enquanto em monócitos, a interação da LXA₄ ao receptor estimula a quimiotaxia de monócitos e outras respostas não flogísticas^{22,47,48,49}.

O receptor FPR2/ALXR pode reconhecer vários lípidos de meia vida curta, tais como: a LXA₄ e os seus análogos estáveis; proteínas e peptídeos, como a proteína amiloide sérica A (SAA, do inglês, *serum amyloid A protein*) e as derivadas de glicoproteínas virais⁴⁷.

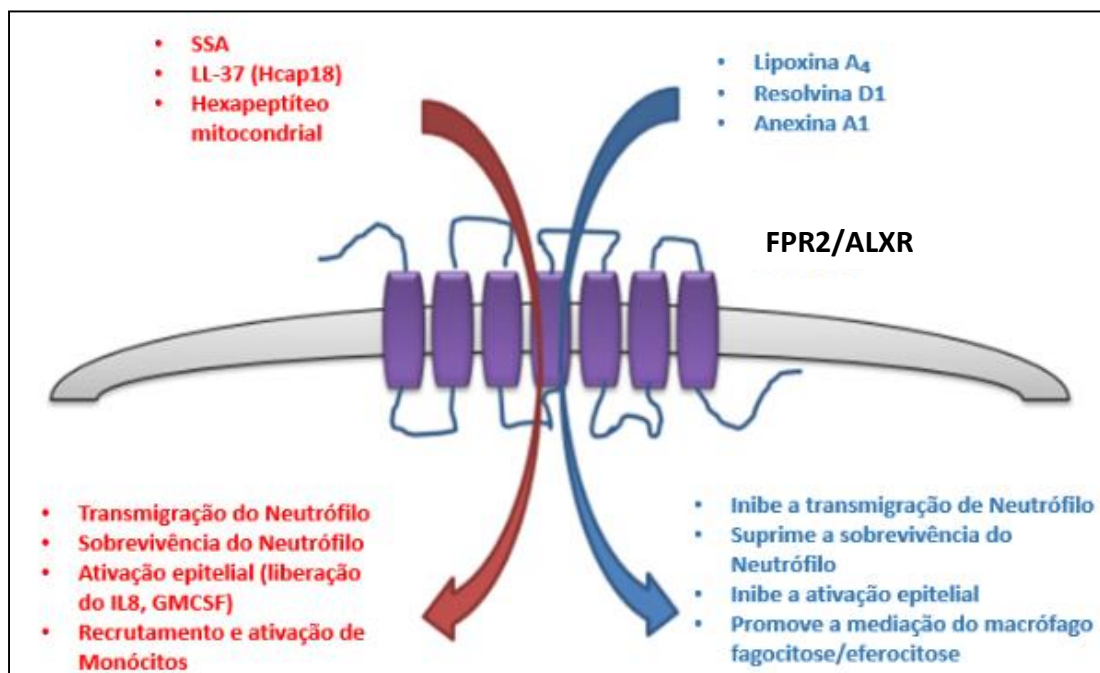


Figura 2 - Representação esquemática do receptor FPR2/ALXR.

Fonte: Adaptada de Bozinovski, Desiree, Ross⁵⁰.

Durante a fase pró-inflamatória, a resposta do hospedeiro à lesão ou a infecção é acompanhada por um rápido aumento no sangue de proteínas de fase aguda como a SAA⁴⁷. Dez anos atrás, a SAA foi um dos primeiros ligantes quimiotáticos pró-inflamatórios identificados para o receptor FPR2/ALXR, o que levou ao aumento da secreção de IL-8 após a ativação de NF- κ B em PMNs humanos^{51,52}. Evidenciou-se que estes peptídeos pró-inflamatórios/proteínas S demonstraram induzir ações inflamatórias através do receptor FPR2/ALXR, o que pode, portanto, desempenhar um papel pró-inflamatório²⁴.

Os efeitos anti-inflamatórios do receptor FPR2/ALXR tornaram-se evidentes quando LXA₄ foi identificada como um ligante endógeno para este receptor²⁴. Utilizando radioligantes isolados, foram caracterizados os sítios específicos de ligação para a LXA₄

em PMNs humanos e demonstraram ser responsáveis pela função específica de LXA₄⁵³. Mediadores 15-epi-LXA₄ e a LXA₄ têm ações compartilhadas para ativar a expressão de genes regulados por FPR2/ALXR e por sua capacidade de inibir a migração de PMNs em humanos através de células endoteliais^{54,55}. Demonstrou-se que a LXA₄ diminui a secreção de IL-8 induzida por SAA^{56,57} e a 15-epi-LXA₄ inibe a expressão das moléculas de adesão das células vasculares (VCAM, do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule*) e E-selectina em células endoteliais⁵⁸. Além da inibição da quimiotaxia e migração de PMN, a LXA₄ inibiu a secreção de TNF- α pelas células T⁵⁹, induziu quimiotaxia de monócitos sem citotoxicidade⁶⁰, e tem demonstrado promover a fagocitose de PMN apoptóticos por macrófagos humanos^{61,62,63}.

Achados de que mediadores lípidos endógenos específicos e certos peptídeos interagem com o mesmo receptor pode refletir, a nível genômico, na economia da utilização de uma estrutura receptora para múltiplos reconhecimentos e funções no sistema imune. Além disso, a competição entre estes agentes pró e anti-inflamatórios aponta para uma participação importante da FPR2/ALXR durante o aparecimento de doenças inflamatórias crônicas e sua resolução²⁴.

É provável que as LXs também possam atenuar a sensibilização e ativação de neurônios sensoriais através de suas propriedades antiinflamatórias e pró-resolutivas, limitando a liberação local de fatores inflamatórios²⁴. Vários estudos demonstram que muitos dos fatores atenuados pela interação dos mediadores lipídicos pró-resolução com seus receptores, entre eles a LXA₄ com o FPR2/ALXR, podem atenuar a dor por meio de diversos mecanismos atuando em diferentes células por reduzir a inflamação, a ativação glial e a plasticidade sináptica da medula espinal^{64,65,66,67}.

1.1.1.3 A AnxA1 como mediador anti-inflamatório e pró-resolutivo

Potentes agentes anti-inflamatórios e imunossupressores são explorados terapeuticamente para o tratamento de várias condições inflamatórias, como os hormônios GCs endógenos e exógenos. Durante o processo inflamatório, os GCs endógenos são produzidos pelas glândulas supra-renais e desempenham funções na resolução da resposta inflamatória. Os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores

dos GCs dependem de seus efeitos sobre vias de sinalização (transrepressão), tais como fator nuclear kappa B (NF-kB, do inglês *nuclear factor kappa B*) e da proteína ativadora 1 (AP-1, do inglês *activator protein 1*), bem como na indução gênica (transativação) de proteínas anti-inflamatórias. A maioria dos efeitos anti-inflamatórios dos GCs é desencadeado pela ação gênica, que leva a uma regulação positiva ou negativa da síntese de proteínas⁶⁸. O complexo GC-receptor penetra no núcleo celular no qual se liga a regiões promotoras de genes, denominadas elementos responsivos aos GCs (GRE, do inglês *glucocorticoid responsive elements*), resultando na indução da síntese de proteínas anti-inflamatórias como a AnxA1 e IL-10, e de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico^{69,70}.

A AnxA1, também conhecida como lipocortina, é uma proteína induzida por GCs, que inibe a síntese de eicosanóides por meio da inibição de fosfolipase A2, mimetizando várias das ações anti-inflamatórias dos GCs^{71,72}. O termo 'anexina' deriva de 'anexar', na qual está relacionado a algumas das funções que estas proteínas têm em comum como a capacidade de ligação a fosfolipídios de membrana, um processo que ocorre de forma dependente de Ca^{2+} . A AnxA1 é constituída por dois domínios: uma cauda na extremidade amino (N-terminal), que apresenta características variáveis de comprimento e composição de acordo com o tipo de proteína; e por um domínio central na proximidade da extremidade carboxílica (C-terminal). O domínio C-terminal é constituído por quatro sequências de aminoácidos repetidas, representadas pelos números de I a IV, e responsável pela afinidade da proteína ao Ca^{2+} . A região N-terminal é constituída por 44 aminoácidos e tem sido caracterizada como promotora da ação anti-inflamatória da proteína^{71,72,73,74}.

Em relação ao mecanismo de liberação e clivagem da AnxA1, em condições normais, são encontradas no citoplasma de neutrófilos, macrófagos e monócitos e abundante nas células diretamente envolvidas na resposta inflamatória. Após a ativação celular, a AnxA1 intracelular é ativamente mobilizada para a membrana plasmática e secretada por ativação do transportador ABC (ABC do inglês, *ATP-binding cassette*), fosforilação do resíduo de serina na porção N-terminal, ou fusão de grânulos de gelatinase contendo AnxA1 com a membrana plasmática (Figura 3)⁶⁸.

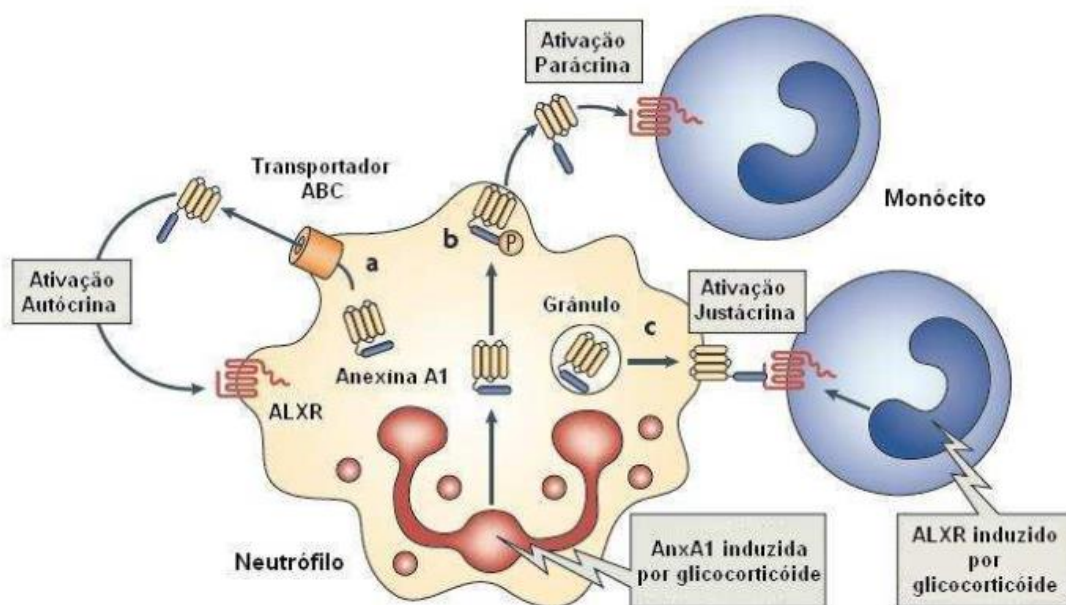


Figura 3 - Representação esquemática da mobilização e secreção de AnxA1 em células ativadas.

Legenda: Após ativação celular, a AnxA1 intracelular é mobilizada para a membrana plasmática e externalizada pelos seguintes mecanismos: (a) ativação do transportador ABC; (b) fosforilação do resíduo de serina e (c) fusão do grânulo com a membrana plasmática.

Fonte: Adaptada de Perretti, D'acqui⁶⁸.

A AnxA1 pode ativar a sinalização por mecanismos autócrinos, parácrinos ou justácrinos (contato célula-célula), envolvendo interação entre a AnxA1 na superfície da célula secretora e o receptor FPR2/ALXR da célula alvo (Figura 3). Este parece ser o mecanismo de ação mais plausível em condições inflamatórias⁶⁸. Em neutrófilos ativados pode-se encontrar grandes quantidades de AnxA1 citoplasmática (mais de 50%), que ao estarem expostas sobre a membrana plasmática do leucócito aderente, exercem uma ação inibitória, reduzindo a transmigração por meio das células endoteliais (Figura 4)^{68,75}.

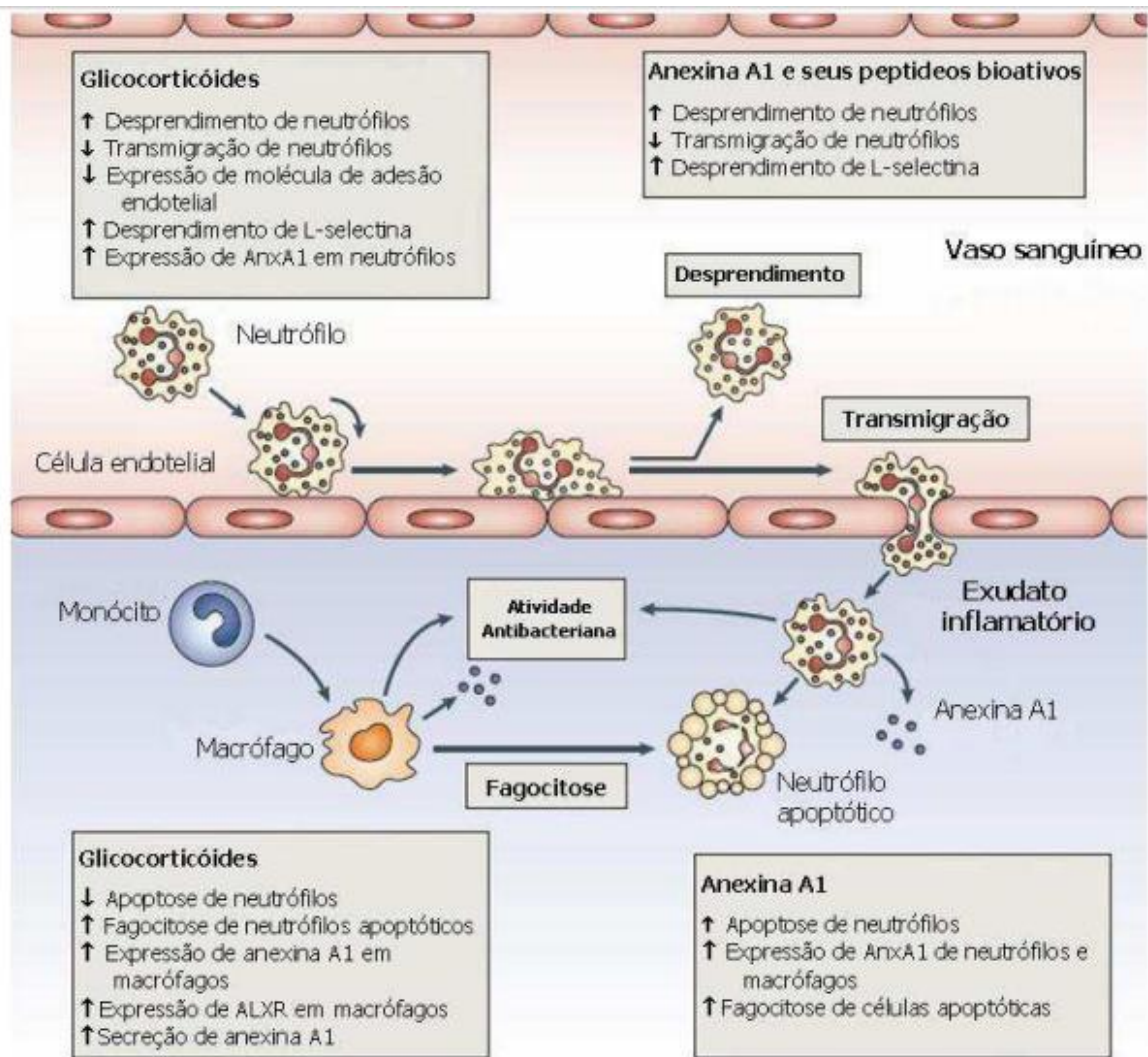


Figura 4 - Efeito dos GCs e AnxA1 na resposta inflamatória.

Legenda: AnxA1: anexina A1, ALXR: receptor para lipoxina A₄ (do inglês, *receptor lipoxin A₄*).

Fonte: Adaptada de Perretti e D'acquiisto ⁶⁸.

Estudos em modelos de inflamação aguda e crônica evidenciaram que a proteína AnxA1 inibe a transmigração de leucócitos para o sítio da inflamação. O mecanismo para este efeito da AnxA1 está relacionado com a inibição da atividade das moléculas de adesão nas interações leucócito-endotélio, principalmente as integrinas e selectinas⁷⁶. Além disso, a AnxA1 está envolvida com a inibição da enzima COX-2 e do óxido nítrico sintase induzida (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*), bem como, com a liberação de IL-10 em fagócitos, indução de apoptose de células inflamatórias *in vitro* e

a remoção de células e corpos apoptóticos^{77,78}.

A AnxA1 induzida por GCs e seu peptídeo derivado Ac2-26, gerado *in vivo*, também podem interromper a diapedese de PMN. Ambos (LXA₄ e AnxA1) anti-inflamatórios responsivos interagem diretamente com o FPR2/ALXR em humanos nas células renais embrionárias transfectadas com o FPR2/ALXR e em PMN primários⁷⁹. Em outro estudo demonstram que a AnxA1 inibiu a adesão de PMNs humanos, enquanto que Ac2-26 atenuou significativamente a captura e rolamento⁸⁰.

1.1.2 EA na dor e inflamação

Apesar da acupuntura ser utilizada há mais de 2.500 anos na Ásia para tratamento da dor, sendo sua eficácia analgésica reconhecida mundialmente, o seu mecanismo de ação ainda é estudado^{81,82}. Embora a medicina ocidental tenha um ceticismo significativo ao tratamento com acupuntura, uma ampla população mundial tem aceitado bem a sua prática. Por exemplo, a OMS apóia esse tratamento por pelo menos vinte quatro condições, e o *National Institutes of Health* dos EUA emitiu uma declaração de consenso propondo a acupuntura como uma intervenção terapêutica para a medicina complementar. Talvez o mais significativo fato ocorreu na Receita Federal dos EUA em aprovar a acupuntura como uma despesa médica dedutível em 1973^{81,82}.

Os pontos estimulados pelas agulhas de acupuntura podem ser selecionados de acordo com a terapia de acupuntura tradicional. Quando esta agulha recebe uma corrente elétrica denomina-se eletroacupuntura (EA). A estimulação elétrica periférica pode ser feita inclusive por meio de eletrodos colocados na pele (estimulação elétrica transcutânea do nervo, TENS, do inglês, *transcutaneous electrical nerve stimulation*) ou através de uma sonda inserida através da pele no tecido (estimulação nervosa elétrica percutânea, PENS, do inglês, *percutaneous electrical nerve stimulation*). Aponta-se que a variação das frequências da eletroestimulação mobilizam diferentes respostas neurobiológicas⁸³.

Assim, a EA tem sido realizada em casos de: dores musculoesqueléticas com origem por compressões nervosas ao longo da coluna vertebral⁸³, na qual as dores irradiam para membros superiores e inferiores^{84,85} no pós-operatório nas áreas da

ortopedia e traumatologia⁸⁶, odontologia⁸⁷, oncologia⁸⁸, nas cirurgias tem sido usado com o intuito de: reduzir a dor⁸⁹, melhorar a cicatrização⁹⁰, favorecer o retorno venoso⁹¹, reduzir processo inflamatório (fibrose, edema, equimose)⁹², reequilíbrio emocional⁹³, ansiedade⁹⁴ e sono⁹⁵.

O canal ou meridiano do estômago em humanos atravessa o dorso do pé e alcança a face medial do dedo médio do pé^{96,97}. O ponto *Stomach 36* (ST36) está localizado a 3 polegadas abaixo da patela entre o músculo tibial anterior e o músculo extensor longo dos dedos^{98,99}. Para a correspondência em animais, a anatomia topográfica da passagem da agulha de acupuntura neste ponto (Figura 5) percorre: a pele e tecido subcutâneo, a agulha atinge ramificações cutâneas surais laterais do nervo fibular comum abrangendo as fibras do quinto nervo lombar (L5); no músculo tibial anterior, atinge as ramificações do nervo fibular profundo contendo fibras do quarto nervo lombar ao primeiro sacral (L4, L5, S1) que inervam o músculo; na membrana interóssea, ressalta-se as ramificações do nervo fibular profundo que inervam a parte anterior da membrana interóssea; no músculo tibial posterior, este percorre a membrana interóssea posterior, entre os músculos flexores longo do hálux e longo dos dedos; e se a agulha for inserida medialmente a duas polegadas de profundidade, poderá penetrar no nervo tibial, artéria e veia tibial posterior^{98,99,100,101,102}.

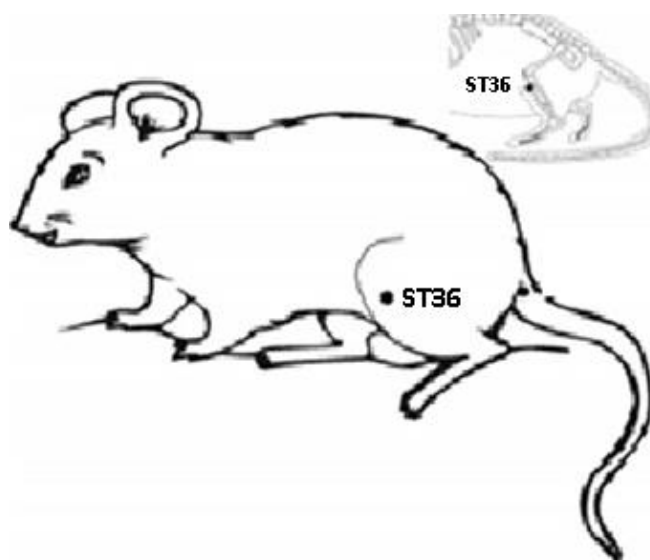


Figura 5 – Topografia do acuponto ST36 no modelo animal.

Fonte: Adaptado de Casasolo¹⁰⁰.

Indicado para transtornos do sistema nervoso e afecções crônicas de edema nas articulações¹⁰³. Ponto vital no tratamento dos membros inferiores, principalmente distúrbios de hipotrofia e hemiplegia; nas obstruções vasculares dolorosas predominantemente crônicas¹⁰⁴.

Além de ser indicado para as condições citadas anteriormente, tem sido evidenciado substanciais trabalhos mostrando o efeito da eletroestimulação do acuponto ST36 a dor e inflamação. Neste sentido, recentemente tem sido mostrado que a estimulação elétrica do acuponto ST36 aumentou a latência de retirada da face frente ao calor aplicado na face dos ratos. Os autores ainda demonstraram que esse efeito antinociceptivo do acuponto ST36 é mediado pela participação do NO na ativação das enzimas, como a NO sintase neuronal (nNOS, do inglês *neuronal nitric oxidesynthase*) e iNOS e por canais de K sensíveis ao ATP¹⁰⁵.

Almeida e cols (2017) demonstraram que a estimulação do acuponto ST36 é capaz de produzir antinocicepção térmica e mecânica em ratos. Adicionaram uma importante informação a literatura por avaliar os receptores do canal iônico sensível ao ácido (ASIC3 do inglês, *acid-sensing ion channel*) e dos receptores de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1 do inglês, *receptors of transient vanilloid potential 1*) na analgesia segmentar e sistêmica induzida pela EA¹⁰⁵. Observaram que a EA com baixa intensidade é parcialmente mediada por receptores ASIC3 em fibra A-β, enquanto que a analgesia sistêmica, induzida pela EA com alta intensidade, é mediada mais provavelmente por receptores TRPV1 expressos em fibras A-delta e do tipo C^{105,106}.

Em humanos, outro acuponto é *Spleen Pancreas 6* (SP6). Ponto localizado a três polegadas acima do maléolo medial, na borda póstero-medial da tíbia^{107,108,109}. Reunião dos três *Yin* (canal de baço, fígado, rim), na qual localiza-se a três distâncias da tíbia, acima do maléolo interno^{110,111}. Para correspondência em animais, como anatomia topográfica na passagem da agulha na pele e tecido subcutâneo pelo SP6 (Figura 6) as ramificações do nervo safeno com fibras do quarto nervo lombar (L4) que inervam a pele; nos músculos flexor longo dos dedos e do hálux, tibial posterior inervados pelas ramificações do nervo tibial contendo fibras do quinto nervo lombar e primeiro sacral (L5 e S1). Quando a agulha é inserida perpendicularmente passará por músculos flexores longos dos dedos, longos do hálux e sóleo, artéria e veias tibiais, membrana interóssea,

músculos extensores longo do hálux e dos dedos, osso tibial anterior ao tecido subcutâneo. Na inserção oblíqua posterior, poderá agulhar artéria e veia tibiais posteriores e nervo tibial e quando oblíqua inferior atravessará músculos flexores longos dos dedos e tibial posterior^{98,100,102}.

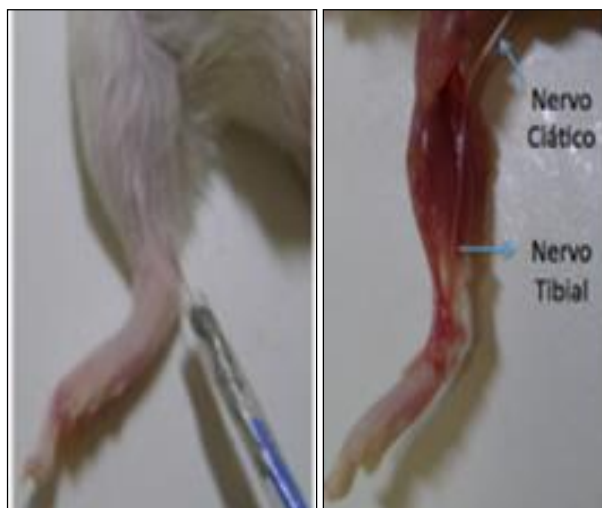


Figura 6 - Topografia do acuponto SP6 no modelo animal.

Legenda: Visualização do trajeto dos nervos ciático e tibial estimulados pela EA no modelo animal.

Fonte: Adaptado de Moré ¹⁰².

Este acuponto é indicado para tratar dismenorréia^{112,113}, enurese¹¹⁴, medo¹¹⁵, varizes¹¹⁶, diarreia, regulação da pressão arterial; disfunções da genitália feminina e masculina, espermatorréia, secreção vaginal, muco nas fezes, urina turva, prurido no escroto ou vagina, dificuldade ou retenção urinária, micção dolorida, alívio das dores, principalmente quando em baixo ventre ¹¹⁷. O SP6 interrompe a dor, principalmente na região inferior do abdome ^{118,119}, sendo indicado para a analgesia para cirurgia abdominal ^{120,121}.

Na última década, tem aumentado as investigações pré-clínicas sobre o mecanismo de ação da EA na dor persistente em tecido inflamado, lesão nervosa (neuropática), câncer e dor visceral. A EA alivia a dor inflamatória e neuropática de forma mais eficaz a 2-10 Hz do que a 100 Hz. A EA reduz a dor por liberar uma variedade de substâncias químicas bioativas em sítios por mecanismos periférico, espinal e supraespinal. Estes incluem opioides, que inibem a ativação dos nociceptores periféricos

e reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (periféricamente e centralmente), e serotonina e noradrenalina, que diminuem na via espinal a fosforilação da subunidade GluN1 do receptor NMDA. Estudos adicionais sugerem que a EA, quando combinada com baixas doses de analgésicos convencionais, fornece tratamento eficaz da dor¹²².

A EA ativa mecanismo descendente que modula as entradas nociceptivas no corno posterior da medula espinal. Na acupuntura três regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) são ativadas tais como: medula espinal, mesencéfalo e hipófise. A partir daí são liberadas substâncias químicas transmissoras, como endorfinas e monoaminas que reduzem a informação dolorosa¹²³. Um dos eventos envolvidos no mecanismo da analgesia induzida pela EA é a liberação de opioides periféricos no local da inflamação¹²⁴. A analgesia por acupuntura é um processo neurobiológico complexo influenciado também por hormônios, monoaminas, substâncias moduladoras, catecolaminas e transmissoras como a neurotensina, serotonina, colecistoquinina octapeptídeo, dopamina, noradrenalina, angiotensina II¹⁴. Destaca-se a dopamina como fundamental no potencial anti-inflamatório da EA, na qual inibe a produção das citocinas por meio dos receptores dopaminérgicos de tipo 1. Os agonistas D1 (dopaminérgicos) suprimem a inflamação sistêmica, na qual imitam o potencial anti-inflamatório da EA e podem fornecer vantagens no controle da inflamação em distúrbios infecciosos e inflamatórios^{125,126}.

Nos estudos da ativação de vias descendentes de resolução da inflamação pela EA, pesquisadores evidenciaram que o nervo vago controla a inflamação sistêmica em condições de isquemia experimental e reperfusão, hemorragia e ressuscitação, pancreatite, colite, endotoxemia, choque séptico e sepse grave. Esta via anti-inflamatória colinérgica inibe a ativação de macrófagos e a liberação de citocinas pró-inflamatória por meio da ativação do nervo vago^{125,127}. As ações antiinflamatórias da acupuntura por origem parassimpática são apoiadas pela observação de que a estimulação elétrica do nervo vago, em camundongos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS do inglês, *lipopolysaccharide*), inibe a síntese de TNF- α em células do sistema macrofágico mononuclear. Este efeito parece ser mediado pela ativação de receptores para acetilcolina do tipo nicotínico $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR, do inglês, *$\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor*) presentes nos macrófagos¹²⁵. Desta forma, a ação antiinflamatória da AM e EA por via

colinérgica pode justificar seu mecanismo fisiológico^{128,129}. Neste estudo, para evidenciar as reações do nervo vago, foi realizado a estimulação do ponto ST36 em camundongos anestesiados causando como resultado o aumento significativo da secreção ácida no estômago, o que não ocorreu quando eram submetidos à vagotomia¹²⁹.

Outro neuromodulador antinociceptivo liberado no sítio de inserção da agulha de acupuntura em camundongos é a adenosina, produzindo efeito local. Esta medeia os efeitos da acupuntura e o metabolismo dela pode prolongar o benefício clínico desta terapêutica. A injeção direta de um agonista do receptor A₁ mimetizou o efeito analgésico da acupuntura. Além disso, a inibição das enzimas envolvidas na degradação da adenosina promoveu o aumento da adenosina induzido pela acupuntura, bem como do seu efeito antinociceptivo¹³⁰. Eles ainda demonstraram que a acupuntura no ponto ST36 não causou efeito antinociceptivo em animais nocautes para o receptor A₁, e que a administração de agonista para o receptor A₁ administrado neste acuponto ST36 produziu efeito antinociceptivo similar ao efeito da agulha¹³¹.

Especificamente na EA, já está bem estabelecido que o mecanismo de ação é frequência dependente, ou seja, a EA de baixa frequência produz efeitos por liberar diferentes neurotransmissores daqueles liberados pela EA de alta frequência. Por exemplo: a analgesia induzida por estimulação de baixa frequência (4 Hz), mas não a induzida por estimulação de alta frequência (200 Hz), pode ser prevenida por baixas doses do antagonista opioide naloxona, sugerindo que a estimulação de baixa frequência pode aumentar a liberação de peptídeos opioides no SNC. Alterando a dose de naloxona ou usando vários antagonistas específicos do subtipo de receptor opioide, pode-se mostrar que a analgesia induzida por estimulação de baixa ou alta frequência é mediada por peptídeos opioides. A diferença foi que o primeiro foi mediado por receptores opioides μ e/ou δ , enquanto o último foi mediado por κ receptores opioides⁸⁴. Estes resultados sugerem que diferentes tipos de peptídeos opioides são liberados sob diferentes condições de estimulações.

A EA de baixa frequência (2 Hz) aumenta os níveis líquóricos espinais de encefalina, mas não os de dinorfina A. A β -endorfina e a endomorfina produzem efeitos similares aos da estimulação de baixa frequência. A EA de alta frequência (100 Hz) eleva os níveis líquóricos espinais de dinorfina A, mas não altera os níveis de encefalina. A EA

de alta frequência produz analgesia pela liberação de dinorfina A, agonista em receptores opióides κ , enquanto a estimulação de baixa frequência libera endomorfina e β -endorfinas, agonistas em receptores opióides δ e μ , e encefalinas. A EA induz a liberação de opióides endógenos da hipófise para o plasma e é suficientemente capaz de induzir analgesia^{132,133}.

Meng e cols (2011) descreveram que a EA a 10 Hz é mais efetiva em reduzir a alodinia mecânica quando comparada a EA a 100 Hz¹³⁴. EA de menor frequência tem um potente efeito inibitório na alodinia induzida por lesão nervosa periférica¹³⁵.

Estudos com EA em baixas e altas frequências utilizando o modelo de nocicepção inflamatória induzida pelo CFA tem demonstrado resultados interessantes. Em alguns estudos que utilizaram o mesmo ponto do presente estudo (ST36 e SP6) ou diferentes pontos são observadas reduções na hiperalgesia. Lao e cols (2004) observaram que a EA de 10 à 100 Hz no acuponto *Huantiao* (GB30) produziu efeito antihiperalgésico com melhor tempo de 20 min de tratamento¹⁰⁴; Huang e cols (2004) em uma sessão de EA com 100 Hz, com 10 minutos nos acupontos ST36 e SP6 observaram redução da hiperalgesia mecânica, mas não na hiperalgesia térmica¹³⁶ (Figura 7).

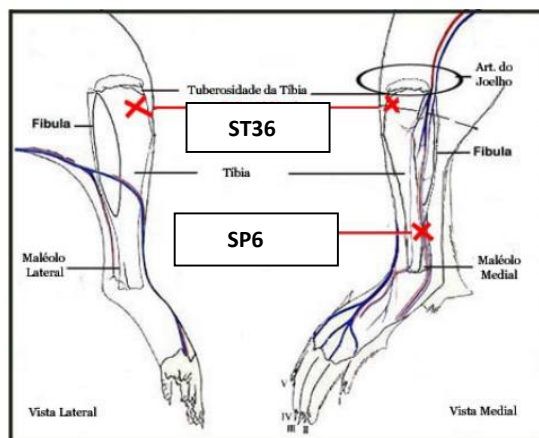


Figura 7 - Modelo esquemático da localização dos acupontos ST36 e SP6.

Fonte: Adaptada de Da Silva¹³².

Huang e cols (2008) investigaram o efeito antinociceptivo da EA em camundongos induzidos a nocicepção inflamatória com injeção de CFA na pata traseira. Interviram com a EA a 100Hz nos pontos análogos ao ST36 e SP6, aplicada uma vez por dia, 30 minutos de eletroestimulação, por 6 dias consecutivos. Os resultados mostraram que a

ação antinociceptiva da EA de 100 Hz foi significativamente aumentada em camundongos com nocicepção inflamatória induzida por CFA e que administração intraperitoneal de naloxona preveniu esse efeito¹³⁷.

Zhang e cols (2005) conduziram estudos em ratos *Sprague-Dawley* machos que receberam EA duas vezes por semana, no acuponto GB30, por 20 minutos, uma vez imediatamente após a administração de CFA na pata posterior, e novamente 2 horas pós-CFA, com parâmetros de 10 e 100 Hz, 3 mA, e largura de pulso de 0,1 ms. Obtiveram resultados de redução significativa do edema da pata posterior induzida por CFA na frequência de 10 Hz. Em 10 Hz a EA suprimiu a inflamação pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA – do inglês, *hypothalamus-pituitary-adrenal axis*)¹³⁰. Estes efeitos analgésicos produzidos pela EA em humanos e antinociceptivos em animais em diferentes acupontos, como ST36 e SP6 podem estar associados ao aumento de opioides endógenos no SNC^{138,139,140}.

No SNC este estímulo da EA é reconhecido e traduzido em três níveis: i) nível hipotalâmico, onde há ativação do eixo hipotálamo-hipófise que gera liberação de β -endorfinas (analgésicos), cortisol (anti-inflamatório) e serotonina (antidepressivo) na corrente sanguínea e no líquido encefálico raquidiano; ii) nível do mesencéfalo, onde ativa neurônios da substância cinzenta periaquedutal, que liberam endorfinas que estimulam a produção de serotonina e norepinefrina; iii) nível de medula espinal, onde ativa interneurônios na substância gelatinosa e liberam dinorfinas^{139,141}.

1.1.2.1 EA na resolução da inflamação

A hipótese de que a EA poderia induzir a resolução da inflamação, tanto quanto ela já produz efeito anti-inflamatório, surgiu da observação dos resultados de estudos feitos com AM ou EA. Estes estudos mostram efeitos muito similares aos observados quando se administra exogenamente substâncias pró-resolutivas, que tem em comum a ativação do receptor FPR2/ALXR. Neste contexto, Ji e cols (2016) investigaram os efeitos da EA sobre a expressão de COX-2 na microglia espinal em um modelo animal de dor neuropática. Os autores concluíram que a EA apresentou efetivo efeito analgésico e anti-inflamatório por diminuir a expressão do RNAm de COX-2 na microglia espinal¹⁴².

A diminuição da expressão de COX-2 também tem sido uma ação da AnxA1^{74,77,78}, LXA₄^{24,7} e RvD₁²⁴.

Outro interessante efeito pró-resolutivo é a apoptose de neutrófilos. Huan-Gan e cols (2007) investigaram o efeito da EA em promover apoptose de neutrófilos, utilizando um modelo de colite ulcerativa. Eles descobriram que a EA pode promover a apoptose de neutrófilos e a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) liberadas por monócitos¹⁴³.

Corroborando com estes dados, Da Silva e cols (2011) analisaram o efeito anti-inflamatório do acuponto SP6 na peritonite induzida pela carragenina em camundongos. Perceberam que tratamento no SP6 ou dexametasona inibiram o infiltrado de células inflamatórias, reduziram a permeabilidade vascular e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em camundongos injetados com carragenina. Além disso, o tratamento no SP6 também aumentou as concentrações de IL-10. Quando os animais foram adrenalectomizados, o efeito do tratamento no SP6 foi prevenido, com a redução de leucócitos totais e o extravasamento de plasmático¹⁴⁴.

Da Silva e cols (2015) ainda verificaram outro interessante efeito pró-resolutivo da acupuntura por analisar a mudança de fenótipo de macrófagos em um modelo de dor inflamatória em camundongos. Após injetar carragenina no músculo gastrocnêmio, foram tratados os animais com AM no acuponto SP6. Observaram que o tratamento reduziu o comportamento nociceptivo (hiperalgesia mecânica e ao calor), o edema, e aumentou as concentrações de IL-10 teciduais. O tratamento foi inefetivo em reduzir a hiperalgesia e edema em camundongos nocautes (^{-/-}IL-10) para IL-10. Notaram que o tratamento diário com o acuponto SP6 induziu uma mudança de fenótipo dos macrófagos do tecido muscular com uma redução dos macrófagos M1 (células pró-inflamatórias) e um aumento dos macrófagos M2 (células anti-inflamatórias e importante fonte de IL-10)¹⁴⁵.

Na resolução da inflamação, a hipótese da liberação de AnxA1 pela EA pode ativar o receptor FPR2/ALXR, pois a AnxA1 pode induzir a liberação de opioide pelos neutrófilos. É conhecida a via molecular de liberação tônica de opioide de neutrófilos na dor inflamatória que envolve a ativação do receptor FPR2/ALXR¹⁴⁶. Foi demonstrado que a liberação de opioide pode induzir analgesia na inflamação induzida por CFA e que depende da mobilização de Ca²⁺ intracelular, bem como, da ativação da enzima

fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K, do inglês *phosphatidylinositol-3-kinase*) - ambos conhecidos por serem sinais intracelulares do receptor FPR2/ALXR e AnxA1 – e que este efeito é mediado por receptores opioide μ e δ , e que quando é administrado a injeção local de antagonista FPR, este efeito pode ser bloqueado¹⁴⁷.

A analgesia induzida pela acupuntura é dependente da liberação de opioides. Especificamente, foi mostrado que a analgesia induzida pela estimulação de baixa frequência em pontos de acupuntura, mas não de alta frequência, pode ser prevenida por baixas doses do antagonista do opioide, a naloxona¹⁴⁸.

Outro importante mediador pró-resolutivo de origem lipídica que pode ter suas concentrações aumentadas e consequentemente ativar o receptor FPR2/ALXR é a LXA₄¹⁴⁹. Na biossíntese da LXA₄, quando os PMNs do sangue periférico humano são expostos a prostaglandina E₂ (PGE₂), como nos exudatos, eles mudam a biossíntese de eicosanóides das vias que produzem os LTB₄ pela ação da 5-lipoxigenase (5-LO) para a via que produz a LXA₄, um produto da 15-LO que cessa a infiltração de PMN. Ainda em relação a essa importante ação da 15-LO na biossíntese da LXA₄, tem sido demonstrado o papel da IL-4³⁴. Spanbroek e cols (2001) demonstraram que a IL-4 determina a formação de eicosanoides em células dendríticas por induzir uma regulação negativa da 5-LOX e uma regulação positiva da 15-LOX. Demonstrou-se que a IL-4 também induz a expressão do receptor FPR2/ALXR¹⁵⁰.

Paralelo a esses achados, Ouyang e cols (2010) verificaram um aumento das concentrações de IL-4 induzida pela EA no sangue periférico e fluído articular de pacientes com artrite reumatóide. Com base no exposto acima, especula-se que a EA possa induzir a liberação de IL-4 que regula positivamente a 15-LOX aumentando assim a produção de LXA₄ na inflamação reduzindo o processo inflamatório¹⁵¹.

Neste contexto, os objetivos investigaram o envolvimento das lipoxinas por meio da participação do receptor FPR2/ALXR periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA de baixa frequência em um modelo animal de inflamação periférica persistente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento do receptor FPR2/ALXR periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA de baixa frequência em um modelo animal de inflamação periférica persistente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito da EA na hiperalgesia mecânica e no edema em camundongos com inflamação persistente na pata;

Analisar o envolvimento do receptor FPR2/ALXR periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111 em camundongos com inflamação persistente na pata;

Investigar o envolvimento do receptor opioide periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111 em camundongos com inflamação persistente na pata;

Analisar a expressão do receptor FPR2/ALXR periférico e espinal no efeito da EA e do BML-111 em camundongos com inflamação persistente na pata;

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa é estudo não clínico do tipo experimental. Envolveu a manipulação de tratamentos na tentativa de estabelecer relações de causa e efeitos¹⁵².

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

As seguintes substâncias foram utilizadas: CFA (Sigma Chemical Co., St Luis, Missouri, EUA); BML-111 (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, MI, EUA); WRW4 (Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-NH₂, Tocris, Bioscience, Bristol, RU); Tween 80 e hidrato de cloral adquiridos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, BR); isoflurano (2-cloro-2-(difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano (Bio-Chimico, BR); naloxona (Tocris Cookson Inc., 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); membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA); anticorpo primário contra FPR2/ALXR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anticorpo primário contra β -actina-HRP (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); anticorpo secundário conjugado com peroxidase (cabra anti-coelho-HRP; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); *kit* de quimiluminescência (ECL; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

Os equipamentos usados foram: aparelho de EA NKL-608 (NKL produtos eletrônicos LTDA, Brusque, SC, BR); agulhas de acupuntura compatíveis a humanos e animais, de aço inoxidável medindo (0,18 x 8 mm, marca Dong Bang, República da Coréia); microseringa Hamilton de 25 μ l (Hamilton, Birmingham, RU); aparelho de anestesia inalatória NARCOFLUX (NARCOSUL, Porto Alegre, BR); monofilamento de *von Frey* (vF) de 0,6g da VFH (Chicago, EUA); micrômetro digital (*INSIZE*, Ribeirão Preto, SP, BR); fotodocumentador (ChemiDoc, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA); programa Image Lab (versão 4.1; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

3.3 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx), Campus Universitário Grande Florianópolis, unidade Pedra Branca, localizado no Bloco I2, da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), no período vespertino, usando camundongos machos Swiss (30 a 40 g) com idade de 45-60 dias, obtidos do Biotério da Central da UFSC. Os animais foram habituados na sala de experimentação a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 7h00), com acesso a ração *Nuvilab*® e água *ad libitum*. Os mesmos foram randomicamente alocados entre os grupos e aclimatizados na sala de experimentação por pelo menos 1 h antes dos testes e foram usados somente uma vez em cada experimento.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Um dia antes da indução da inflamação foram registradas as informações basais de hiperalgesia e edema de todos os animais. No dia seguinte os animais foram submetidos a injeção intraplantar (i.pl.) de CFA (item 3.5.1) para indução da inflamação periférica. O desfecho principal foi a hiperalgesia mecânica avaliada pelo teste de *von Frey*. Vinte e quatro horas após a indução da inflamação, diferentes grupos de animais foram tratados por diferentes tempos com EA (5', 10', 20') ou com BML-111 (0,3, 1, 3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l/s.c.}$)¹⁵³ e então foram avaliados em diferentes tempos após os tratamentos, na avaliação do decurso temporal do efeito da EA e do BML-111, afim de, determinar o tempo que produziu o melhor efeito anti-hiperalgésico. Após a determinação desse tempo (para EA) e dessa dose (para o BML-111), os demais desfechos foram analisados usando somente o grupo com o melhor parâmetro. A análise do edema foi realizada no quarto dia após CFA. Além disso, um segundo experimento foi realizado submetendo os animais com a pata inflamada ao tratamento no primeiro e no quinto dia com a EA ou com BML-111, que possibilitou determinar o possível efeito somatório dos tratamentos diários sobre a hiperalgesia mecânica e demais desfechos, sendo novamente realizada avaliação do decurso temporal do efeito dos tratamentos no quinto dia de tratamento (Figura 8).

Após a caracterização do efeito anti-hiperalgésico, o passo seguinte foi analisar o envolvimento do receptor FPR2/ALXR no efeito anti-hiperalgésico da EA e BML-111. Para isso, no primeiro e quinto dia após a injeção i.pl. de CFA, camundongos pré-administrados (i.pl. ou i.t.) com salina ou WRW4 foram tratados com BML-111 ou EA e 30 min após foi avaliada a hiperalgesia mecânica. Grupos para os respectivos controles também foram utilizados. O envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico da EA e BML-111 foi investigado no primeiro e quinto dia após a injeção i.pl. de CFA, neste sentido, camundongos pré-administrados com salina ou naloxona (i.pl. ou i.t.) foram tratados com BML-111 ou EA e 30 min após foi avaliada a hiperalgesia mecânica. Grupos para os respectivos controles também foram utilizados. Por fim, análises da expressão do receptor FPR2/ALXR nos tecidos da pata e medula espinal de animais tratados com EA ou BML-111 foram realizadas no segundo dia após CFA.

Segue a representação esquemática temporal na Figura 8 dos procedimentos experimentais deste estudo:

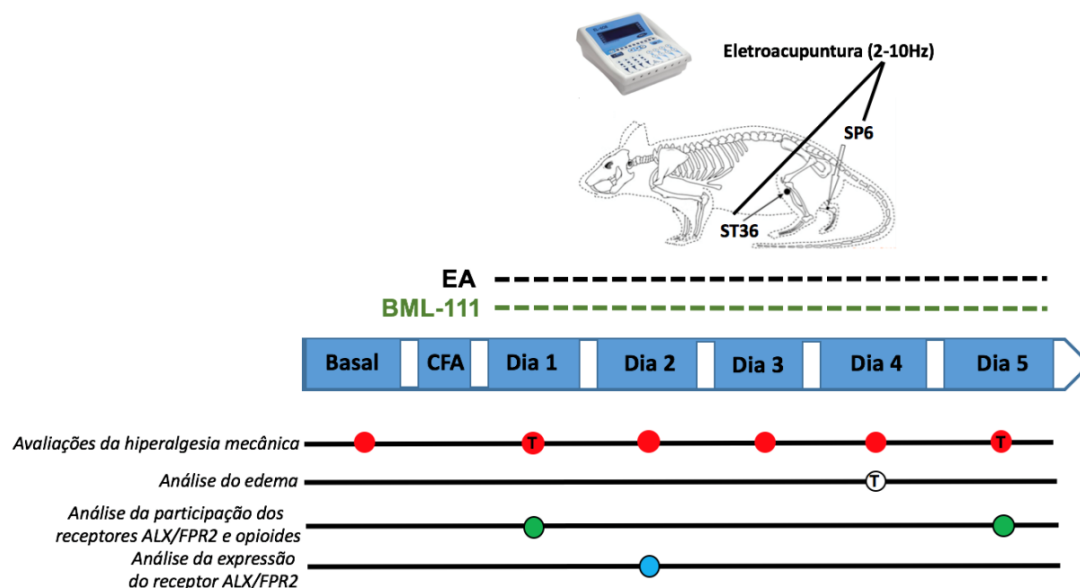


Figura 8 – Representação esquemática temporal dos procedimentos experimentais.
 Legenda: BML-111 - (5S,6R) - methyl 5,6,7-trihydroxyheptanoate; CFA – Adjuvante Completo de Freund; FPR2/ALXR - receptor 2 de peptídeos formilados; T – time-course.

3.5 TESTES

3.5.1 Modelo animal de hiperalgesia inflamatória persistente

Nesta pesquisa utilizou-se o modelo animal de inflamação periférica por meio da administração de CFA (1 mg/ml) em uma solução de 50%, dissolvido em solução salina e Tween®80. Cada animal recebeu 20 µl desta solução na pata direita^{106,154,155}.

3.5.2 Tratamento com EA ou BML-111 (análogo da LXA₄)

O tratamento com EA consistiu na estimulação elétrica dos pontos de acupuntura SP6 e ST36, por meio de um aparelho de EA NKL-608 com eletrodos conectados às agulhas de acupuntura compatíveis a humanos e animais, de aço inoxidável¹³³. Durante o tratamento, os animais foram levemente sedados com 1-2% de isoflurano à 100% de O₂ aplicado por meio de uma máscara nasal adaptada para camundongos (Figura 9).

O uso de pontos de acupuntura próximo ao local da lesão, por alguns pesquisadores, demonstra que podem ser mais eficazes a acupontos distantes da lesão para aliviar a dor^{156,157}. Desta forma, as agulhas foram inseridas no acuponto ST36 com ângulo perpendicular e no acuponto SP6 com ângulo oblíquo, ipsilateral a pata injetada com CFA^{102,137}. O acuponto ST36 está localizado no camundongo a três polegadas abaixo do joelho, em uma fossa entre os tendões dos músculos tibial anterior e extensor comum dos dedos^{103,120,121}. A agulha quando inserida no acuponto ST36, penetra as fibras do músculo flexor dos dedos e a ponta da agulha fica próxima ao nervo tibial. O acuponto SP6 está localizado na face medial do terço distal da pata posterior, entre a borda anterior do tendão calcâneo e a margem posterior da tíbia^{103,120,121}. Em camundongos, na transposição anatômica, está localizado na região proximal da tíbia, 0,5 mm acima do maléolo medial¹⁵⁸.

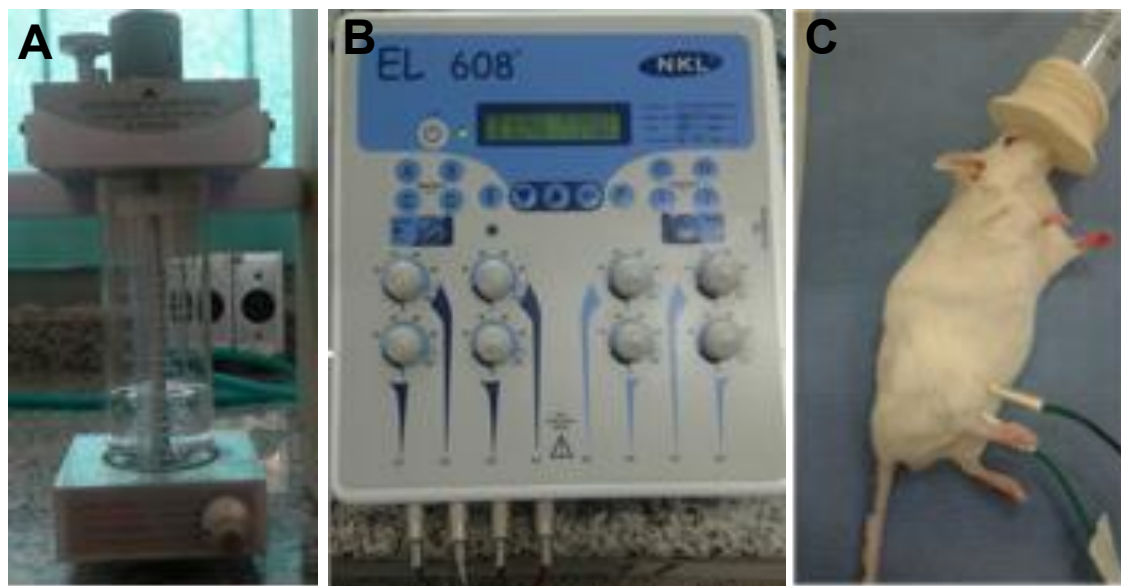


Figura 9 – Tratamento com EA.

Legenda: Realização da EA: vaporizador universal com isoflurano (painel A). Aparelho de EA (painel B). Tratamento com EA em animais sedados com isoflurano aplicado por meio de uma máscara nasal adaptada para os camundongos (painel C).

Os parâmetros de estimulação com EA seguiram estudos anteriores, como descrito a seguir^{102,103,104,105}. A frequência utilizada foi baixa e alternada de 2 e 10 Hz, pulso de 0,1 ms. Foram testados diferentes tempos de estimulação (5, 10 e 20 minutos) com corrente alternada, morfologia do pulso assimétrico balanceado e alternando os pólos positivo e negativo dos eletrodos. A intensidade da corrente utilizada foi a mínima necessária para que se observe uma leve contração dos músculos flexores dos dedos da pata posterior (geralmente atingida com uma corrente de 2 a 3 mA), na qual permitiu perceber pelos pesquisadores a corrente elétrica estimulando os acupontos. Durante todo o período da EA o grupo de animais tratados com EA permaneceram levemente sedados.

Após o término do tratamento, as agulhas foram retiradas e os animais foram recolocados nosacrílicos para o teste da hiperalgesia mecânica ou mensuração do edema após 15 minutos das aplicações da EA. Um grupo controle para anestesia foi submetido a inalação com isoflurano por 20 minutos, porém, a inserção de agulha de AM ocorreu sem manipulação e sem a utilização da EA nos acupontos SP6 e ST36.

Outros grupos de animais foram tratados por meio da administração de BML-111 (0,3, 1 e 3 µg/100 µl, s.c. por animal) sendo avaliados nos mesmos tempos que os animais que receberam EA. Outros grupos de animais (BML-111 doses de 0,3 e 1 µg/100 µl, s.c.) receberam administrações somente no primeiro e no quinto dia.

3.5.3 Mensurações da hiperalgesia mecânica

O teste foi aplicado nos animais colocando-os individualmente em câmaras de observação feitas em acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre uma plataforma (70 x 40 cm) feita de tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior direita. A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando os monofilamentos de *von Frey* (0,6 g). A frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de *von Frey*, foi registrada em porcentagem e utilizada como indicativo de resposta hiperalgésica. No dia anterior ao estímulo de EA, os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal, sendo que, apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta em torno de 20% ou menos foram selecionados.

O filamento foi aplicado na superfície plantar da pata posterior direita^{159,160}, atendendo a alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro patas estiveram acomodadas sobre a tela; e foi considerada resposta positiva o levantamento da pata posterior direita inflamada (Figura 10).

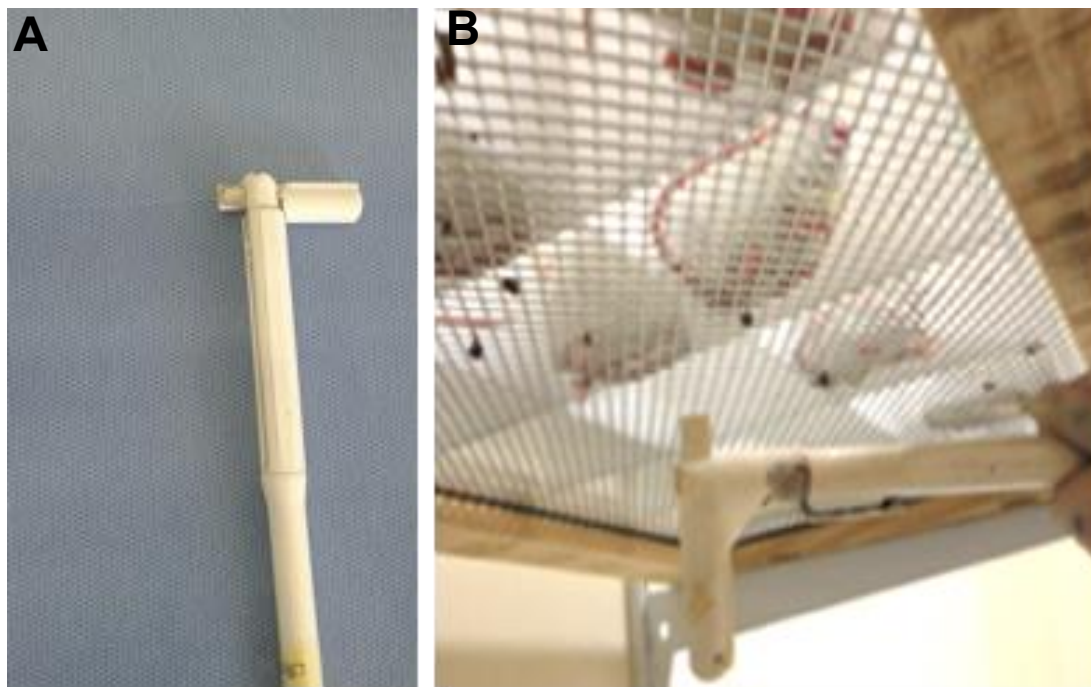


Figura 10 – Teste de von Frey. Filamento de *von Frey* 0,6 g (painel A). Aplicação do filamento de *von Frey* (painel B).

3.5.4 Mensuração do edema de pata

Para verificar o edema de pata foi utilizado um micrômetro digital da marca *INSIZE* (Figura 11). O edema foi avaliado pré- e pós a injeção i.pl. de CFA, assim como após a avaliação da hiperalgesia mecânica. As medidas foram obtidas de cada grupo e foram expressas pela diferença do valor obtido nas mensurações basal e nas subsequentes, e comparativamente com as diferenças entre as espessuras do coxim da pata experimental e controle¹⁶¹. Para a realização deste experimento foram utilizados os mesmos animais do teste de *von Frey*, pois trata-se de uma análise não invasiva e não dolorosa.

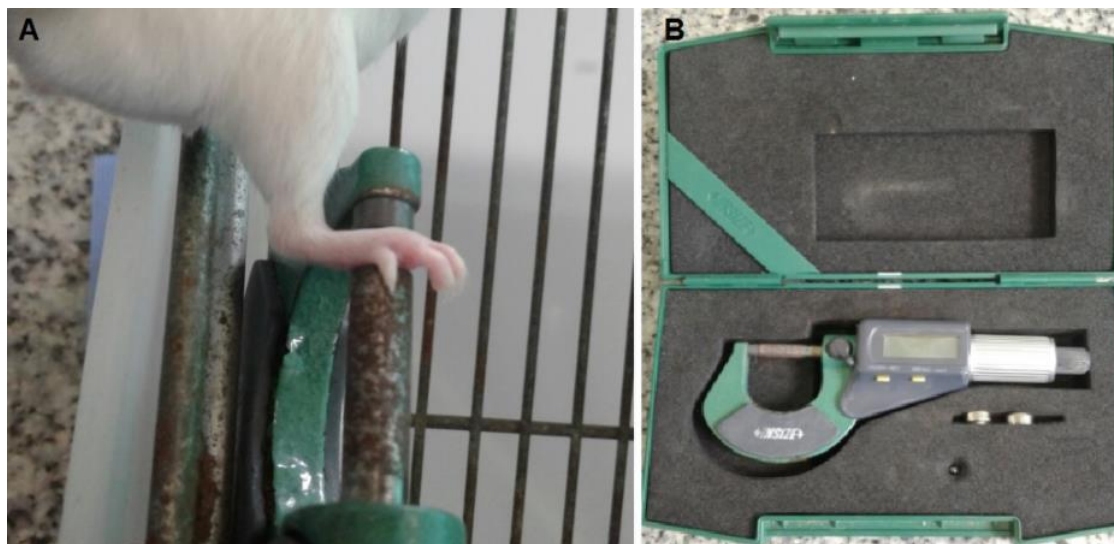


Figura 11 – Mensuração do edema. Análise da espessura da pata (painel A). Micrômetro digital (painel B)^{162, 163}.

3.5.5 Avaliação do envolvimento dos receptores FPR2/ALXR periféricos e espinais no efeito anti-hiperalgésico da EA

A fim de avaliar o envolvimento do receptor FPR2/ALXR periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico do BML-111 e da EA, no primeiro e no quinto dia após a injeção i.pl. de CFA, os animais foram pré-tratados com WRW4 (antagonista para o receptor FPR2/ALXR) por via i.pl. (3 ou 10 µg/sítio) ou via intratecal (i.t., 3 ou 10 µg/sítio) ou salina (5 µl ou 20 µl, i.t. ou i.pl., respectivamente). Quinze minutos após as administrações, os animais receberam tratamento sham de AM (agulhamento nos acupontos ST36 e SP6 conectados ao aparelho) ou EA. A hiperalgesia mecânica foi avaliada trinta minutos após os tratamentos, conforme descrito no item 3.5.3. Outros grupos de animais com inflamação na pata foram pré-tratados somente com salina ou WRW4 e 15 min após receberam os tratamentos nos mesmos dias com BML-111 (0,3 µg/100µl/s.c.) ou salina (100 µl/s.c.). Quinze minutos após os tratamentos foi avaliada a hiperalgesia mecânica nestes grupos.

3.5.6 Avaliação do envolvimento dos receptores opioides periféricos e espinais no efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111

A fim de avaliar o envolvimento do receptor opioide periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico do BML-111 e da EA, no primeiro (fase precoce) e no quinto dia (fase tardia) após a injeção i.pl. de CFA, os animais foram pré-tratados com naloxona (antagonista não seletivo para receptores opioides) por via i.pl. (5 µg/sítio) ou via i.t. (5 µg/sítio) ou salina (5 µl ou 20 µl, i.t. ou i.pl., respectivamente). Quinze minutos após as administrações, os animais receberam tratamento sham de AM (agulhamento nos acupontos ST36 e SP6 conectados ao aparelho) ou EA 20 min. A hiperalgesia mecânica foi avaliada trinta minutos após os tratamentos, conforme descrito no item 3.5.3. Outros grupos de animais com inflamação na pata foram pré-tratados somente com salina ou naloxona e 15 min e após receberam os tratamentos nos mesmos dias com BML-111 (0,3 µg/100µl/s.c.) ou salina (100 µl/s.c.). Quinze minutos após os tratamentos foi avaliada a hiperalgesia mecânica nestes grupos.

3.5.7 Análise da expressão do receptor FPR2/ALXR por imunoeletroforese – *Western Blotting*

3.5.7.1 Preparação das amostras

Amostras de medula espinal e da pele superfície ventral da pata foram obtidas e armazenadas a -80 °C até o seu processamento¹⁶⁴. As amostras da medula espinal foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micropistilos) em tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% e em seguida, incubados em gelo por 30 minutos. As amostras de pele da pata foram pulverizadas e incubadas em tampão de lise RIPA no gelo por 30 minutos. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante (correspondente ao extrato total) foi coletado, sendo uma alíquota separada para a dosagem de proteína em cada amostra, a qual foi

determinada através do método de Bradford¹⁶⁵. Ao restante do sobrenadante, foi adicionado o tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%) na proporção de 1:6. As amostras foram fervidas (95 °C; 5 min) e permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

3.5.7.2. Separação de proteínas e imunodeteção

Para a realização dos ensaios de imunodeteção, todas as amostras foram mantidas em gelo até o completo descongelamento. Após, quantidades iguais de proteínas para cada amostra (60 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (8%). A etapa de transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno) foi realizada sob as seguintes condições: 90 V e 30 mA por 1 h e 30 min. Em seguida, as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%) para visualização das proteínas. Após lavagens em TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, Tween-20 0,05%), para a retirada do excesso do corante, as membranas foram imersas em solução de TBS-T contendo BSA 5%, por 1 h a temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas. Na sequência, as membranas foram incubadas durante 14-16 h (2-8 °C), sob agitação, com os anticorpos primários, diluídos em TBS-T contendo BSA 1%, contra as proteínas de interesse: FPR2/ALXR (1:500; sc-66901) e β -actina-HRP (1:45000). Ao término do período de incubação, as membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T, e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:10000, cabra anti-coelho-HRP) (exceto para anti-actina-HRP) por 1 h em temperatura ambiente. Após esse período, uma nova lavagem de 30 minutos com TBS-T foi então realizada seguida pela exposição das membranas durante 1 minuto ao *kit* de quimiluminescência e revelação através de um fotodocumentador. As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa Image Lab. Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a β -actina, e expressos graficamente como unidades arbitrárias¹⁶⁴.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – quadro de variáveis do estudo.

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Hiperalgesia mecânica	Dependente	Quantitativa Contínua	Frequência de resposta (%). Média ± Erro padrão da média
Edema	Dependente	Quantitativa Contínua	Espessura da pata (µm). Média ± Erro padrão da média
Participação do receptor FPR2/ALXR	Dependente	Quantitativa Contínua	Frequência de resposta (%). Média ± Erro padrão da média
Participação dos receptores opioides	Dependente	Quantitativa Contínua	Frequência de resposta (%). Média ± Erro padrão da média
Expressão do receptor FPR2/ALXR	Dependente	Quantitativa Contínua	Unidade arbitrárias Média ± Erro padrão da média
EA	Independente	Quantitativa Contínua	5', 10', 20'
BML-111	Independente	Quantitativa Contínua	Frequência de resposta (%). Média ± Erro padrão da média

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados no programa *Graph Pad Prism* na versão 6.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Foi avaliada a distribuição dos dados por meio do teste de *Shapiro – Wilk*. Desta forma, os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados paramétricos foram comparados usando análise de variância

(ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de *Student Newman-Keuls* ou *Bonferroni*, respectivamente. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi encaminhado para Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL e aprovado, sob o protocolo número 17.002.2.07.IV. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes¹⁶⁶, assim como os aspectos éticos da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a utilização de Animais para fins científicos e didáticos – DBCA, 2016. Esta Diretriz, assim como a legislação brasileira, estabelece a responsabilidade primária em determinar se a utilização de animais for devidamente justificada e garante a adesão aos princípios de substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*). O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram o mínimo necessário para demonstrar o efeito do tratamento recebido.

A Morte Indolor Assistida/Eutanásia (MIA) dos animais foi realizada por meio de uma injeção intraperitoneal de uma dose excessiva de anestésico de acordo com a resolução 1000, 12/05/2012 - Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) sob a supervisão de médico veterinário responsável. A dose é uma mistura xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg) em cada animal é injetado 0,7 ml. O médico veterinário responsável pelo procedimento de MIA foi Geraldo Jorge Severgnini Bernardes (matrícula na UNISUL - 7068) e CRMV 0452-SC.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA EA NA HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que a injeção i.pl. de CFA induziu um aumento da frequência de resposta de retirada da pata (hiperalgesia mecânica) dos animais quando comparados com o período pré-injeção. A hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral dos animais persistiu por 5 dias quando avaliados (Figs. 12A-C).

Os resultados apresentados na Figura 12A, demonstram que no primeiro dia após injeção i.pl. de CFA, o tratamento agudo com EA 20 min produziu redução significativa da hiperalgesia mecânica em 0,5 h e 1 h após tratamento, com inibição de $64 \pm 5\%$, 0,5 h após o tratamento. O grupo de animais tratados com EA 10 min reduziu a hiperalgesia mecânica somente 0,5 h após o tratamento com inibição de $35 \pm 10\%$ (Fig. 12A). No grupo de animais com hiperalgesia e tratado com EA por 5 min não se notou diferença na frequência de retirada da pata (Fig. 12A). O tempo de 20 minutos foi o melhor tempo de EA na redução da hiperalgesia mecânica. O tratamento diário com EA 20 min (1 vez ao dia) reduziu ($p < 0,001$) a frequência de resposta de retirada da pata dos camundongos por 5 dias consecutivos (Figura 13B).

A Figura 12C demonstra que no quinto dia após injeção i.pl. de CFA, o tratamento com EA 20 min promoveu redução significativa da hiperalgesia mecânica por até 2 h com inibição de $65 \pm 13\%$, 1 h após tratamento.

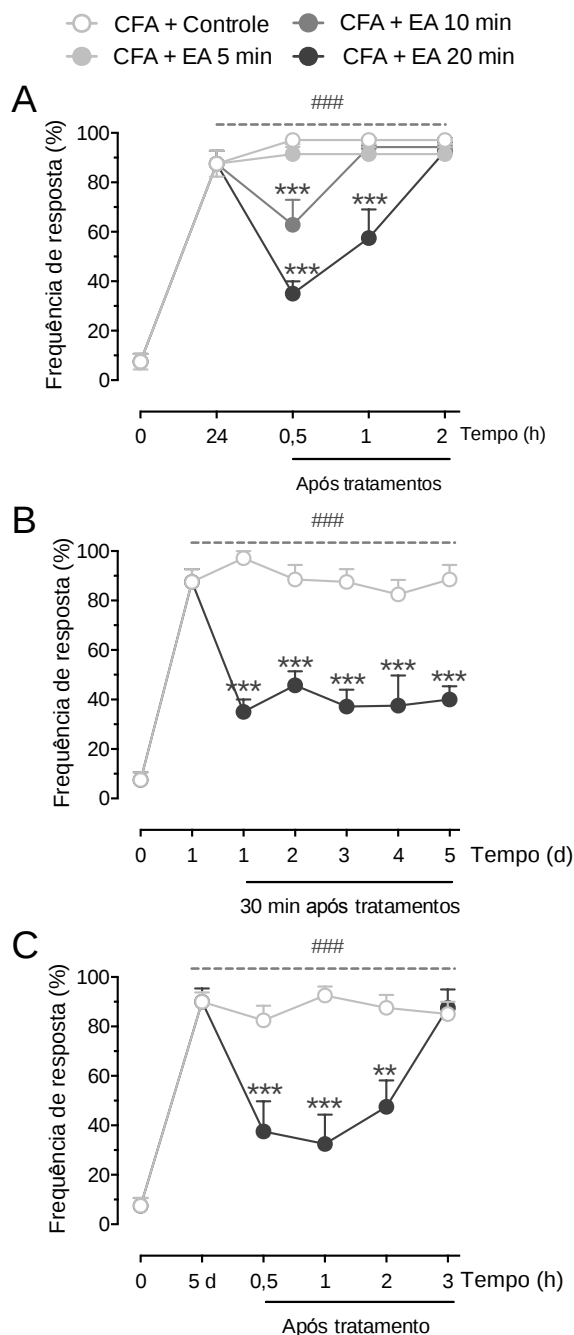


Figura 12 – Efeitos da EA na hiperalgesia mecânica.

Legenda: Avaliação do decurso temporal do tratamento agudo no 1º dia (painel A). Avaliação do tratamento diário por 5 dias consecutivos (painel B). Avaliação do decurso temporal do tratamento crônico no 5º dia (painel C). Os valores representam a média $\pm$ EPM ($n = 8$ animais). ### $p < 0,001$ quando comparado com a condição pré-CFA (tempo 0). Considera-se ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo CFA + Controle. Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. EA: eletroacupuntura; CFA: adjuvante completo de Freund; d: dias; h: horas.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM BML-111 NA HIPERALGESIA MECÂNICA

Os resultados da Figura 13A, demonstram que no primeiro dia após injeção i.pl. de CFA, o tratamento agudo com BML-111 (0,3-3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$), administrado por via subcutânea, promoveu redução significativa da hiperalgesia mecânica com inibição máxima de $59 \pm 8\%$ na dose de 0,3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ avaliado 30 min após o tratamento. O tratamento com BML-111 (0,3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, s.c.) (1 vez ao dia) reduziu a frequência de resposta de retirada da pata dos camundongos no primeiro ($p < 0,001$), terceiro ($p < 0,05$) e quinto ($p < 0,05$) dia (Figura 13B). A Figura 13C demonstra que no quinto dia após injeção i.pl. de CFA, somente o tratamento com BML-111 (0,3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, s.c.) promoveu redução significativa da hiperalgesia mecânica com inibição de $34 \pm 11\%$, 30 min após o tratamento.

○ CFA + Controle ◆ CFA + BML-111 (1 µg/s.c)
 ▲ CFA + BML-111 (0,3 µg/s.c) ● CFA + BML-111 (3 µg/s.c)

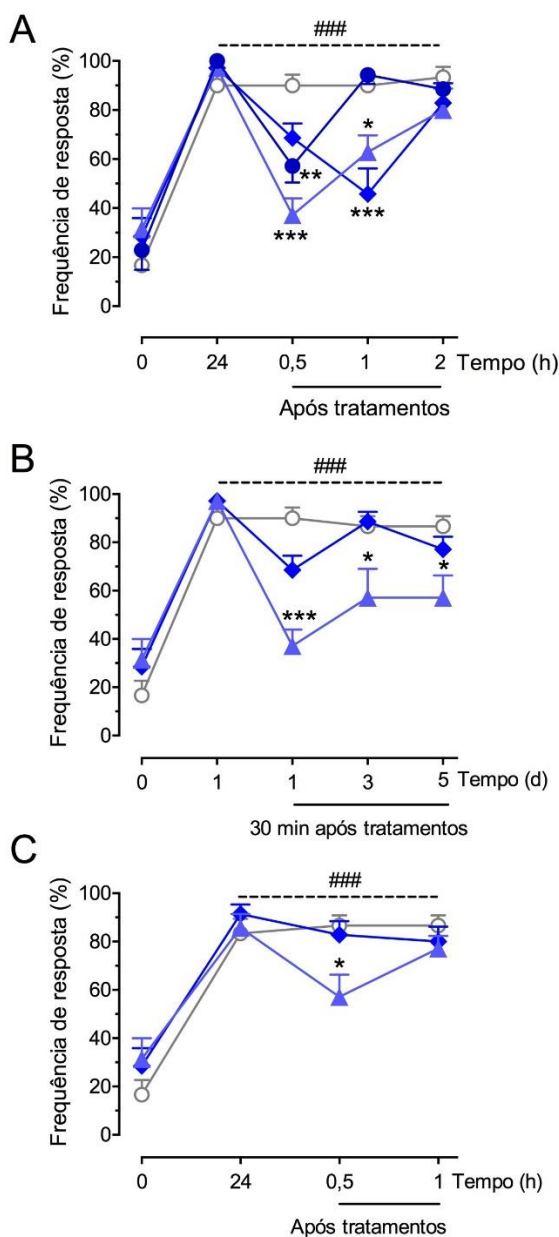


Figura 13 – Efeitos do tratamento com BML-111 na hiperalgesia mecânica. Legenda: Avaliação do decurso temporal do tratamento agudo no 1º dia (painel A). Avaliação do tratamento diário por 5 dias consecutivos (painel B). Avaliação do decurso temporal do tratamento crônico no 5º dia (painel C). Os valores representam a média ± EPM (n = 8 animais). ####p < 0,001 quando comparado com a condição pré-CFA (tempo 0). Considera-se *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 quando comparado com o grupo CFA + Controle. Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. EA: eletroacupuntura; CFA: adjuvante completo de Freund; d: dias; h: horas.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EA E DO BML-111 NO EDEMA DE PATA

Os resultados apresentados na Figura 14 demonstraram que a injeção i.pl. de CFA induziu edema robusto ($p < 0,001$) de pata nos animais caracterizando o modelo animal de dor inflamatória. O tratamento diário por 4 dias consecutivos com EA, com o tempo que melhor reduziu a hiperalgesia mecânica, não foi capaz ($p > 0,05$) de reduzir o edema de pata avaliada no 4º dia. Além disso, o tratamento com BML-111 com a dose que melhor reduziu a hiperalgesia mecânica também falhou em reduzir ($p > 0,05$) o edema de pata.

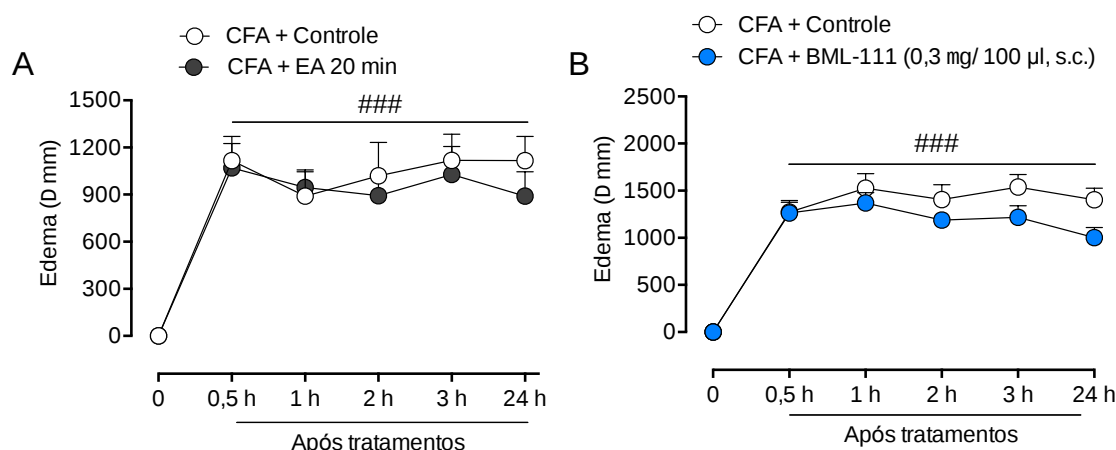


Figura 14 – Efeito do tratamento com EA e BML-111 no edema de pata.

Legenda: Avaliação do decurso temporal do tratamento com EA no 4º dia após injeção i.pl. de CFA (painel A). Avaliação do decurso temporal do tratamento com BML-111 no 4º dia após injeção i.pl. de CFA (painel B). Os valores representam a média $\pm$ EPM ($n = 8$ animais). Análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. ### $p < 0,001$ quando comparado com a condição pré-CFA (tempo 0). EA: eletroacupuntura; CFA: adjuvante completo de Freund; h: horas.

4.4 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALXR PERIFÉRICO NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA E DO BML-111

A Figura 15 demonstra que a administração i.pl. de WRW4 na dose de 10 μ g/sítio, mas não de 3 μ g/sítio em animais com inflamação na pata foi capaz de prevenir ($p < 0,01$) o efeito anti-hiperalgésico induzido pela BML-111 (painel A) e pelo tratamento com

EA (painel B, $p < 0,01$) no primeiro dia após a injeção com CFA. Além disso, no quinto dia após a injeção com CFA também foi evidenciado que a dose de 10 $\mu\text{g}/\text{i.pl.}$ de WRW4 preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido por ambos tratamentos, BML-111 (painel C, $p < 0,01$) e EA (painel D, $p < 0,01$).

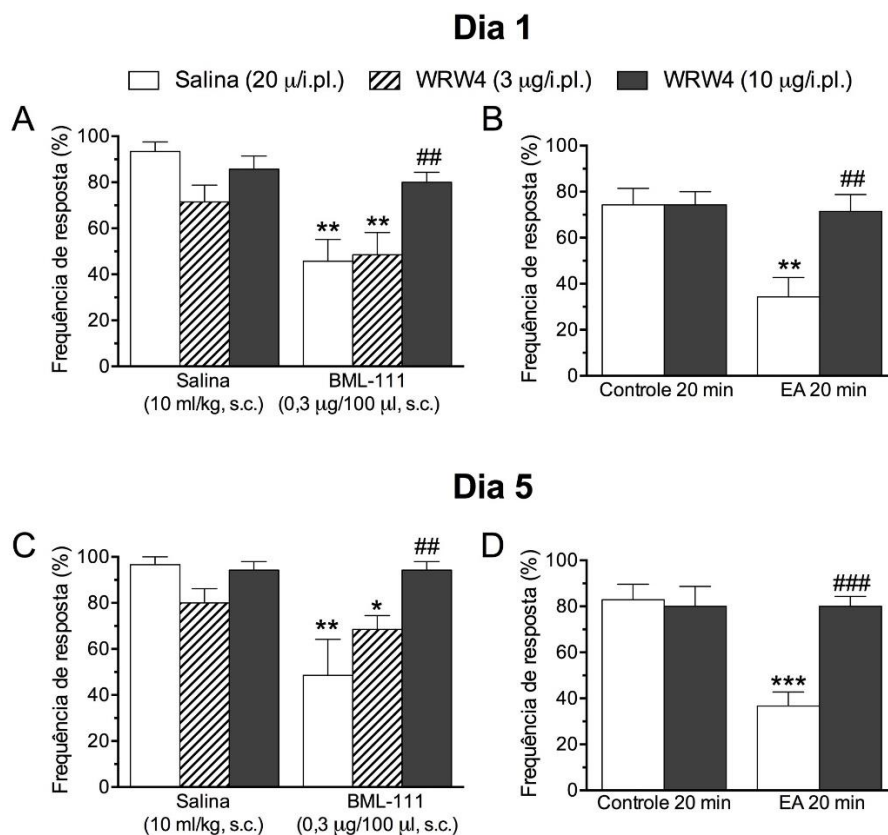


Figura 15 - Envolvimento do receptor FPR2/ALXR periférico no efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111.

Legenda: Efeito da administração intraplantar de WRW4 contra o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (painel A) e da EA (painel B) no primeiro dia após o adjuvante completo de Freund. Efeito da administração intraplantar de WRW4 contra o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (painel C) e da EA (painel D) no quinto dia após o adjuvante completo de Freund. Os valores representam a média $\pm$ EPM ($n = 8$ animais). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Salina (20 $\mu\text{l}/\text{i.pl.}$) + Salina (10 ml/kg, s.c.). Considera-se ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Salina (20 $\mu\text{l}/\text{i.pl.}$) + BML-111 ou com o grupo Salina (20 $\mu\text{l}/\text{i.pl.}$) + EA. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls*. EA: eletroacupuntura.

4.5 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EA, BML-111 OU WRW4 SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR FPR2/ALXR NA PATA

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram que animais naïve expressam na superfície ventral da pata o receptor FPR2/ALXR e que dois dias após a injeção i.pl. de CFA há um aumento ($p < 0,05$) da expressão deste receptor. Este aumento também foi evidenciado nos grupos que receberam a injeção i.pl. de CFA e que foram tratados com EA 20 min ($p < 0,01$), BML-111 ($p < 0,01$) e WRW4 ($p < 0,05$).

Interessantemente foi observado que os animais que foram pré-administrados com uma injeção i.pl. de WRW4 (um antagonista seletivo para o receptor FPR2/ALXR) e tratados com EA 20 min ($p < 0,05$), apresentaram uma menor expressão do receptor FPR2/ALXR na pata, quando comparados com os animais que receberam apenas EA 20 min. O grupo de animais que foi pré-administrado com WRW4 e tratado com BML-111 apresentou valores menores ($p > 0,05$), mas não significativos, na expressão do receptor FPR2/ALXR quando comparado ao grupo que foi tratado apenas com BML-111 (Figura 16).

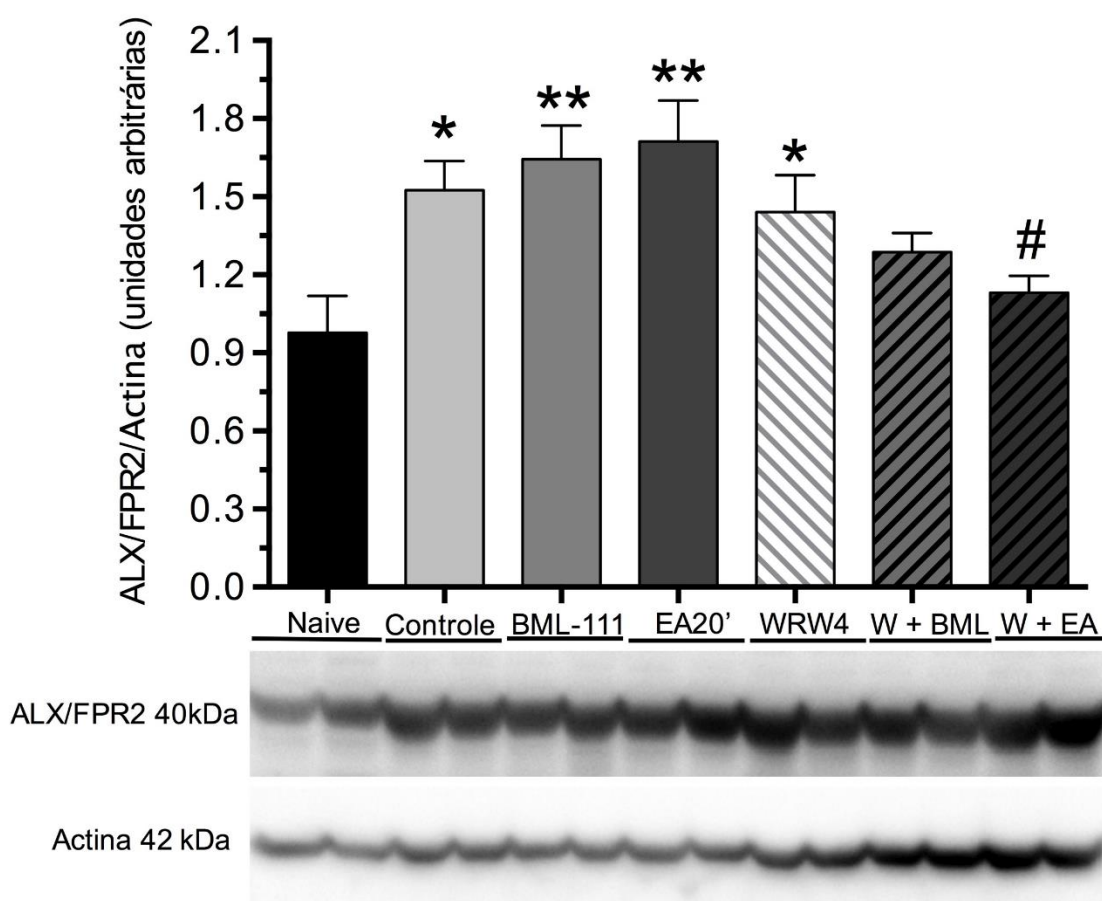


Figura 16 - Efeitos dos tratamentos com EA, BML-111 ou WRW4 sobre a expressão do receptor FPR2/ALXR na pata.

Legenda: Análise da expressão do receptor FPR2/ALXR na pata no segundo dia após injeção i.pl.do adjuvante completo de Freund. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n = 8 animais). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo Naive. Considera-se # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo EA 20'. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls*. EA: eletroacupuntura; W: WRW4; BML: BML-111; EA: EA 20'.

4.6 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR FPR2/ALXR ESPINAL NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA E DO BML-111

A Figura 17 ilustra o efeito da administração i.t. de WRW4 de 10 $\mu\text{g}/\text{i.t.}$ sobre o efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111. Observou-se que as doses de 3 e 10 $\mu\text{g}/\text{sítio}$ de WRW4 em animais com inflamação na pata, foram capazes de prevenir o

efeito anti-hiperalgésico induzido pela BML-111 (painel A) e pelo tratamento com EA (painel B) no primeiro dia após a injeção com CFA. No quinto dia após a injeção com CFA foi evidenciado que somente a dose de 10 µg/i.t. de WRW4 preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido por ambos tratamentos, BML-111 (painel C) e EA (painel D).

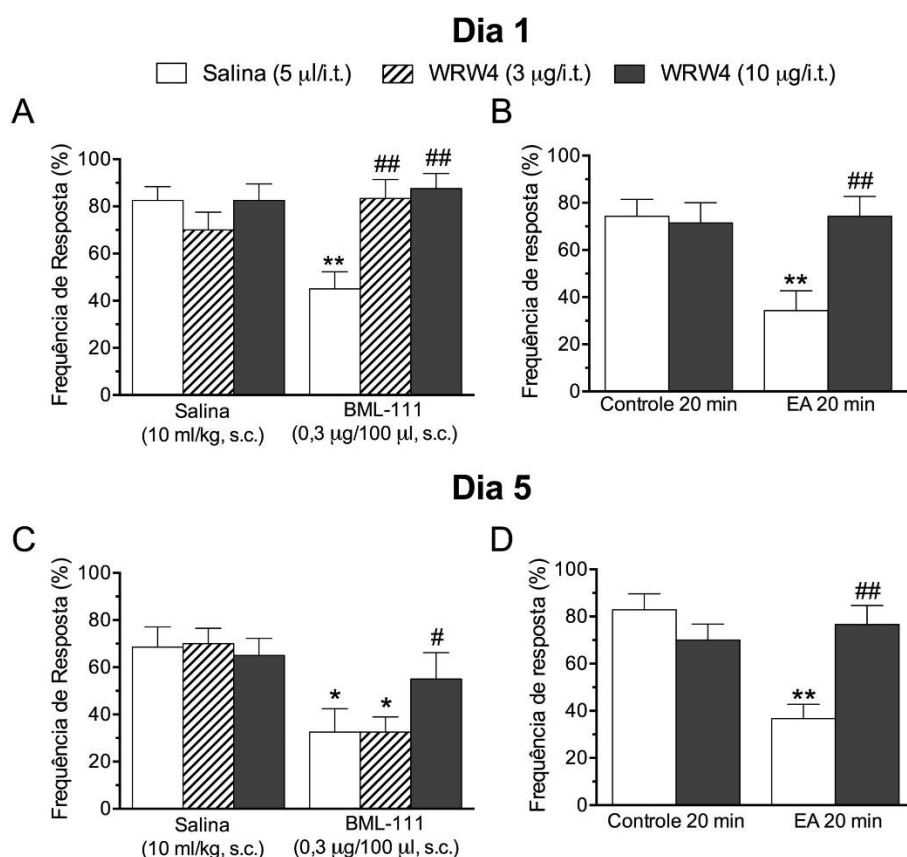


Figura 17 - Envolvimento do receptor FPR2/ALXR central no efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111.

Legenda: Efeito da administração intratecal de WRW4 contra o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (painel A) e da EA (painel B) no primeiro dia após o adjuvante completo de Freund. Efeito da administração intratecal de WRW4 contra o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (painel C) e da EA (painel D) no quinto dia após o adjuvante completo de Freund. Os valores representam a média $\pm$ EPM ($n = 8$ animais). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo Salina (20 µl/i.pl.) + Salina (10 ml/kg, s.c.). Considera-se # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ quando comparado com o grupo Salina (20 µl/i.pl.) + BML-111 ou com o grupo Salina (20 µl/i.pl.) + EA. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls*. EA= eletroacupuntura.

4.7 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM EA, BML-111 OU WRW4 SOBRE A EXPRESSÃO DO RECEPTOR FPR2/ALXR NA MEDULA ESPINAL

Nos resultados ilustrados na Figura 18 observa-se que os animais naives expressam constitutivamente o receptor FPR2/ALXR na medula espinal. Além disso, dois dias após à injeção i.pl. de CFA notou-se maior, mas não significativa ($p > 0,05$), expressão deste receptor. Embora, a injeção i.pl. de CFA não tenha influenciado na expressão do receptor FPR2/ALXR na medula espinal, os animais pré-administrados com uma injeção i.pl. de WRW4 e tratados com EA 20 min ($p < 0,01$) ou BML-111 ($p < 0,001$) apresentaram uma menor expressão do receptor FPR2/ALXR na medula espinal quando comparados com animais naives e quando comparados com os animais que receberam apenas BML-111 ($p < 0,05$) ou EA 20 min ($p < 0,001$), respectivamente.

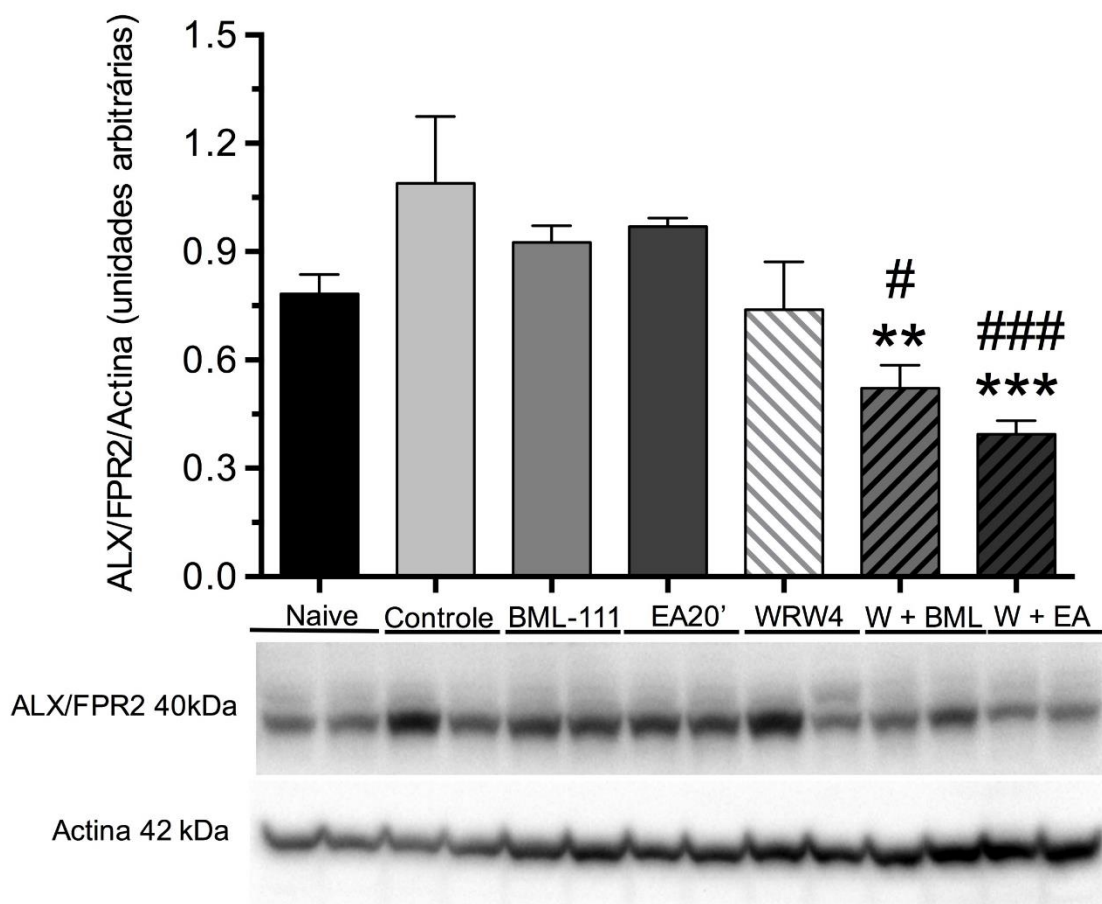


Figura 18 - Efeitos dos tratamentos com EA, BML-111 ou WRW4 sobre a expressão do receptor FPR2/ALXR na medula espinal.

Legenda: Análise da expressão do receptor FPR2/ALXR na medula espinal no segundo dia após injeção i.pl. do adjuvante completo de Freund. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n = 8 animais). $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ quando comparado com o grupo Naive. Considera-se $\#p < 0,05$ ou $###p < 0,001$ quando comparado com o grupo BML-111 e EA20', respectivamente. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls*. EA: eletroacupuntura; W: WRW4; BML: BML-111; EA: EA 20'.

4.8 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDES PERIFÉRICOS NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA E DO BML-111

A Figura 19 ilustra o efeito da administração i.pl. da naloxona no efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA e pelo BML-111. Observou-se que a dose de 5 μ g/i.pl. de naloxona em animais com inflamação na pata preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido pela BML-111 (painel A, $p < 0,05$) e pelo tratamento com EA (painel B, $p < 0,05$)

no primeiro dia após a injeção i.pl. com CFA. No quinto dia após a injeção com CFA foi evidenciado que a naloxona também preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido por ambos tratamentos, BML-111 (painel C, $p < 0,05$) e EA (painel D, $p < 0,05$).

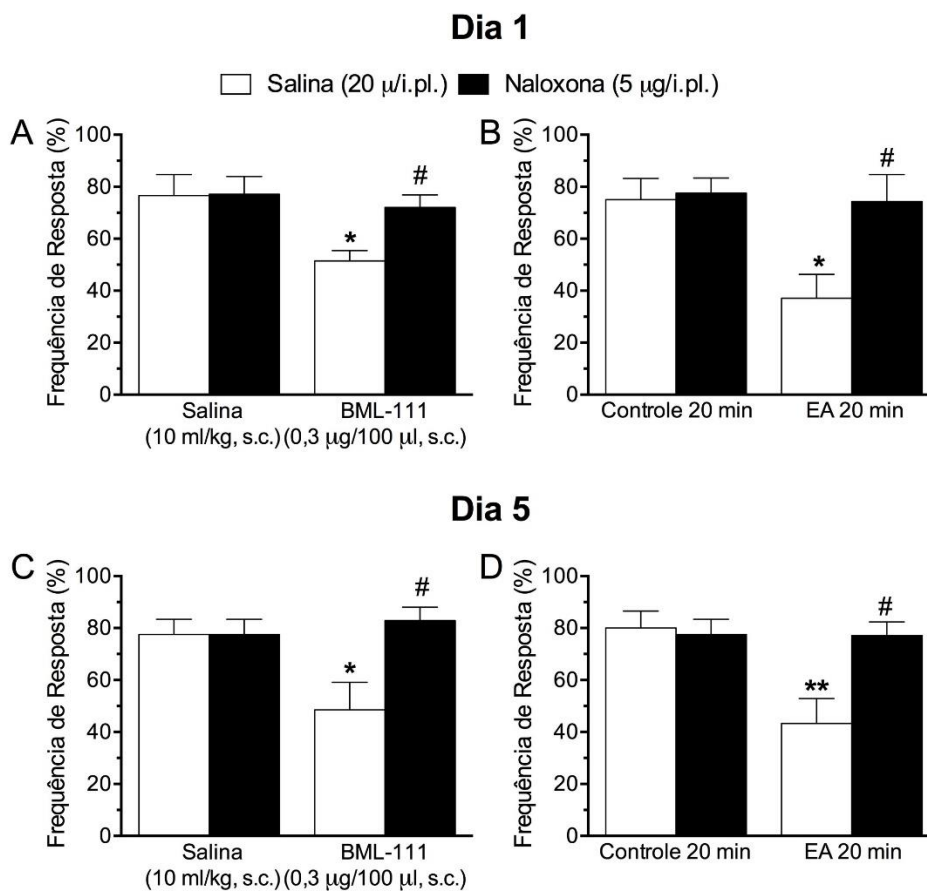


Figura 19 - Envolvimento dos receptores opioides periféricos no efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111.

Legenda: Efeito da administração intraplantar de naloxona contra o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (painel A) e da EA (painel B) no primeiro dia após CFA. Efeito da administração intraplantar de naloxona contra o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (painel C) e da EA (painel D) no quinto dia após CFA. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo Salina (20 μ l/i.pl.) + Salina (10 ml/kg, s.c.). Considera-se # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Salina (20 μ l/i.pl.) + BML-111 ou com o grupo Salina (20 μ l/i.pl.) + EA. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls*. EA: eletroacupuntura; CFA: adjuvante completo de Freund.

4.9 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDES CENTRAIS (ESPINAIS) NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA EA E DO BML-111

A Figura 20 ilustra o efeito da administração i.t. da naloxona no efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA e pelo BML-111. Notou-se que a dose de 5 µg /i.t. de naloxona em animais com inflamação na pata, foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico induzido pela BML-111 (painel A, $p < 0,05$) e pelo tratamento com EA (painel B, $p < 0,05$) no primeiro dia após a injeção i.pl. com CFA. No quinto dia após a injeção de CFA foi evidenciado que a naloxona preveniu o efeito anti-hiperalgésico induzido tanto pelo tratamento com BML-111 (painel C, $p < 0,05$) e quanto pelo tratamento com EA (painel D, $p < 0,05$).

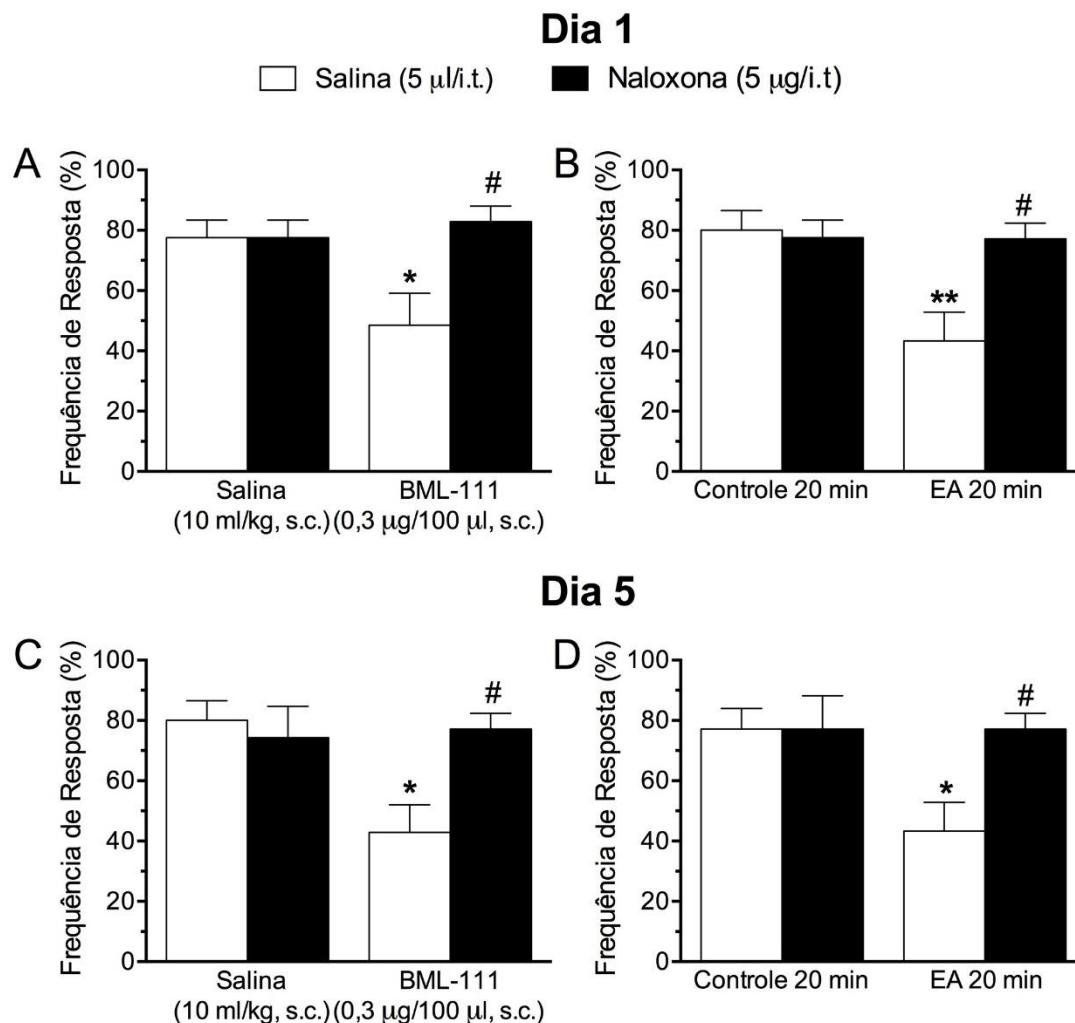


Figura 20 - Envolvimento dos receptores opioides centrais no efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111.

Legenda: Efeito da administração intratecal de naloxona contra o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (painel A) e da EA (painel B) no primeiro dia após CFA. Efeito da administração intratecal de naloxona contra o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (painel C) e da EA (painel D) no quinto dia após CFA. Os valores representam a média $\pm$ EPM ($n = 8$ animais). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo Salina (20 µl/i.pl.) + Salina (10 ml/kg, s.c.). Considera-se # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Salina (20 µl/i.pl.) + BML-111 ou com o grupo Salina (20 µl/i.pl.) + EA. Análise de variância de uma via seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls*. EA: eletroacupuntura; CFA = adjuvante completo de Freund.

5. DISCUSSÃO

A dor crônica secundária à lesão e à inflamação é um problema persistente e debilitante^{167,168}, pelo fato de que o mecanismo periférico e espinal da dor inflamatória persistente ainda não está completamente esclarecido. Embora estudos prévios tenham descrito o papel da sensibilização periférica em condições dolorosas, agora também é enfatizado que a facilitação espinal do processamento nociceptivo é um componente crítico nos estados de dor inflamatória¹⁶⁹. Tem sido amplamente enfatizado que a lesão periférica leva a rápida expressão e liberação de fatores pró-inflamatórios (por exemplo, TNF- α , IL-1 β e PGs) no local da lesão, o que reduz o limiar de ativação e aumenta a capacidade de resposta dos terminais periféricos do neurônio nociceptivo primário. Há evidências crescentes de que existe uma liberação similar de tais mediadores no corno dorsal da medula espinal, onde esses fatores medeiam a facilitação do processamento de dor, ampliando ainda mais a sinalização nociceptiva transmitida ao encéfalo¹⁷⁰. Portanto, muitos fatores que estão envolvidos no início da inflamação no sítio periférico também conduzem a sensibilização na medula espinal (sítio central). A exemplo as PGs, que são liberadas não apenas no local da inflamação, mas na medula espinal¹⁷¹. É importante notar que as PGs não só têm ações pró-inflamatórias, mas também podem iniciar a fase de resolução da inflamação por meio das ações, respectivamente da PGE₂ e PGD₂ em PMN que incluem a indução de lipoxigenases que são capazes de formar a LXA₄¹⁷².

Mediadores químicos endógenos (autacoides) desempenham papel fundamental no controle e resolução da inflamação. Entre eles, as LXs ativadas pela aspirina (ATLs) são mediadores lipídicos que impedem a infiltração de neutrófilos, estimulam monócitos e macrófagos a executarem o processo de fagocitose (eferocitose), iniciam a resolução¹⁷³ e regulam a expressão e secreção de citocinas, tais como pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β ; e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β 1, as quais estão fortemente ligadas ao processo fisiopatológico da dor crônica¹⁷⁴. Neste sentido tem sido relatado que a administração de LXA₄¹⁷⁵ ou de BML-111 (um análogo da LXA₄) podem aliviar a dor inflamatória.

Dentre as terapias não farmacológicas e integrativas mais amplamente utilizadas e estudadas em todo o mundo tem se destacado a EA. A neuromodulação com EA é usada por milhões de pessoas para controlar a dor e a inflamação e para restabelecer a homeostase fisiológica na doença¹⁷⁶. Estudos recentes indicam que a estimulação nervosa proporciona benefícios terapêuticos no tratamento da inflamação na artrite, colite, diabetes, obesidade, pancreatite e distúrbios infecciosos, tais como endotoxemia, choque séptico e sepse grave¹⁷⁷⁻¹⁸⁴. No entanto, a eficácia da AM/EA é controversa e a falta de estudos mecanicistas adequados neste campo impede uma explicação das limitações clínicas dessas técnicas e não se sabe por que a EA pode ser efetiva em algumas doenças e em alguns pacientes, mas não em outros com sintomas semelhantes¹⁷⁶. Além disso, alguns dos resultados mais confiáveis da EA são produzidos em modelos animais experimentais, em contraste aos ensaios clínicos que podem apresentar viés pelo efeito placebo e a heterogeneidade dos pacientes^{185,186,187}.

Assim, no presente estudo foi testado o efeito da EA na fase precoce e tardia da dor inflamatória persistente induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. A injeção i.pl. de CFA induz dor inflamatória persistente por semanas¹⁸⁸. A escolha do modelo experimental de inflamação persistente na pata induzida por CFA deveu-se ao fato de que este é um modelo bem caracterizado que permite uma quantificação da hiperalgesia mecânica e edema rápida e confiável, com medidas repetidas em diferentes intervalos de tempo^{14,104,130,136,137}. Um único tratamento com EA produziu efeito anti-hiperalgésico breve e tempo dependente, na fase precoce da inflamação. No tratamento diário com EA o efeito anti-hiperalgésico se manteve. Na fase tardia da inflamação o efeito foi mais prolongado (duradouro) quando comparado com a fase precoce. Os resultados do presente estudo confirmam e estendem os dados da literatura por demonstrar que a EA de baixa intensidade nos acupontos ST36 e SP6 reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos.

Corroborando com esses resultados, Huang e cols (2013) mostraram que EA de baixa frequência (2 Hz) somente no acuponto ST36 por 20 min realizada imediatamente após a injeção de CFA ou carragenina reduz a hiperalgesia mecânica e térmica (calor e frio) em ratos¹⁸⁹. Chen e cols (2011) demonstraram em camundongos com inflamação da pata também induzida por CFA ou carragenina, que o tratamento com EA de baixa

frequência (2 Hz) somente no acuponto ST36 por 20 min realizada reduziu a hiperalgesia mecânica nos dias 1, 2, 4 e 7 após as injeções dos agentes flogísticos¹⁹⁰. Por fim, Liao e cols (2017) mostraram que a realização de EA nos acupontos ST36 e SP6 por 15 min (2 Hz) reduziu a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos por 3 dias consecutivos de aplicação¹⁵⁵. Apesar do efeito anti-hiperalgésico da EA já estar bem estabelecido na literatura¹⁴, neste estudo foi demonstrado o decurso temporal do efeito anti-hiperalgésico da EA realizada por diferentes tempos de estimulação com EA tanto na fase precoce quanto na fase tardia da inflamação induzida por CFA, resultados que ao nosso conhecimento não tinham ainda sido demonstrados.

Como o BML-111 (um análogo da LXA₄) já está bem estabelecido como um agonista para o receptor FPR2/ALXR, no presente estudo este agonista foi usado com dois propósitos: 1) demonstrar o papel fisiopatológico da LX na hiperalgesia mecânica inflamatória induzida por CFA e 2) utilizar como controle positivo nas análises do envolvimento do receptor FPR2/ALXR no efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA. Aqui, foi então examinado o efeito do BML-111 administrado sistemicamente também na fase precoce e tardia da dor inflamatória persistente induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. Neste estudo, o BML-111 reduziu a hiperalgesia mecânica por 5 dias consecutivos de tratamento. Assim, os resultados mostram que o BML-111 foi efetivo tanto na fase precoce (primeiro dia) quanto na fase tardia (quinto dia) da inflamação induzida por CFA. Apesar do BML-111 apresentar efeito anti-hiperalgésico em todos os dias avaliados, ficou evidente o efeito pronunciado no primeiro dia de tratamento e após CFA, bem como o efeito modesto no quinto dia (após CFA), observado na análise do decurso temporal.

Esses resultados podem estar atrelados a população de células predominantes no período da avaliação. Rittner e cols (2001) descreveram a população de células presentes na pata de ratos submetidos a injeção i.pl. de CFA na fase precoce (2 e 6 h após) e tardia (96 h). Na fase precoce, os granulócitos foram as células majoritárias (granulócitos 65-70%; monócitos 24-38%) que eles encontraram. Na fase tardia a porcentagem de granulócitos diminuiu e os monócitos ou macrófagos aumentaram (granulócitos 35%; monócitos 60%)¹⁹¹. No sítio da inflamação, as LXs são geradas por

meio de rotas biossintéticas envolvidas durante as interações célula-célula. Ao infiltrar os PMNs (que expressam 5-LO) interagem com células residentes do tecido (que expressam 15-LO) no sítio inflamado. De forma autócrina, as LXs recém-formadas podem interagir com receptores específicos nos leucócitos regulando a função deles¹⁹². Nesse sentido, pode-se concluir que a produção e a ação das LXs dependem da presença dos neutrófilos. Isso explicaria o efeito pronunciado do BML-111 no primeiro dia, quando se observa uma presença maior de neutrófilos e o modesto efeito no quinto dia após CFA, onde se observa uma menor concentração dessas células. Além disso, as LXs (bem como BML-111) ativam o receptor FPR2/ALXR nos tecidos periféricos, o qual foi clonado a partir de tipos de células imunes e não imunes, incluindo PMNs, monócitos, células T e fibroblastos sinoviais¹⁹³.

Os resultados aqui apresentados também indicam que os tratamentos diários por 4 dias consecutivos com EA ou com BML-111, com o tempo que melhor reduziu a hiperalgia mecânica, falharam em reduzir o edema de pata. Não encontrou-se na literatura estudos que utilizaram o mesmo desenho experimental da presente pesquisa (mesmos pontos, parâmetros de estimulação e tempos de avaliação) para que fosse possível uma comparação direta dos achados. Alguns estudos similares encontraram efeito contrário ao observado aqui, como por exemplo o estudo de Kim e cols (2008) que observaram no modelo inflamatório induzido pela carragenina em camundongos que EA (1 Hz) no acuponto ST36, por 30 min, realizada bilateralmente e imediatamente a injeção de carragenina reduziu o edema de pata¹⁹⁴. Ainda em camundongos, da Silva e cols (2015) mostraram que a AM no acuponto SP6 realizada por 10 min reduziu o edema produzido pela injeção intramuscular de carragenina no gastrocnêmio¹⁴⁵.

Uma das explicações dessa falha do tratamento com EA em reduzir o edema de pata no modelo de inflamação induzida por CFA pode estar relacionado a própria produção de LXA₄ induzida pela EA. Sabe-se que a LXA₄ ao mesmo tempo que produz efeito anti-inflamatório mediado pelo receptor FPR2/ALXR ou não, ela também induz a produção de outros fatores que possuem ação pró-inflamatória. Por exemplo, LXA₄ e LXB₄ estimulam a produção de prostaciclina (PGI₂) em células endoteliais vasculares de ratos¹⁹⁵ e humanos *in vitro*¹⁹⁶. A PGI₂ é classicamente descrita como um mediador inflamatório que não só induz a formação de edema, mas também potencializa a

resposta edematogênica induzida por outros agentes, tais como carragenina, histamina e bradicinina^{197,198,199}. Assim, acredita-se que a produção de LXA₄ induzida pela EA possa ser apenas suficiente para induzir efeito anti-hiperalgésico, mas não capaz de reduzir o edema da pata. Porém, futuros estudos que analisem as concentrações teciduais de LXA₄ após o tratamento com EA ainda precisam ser realizados.

Se por um lado, tem sido demonstrado que a ativação do receptor FPR2/ALXR pela LXA₄ ou AnxA1 produz efeito anti-inflamatório e anti-hiperalgésico, como: inibir a adesão de leucócitos na parede vascular, induzir a apoptose de neutrófilos teciduais, ativar monócitos a realizarem eferocitose, inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e induzirem a liberação de opioides pelos neutrófilos, entre outras ações. Por outro lado, tem sido observado que EA induz todos esses efeitos e muitos outros aqui não descritos.

No entanto, ainda não havia sido investigado o envolvimento do receptor FPR2/ALXR no efeito anti-hiperalgésico da EA. A partir dos primeiros resultados com a EA, o próximo passo e foco principal da presente pesquisa foi investigar a participação do receptor FPR2/ALXR periférico e espinal no efeito anti-hiperalgésico da EA nas fases precoce e tardia da inflamação induzida por CFA. Os resultados mostram que o antagonista específico para o receptor FPR2/ALXR periférico foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico induzido pela EA, com a mesma dose que também preveniu a ação anti-hiperalgésica do BML-111. Na análise da expressão do receptor FPR2/ALXR periférico foi observado que no segundo dia após CFA houve um aumento da expressão deste receptor. Além disso, os grupos que foram pré-tratados com WRW4 e receberam tratamento com EA 20 min ou BML-111 apresentaram uma menor expressão do receptor FPR2/ALXR na pata. Em conjunto, os resultados do bloqueio farmacológico e da expressão do receptor FPR2/ALXR periférico, mostram a participação deste receptor no efeito anti-hiperalgésico da EA 20 min e do BML-111.

Ao menos ao nosso conhecimento não tem sido ainda demonstrada a expressão do receptor FPR2/ALXR no terminal periférico do aferente primário nociceptivo. No entanto, de interesse no sítio periférico as células que podem influenciar sobre a atividade neuronal (nocicepção) são as células imunológicas e de suporte. Neste sentido, Migeotte e cols (2006) tem relatado a expressão do receptor FPR2/ALXR em leucócitos/neutrófilos, monócitos/macrófago, fibroblastos, células dendríticas e células

endoteliais⁴². Recentemente, também tem sido demonstrado a expressão do receptor FPR2/ALXR no mastócito (granulócito) com função de inibir a sua degranulação²⁰⁰. Assim, especula-se que o receptor FPR2/ALXR está envolvido, pelo menos em parte, no efeito anti-hiperalgésico da EA.

Outro interessante resultado do presente estudo foi a demonstração do envolvimento do receptor FPR2/ALXR espinal (central) no efeito anti-hiperalgésico da EA e o fato de que a administração i.t. do antagonista (WRW4) do receptor FPR2/ALXR também preveniu o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 na fase precoce e tardia da inflamação induzida por CFA. Adicionalmente, na análise da expressão do receptor FPR2/ALXR espinal, apesar de não ter sido observado aumento deste receptor no segundo dia após CFA, há um aumento da expressão deste receptor na medula espinal, os animais que foram pré-tratados com WRW4 e receberam tratamento com EA 20 min ou BML-111 apresentaram uma menor expressão deste receptor. Assim, esses resultados também mostram a participação do receptor FPR2/ALXR espinal no efeito anti-hiperalgésico da EA 20 min e do BML-111.

A ação anti-hiperalgésica observada após a administração i.t. da LXA₄ indica que este mediador lipídico também atua em alvos específicos na medula espinal¹⁷⁵. Estes autores, Svensson e cols (2007), demonstraram que a LXA₄ induz efeito anti-hiperalgésico não somente após administração sistêmica mas também quando administrada por via i.t. e que o efeito antihiperálgico produzido é mediado por mecanismo distinto da regulação da inflamação periférica e edema. Constataram que o receptor FPR2/ALXR é expresso constitutivamente na medula espinal de ratos e camundongos *naïves*. Além disso, mostraram que a injeção i.pl. de carragenina aumenta a expressão desse receptor e que se localiza com células astrogliais, mas não com células microgliais ou neurônios, e que a administração i.t. de LXA₄ reduziu a hiperálgia mecânica desses animais¹⁷⁵.

Liao e cols (2017) mostraram que a injeção i.pl. de CFA também aumentou a expressão de GFAP (ativação de astrócitos) na medula espinal de camundongos e que a realização de EA (2 Hz) no acuponto ST36 reduziu a ativação de astrocitária e a hiperálgia mecânica⁸. O fato de que o receptor FPR2/ALXR é expresso em astrócitos espinais pode explicar em parte os resultados do presente estudo. Vários estudos

indicam que as células não-neuronais da medula espinal desempenham papel importante na facilitação da dor, aumentando a nocicepção^{201,202,203}. Além disso, sabe-se que a inflamação periférica leva à ativação astrocitária e microglial no corno posterior da medula espinal²⁰⁴. A administração espinal de inibidores ou moduladores da função dos astrócitos bloqueiam o início e a manutenção da dor inflamatória persistente²⁰⁵, apoiando o papel dessas células na sensibilização espinal (central). Como os astrócitos ativados liberam citocinas, quimiocinas e NO, é possível que a ativação do receptor FPR2/ALXR expresso no astrócito atue contra-regulando a produção desses mediadores pró-inflamatórios e assim reduzindo a sensibilização central e consequentemente a hiperalgesia mecânica.

Neste estudo, hipotetizou-se que a EA pode ter ação anti-inflamatória e pró-resolutiva por induzir a produção e/ou liberação de agonistas endógenos de origem lipídica ou peptidérgica que agem sobre o receptor AnxA1-FPR2/ALXR pela similaridade dos efeitos produzidos pela EA com os efeitos desses mediadores. Sendo os efeitos observados com a EA: a diminuição da expressão do RNAm de COX-2 na microglia espinal em modelo animal de dor neuropática¹⁵⁵, a indução da apoptose de neutrófilos e a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) liberadas por monócitos em um modelo de colite ulcerativa¹⁴³, inibição do infiltrado de células inflamatórias e redução da permeabilidade vascular na peritonite induzida pela carragenina em camundongos¹⁴⁴, indução de mudança de fenótipo dos macrófagos do tecido muscular com uma redução dos macrófagos M1 e um aumento dos macrófagos M2 (células anti-inflamatórias)¹⁴⁵.

A LXA₄ é um lipídeo com chances de ser a substância chave responsável pela ativação do receptor FPR2/ALXR^{3,7,64,65,66,67} induzida pela EA. Levando em consideração a importância da 15-LOX na biossíntese da LXA₄, e o estudo de Spanbroek e cols (2001) que demonstraram que a IL-4 determina a formação de eicosanoides em células dendríticas por induzir uma regulação negativa da 5-LOX e uma regulação positiva da 15-LOX e também induz a expressão do receptor FPR2/ALXR¹⁵⁰. Interessante são os achados do estudo de Ouyang e cols (2010) que verificaram um aumento das concentrações de IL-4 induzida pela EA no sangue periférico e fluído articular de pacientes com artrite reumatóide. Assim, com base nestes achados, especula-se que a

EA poderia induzir a liberação de IL-4 que regula positivamente a 15-LOX aumentando assim a produção de LXA₄ na inflamação reduzindo o processo inflamatório¹⁵¹. No entanto, futuros estudos analisando as concentrações teciduais e sanguíneas de IL-4 devem ser realizados para corroborar nessa hipótese.

Além disso, tem sido demonstrado que a EA no GB30 induz sinais aferentes sensoriais no nervo isquiático ativando o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo que secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Na glândula hipófise anterior (adeno-hipófise) o CRH induz a liberação na corrente sanguínea do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A ação do ACTH na zona fasciculata das glândulas supra-renais induz a produção dos glicocorticoides (em roedores principalmente a corticosterona), os quais realizam uma alça de retroalimentação negativa (feedback negativo) por inibir o PVN do hipotálamo e a glândula hipófise anterior¹⁰⁴. Além dos efeitos já descritos dos glicocorticoides nas secções anteriores deste trabalho, os glicocorticoides liberados na corrente sanguínea difundem-se através da membrana celular se ligando ao receptor citosólico formando o complexo glicocorticoide-receptor (GR) ativo. Durante o processo de transrepressão de gene o complexo GR liga-se a outros fatores de transcrição de genes, tais como o NFκB que promove a transcrição GR e inibe a capacidade dele de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Interessantemente, na transativação, o complexo GR ativado induz a expressão de genes anti-inflamatórios codificando proteínas como: IL-10 e a IL-4²⁰⁶. Assim, pelo eixo CRH/ACTH/glicocorticoide/IL-4/LXA₄ pode ser a explicação da produção de LXA₄ pela EA²⁰⁶.

Outro potencial mediador endógeno candidato a contribuir aos efeitos da EA é a AnxA1, que pode ser produzida pela ativação do eixo CRH/ACTH/glicocorticoide pela EA. AnxA1 liberada de neutrófilos, monócitos e macrófagos foi originalmente identificada como responsável pelas ações anti-inflamatórias dos glicocorticoides²⁰⁷. A administração de peptídeos derivado da AnxA₁₂₋₂₆ reduz o edema de pata e o acúmulo de neutrófilos em vários modelos experimentais^{208,209}, abrangendo desde modelos de peritonite à modelos de lesão tecidual mediada por neutrófilos^{210,211}.

Há muito tempo tem sido demonstrado que analgesia induzida pela acupuntura é dependente da liberação de opioides. Especificamente, foi mostrado que a analgesia

induzida pela EA de baixa, mas não de alta frequência, pode ser prevenida por baixas doses do antagonista opióide – naloxona⁸⁴. No entanto, como a EA induz a liberação de opioides endógenos ainda não tem sido completamente esclarecido.

Neste sentido, interessantes foram os resultados do presente estudo onde se demonstrou que a naloxona (antagonista não seletivo para receptores opioides) administrada na pata ou na medula espinal na mesma dose que preveniu o efeito anti-hiperalgésico da EA, também preveniu o efeito anti-hiperalgésico do BML-111 (agonista do receptor FPR2/ALXR) na fase precoce e tardia da inflamação induzida por CFA.

É conhecida a via molecular de liberação tônica de opioide de neutrófilos na dor inflamatória que envolve a ativação do receptor FPR2/ALXR^{146,212}. Ainda, há hipótese da liberação de AnxA1 induzida pela EA, ativando assim o receptor FPR2/ALXR, pois a AnxA1 pode induzir a liberação de opioide pelos neutrófilos. Foi demonstrado que a liberação de opioide pode induzir analgesia na inflamação induzida por CFA e que depende da mobilização de Ca^{2+} intracelular, bem como, da ativação da PI3K - ambos conhecidos por serem sinais intracelulares do receptor FPR2/ALXR e AnxA1 – e que este efeito é mediado por receptores opioides μ e δ , e que quando é administrado localmente o antagonista para FPR, este efeito pode ser bloqueado¹⁴⁷.

Assim, os achados do presente estudo também sugerem que a ativação do receptor FPR2/ALXR possa ser uma etapa prévia a liberação de opioides induzida pela EA. Estudos futuros adicionais que analisem a expressão de AnxA1 e/ou outros mediadores que também ativam o receptor FPR2/ALXR, tal como a LXA₄, podem ajudar a esclarecer essa hipótese.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados aqui, conclui-se:

- 1) O tratamento dos animais com EA de baixa frequência apresenta efeito anti-hiperalgésico dependente do tempo de estimulação na fase precoce e tardia da dor inflamatória persistente;
- 2) A administração de BML-111 produz efeito anti-hiperalgésico dose dependente na fase precoce e tardia da dor inflamatória persistente;
- 3) O tratamento diário, tanto com EA de baixa frequência, quanto com BML-111 são efetivos em reduzir a hiperalgesia mecânica na fase precoce e tardia da dor inflamatória persistente;
- 4) Os tratamentos diários com EA de baixa frequência ou BML-111 falham em reduzir o edema de pata na fase tardia da dor inflamatória persistente;
- 5) O bloqueio farmacológico do receptor FPR2/ALXR ou dos receptores opioides periféricos e centrais (espinal) preveniu o efeito anti-hiperalgésico da EA e do BML-111 na fase precoce e tardia da dor inflamatória persistente;
- 6) A injeção i.pl. de CFA aumenta a expressão do receptor FPR2/ALXR na pata, mas não na medula espinal dois dias após a injeção e o tratamento dos animais com EA de baixa frequência ou com BML-111 não altera a expressão do receptor FPR2/ALXR na pata ou na medula espinal;
- 7) Há uma menor expressão do receptor FPR2/ALXR nos grupos de animais pré-tratados com WRW4 que receberam EA 20 min e BML-111 na medula espinal, porém na pata somente os animais pré-tratados com WRW4 e que receberam EA 20 min apresentam menor expressão deste receptor.

Finalmente, a principal contribuição do nosso trabalho foi a demonstração, pela primeira vez na literatura, que o tratamento com EA ou com o análogo da LXA₄ (BML-111) reduzem a hiperalgesia mecânica, mas não o edema em um modelo animal de dor inflamatória persistente e que este efeito pode ser mediado, pelo menos em parte, pela ativação do receptor FPR2/ALXR periférico e central. Assim, nossos dados sugerem

que um receptor, primariamente descrito como mediador de respostas imunológicas, pode ter um papel relevante na hiperalgesia mecânica observada em condições inflamatórias persistentes, sendo um possível alvo da EA e abrindo assim avenidas para novas intervenções terapêuticas no tratamento da dor.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas desse trabalho, pretende-se imediatamente analisar a expressão de AnxA1 e dosar as concentrações de IL-4 e IL-10 na pata e medula espinal de animais tratados com EA e com BML-111. Estudar o fenótipo dos macrófagos de animais submetidos ao tratamento com EA na fase precoce e tardia da inflamação persistente. Além disso, mais a longo prazo, pretende-se analisar o efeito da EA nas concentrações de alguns mediadores pró-resolutivos especializados, tais como: a LXA₄ e Resolvinas, por meio de análise metabólico lipidômica.

REFERÊNCIAS

1. Willman A, Petzäll K, Östberg AL, Hall-Lord ML. The psycho-social dimension of pain and health-related quality of life in the oldest old. *Scand J Caring Sci.* 2013;27(3):534-40.
2. Ferreira SH. Peripheral analgesia: mechanism of the analgesic action of aspirin like drugs and opiate-antagonists. *Br J Clin Pharmac.* 1980;2:237-45.
3. Sugimoto M, Souza LP, Pinho V, Perreti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: what Controls its Onset?. *Front Immunol.* 2016;7:160.
4. Serhan CN, Chiang N, Dyke T. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):349-61.
5. Scannell M, Maderna M. Lipoxins and Annexin-1: Resolution of Inflammation and Regulation of Phagocytosis of Apoptotic Cells. Review Article Special Issue: Glucocorticoids and Melanocortins. *ScientificWorldJournal.* 2006;6:1555–73.
6. Chen L, Lv F, Pei L. Annexin 1: A glucocorticoid-inducible protein that modulates inflammatory pain. *Eur J Pain.* 2014;18(3):338-47.
7. Chiang N, Fierro IM, Gronert K, Serhan CN. Activation of lipoxin A(4) receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. *J Exp Med.* 2000;191(7):1197-208.
8. Liao HY, Hsieh C, Huang C. Electroacupuncture Attenuates CFA-induced Inflammatory Pain by suppressing Nav1.8 through S100B, TRPV1, Opioid, and Adenosine Pathways in Mice. *Sci Rep.* 2017;7:42531.
9. Li M, Zhang X, Bao H, Li C, Zhang P. Acupuncture for asthma: Protocol for a systematic review. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(26):e7296.
10. Camachio J. Efetividade da eletroacupuntura versus acupuntura manual em pacientes com dor lombar crônica não específica: um ensaio clínico randomizado [dissertação]. SP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2016.
11. Silvério-Lopes S. Eletroacupuntura e eletropuntura. Analgesia por acupuntura. Paraná: Omnipax, 2013. p.63-80.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS /Brasília: 2006. Disponível em: <<http://dab.saude.gov.br/docs/publicacoes/geral/pnpic.pdf> > Acesso em: 04 abril 2016.

13. Vickers AJ, Vertosick EA, Lewith G, MacPherson H, Foster NE, Sherman KJ, et al. Acupuncture for Chronic Pain: Update of an individual Patient Data Meta-Analysis. *Archives of internal medicine*. 2012;172(19):1444–53.
14. Zhang R, Lao L, Ren K, Berman BM. Mechanisms of Acupuncture-Electroacupuncture on Persistent Pain. *Anesthesiology*. 2014;120(2):482-503.
15. Ji L, Meng-Wei G, Xiu-jun R, Dong-yu G, Gen-Mao L, Ya T. Effects of Electroacupuncture Intervention on Expression of Cyclooxygenase 2 and Microglia in Spinal Cord in Rat Model of Neuropathic Pain. *Chin J Integr Med*. 2016.
16. Sun YM. Acupuncture and inflammation. *International Journal of Chinese Medicine*. 1984(1):15-20.
17. Davies E, Omer S, Morris JF, Christian HC. The influence of 17 β -estradiol on annexin 1 expression in the anterior pituitary of the female rat and in a folliculo-stellate cell line. *J Endocrinol*. 2007;192(2):429-42.
18. Headland Chiang S, Dalli J, Sanger JM, Winkler JW, Aursnes M, Tungen JE, et al. The Protectin PCTR1 Is Produced by Human M2 Macrophages and Enhances Resolution of Infectious Inflammation. *Am J Pathol*. 2016;186(4):962-73.
19. Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol*. 2015;27(3):149-60.
20. Serhan CN, Charles N, Petasis A. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. 2012;111(10):5922–43.
21. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*. 2013;5(5):661-74.
22. Jones HR, Robb CT, Perretti M, Rossi AG. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol*. 2016;28(2):137-45.
23. Chiang N, Serhan CN, Dahlén SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE, et al. The Lipoxin Receptor ALX: Potent Ligand-Specific and Stereoselective Actions in Vivo. *Pharmacol Ver*. 2006;58:463–87.
24. Waechter, V. Role of the lipoxin A4 receptor in inflammation [dissertation]. Zurich: Faculty of Science; 2010.

25. Makarewicz-Wujec M, Parol G, Parzonko A, Kozłowska-Wojciechowska M. Supplementation with omega-3 acids after myocardial infarction and modification of inflammatory markers in light of the patients' diet: a preliminary study. *Kardiol Pol.* 2017;75(7):674-81.
26. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med.* 2002;196(8):1025-37.
27. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, et al. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J Immunol.* 2006;176(3):1848-59.
28. Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem.* 2003;278(44):43807-17.
29. Gronert K, Maheshwari N, Khan N, Hassan IR, Dunn M, Laniado Schwartzman M. A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. *J Biol Chem.* 2005;280(15):15267-78.
30. Rankin JA. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues.* 2004;15(1):3-17.
31. Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, Haworth O, Hong S, Kazani S, et al. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. *J Immunol.* 2007;178(1):496-502.
32. Ariel A, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol.* 2007;28(4):176-83.
33. Romano M, Recchia I, Recchiuti A. Lipoxin receptors. *ScientificWorldJournal.* 2007; 1(7)1393-412.
34. Martini AC, Forner S, Bento AF, Rae GA. Neuroprotective effects of lipoxin A4 in central nervous system pathologies. *Biomed Res Int.* 2014; 316204.
35. Serhan CN. On the relationship between leukotriene and lipoxin production by human neutrophils: evidence for differential metabolism of 15-HETE and 5-HETE. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1004(2):158-68.

36. Martini AC, Berta T, Forner S, Chen G, Bento AF, Ji RR, Rae GA. Lipoxin A4 inhibits microglial activation and reduces neuroinflammation and neuropathic pain after spinal cord hemisection. *J Neuroinflammation*. 2016;8;13(1):75.
37. Lee TH, Lympay P, Crea AE, Spur BW. Inhibition of leukotriene B4-induced neutrophil migration by lipoxin A4: structure-function relationships. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;180(3):1416-21.
38. Wu SH, Liao PY, Yin PL, Zhang YM, Dong L. Elevated expressions of 15-lipoxygenase and lipoxin A4 in children with acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2009;174(1):115-22.
39. Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR, et al. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*. 1995;34 (44):14609-15.
40. Papayianni A, Serhan, CN, Brady, HR. Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. *J Immunol*, 1996; 156(6):2264-72.
41. Scalia R, Gefen J, Petasis NA, Serhan CN, Lefer AM. Lipoxin A4 stable analogs inhibit leukocyte rolling and adherence in the rat mesenteric microvasculature: role of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(18):9967- 72.
42. Migeotte I, Communi D, Parmentier M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17(6):501-19.
43. Rabiet MJ, Huet E, Boulay F. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie*. 2007;89(9):1089-106.
44. Bao HY, Jiang M, Shen F, Zhu MQ, Ruan CG. Effects of thalidomide on Annexin II gene regulation. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2009;30(7):464-7.
45. Forsman H, Bylund J , Oprea TI, Karlsson A , Boulay F , Rabiet MJ , et al. The leukocyte chemotactic receptor FPR2, but not the closely related FPR1, is sensitive to cell-penetrating peptides with amino acid sequences descending from the third intracellular receptor loop. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(8):1914-23.
46. Leoni G, Alam A, Neumann PA, Lambeth JD, Cheng G, McCoy J, et al. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J Clin Invest*. 2013;123(1):443-54.

47. Vieira AM, Neto EH, Figueiredo CC, Barja Fidalgo C, Fierro IM, Morandi V. ATL-1, a synthetic analog of lipoxin, modulates endothelial permeability and interaction with tumor cells through a VEGF-dependent mechanism. *Biochem Pharmacol.* 2014;90(4):388-96.
48. 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.
49. Gronert K, Gewirtz A, Madara JL, Serhan CN. Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release. *J Exp Med.* 1998;187(8):1285-94.
50. Bozinovski S, Desiree A, Ross V. Targeting pro-Resolution Pathways to Combat Chronic Inflammation in COPD. *J Thorac Dis.* 2014;1548–1556.
51. Su SB, Gong W, Gao JL, Shen W, Murphy PM, Oppenheim JJ, et al. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med.* 1999;189(2):395-402.
52. Shimizu S, Ogawa T, Seno S, Kouzaki H, Shimizu T. Pro-resolution mediator lipoxin A4 and its receptor in upper airway inflammation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2013;122(11):683-9.
53. Fiore S, Ryeom SW, Weller PF, Serhan CN. Lipoxin recognition sites. Specific binding of labeled lipoxin A4 with human neutrophils. *J Biol Chem.* 1992;267(23):6168-76.
54. Fierro IM, Colgan SP, Bernasconi G, Petasis NA, Clish CB, Arita M, et al. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit human neutrophil migration: comparisons between synthetic 15 epimers in chemotaxis and transmigration with microvessel endothelial cells and epithelial cells. *J Immunol.* 2003;170(5):2688-94.
55. Parkinson JF. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006;5(2):91-106.
56. He R, Sang H, Ye RD. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood.* 2003;101(4):1572-81.

57. Sodin-Semrl S, Spagnolo A, Mikus R, Barbaro B, Varga J, Fiore S. Opposing regulation of interleukin-8 and NF-kappaB responses by lipoxin A4 and serum amyloid A via the common lipoxin A receptor. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004;17(2):145-56.
58. Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG, Fierro IM. Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(3):C557-63.
59. Ariel A, Chiang N, Arita M, Petasis NA, Serhan CN. Aspirin-triggered lipoxin A4 and B4 analogs block extracellular signal-regulated kinase-dependent TNF-alpha secretion from human T cells. *J Immunol.* 2003;170(12):6266-72.
60. Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *J Biol Chem.* 1997;272 (11):6972-8.
61. Maderna P, Yona S, Perretti M, Godson C. Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac (2-26). *J Immunol.* 2005;174(6):3727-33.
62. Dalli J, Serhan C. Macrophage Proresolving Mediators-the When and Where. *Microbiol Spectr.* 2016;4(3):1-23.
63. Heasman SJ, Giles KM, Ward C, Rossi AG, Haslett C, Dransfield I. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *J Endocrinol.* 2003;178(1):29-36.
64. Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med.* 2010;16(5):592-7.
65. Ji RR, Xu ZZ, Strichartz G, Serhan CN. Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends Neurosci.* 2011;34(11):599-609.
66. Lima-Garcia JF, Dutra RC, da Silva K, Motta EM, Campos MM, Calixto JB. The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol.* 2011;164(2):278-93.
67. Xu ZZ, Liu XJ, Berta T, Park CK, Lü N, Serhan CN, et al. Neuroprotectin/protectin D1 protects against neuropathic pain in mice after nerve trauma. *Ann Neurol.* 2013;74(3):490-5.
68. Perretti M, D'acquistio F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(1):62-70.

69. Chen AL, Sun X, Wang W, Liu JF, Zeng X, Qiu JF, et al. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis contributes to the immunosuppression of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):266-80.
70. Yazid S, Sinniah A, Solito E, Calder V, Flower RJ. Anti-allergic cromones inhibit histamine and eicosanoid release from activated human and murine mast cells by releasing Annexin A1. *PLoS One*. 2013;8(3):58963.
71. Kim S, Ko J, Kim JH, Choi EC, Na DS. Differential effects of annexins I, II, III, and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model. *FEBS Letters*. 2001;489(2-3):243-8.
72. Oliani SM, Gil CD. Proteína antiinflamatória anexina 1: mecanismos celulares e relevância clínica. *Arq Ciênc Saúde*. 2006;(4):186-191.
73. Castro-Caldas M. Anexina-1: 2º mensageiro das ações antiinflamatórias dos glucocorticóides. *Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Reumatologia – ACTA REUM PORT*. 2006;31:293-302.
74. Da Silva JPV. Estudo do papel da proteína induzida por glicocorticoide Anexina A1 na resolução da resposta inflamatória aguda [dissertação]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
75. Perretti M, Flower R. Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: modulation by glucocorticoids and inflammation. *Br J Pharmacol*. 1996;118(3):605-10.
76. Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, et al. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(10-11):1363-9.
77. Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res*. 2004;53(4):125-32.
78. Lu QY, Jin Y, Mao JT, Zhang ZF, Heber D, Dubinett SM, et al. Green Tea Inhibits Cyclooxygenase-2 in Non-Small Cell Lung Cancer Cells through the Induction of Annexin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427(4):725-30.
79. Perretti M, Chiang N, La M, Fierro IM, Marullo S, Getting SJ, et al. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat Med*. 2002;8 (11):1296-302.
80. Hayhoe RP, Kamal AM, Solito E, Flower RJ, Cooper D, Perretti M. Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood*. 2006;107(5):2123-30.

81. Machado MMT, Oliveira JC, Fachine ADL. Acupuncture: Knowledge and Perception of University Professors. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. Revista Brasileira de Educação Médica. 2012;4236(1):41-49.

82. Patil S, Sen S, Bral M, Reddy S, Bradley KK, Cornett EM, et al. The Role of Acupuncture in Pain Management. Curr Pain Headache Rep. 2016;20(4):22.

83. Sawatsugawa, M. A Prática da eletroacupuntura conforme o sintoma. São Paulo: Icone. 1997

84. Silvério-Lopes, SM. Induced analgesic for eletroacupuntura: a retrospective boarding na frequency stimulation. FIEP Bulletin. 2008;2:308-393.

85. Yuanzhi F, Yaochi W. Effect of electroacupuncture on muscle state and infrared thermogram changes in patients with acute lumbar muscle sprain. J Tradit Chin Med. October. 2015;5(5):499-506.

86. Dalamagka M, Mavrommatis C, Karakoulas K. Postoperative analgesia after low-frequency electroacupuncture as adjunctive treatment in inguinal hernia surgery with abdominal wall mesh reconstruction. Acupunct Med. 2015(33)360–367.

87. Tavares MG, Machado AP, Mota BG, Borsatto MC, Rosa AL, Xavier SP. Electro-Acupuncture Efficacy on Pain Control after Mandibular Third Molar Surgery. Braz Dent J. 2007;18(2):158-162.

88. Greenlee H, Crew KD, Capodice J, Awad D, Buono D, Shi Z, et al. Randomized sham controlled pilot trial of weekly electroacupuncture for the prevention of taxane-induced peripheral neuropathy in women with early stage breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2016;156(3):453-64.

89. Chen T, Wang K, Xu J, Ma W, Zhou J. Electroacupuncture Reduces Postoperative Pain and Analgesic Consumption in Patients Undergoing Thoracic Surgery: A Randomized Study. Evid Based Complement Alternat Med. 2016(2016)2126416.

90. Parmen V, Pestean C, Taulescu M, Oana L. Influence of Electroacupuncture on the Soft Tissue Healing Process. J Acupunct Meridian Stud. 2014;7(5):243-249.

91. Kusayanagi H, Ishikawa S, Tajika Y, Moue T, Sunagawa M, Hisamitsu T. Influence of Electroacupuncture Stimulation on Nitric Monoxide Production in Vascular Endothelial Cells in Rats. In Vivo. 2015;29(6):679-85.

92. Shim J, Jung J, Kim S. Effects of Electroacupuncture for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Evid Based Complement Alternat Med. 2016(2016)3485875.

93. Mao JJ, Farrar JT, Bruner D, Zee J, Bowman M, Seluzicki C, et al. Electroacupuncture for Fatigue, Sleep, and Psychological Distress in Breast Cancer Patients With Aromatase Inhibitor-Related Arthralgia: A Randomized Trial. *Cancer*. 2014;120(23):3744-51.
94. Bassetto RM, Wscieklica T, Pouza KCP, Ortolani D, Viana MB, Cespedes IC, et al. Effects of electroacupuncture on stress and anxiety-related responses in rats. *An Acad Bras Cienc*. 2017.
95. Kim SP, Kim JH, Kim BK, Kim HJ, Jung IC, Cho JH, et al. Electroacupuncture for insomnia disorder: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2017;18(1):177.
96. Focks C. Atlas de acupuntura: com sequência de fotos e ilustrações, textos didáticos e indicações clínicas. SP: Manole, 2005.
97. Wen Dr. T S. Acupuntura Clássica Chinesa. São Paulo: Cultrix, 2006.
98. Chen E. Anatomia topográfica dos pontos de acupuntura. São Paulo: Roca, 1997.
99. Zhao Z, Lee BH, Lin F, Guo Y, Wu Y, In S, et al. Effects of Acupuncture at Zu-San-Li (ST36) on the Activity of the HypothalamicePituitaryeAdrenal Axis during Ethanol Withdrawal in Rats. *J Acupunct Meridian Stud*. 2014;7(5):225-30.
100. Casasolo M. Acupuntura en animales – la historia lejana. Madrid: Mandala; 1999.
101. Ding L. Acupuntura, teoria do meridiano e pontos de acupuntura. Ed. Atual. SP: Roca, 1996.
102. Moré AOC. O efeito da eletroacupuntura no modelo de dor pós-operatória em camundongos: investigação do sistema adenosinérgico utilizando a farmacopuntura [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2012.
103. Rodrigues AS. A influência dos pontos de acupuntura Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP 6) no desenvolvimento de lesões hepáticas induzidas por Tioacetamida em ratos wistar [tese]. SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2009.
104. 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;1020(1-2):18-29.
105. Almeida RT, Galdino G, Perez AC, Silva G, Romero TR, Duarte ID. ST36 electroacupuncture activates nNOS, iNOS and ATP-sensitive potassium channels to

promote orofacial antinociception in rats. *Journal of physiology and pharmacology*. 2017;68(1):27-33.

106. Xin J, Su Y, Yang Z, He W, Shi H, Wang X, et al. Distinct roles of ASIC3 and TRPV1 receptors in electroacupuncture-induced segmental and systemic analgesia. *Front Med*. 2016;10(4):465-72.

107. Peter D. *Manual de acupuntura*. SP: Roca, 2011.

108. Yamamura Y. *Acupuntura tradicional: a arte de inserir*. 2ed. SP: Roca, 2001.

109. Maike SRL; Santos E. *Fundamentos essenciais da acupuntura chinesa*. SP: Icone, 1995.

110. Maciocia G. *Canais de acupuntura: uso clínico dos canais secundários e dos oito vasos extraordinários*. SP: Roca, 2008.

111. Jamil T. *Medicina Complementar – um guia prático*. SP: Manole, 2001.

112. Charandabi SMA, Nashtaei MS, Kamali S, Majlesi R. The effect of acupressure at the Sanyinjiao point (SP6) on primary dysmenorrhea in students resident in dormitories of Tabriz. *Iran J Nurs Midwifery Res*. 2011;16(4):309-17.

113. Miao EY, Miao MY, Kildea DG, Lao YW. Effects of Electroacupuncture and Electroacupuncture Plus Tao Hong Si Wu Wan in Treating Primary Dysmenorrhea. *J Acupunct Meridian Stud*. 2014;7(1):6-14.

114. Tüzüner F, Keçik Y, Ozdemir S, Canakçi N. Electro-acupuncture in the treatment of enuresis nocturna. *Acupunct Electrother Res*. 1989;14(3-4):211-5.

115. Duan DM, Tu Y, Chen LP, Wu ZJ. Efficacy Evaluation for depression with somatic symptoms treated by eletroacupuncture combined with fluoxetine. *J Tradit Chin Med*. 2009;29(3):167-73.

116. Wang L, Chu K, Zeng L, Wang L. Primary varicose veins treated with HE's fire needle therapy: a randomized controlled trial. *Zhongguo Zhen Jiu*. 2016;36(3):231-6.

117. Martins EIS. *Atlas dos pontos de acupuntura*. RJ: Roca, 2001.

118. Gaynor JS. Acupuncture for management of pain. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2000;30(4):875-84.

119. Jiang QY, Wang MY, Li L, Mo HX, Song JL, Tang QL, et al. Electroacupuncture relieves labour pain and influences the spinal dynorphin/k-opioid receptor system in rats. *Acupunct Med.* 2016;34(3):223-8.
120. Sehhatie-Shafaie F, Kazemzadeh R, Amani F, Heshmat R. The Effect of Acupressure on Sanyinjiao and Hugo Points on Labor Pain in Nulliparous Women: A Randomized Clinical Trial. *J Caring Sci.* 2013;2(2):123-9.
121. Zhang Y. Clinical observation on therapeutic effect of electroacupuncture on SP6 for labor pain [thesis]. Beijing University of Chinese Medicine; 2006.
122. Luiz A, Babinski MA, Ferreira AS. Neurobiologia da analgesia induzida por acupuntura manual e eletroacupuntura: revisão de literatura. *Cadernos de Naturologia e Terapias Complementares.* 2012(1)1.
123. Stux G, Hammerschlag R. *Acupuntura Clínica: bases científicas.* SP: Manole, 2005.
124. Sekido R, Ishimaru K, Sakita M. Differences of electroacupuncture-induced analgesic: effect in normal and inflammatory conditions in rats. *Am J Chin Med.* 2003;31(6):955-65.
125. Torres-Rosas R, Yehia G, Peña G, Mishra P, Rocio TB M, Moreno-Eutimio MA, et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by eletroacupuntura. *Nat Med.* 2014; 20(3):291-5.
126. Chavan SS, Tracey KJ. Regulating innate immunity with dopamine and electroacupuncture. *Nat Med.* 2014;20(3):239-41.
127. Lux G, Hagel J, Bäcker P, Bäcker G, Vogl R, Ruppert H, et al. Acupuncture inhibits vagal gastric acid secretion stimulated by sham feeding in healthy subjects. *Gut.* 1994;35(8):1026-9.
128. Cho ZH, Hwang SC, Wong EK, Son YD, Kang CK, Park TS, et al. Neural substrates, experimental evidences and functional hypothesis of acupuncture mechanisms. *Acta Neurol Scand.* 2006;113(6):370-7.
129. Kavoussi B, Ross BE. The Neuroimmune Basis of Anti-inflammatory Acupuncture. *Integr Cancer Ther.* 2007;6(3):251-7.
130. Zhang RX, Lao L, Wang X, Fan A, Wang L, Ren K, et al. Electroacupuncture Attenuates Inflammation in a Rat Model. *J Altern Complement Med.* 2005;11(1):135–42.
131. Goldman N, Chen M, Fujita T, Xu Q, Peng W, Liu W, et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. *Nat Neurosci.* 2010;13(7):883-8.

132. Da Silva JRT. Neurotransmissores espinais do sistema descendente de controle da nocicepção envolvidos na antinocicepção induzida por eletroacupuntura com 2Hz e 100Hz em ratos [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ribeirão Preto;2009.

133. Hsieh CL, Kuo CC, Chen YS, Li TC, Hsieh CT, Lao CJ, et al. Analgesic effect of electric stimulation of peripheral nerves with different electric frequencies using the formalin test. *Am J Chin Med*. 2000;28(2):291-9.

134. Meng X, Zhang Y, Li A, Xin J, Lao L, Ren K, et al. The effects of opioid receptor antagonists on electroacupuncture-produced anti-allodynia/hyperalgesia in rats with paclitaxel-evoked peripheral neuropathy. *Brain Res*. 2011;1414: 58–65.

135. Han JS. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. *Trends Neurosci*. 2003;26(1):17-22.

136. Huang C, Hu ZP, Long H, Shi YS, Han JS, Wan Y. Attenuation of mechanical but not thermal hyperalgesia by electroacupuncture with the involvement of opioids in rat model of chronic inflammatory pain. *Brain Research Bulletin*. 2004;63:99-103.

137. Huang C, Huang ZQ, Hu ZP, Jiang SZ, Li HT, Han JS, et al. Electroacupuncture Effects in a Rat Model of Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain: Antinociceptive Effects Enhanced and Tolerance Development Accelerated. *Neurochem Res*. 2008;33:2107–11.

138. Wang Y, Lei J, Gupta M, Peng F, Lam S, Jha R, et al. Electroacupuncture in conscious free-moving mice reduces pain by ameliorating peripheral and central nociceptive mechanisms. *Sci Rep*. 2016;6:34493.

139. Zhao ZQ. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. *Prog Neurobiol*. 2008;85(4):355-75.

140. Liu YJ, Fang F, Fang JQ, Zhang JR, Chi XL, Chen HD. Analgesic Effect and Mechanism of Electroacupuncture on Rats with Chronic Inflammatory Pain. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2016;36(6):690-5.

141. White A, Cummings M, Filshie J. An introduction to western medical acupuncture – includes pull out quick reference cards. Elsevier. 2008. p.148-51.

142. Liu F, Fang JQ, Shao XM. Influence of electroacupuncture on the expression of cyclooxygenase mRNA and protein in rats with air-pouch plus recombinant human IL-1 β induced inflammation at the back. *Zhen Ci Yan Jiu*. 2009;34(3):159-62.

143. Wu HG, Liu HR, Tan LY, Gong YJ, Shi Y, Zhao TP, et al. Electroacupuncture and Moxibustion Promote Neutrophil Apoptosis and Improve Ulcerative Colitis in Rats. *Dig Dis Sci*. 2007; 52:379–84.
144. Da Silva MD, Guginski G, Werner MF, Baggio CH, Marcon R, Santos AR. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;217946.
145. Da Silva MD, Bobinski F, Sato KL, Kolker SJ, Sluka KA, Santos AR. IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain. *Mol Neurobiol*. 2015;51(1):19-31.
146. Rittner HL, Hackel D, Voigt P, Mousa S, Stolz A, Labuz D, et al. Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):1000362.
147. Dalpiaz A, Spisani S, Biondi C, Fabbri E, Nalli M, Ferretti ME. Studies on human neutrophil biological functions by means of formyl-peptide receptor agonists and antagonists. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003;3(1):33-42.
148. Silva MD. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da acupuntura no acuponto “spleen” 6(SP6) em camundongos: análise dos seus mecanismos neurobiológicos [tese]. Florianópolis: Universidade ederal de Santa Catarina; 2013.
149. Chiang N, Arita M, Serhan CN. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73(3-4):163-77.
150. Spanbroek R, Hildner M, Köhler A, Müller A, Zintl F, Kühn H, et al. IL-4 determines eicosanoid formation in dendritic cells by down-regulation of 5-lipoxygenase and up-regulation of 15-lipoxygenase 1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(9):5152-7.
151. Ouyang BS, Che JL, Gao J, Zhang Y, Li J, Yang HZ, et al . Effects of electroacupuncture and simple acupuncture on changes of IL-1, IL-4, IL-6 and IL-10 in peripheral blood and joint fluid in patients with rheumatoid arthritis. *Zhongguo Zhen Jiu*. 2010;30(10):840-4.
152. Thomas JR, Nelson JK, Silverman SJ. Métodos de pesquisa em atividade física. 6. ed. PA: Artmed, 2012.
153. Piovezan AP, Batisti AP, Benevides MLACS, Turnes BL, Martins DF, Kanis L, Duarte ECW, Cavaleiro AJ, Bueno PCP. Hydroalcoholic crude extract of *Casearia sylvestris* Sw. reduces chronic post-ischemic pain by activation of pro-resolving pathways. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016.

154. Chang FC, Tsai HY, Yu MC, Yi PL, Lin JG. The Central Serotonergic System Mediates the Analgesic Effect of Electroacupuncture on Zusanli (ST36) Acupoints. *J Biomed Sci.* 2004;11:179-185.
155. Liao H, Hsieh C, Huang C, Lin Y. Electroacupuncture Attenuates Induction of Inflammatory Pain by Regulating Opioid and Adenosine Pathways in Mice. *Scientific Reports.* 2017;7:15679.
156. Chen-Ping W, Chih-Chi C, Jen-Yu W. Inhibitory effect produced by stimulation of afferent nerves on responses of cat dorsolateral fasciculus fibers to noxious stimulus. *Sci Sin.* 1974;17:688-97.
157. Dai Y, Kondo E, Fukuoka T, Tokunaga A, Miki K, Noguchi K. The effect of electroacupuncture on pain behaviors and noxious stimulus-evoked Fos expression in a rat model of neuropathic pain. *J Pain.* 2001;2(3):151-9.
158. Yin CS, Jeong HS, Park HJ, Baik Y, Yoon MH, Choi CB, et al. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. *Res Vet Sci.* 2008;84:159-65.
159. Fox CD, Berger D, Fine PG. A position statement from the American Pain Society. Glenview: American Pain Society, 2000.
160. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* 2008;137(3):473-7.
161. Martins DF, Brito RN, Stramosk J, Batisti AP, Madeira F, Turnes BL, Mazzardo-Martins L, Santos AR, Piovezan AP. Peripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. *J Neurosci Res.* 2015;93(1):157-66.
162. NBR NM-ISO 3611 Micrômetro para medições externas. RJ: 1997.
163. Pereira CKS. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Herissantia Crispa* (L.) Brizicky em camundongos [tese]. João Pessoa: Universidade Federal de Paraíba; 2013.
164. 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.* 2015;746:267-73.

165. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
166. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16(2):109-10.
167. Breivika H, Stubhauga A, Butler S. CNS-mechanisms contribute to chronification of pain. *Scand J Pain.* 2017;137-39.
168. Borsook D, Linnman C, Faria V, Strassman AM, Becerra L, Elman I. Reward deficiency and anti-reward in pain chronification. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016;68:282-97.
169. Woller SA, Eddinger KA, Corr M, Yaksh TL. An overview of pathways encoding nociception. *Clin Exp Rheumatol.* 2017;107(5):40-6.
170. McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol.* 2005;192(2):444-62.
171. Meves H. The action of prostaglandins on ion channels. *Curr Neuropharmacol.* 2006;4(1):41-57.
172. Motwani MP, Newson J, Kwong S, Richard-Loendt A, Colas R, Dalli J, et al. Prolonged immune alteration following resolution of acute inflammation in humans. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186964.
173. Serhan CN. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(4):305-21.
174. Wu SH, Liao PY, Dong L, Chen ZQ. Signal pathway involved in inhibition by lipoxin A(4) of production of interleukins induced in endothelial cells by lipopolysaccharide. *Inflammation Res.* 2008;57:430–37.
175. Svensson CI, Zattoni M, Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. *J Exp Med.* 2007;204(2):245-52.
176. Ulloa L, Quiroz-Gonzalez S, Torres-Rosas R. Nerve Stimulation: Immunomodulation and Control of Inflammation. *Trends Mol Med.* 2017;23(12):1103-20.
177. Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat. Rev.*

Drug Discov. 2005; 4(8):673-84.

178. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med*. 2006;203(7):1623-8.

179. Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7$ nAChR⁺ splenocytes. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1939-52.

180. Gautron L, Elmquist JK, Williams KW. Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. *Cell*. 2015;161(1):133-45.

181. Bouton CE, Shaikhouni A, Annetta NV, Bockbrader MA, Friedenber DA, Nielson DM, et al. Restoring cortical control of functional movement in a human with quadriplegia. *Nature*. 2016;533,247–50.

182. 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.

183. Trakhtenberg EF, Goldberg JL. Neuroimmune communication. *Science*. 2011;334, 47–8.

184. Pavlov VA, Tracey KJ. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nat Neurosci*. 2017;20(2)156–66.

185. Colquhoun D, Novella SP. Acupuncture is theatrical placebo. *Anesth Analg*. 2013;116(6)1360–63.

186. Ben-Shaanan TL, Azulay-Debby H, Dubovik T, Starosvetsky E, Korin B, Schiller M, et al. Activation of the reward system boosts innate and adaptive immunity. *Nat Med*. 2016; 22(8)940–4.

187. Taub A. Thumbs down on acupuncture. *Science*. 1998;279(5348):159.

188. Liu XJ, Gingrich JR, Vargas-Caballero M, Dong YN, Sengar A, Beggs S, et al. Treatment of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling Src from the NMDA receptor complex. *Nat Med*. 2008;14(12):1325-32.

189. Huang CP, Chen HN, Su HL, Hsieh CL, Chen WH, Lai ZR, et al. Electroacupuncture Reduces Carrageenan- and CFA-Induced Inflammatory Pain Accompanied by Changing the Expression of Nav1.7 and Nav1.8, rather than Nav1.9, in Mice Dorsal Root Ganglia. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:312184.

190. Chen WH, Hsieh CL, Huang CP, Lin TJ, Tzen JT, Ho TY, et al. Acid-sensing ion channel 3 mediates peripheral antihyperalgesia effects of acupuncture in mice in inflammatory pain. *J Biomed Sci.* 2011;18:82.
191. Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schäfer M, et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology.* 2001;95(2):500-8.
192. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2001;2(7):612-9.
193. Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;73(3-4):141-62.
194. Kim HW, Uh DK, Yoon SY, Roh DH, Kwon YB, Han HJ, et al. Low-frequency electroacupuncture suppresses carrageenan-induced paw inflammation in mice via sympathetic post-ganglionic neurons, while high-frequency EA suppression is mediated by the sympathoadrenal medullary axis. *Brain Res Bull.* 2008;75(5):698-705.
195. Leszczynski D, Ustinov J. Protein kinase C-regulated production of prostacyclin by rat endothelium is increased in the presence of lipoxin A4. *FEBS Lett.* 1990;263(1):117-20.
196. Brezinski ME, Gimbrone Jr MA, Nicolaou KC, Serhan CN. Lipoxins stimulate prostacyclin generation by human endothelial cells. *FEBS Lett.* 1989;245(1/2):167-72.
197. Ford-Hutchinson AW, Walker JR, Davidson EM, Smith MJ. PGI₂: a potential mediator of inflammation. *Prostaglandins.* 1978;16(2):253-8.
198. Ueno A, Naraba H, Ikeda Y, Ushikubi F, Murata T, Narumiya S, et al. Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw edema induced in IP-receptor-deficient mice. *Life Sci.* 2000;66(12):155-60.
199. Higgs EA, Moncada S, Vane JR. Inflammatory effects of prostacyclin (PGI₂) and 6-oxo-PGF₁α in the rat paw. *Prostaglandins.* 1978;16(2):153-62.
200. Sinniah A, Yazid S, Perretti M, Solito E, Flower RJ. The role of the Annexin-A1/FPR2 system in the regulation of mast cell degranulation provoked by compound 48/80 and in the inhibitory action of nedocromil. *Int Immunopharmacol.* 2016;32:87-95.
201. Ji RR, Chamezian A, Zhang YQ. Pain Regulation by Non-neuronal Cells and Inflammation. *Science.* 2016;354(6312):572-77.

202. Willemen HL, Eijkelkamp N, Garza Carbajal A, Wang H, Mack M, Zijlstra J, et al. Monocytes/Macrophages Control Resolution of Transient Inflammatory Pain. *J Pain*. 2014;15(5):496–506.
203. Svensson CI, Brodin E. Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets. *Mol Interv*. 2010;10(1):25-38.
204. Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M, DeLeo JA. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 β expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res*. 1999;829(1-2):209-21.
205. Watkins LR, Martin D, Ulrich P, Tracey KJ, Maier SF. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain*. 1997;71(3):225-35.
206. Irwin MR, Cole SW. Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):625-32.
207. Flower RJ. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol*. 1988;94:987-1015.
208. Cirino G, Cicala C, Sorrentino L, Ciliberto C, Arpaia G, Perretti M, et al. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. *Br J Pharmacol*. 1993;108(3):573-4.
209. Perretti M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte – endothelium interaction. *Trends Pharmacol Sci*. 1997;18(11):418-25.
210. Cuzzocrea S, Tailor A, Zingarelli B, Salzman AL, Flower RJ, Szabo C, et al. Lipocortin 1 protects against splanchnic artery occlusion and reperfusion injury by affecting neutrophil migration. *J Immunol*. 1997;159(10):5089-97.
211. La M, D'Amico M, Bandiera S, Di Filippo C, Oliani SM, Gavins FNE, et al. Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action. *Fed Am Soc Exp Biol J*. 2001;15(12):2247-56.
212. Oehler B, Mohammadi M, Perpina Viciano C, Hackel D, Hoffmann C, Brack A, et al. Peripheral Interaction of Resolvin D1 and E1 with Opioid Receptor Antagonists for Antinociception in Inflammatory Pain in Rats. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:242.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Produções científicas publicadas durante o Mestrado

Pain-related encephalic regions influenced by yoga practice: an integrative review

Short title: Yoga decreases pain-related neuronal activity

Petra Jurisic ^a, Daiana Cristina Salm ^{a,b}, Cintia Vieira Caron ^{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, Palhoça, Santa Catarina, Brazil.

^b Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil

^c Postgraduate Program in Neuroscience, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

*Corresponding Author: Daniel F. Martins, PT, PhD. Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), University of Southern Santa Catarina, Palhoça, Santa Catarina, Brazil. Phone: +55 48 3279-1057; E-mail: danielmartinsfisio@hotmail.com; daniel.martins4@unisul.br

Funding statement

University of Southern Santa Catarina (UNISUL) which supported scholarships for scientific initiation.

De: Complementary Therapies in Clinical Practice <EvisSupport@elsevier.com>

Enviado: terça-feira, 16 de janeiro de 2018 08:11

Para: danielmartinsfisio@hotmail.com

Assunto: Revision Requested - CTCP_2017_416 for Complementary Therapies in Clinical Practice

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: CTCP_2017_416

Title: Pain-related encephalic regions influenced by yoga practice: an integrative review

Journal: Complementary Therapies in Clinical Practice

Dear Dr. Martins,

On 17/Dec/2017 I sent the above-referenced request for your manuscript, and would kindly like to remind you to respond to this request by 15/Feb/2018.

To view the request, log into EVISE* at: http://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=CTCP and click on the title of your manuscript, located under 'My Author Tasks' on your homepage. Complete the required steps and submit the manuscript.

What happens next?

After you submit your manuscript you will receive an email confirmation that your submission is complete. To track the status of your manuscript throughout the editorial process, log into EVISE* at: http://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=CTCP and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Kind regards,

Complementary Therapies in Clinical Practice

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE* via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Antioxidant Effect of Far Infrared Radiation Produced by Bioceramics in Individuals with Intermittent Claudication: a Randomized, Controlled Pilot Study

Short title: Far Infrared and Intermittent Claudication

Fábio Goulart da Silva^a; Gerli Elenise Gehrke Herr^a; Francisco José Cidral-Filho^b, Fabricia Petronilho^c; Lucineia Gainski Danielski^c; Drielly Florentino^c; Franciane Bobinski^b; Daniela Dero Ludtke^b; Cintia Vieira Caron^b; Daniel Fernandes Martins^{b,*,#}; Eliane Roseli Winkelmann^{a,#}.

^aLaboratory of Physical Pathophysiology of Exercise, Graduate Program in Comprehensive Health Care at Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul – (UNIJUI), Ijuí, RS, Brazil;

^bExperimental Neuroscience Laboratory (LaNEx) and Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina at Palhoça, SC, Brazil;

^cLaboratory of Neurobiology of Inflammatory and Metabolic Processes, University of Southern Santa Catarina at Tubarão, SC, Brazil.

[#] These authors contributed equally to this study.

*Correspondence to: Daniel F. Martins, Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina at Palhoça, Santa Catarina, Brazil. Tel: +55-48-3279-1167. E-mail addresses:

danielmartinsfisio@hotmail.com, daniel.martins4@unisul.br.

Sources of Funding: CNPq, FAPERGS, FAPESC, CAPES, PUIC and UNIJUÍ.

De: Caralin Walsh <caralin@innovisionhm.com>

Enviado: sábado, 23 de dezembro de 2017 23:02

Para: Danielmartinsfisio@hotmail.com

Assunto: ATHM 5861 Revisions Requested

Dear Dr. Daniel Fernandes Martins:

I am pleased to inform you that our editors are requesting a revision of your manuscript, MS #5861, "Antioxidant effect of Far Infrared Radiation produced by bioceramics in individuals with intermittent claudication: A randomized, controlled pilot study," with the possibility that it may be published in *Alternative Therapies in Health and Medicine* after adequate revision.

Your manuscript was reviewed by 2 peer reviewers. Their comments and suggestions are attached. Please review them and revise your manuscript accordingly. We would like your revised manuscript by January 22, 2018. When you return your revised manuscript to us, please highlight the changes you have made in the text and include a cover letter briefly describing the changes you made and any reviewer comments that you chose not to address. Your revised manuscript and cover letter will then be forwarded to our editor in chief, who will ultimately determine whether the manuscript will be accepted for publication.

We are deeply interested in your work and our review board has made these recommendations for revision to make this a publishable paper for our journal, however publication is not guaranteed at this point. It is up to the editor in chief to determine whether the reviewers' recommendations have been adequately addressed.

Thank you again for your fine contribution to *Alternative Therapies in Health and Medicine*. I look forward to receiving your revised manuscript.

Sincerely,

Caralin Walsh

Editorial Assistant

Alternative Therapies in Health and Medicine

ANEXO

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética (CEUA)



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 30 de março de 2017
Registro na CEUA (código): 17.002.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Efeito antihiperalgésico induzido por eletroacupuntura na inflamação periférica persistente em camundongos: avaliação do possível mecanismo pró-resolutivo", registrada com o nº 17.002.2.07.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 11/04/2017.

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