



**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**TESE DE DOUTORADO**

*Avaliação dos Efeitos da Acupuntura e da Eletroacupuntura em Modelo Animal de Dor Neuropática: Parâmetros Comportamentais e Bioquímicos*

**Lauren Naomi Spezia Adachi**

**Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres**

**Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Vercelino**

**Porto Alegre**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

*Avaliação dos Efeitos da Acupuntura e da Eletroacupuntura em Modelo Animal de Dor Neuropática: Parâmetros Comportamentais e Bioquímicos*

**Autora: Lauren Naomi Spezia Adachi**

**Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres**

**Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Vercelino**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Porto Alegre**

**2017**

CIP - Catalogação na Publicação

Adachi, Lauren Naomi Spezia  
Avaliação dos Efeitos da Acupuntura e da  
Eletroacupuntura em Modelo Animal de Dor  
Neuropática: Parâmetros Comportamentais e Bioquímicos  
/ Lauren Naomi Spezia Adachi. -- 2017.  
155 f.

Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres.  
Coorientador: Rafael Vercelino.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Acupuntura. 2. Eletroacupuntura. 3.  
Isoflurano. 4. Dor crônica. 5. Fator de crescimento  
neural. I. Torres, Iraci Lucena da Silva, orient.  
II. Vercelino, Rafael, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Artur Francisco Schumacher Schuh

(PPGCM-UFRGS)

Dra. Norma Anair Possa Marroni

(PPGCM-UFRGS)

Dra. Alessandra Hubner de Souza

(ULBRA)

Dra. Isabel Cristina de Macedo

(UNIPAMPA)

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

Aos meus pais.

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço imensamente à minha Orientadora Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, pela oportunidade concedida desde a iniciação científica até hoje. Obrigada pela confiança, por todos os ensinamentos durante estes 11 anos de orientação, pelo apoio e empenho. Obrigada por tudo.
- Pela amizade, confiança e ensinamentos agradeço ao meu co-orientador Dr. Rafael Vercelino. Muito obrigada por toda ajuda prestada durante este trabalho.
- Obrigada às amigas e colegas Dra. Carla de Oliveira e Dra. Vanesa Leal Scarabelot pelo apoio, companheirismo, amizade e incansável ajuda durante este trabalho.
- Também gostaria de agradecer às colegas Dra. Joanna Ripoll Rozisky e Dra. Liciane Medeiros que foram muito importantes para minha formação, desde o meu início no grupo de pesquisa. Obrigada por toda ajuda!
- Às alunas de Iniciação Científica Tizye de Lima Rizzo, Camila Muneretto e Natália de Paula Silveira, meu agradecimento por toda ajuda na execução deste trabalho.
- Gostaria de agradecer às colegas Dra. Andressa de Souza, Joice Soares de Freitas e Roberta Ströher pela ajuda nos testes bioquímicos, muito obrigada.
- A todos os colegas do grupo de pesquisa em Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clínicas, pelo convívio e auxílio sempre que necessário.
- Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - GPPG-HCPA, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (13-0298), por dispor da Unidade de Experimentação Animal (UEA) e da Unidade de Análises Moleculares e Proteína (UAMP) onde o trabalho foi desenvolvido.

- Agradeço a ajuda e disposição das colegas Francele Valente Piazza, do Laboratório de Histofisiologia Comparada, e Bruna Bellaver, do Departamento de Bioquímica pela ajuda nos experimentos e disponibilidade.
- Pela assistência e atenção, agradeço à Marta Cioato, Tuane N Alves Garcez e à Daniela Campagnol da Unidade de Experimentação Animal. Também agradeço a Rosalina A Braga, Karen Schwambach, Sônia Rodrigues e Vera L Gonçalves por todo suporte para o desenvolvimento deste estudo.
- Pela disposição e generosidade, agradeço ao Everaldo B de Almeida (CPE) e Jeferson B da Silva (UAMP). Obrigada por toda ajuda prestada.
- Agradeço à UFRGS, pela oportunidade, a CAPES, por ter financiado meus estudos. Agradeço também aos órgãos de fomento CNPq e FINEP que contribuíram para realização deste trabalho.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade de desenvolver meu Doutorado nesta instituição.
- Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Dr. Wolnei Caumo, obrigada pela oportunidade e confiança.
- A Vera Susana V. Ribeiro e aos demais funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, pelas informações e ajuda quando solicitadas.
- BIC/UFRGS, PIBIC CNPq/UFRGS e PROCAD, pelas bolsas dos alunos que participaram deste trabalho.
- Meu agradecimento especial ao meu amor Guilherme Mahlman Mülheres, que sempre esteve ao meu lado, incentivando e apoiando. Muito obrigada por abdicar de algumas coisas para que pudesse me dedicar ao meu trabalho. Te amo muito.

- Agradeço imensamente ao meu pai Yoshimasa Adachi e à minha mãe Vandira Spezia Adachi, por serem meu porto seguro, por apoiarem minhas escolhas, e acreditarem em mim. Enfim, por todo esforço e todo amor dedicados a mim, muito obrigada. Amo vocês.
- Agradeço o incentivo e apoio de minha amada irmã Tayanee Akemi Spezia Adachi e meu cunhado Cezar Dall Pizzol, obrigada pelo apoio sempre.
- Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. A realização deste trabalho não seria possível sem a ajuda de todos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
APRESENTAÇÃO.....	13
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	16
I. INTRODUÇÃO.....	18
II. REVISÃO DA LITERATURA .....	22
2.1 Estratégias para Localizar e Selecionar Informações.....	23
2.2 Dor.....	25
2.3 Dor Neuropática (DN).....	26
2.3.1 Sensibilização Periférica.....	28
2.4 Acupuntura e Eletroacupuntura.....	35
2.7 Biomarcadores.....	39
III. JUSTIFICATIVA .....	43
IV. OBJETIVOS.....	45
4.1 Objetivo Geral .....	46
4.2 Objetivos Específicos .....	46
V. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....	47
VI. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....	58
6.1 Artigo 1 .....	61
6.2 Artigo 2.....	89
6.3 Artigo 3.....	118
VII. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	59
VIII. PERSPECTIVAS.....	63
IX. ANEXOS.....	65
A) APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	66
B) DIVULGAÇÕES .....	67
C) ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO .....	69
D) ARTIGO 1 SUBMETIDO AO PERIÓDICO PHARMACOLOGY RESEARCH.....	74
E) ARTIGO 2 SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY.....	153
F) ARTIGO 3 SUBMETIDO AO PERIÓDICO MOLECULAR NEUROBIOLOGY....	76

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Fluxograma da pesquisa realizada com as palavras-chave .....	24
Figura 2. Transmissão do estímulo nociceptivo.....	28
Figura 3. Sensibilização Central.....	32
Figura 4. Resumos dos resultados apresentados nesta tese.....	138

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

5-HT = Serotonina

AC = Acupuntura

ACTH = Hormônio Adrenocorticotrófico

AMPA = Ácido  $\alpha$ -Amino-3-Hidróxi-5-Metil-4-Isoxazolepropiónico

AMPc = Adenosina Monofosfato Cíclico

ANOVA = *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

ATP = Adenosina Trifosfato

AVC = Acidente Vascular Cerebral

BDNF = *Brain Derived Neurotrophic Factor* (Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo)

CCI = *Chronic Constriction Injury*

CGRP = Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

CSA = *Cros-Sectional Area*

DCFH = Diacetato de Diclorofluoresceína

DN = Dor Neuropática

EA = Eletroacupuntura

GABA = Ácido Gama-Aminobutírico

GDR = Gânglio da Raiz Dorsal

GSH = Glutathiona

IASP = *International Association for Study of Pain* (Associação Internacional para o Estudo da Dor)

IL-1 $\beta$  = Interleucina 1 beta

IL-10 = Interleucina 10

IL-6 = Interleucina 6

HHA = Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

LCR = Líquido Céfalo Raquidiano

LTP = *Long Term Potentiation* (potenciação de longa duração)

LSD = *Fisher's LSD statistic test*

NGF = *Neural Growth Factor* (fator de crescimento neural)

NK = Neurocinina

NMDA = N-metil-d-aspartato

NP= *Neuropathic pain*

NRs = neurotrofinas

PG-E2 = Prostaglandina E2

PMRs = Receptores Polimodais

RMIf = Ressonância Magnética Funcional

ROS = Espécies Reativas de Oxigênio

SC = Sensibilização Central

SN = Sistema Nervoso

SNC = Sistema Nervoso Central

SNP = Sistema Nervoso Periférico

SP = Sensibilização Periférica

SNK = Student-Newman-Keuls

SNL = *Spinal nerve ligation*

TNF- $\alpha$  = *Tumor Necrosis Factor Alpha* (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

TrkB = Receptor Tirosina Quinase B

TRPV1 = Receptores Vaniloides sub-tipo 1

## **APRESENTAÇÃO**

Esta Tese está estruturada em 3 capítulos e 2 anexos:

- Capítulo I - Introdução, Revisão da Literatura, Objetivos e Referências Bibliográficas;
- Capítulo II - Materiais e Métodos, Resultados e Discussão na forma de artigos científicos;
- Capítulo III – Considerações Finais
- Anexos I - Aprovação do comitê de ética
- Anexo II - Produção acadêmica durante o período de doutorado.

O item Referências Bibliográficas refere-se somente às referências contidas nos itens Introdução, Revisão da Literatura e Considerações Finais.

Detalhes técnicos mais precisos sobre a metodologia empregada em cada um dos trabalhos apresentados podem ser encontrados nos trabalhos científicos.

## **RESUMO**

Dor neuropática (DN) é definida como “dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção em sistema nervoso”, porém sua prevalência depende do tipo de trauma e da disfunção relacionada. Apesar desta condição dolorosa ser considerada altamente prevalente e debilitante, os tratamentos disponíveis são relacionados a efeitos adversos dificultando a adesão. Devido a isso, buscam-se alternativas não farmacológicas para o tratamento deste tipo de dor, entre elas, as técnicas de neuromodulação periférica, como acupuntura (AC) e eletroacupuntura (EA). Estas técnicas podem ser combinadas com intervenções farmacológicas e não farmacológicas e têm apresentado resultados promissores no tratamento da dor neuropática. No entanto, seus mecanismos de ação não estão totalmente elucidados, desta forma a utilização de modelos animais é de grande valia para o estudo destes mecanismos no tratamento da dor neuropática e da patofisiologia deste tipo de dor crônica. É importante salientar que a aplicação de AC e EA em animais acordados é complexa, visto que gera desconforto e pode alterar a analgesia induzida pelo tratamento. Em muitos estudos a anestesia com isoflurano é utilizada durante a aplicação dos tratamentos, porém sua utilização pode gerar um viés no estudo, considerando a possível interferência do fármaco nos resultados comportamentais e neuroquímicos. Outro importante foco de estudo consiste em comparar as duas técnicas, AC e EA, buscando determinar qual destas é a mais eficaz no tratamento da dor neuropática. Considerando o exposto acima, os objetivos desta tese foram: 1) avaliar os parâmetros comportamentais e neuroquímicos dos efeitos da utilização de anestesia na aplicação de AC e EA em ratos submetidos ao modelo de DN; 2) comparar os efeitos da AC e EA em modelo animal de DN por meio de parâmetros comportamentais, neuroquímicos e histológicos. Considerando os resultados obtidos nesta tese, concluímos que o isoflurano aumenta a analgesia promovida por AC e EA, provavelmente diminuindo o efeito do estresse gerado pela aplicação dos tratamentos em animais acordados,

resultado que é corroborado pela diminuição do nível de S100 $\beta$  periférico (marcador de morte neuronal central); Por outro lado, o isoflurano diminuiu os níveis de fator de crescimento neuronal (NGF) no nervo periférico lesado, indicando diminuição do processo de regeneração neural, enquanto a EA aumentou. Ao mesmo tempo, o isoflurano alterou os efeitos dos tratamentos nos comportamentos exploratórios e nos níveis de N-metil D-aspartato em tronco encefálico e medula espinhal. A AC apresentou-se mais eficaz no tratamento da DN em comparação à EA, porém nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar os danos causados pela indução da DN no músculo gastrocnêmio esquerdo dos animais demonstrado na histologia. Todavia, este resultado não alterou a analgesia gerada pelos tratamentos.

**Palavras-Chave:** dor neuropática, acupuntura, eletroacupuntura, isoflurano, NGF, S100b, NMDA.

## **ABSTRACT**

Neuropathic pain (NP) is defined as "pain initiated or caused by primary injury or dysfunction in the nervous system," but its prevalence depends on the type of trauma and related dysfunction. Although this painful condition is considered to be highly prevalent and debilitating, the available treatments are related to adverse effects, making adherence difficult. Because of this, non-pharmacological alternatives for the treatment of this type of pain are sought, among them, the techniques of peripheral neuromodulation, such as acupuncture (AC) and electroacupuncture (EA). These techniques can be combined with pharmacological and non-pharmacological interventions and have shown promising results in the treatment of neuropathic pain. However, its mechanisms of action are not fully elucidated, so the use of animal models is of great value for the study of these mechanisms in the treatment of neuropathic pain and the pathophysiology of this type of chronic pain. It is important to emphasize that the application of AC and EA in awake animals is complex, since it generates discomfort and can alter the analgesia induced by the treatment. In many studies, anesthesia with isoflurane is used during the application of the treatments, but its use may generate a bias in the study, considering the possible interference of the drug in the behavioral and neurochemical results. Another important focus of the study is to compare the two techniques, AC and EA, seeking to determine which is the most effective in the treatment of neuropathic pain. Considering the above, the objectives of this thesis were: 1) to evaluate the behavioral and neurochemical parameters of the effects of the use of anesthesia in the application of AC and EA in rats submitted to the DN model; 2) to compare the effects of AC and EA on animal model of DN by means of behavioral, neurochemical and morphological parameters. Considering the results obtained in this thesis, we conclude that isoflurane increases the analgesia promoted by AC and EA, probably decreasing the effect of the stress generated by the application of the treatments in agreed animals, a result that is corroborated by the decrease

in the level of peripheral S100 $\beta$  (biomarker of central neuronal injury); On the other hand, isoflurane decreased the levels of neural growth factor (NGF) in the injured peripheral nerve, indicating a decrease in the neural regeneration process, while the EA increased. At the same time, isoflurane altered the effects of treatments on exploratory behaviors and N-metil-D-aspartato (NMDA) levels in the brainstem and spinal cord. AC was more effective in the treatment of DN compared to EA, but none of the treatments was able to alter the damage caused by DN induction in the left gastrocnemius muscle of the animals showed in histology. However, this result did not alter the analgesia generated by the treatments.

**Keywords:** neuropathic pain, acupuncture, electroacupuncture, isoflurane, NGF, S100b, NMDA.

---

## **I. INTRODUÇÃO**

## **1. INTRODUÇÃO**

Dor aguda é uma resposta protetora do organismo a estímulos nocivos que, quando não controlada, resulta em efeitos indesejáveis que podem desencadear um processo de doença crônica. Dentre as dores crônicas, a dor neuropática (DN) é um problema clínico importante e debilitante; pode ser decorrente de uma lesão nervosa central ou periférica, afetando o sistema somatossensorial. Apesar do grande comprometimento clínico causado por esta condição, os tratamentos farmacológicos disponíveis são relacionados a efeitos adversos, diminuindo a adesão e dificultando o tratamento (Li *et al.*, 2016). Por isso na busca por novas terapias que auxiliem a diminuição dos sintomas clínicos da DN, estudos em modelos animais são extremamente importantes. Nas últimas décadas, o modelo da lesão constritiva crônica do nervo ciático (CCI), descrita por Bennet e Xie, 1988 tem sido o modelo animal mais utilizado para o estudo da patofisiologia e tratamento da DN (Bennett e Xie, 1988; Wang *et al.*, 2016)

Dentre as técnicas não farmacológicas que apresentam bons resultados no tratamento de quadros dolorosos crônicos, a Acupuntura (AC) e a Eletroacupuntura (EA) se destacam como técnicas promissoras complementares ou mesmo substitutivas a terapias farmacológicas, quando apresentam resultados satisfatórios. Ambos os tratamentos têm sido amplamente utilizados clinicamente nos países asiáticos no tratamento de uma série de doenças como osteoartrite (Liu, Y. H. *et al.*, 2017), depressão (Dong *et al.*, 2017) e cefaléia (Liu e Yu, 2016); incluindo doenças que cursam com dor aguda e crônica.

Apesar da analgesia induzida pela AC e EA ser reconhecida, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido (Wang *et al.*, 2016). Sabe-se que AC e EA apresentam mecanismos complexos, que alteram diversos sistemas endógenos, como por exemplo, o sistema opioide, que aumenta a liberação de encefalinas e dinorfinas nos sistemas descendente

inibitório da dor, assim como ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Han, 1999); Alvarenga et al., 2014).

Com o aumento da utilização destas tecnologias nos países ocidentais, e com o objetivo de oferecer tratamentos eficazes e livres de efeitos contextuais (placebo), algumas dúvidas em relação ao real efeito destas terapias permanecem. Uma dúvida frequente é reconhecer se há diferença entre o tratamento de AC em relação a sua associação à corrente elétrica, a EA. Existem poucos estudos pré-clínicos que comparem os efeitos comportamentais e neuroquímicos da AC manual e da EA no tratamento da DN. Dentre os estudos existentes, as metodologias não são consistentes ao comparar ambas as técnicas diretamente (Langevin *et al.*, 2015). A escolha do melhor tratamento depende da doença a ser tratada, das especificidades dos pacientes e da experiência clínica dos profissionais. Em DN, por exemplo, tanto AC ou EA têm bons resultados, mas ainda é necessário pesquisar sobre as possíveis diferenças entre os seus efeitos sobre esta condição dolorosa e seus mecanismos de ação.

O uso de modelos animais de dor crônica, como a DN, aliados ao tratamento de AC e EA, é de extrema importância para elucidarmos estes questionamentos. No entanto, dentro da prerrogativa translacional, existe grande dificuldade na aplicação destes tratamentos em modelos animais, o que consequentemente dificulta a interpretação das respostas obtidas em um ambiente de pesquisa de estudos pré-clínicos. As formas utilizadas para a aplicação de AC e EA descritas na literatura são: animais acordados e livres, o que tende a gerar estresse, já que a inserção da agulha pode gerar desconforto ao animal; animais restritos, além do desconforto da inserção da agulha, a restrição é conhecida por causar estresse (agudo ou crônico) que influencia diretamente a analgesia induzida pelos tratamentos; animais anestesiados com isoflurano, apesar de ser um anestésico inalatório de pouca metabolização, pouco se sabe sobre as possíveis interferências nas respostas comportamentais e neuroquímicas induzidas pelos tratamentos de AC ou EA.

Dentre os mecanismos neuroquímicos relacionados à DN e aos tratamentos com AC e EA, têm sido indentificados diversos biomarcadores. Dentre os mais estudados está: o fator de crescimento neural (NGF), uma neurotrofina atuante no processo nociceptivo, tanto em nível central quanto periférico (Bannwarth e Kostine, 2014); proteína S100 $\beta$ , relacionada a processos de dor crônica, e utilizada como biomarcador de transtorno ou dano cerebral (Martins *et al.*, 2006); citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF alfa) com importante papel na indução e manutenção da DN (Wang *et al.*, 2016), e alteradas por AC e EA em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) (Geis *et al.*, 2017). Os receptores N-metil D-aspartato (NMDAr) também participam ativamente do processo de sensibilização central, envolvido na DN (Ji e Strichartz, 2004), e o tratamento com AC e EA parecem alterar a expressão destes receptores (Lu *et al.*, 2016). Existem evidências que estes tratamentos também causam alterações nos níveis de diclorofluoresceína diacetato (DCFH), importante marcador de estresse oxidativo que, em SNP, também está alterado em condições de DN (Choi *et al.*, 2012).

Considerando o exposto acima, os objetivos desta tese foram: avaliar a influência da anestesia inalatória na aplicação de AC e EA em parâmetros comportamentais e neuroquímicos em ratos com DN; e comparar os efeitos da AC e EA em um modelo animal de DN em parâmetros comportamentais, neuroquímicos e histológicos

---

## **II. REVISÃO DA LITERATURA**

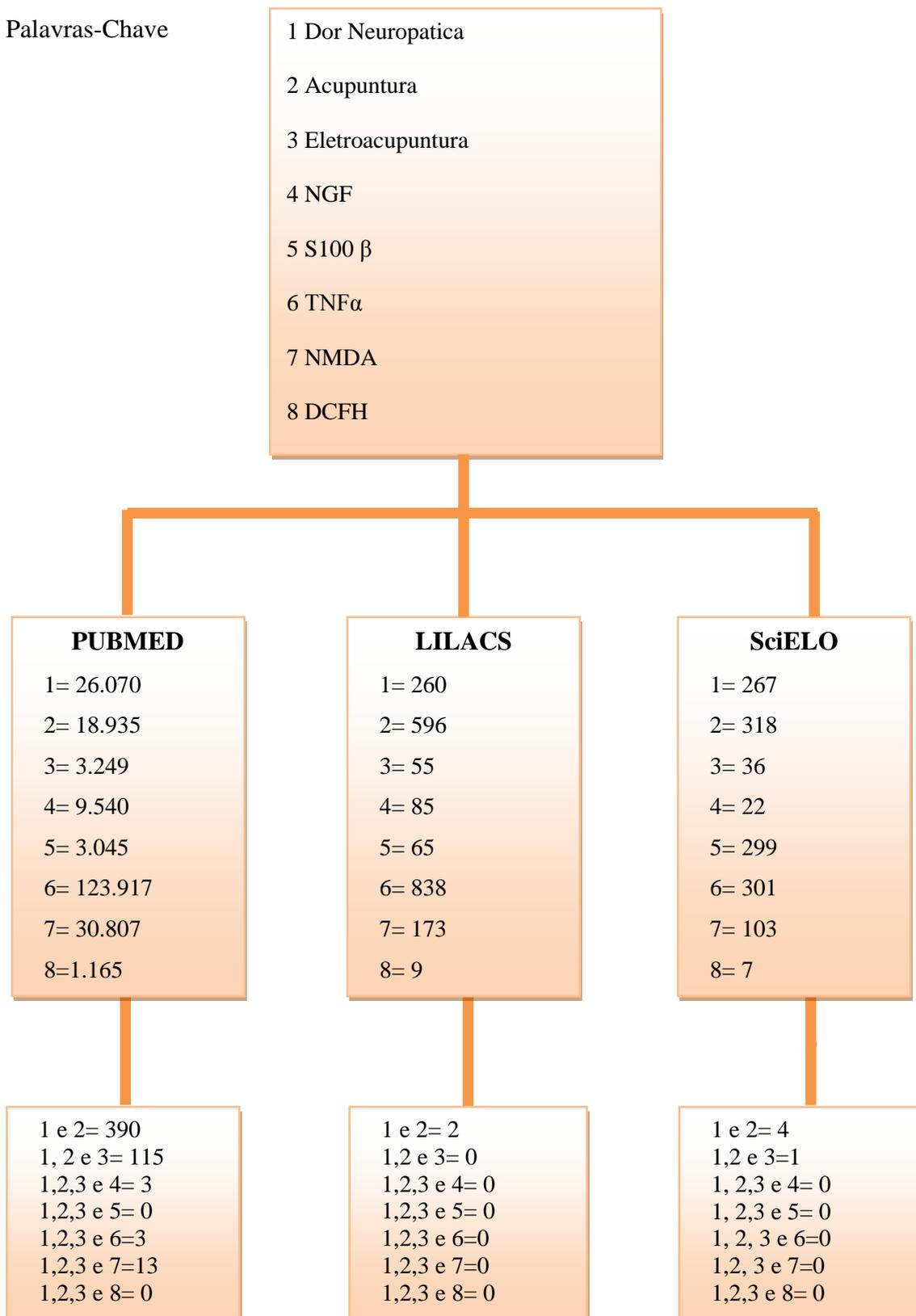
## **2.1 Estratégias para Localizar e Selecionar Informações**

Nesta revisão de literatura buscou-se estudar os principais aspectos da dor neuropática, acupuntura, eletroacupuntura e a relação com biomarcadores. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (site PubMed), LILACS, SciELO. Foram selecionados artigos publicados entre 1997 e 2017.

Nos sites PubMed, LILACS, SciELO foram realizadas buscas utilizando os termos: *neuropathic pain*, *acupuncture*, *electroacupuncture*, *NGF*, *S100  $\beta$* , *TNF- $\alpha$* , *NMDA* e *DCFH*. Em relação ao termo *neuropathic pain*, foram encontrados 26.070 artigos no PubMed e 260 artigos no LILACS, já no SciELO foram encontrados 267 artigos. Utilizando-se o termo *acupuncture* foram encontrados 18.935 artigos no PubMed, 596 artigos no LILACS e 318 no SciELO. Com o descritor *electroacupuncture* a busca no PubMed encontrou 3.249 artigos, 55 no LILACS e 36 no SciELO. Com o descritor *NGF*, foram encontrados 9.540 no PubMed, 85 no LILACS e 22 no SciELO. Para *S100  $\beta$* , 3.045 artigos foram encontrados no PubMed, 65 no LILACS e 229 no SciELO. Em relação ao *TNF- $\alpha$*  123.917 artigos foram encontrados no PubMed, 838 no LILACS e 301 no SciELO. A busca por *NMDA* revelou 30.807 artigos no PubMed, 173 no LILACS e 103 no SciELO. Por último, a busca simples de *DCFH* revelou 1.165 artigos no PubMed, 9 no LILACS e 7 no SciELO.

Refinando-se a busca, com cruzamentos entre as palavras-chave foi encontrado um reduzido número de artigos como mostrado na Figura 1.

Palavras-Chave



**Figura 1.** Fluxograma da pesquisa realizada com as palavras-chave

## **2.2 Dor**

Dor é conceituada como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) desde 1979 (Merskey, 1994). Entretanto, Williams e Craig sugerem uma atualização do conceito, com maior abrangência, que beneficiaria o entendimento e o tratamento da dor (Williams e Craig, 2016). Assim, a nova definição considera dor “uma experiência angustiante associada a dano tecidual real ou potencial com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais” (Williams e Craig, 2016).

Seguindo critério temporal, a dor pode ser classificada em aguda ou crônica. Devido à sua natureza angustiante e desagradável, a dor aguda exerce um papel protetor contra danos teciduais e geralmente está relacionada a causa recente. É causada por traumas, doenças subjacentes, alterações funcionais musculares ou viscerais e, na maioria dos casos, cessa em alguns dias ou semanas, sendo responsiva a analgésicos clássicos (Tajerian e Clark, 2017).

Por outro lado, a dor pode se tornar persistente, deixando de ser um sintoma, e passa a ser por si só a doença, caracterizada por um quadro de dor crônica. Estes casos são decorrentes da incapacidade do organismo de reverter a lesão relacionada à dor, como em casos inflamatórios crônicos, como a osteoartrite, ou então quando há o desequilíbrio entre os sistemas inibitórios e excitatórios nociceptivos, gerando, desta forma, uma resposta mal adaptativa a dor (D'mello e Dickenson, 2008). Em consequência disto há inúmeros prejuízos, mas pode-se salientar como principal, a perda da qualidade de vida destes pacientes.

Entre os critérios diagnósticos para classificação da dor crônica preconizada pela IASP, e que a dor deve ter duração de pelo menos três meses, porém alguns autores sugerem que dores com duração de pelo menos um mês já podem ser consideradas crônicas (Morgan e Whitney, 1996; Loeser, 2001). Dor crônica é uma condição de difícil tratamento e diagnóstico, está associada a sofrimento psicológico e prejuízo funcional (Wolfe *et al.*, 1990; Verhaak *et al.*,

1998). Sendo por estas razões que é considerada um problema de saúde pública que afeta 30% da população adulta nos EUA (Johannes *et al.*, 2010). No Brasil a prevalência da dor crônica difere de acordo com as regiões do país, variando de 28% a 54% da população (Dias *et al.*, 2009; Mendonza-Sassi *et al.*, 2006). Com a incidência e prevalência crescentes, esta doença gera custos de bilhões de dólares relacionados a seus tratamento e comorbidades, como alterações do humor (McWilliams *et al.*, 2004) e prejuízo cognitivo (Berryman *et al.*, 2013).

Um dos mecanismos sugeridos para a cronificação da dor e resistência às formas clássicas de tratamento envolve o conceito de sensibilização central, no qual eventos sensoriais desencadeados por trauma, gradualmente alteram o sistema nervoso central (SNC) amplificando a dor, mesmo sem lesão tecidual e sensibilização periférica (Tajerian e Clark, 2017). Dentre as causas mais comuns de dor crônica relacionada à sensibilização central estão fibromialgia, migrânea e dor neuropática (DN) (Naro *et al.*, 2016).

### **2.3 Dor Neuropática**

DN é definida pela IASP como “dor que surge como consequência direta de uma lesão ou doença do sistema somatossensorial” (Jensen *et al.*, 2011). O sistema somatossensorial é responsável pela percepção do toque, pressão, temperatura, posição, movimento, vibrações e dor. Nervos somatossensoriais encontram-se em pele, músculos, articulações e fáscia; incluem termorreceptores, mecanorreceptores, quimiorreceptores, pruriceptores e nociceptores que enviam sinais para a medula espinhal e, finalmente, para o encéfalo para o seu processamento (Colloca *et al.*, 2017). A maioria dos processos sensoriais envolve núcleos talâmicos que recebem um sinal sensorial que é então direcionado ao córtex cerebral. Lesões ou doenças do sistema nervoso somatossensorial podem levar à transmissão alterada e desordenada de sinais sensoriais na medula espinhal e no encéfalo (Borsook, 2012). Condições comuns associadas à

DN incluem dor pós-herpética, neuralgia trigeminal, dor radicular, neuropatia diabética, amputação, lesão nervosa periférica e acidente vascular cerebral (AVC). De acordo com a origem e etiologia da DN, podemos classificá-la em central ou periférica, sendo que a de origem central é proveniente de lesões ou doenças que acometem o encéfalo ou a medula espinhal (por exemplo: AVC, lesão medular, afecções desmielinizantes, doenças inflamatórias, entre outras). Por outro lado, as dores periféricas são provenientes de alterações nervosas periféricas (por exemplo: diabetes, traumas, tumores, doenças, infecciosas, entre outras) (Baron *et al.*, 2010). No entanto, nem todos os pacientes com neuropatia periférica ou lesão nervosa central desenvolvem o quadro de DN. Um grande estudo com pacientes portadores de diabetes melitus demonstrou que apenas 21% deles desenvolveram sintomas de DN, sendo que todos apresentaram formas diferentes de neuropatias (Costigan *et al.*, 2009).

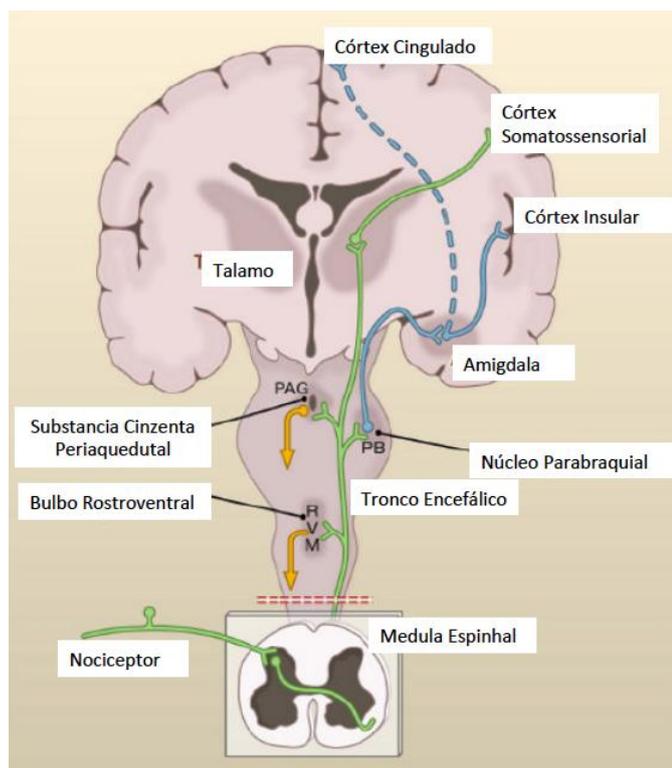
A prevalência global de sintomas de DN é de 21% em pacientes com neuropatia clínica (Colloca *et al.*, 2017) e depende do tipo de trauma e disfunção relacionados (Smith e Torrance, 2012). DN crônica é mais frequente em mulheres (8% versus 5,7% nos homens) e pessoas com mais de 50 anos (8,9% versus 5,6% naqueles <49 anos de idade). Além disto, afeta mais frequentemente a parte inferior das costas, membros inferiores, pescoço e membros superiores (Bouhassira, 2008). Os sintomas mais característicos da DN são: hiperalgesia, caracterizada pelo aumento da resposta aos estímulos nocivos mecânicos ou térmicos; e alodinia, que apresenta respostas dolorosas aos estímulos táteis inócuos. Estes sintomas são característicos de sensibilização periférica e central, decorrentes da lesão nervosa periférica (Baron *et al.*, 2010; Nickel *et al.*, 2012).

### **2.3.1 Sensibilização Periférica**

Sensibilização periférica ocorre após inflamação periférica e é caracterizada por redução do limiar nociceptivo decorrente do aumento da resposta dos nociceptores periféricos a mediadores inflamatórios sensibilizantes. Perl, em 1976, descreveu primeiramente o fenômeno da sensibilização periférica decorrente da estimulação persistente de nociceptores promovendo redução do limiar de despolarização de terminações livres e aumento no tempo de respostas aos estímulos nociceptivos (Perl *et al.*, 1976).

Nociceptores são terminações de fibras nervosas livres específicas para responder a estímulos nocivos. Quando ativados por substâncias algôgenicas transformam estímulos de natureza térmica, química ou mecânica em estímulo elétrico (potencial de ação) (transdução do sinal). Este potencial excitatório será transmitido pelas fibras nervosas periféricas (fibras A $\delta$  e C) até SNC e interpretado no córtex cerebral como dor (Levine e Taiwo, 1990) (transmissão do sinal) (Fig.2). As fibras A $\delta$ , em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida, enquanto as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor. Após o estímulo nociceptivo, no sítio da lesão a partir de axônios danificados e de células satélites, ocorre liberação de substâncias denominadas algôgenicas como íons, prostaglandina E2 (PG-E2), bradicinina, adenosina trifosfato (ATP), histamina, serotonina, interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), TNF- $\alpha$ , glutamato, endotelina1, NGF, e várias quimiocinas. Em sequência, ocorre migração de mastócitos e de leucócitos para o sítio da lesão (Piotrowski e Foreman, 1986; Campbell, 1989). Prostaglandinas e bradicinina causam alterações em receptores vanilóides sub-tipo 1 (TRPV1) acoplados a canais iônicos ligante-dependente via ativação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). Ocorre redução do tempo pós-hiperpolarização de membrana neural reduzindo o limiar de disparo da fibra nervosa.

As neurotrofinas, como o NGF, aumentam a síntese de substância P (SP) e do peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) nas fibras C, promovem redução da atividade do ácido gama-aminobutírico (GABA), em terminações nervosas periféricas e centrais, além de induzirem mudanças em receptores vanilóides (VR1) de fibras A $\delta$  acoplados a canais iônicos ligante-dependente. Outra função relacionada às neurotrofinas, que esta relacionada ao mecanismo de sensibilização periférica é o recrutamento de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) que fosforilam o AMPc e iniciam a transcrição gênica responsável por alterações fenotípicas que contribuem para amplificação da eficácia sináptica (Fletcher *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1999).



**Figura 2.** Transmissão do estímulo nociceptivo (Adaptado de Basbaum *et al.*, 2009).

A persistência do estímulo nociceptivo induz modificações no SNP e sensibilização de fibras nervosas periféricas e centrais, com consequente hiperalgesia primária e secundária e

aumento dos níveis de AMPc e cálcio nos nociceptores. Esta sensibilização resulta em alodinia e hiperalgesia (Fletcher *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1999). Além disto, a sensibilização periférica também ocorre após lesões nervosas na presença (neurite periférica) e ausência de inflamação tecidual e assim, pode contribuir para a hipersensibilidade da área de inervação do nervo afetado. A hiperalgesia secundária é caracterizada pela sensibilização da área adjacente à lesão, inervada pelo mesmo segmento da hiperalgesia primária. Isto ocorre devido a maior capacidade de resposta dos neurônios do corno dorsal que inervam o segmento da fonte primária da lesão (Latremoliere e Woolf, 2009).

A lesão do nervo periférico resulta em alterações orquestradas semelhantes à degeneração walleriana, levando a alterações estruturais e funcionais que afetam todo o SNP, incluindo terminações nervosas periféricas, fibras aferentes, gânglio da raiz dorsal (GDR) e terminais aferentes centrais na medula espinhal (Austin *et al.*, 2012; Nickel *et al.*, 2012). As alterações incluem edema do corpo celular, perda de corpúsculo de Nissl e deslocamento do núcleo do centro do neurônio para uma posição próxima à membrana celular. Após a lesão do nervo periférico, observa-se degeneração axonal, edema endoneurial e desmielinização maciça, associados à degeneração axonal e infiltração de células imunes em gânglio da raiz dorsal (GDR) e cornos dorsais de medula espinhal (Zochodne, 2012). Consequências da lesão nervosa incluem déficits funcionais e comportamentais que representam desafios para a identificação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de DN (Von Hehn *et al.*, 2012; Komirishetty *et al.*, 2016).

Outra consequência debilitante da lesão nervosa periférica é a dor espontânea, que ocorre na ausência de qualquer estímulo externo, podendo ser resultado da atividade espontânea gerada ao longo da via nociceptiva. Dor espontânea após lesões nervosas periféricas parece ser gerada pela hiperexcitabilidade no neurônio sensorial primário, levando a descarga de potenciais de ação ectópicos no local da lesão, mas também em locais axonais proximais, incluindo o soma

(Amir *et al.*, 2005; Amir *et al.*, 2015). Atividade ectópica é uma das principais sensações espontâneas que se manifestam após lesões nervosas, produzindo parestesia, disestesia e dor. DN pode ser episódica ou contínua, superficial ou profunda, muitas vezes apresenta-se como choque, em rajadas, fisgadas ou ardência. Enquanto muitas alterações ocorrem nos neurônios lesionados, fibras não lesionadas vizinhas passam a ser fonte de atividade ectópica neuropática, pois se comportam como uma entrada aferente produzindo sensações dolorosas (Wu *et al.*, 2002; Djouhri *et al.*, 2006). Alterações nestes neurônios podem induzir a liberação de mediadores pelos axônios lesados, células imunes e células de Schwann denervadas. A atividade espontânea é um componente importante no tratamento da DN por ter um papel fundamental nas alterações centrais nas vias nociceptivas, amplificando a sensibilização central e consequentemente, a dor (Von Hehn *et al.*, 2012).

### **2.3.2 Sensibilização Central**

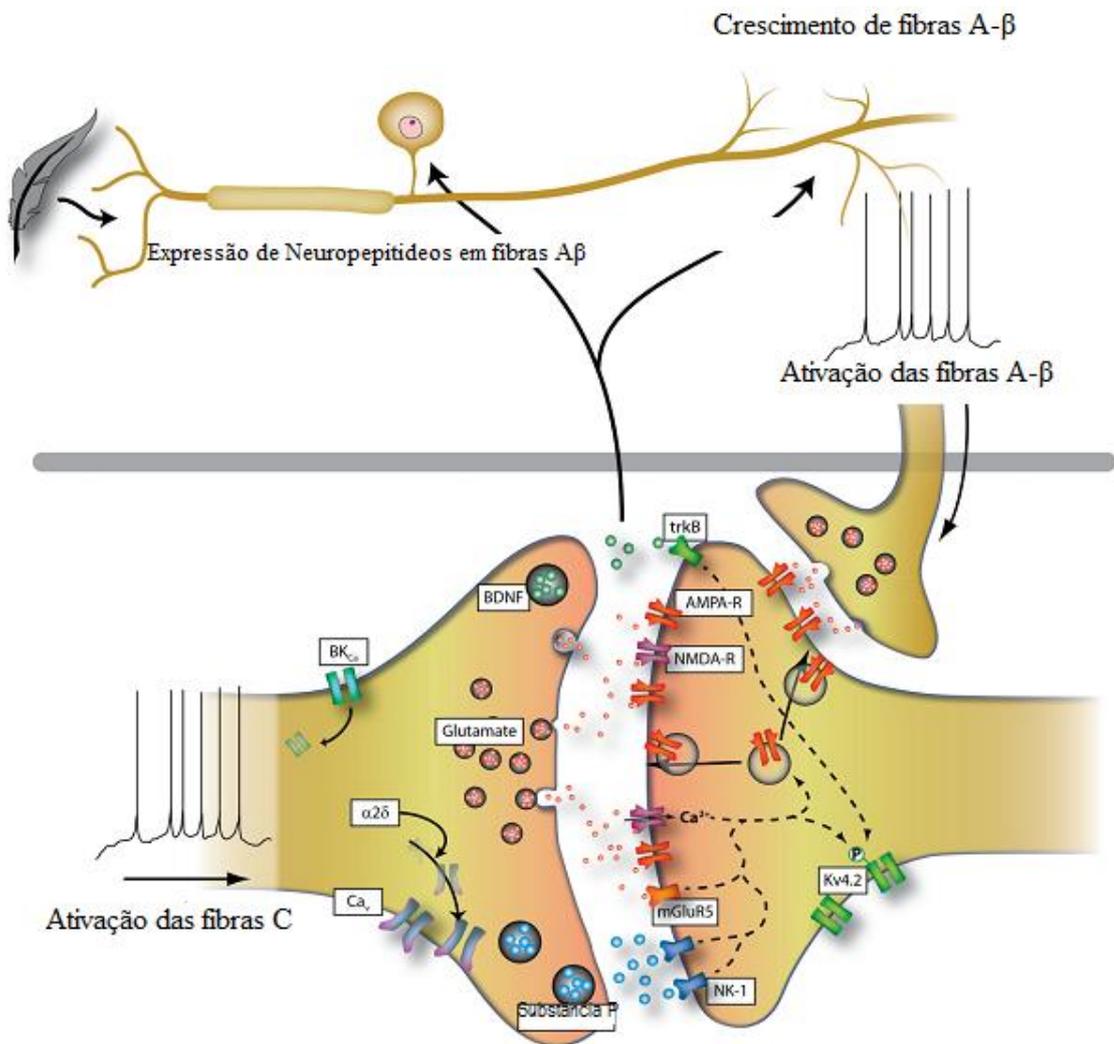
A Sensibilização Central (SC) é clinicamente caracterizada pela hiperalgesia, alodinia, dor irradiada ou dor persistente descrita como desagradável, latejante, em queimação ou dormência (Yunus, 2007). É definida como o aumento da capacidade de resposta de neurônios centrais à sinalização de nociceptores periféricos. Ocorre a partir de modificações em medula espinhal, entre o neurônio pré e pós sináptico, da via aferente nociceptiva no corno dorsal da medula. Estas alterações contribuem para redução do limiar de disparo dos nociceptores, aumento da eficácia sináptica e aumento do campo receptivo contribuindo para amplificação da dor. Estes fenômenos ocorrem em uma ordem temporal: alterações dos impulsos periféricos, aumento da excitabilidade de neurônios nociceptivos, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do corno dorsal. O processo de SC tem como consequência a alteração no processamento sensorial central, mau funcionamento do

mecanismo antinociceptivo descendente, aumento da atividade da rota facilitatória da dor e aumento do período da segunda dor (somação temporal) (Nijs *et al.*, 2010).

SC é considerada o principal mecanismo fisiopatológico em condições de DN. Primeiramente ocorre sensibilização sináptica causada por uma sequência de estímulos periféricos nociceptivos repetidos aumentando as respostas das fibras A $\delta$ , C e A $\beta$ . Este fenômeno ocorre como consequência da liberação de aminoácidos excitatórios (ex. glutamato e aspartato), de peptídeos (ex. SP e CGRP) e de neurotrofinas [ex. NGF e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF)] no corno dorsal da medula espinhal (Woolf e Salter, 2000). Após a liberação destas substâncias e sua interação com receptores específicos, tais como os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), neurocinina 1 (NK1) e Tirosina Quinase B (TrkB), há ativação de cascatas de segundos mensageiros, promovendo a abertura de canais de cálcio, produção de prostaglandinas e óxido nítrico. Em sequência, ocorre liberação de glutamato, aspartato, SP e CGRP, contribuindo para a ampliação do processo algico (Ji e Strichartz, 2004).

Outro mecanismo fundamental na manutenção da SC é fenômeno *wind up*, que é o resultado da somação de potenciais sinápticos lentos após estimulação aferente repetida por tempo prolongado. As fibras C, amielínicas e de condução lenta, enviam impulsos nociceptivos para os neurônios de ampla faixa dinâmica (*wide-dynamic range* [WDR]) no corno dorsal da medula. Com impulsos intensos, ambos os neurônios são ativados de modo que até estímulos não dolorosos, como o toque, sejam percebidos como dolorosos (Yunus, 2007), estimulando a liberação dos neurotransmissores excitatórios como glutamato e aspartato no corno dorsal da medula espinhal induzindo despolarização neuronal pelos receptores NMDA. Ocorre, a partir desses eventos, o aumento da condutividade ao cálcio, e conseqüentemente maior resposta à dor, a cada estímulo repetido e de mesma intensidade (Li *et al.*, 1999). Os mecanismos que contribuem para o aumento da eficácia da transmissão sináptica são decorrentes da fosforilação de receptores de membrana e de alterações do tempo de abertura de canais iônicos ou do

aumento da síntese e liberação de mediadores excitatórios. O processo de facilitação sináptica envolve a ativação de fatores de transcrição, tais como a expressão de genes de formação imediata, como *c-fos* e *c-jun*, e de genes de resposta lenta que codificam a pró dinorfina, o receptor NK1 e trkB no corno dorsal da medula espinhal. Assim, ocorre regulação das vias ascendentes para síntese de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Deste modo, há mudança fenotípica no GRD (Hunt *et al.*, 1987) (Fig. 3).



**Figura 3.** Sensibilização Central Adaptado de Von Hehn 2013.

Pode-se caracterizar a DN como uma combinação de sinais e sintomas que se manifestam com hiperalgesia e alodinia, intercalados ou em conjunto (Cruccu 2010; Baron 2012; Backonja 2013). Para avaliar perda (sinais sensoriais negativos) ou ganho (sinais sensoriais positivos) da função somatossensorial, as respostas são classificadas como normais, diminuídas ou aumentadas. O estímulo evocado positivo é classificado como hiperalgésico, (sensibilidade aumentada à um estímulo doloroso) ou alodínico (dor à um estímulo inócuo), e relacionado à dinâmica ou caráter estático do estímulo (Baron et al., 2017).

Atualmente existem muitos tratamentos farmacológicos para a DN, a maioria atua predominantemente na transdução de sinais neuronais incluindo bloqueadores de canais de cálcio e de sódio, antidepressivos e anticonvulsivantes. Contudo, como os demais tipos de dores crônicas, a DN não apresenta tratamentos farmacológicos satisfatórios. Os fármacos oferecem benefícios terapêuticos limitados e os pacientes podem apresentar muitos efeitos adversos (Finnerup *et al.*, 2010; Teasell *et al.*, 2010). Os opioides, considerados potentes agentes analgésicos, são menos eficazes para dores superficiais tipo pontada. Além de que os pacientes referem discreta redução na intensidade e melhora no desconforto gerado pela dor (Finnerup *et al.*, 2010; Teasell *et al.*, 2010). Sendo assim, a busca por terapias mais eficazes e com menos efeitos adversos se faz necessária.

Com objetivo de potencializar ou mesmo substituir terapias farmacológicas no tratamento de quadros dolorosos, técnicas alternativas como estimulação do SNC e SNP, utilizando diferentes abordagens, estão sendo estudadas (Spezia Adachi *et al.*, 2015; Liu, L. *et al.*, 2017). Em relação aos métodos de estimulação do SNP, considerados seguros e de fácil aplicação, a Acupuntura e a Eletroacupuntura são técnicas que apresentam potencial benefício no tratamento das dores crônicas (Zhao, 2008).

## **2.4 Acupuntura e Eletroacupuntura**

Acupuntura, do latim *acus* = agulha e *pungere* = puncionar, utilizando a aplicação de agulhas em determinados pontos do corpo, chamados de acupontos, tem como objetivo tratar e aliviar os sintomas de doenças (Schoen *et al.*, 1986; Jaggar, 1992). Os acupontos pertencem aos 12 canais de energia divididos pelo corpo. Este tratamento também é considerado uma terapia reflexa, já que o estímulo realizado em determinado ponto tem ação sobre outras áreas do corpo (Hayashi, 2007).

Os meridianos e seus acupontos foram determinados de forma empírica durante milhares de anos de prática da Medicina Tradicional Chinesa (Ristol, 1997). Sugere-se que o acuponto é uma região em que há grande concentração de terminações nervosas sensoriais, podendo estar próximo à nervos, vasos sanguíneos, tendões, periósteo e cápsulas articulares (Wu, 1990). As propriedades elétricas dos acupontos são: condutância elevada, menor resistência, padrões de campo organizados e diferenças de potencial elétrico; geralmente possuem um diâmetro de 0,1 a 5 cm (Altman, 1992). Quando um destes pontos é puncionado, ocorre sensação de parestesia elétrica, calor podendo ocorrer contração muscular (Taffarel 2009, Rosted 1998, Scognamillo-Szabó 2001).

Acupuntura tem sido amplamente utilizada na China e em outros países asiáticos desde sua antiguidade para prevenção e tratamento de uma série de doenças, como depressão, estresse crônico e dor aguda e crônica (Dong *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Liu, L. *et al.*, 2017). Atualmente também é considerada um método alternativo para o tratamento de inúmeras doenças em diversos países ocidentais (Wang *et al.*, 2016). Sabe-se que a EA apresenta bons resultados clínicos no tratamento de dores agudas ou dores crônicas inflamatórias (Ceccherelli *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2017), assim como no tratamento da DN, com efeito analgésico potente (Kim, H. K. *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2016).

As agulhas utilizadas para puncionar os acupontos podem ser estimuladas por rotação manual ou estimulação elétrica, técnica conhecida como EA. O efeito antinociceptivo da AC e da EA é desencadeado pela ativação de vias opioides e não-opioides. Além disso, ocorre hiperestimulação das terminações nervosas de fibras mielínicas A $\delta$  e consequente, ativação de vias modulatórias da dor. A modulação nociceptiva em estruturas do SNC, como no mesencéfalo ocorre por meio da liberação de serotonina e norepinefrina nos sistemas descendentes. Concomitante a isso, em medula espinhal, a modulação ocorre por inibição pré-sináptica, devido à ação de encefalinas e dinorfinas (Taffarel, 2009). AC ativa o eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal (HHA) liberando hormônio liberador de corticotrofina (CRH) hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), glicocorticoides (cortisol) e  $\beta$ -endorfinas. Entretanto, existem opiniões controversas acerca da participação de hormônios glicocorticoides no efeito anti-inflamatório da AC (Alvarenga *et al.* 2014).

Prévios estudos demonstram alterações na ressonância magnética funcional (RMIf) de diversas áreas cerebrais após tratamento com AC sugerindo efeitos hipocampais da acupuntura. A manipulação de agulhas em ambas as mãos produziu diminuições proeminentes de sinais na RMIf no núcleo accumbens, amígdala, hipocampo, parahipocampo, hipotálamo, área tegmental ventral, giro cingulado anterior, caudado, putamen, pólo temporal e insula. Em contraste, os aumentos de sinal foram observados principalmente no córtex somatossensorial (Hui *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2012). Da mesma forma, EA parece modular a função de interneurônios no hipocampo, aumentando a LTP hipocampal em longo prazo no giro denteado em experimento relacionado à memória (He *et al.*, 2012).

Os efeitos da AC parecem estar relacionados, além da ativação de fibras do tipo A $\delta$  e C (Zhao, 2008), também à ativação de receptores polimodais (PMRs) (Kawakita e Funakoshi, 1981; Kawakita e Gotoh, 1996; Kawakita *et al.*, 2006). PMRs são terminações nervosas livres capazes de responder a estímulos mecânicos e térmicos (não necessariamente nocivo), o que

pode explicar a sobreposição de efeitos de técnicas baseadas em estímulo mecânico (acupuntura) ou térmico (moxabustão) (Kawakita e Gotoh, 1996; Kawakita *et al.*, 2006).

Também é conhecido o envolvimento de opioides endógenos e de serotonina (5-HT) nos efeitos antinociceptivos da AC. A analgesia induzida por EA pode ser bloqueada pela naloxona, um antagonista competitivo opioide, tanto em humanos como em ratos, sugerindo a participação de opioides endógenos neste efeito (Pomeranz e Chiu, 1976; Mayer *et al.*, 1977). Adicionalmente, um estudo de Han (2004) demonstrou que naloxona bloqueia analgesia induzida por EA de baixa frequência (4 Hz), mas não de alta frequência (200 Hz) (Han, 2004). Isto pode ser devido à baixa frequência provocar liberação de opioides e a alta frequência atuar também em outros sistemas de neurotransmissão. Por outro lado, Hökfelt demonstrou que os neuropeptídeos só podem ser liberados por alta frequência de estimulação e não por baixa (Hökfelt, 1991).

Adicionalmente foi demonstrado o efeito neuroprotetor da EA por meio da ação de neurotrofinas (NRs) utilizando um modelo animal de lesão parcial de medula espinhal. Maiores níveis de NGF, BDNF e NT-3 foram observados após lesão parcial de medula espinhal e aplicação da EA de alta frequência indicando plasticidade espinhal induzida pelo aumento dos níveis de NTs promovida pela EA (Wang *et al.*, 2007). Usando o mesmo modelo experimental, também foi demonstrado que a EA de alta frequência aumenta os níveis de mRNA e NGF, BDNF, NT-3 em neurônios do GRD. Desta forma, estende-se aos neurônios sensoriais primários a hipótese de NTs mediar o efeito da EA na plasticidade em neurônios com lesão (Chen *et al.*, 2007). As mesmas observações foram estendidas para NT-4, sugerindo um envolvimento da família NT inteira no efeito da EA induzindo o processo de neuroplasticidade em medula espinhal após lesão do nervo periférico (Liu *et al.*, 2009). Estudo recente sugere que a analgesia promovida pelo tratamento com EA é relacionada a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  RNAm e BDNF, NGF, e NT3 / 4, mas não a IL-6. EA utilizada em ratos com dor crônica inibiu a expressão de citocinas e

a liberação de fatores neurotróficos por astrócitos podendo este ser um dos mecanismos da analgesia induzida por EA repetida (Wang *et al.*, 2016).

AC e EA demonstram bons resultados quando utilizados para aliviar a dor em humanos e em modelos animais de DN (Wang *et al.*, 2008; Norrbrink e Lundeberg, 2011). Porém, devido à dificuldade da aplicação desses tratamentos em animais acordados e em movimento, a maioria dos estudos utiliza alguma forma de imobilização (Tu *et al.*, 2012) ou anestesia (Cha *et al.*, 2012). No entanto, a administração de anestésicos e a imobilização dos animais durante a AC e EA pode ser uma fonte de viés na pesquisa pré-clínica, causando alterações fisiológicas que podem prejudicar a eficácia das técnicas. O efeito da AC e da EA pode ser influenciado pelo estresse e habituação de animais conscientes (Park *et al.*, 2010) ou pelos anestésicos utilizados para sedação destes animais. A aplicação destes tratamentos em animais acordados atua como potencial estressor, já que a simples inserção da agulha e a estimulação manual ou elétrica podem favorecer o mecanismo de estresse. Sabe-se que imobilização, choque e até mesmo medo podem desencadear a analgesia induzida pelo estresse agudo interferindo desta forma nos resultados obtidos a partir de modelos animais de AC e EA (De Medeiros *et al.*, 2003). Desta forma, a analgesia por AC e EA pode ser severamente reduzida quando os estressores concomitantes não são adequadamente controlados.

Na maioria dos estudos em animais que utilizam AC ou EA, o anestésico utilizado é o isoflurano, que é de fácil administração e mantém as características comportamentais e fisiológicas da anestesia geral sem adjuvante (Purdon *et al.*, 2015). No entanto, não há estudos que comprovem que a utilização deste anestésico não altera a resposta analgésica da AC ou EA e/ou os níveis de alguns biomarcadores, como o NGF.

## **2.7 Biomarcadores**

Biomarcadores são utilizados como parâmetros de avaliação de diagnóstico, relação causa-efeito e efetividade de tratamento. Biomarcadores podem ser encontrados periférica ou centralmente, sendo de fácil mensuração no caso de marcadores sanguíneos. Considerando que processo nociceptivo ativa diversos sistemas como endócrino, autonômico e imune, estudos recentes tem buscado determinar marcadores que possam estar relacionados com processos de dor crônica (Nwagwu *et al.*, 2016).

O fator de crescimento neuronal (NGF) é uma neurotrofina essencial, amplamente expressa no SNC e SNP em desenvolvimento, envolvida na sobrevivência neuronal, no crescimento axonal e na diferenciação neural (Huang e Reichardt, 2001). Tem sido demonstrado que o NGF também atua no processo nociceptivo, tanto em nível central quanto periférico (Bannwarth e Kostine, 2014). NGF apresenta-se diminuído em neurônios sensoriais do GRD e do corno dorsal da medula espinhal em um modelo de neuropatia periférica (Aloe e Mani, 2009). Em contraste, Watson e colaboradores (2008), encontraram aumento nos níveis de NGF em um modelo de dor neuropática (Watson *et al.*, 2008). Sabe-se que após a lesão do nervo, muitas substâncias, incluindo o NGF, são liberadas principalmente pelos astrócitos do SNC. No corno dorsal da medula espinhal, um aumento do NGF está relacionado à sensibilização central provocando sintomas clínicos relacionados à DN (Campbell *et al.*, 1988). De forma semelhante, estudo prévio associa o aumento dos níveis de NGF no SNC ao aumento da dor (Chiang *et al.*, 2014). No entanto, quando se trata do SNP, há divergências em relação ao NGF e as condições dolorosas. Tem sido sugerido que o aumento dos níveis periféricos de NGF está relacionado à DN (Zhao *et al.*, 2016), no entanto, um estudo utilizando mobilização neural mostrou aumento de 52% nos níveis de NGF no nervo afetado comparado ao grupo submetido ao modelo de constrição do nervo ciático para indução da DN, indicando que o NGF contribui para a

regeneração neural do nervo afetado (Da Silva *et al.*, 2015). Em nível central o tratamento por AC ou EA diminui os níveis de NGF aumentados pela DN em ratos submetidos á lesão medular (Hains *et al.*, 2005).

A proteína S100 $\beta$  está relacionada ao processo de dor crônica, sendo altamente específica para SNC, encontrada em células gliais, astrócito, células de Schwann e algumas populações de neurônios (Portela *et al.*, 2002). Embora o papel fisiológico da proteína S100 $\beta$  ainda não seja totalmente conhecido, tem sido observado níveis aumentados no sangue e no líquido céfalo raquidiano (LCR) em lesões agudas e crônicas, e esta diretamente relacionado a intensidade e a extensão das lesões no SNC (Martins *et al.*, 2006), sugerindo um papel como biomarcador de transtorno ou dano encefálico. O aumento nos níveis centrais e em soro da S100 $\beta$  está relacionado à diminuição do limiar nociceptivo, induzido por modelos de dor inflamatória e neuropática (Tanga *et al.*, 2006; Zanette *et al.*, 2014). Estudo prévio demonstrou que o tratamento com AC e EA diminui os níveis periféricos de S100 $\beta$  após lesões cerebrais em humanos (Lu *et al.*, 2010), porém não foram encontrados estudos relacionados ao efeito analgésico de AC ou EA e níveis desta proteína.

As citocinas e outros mediadores inflamatórios são capazes de alterar correntes iônicas em nociceptores alterando o limiar nociceptivo (Binshtok *et al.*, 2008) na presença de sensibilização periférica. O sistema imune, quando ativado, promove a liberação de mediadores como óxido nítrico, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e NGF (Sommer e Kress, 2004; Coutaux *et al.*, 2005), contribuindo tanto para a sensibilização periférica como para a central (Julius e Basbaum, 2001; Coutaux *et al.*, 2005; Planells-Cases *et al.*, 2005). Células gliais medulares, como microglia e astrócitos, têm um papel importante na indução e manutenção da DN. A microglia aumenta a liberação de fatores neurotróficos, e os astrócitos liberam citocinas, incluindo TNF- $\alpha$ , interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e IL-6, mediadores essenciais para indução da DN (Guo *et al.*, 2007; Gao e Ji, 2010). Assim, está bem descrito que estas citocinas, principalmente TNF- $\alpha$ , estão

aumentadas tanto em SNC como em SNP (Wang *et al.*, 2016). Porém pouco é conhecido dos efeitos que da DN em estruturas musculares afetadas pela constrição neural e nos níveis de TNF- $\alpha$ . Por outro lado, está bem estabelecido que os tratamentos com AC ou EA diminuem os níveis de citocinas inflamatórias, principalmente o TNF- $\alpha$ , tanto em estruturas centrais quanto periféricamente (Wang *et al.*, 2016; Geis *et al.*, 2017). No entanto, não são conhecidos os efeitos da AC e EA em estruturas musculares.

Após o mecanismo de lesão, há a liberação de aminoácidos excitatórios, estes interagem com receptores específicos, como receptores N-metil D-aspartato (NMDAR), que estão diretamente relacionados ao processo de sensibilização central, NK1 e trkB, que ativam uma cascata de segundos mensageiros, promovendo abertura de canais de cálcio, contribuindo para a ampliação do processo algico (Ji e Strichartz, 2004). Além do aumento da excitabilidade sináptica, a atividade aumentada do NMDA no corno dorsal espinhal desempenha um papel chave no desenvolvimento de dor neuropática (Chaplan *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2014). Muitos estudos demonstraram que o efeito antinociceptivo da AC pode estar relacionado à alteração na expressão de receptores ionotrópicos, incluindo NMDARs, canal iônico ácido sensível (ASIC) - 3, receptor de potencial transiente vaniloide (TRPV) -1, TRPV4 e canais de sódio voltagem-dependentes (Lin *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2016).

Outro mecanismo envolvido na indução e manutenção da condição de DN é a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Geis *et al.*, 2017). Sabe-se que ROS atuam na fisiopatologia da DN (Kim, J. H. *et al.*, 2004; Yowtak *et al.*, 2011). Um modelo animal de lesão do nervo, a ligadura do nervo espinhal (SNL), causou aumento de estresse oxidativo evidenciado por alterações na peroxidação lipídica e na concentração de nitrito, GSH, SOD e catalase (Pottabathini *et al.*, 2015). O diacetato de diclorofluoresceína (DCFH) é um marcador direto de ROS e seu aumento é observado em condições de atrofia muscular (Powers *et al.*, 2007). Um dos possíveis mecanismos de ação da AC e EA está relacionado à diminuição de marcadores de ROS

em SNC e SNP. Choi e colaboradores sugerem que o tratamento com acupuntura diminuiu os níveis elevados de ROS em um modelo animal de DN (Choi *et al.*, 2012).

---

### **III. JUSTIFICATIVA**

### **3. JUSTIFICATIVA**

Dor neuropática é um quadro de dor crônica, altamente prevalente, debilitante, que afeta diretamente a qualidade de vida dos pacientes. Apesar de existirem diversos fármacos para seu tratamento, estes apresentam falta de eficácia e muitos efeitos adversos dificultando a adesão ao tratamento. Desta forma, a busca por alternativas terapêuticas de tratamento é de extrema importância. Dentre elas, a AC e EA apresentam-se como técnicas promissoras que tem demonstrado bons resultados no tratamento da dor neuropática. Apesar destas técnicas serem bastante utilizadas, permanecem dúvidas sobre seus mecanismos de ação, aumentando a necessidade de estudos em modelos animais que possam melhor elucidar estes mecanismos. As técnicas de AC e EA são de difícil aplicação em animais; a maioria dos estudos utiliza anestésicos que podem influenciar o efeito do tratamento. Considerando a importância do entendimento dos mecanismos envolvidos na dor neuropática e no seu tratamento com AC e EA, e acreditando-se que estes tratamentos podem reverter quadros de hiperalgesia e alodinia, a utilização de modelos animais para indução de dor neuropática podem elucidar possíveis alterações neuroquímicas e comportamentais provocadas pelo quadro de dor neuropática e o efeito dos tratamentos de AC e EA nestes parâmetros, permitirá melhor compreender estes parâmetros. Desta forma, espera-se que a melhor compreensão destas terapêuticas e dos mecanismos neuroquímicos envolvidos na DN, auxilie o tratamento de pacientes com quadros de dor, aumentando o espectro clínico por meio de abordagens translacionais. Resumidamente, a realização desta pesquisa contribuiu para um melhor entendimento dos mecanismos de ação da AC e EA na reversão da DN, aumentando seu entendimento e utilização para casos específicos de dores crônicas.

---

## **IV. OBJETIVOS**

## **4.1 Objetivo Geral**

Investigar o efeito do isoflurano na aplicação repetida de AC e EA, em parâmetros comportamentais e neuroquímicos de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática; e comparar os efeitos da AC e EA em modelo animal de dor neuropática nas respostas comportamentais, bioquímicas e histológicas.

## **4.2 Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito de 8 sessões diárias de 20 minutos de AC ou EA em modelo animal de dor neuropática.

### *Artigo I*

- ✓ Avaliar a resposta nociceptiva de alodinia mecânica;
- ✓ Avaliar dano neuronal periférico e central (NGF e S100 $\beta$ );
- ✓ Comparar a utilização ou não do anestésico durante o tratamento;

### *Artigo II*

- ✓ Avaliar a resposta comportamental exploratória e exploratória;
- ✓ Avaliar NMDA em tronco encefálico e medula espinhal;
- ✓ Comparar a utilização ou não do anestésico durante o tratamento;

### *Artigo III*

- ✓ Avaliar a resposta hiperalgésica térmica;
- ✓ Avaliar a resposta nociceptiva a estímulo mecânico;
- ✓ Avaliar histologia e imunohistoquímica de citocina inflamatória;
- ✓ Avaliar marcador de estresse oxidativo em tecido muscular;

---

## **V. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA**

## REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

AIDA, S. et al. The effectiveness of preemptive analgesia varies according to the type of surgery: a randomized, double-blind study. **Anesth Analg**, v. 89, n. 3, p. 711-6, Sep 1999. ISSN 0003-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10475311> >.

ALOE, L.; MANNI, L. Low-frequency electro-acupuncture reduces the nociceptive response and the pain mediator enhancement induced by nerve growth factor. **Neurosci Lett**, v. 449, n. 3, p. 173-7, Jan 2009. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013501> >.

AMIR, L. H.; JONES, L. E.; BUCK, M. L. Nipple pain associated with breastfeeding: incorporating current neurophysiology into clinical reasoning. **Aust Fam Physician**, v. 44, n. 3, p. 127-32, Mar 2015. ISSN 0300-8495. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25770578> >.

AMIR, R.; KOCSIS, J. D.; DEVOR, M. Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. **J Neurosci**, v. 25, n. 10, p. 2576-85, Mar 2005. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758167> >.

AUSTIN, P. J.; WU, A.; MOALEM-TAYLOR, G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. **J Vis Exp**, n. 61, Mar 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22433911> >.

BANNWARTH, B.; KOSTINE, M. Targeting nerve growth factor (NGF) for pain management: what does the future hold for NGF antagonists? **Drugs**, v. 74, n. 6, p. 619-26, Apr 2014. ISSN 1179-1950. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24691709> >.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **Lancet Neurol**, v. 9, n. 8, p. 807-19, Aug 2010. ISSN 1474-4465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20650402> >.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, Apr 1988. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2837713> >.

BERRYMAN, C. et al. Evidence for working memory deficits in chronic pain: a systematic review and meta-analysis. **Pain**, v. 154, n. 8, p. 1181-96, Aug 2013. ISSN 1872-6623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707355> >.

BINSHTOK, A. M. et al. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. **J Neurosci**, v. 28, n. 52, p. 14062-73, Dec 2008. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109489> >.

BORSOOK, D. Neurological diseases and pain. **Brain**, v. 135, n. Pt 2, p. 320-44, Feb 2012. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22067541> >.

BOUHASSIRA, D. [Definition and classification of neuropathic pain]. **Presse Med**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 311-4, Feb 2008. ISSN 2213-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191365> >.

CAMPBELL, J. N. et al. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 89-94, Jan 1988. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3340426> >.

CAMPBELL, S. M. Regional myofascial pain syndromes. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 15, n. 1, p. 31-44, Feb 1989. ISSN 0889-857X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2644677> >.

CECCHERELLI, F. et al. Different analgesic effects of manual and electrical acupuncture stimulation of real and sham auricular points: a blind controlled study with rats. **Acupunct Electrother Res**, v. 24, n. 3-4, p. 169-79, 1999. ISSN 0360-1293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768414> >.

CHA, M. H. et al. Changes in cytokine expression after electroacupuncture in neuropathic rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 792765, 2012. ISSN 1741-4288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454684> >.

CHAPLAN, S. R.; MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 280, n. 2, p. 829-38, Feb 1997. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023297> >.

CHEN, J. et al. Electro-acupuncture induced NGF, BDNF and NT-3 expression in spared L6 dorsal root ganglion in cats subjected to removal of adjacent ganglia. **Neurosci Res**, v. 59, n. 4, p. 399-405, Dec 2007. ISSN 0168-0102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875332> >.

CHEN, S. R. et al. Increased spinal cord Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter-1 (NKCC1) activity contributes to impairment of synaptic inhibition in paclitaxel-induced neuropathic pain. **J Biol Chem**, v. 289, n. 45, p. 31111-20, Nov 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253692> >.

CHIANG, C. Y. et al. Comprehensive analysis of neurobehavior associated with histomorphological alterations in a chronic constrictive nerve injury model through use of the CatWalk XT system. **J Neurosurg**, v. 120, n. 1, p. 250-62, Jan 2014. ISSN 1933-0693. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24180567> >.

CHOI, D. C. et al. Inhibition of ROS-induced p38MAPK and ERK activation in microglia by acupuncture relieves neuropathic pain after spinal cord injury in rats. **Exp Neurol**, v. 236, n. 2, p. 268-82, Aug 2012. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634758> >.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17002, Feb 2017. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28205574> >.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 1-32, 2009. ISSN 1545-4126. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400724> >.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-71, Oct 2005. ISSN 1297-319X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214069> >.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth**, v. 101, n. 1, p. 8-16, Jul 2008. ISSN 1471-6771. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417503> >.

DA SILVA, J. T. et al. Neural mobilization promotes nerve regeneration by nerve growth factor and myelin protein zero increased after sciatic nerve injury. **Growth Factors**, v. 33, n. 1, p. 8-13, Feb 2015. ISSN 1029-2292. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25489629> >.

DE MEDEIROS, M. A. et al. Analgesia and c-Fos expression in the periaqueductal gray induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats. **Brain Res**, v. 973, n. 2, p. 196-204, May 2003. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738063> >.

DJOUHRI, L. et al. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. **J Neurosci**, v. 26, n. 4, p. 1281-92, Jan 2006. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436616> >.

DONG, B. et al. The Efficacy of Acupuncture for Treating Depression-Related Insomnia Compared with a Control Group: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 9614810, 2017. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28286776> >.

FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. **Pain**, v. 150, n. 3, p. 573-81, Sep 2010. ISSN 1872-6623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705215> >.

FLETCHER, D.; KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Influence of timing of administration on the analgesic effect of bupivacaine infiltration in carrageenin-injected rats. **Anesthesiology**, v. 84, n. 5, p. 1129-37, May 1996. ISSN 0003-3022. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624007> >.

GAO, Y. J.; JI, R. R. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. **Pharmacol Ther**, v. 126, n. 1, p. 56-68, Apr 2010. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20117131> >.

GEIS, C. et al. NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. **Exp Neurol**, v. 288, p. 94-103, Feb 2017. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27856286> >.

GUO, W. et al. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. **J Neurosci**, v. 27, n. 22, p. 6006-18, May 2007. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537972> >.

HAINS, B. C.; SAAB, C. Y.; WAXMAN, S. G. Changes in electrophysiological properties and sodium channel Nav1.3 expression in thalamic neurons after spinal cord injury. **Brain**, v. 128, n. Pt 10, p. 2359-71, Oct 2005. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16109750> >.

HAN, J. **Mechanisms of acupuncture analgesia**. Shanghai: Shanghai Science, Technology and Education Publishing House. Shangai 1999.

HAN, J. S. Acupuncture and endorphins. **Neurosci Lett**, v. 361, n. 1-3, p. 258-61, May 2004. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15135942> >.

HE, X. et al. Acute effects of electro-acupuncture (EA) on hippocampal long term potentiation (LTP) of perforant path-dentate gyrus granule cells synapse related to memory. **Acupunct Electrother Res**, v. 37, n. 2-3, p. 89-101, 2012. ISSN 0360-1293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23156202> >.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 677-736, 2001. ISSN 0147-006X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520916> >.

HUI, K. K. et al. Acupuncture modulates the limbic system and subcortical gray structures of the human brain: evidence from fMRI studies in normal subjects. **Hum Brain Mapp**, v. 9, n. 1, p. 13-25, 2000. ISSN 1065-9471. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643726> >.

HUNT, S. P.; PINI, A.; EVAN, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**, v. 328, n. 6131, p. 632-4, 1987 Aug 13-19 1987. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3112583> >.

HÖKFELT, T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. **Neuron**, v. 7, n. 6, p. 867-79, Dec 1991. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1684901> >.

JAGGAR, D. History and basic introduction to veterinary acupuncture. **Probl Vet Med**, v. 4, n. 1, p. 1-11, Mar 1992. ISSN 1041-0228. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1581644> >.

JENSEN, T. S. et al. A new definition of neuropathic pain. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2204-5, Oct 2011. ISSN 1872-6623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764514> >.

JL, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Sci STKE**, v. 2004, n. 252, p. reE14, Sep 2004. ISSN 1525-8882. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454629> >.

JOHANNES, C. B. et al. The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey. **J Pain**, v. 11, n. 11, p. 1230-9, Nov 2010. ISSN 1528-8447. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20797916> >.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557989> >.

KAWAKITA, K.; FUNAKOSHI, M. Role of the subsequently activated receptors in electroacupuncture of the rat. **Am J Chin Med**, v. 9, n. 2, p. 164-70, 1981. ISSN 0192-415X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7345921> >.

KAWAKITA, K.; GOTOH, K. Role of polymodal receptors in the acupuncture-mediated endogenous pain inhibitory systems. **Prog Brain Res**, v. 113, p. 507-23, 1996. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9009752> >.

KAWAKITA, K. et al. How do acupuncture and moxibustion act? - Focusing on the progress in Japanese acupuncture research -. **J Pharmacol Sci**, v. 100, n. 5, p. 443-59, 2006. ISSN 1347-8613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799260> >.

KIM, H. K. et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, n. 1-2, p. 116-24, Sep 2004. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15327815> >.

KIM, J. H. et al. Relieving effects of electroacupuncture on mechanical allodynia in neuropathic pain model of inferior caudal trunk injury in rat: mediation by spinal opioid receptors. **Brain Res**, v. 998, n. 2, p. 230-6, Feb 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751594> >.

KOMIRISHETTY, P. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reveals a potential mechanism to promote neuroprotection and treat neuropathic pain. **Neural Regen Res**, v. 11, n. 10, p. 1545-1548, Oct 2016. ISSN 1673-5374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27904474> >.

LANGEVIN, H. M. et al. Manual and electrical needle stimulation in acupuncture research: pitfalls and challenges of heterogeneity. **J Altern Complement Med**, v. 21, n. 3, p. 113-28, Mar 2015. ISSN 1557-7708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25710206> >.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, Sep 2009. ISSN 1528-8447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712899> >.

LEVINE, J. D.; TAIWO, Y. O. Hyperalgesic pain: a review. **Anesth Prog**, v. 37, n. 2-3, p. 133-5, 1990 Mar-Jun 1990. ISSN 0003-3006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1964769> >.

LI, S.; DAVIS, M.; FRONTERA, J. E. A novel nonpharmacological intervention - breathing-controlled electrical stimulation for neuropathic pain management after spinal cord injury - a

preliminary study. **J Pain Res**, v. 9, p. 933-940, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27843337> >.

LI, W. et al. Electroacupuncture relieves depression-like symptoms in rats exposed to chronic unpredictable mild stress by activating ERK signaling pathway. **Neurosci Lett**, v. 642, p. 43-50, Mar 2017. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28147225> >.

LI, W. P. et al. Upregulation of brain-derived neurotrophic factor and neuropeptide Y in the dorsal ascending sensory pathway following sciatic nerve injury in rat. **Neurosci Lett**, v. 260, n. 1, p. 49-52, Jan 1999. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027697> >.

LIAO, H. Y. et al. Electroacupuncture Attenuates CFA-induced Inflammatory Pain by suppressing Nav1.8 through S100B, TRPV1, Opioid, and Adenosine Pathways in Mice. **Sci Rep**, v. 7, p. 42531, Feb 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28211895> >.

LIN, J. G.; HSIEH, C. L.; LIN, Y. W. Analgesic Effect of Electroacupuncture in a Mouse Fibromyalgia Model: Roles of TRPV1, TRPV4, and pERK. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128037, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26043006> >.

LIU, L. et al. Acupuncture for chronic low back pain: a randomized controlled feasibility trial comparing treatment session numbers. **Clin Rehabil**, p. 269215517705690, Apr 2017. ISSN 1477-0873. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28459161> >.

LIU, Y.; YU, S. Acupuncture may be considered to be an effective tool for patients with frequent episodic or chronic tension-type headache. **Evid Based Med**, v. 21, n. 5, p. 183, 10 2016. ISSN 1473-6810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27565945> >.

LIU, Y. H. et al. Immediate Effects of Acupuncture Treatment on Intra- and Inter-Limb Contributions to Body Support During Gait in Patients with Bilateral Medial Knee Osteoarthritis. **Am J Chin Med**, v. 45, n. 1, p. 23-35, 2017. ISSN 0192-415X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28068837> >.

LOESER, J. D. The future. Will pain be abolished or just pain specialists? **Minn Med**, v. 84, n. 7, p. 20-1, Jul 2001. ISSN 0026-556X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481947> >.

LU, K. W. et al. Probing the Effects and Mechanisms of Electroacupuncture at Ipsilateral or Contralateral ST36-ST37 Acupoints on CFA-induced Inflammatory Pain. **Sci Rep**, v. 6, p. 22123, Feb 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26906464> >.

LU, Z. H. et al. Effect of electroacupuncture preconditioning on serum S100beta and NSE in patients undergoing craniocerebral tumor resection. **Chin J Integr Med**, v. 16, n. 3, p. 229-33, Jun 2010. ISSN 1672-0415. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694777> >.

MARTINS, R. O. et al. S100B protein related neonatal hypoxia. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 64, n. 1, p. 24-9, Mar 2006. ISSN 0004-282X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622548> >.

MAYER, D. J.; PRICE, D. D.; RAFIL, A. Antagonism of acupuncture analgesia in man by the narcotic antagonist naloxone. **Brain Res**, v. 121, n. 2, p. 368-72, Feb 1977. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/832169> >.

MCWILLIAMS, L. A.; GOODWIN, R. D.; COX, B. J. Depression and anxiety associated with three pain conditions: results from a nationally representative sample. **Pain**, v. 111, n. 1-2, p. 77-83, Sep 2004. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15327811> >.

MERSKEY, H. Logic, truth and language in concepts of pain. **Qual Life Res**, v. 3 Suppl 1, p. S69-76, Dec 1994. ISSN 0962-9343. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7866375> >.

MORGAN, M. M.; WHITNEY, P. K. Behavioral analysis of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC): antinociception and escape reactions. **Pain**, v. 66, n. 2-3, p. 307-12, Aug 1996. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8880854> >.

NARO, A. et al. Non-invasive Brain Stimulation, a Tool to Revert Maladaptive Plasticity in Neuropathic Pain. **Front Hum Neurosci**, v. 10, p. 376, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27512368> >.

NICKEL, F. T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 81-91, Feb 2012. ISSN 1873-7862. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672666> >.

NIJS, J.; VAN HOUDENHOVE, B.; OOSTENDORP, R. A. Recognition of central sensitization in patients with musculoskeletal pain: Application of pain neurophysiology in manual therapy practice. **Man Ther**, v. 15, n. 2, p. 135-41, Apr 2010. ISSN 1532-2769. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036180> >.

NORRBRINK, C.; LUNDEBERG, T. Acupuncture and massage therapy for neuropathic pain following spinal cord injury: an exploratory study. **Acupunct Med**, v. 29, n. 2, p. 108-15, Jun 2011. ISSN 1759-9873. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474490> >.

NWAGWU, C. D. et al. Biomarkers for Chronic Neuropathic Pain and their Potential Application in Spinal Cord Stimulation: A Review. **Transl Perioper Pain Med**, v. 1, n. 3, p. 33-38, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28480314> >.

PARK, H. J. et al. Electroacupuncture to ST36 ameliorates behavioral and biochemical responses to restraint stress in rats. **Neurol Res**, v. 32 Suppl 1, p. 111-5, Feb 2010. ISSN 1743-1328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034458> >.

PERL, E. R. et al. Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers. **Prog Brain Res**, v. 43, p. 263-77, 1976. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/815956> >.

PIOTROWSKI, W.; FOREMAN, J. C. Some effects of calcitonin gene-related peptide in human skin and on histamine release. **Br J Dermatol**, v. 114, n. 1, p. 37-46, Jan 1986. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2417614> >.

PLANELLS-CASES, R. et al. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. **Pflugers Arch**, v. 451, n. 1, p. 151-9, Oct 2005. ISSN 0031-6768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15909179> >.

POMERANZ, B.; CHIU, D. Naloxone blockade of acupuncture analgesia: endorphin implicated. **Life Sci**, v. 19, n. 11, p. 1757-62, Dec 1976. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/187888> >.

PORTELA, L. V. et al. The serum S100B concentration is age dependent. **Clin Chem**, v. 48, n. 6 Pt 1, p. 950-2, Jun 2002. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12029017> >.

POTTABATHINI, R. et al. Possible involvement of nitric oxide modulatory mechanism in the protective effect of retigabine against spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. **Cell Mol Neurobiol**, v. 35, n. 1, p. 137-46, Jan 2015. ISSN 1573-6830. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182225> >.

POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; MCCLUNG, J. M. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. **J Appl Physiol (1985)**, v. 102, n. 6, p. 2389-97, Jun 2007. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289908> >.

PURDON, P. L. et al. Clinical Electroencephalography for Anesthesiologists: Part I: Background and Basic Signatures. **Anesthesiology**, v. 123, n. 4, p. 937-60, Oct 2015. ISSN 1528-1175. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26275092> >.

SCHOEN, A. M.; JANSSENS, L.; ROGERS, P. A. Veterinary acupuncture. **Semin Vet Med Surg (Small Anim)**, v. 1, n. 3, p. 224-9, Aug 1986. ISSN 0882-0511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3317622> >.

SMITH, B. H.; TORRANCE, N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. **Curr Pain Headache Rep**, v. 16, n. 3, p. 191-8, Jun 2012. ISSN 1534-3081. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22395856> >.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett**, v. 361, n. 1-3, p. 184-7, May 2004. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15135924> >.

TAJERIAN, M.; CLARK, J. D. Nonpharmacological Interventions in Targeting Pain-Related Brain Plasticity. **Neural Plast**, v. 2017, p. 2038573, 2017. ISSN 1687-5443. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28299206> >.

TANGA, F. Y. et al. Role of astrocytic S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 140, n. 3, p. 1003-10, Jul 2006. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600520> >.

TEASELL, R. W. et al. A systematic review of pharmacologic treatments of pain after spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 91, n. 5, p. 816-31, May 2010. ISSN 1532-821X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20434623> >.

TU, W. Z. et al. Analgesic effect of electroacupuncture on chronic neuropathic pain mediated by P2X3 receptors in rat dorsal root ganglion neurons. **Neurochem Int**, v. 60, n. 4, p. 379-86, Mar 2012. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22269805> >.

VERHAAK, P. F. et al. Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature. **Pain**, v. 77, n. 3, p. 231-9, Sep 1998. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808348> >.

VON HEHN, C. A.; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 638-52, Feb 2012. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365541> >.

WANG, J. et al. The Effect of Repeated Electroacupuncture Analgesia on Neurotrophic and Cytokine Factors in Neuropathic Pain Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2016, p. 8403064, 2016. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27800006> >.

WANG, S. M.; KAIN, Z. N.; WHITE, P. F. Acupuncture analgesia: II. Clinical considerations. **Anesth Analg**, v. 106, n. 2, p. 611-21, table of contents, Feb 2008. ISSN 1526-7598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227323> >.

WANG, T. H. et al. Effect of electroacupuncture on neurotrophin expression in cat spinal cord after partial dorsal rhizotomy. **Neurochem Res**, v. 32, n. 8, p. 1415-22, Aug 2007. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406982> >.

WATSON, J. J.; ALLEN, S. J.; DAWBARN, D. Targeting nerve growth factor in pain: what is the therapeutic potential? **BioDrugs**, v. 22, n. 6, p. 349-59, 2008. ISSN 1173-8804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18998753> >.

WILLIAMS, A. C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2420-2423, Nov 2016. ISSN 1872-6623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200490> >.

WOLFE, F. et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. **Arthritis Rheum**, v. 33, n. 2, p. 160-72, Feb 1990. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2306288> >.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, Jun 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846153> >.

WU, G. et al. Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. **J Neurosci**, v. 22, n. 17, p. 7746-53, Sep 2002. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196598> >.

YANG, J. et al. A PET-CT study on the specificity of acupoints through acupuncture treatment in migraine patients. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 123, Aug 2012. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894176> >.

YOWTAK, J. et al. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. **Pain**, v. 152, n. 4, p. 844-52, Apr 2011. ISSN 1872-6623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296500> >.

YUNUS, M. B. Role of central sensitization in symptoms beyond muscle pain, and the evaluation of a patient with widespread pain. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 21, n. 3, p. 481-97, Jun 2007. ISSN 1521-6942. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602995> >.

ZANETTE, S. A. et al. Higher serum S100B and BDNF levels are correlated with a lower pressure-pain threshold in fibromyalgia. **Mol Pain**, v. 10, p. 46, 2014. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25005881> >.

ZHAO, B. et al. Intrathecal Administration of Tempol Reduces Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain in Rats by Increasing SOD Activity and Inhibiting NGF Expression. **Cell Mol Neurobiol**, v. 36, n. 6, p. 893-906, Aug 2016. ISSN 1573-6830. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433732> >.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Prog Neurobiol**, v. 85, n. 4, p. 355-75, Aug 2008. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18582529> >.

ZOCHODNE, D. Neuropathic pain: redundant pathways, inadequate therapy. **Can J Neurol Sci**, v. 39, n. 4, p. 409-10, Jul 2012. ISSN 0317-1671. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728845> >.

---

## **VI. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

---

## **VII. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Considerando a alta prevalência da dor neuropática na população mundial e o difícil tratamento desta condição, este estudo buscou abordar mecanismos neurobiológicos envolvidos nesta patologia e em possíveis tratamentos não farmacológicos, como acupuntura e eletroacupuntura. Concomitante a isto, buscamos revelar o efeito do isoflurano sobre os tratamentos em questão, devido ao frequente uso deste fármaco em pesquisas pré-clínicas utilizando as técnicas de AC e EA. Abaixo listamos os resultados e conclusões obtidas nesta tese:

### - Artigo 1

- Isoflurano aumentou a analgesia promovida por AC e EA no teste de von Frey;
- AC e EA aumentaram a locomoção no teste de campo aberto, porém a anestesia diminuiu este comportamento.
- Isoflurano diminuiu os níveis de S100 $\beta$  em soro, enquanto a aplicação de EA sem anestesia em animais com DN aumentou estes níveis;
- Isoflurano diminuiu os níveis de NGF no nervo ciático esquerdo, enquanto a EA aumentou.
- A DN e o isoflurano diminuíram os níveis de NGF no nervo ciático esquerdo, enquanto que a EA aumentou.

### - Artigo 2

- AC e EA aumentaram comportamentos exploratórios, enquanto a DN e o isoflurano diminuíram.
- Isoflurano aumentou o número de bolos fecais.

- Na actigrafia, a anestesia e a EA aumentaram o número de NTDs no ciclo claro, enquanto a DN diminuiu. No ciclo escuro, o isoflurano e a DN mantiveram o mesmo efeito, porém a EA diminuiu as NTDs.
- O Isoflurano diminuiu os níveis de NMDA em tronco encefálico e medula espinhal, porém a EA aumentou estes níveis em medula espinhal.

- Artigo 3

- A AC apresentou maior analgesia em animais submetidos ao modelo de DN em comparação à EA nos testes de hiperalgesia térmica e mecânica.
- O modelo de DN aumentou a densidade de fibras musculares de 1000  $\mu\text{m}^2$  e diminuiu as de 4000 $\mu\text{m}^2$  e 6000 $\mu\text{m}^2$ , promovendo atrofia do músculo gastrocnêmio esquerdo. Ambos os tratamentos não alteraram esta medida.
- A DN também aumentou o nível de DCFH, marcador de estresse oxidativo, no gastrocnêmio esquerdo, e esta medida não foi alterada pela AC ou EA.

Considerando o exposto acima, concluímos que o Isoflurano aumenta a analgesia gerada pela AC e EA, protegendo os animais do efeito estressor dos tratamentos quando aplicado em animais acordados. Este resultado é concomitante com a diminuição do nível periférico de S100 $\beta$ , marcador de morte neuronal relaciona ao estresse. Por outro lado, o isoflurano diminuiu os níveis de NGF em nervo periférico, provavelmente diminuindo a regeneração neural; enquanto isso a EA aumentou esta medida. A anestesia diminuiu o comportamento exploratório, o que corrobora a diminuição nos níveis de NMDA em tronco encefálico e medula espinhal também promovido pelo isoflurano, considerando a relação entre as vias glutamatérgicas e o comportamento exploratório. Por fim, a AC mostrou-se como melhor tratamento em comparação à EA para promoção de analgesia

em animais submetidos à DN, provavelmente pela ativação de fibras A $\delta$ . Por outro lado, demonstramos que o modelo de DN utilizado promove atrofia muscular e aumento de marcador de ROS em gastrocnêmio, e ambos os tratamentos não alteram estas medidas (Fig.4).

Estes resultados demonstram a necessidade de novas pesquisas pré-clínicas demonstrando os efeitos e mecanismos de ação envolvidos em alternativas terapêuticas que possam reverter os efeitos deletérios da dor neuropática.

	<b>Analgesia</b>	<b>S100<math>\beta</math></b>	<b>NGF</b>	<b>Comportamento Exploratório</b>	<b>Actimetria</b>	<b>NMDA</b>	<b>DCFH</b>	<b>Histologia (CSA)</b>
<b>DN</b>	↓	↑	↓	↓	↓	⊘	↑	↓
<b>AC</b>	↑	⊘	⊘	↑	⊘	⊘	⊘	⊘
<b>EA</b>	↑	↑	↑	↑	↑ ↓	↑	⊘	⊘
<b>ISO</b>	↑	↓	↓	↓	↑	↓	×	×

**Figure 4.** Resumo dos resultados apresentados nesta tese.

---

## **VIII. PERSPECTIVAS**

## **PERSPECTIVAS**

Sabe-se que AC e EA alteram vias opioide e serotoninérgica, porém a influência do isoflurano sobre estas vias não está completamente elucidada. Sendo assim, pretendemos dosar a expressão de receptores opioides em medula espinhal por meio da técnica de *Western Blotting*, bem como dosagem de serotonina e  $\beta$ -endorfinas por meio de ensaio imunoenzimático ELISA. Desta forma, esperamos melhor compreender a interação entre os sistemas opioidérgicos e serotoninérgicos no modelo experimental proposto, esclarecendo possíveis alterações que podem ser causadas pela sobreposição dos tratamentos e dos fármacos em questão.

Outra perspectiva é associar à AC e/ou EA a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) no tratamento da DN. Conforme estudo publicado previamente pelo nosso grupo por Cioato e colaboradores (2016), a ETCC apresentou bom efeito analgésico no tratamento da DN assim como as técnicas de neuromodulação periféricas apresentadas nesta tese. A associação entre a neuromodulação central e periférica pode aumentar os efeitos analgésicos e alterar diferentes vias envolvidas no processo nociceptivo.

---

**IX. ANEXOS**

## **A) APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 130298

**Data da Versão do Projeto:** 30/06/2013

**Pesquisadores:**

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

**Título:** AVALIAÇÃO DE EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA EM MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA: PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 07 de novembro de 2013.

Dr. Alessandro Osvaldt  
Coordenador CEUA/HCPA

## **B) DIVULGAÇÕES**

### **2014:**

ADACHI, L. N. S.; VERCELINO, R.; SCARABELOT, V. L.; MARQUES, P. R.; OLIVEIRA, C.; MEDEIROS, L.; CIOATO, S.; QUEVEDO, A. S.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ACUPUNTURA E ELETROACUPUNTURA EM MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA - ESTUDO PILOTO. In: 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2014, Porto Alegre. Anais da 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2014. v. 34. p. 95-96

### **2015:**

SPEZIA ADACHI, L.N.; VERCELINO, R.; OLIVEIRA, C.; SCARABELOT, V. L.; RIZZO, T. L.; MEDEIROS, L.F.; MARQUES FILHO, P.R.; CIOATO, S. G.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Efeito do uso da anestesia na aplicação de Acupuntura (AC) em ratos submetidos ao modelo de dor neuropática (DN). In: 35ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2015, Porto Alegre. Anais da 35ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2015.

VERCELINO, R.; SPEZIA ADACHI, L. N.; OLIVEIRA, C.; SCARABELOT, V. L.; RIZZO, T. L.; CIOATO, S.G.; CAUMO, W. ; TORRES, I. L. S. Acupuntura reduz a hiperalgesia mecânica e térmica induzida por compressão de nervo isquiático. In: VII SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM NEUROMODULAÇÃO, 2015, São Paulo. Anais do VII SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM NEUROMODULAÇÃO, 2015.

SPEZIA ADACHI, L.N.; VERCELINO, R.; OLIVEIRA, C.; SCARABELOT, V.L.; RIZZO, T. L.; MEDEIROS, L. F.; MARQUES FILHO, P.R.; CIOATO, S.G.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Comparação entre a aplicação de Acupuntura (AC) com e sem anestesia em ratos submetidos ao modelo de dor neuropática (DN). In: VII SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM NEUROMODULAÇÃO, 2015, São Paulo. Anais do VII SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM NEUROMODULAÇÃO, 2015

### **2016:**

MUNERETTO, C. S.; SPEZIA ADACHI, L.N.; VERCELINO, R. ; OLIVEIRA, C. ; SCARABELOT, V.L.; MEDEIROS, L.F. ; SOUZA, A. ; CIOATO, S. G.; CAUMO, W. ; TORRES, I. L. S. Isoflurano altera parâmetros em teste de Campo Aberto de animais submetidos a um modelo de dor neuropática tratados com Acupuntura ou Eletroacupuntura.. In: 36ª Semana Científica do HCPA, 2016, Porto Alegre. Anais da 36ª Semana Científica do HCPA, 2016

SPEZIA ADACHI, L.N.; VERCELINO, R.; OLIVEIRA, C. ; MUNERETTO, C. S. ; SCARABELOT, V. L. ; MEDEIROS, L. ; SOUZA, A. ; CAUMO, W. ; TORRES, I. L. S. Anestesia altera níveis séricos de S100 $\beta$  em modelo animal de dor neuropática (DN) tratado com Acupuntura (A) ou Eletroacupuntura (EA). In: 36ª Semana Científica do HCPA, 2016, Porto Alegre. Anais da 36ª Semana Científica do HCPA, 2016.

SPEZIA ADACHI, L.N.; VERCELINO, R.; OLIVEIRA, C.; SCARABELOT, V. L.; MEDEIROS, L. F.; SOUZA, A.; CIOATO, S.G.; CALLAI, E.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. ISOFLURANE ALTERS OPEN FIELD TEST AND S100B SERUM LEVEL ON ANIMAL MODEL OF NEUROPATHIC PAIN SUBMITTED TO ACUPUNCTURE AND ELETROACUPUNCTURE TREATMENT. In: 16th World Congress on Pain, 2016, Yokohama. 16th World Congress on Pain, 2016.

VERCELINO, R.; SPEZIA ADACHI, L.N.; OLIVEIRA, C.; SCARABELOT, V.L.; CIOATO, S.G.; TORRES, IRACI L. S. ACUPUNCTURE CHANGES HYPERALGESIA INDUCED BY SCIATIC NERVE COMPRESSION. In: 16th World Congress on Pain, 2016, Yokohama. 16th World Congress on Pain, 2016.

OLIVEIRA, C.; SPEZIA ADACHI, L.N.; VERCELINO, R.; SCARABELOT, V.L.; CIOATO, S.G. ; TORRES, I. L. S. . APPLICATION EFFECT OF ACUPUNCTURE (AC) AND ELETROACUPUNCTURE (EA) IN RATS WITH AND WITHOUT ANESTHESIA IN A MODEL OF NEUROPATHIC PAIN (NP). In: 16th World Congress on Pain, 2016, Yokohama, Japan. 16th World Congress on Pain, 2016.

## **C) ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO**

### **a) Autoria**

Adachi, L. N. S. ; Caumo, Wolnei ; Laste, G. ; Medeiros, L. F. ; Rozisky, Jr ; Souza, A. ; Fregni, F. ; Torres, I. L. S. Reversal of Chronic Stress induced Pain by Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) in an Animal Model. *Brain Research*, v. 1489, p. 17-26, 2012

Adachi, L. N. S. ; Quevedo, A. ; Souza, A. ; Scarabelot, VI ; Rozisky, J. R. ; Oliveira, C. ; Marques, P. ; Medeiros, L.F. ; Fregni, F. ; Caumo, W. ; Torres, I.L.S. . Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Experimental Brain Research*, v. 233, p. 1377-1389, 2015

### **b) Artigo aceito para publicação**

Adachi, L. N. S.; Oliveira, C. ; Vercelino R; Macedo, I.C.M.; Laste, G.; Quevedo, A.S.; Scarabelot, V.L.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Evaluation of different procedure involved in the Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) technique experimental application. *Clinical & Biomedical Research*.

### **c) Coautoria**

Rozisky, J. R. ; Laste, G. ; Medeiros, Liciane F. ; Souza, Vs ; Adachi, L ; Macedo, I. C. ; Caumo, W. ; Torres, ILS . Morphine Treatment in Neonate Rats Increases Exploratory Activities: Reversal by Antagonist D2 Receptor. *British Journal of Medicine and Medical Research*, v. 4, p. 351-367, 2014.

Souza, Andressa ; Dussan-Sarria, Jairo Alberto ; Medeiros, Liciane Fernandes ; Souza, Ana Cláudia ; Oliveira, Carla ; Scarabelot, Vanessa Leal ; Adachi, Lauren Naomi ; Winkelmann-Duarte, Elisa Cristiana; Philippi-Martins, Bárbara Beatriz ; Netto, Carlos Alexandre ; Caumo, Wolnei ; Torres, Iraci L.S. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy reduces c-Fos activation in the rat hippocampus: evidence of a long-

lasting effect. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 38, p. 213-222, 2014

Marques Filho, P. R. ; Vercelino, R. ; Cioato, S. G. ; Medeiros, L.F. ; Oliveira, C. ; Scarabelot VI ; Souza, A. De ; Rozisky, Jr ; Quevedo, A. ; Adachi, L. N. S. ; Sanches, P. R. ; Fregni, F. ; Caumo, Wolnei ; Torres, I.L.S. . Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 64, p. 44-51, 2015.

Cioato, Stefania Giotti ; Medeiros, Liciane Fernandes ; Marques Filho, Paulo Ricardo ; Vercelino, R ; De Souza, Andressa ; Scarabelot, Vanessa Leal ; De Oliveira, Carla ; Adachi, Lauren Naomi Spezia ; Fregni, Felipe ; Caumo, Wolnei ; Torres I Da S. Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model. *Brain Stimulation: basic, translational and clinical research in neuromodulation*, v. 9, p. 209-217, 2016

Scarabelot, VI ; Oliveira, C. ; Souza, A. ; De Freitas Js ; Macedo, I. C. ; Quevedo, A. ; Caumo, Wolnei ; Cioato, S. G. ; Adachi, L. N. S. ; Torres, I. L. S. Melatonin Alters the Mechanical and Thermal Hyperalgesia Induced by Orofacial Pain Model in Rats. *Inflammation*, v. n/a, p. n/a-n/a, 2016.

## **D) ARTIGO 1 SUBMETIDO AO PERIÓDICO PHARMACOLOGICAL RESEARCH**

### **Manuscript Details**

<b>Manuscript number</b>	YPHRS_2017_512
<b>Title</b>	Isoflurane enhances the analgesic effect of acupuncture and electroacupuncture on neuropathic pain in rats
<b>Article type</b>	Research Paper

### **Abstract**

**Introduction:** Due to the difficulty of applying acupuncture (Ac) and electroacupuncture (EA) to the treatment of neuropathic pain (NP) in awake and freely moving rats, most studies use restraint or anesthesia. However, both conditions could be a potential source of bias. The purpose of the present study was to determine whether isoflurane interferes with the analgesic effects of Ac and EA using an NP rat model. We also investigated the effect of isoflurane on the levels of S100 $\beta$  protein in serum and nerve growth factor (NGF) in the left sciatic nerve of the animals.

**Methods:** Using 140 male Wistar rats, we evaluated the nociceptive response induced by isoflurane using the von Frey test, serum levels of S100 $\beta$ , and NGF levels in the left sciatic nerve. NP was induced by constriction of the left sciatic nerve. The treatments, with or without isoflurane anesthesia, started 14 days after surgery (20 min/day/8 days). The von Frey test was performed at baseline, 14 days postoperatively, and immediately, 24 h and 48 h after the last treatment session. Animals were killed by decapitation. Serum and constricted nerves were collected and frozen at -80°C. Generalized estimating equations/Bonferroni were used to analyze the results of the nociceptive test and three-way analysis of variance/SNK or Fisher's LSD test was used to analyze the results of the biochemical analysis. Results were considered significant if  $P \leq 0.05$ .

**Results:** At baseline, there were no differences in the nociceptive response threshold among all groups. Fourteen days after surgery, the groups with NP had a decreased pain threshold compared to the other groups, showing that NP was established ( $P < 0.05$ ). Ac and EA enhanced the mechanical pain threshold immediately after the last session in the groups with NP and without anesthesia. In addition, when all groups received isoflurane, the nociceptive threshold significantly increased ( $P < 0.001$ ). These results were maintained for 48 h after the last treatment session. There was an interaction between the independent variables: pain x treatments x isoflurane in serum S100 $\beta$  levels ( $P < 0.001$ ) and NGF levels in the left sciatic nerve ( $P < 0.001$ ). Conclusion: Isoflurane enhanced the analgesic effects of Ac and EA and altered serum S100 $\beta$  levels and NGF levels in the left sciatic nerve in rats with NP.

<b>Keywords</b>	Isoflurane; Neuropathic pain; Acupuncture; Electroacupuncture
<b>Corresponding Author</b>	Iraci Lucena da Silva Torres
<b>Corresponding Author's Institution</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>Order of Authors</b>	Lauren Naomi Adachi, Rafael Vercelino, Carla de Oliveira, Vanessa Scarabelot, Andressa Souza, Tizye Rizzo, Liciane Medeiros, Stefania Cioatol, Wolnei Caumo, Iraci Lucena da Silva Torres

### **Submission Files Included in this PDF**

<b>File Name [File Type]</b>
Cover_letter.docx [Cover Letter]
graphical abstracts manuscript isoflurane.tif [Graphical Abstract]
Manuscript Isoflurane.doc [Manuscript File]
fig 1.tif [Figure]
fig 2.tif [Figure]
fig 3.tif [Figure]
figure4.TIF [Figure]
fig 5.tif [Figure]
fig 6.tif [Figure]
Conflict of Interest.docx [Conflict of Interest]

Dear Ms. Adachi,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Pharmacological Research

Title: Isoflurane enhances the analgesic effect of acupuncture and electroacupuncture on neuropathic pain in rats

Corresponding Author: Iraci Lucena da Silva Torres

Co-Authors: Lauren Naomi Adachi, Rafael Vercelino, Carla de Oliveira, Vanessa Scarabelot, Andressa Souza, Tizye Rizzo, Liciane Medeiros, Stefania Cioatoj, Wolnei Caumo

Iraci Lucena da Silva Torres submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating

to [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=YPHRS](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=YPHRS)

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page:

[http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at 87605@ufrgs.br.

Thank you,

Pharmacological Research

**This message was sent automatically. Please do not reply**

## **E) ARTIGO 2 SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY**

← → 🏠 🔒 Seguro | <https://mc.manuscriptcentral.com/jneurochem>



### Submission Confirmation



Thank you for your submission

---

**Submitted to** Journal of Neurochemistry

**Manuscript ID** JNC-2017-0312

**Title** Isoflurane alters effects of Acupuncture and Electroacupuncture upon locomotor activity and NMDA central levels in neuropathic pain rat model

**Authors** Adachi, Lauren Naomi  
Vercelino, Rafael  
Oliveira, Carla  
Scarabelot, Vanessa  
Souza, Andressa  
Santos, Lisiane  
Caumo, Wolnei  
Torres, I

**Date Submitted** 24-May-2017

Journal of Neurochemistry



**Isoflurane alters effects of Acupuncture and Eletroacupuncture upon locomotor activity and NMDA central levels in neuropathic pain rat model**

Journal:	<i>Journal of Neurochemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Adachi, Lauren Naomi; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Vercelino, Rafael; Universidade Federal de Ciencias da Saude de Porto Alegre Oliveira, Carla; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Scarabelot, Vanessa; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Souza, Andressa; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Santos, Lisiane; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Caumo, Wolnei; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Torres, I ; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pharmacology
Area/Section:	Neuronal Plasticity & Behavior
Keywords:	Acupuncture, Neuropathic pain, Eletroacupuncture, Isoflurane, NMDA

**F) ARTIGO 3 SUBMETIDO AO PERIÓDICO MOLECULAR  
NEUROBIOLOGY**

**Molecular Neurobiology**

**Acupuncture induces greater analgesia than Eletroacupuntura in rats submitted to neuropathic pain model.**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Keywords:</b>	Neuropathic pain, Acupuncture, Eletroacupuntura, gastrocnemius, CSA, DCFH.
<b>Corresponding Author:</b>	Iraci Torres Universidade Federal do Rio Grande do Sul BRAZIL
<b>First Author:</b>	Iraci Torres
<b>Order of Authors:</b>	Iraci Torres Lauren Naomi S Adachi Rafael Vercelino Francele V Piazza Carla de liveira Vanessa L Scarabelot Natalia P Silveira Bruna Belaver Wolnei Caumo Andre Quincozes-Santos
<b>Abstract:</b>	<p><b>Introduction:</b> The purpose of this study was to investigate the comparison of repeated Acupuncture or Eletroacupuntura on nociceptive behavior, TNF-<math>\alpha</math> immunostaining, cross-sectional area measure (CSA) and oxidative stress parameters in the gastrocnemius muscle on chronic constriction injury (CCI) model. <b>Methods:</b> seventy male Wistar rats with 60 days-year-old were used. The nociceptive response was evaluated by Hot plate and Randall Selitto test, at baseline; 14 days post-surgery, immediately and 24h after the last session of treatment. Neuropathic pain (NP) was induced by sciatic nerve constriction, and the Ac or EA treatments started 14days after-surgery (20min/day/8days). The statistical analysis GEE/Bonferroni were conducted to nociceptive tests, and three-way ANOVA/SNK, for histological and biochemical analysis. The results were considered significant with <math>P \leq 0.05</math>. <b>Results:</b> Fourteen days after-surgery, groups submitted to NP presented decrease in nociceptive threshold compared to other groups, confirming the establishment of NP (<math>P &lt; 0.05</math>). Both treatments enhanced nociceptive threshold immediately after the last session, however Ac induces greater analgesia than EA immediately in the hot plate (<math>P &lt; 0.05</math>) and Randall Selitto tests (<math>P &lt; 0.05</math>). In CSA of gastrocnemius muscle, Pain groups showed a significant increase in fibers 1000 <math>\mu\text{m}^2</math> (<math>P \leq 0.000</math>) and a significant decrease in fibers 4000 <math>\mu\text{m}^2</math> and 6000 <math>\mu\text{m}^2</math> (<math>P \leq 0.000</math>). The DCFH levels were increased on gastrocnemius muscle of rats submitted to CCI model (<math>P \leq 0.000</math>), and AC and EA were not able to revert this effect. <b>Conclusion:</b> AC induces greater analgesia than EA, however were not able to revert changes caused by CCI model on gastrocnemius muscle.</p>

Re: "Acupuncture induces greater analgesia than Eletroacupuntura in rats submitted to neuropathic pain model."

Full author list: Iraci Torres; Lauren Naomi S Adachi; Rafael Vercelino; Francele V Piazza; Carla de liveira; Vanessa L Scarabelot; Natalia P Silveira; Bruna Belaver; Wolnei Caumo; Andre Quincozes-Santos

Dear Ms Lauren Naomi Adachi,

We have received the submission entitled: "Acupuncture induces greater analgesia than Eletroacupuntura in rats submitted to neuropathic pain model." for possible publication in *Molecular Neurobiology*, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dra. Iraci Torres who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office

*Molecular Neurobiology*