

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

JÉSSICA NATALIA SILVA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACUPUNTURA,
IMPLANTES EM ACUPONTOS E DA
MOXABUSTÃO EM MODELO DE NEUROPATIA
PERIFÉRICA INDUZIDA PELA LESÃO EM
NERVO**

ILHÉUS – BAHIA

2022

JÉSSICA NATALIA SILVA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACUPUNTURA,
IMPLANTES EM ACUPONTOS E DA
MOXABUSTÃO EM MODELO DE NEUROPATIA
PERIFÉRICA INDUZIDA PELA LESÃO EM
NERVO**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal

Área de concentração: Clínica e
Sanidade Animal

Orientador: Prof^o Dr. Mário Sérgio
Lima de Lavor

Coorientadora: Prof^a Dra. Poliana de
Castro Melo

ILHÉUS – BAHIA

2022

JÉSSICA NATALIA SILVA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACUPUNTURA, IMPLANTES
EM ACUPONTOS E DA MOXABUSTÃO EM MODELO DE
NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELA LESÃO EM
NERVO**

Ilhéus –BA, 23/02/2022.

Mário Sérgio Lima de Lavor – Dsc
UESC/DCAA
(Orientador)

Poliana de Castro Melo – Dsc
UESC/DCAA
(Coorientadora)

Maria Amélia Fernandes Figueiredo – Dsc
UESC/DCAA

Karen Maciel de Oliveira – Dsc
UNIFESP

ILHÉUS – BAHIA

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por toda força, paciência e fé que me concedeu em todos os momentos em que mais precisei. De fato, nunca me vi sozinha nessa trajetória, Ele sempre soube que eu chegaria até aqui e me provou a cada desafio superado por mim.

À minha avó Sandra Chico e ao meu pai Carlos Antônio de Oliveira Jr. que mesmo a mil quilômetros de distância fisicamente, espiritualmente e mentalmente sempre estiveram ao meu lado lutando comigo. Essa conquista também é de vocês.

Ao meu namorado Valter Moura Costa, que em todos esses anos de parceria sempre me apoiou em todos os meus sonhos e objetivos, e esteve ao meu lado como uma âncora nos momentos mais críticos, e como um verdadeiro alicerce, ao passo que crescemos juntos nessa estrada até aqui.

Ao meu orientador Mário Sérgio Lima de Lavor, por ter aberto as portas para mim desde a graduação, com a iniciação científica, e em um segundo momento na pós-graduação, acreditando e confiando em meu potencial. Agradeço por todos os ensinamentos, atenção, suporte e todo o apoio durante todo esse tempo.

À minha coordenadora Poliana de Castro Melo, por todos os ensinamentos com a Medicina Tradicional Chinesa, orientação e todo o apoio. Sem o seu suporte certamente parte disso não existiria.

Agradeço à minha parceira de mestrado Isabela Drummond, que desde o início esteve caminhando ao meu lado, e juntas vencemos cada etapa, com apoio mútuo e muito companheirismo. Sem você, o caminho seria muito mais difícil.

Aos funcionários do Hospital Veterinário e da UESC, em especial à Márcia Souza, Ivo Arouca e Jaciara, por muito mais que a disponibilidade e colaboração no experimento, mas também por compartilharem momentos únicos de muita alegria, diversão e leveza, além de todo o apoio.

À toda equipe do experimento, sem vocês nada disso seria possível, obrigada pelo tempo disponibilizado, boa intenção, e pela amizade, Raquel Niella, Claire Marques, Iago Oliveira, AnisCleide Oliveira, Álvaro Chávez, Maria Clara Galrao e Janaína Corrêa.

Agradeço ao professor Juneo Freitas Silva pela disponibilidade e ensinamentos compartilhados, pelo auxílio nas leituras e interpretação das lâminas da imuno-histoquímica, certamente, você foi fator decisivo para o sucesso da mesma. Agradeço aos colegas Bianca e Luciano pelo apoio com a imuno-histoquímica e, em especial, à Jeane Cordeiro, por ter estado sempre presente nos momentos mais críticos, não há palavras para agradecer-lá.

Aos componentes titulares da banca Maria Amélia Fernandes Figueiredo e Karen Maciel de Oliveira, obrigada por contribuírem para a minha evolução e crescimento científico.

Agradeço imensamente a todos os meus amigos que me apoiam desde sempre, em especial à Natalia Paim, Camilla Freitas, Yasmine Costa, Kadyje Barakat, João Ribeiro, Anderson Vieira, Áquila Rhaná, Joyce Freitas e Rafaela Oliveira. Vocês fizeram diferença nessa caminhada, me dando todo o apoio necessário para que eu não sucumbisse.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e financiamento e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz.

RESUMO

Acredita-se que a acupuntura, moxabustão e implantes em acupontos possam atuar na redução do estresse oxidativo, contribuindo para a neuroproteção. Objetivou-se Investigar os efeitos antinociceptivos, antioxidantes e antiinflamatórios da estimulação de acupontos em modelo de dor neuropática. dessas terapias na dor neuropática. Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem Wistar, submetidos à lesão constritiva crônica (LCC) do nervo isquiático. Foram divididos aleatoriamente em sete grupos e receberam os seguintes tratamentos durante 28 dias após 7 dias da LCC: G1 (Naive) – Animais sem ligadura e sem tratamento; G2 (Controle Negativo) – Animais submetidos à exposição do nervo, porém sem a ligadura, tratados com 0,25 ml/kg/24q solução salina; G3 (Controle Positivo) – Animais submetidos à ligadura do nervo e tratados com 0,25 ml/kg/24q solução salina; G4 (Gabapentina) – Tratados com 60 mg/kg/VO/24q de gabapentina; G5 (acupuntura) – Tratados com acupuntura com estimulação dos acupontos; G6 (moxabustão) – Tratados com moxabustão com a estimulação dos acupontos; G7 (implante em acupontos)– Tratados com implante de fio *CatGut* com estimulação dos acupontos. Foi realizada a estimulação dos acupontos VB30 (Huantiao), VB34 (Yanglingquan) e ST36 (Zusanli) e avaliado a alodínia mecânica a partir do 8º dia, 60 minutos após a administração de gabapentina e 15 minutos após a aplicação das terapias. No 37º dia, os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico com sevoflurano e coletada a medula espinal para processamento pela técnica de inclusão em parafina. Foram avaliados o mediador inflamatório (IL-10), estresse oxidativo (SOD, GPx, CAT), microglial (IBA-1), álgico (CXCR-4), e quantificação da quantidade de catalase e superóxido dismutase. Os tratamentos com acupuntura, moxabustão e implante com fio *CatGut* nos acupontos aumentaram o limiar nociceptivo mecânico após 15 minutos da aplicação da acupuntura, moxabustão e implante com fio *CatGut* nos acupontos VB30, VB34 e ST36, atenuou a alodinia e a hiperalgesia nos animais. Houve redução da ativação microglial, aumento do marcador anti-inflamatório, aumento da atividade antioxidante e redução do marcador álgico. Assim, esses resultados demonstraram que a acupuntura, moxabustão e implante em acupontos possuem ação antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante.

ABSTRACT

It is believed that acupuncture, moxibustion and acupoint implants may act in reducing oxidative stress, contributing to neuroprotection. The objective was to investigate the antinociceptive, antioxidant and anti-inflammatory effects of acupoint stimulation in a neuropathic pain model. of these therapies in neuropathic pain. Sixty male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) submitted to chronic constrictive injury (CCL) of the sciatic nerve were used. They were randomly divided into seven groups and received the following treatments for 28 days after 7 days of LCC: G1 (Naive) – Animals without ligature and without treatment; G2 (Negative Control) – Animals submitted to nerve exposure, but without ligation, treated with 0.25 ml/kg/24q saline solution; G3 (Positive Control) – Animals submitted to nerve ligation and treated with 0.25 ml/kg/24q saline solution; G4 (Gabapentin) – Treated with 60 mg/kg/VO/24q of gabapentin; G5 (acupuncture) – Treated with acupuncture with stimulation of acupoints; G6 (moxibustion) – Treated with moxibustion with acupoint stimulation; G7 (acupoint implantation) – Treated with a CatGut wire implant with acupoint stimulation. Stimulation of the acupoints VB30 (Huantiao), VB34 (Yanglingquan) and ST36 (Zusanli) was performed and mechanical allodynia was evaluated from the 8th day, 60 minutes after the administration of gabapentin and 15 minutes after the application of the therapies. On the 37th day, the animals were euthanized by deepening the anesthetic plane with sevoflurane and the spinal cord was collected for processing using the paraffin embedding technique. Inflammatory mediator (IL-10), oxidative stress (SOD, GPx, CAT), microglial (IBA-1), algic (CXCR-4) and quantification of the amount of catalase and superoxide dismutase were evaluated. The treatments with acupuncture, moxibustion and implantation with CatGut thread in the acupoints increased the mechanical nociceptive threshold after 15 minutes of the application of acupuncture, moxibustion and implantation with catgut thread in the acupoints VB30, VB34 and ST36, attenuated allodynia and hyperalgesia in the animals. There was a reduction in microglial activation, an increase in the anti-inflammatory marker, an increase in antioxidant activity and a reduction in the pain marker. Thus, these results demonstrated that acupuncture, moxibustion and implantation in acupoints have antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant action.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Ilustração esquemática das estruturas periféricas com a exposição dos danos nos nervos.....22
- Figura 2-** A- Exposição do nervo isquiático de um rato; B- Nervo isquiático após a realização de três ligaduras com fio de poliamida (5-0)40
- Figura 3-** Esquema geral do modelo experimental e período das avaliações do limiar de retirada mecânica nos grupos: G1 (naive); G2 (controle negativo); G3 (controle positivo); G4 (gabapentina); G5 (acupuntura); G6 (moxabustão) e G7 (implantes em acupontos), iniciado no dia 1 da neuropatia e finalizado o dia 28.41
- Figura 4-** A- Localização dos acupontos ST 36 (Zusanli), VB 30 (Huntiao) e VB 34 (Yangligquan) no membro posterior de um rato do grupo acupuntura (G5); B- animal após inserção das agulhas de aço inoxidável (DUX® Spring C) nos acupontos ST 36, VB 30 e VB 34 no membro posterior.43
- Figura 5-** A e B- Aplicação do pau de moxa cigarrate (Moxa Rolls - Dong Yang®) nos acupontos ST 36 (Zusanli), VB 30 (Huntiao) e VB 34 (Yangligquan) no membro posterior de um animal do grupo moxabustão (G6).43
- Figura 6-** A e B- Aplicação dos implantes com fio CatGut 2-0 (Procare ®) nos acupontos ST 36 (Zusanli), VB 30 (Huntiao) e VB 34 (Yangligquan) no membro posterior de um animal anestesiado do grupo implante (G7)44
- Figura 7-** Avaliação do limiar nociceptivo mecânico com analgesímetro digital, antes da indução da neuropatia (B: limiar basal), após LCC, com o estabelecimento da neuropatia periférica (N) e do dia 1 ao dia 28 com os

tratamentos; realizada 60 minutos após a administração do fármaco gabapentina e da administração da solução fisiológica nos grupos controle positivo e controle negativo, e 15 minutos após a aplicação da acupuntura, moxabustão, implante nos acupontos. (●) representa o grupo G1 (naive); (▲) representa o grupo G2 (controle negativo); (■) representa o grupo G3 (controle positivo); (▼) representa o grupo G4 (gabapentina); (◆) representa o grupo G5 (acupuntura); (○) representa o grupo G6 (moxabustão); (□) representa o grupo G7 (implantes em acupontos). Foi utilizado análise de variância de duas vias seguida de teste post hoc de BonFerroni. As linhas verticais indicam média ± S.E.M e os símbolos * para comparar com o grupo G3 (****p<0,0001); n=10.49

Figura 8- Eficácia dos tratamentos dos grupos: G4 (gabapentina), G5 (acupuntura), G6 (moxabustão) e G7 (implantes em acupontos). Média e erro padrão médio do limiar nociceptivo mecânico (LNM) dos ratos com neuropatia estabelecida e ao final dos tratamentos. (—) representa animais com neuropatia (G3) e (□) representa animais que receberam tratamento terapêutico (G4, G5, G6 e G7). Análise estatística usando ANOVA de duas vias, sendo ****p<0,0001 para comparar com o grupo G3; e símbolos #p<0,0001 e ##p=0,0016, para comparar o grupo G4 com os grupos G5, G6 e G7; n=10.....51

Figura 9- Expressão proteica de SOD (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunistoquímica de SOD em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (naive). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de CAT (H). (Média ± SEM; n=6, **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). Atividade enzimática de SOD em ratos submetidos à LCCI associado ao tratamento com solução salina (G3); tratados com gabapentina 60 mg/kg (G4); tratados com acupuntura (G5); tratados com moxabustão (G6); e tratados com implantes (G7), nos acupontos

ST 36, VB 30 e VB 34 durante 28 dias (I). (Média ± SEM; n=6).

.....52

Figura 10- Expressão proteica de CAT (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunistoquímica de CAT em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (naive). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de CAT (H). (Média ± SEM; n=6, ****p<0,0001). Atividade enzimática de CAT em ratos submetidos à LCCI associado ao tratamento com solução salina (G3); tratados com gabapentina 60 mg/kg (G4); tratados com acupuntura (G5); tratados com moxabustão (G6); e tratados com implantes (G7), nos acupontos ST 36, VB 30 e VB 34 durante 28 dias (I). (Média ± SEM; n=6)

.....53

Figura 11- Expressão proteica de GPx (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunistoquímica de CAT em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (naive). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de CAT (H). (Média ± SEM; n=6, ****p<0,0001)

54

Figura 12- Expressão proteica de IL-10 (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunistoquímica de IL-10 em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (naive). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de IL-10 (H). (Média ± SEM; n=6, ****p<0,0001)

55

Figura 13- Expressão proteica de CXCR-4 (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias

da expressão imunohistoquímica de CXCR4 em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (naive). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de CXCR4 (H). (Média \pm SEM; n=6, ****p<0,0001).56

Figura 14- Expressão proteica de IBA-1 (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de IBA-1 em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (naive). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de IBA-1 (H). (Média \pm SEM; n=6, ****p<0,0001)57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Anticorpos, diluições, tempos de revelação com diaminobenzidina (DAB) e os seus respectivos códigos.....	84
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A β δ	Alfa beta delta
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAM	Concentração alveolar mínima
CAT	Catalase
CB1	Receptor endocanabinoide tipo 1
CB2	Receptor endocanabinoide tipo 2
CCI	Lesão por constrição crônica
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CFA	Adjuvante completo de Freund
CCK-8	Octapeptídeo colecistocinina
Cu	Cobre
Cys	Cisteína
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo

Fe	Ferro
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCRP	Proteína relacionada ao gene da calcitonina
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GPx	Glutaciona peroxidase
GRd	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GO	Glutaciona oxidase
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IBA	Molécula Adaptadora Ligante de Cálcio Ionizado-1
IL	Interleucina
IL 1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina - 10
IL-6	Interleucina – 6
IV	Intravenosa
i.p	intraperitoneal
JNK	c-Jun N-terminal cinase
Kg	Quilograma
LCC	Lesão constritiva crônica
LCCI	Lesão constritiva crônica do nervo isquiático
LNM	Limiar nociceptivo mecânico

MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MCP-1	Citocina proinflamatória 1
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mn	Magnésio
mGluR1	Receptor metabotrópico de glutamato 1.
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NGF	Fator de Crescimento Neural
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NT-3	Neurotrofina 3
°C	Graus Celsius
PKC γ	Proteína quinase C gama
Prxs	Peroxirredoxinas
RL	Radicais livres
RPM	Rotação por minuto
SC	Subcutâneo
Sec	Selenocisteína
SNC	Sistema nervoso central

SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
TFK	Tampão fosfato de potássio
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TRP	Receptores de potencial transitório
TRPV	Receptor vanilóide transitório
TRPV1	Receptor vanilóide transitório subtipo 1
TRPV4	Receptor vanilóide transitório subtipo 4
V%	Volume por cento
Zn	Zinco
μ L	Microlitro(s)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Fisiopatologia da dor	14
3.2. Classificação da dor	15
3.3. Dor neuropática	16
3.2.1. Estresse oxidativo.....	17
3.4. Modelo Experimental de dor neuropática	19
3.3.1. Lesão constrictiva crônica	19
3.5. Tratamento da dor neuropática	22
3.5.1. Farmacológico.....	22
3.5.1.1. <i>Gabapentina</i>	22
3.5.2. Não farmacológico.....	24
3.5.2.1. <i>Acupuntura</i>	24
3.5.2.2. <i>Moxabustão</i>	26
3.5.2.3. <i>Implantes em acupontos</i>	27
3.6. Especificidade dos acupontos	28

3.7. Participação dos canais iônicos na recepção do estímulo mecânico.....	29
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ARTIGO CIENTÍFICO.....	31
ANEXOS.....	79

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas representam quase 80% das mortes no Brasil, apresentando um grande desafio e é alvo de diversas abordagens de tratamento do século XXI (DRUMMOND et al., 2020). Pacientes que possuem limitações às terapias alopáticas, cada vez mais vem se aproximando de terapias de saúde complementares e integrativas a fim de controlar a dor crônica e minimizar os efeitos adversos relacionados aos fármacos (ZELIADT et al., 2020).

Doenças que envolvem o nervo e o músculo impactam fortemente a população com idade mais avançada, tendo a neuropatia periférica como uma das doenças mais debilitantes e de maior preocupação terapêutica naqueles que possuem comorbidades associadas (RUTKOVE et al., 2018). A média é que mais de 2 a cada 100 pessoas possuam dor neuropática, e em pessoas idosas a incidência aumenta para 8 a cada 100 pessoas, constituindo alta prevalência (BAUTE et al., 2019).

A dor neuropática trata-se de um estado debilitante provocado por um dano ou doença do sistema somatossensorial (ZARABIAN et al., 2021; COLLOCA et al., 2017). A predominância dessa doença se deve à complexidade de seus sintomas e de tratamentos complicados, com a associação de inúmeros medicamentos, com modalidades e mecanismos de ação diferentes (SETTA et al. 2012), mas que, muitas vezes, possuem baixa adesão ou efeitos adversos, afetando a qualidade de vida desses pacientes (COLLOCA et al., 2017).

As terapias da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) tem sido exploradas pelos médicos como uma medicina complementar ao tratamento alopático na dor neuropática, tendo a acupuntura como uma das terapias mais aplicadas nesse meio (TAN et al., 2020). A moxabustão, outra terapia da MTC, também tem demonstrado eficácia ampla no tratamento da dor neuropática, apresentando efeitos antiinflamatórios e analgésicos por meio de propriedades

farmacológicas da erva, fumaça emitida e odor (ZHOU et al. 2017; CHIU et al., 2013).

Em contrapartida, a terapia de implante de fio categute em acupontos supre algumas deficiências presentes nas terapias anteriores, como tratamento repetitivo, devido ao curto tempo de ação, e longo curso de tratamento, enquanto a implantação com categute prolonga e fortalece o efeito terapêutico com a estimulação contínua dos acupontos (IGNATOV et al., 2020). A técnica de implantação é simples, segura, com boa adesão, e de baixo custo, apresentando benefícios aos pacientes debilitados, com redução do deslocamento ao médico (HAN et al., 2021).

Há diversos estudos sobre a eficácia clínica da acupuntura, moxabustão e implante de fio categute em acupontos no tratamento da dor neuropática, no entanto, existe a necessidade de investigar os efeitos antinociceptivos, antiinflamatórios e antioxidantes da estimulação de acupontos específicos no tratamento da neuropatia periférica, bem como comparar a efetividade de cada terapia em um modelo de neuropatia. Ademais, salienta-se a relevância do estudo, dado que as terapias da MTC apresentam alta acessibilidade, baixo custo e poucos efeitos adversos, comparado às terapias farmacológicas existentes.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Investigar os efeitos antinociceptivos, antioxidantes e antiinflamatórios da estimulação de acupontos em modelo de dor neuropática.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar diferentes técnicas da estimulação dos acupontos Huantiao (VB 30), Yanglingquan (VB 34) e Zusanli (ST 36) no modelo de neuropatia causada por lesão constritiva crônica do nervo isquiático;
- Verificar o efeito da estimulação dos acupontos Huantiao (VB 30), Yanglingquan (VB 34) e Zusanli (ST 36) sobre o limiar mecânico nociceptivo no modelo de neuropatia causada por lesão constritiva crônica do nervo isquiático;
- Avaliar o perfil de citocinas inflamatórias e de ativação glial através da estimulação dos acupontos Huantiao (VB 30), Yanglingquan (VB 34) e Zusanli (ST 36) no modelo de neuropatia causada por lesão constritiva crônica do nervo isquiático;
- Avaliar o perfil de estresse oxidativo através da estimulação dos acupontos Huantiao (VB 30), Yanglingquan (VB 34) e Zusanli (ST 36) no modelo de neuropatia causada por lesão constritiva crônica do nervo isquiático.
- Avaliar o perfil de expressão de mediador algico na medula espinal através da estimulação dos acupontos Huantiao (VB 30), Yanglingquan (VB 34) e Zusanli (ST 36) no modelo de neuropatia causada por lesão constritiva crônica do nervo isquiático.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.3 Fisiopatologia da dor

A dor é uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (DeSANTANA et al., 2020). Ocorre como um mecanismo de alerta informando o organismo de alguma desordem que requer reparação (WALL, 1999). Quando se torna crônica, acarreta grande sofrimento ao paciente, o que requer maior atenção por parte dos profissionais da saúde (DELLAROZA et al., 2008).

Quando ocorre uma lesão, há a decodificação de sensações mecânica, térmica e química em impulsos elétricos por terminais nervosos pelos nociceptores, que são receptores de dor, localizados em diversos órgãos parenquimatosos, periféricos e viscerais (PISERA, 2005). Os nociceptores transmitem estímulos nocivos para o corno dorsal da medula espinal, pelas fibras periféricas A-delta (fibra nociceptiva) e fibras C (fibra sensitiva) (BASBAUM et al., 2009), podendo ser sensibilizados por ação cáustica de substâncias químicas, temperaturas extremas, pressões excessivas e distensões (MOFFAT; RAE, 2011).

Os neurotransmissores excitatórios ligam-se à receptores específicos da medula espinal e efetuam a transmissão da informação nociceptiva que ocorre entre as fibras aferentes de primeira ordem e os interneurônios, neurônios de projeção e neurônios proprioespinais. O glutamato, aspartato, substância P, peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo relacionado com o gene da calcitonina e colecistocinina são os principais aminoácidos excitatórios (neurotransmissores) (KLAUMANN, 2008).

Os neurônios de projeção, os tratos espinotalâmicos e espinoreticulotalâmico, originados nas vias ascendentes, levam a informação algica para o tálamo e tronco cerebral, e no córtex cerebral ocorre a percepção

da informação nociceptiva (BASBAUM et al., 2009). Entretanto, em um cenário de lesão, ocorre um fenômeno chamado facilitação descendente, o qual pode inibir a descarga de neurônios nociceptivos de projeção através da inibição de interneurônios excitatórios ou estimulação de neurônios inibitórios. As sinapses com terminais de aferentes primários reduzem a liberação de glutamato, aspartato e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, ao passo que os opioides inibem a descarga dos neurônios GABAérgicos inibitórios (PISERA, 2005; DREWES, 2006).

O dano tecidual é acompanhado da liberação de fatores endógenos pelos nociceptores ou células não neurais como mastócitos, basófilos, linfócitos, macrófagos, plaquetas, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, também chamados de ‘sopa inflamatória’, as quais liberam substâncias vasoativas que sensibilizam os nociceptores, que reconhecem e respondem esses agentes pró-inflamatórios. A liberação de substância algogênicas e hipersensibilizadoras aumentam a excitabilidade das fibras nervosas aferentes, podendo resultar em alterações no corno dorsal (BASBAUM et al., 2009; BELL, 2018)

Com a estimulação intensa ou uma lesão sustentada, ocorre alteração na transmissão glutamatérgica, perda de controles inibitórios e interações neuronais gliais. Há a liberação de diversos neurotransmissores pelos nociceptores A δ e C no corno dorsal da medula espinal, tendo como consequência a ativação de uma série de vias de sinalização dependentes de cálcio e segundos mensageiros, aumentando a excitabilidade do neurônio de saída e facilitando a transmissão álgica ao cérebro. Além disso, a desinibição de interneurônios que expressam PKC γ excitatórios faz com que estímulos inócuos sejam percebidos como dolorosos, e a micróglia ativada pela lesão do nervo periférico, libera uma série de citocinas que contribuem ativamente para a sensibilização central e hiperalgesia (BASBAUM et al., 2009).

3.4 Classificação da dor

Quando nos referimos às classificações da dor, podemos classificá-la em dor fisiológica – ou nociceptiva – que conduz a respostas protetoras ao organismo, com o objetivo de manter a homeostase tissular; ou dor patológica, descrita como um estado doloroso prolongado e que envolve desconforto e sensibilidade anormal, exacerbando os efeitos da dor crônica (ALMEIDA, 2006; KLAUMANN, 2008; ALVES, 2017).

A dor patológica, por sua vez, pode ser classificada em dor inflamatória, que envolve estruturas somáticas ou viscerais, ou em dor neuropática, que envolve lesões do sistema nervoso. Caso a dor inflamatória não seja reparada, ocorre alterações a nível espinal e supraespinal, levando à dor neuropática, a qual pode apresentar modificações a nível central na estrutura e/ou função, quanto a nível periférico, com alterações no processamento e percepção de um estímulo nódico normal (MCKUNE et al., 2012; ALVES, 2017).

3.2 Dor Neuropática

A dor neuropática resulta de uma lesão direta ou disfunção dos axônios do sistema nervoso periférico e/ou central, caracterizada por uma dor crônica (LOESER; TREEDE, 2008), podendo ser contínua ou episódica, tendo como principais sintomas: formigamento, queimação, choque, espasmos ou frio (FINNERUP et al., 2005). Esta possui estimativa de incidência mundial que chega a 10%, embora alguns estudos afirmem que em 35% de todas as síndromes dolorosas há a presença de características neuropáticas (VAN et al., 2014).

Após a indução da lesão do nervo, ocorre disparos nervosos que podem se estender por tempo prolongado; liberação de neuropeptídeos e mediadores pró-inflamatórios no local da lesão e no sistema nervoso central (SNC); sensibilização de nociceptores e ativação de nociceptores silenciosos; mudanças nas expressões gênicas e de peptídeos; crescimento anormal de fibras nervosas centrais e periféricas; além de mudanças estruturais e funcionais em

fibras nervosas periféricas tanto lesionadas, quanto intactas (SAADE; JABBUR, 2008).

A dor neuropática pode ocorrer não somente pela lesão direta, como também indiretamente pelas moléculas produzidas pelas células gliais e células imune, tais como: prostaglandinas, glutamato, ácido araquidônico e óxido nítrico (NO). Há a liberação de citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL 1 β , IL-6, IL-10, quimiocina MCP-1, fatores neurotróficos, BDNF, GDNF, NGF e NT-3 (ROSTAMI et al., 2020). Essas moléculas podem influenciar na facilitação da transmissão excitatória e a ativação dos neurônios da medula espinal contribuindo para a iniciação de estados de dor neuropática (KLAUMANN et al., 2008).

Devido às sensibilizações periférica e central sustentadas no sistema nervoso, ocorrem modificações nas funções dos neurônios constituindo neurônios hiperresponsivos e contribuindo para a hipersensibilidade à dor (NETO, 2009). Além disso, são comuns alterações periféricas como disfunção motora, dormência, sensação anormal desagradável de dor (disestesia) e dor em resposta a estímulos inócuos (alodinia) (BARON et al., 2010).

Os tratamentos farmacológicos que são eficazes contra a dor neuropática, como os antidepressivos, anticonvulsivantes e opioides, possuem eficácia moderada e a ascensão das doses é limitada, devido aos efeitos colaterais (HENNEMANN-KRAUSE et al., 2016). Além disso, a resposta individual dos pacientes torna o tratamento da dor neuropática desafiador, levando à necessidade de uma abordagem multifatorial, que inclui terapias farmacológicas e não farmacológicas (BARON et al., 2010).

2.2.1. Estresse oxidativo

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio são importantes para a funcionalidade normal das células, no entanto, quando produzidas em excesso e, portanto, em um meio desfavorável entre agentes antioxidantes e pró-

oxidantes, ocorre o estresse oxidativo. Esse desequilíbrio gera danos severos em macromoléculas que são essenciais para o funcionamento orgânico das células. Esse desequilíbrio influencia no desenvolvimento de diversas doenças e no seu agravamento, como: artrite reumatoide, aterosclerose, diabetes, obesidade, hipertensão arterial sistêmica, infecção viral respiratória, e doenças neurodegenerativas (VELLOSA et al., 2021).

O organismo conta com um sistema antioxidante, enzimático (via endógena) e não enzimático (via exógena) para equilibrar os danos que são causados pelo estresse oxidativo. Pode-se destacar, dentre os compostos antioxidantes endógenos, as enzimas: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione oxidase (GO), peroxirredoxinas (Prxs) e catalase (HE et al., 2017).

A SOD catalisa a dismutação de duas moléculas de O₂ em oxigênio e peróxido de hidrogênio e este, quando não eliminado do organismo pelas enzimas peroxidases e catalase, pode gerar radicais hidroxila. As SODs são metaloenzimas que desempenham papel fundamental no sistema de defesa antioxidante e ela ocorre em três formas moleculares: Mn, Fe ou Cu/Zn (BARREIROS et al., 2006). Além de possuir papel fundamental na inibição do processo de formação de peroxinitrito e disfunções na mitôndria e no endotélio (FUKAI et al., 2011).

A GO, enzima FAD-dependente e a GPx catalisam a oxidação de GSH à GSSG, sendo esta última responsável pela ação oxidante consoante à ligação dissulfeto em sua estrutura. Isso explica a importância da atividade da GRd, pois ela recupera a GSH, permitindo um equilíbrio saudável entre os sistemas de defesa enzimáticos e a manutenção da integralidade celular (BARBOSA et al., 2010). Em um estudo, as enzimas GPx apresentaram papel protetor do estresse oxidativo no cérebro, por meio da eliminação dos radicais livres e das espécies reativas de nitrogênio (CARDOSO et al., 2016; VELLOSA et al., 2021).

Além disso, Cardoso et al. (2016) relataram papel fundamental do selênio na expressão e na atividade do GPx4, diminuindo a perda neuronal e o risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Estudos *in vivo* demonstraram que na deficiência de selenoproteínas, enzimas GPx4 apresentaram atividade reduzida em decorrência da incorporação de Cys em vez de Sec, induzindo à ferroptose e implicando negativamente na defesa antioxidante.

As Prxs fazem parte de uma família de tióis-peroxidases que são essenciais na manutenção da homeostasia redox e, assim como a CAT e GPx, controlam o acúmulo de peróxido de hidrogênio no organismo. Além disso, as Prxs participam de diversos processos biológicos de grande importância, como controle do ciclo celular e proteção do DNA às mutações provocado pelo estresse oxidativo (CAO et al., 2017). Possuem semelhança às chaperonas, pois em ambiente de estresse oxidativo protegem outras proteínas de danos (KIM et al., 2009).

A catalase (CAT) quebra duas moléculas de peróxido de hidrogênio em uma molécula de oxigênio e duas moléculas de água, ou seja, assim como o GPx, age impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio, o qual torna-se reativo em excesso, apesar de não ser um radical livre. Quando a CAT se encontra deficiente ou com mau funcionamento, a relação da patogenia de doenças como hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, Alzheimer, Parkinson, câncer, anemia, com esta deficiência torna-se comum. A CAT é encontrada em neurônios, astrócitos e oligodendócitos e possui relação com doenças degenerativas neurológicas e o envelhecimento (NANDI et al., 2019).

2.3. Modelo experimental de dor neuropática

2.3.1. Lesão Constrictiva Crônica (LCC)

Existem diversos modelos experimentais de dor neuropática que foram desenvolvidos ao longo dos anos com a finalidade de estudar diversas etiologias

e manifestações clínicas da dor neuropática, bem como para avaliar possíveis terapias para o desenvolvimento dela. Dentre os modelos de dor, pode-se dividi-los no estudo dos mecanismos periféricos, mecanismos centrais e mecanismos espinais da dor neuropática (SOUSA et al., 2016).

O modelo de neuropatia periférica pode ser induzido tanto por *Diabetes Mellitus* quanto por neuralgia pós-herpética; o modelo de neuropatia central, induzido por lesão na medula espinal; e o modelo de neuropatia espinal, induzido principalmente por ligadura de nervos espinais, lesão por constrição crônica (LCC), ligadura parcial/frouxa do nervo ciático, rizotomia, lesão poupadora de nervo (SNL), e lesão do nervo isquiático (SORKIN e YAKSH, 2009; KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009; SOUSA et al., 2016).

A lesão por constrição crônica do nervo isquiático (LCCI) descrita por Bennett & Xie (1988) vem sendo bastante utilizada devido à facilidade na execução da técnica, confiabilidade (BRIDGE et al., 1994) e por induzir alterações comportamentais nos roedores de hiperalgesia, alodinia e dor espontânea, semelhantes aos que ocorrem em humanos com dor neuropática (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009).



Figura 1: Ilustração esquemática das estruturas periféricas com a exposição dos danos nos nervos por trauma físico, e indicado por números os modelos experimentais de dor neuropática: (1) transecção do nervo ciático (WALL et al., 1979); (2) lesão por constrição crônica (BENNET e XIE, 1988); (3) ligadura parcial do nervo ciático (SELTZER et al., 1990); (4) modelo de lesão do nervo poupado (DECOSTERD e WOOLF, 2000); (5) ligadura dos nervos espinais L5/L6 (KIM; CHUNG, 1992); (6) constrição da raiz dorsal (TABO et al., 1999); (7) rizotomia dorsal (LOMBARD et al., 1979); (8) Rizotomia Ventral (LI et al., 2002).

Fonte: Adaptado de Klusakova e Dubovy (2009).

As principais respostas comportamentais pelos roedores nestes modelos são: lambadura excessiva, deslocamento do corpo para o lado oposto ao membro afetado, autotomia, como mecanismo de defesa, proteção do membro

lesionado, além de alodinia e hiperalgesia, ambas mecânica e térmica (BENNETT; XIE, 1988).

Quando ocorre uma lesão traumática no nervo periférico, há uma cascata de eventos bioquímicos e neuroquímicos que acarreta déficit mecânico, e a sua recuperação é proporcional à intensidade e à duração da compressão aplicada. Entretanto, a regeneração do mesmo também é influenciada por alguns fatores, sendo a intervenção terapêutica (farmacológica e não farmacológica) e a liberação de fatores neurotróficos os principais responsáveis. Ou seja, a capacidade de um neurônio regenerar-se depende diretamente de um microambiente favorável, o que contribui para a manutenção e o crescimento de neurônios e axônios saudáveis (BEZERRA, 2016).

2.4. Tratamentos da dor neuropática

2.4.1. Farmacológico

2.4.1.1. Gabapentina

O tratamento da dor neuropática é um desafio, pois poucas terapias estão disponíveis para a intervenção, e as que existem apresentam eficácia reduzida e inúmeros efeitos colaterais severos (BARON et al., 2009), como os opióides (LABIANCA et al., 2012; FINNERUP et al., 2015) e os antidepressivos tricíclicos (FORNASSARI, 2017).

A gabapentina, derivada do ácido gama-aminobutírico (GABA), possui atividade modulatória da excitação neuronal (FEHRENBACHER et al., 2003), reduzindo a liberação de glutamato e o influxo de cálcio no corno dorsal da medula espinal (JAGUSTYN & ROMANIAK, 2001; FENG et al., 2003). Isso explica os seus efeitos anti-hiperalgésicos, ansiolíticos e anticonvulsivantes (FIELD et al., 2000).

Em condições de dor neuropática, ocorre o aumento do número de canais de cálcio dependentes de voltagem, podendo sustentar uma neurotransmissão anormal na medula espinal (STAHL et al., 2013). Os gabapentinóides, por sua vez, possuem influência na redução do influxo de cálcio por se ligarem no canal de cálcio na subunidade $\alpha 2\text{-}\delta$, acarretando a diminuição da liberação de neurotransmissores, tais como noradrenalina, glutamato e substância P, nos terminais pré-sinápticos (TAYLOR, 2009; FORNASSARI, 2017).

Além disso, os gabapentinóides interagem com as vias descendentes noradrenérgica e serotoninérgica na medula espinal, indicando ação antinociceptiva (STAHL et al. 2013). Estudos da sua aplicação pós-operatória demonstram a efetividade na redução da dor e na diminuição da dose de opióides, reduzindo, conseqüentemente, os efeitos adversos (BRUHN et al. 2017). A Sociedade Americana de Anestesiologia (ASA) orienta o uso dos gabapentinóides de forma multimodal no controle da dor no pós-operatório, principalmente quando se trata de pacientes com alta tolerância à opióides (CHOU et al., 2016).

Em um modelo de constrição do nervo espinal (L5) em ratos, a gabapentina foi capaz de reverter a alodinia mecânica da pata traseira ipsilateral com três doses diferentes (30, 60 e 120 mg/kg/i.p.), apresentando efeitos anti-alodínicos consideráveis, com o aumento dos limiares de retirada da pata medidos por monofilamentos de Von Frey de 143, 206 e 180% em relação ao grupo *sham* (exposição do nervo e tratado com solução salina) (LABUDA et al., 2005).

Apesar de seus efeitos benéficos, deve-se salientar possíveis efeitos adversos, que são limitantes da dose utilizada. Dentre os efeitos colaterais mais citados na literatura estão: tontura, náusea e sonolência. Esses efeitos podem se dar devido às múltiplas doses dentro de 24h, que levam a picos e vales nos níveis de sua concentração plasmática (CHANG et al., 2014). Quando descontinuada abruptamente e em altas doses podem manifestar sintomas como

abstinência, agitação, palpitação e sudorese, devendo-se ser reduzida gradualmente (TRAN et al., 2005).

2.4.2. Não farmacológico

2.4.2.1. Acupuntura

A acupuntura é uma terapia não farmacológica advinda da MTC introduzida há vários milênios na China, e há cerca de 40 anos no Brasil (BRASIL, 2015). Constitui-se da inserção de agulhas em locais específicos e ricamente inervados, com vasos sanguíneos ou vasos linfáticos, nomeados de acupontos (FRY et al., 2014). Podem ser estimulados manualmente (agulhas específicas), por pressão (acupressão), subpressão (sangria), estimulação elétrica (eletroacupuntura) ou soluções (farmacopuntura) (PATIL et al., 2016; ONDREJOVICOVA et al., 2016).

Segundo Patil e colaboradores (2016), a terapia de acupuntura vem sendo utilizada amplamente para tratamento de diversas dores decorrentes de transtornos de ansiedade, dor emocional, dor de enxaqueca, dor de câncer, dor de parto, além de condições específicas como: anorexia nervosa, bexiga hiperativa, hipertrofia prostática benigna, psoríase e urticária crônica. Em 2006, foi homologada no Brasil a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), em que a acupuntura, juntamente à outras terapias integrativas, passaram a ter atenção primária à saúde, e não apenas alternativas (BRASIL, 2015).

A cultura chinesa define os acupontos empiricamente como aberturas ou orifícios na pele que possuem comunicação ou transporte, bem como definiu a teoria dos meridianos em vias condutoras de suporte à circulação de Qi (ou “chi”), fundamentais para a circulação de energia por todo o corpo (MORE et al., 2011). A MTC relaciona as funções mentais e físicas com meridianos que correspondem a vários órgãos específicos, e descreve o equilíbrio do Qi nos

conceitos de *Yin* (escuro, sinistro, oculto) e *Yang* (brilhante, aberto, saída), ou seja, duas forças de energia opostas que se complementam (PATIL et al., 2016)

O método é baseado na estimulação de acupontos de maneira precisa e controlada, em locais que possuem nervos e vasos sanguíneos (GOLDMAN et al., 2010). Após estimulados pela acupuntura manual, as fibras aferentes A-beta, A-delta e C são ativadas (ZHAO, 2008), há a transmissão do estímulo nervoso para a medula espinal, ativando o controle da dor e liberando neurotransmissores como endorfina, serotonina e encefalina que levam a um efeito anti-inflamatório e analgésico local (CABYOGLU et al., 2006; SCHOEN, 2006; STUX et al., 2003).

O efeito antinociceptivo se deve ao envolvimento da liberação de peptídeos opióides no sistema nervoso central em resposta à ativação de longa duração das vias sensoriais ascendentes durante a estimulação sensorial pela agulha (GOLDMAN et al., 2010). Ocorre a sinalização de diversas moléculas que medeiam a analgesia da acupuntura: peptídeos opióides, glutamato, CCK-8, receptores NMDA, AMPA e cainato, além de serotonina e noradrenalina (ZHAO, 2008).

A localização anatômica dos acupontos entre os humanos e os animais são análogas e, portanto, em estudos dos efeitos da acupuntura, são utilizados os mesmos pontos de acupuntura em animais (YIN et al., 2008). Após estimulação da acupuntura, é observado sensação de dormência, peso, dor ou distensão após, ao passo que o limiar nociceptivo aumenta gradualmente, instalando-se um efeito analgésico de longa duração, tanto em humanos, quanto em animais (ZHAO, 2008).

Devido ao fato de os efeitos adversos predominarem na utilização de medicamentos analgésicos opióides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), a terapia não farmacológica da MTC vem se tornando essencial e efetiva no tratamento da dor, adicionado à seguridade da sua aplicação, ser

pouco invasiva, ter baixo custo e índices baixos de efeitos colaterais (MORE et al., 2011).

2.4.2.2. Moxabustão

A moxabustão consiste na queima das ervas “*Artemisia sinensis*” e “*Artemisia vulgaris*”, as quais liberam uma fumaça que é absorvida pela pele, ativando receptores para o calor e/ou receptores polimodais (DENG; SHEN, 2013). Pode ser aplicada de forma direta sobre a pele, com cones de moxa, ou de forma indireta sem contato com a pele, utilizando bastões de moxa (TAFFAREL et al., 2009).

Os efeitos terapêuticos da moxabustão não se dão apenas pela temperatura sobre o acuponto, mas também pela fumaça emitida, odor e suas propriedades farmacológicas pela erva, além da radiação infravermelha (CHIU et al., 2013). Quando associada à terapia de acupuntura, há a potencialização do fluxo de Qi no sangue (HUANG; SHEU, 2013), redução da viscosidade do sangue e aumento do fluxo local, proporcionando alívio da dor (ERNEST, 2001).

Um estudo mostrou efeitos antiinflamatórios da fumaça da moxa na produção de NO usando células da linhagem *macrophage-like Raw 264.7* semelhantes a macrófagos de camundongo. A concentração inibitória de 50% da produção de NO induzida por lipopolissacarídeo pela fumaça da moxa foi menor que a concentração citotóxica de 50%. Portanto, a inibição de produção de NO pela fumaça da moxa é por uma provável inibição da eliminação de radicais, colaborando para um efeito anti-inflamatório (MATSUMOTO et al., 2005).

A temperatura ideal da queima da moxa varia conforme o tipo de dor que o indivíduo apresenta, alternando em temperaturas mais baixas ou mais altas (ZHOU, et al. 2017), e ativando determinados receptores (WANG et al., 2013). Zhou e colaboradores (2017) descobriram em seu estudo que os padrões do efeito analgésico da moxabustão relacionados à temperatura diferiram na dor

inflamatória crônica e na dor neuropática, tendo esta última apresentado efeitos analgésicos mais intensos com uma temperatura mais alta (47 °C ou 52 °C) quando comparada com temperaturas mais baixas (37 °C e 42 °C), pois trata-se de um modelo muito sensível ao estímulo mecânico, enquanto que o modelo de dor inflamatória é mais sensível ao estímulo térmico.

Todavia, há autores que relatam que a temperatura ótima tolerável e capaz de apresentar respostas terapêuticas é em um limiar superior a 43°C (WANG et al., 2013). À medida que, a distância segura para que não haja queimaduras da pele é entre 3 e 4 cm (XU et al., 2014).

Pouco de fala sobre os efeitos adversos (EAs) da moxabustão na literatura, mas Xu e seus colaboradores (2014) relatam em uma revisão um total de 64 casos EAs associados a essa terapia, os quais incluem: alergias, náuseas, infecção, queimaduras, tosse, vômito, carcinoma basocelular, nascimento prematuro e até mesmo morte. No entanto, o tempo de exposição à substância, presença de fumaça, ambiente, condições do paciente e habilidade do profissional podem influenciar na sua segurança.

2.4.2.3. Implantes em Acupontos

Os implantes em acupontos consistem na implantação de materiais em pontos de acupuntura, a fim de se obter um estímulo mais prolongado. Estes materiais podem ser de aço inoxidável, ouro, platina e fios de sutura absorvíveis (XIE & PREAST, 2007; CANTWELL, 2010). Os fios absorvíveis são menos utilizados, porém são mais acessíveis em vista do seu valor e da facilidade em adquiri-los (BARBOSA, 2015).

Atualmente o método de implante de fios absorvíveis é considerada uma terapia micro invasiva, podendo ser rapidamente finalizada e sem grandes dificuldades por um profissional treinado. É utilizada em diversas alterações: epilepsia, asma, obesidade, insônia, rinite alérgica, enterite crônica (WEN-

SHAN, 2012). Também é muito aplicada em doenças articulares degenerativas e dores crônicas (HAYASHI *et al.*, 2005).

Em um experimento foi observado efeito positivo na redução da espasticidade dos membros de ratos após acidente vascular cerebral (derrame), após a implantação do fio reabsorvível categut. Isso se deu por meio da regulação dos neurotransmissores, aumentando a expressão GABA_B e reduzindo a expressão de mGluR1 no tronco cerebral dos ratos (LIU *et al.*, 2014).

A literatura afirma que a combinação da terapia de implante em acupontos com as terapias convencionais acelera e intensifica o tratamento de certas doenças, como no caso de nefropatias causadas pela diabetes tipo 2 (CHEN *et al.*, 2012).

2.5. Especificidade dos acupontos

Segundo ZHAO e colaboradores (2012), existe uma especificidade e individualidade muito grande em cada ponto de acupuntura. O acuponto Zusanli (ST36), localizado a 3 cm abaixo da patela e 0,5 cm lateral à tibia, possui evidências de reduzir a dor neuropática causada por LCCI em ratos (HSU *et al.*, 2014), além de ser utilizado para o tratamento da dor aguda de nervo ciático e controlar desordens gastrointestinais quando estimulado (ZHAO *et al.*, 2012).

Outros dois acupontos utilizados são o Huantiao (VB 30), localizado na junção do 1/3 lateral e 2/3 medial da distância entre o grande trocanter do fêmur e as últimas vértebras sacrais, e o Yanglingquan (VB 34), localizado na depressão anterior e inferior à cabeça pequena da fíbula, em que, por meio da acupuntura, foi capaz de reduzir a nocicepção inflamatória em patas de ratos mediante os receptores canabinóides CB2 e com o aumento concomitante no local do nível de anandamida, medido por cromatografia líquida (CHEN *et al.*, 2009).

O acuponto Zusanli demonstrou efeito analgésico após ser estimulado pela técnica de acupuntura, em um estudo de DOMINGUES (2016). Houve redução do comportamento hiperálgico nos ratos após injeção de mediadores no acuponto Zusanli, como: acetilcolina e substância P, glutamato e serotonina, histamina e bradicinina. Assim como no modelo de constrição crônica do nervo isquiático, o qual houve redução da hiperalgesia neuropática após administração no acuponto de acetilcolina, serotonina, glutamato, bradicinina, histamina e substância P, evidenciando seus efeitos antinociceptivos (DOMINGUES, 2016).

2.6. Participação dos canais iônicos na recepção do estímulo mecânico

Os receptores TRPV1 são expressos nos gânglios da raiz dorsal e participam de diversos processos fisiológicos, principalmente inflamatórios e hiperálgicos, como ‘portões moleculares’ em sistemas sensoriais que traduzem estímulos físicos e químicos em potenciais de ação (HARGREAVES & RUPAREL, 2016). GOLDMAN e seus colaboradores (2010) sugeriram que há a participação de canais iônicos envolvidos na recepção do estímulo mecânico tais como canais vanilóides/potencial transitório, como TRPV1 e TRPV4, que estão relacionados com a liberação de ATP.

Em seus estudos, GOLDMAN e seus colaboradores (2010), demonstraram uma redução da expressão dos receptores TRPV1 no gânglio da raiz dorsal dos ratos com dor, sugerindo um possível mecanismo da acupuntura em reduzir a hiperalgesia inflamatória, neuropática e a sensibilização. Adicionado a isso, sugeriu-se que os receptores histamina, bradicinina tipo 1, 5-hidroxitriptamina, glutamato, substância P e acetilcolina muscarínico tipo 2 localizados no acuponto Zusanli, possuem papel no efeito anti-hiperalgésico da acupuntura nos modelos de dor inflamatório induzido por CFA (adjuvante completo de Freund), e dor neuropática induzida por LCCI.

O TRPV1 também é um termorreceptor e em altas temperaturas (> 43°C) pode ser ativado. A moxabustão quando se encontra a 46° ativa o TRPV1 e

induz o influxo de cálcio, portanto, a manifestação do efeito da moxabustão está intimamente relacionada com a ativação dos canais vaniloides. No entanto, são necessários mais estudos para compreender como a estimulação térmica inicia a cascata de sinalização e para ter conhecimento sobre outros possíveis membros da família dos receptores de potencial transitório (TRPs) (WANG *et al.*, 2013).

Os endocanabinóides são outro grupo de substâncias com capacidade antinociceptiva, porém, com poucos estudos sobre a sua relação com a acupuntura. Alguns trabalhos evidenciaram a ação antinociceptiva dos receptores canabinóides CB1 e CB2 após estímulo nocivo, por meio da ativação de estruturas supra-medulares envolvidas com o sistema descendente analgésico em que, no arcabouço neuronal, os canabinóides estão inseridos (MALAN *et al.*, 2001; HOHMANN *et al.*, 2005).

Em vista dessas evidências sobre a participação dos canais iônicos na recepção do estímulo mecânico e a sua relação com as técnicas da MTC, há a necessidade de pesquisas científicas para investigar tanto os efeitos antinociceptivos, antiinflamatórios e antioxidantes da estimulação de acupontos específicos no tratamento da dor neuropática, quanto na comparação de diferentes técnicas da MTC no modelo de neuropatia. Além disso, torna-se relevante o conhecimento científico, visto que terapias medicamentosas disponíveis atualmente trazem consigo efeitos adversos severos e de custo elevado, quando comparado às técnicas da MTC.

ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos serão apresentados em forma de artigo científico, o qual será submetido ao periódico *Plos One*. Desta forma, a formatação do manuscrito aqui apresentado seguirá as normas do periódico.

Artigo Oficial

Avaliação dos Efeitos da Acupuntura, Implantes em Acupontos e Moxabustão em um Modelo de Neuropatia Periférica Induzida pela Lesão em Nervo

Jéssica Natália Silva de Oliveira¹, Isabella Drummond Albertazzi¹, Raquel Vieira Niella¹, Álvaro José Chávez Silva¹, Janaina Maria Xavier Corrêa¹, Claire Souza da Costa Marques², Iago Oliveira², AnisCleide Oliveira², Maria Clara da Silva Galrao Cunha², Juneo freitas da Silva⁴, Poliana de Castro Melo³, e Mário Sérgio Lima de Lavor³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil

² Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil

³ Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil

⁴ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil.

* **Correspondência:** jeoliveira.rp25@gmail.com

Resumo

Acredita-se que a acupuntura, moxabustão e implantes em acupontos possam atuar na redução do estresse oxidativo, contribuindo para a neuroproteção. Objetivou-se investigar os efeitos antinociceptivos, antioxidantes e antiinflamatórios da estimulação dos acupontos VB30 (Huantiao), VB34 (Yanglingquan) e ST36 (Zusanli) dessas terapias na dor neuropática. Para isso, 60 ratos Wistar foram submetidos à lesão constritiva crônica (LCC) do nervo isquiático. Após LCC, foram divididos em sete grupos e receberam os seguintes tratamentos durante 28 dias após 7 dias da LCC: G1 (*Naive*) – Animais sem ligadura e sem tratamento; G2 (Controle Negativo) – Animais submetidos à exposição do nervo, porém sem a ligadura, tratados com 0,25 ml/kg/24q

solução salina; G3 (Controle Positivo) – Animais submetidos à ligadura do nervo e tratados com 0,25 ml/kg/24q solução salina; G4 (Gabapentina) – Tratados com 60 mg/kg/VO/24q de gabapentina; G5 (acupuntura) – Tratados com acupuntura com estimulação dos acupontos; G6 (moxabustão) – Tratados com moxabustão com a estimulação dos acupontos; G7 (implante em acupontos)– Tratados com implante de fio categute com estimulação dos acupontos. O limiar mecânico nociceptivo foi avaliado por analgesímetro, o efeito do tratamento sobre mediador inflamatório (IL-10), estresse oxidativo (SOD, GPx, CAT), microglial (IBA-1) e álgico (CXCR-4) foi avaliado por imunohistoquímica, e a quantificação da quantidade de catalase e superóxido dismutase pelo método de Bradford. Os tratamentos com acupuntura, moxabustão e implante com fio categute nos acupontos aumentaram o limiar nociceptivo mecânico após 15 minutos da aplicação da acupuntura, moxabustão e implante com fio categute nos acupontos VB30, VB34 e ST36, atenuou a alodinia e a hiperalgesia nos animais. Houve redução da ativação microglial, aumento do marcador anti-inflamatório, aumento da atividade antioxidante e redução do marcador álgico. Assim, esses resultados demonstraram que a acupuntura, moxabustão e implante em acupontos possuem ação antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante.

Palavras-chave: hiperalgesia; lesão nervosa, terapia complementar, espécies reativas de oxigênio.

Abstract

It is believed that acupuncture, moxibustion and acupoint implants may act in reducing oxidative stress, contributing to neuroprotection. The objective was to investigate the antinociceptive, antioxidant and anti-inflammatory effects of stimulation of the VB30 (Huantiao), VB34 (Yanglingquan) and ST36 (Zusanli) acupoints of these therapies in neuropathic pain. For this, 60 Wistar rats were submitted to chronic constrictive injury (CCL) of the sciatic nerve. After LCC, they were divided into seven groups and received the following treatments for 28 days after 7 days of LCC: G1 (Naive) – Animals without ligature and without treatment; G2 (Negative Control) – Animals submitted to nerve exposure, but without ligation, treated with 0.25 ml/kg/24q saline solution; G3 (Positive Control) – Animals submitted to nerve ligation and treated with 0.25 ml/kg/24q saline solution; G4 (Gabapentin) – Treated with 60 mg/kg/VO/24q of gabapentin; G5 (acupuncture) – Treated with acupuncture with stimulation of acupoints; G6 (moxibustion) – Treated with moxibustion with acupoint stimulation; G7 (implant in acupoints) – Treated with implantation of catgut wire with stimulation of the acupoints. The mechanical nociceptive threshold was evaluated by analgesimeter, the effect of treatment on inflammatory mediator (IL-10), oxidative stress (SOD, GPx, CAT), microglial (IBA-1) and pain (CXCR-4) was evaluated by immunohistochemistry, and quantification of the amount of catalase and superoxide dismutase by the Bradford method. The treatments with acupuncture, moxibustion and implantation with catgut wire in the acupoints increased the mechanical nociceptive threshold after 15 minutes of the application of acupuncture, moxibustion and implant with catgut wire in the acupoints VB30, VB34 and ST36, attenuated allodynia and hyperalgesia in the animals. There was a reduction in microglial activation, an increase in the anti-inflammatory marker, an increase in antioxidant activity and a reduction in the pain marker. Thus, these results demonstrated that acupuncture, moxibustion and implantation in acupoints have antinociceptive, anti-

inflammatory and antioxidant action.

Keywords: hyperalgesia; nerve injury, complementary therapy, reactive oxygen species.

1. Introdução

A dor neuropática decorre de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial, o qual apresenta alterações sintomatológicas de hiperalgesia e alodinia (GUIDA et al., 2020). É uma condição de alta prevalência no mundo todo, com taxa de aproximadamente 6,9% a 10% (HECKE et al., 2014), porém, possivelmente há uma subestimação da real prevalência da neuropatia periférica, uma vez que não há um critério padronizado de diagnóstico para a mesma (UDALL et al., 2019).

O requerimento por terapias complementares e alternativas crescem cada vez mais mediante a baixa adesão e efeitos adversos da terapia farmacológica no tratamento da dor neuropática (SANNA et al., 2019; COLLOCA et al., 2017). As terapias da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) tem demonstrado efetividade e segurança no tratamento de diversas doenças (ZHAO et al. 2012).

Evidências científicas demonstraram que a ativação microglial após lesão do nervo periférico contribui para o desenvolvimento da dor (WANG et al., 2018), acarretando diversas alterações, como estresse oxidativo e processo inflamatório. A liberação de fatores neurotróficos, citocinas pró-inflamatórias no corno dorsal da medula espinal e cérebro contribuem para o estabelecimento e manutenção da dor (WANG et al., 2016).

Foi observado por Lai e colaboradores (2020) o aumento da atividade dos efeitos antioxidantes, anti-inflamatório e imunoestimulante da estimulação do acuponto ST36 pela acupuntura. A eletroacupuntura demonstrou inibição das células gliais e astrócitos na medula espinal e aumento da interleucina-10, inibindo a proteína quinase ativada por mitógeno P38, e mediando os efeitos analgésicos da eletroacupuntura (CHEN et al., 2020).

Além de estudos com a moxabustão, em que Zhou e colaboradores (2017) constataram efeitos antiinflamatórios e analgésicos da terapia, por meio da estimulação do acuponto ST36 em temperaturas mais elevadas entre 47°C e

52°C; enquanto que Hu e colaboradores (2018) demonstraram, através da estimulação dos acupontos VB30 e ST36 regeneração do nervo ciático e recuperação funcional através da moxabustão e eletroacupuntura.

Ainda encontra-se em escassez pesquisas científicas com o tratamento com implantes de fio categute e os seus mecanismos na neuropatia periférica. Há uma superioridade desta terapia nos tratamentos de dor epigástrica, obesidade, dor abdominal, lombalgia, epilepsia, asma, paralisia facial, psoríase, dor nas pernas e blefaroplastia, segundo Zhang e colaboradores (2012).

Algumas pesquisas demonstram que a estimulação nervosa pela implantação do fio categute tem capacidade de induzir a ativação e extravasamento de leucócitos, envolvendo mecanismos de regulação nervosa, estresse oxidativo, vias de sinalização e restauração da estrutura (IGNATOV et al., 2020).

Diante desse contexto, acredita-se que a acupuntura, moxabustão e implantes em acupontos possam atuar na redução do estresse oxidativo, contribuindo para a neuroproteção. Esse estudo tem como objetivo investigar os efeitos antinociceptivos, antioxidantes e antiinflamatórios da estimulação dos acupontos VB30 (Huantiao), VB34 (Yanglingquan) e ST36 (Zusanli) dessas terapias a nível espinal em um modelo de lesão neuropática induzida por lesão crônica constritiva em ratos. Nossa hipótese foi que o tratamento com as terapias da MTC, após estabelecimento da neuropatia, seria capaz de aumentar o limiar mecânico de retirada, promovendo diminuição da hiperalgesia, e efeito antiinflamatório e antioxidante.

2. Materiais e Métodos

Declaração de ética

O estudo foi realizado após a obtenção da aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz -

UESC, Bahia, Brasil (protocolo 033/20), e de acordo com as diretrizes sobre cuidados e uso de animais de laboratório, expedido pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal do Brasil.

Animais

Foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com aproximadamente 200 g de peso e 45 dias de vida, provenientes da Estação de Recria e Manutenção de Animais de Laboratório da UESC. Os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação do Hospital Veterinário da UESC em caixas de polipropileno forradas com maravalha em ambiente com temperatura controlada (22° C) e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), recebendo ração comercial (Nuvilab®) e água ad libitum.

Os animais foram submetidos a um período de adaptação experimental durante uma semana com o intuito de uniformizar todas as condições ambientais e alimentares de modo a não interferir nos resultados da pesquisa. Após o período de adaptação pré-experimental, os animais passaram por uma avaliação basal do limiar nociceptivo mecânico com o analgesímetro digital (EFF-301, Insight Equipamentos).

Lesão Constrictiva Crônica do nervo isquiático (LCC)

Para indução de dor neuropática, adotou-se o modelo de lesão constrictiva crônica (LCC) do nervo isquiático descrito por Bennet e Xie (1988). Todos os animais foram submetidos a anestesia geral inalatória com sevoflurano (Sevoflurano 1 mg/mL, Cristália), com exceção do grupo *naive*, em concentração inicial de 4 V% para indução anestésica, seguida de 2,5 V% durante a manutenção anestésica, em um sistema semi-aberto, avalvular, com fluxo de 200 ml/kg/min, e fração de oxigênio inspirado de 0,6. Todos os animais receberam cefalotina sódica (Ceflen®, Agila Especialidades

Farmacêuticas Ltda, Brasil) na dose de 60 mg/kg/SC como antibioticoterapia profilática.

Após a tricotomia da região glútea do membro posterior direito e antissepsia com iodopovidona e álcool 70%, foi feita uma incisão na região glútea, a musculatura entre o íliaco e o músculo glúteo foi divulsionada e o nervo isquiático exposto (figura 1-A). Foram realizadas três ligaduras no nervo isquiático com fio de poliamida (5-0) (figura 1-B) e, em seguida, a musculatura foi aproximada com sutura com fio de poliamida (3-0).

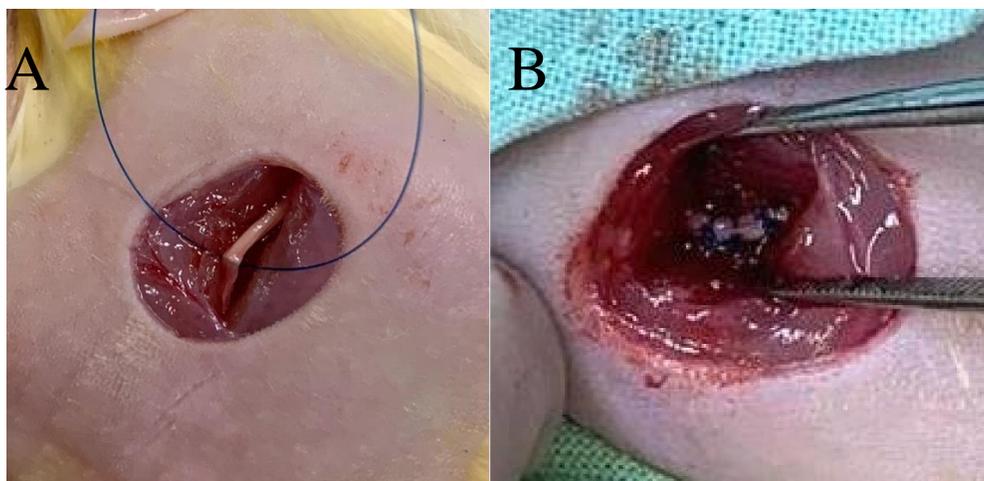


Figura 2: A- Exposição do nervo isquiático de um rato; B: Nervo isquiático após a realização de três ligaduras com fio de poliamida (5-0).

Avaliação do limiar nociceptivo mecânico

A avaliação do limiar mecânico nociceptivo foi feita através de analgesímetro digital (EFF-301, Insight Equipment) por método de pressão crescente. Os animais foram colocados em caixa de 10 cm x 10 cm equipadas com piso de malha metálica, 50 cm acima da bancada. Os animais foram colocados na caixa 30 minutos antes de iniciar o teste para ambientação. O limiar de retirada foi avaliado pela aplicação de forças variando de 0 a 50g com precisão de 0,2g. O estímulo aconteceu na área plantar média do membro posterior direito abaixo do piso da tela, através de uma ponta de plástico 0,7mm e o limiar de retirada foi

exibido automaticamente no equipamento. O limiar mecânico nociceptivo foi definido como a força mínima necessária para provocar reflexo de retirada da pata. Os movimentos voluntários associados à locomoção não foram considerados como resposta de retirada. Os estímulos foram aplicados em intervalos de 5s. As medidas foram repetidas 3 vezes e o valor final foi obtido pela média das 3 medições.

Design experimental

Após a mensuração dos valores basais referentes a estímulos mecânicos, seguida do procedimento cirúrgico, foi avaliado o desenvolvimento da neuropatia após sete dias com o analgesímetro digital.

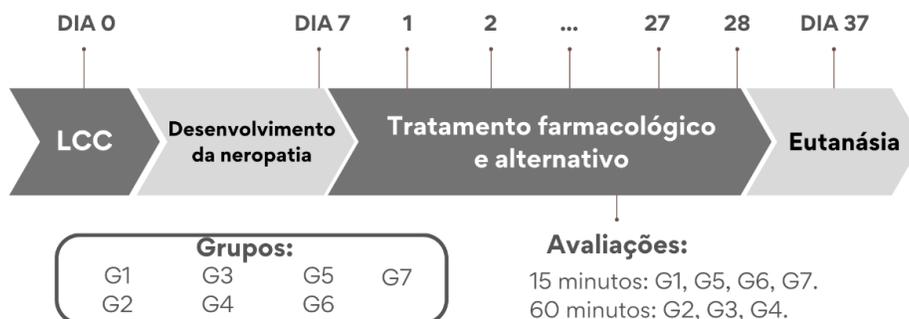


Figura 3: Esquema geral do modelo experimental e período das avaliações do limiar de retirada mecânica nos grupos: G1 (*naive*); G2 (controle negativo); G3 (controle positivo); G4 (gabapentina); G5 (acupuntura); G6 (moxabustão) e G7 (implantes em acupontos), iniciado no dia 1 da neuropatia e finalizado o dia 28; eutanásia 37° dia.

Após confirmação da neuropatia, foi iniciada a avaliação do limiar nociceptivo mecânico. Foi realizado 60 minutos após a administração do fármaco gabapentina e da administração da solução fisiológica, e 15 minutos após a aplicação da acupuntura, moxabustão, implante nos acupontos e no grupo *naive*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em sete grupos (n=10): G1 (*Naive*): Animais não foram submetidos à LCC e à tratamentos; G2 (Controle Negativo): Animais submetidos à exposição do nervo, mas sem a ligadura,

tratados com 0,25 ml/kg/24q solução salina; G3 (Controle Positivo): Animais submetidos à ligadura do nervo e tratados com 0,25 ml/kg/24q solução salina; G4 (Gabapentina): Tratados com 60 mg/kg/VO/24q de gabapentina; G5 (Acupuntura): Tratados com acupuntura com a estimulação dos acupontos VB 30, VB 34, e ST 36; G6 (Moxabustão): Tratados com moxabustão com a estimulação dos acupontos citados; G7 (Implantes em acupontos): Tratados com implante de fio *CatGut* com a estimulação dos acupontos citados.

Tratamento farmacológico

No grupo gabapentina foi administrado 60 mg/kg de gabapentina por via oral, 60 minutos antes da avaliação do limiar nociceptivo, por 28 dias consecutivos, a partir do 8º dia após a lesão do nervo isquiático. Os animais foram contidos cuidadosamente com as mãos para a administração do medicamento pela técnica de gavagem.

Tratamento não farmacológico

Acupuntura

No grupo de estimulação com acupuntura manual, foram utilizadas agulhas (DUX® Spring C) descartáveis esterilizadas com óxido de etileno (0,20 x 15 mm de diâmetro). Os animais foram contidos cuidadosamente manualmente, com os membros posteriores livres para a aplicação das agulhas nos acupontos “Huantiao” (VB 30, localizados na junção do 1/3 lateral e 2/3 medial da distância entre o grande trocânter do fêmur e as últimas vértebras sacrais), “Yanglingquan” (VB 34, localizado na depressão anterior e inferior à cabeça pequena da fíbula), e “Zusanli” (ST 36, localizado no joelho póstero-lateral dos membros posteriores, cerca de 2 mm abaixo da cabeça fibular) (SHAO et al., 2015), bilateralmente, à uma profundidade de aproximadamente 5 mm (figura 4), a partir do 8º dia após a lesão do nervo isquiático e a cada 2 dias (totalizando 10 sessões). Cada animal

foi colocado em uma caixa de acrílico durante 15 minutos antes da remoção das agulhas.



Figura 4: A- Localização dos acupontos ST 36 (Zusanli), VB 30 (Huantiao) e VB 34 (Yanglingquan) no membro posterior de um rato do grupo acupuntura (G5); B- animal após inserção das agulhas de aço inoxidável (DUX® Spring C) nos acupontos ST 36, VB 30 e VB 34 no membro posterior.

Moxabustão

No grupo de estimulação com moxabustão foram utilizados paus de moxa cigarete (Moxa Rolls - Dong Yang®) feita a partir da artemísia 100% natural (10 cm de altura e 1cm de diâmetro). Os animais foram contidos cuidadosamente sobre uma mesa em aço inox, com os membros posteriores livres para a aplicação dos paus de moxa queimados a uma distância de aproximadamente 3 cm (XU et al., 2014) nos acupontos “Huantiao” (VB 30), “Yanglingquan” (VB 34), e “Zusanli” (ST 36), bilateralmente, durante 5 minutos cada membro (figura 5), a partir do 8º dia após a lesão do nervo isquiático e a cada 2 dias (totalizando 10 sessões). (ZHOU et al., 2017).

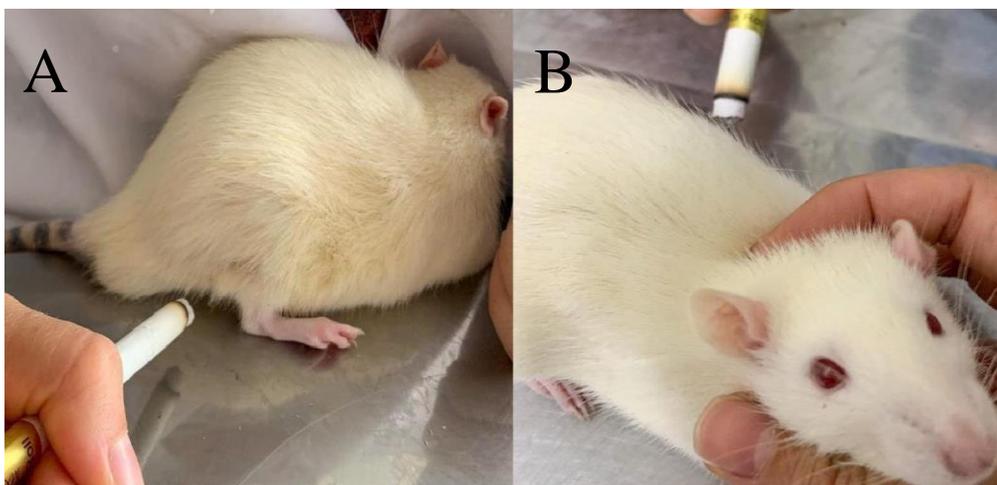


Figura 5: A e B- Aplicação do pau de moxa cigarette (Moxa Rolls - Dong Yang®) nos acupontos ST36 (Zusanli), VB30 (Huantiao) e VB34 (Yanglingquan) no membro posterior de um animal do grupo moxabustão (G6).

Implantes em acupontos

No grupo dos implantes em acupontos, foi utilizado um fio CatGut 2-0 (Procure ®) e implantado com o auxílio de uma agulha hipodérmica (0,80 x 30) e um catéter intravenoso (22G) nos acupontos “Huantiao”, “Yanglingquan”, e “Zusanli”, bilateralmente, previamente esterilizados com iodopovidona e álcool 70%, a 1 a 2 mm de profundidade do subcutâneo (figura 6) (YAN et al., 2012). Para tanto, os ratos foram anestesiados com gás sevoflurano (Sevoflurano 1 mg/mL, Cristália) em concentração inicial de 4 V% para indução anestésica, seguida de 2,5 V% durante a manutenção anestésica para a realização da implantação do fio *CatGut* 2-0 nos acupontos. Foi realizado no 8º dia após a lesão do nervo isquiático e uma única vez.

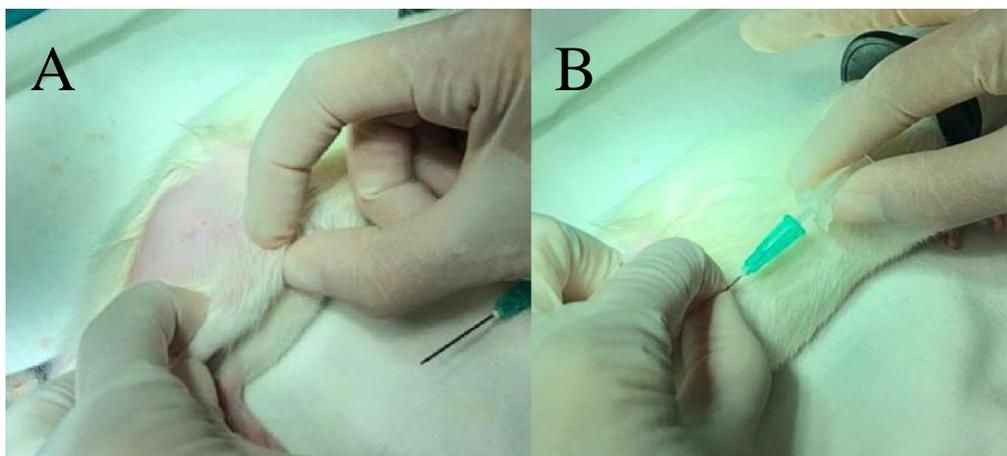


Figura 6: A e B- Aplicação dos implantes com fio CatGut 2-0 (Procare®) nos acupontos ST36 (Zusanli), VB30 (Huntiao) e VB34 (Yangliguan) no membro posterior de um animal anestesiado do grupo implante (G7).

Processamento tecidual e avaliação histopatológica

No 37º dia, todos os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico com propofol (Propofol® 1%, Bio Chimico®) na sobredose de 150 mg/kg e posteriormente coletada 9 mm da medula espinal da região lombosacral de todos os animais pelo método asséptico de hidropulsão descrita por Moghaddasi et al. (2007) e Lavor et al. (2015). Esse material foi dividido em dois cortes de 4,5 mm o qual metade foi armazenado no - 80 °C para atividade enzimática e a outra parte para a realização da técnica de imunistoquímica.

Imunistoquímica

Após coletar fragmentos de 4,5 cm da medula espinal e passar pela técnica rotineira de inclusão em parafina, cortes histológicos foram obtidos e montados em lâminas gelatinizadas. Posteriormente, foram submetidas à análise imunistoquímica utilizando anticorpos anti-IBA-1 (1:300, sc-32725, Santa Cruz Biotechnology®, CA, EUA), anti-CAT (1:200, sc-271803, Santa Cruz Biotechnology®, CA, EUA), anti-SOD (1:8000, sc-101523, Santa Cruz Biotecnologia, CA, EUA), anti-GPx (1:200, sc-133160, Santa Cruz

Biotechnology®, CA, EUA), anti-IL10 (1:2500, sc-365858, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), anti-CXCR-4 (1:200, sc-53534, Santa Cruz Biotechnology®, CA, EUA).

Foi utilizada a técnica do kit EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link) (Dako North America, Inc., ref. K8002, USA) (ANEXO B), e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C utilizando solução de ácido cítrico (P.M. 192,13) com pH 6,0, seguido de 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena e soro de bloqueio (EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link)).

As lâminas foram incubadas em câmara úmida overnight com o anticorpo primário, a incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 45 minutos e o bloqueio com estreptavidina peroxidase por 30 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) e por último, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por PBS (SILVA, 2014).

Foi realizada a avaliação quantitativa da expressão imunistoquímica dos anticorpos em estudo na medula espinal em seis animais/grupo e determinada a área de imunomarcção utilizando o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). Imagens de cinco regiões da medula espinal foram fotografadas em microscópio (Leica DM 2500) utilizando a câmara digital Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Alemanha). Para a análise, foram realizadas “color deconvolution” e “thresholding” das imagens. Os dados foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcção em pixels (SILVA, 2014).

Preparo do extrato bruto da amostra

As amostras armazenadas no ultrafreezer -80°C foram processadas adicionando tampão fosfato de potássio TFK (50 mM, pH 7,0), e posteriormente sonicadas (Cole-Parmer Ultrasonic Processador®) sob amplitude de 70% com 8 pulsos de 5 segundos (ON) e intervalos de 10 segundos (OFF) totalizando 40 segundos com amostras constantemente mantidas no gelo. Foram centrifugadas (Eppendorf®, Centrifuge 5417R) a 13400 rpm sob refrigeração (4°C) por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado novamente ao Ultrafreezer -80°C para posterior análise.

Quantificação de proteína pelo método de Bradford

A dosagem de proteína foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), baseado na reação de proteína com azul G Brilhante. Foi utilizada uma placa de Elisa colocando 150 μL de BSA 0,1mg/mL, 50 μL de TFK (50 mM, pH 7,0) e 40 μL de TFK com 10 μL da amostra (1:20), realizada em triplicata, seguido de 200 μL de Coomassie Blue G250 (Sigma B-0770). Após incubação por 15 minutos, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Paradigm-Multi-Mode Detection Platform) no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de diluição padrão de BSA a 0,1 mg/mL.

Quantificação da atividade da catalase

A dosagem da atividade da catalase (CAT) foi realizada de acordo com uma adaptação do método proposto por Aebi (1984), a partir do preparo do extrato bruto das amostras da medula espinal armazenadas no ultrafreezer -80°C . Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 1800 μL de solução TFK (50 mM, pH 7,0), calibrando o branco e adicionado 120 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (30 mM). A análise cinética foi iniciada após a adição do H_2O_2 e após 45 segundos de leitura foi adicionado 9 μL da amostra e a taxa de decomposição de H_2O_2 foi medida pelo espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Evolution 60)

a 240 nm durante 150 segundos, em intervalos de 15 segundos. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Quantificação de superóxido dismutase

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com uma adaptação do método proposto por Marklund e Marklund (1974), a partir do preparo do extrato bruto das amostras da medula espinal armazenadas no ultrafreezer -80°C. Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 1200 µL de solução TFK (50 mM, pH 7,0) e 32 µL de EDTA (50 mM), calibrando o branco e adicionado 154 µL de pirogalol (20 mM). A leitura cinética foi iniciada e foi registrado os valores de absorvância a cada 30 segundos durante 5 minutos, ocorrendo a auto-oxidação do pirogalol, medida pelo espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Evolution 60) a 420 nm. Após 5 minutos da leitura, adicionou-se 154 µL da amostra e leu-se a absorvância a cada 30 segundos até completar 10 minutos. Uma unidade (U) de SOD foi definida como a quantidade de enzima que pode inibir a auto-oxidação de 50% do pirogalol total na reação. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism Software versão 8.0.2. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Os dados do limiar nociceptivo mecânico foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni e para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student ou o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para múltiplas comparações de dados de imunocoloração. Os dados da atividade enzimática foram analisados verificando a normalidade dos resíduos pelo teste Bartlett'se os dados que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [$x = \text{Log}(y+1)$]. Os dados, então, foram submetidos à análise paramétrica. Aqueles que não seguiram a distribuição normal foram

analisados através do teste de Kruskal Wallis. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Efeitos da acupuntura, moxabustão e implantes nos acupontos sobre a hiperalgesia mecânica induzida por LCC no corno espinal em ratos

A LCC resultou no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral dos ratos após sete dias do procedimento cirúrgico, observado pela redução significativa do limiar nociceptivo mecânico nos animais do grupo controle positivo. Tanto a acupuntura, quanto a moxabustão e implantes nos acupontos ST36, VB 30 e VB 34 foram eficazes na redução da hiperalgesia mecânica nos animais com neuropatia periférica a partir do 5º dia de tratamento ($p < 0,0001$). (Figura 7).

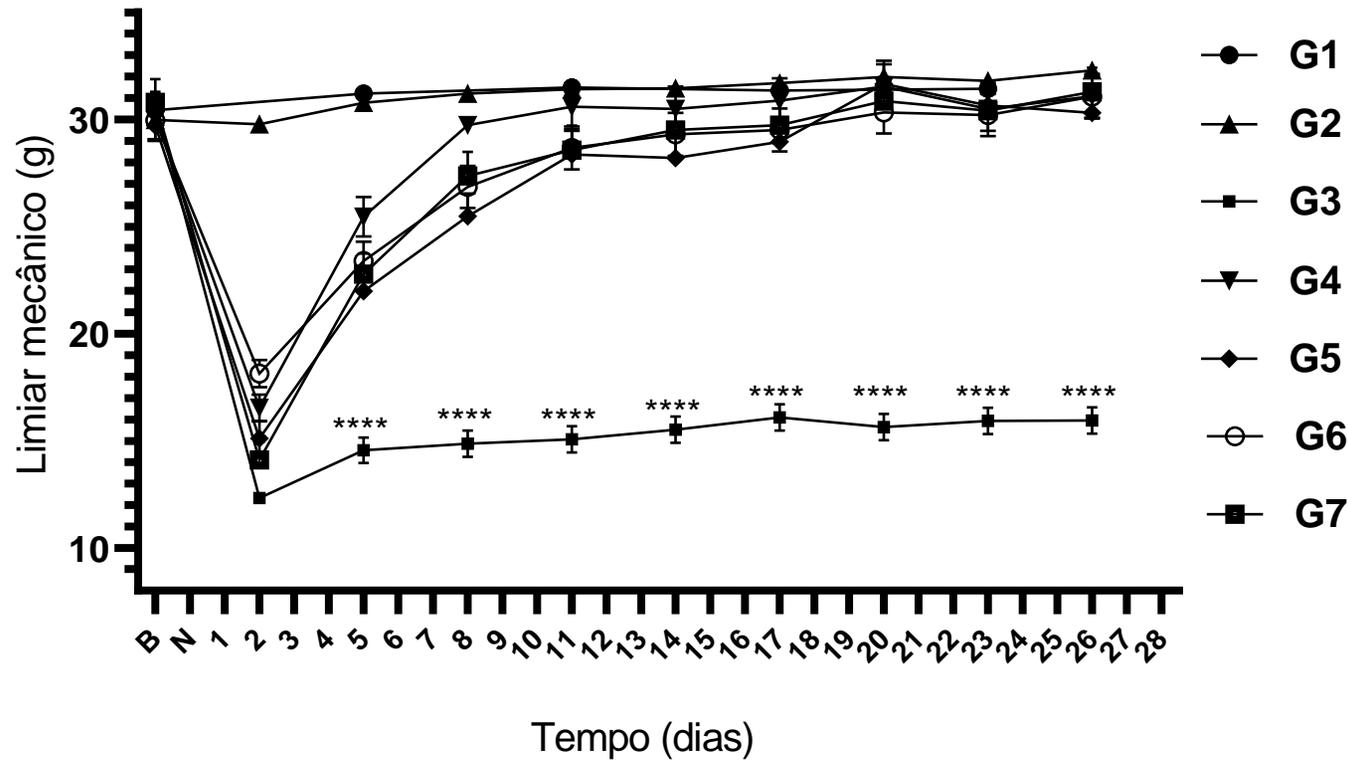


Figura 7 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico com analgesímetro digital, antes da indução da neuropatia (B: limiar basal), após LCC, com o estabelecimento da neuropatia periférica (N) e do dia 1 ao dia 28 com os tratamentos; realizada 60 minutos após a administração do fármaco gabapentina e da administração da solução fisiológica nos grupos controle positivo e controle negativo, e 15 minutos após a aplicação da acupuntura, moxabustão, implante nos acupontos. (●) representa o grupo G1 (*naive*); (▲) representa o grupo G2 (controle negativo); (■) representa o grupo G3 (controle positivo); (▼) representa o grupo G4 (gabapentina); (◆) representa o grupo G5 (acupuntura); (○) representa o grupo G6 (moxabustão); (□) representa o grupo G7 (implantes em acupontos). Foi utilizado análise de variância de duas vias seguida de teste post hoc de BonFeroni. As linhas verticais indicam média \pm S.E.M e os símbolos * para comparar com o grupo G3 (**** $p < 0,0001$); $n = 10$.

3.2 Comparação dos efeitos da acupuntura, moxabustão e implantes nos acupontos com o tratamento farmacológico gabapentina, sobre a hiperalgesia mecânica induzida por LCC no corno dorsal espinal em ratos

Os grupos acupuntura, moxabustão e implantes em acupontos não apresentaram diferença significativa entre si ao final do tratamento ($p>0,05$). Entretanto, apresentaram diferença significativa com o grupo gabapentina (G5 e G7, $p<0,0001$ e G6, $p=0,0016$) (Figura 8).

Ao final do tratamento os limiares nociceptivos mecânicos (média \pm erro padrão médio) obtidos foram $31,15\pm 1,04$ (G4); $30,43\pm 1,06$ (G5); $31,67\pm 0,98$ (G6) e $31,32\pm 1,12$ (G7). O aumento do limiar nociceptivo mecânico em relação ao basal observado foi de 188,96% (G4); 163% (G5); 202,77% (G6) e 181,14% (Figura 8).

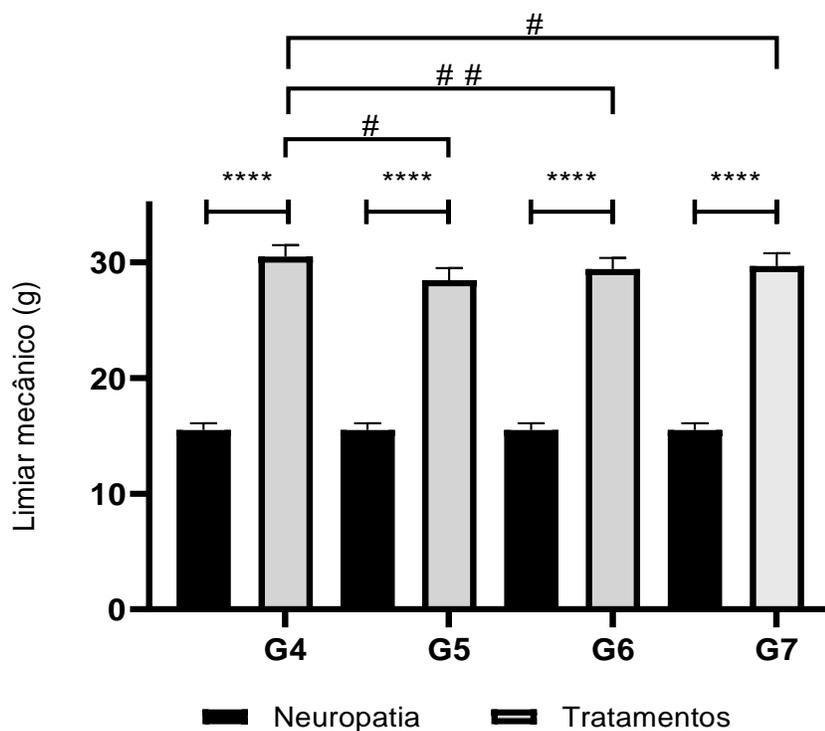


Figura 8: Eficácia dos tratamentos dos grupos: G4 (gabapentina), G5 (acupuntura), G6 (moxabustão) e G7 (implantes em acupontos). Média e erro padrão médio do limiar nociceptivo mecânico (LNM) dos ratos com neuropatia estabelecida e ao final dos tratamentos. (—) representa animais com neuropatia (G3) e (□) representa animais que receberam tratamento terapêutico (G4, G5, G6 e G7). Análise estatística usando ANOVA de duas vias, sendo **** $p < 0,0001$ para comparar com o grupo G3; e símbolos # $p < 0,0001$ e ## $p = 0,0016$, para comparar o grupo G4 com os grupos G5, G6 e G7; $n = 10$.

3.3 Perfil de expressão de mediadores antioxidantes

A partir da técnica de imunistoquímica, foi possível observar redução da expressão de SOD, CAT e GPx no grupo controle positivo, evidenciando menor expressão de células imunopositivas (Fig. 9, 10 e 11), com diferença significativa para os demais grupos

O tratamento com as terapias de acupuntura, moxabustão e implantes nos acupontos ST 36, VB 30 e VB 34 aumentaram significativamente a área de expressão de SOD, com $p < 0,0001$, apresentando valores semelhantes ao grupo G1 (Fig. 9-H). Tratando-se da atividade enzimática antioxidante endógena, foi observado aumento da porcentagem de SOD (Fig. 9-I) em todos os grupos de tratamento quando comparado ao grupo controle (100%), indicando redução do estresse oxidativo, com o aumento da atividade antioxidante em relação ao grupo controle positivo.

A expressão de CAT foi reduzida no grupo G3, demonstrando menor expressão de células imunopositivas (Fig. 10-H) em relação aos outros grupos. Todos os tratamentos demonstraram aumento significativo da área de expressão de CAT, com $p < 0,0001$. Tratando-se da atividade enzimática antioxidante endógena, foi observado aumento da porcentagem da atividade de CAT (Fig. 10-I) em todos os grupos de tratamento quando comparado ao grupo controle (100%), indicando redução do estresse oxidativo, com o aumento da atividade antioxidante em relação ao grupo controle positivo.

Com relação à CAT, houve 74%; 60%; 28% e 44% de atividade enzimática dos grupos G4, G5, G6 e G7, respectivamente, em relação ao grupo

G3. Enquanto à SOD, houve 35%; 92%; 111% e 131% de atividade enzimática dos grupos G4, G5, G6 e G7, respectivamente, em relação ao grupo G3.

Com relação ao GPx, houve redução significativa de células imunopositivas nos animais do grupo G3, indicando menor expressão do fator antioxidante após 28 dias de experimento (Fig. 11-H). Tanto o tratamento farmacológico, quanto os tratamentos não farmacológicos foram capazes de aumentar significativamente a expressão de GPx ($p < 0,0001$) (Fig. 11-H).

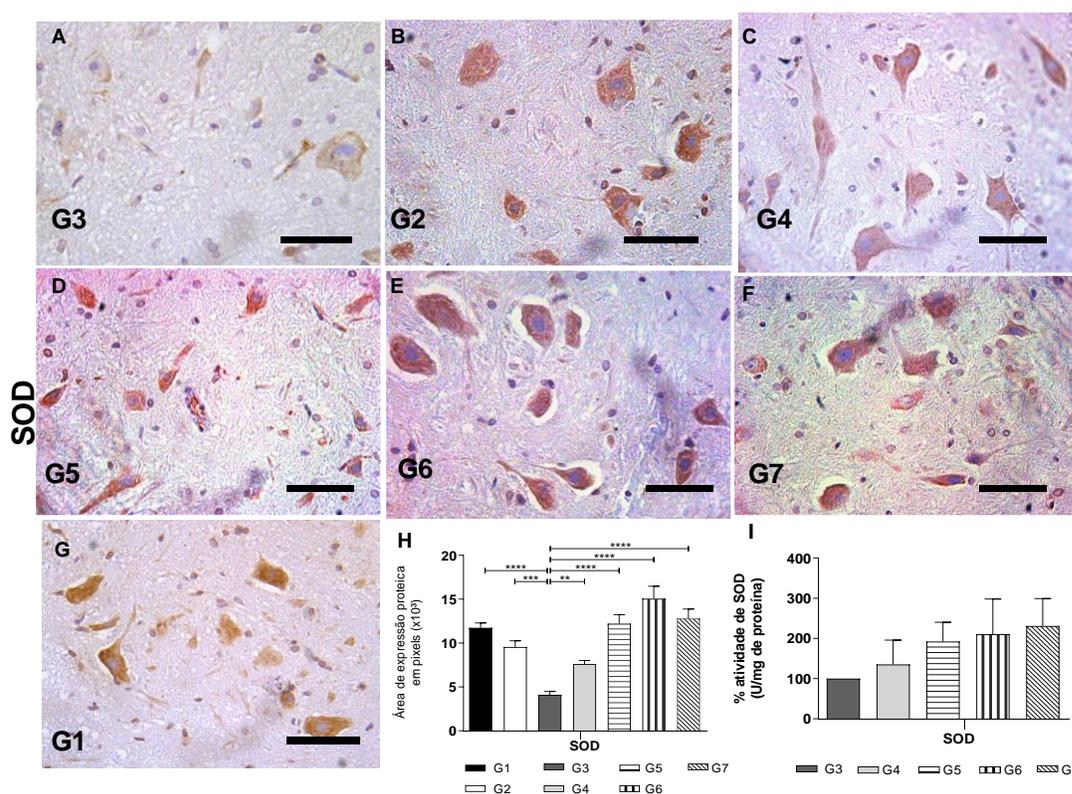


Figura 9: Expressão proteica de SOD (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica de SOD em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (*naive*). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de CAT (H). (Média \pm SEM; $n=6$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Atividade enzimática de SOD em ratos submetidos à LCCI associado ao tratamento com solução salina (G3); tratados com gabapentina 60 mg/kg (G4);

tratados com acupuntura (G5); tratados com moxabustão (G6); e tratados com implantes (G7), nos acupontos ST 36, VB 30 e VB 34 durante 28 dias (I). (Média \pm SEM; n=6).

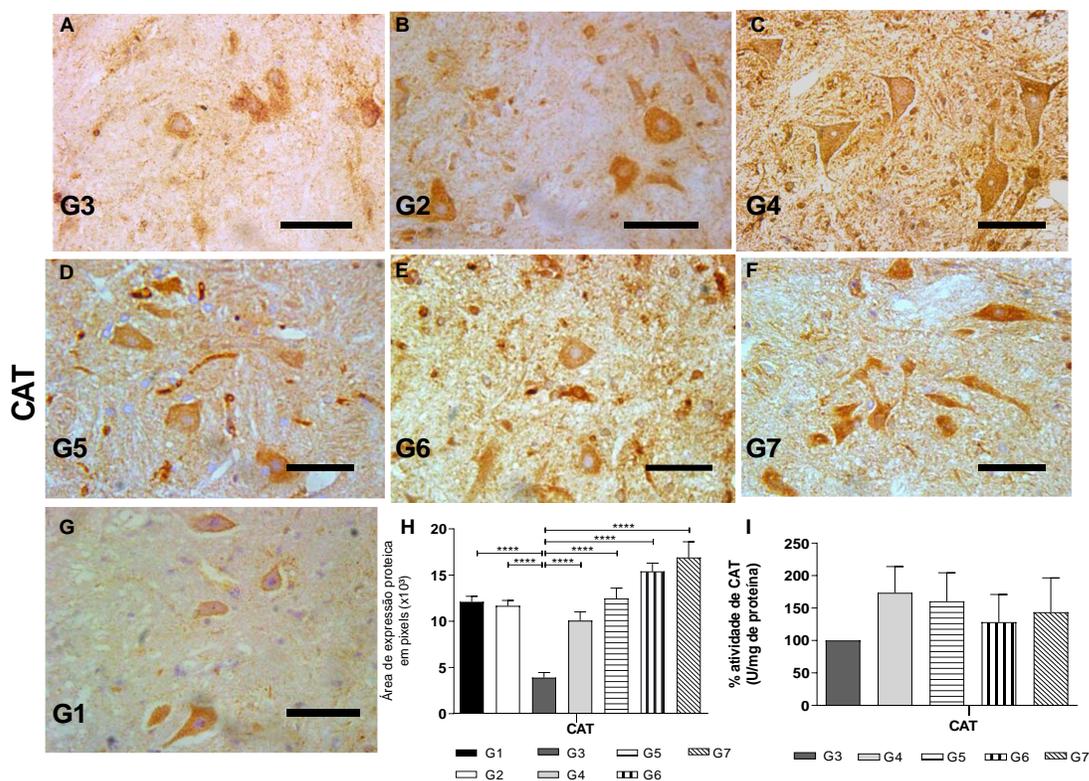


Figura 10: Expressão proteica de CAT (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunistoquímica de CAT em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (*naive*). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de CAT (H). (Média \pm SEM; n=6, ****p<0,0001). Atividade enzimática de CAT em ratos submetidos à LCCI associado ao tratamento com solução salina (G3); tratados com gabapentina 60 mg/kg (G4); tratados com acupuntura (G5); tratados com moxabustão (G6); e tratados com implantes (G7), nos acupontos ST 36, VB 30 e VB 34 durante 28 dias (I). (Média \pm SEM; n=6).

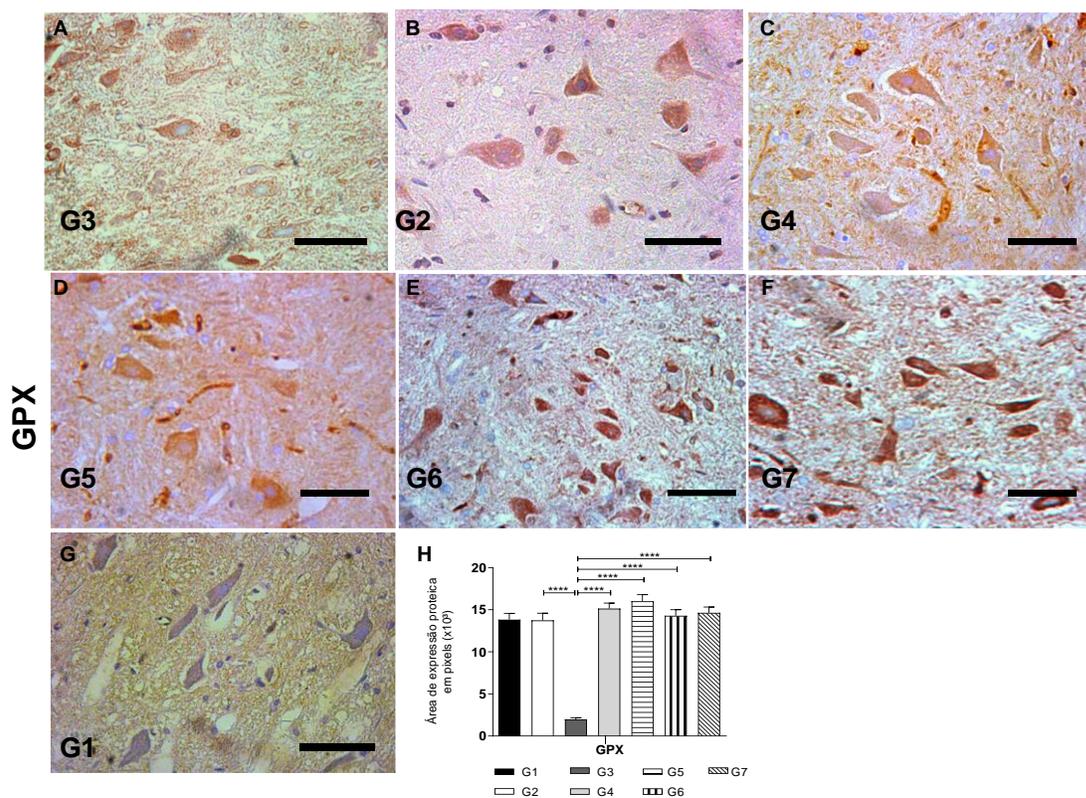


Figura 11: Expressão proteica de GPx (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunistoquímica de CAT em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (*naive*). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de CAT (H). (Média \pm SEM; n=6, ****p<0,0001).

3.4 Perfil de expressão de mediador inflamatório

Houve uma redução significativa da expressão proteica de IL-10 no corno dorsal da medula espinal de ratos com neuropatia periférica em comparação aos grupos de tratamentos ($p < 0,0001$) (Fig. 12-H). Todas as terapias foram eficazes em aumentar a imunomarcção durante 28 dias de tratamento.

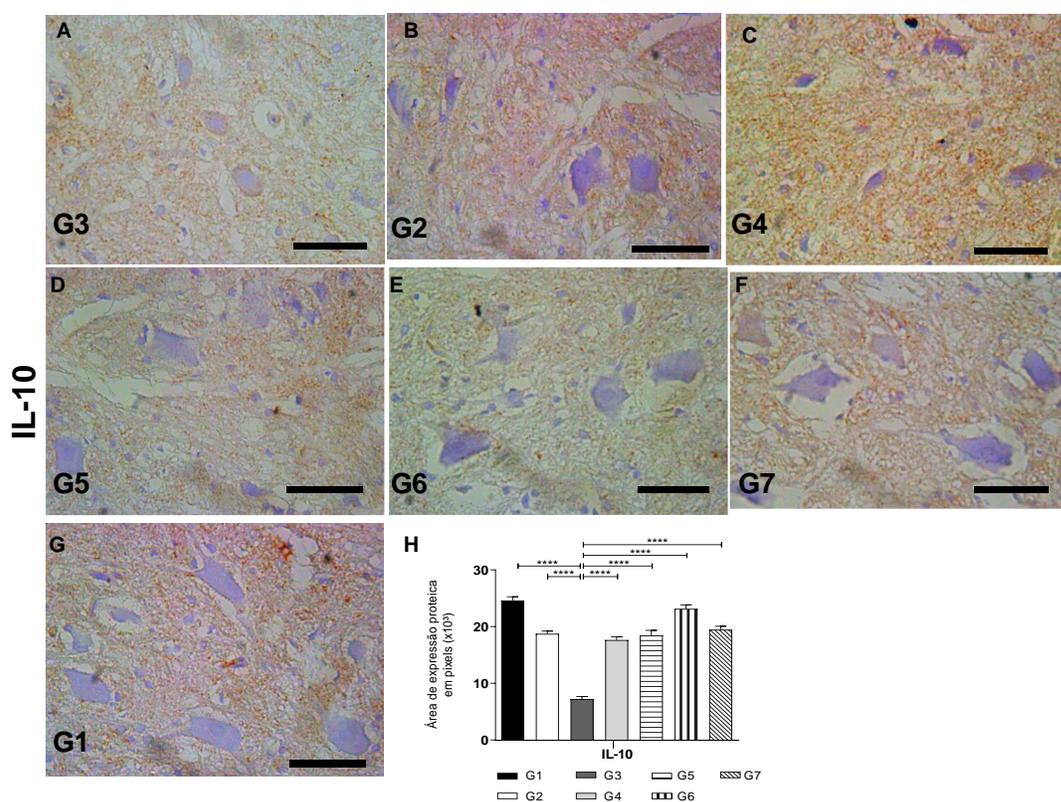


Figura 12: Expressão proteica de IL-10 (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunistoquímica de IL-10 em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (*naive*). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de IL-10 (H). (Média \pm SEM; n=6, ****p<0,0001).

3.5 Perfil de expressão de mediador de dor

Com relação à imunorreatividade para CXCR-4, foi observado um aumento significativo da expressão de CXCR-4 na medula espinal dos animais do grupo G3 (Fig. 13-H), comparado aos grupos G4, G5, G6 e G7 durante 28 dias de experimento ($p < 0,0001$). Constatou-se maior ativação de astrócitos e neurônios no corno dorsal da medula espinal em animais após LCC. (Fig. 13-H).

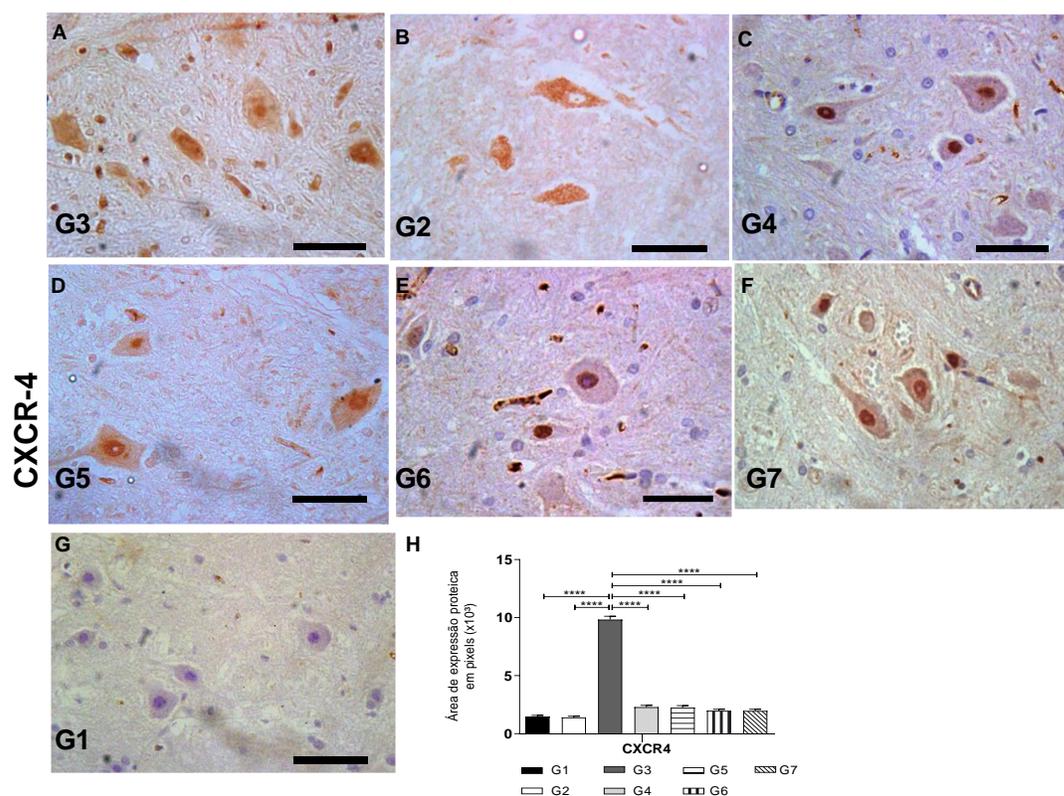


Figura 13: Expressão proteica de CXCR-4 (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica de CXCR4 em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (*naive*). Área de imunomarcagem em pixels da expressão medular de CXCR4 (H). (Média \pm SEM; n=6, **** $p < 0,0001$).

3.6 Efeitos da acupuntura, moxabustão e implantes nos acupontos na ativação microglial induzida por LCC no corno dorsal espinal em ratos

Houve imunorreatividade em todos os grupos experimentais para IBA-1 (Fig. 14). Foi observado aumento significativo da expressão de IBA-1 na medula dos animais do grupo G3 (Fig. 14-H), comparado aos grupos G4, G5, G6 e G7 durante 28 dias de experimento ($p < 0,0001$), indicando maior ativação microglial em animais com neuropatia estabelecida sem tratamento. Os tratamentos de acupuntura, moxabustão e implantes no acupontos ST 36, VB 30 e VB 34 diminuíram significativamente o número de micróglia quando comparado ao grupo G3 ($p < 0,0001$).

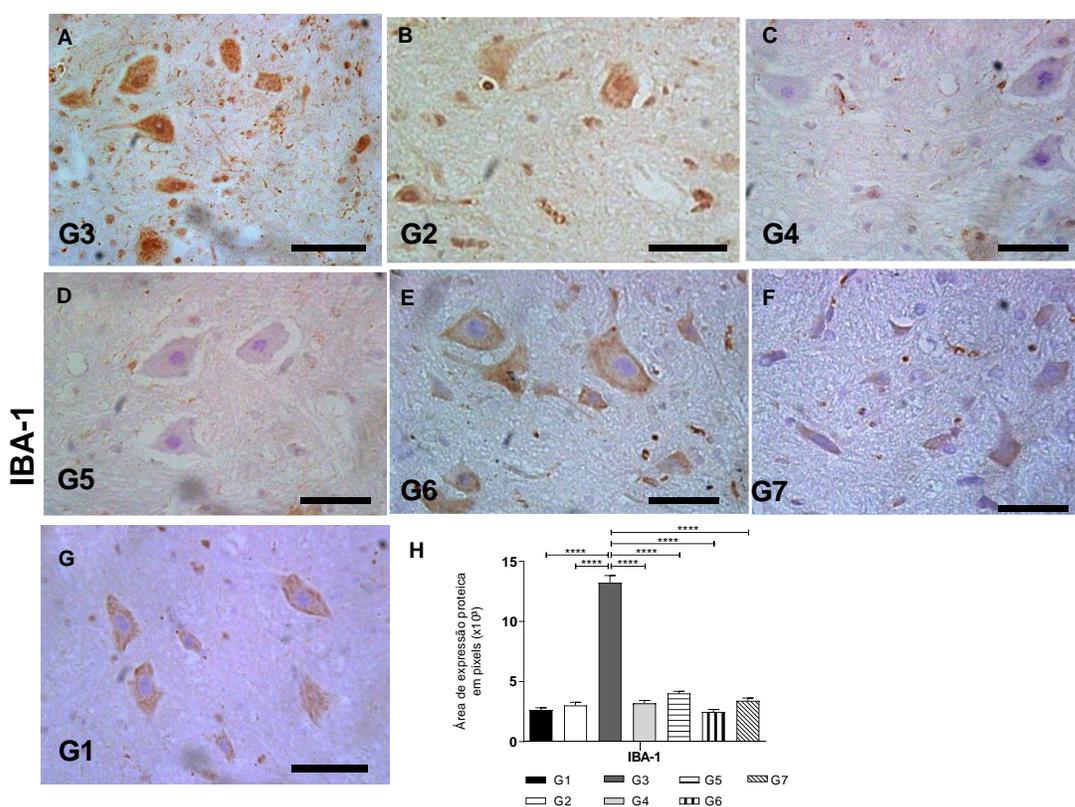


Figura 14: Expressão proteica de IBA-1 (A-G) na medula espinal de ratos. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). Fotomicrografias da expressão imunistoquímica de IBA-1 em (A) G3 (controle positivo); (B) G2 (controle negativo); (C) G4 (gabapentina); (D) G5 (acupuntura); (E) G6 (moxabustão); (F) G7 (implantes em acupontos); (G) G1 (*naive*). Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de IBA-1 (H). (Média \pm SEM; $n=6$, **** $p < 0,0001$).

4 Discussão

O tratamento com as terapias de acupuntura, moxabustão e implantes nos acupontos ST36 (Zusanli), VB30 (Huntiao) e VB34 (Yangligquan) foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica induzida pela LCC, a partir do dia 5, com efeito crescente até o final do tratamento, no dia 28. Em estudos anteriores também foi demonstrado efeito analgésico na dor neuropática com a terapia de acupuntura utilizando a combinação de acupontos (DIMITROVA, 2017; CHA et al, 2010; MOON-KYU, 2010; CIDRAL-FILHO et al, 2011), bem como a terapia de moxabustão (LI et al, 2019; HU et al. 2018; CHEN et al, 2005). Entretanto, ainda há grande escassez de estudos científicos referentes à terapia de implantes com fio catagute e o seu mecanismo no tratamento da neuropatia periférica (IGNATOV et al, 2020).

A associação de acupontos específicos intensificam os efeitos sinérgicos e reduzem os efeitos antagônicos, e a escolha da estimulação de cada acuponto dita o respectivo efeito decorrente no paciente (ZHENG et al., 2020). Assim como demonstrado no estudo de Moon-Kyu e colaboradores (2010), o nosso estudo mostrou efetividade na estimulação dos acupontos VB30 (Huntiao) e VB34 com acupuntura no controle da dor, reduzindo significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela LCC. Em um estudo similar, Cidral-Filho e colaboradores (2011) demonstraram efeito antinociceptivo dos acupontos ST36 e SP6 em modelo de ligadura do nervo espinal em ratos. No entanto, realizamos a estimulação manual com agulha bilateralmente, ou seja, ipsilateral e contralateral à cirurgia.

O acuponto ST36 também foi estimulado em um estudo comparativo do efeito analgésico da moxabustão em camundongos com dor inflamatória e dor neuropática (ZHOU et al., 2017), o qual inferem que, além do efeito analgésico também comprovado pelo acuponto em estudo, sua efetividade variou conforme a temperatura nos diferentes modelos de dor, tendo a dor neuropática um requerimento térmico maior (47°C e 52°C). Nosso estudo não avaliou a latência de retirada térmica, mas sim de retirada mecânica, pois o modelo

utilizado de lesão constrictiva do nervo isquiático é muito mais sensível ao estímulo mecânico ao estímulo térmico (RICHNER et al., 2011).

HU e colaboradores (2018) em seus achados demonstraram que a terapia de moxabustão e eletroacupuntura, através da estimulação dos acupontos VB 30 e ST36, promoveram regeneração do nervo ciático e recuperação funcional, sem diferença dos tratamentos entre si, podendo estar associado ao aumento da proliferação das células de Schwann e à regulação positiva do fator de crescimento nervoso. Aqui, também não encontramos diferença na efetividade entre os tipos de terapia da MTC na redução da hiperalgesia e alodinia mecânica nos animais com a estimulação dos acupontos VB30, ST36 e VB34.

Ainda com poucos estudos da terapia de implantes com *Catgut* no tratamento da dor neuropática periférica, alguns artigos científicos de revisão sistemática como de Han e colaboradores (2021) e Zhang e colaboradores (2021), investigaram a comparação da eficácia clínica e seguridade do implante de *Catgut* em diferentes acupontos guiado por ultrassom musculoesquelético no tratamento da dor ciática, e evidências da terapia de implantes de *Catgut* para dor ciática e seus possíveis efeitos adversos, respectivamente. O nosso estudo também avaliou a estimulação de diferentes acupontos com implantes de fio *Catgut* no tratamento da dor neuropática.

A estimulação dos acupontos VB30, VB34 e ST36 não foram constatados na literatura no tratamento com implantes da neuropatia periférica induzida pela lesão do nervo isquiático, tendo este estudo como pioneiro na investigação do tratamento com implantes nos acupontos citados, e uma possibilidade de tratamento alternativo ou associado à alopatia, podendo intensificar ou acelerar o tratamento de certas doenças, como no caso de nefropatias que são causadas pela diabetes do tipo 2 (CHEN et al., 2012).

A implantação do fio categut em pontos de acupuntura foi avaliado para tratamento da neuralgia do trigêmeo em ratos Wistar machos adultos, o

qual constatou-se a reparação da fibra do nervo trigêmeo e redução da dor no grupo de tratamento com implantes em acupontos, observando-se estimulação do metabolismo de células circunvizinhas, com possível crescimento e diferenciação de células-tronco, que pode estar relacionada com a expressão de citocinas neurogênicas (SUN, 2009).

Em uma revisão de literatura de ZHANG e colaboradores (2012), analisaram as superioridades da terapia de inclusão de catgut e os princípios de aplicação em acupontos nos últimos 40 anos, a qual verificaram como doenças dominantes para a terapia de implante de *Catgut* em acupontos: dor epigástrica, obesidade, epilepsia, asma, dor abdominal, paralisia facial, lombalgia, psoríase, dor nas pernas e blefaroplastia. Notadamente, encontra-se uma escassez de estudos na aplicação dessa terapia na área da dor neuropática, o que fundamenta a relevância do nosso estudo no campo científico.

Sabe-se que a recuperação da lesão do nervo periférico é um processo lento e que a regeneração neural e recuperação funcional dos neurônios demandam tempo no tratamento, o que torna a terapia de implantes em acupontos com fio cirúrgico absorvível uma escolha coerente, visto o prolongamento da estimulação do ponto de acupuntura, à medida que o fio é absorvido pelo organismo, tendo durabilidade de 35 a 60 dias (SAINI et al., 2016; IGNATOV et al, 2020). Esse fato justifica a duração do tratamento do experimento de 28 dias e da aplicação do implante com fio *Catgut* nos acupontos em uma única sessão.

Nosso estudo não associou as terapias da MTC, pois o objetivo foi avaliar os efeitos destas individualmente, porém com a associação de três acupontos, e comparar a sua efetividade no tratamento da neuropatia periférica em modelo de dor constritiva crônica do nervo isquiático. No entanto, sabe-se que a depender da condição do paciente e da circunstância clínica que se encontra, a associação de mais de uma terapia e com diferentes métodos em

cada uma delas pode ser mais benéfica quando comparada à uma terapia isolada (ZHENG, 2020).

Esse fato pode ser observado no estudo de Zheng e colaboradores (2017), em que a associação da acupuntura e moxabustão de gengibre no ponto afetado de Heding (EX-LE2) foi mais eficaz do que a terapia de acupuntura ou moxabustão no mesmo ponto de maneira isolada para tratamento de osteoartrite do joelho. Ou no estudo de Pu e colaboradores (2017), o qual demonstraram através da estimulação dos acupontos ST36 (Zusanli) e PC6 (Neiguan), diferentes efeitos clínicos no tratamento de vômitos e náuseas causados por quimioterapia, tendo uma taxa de controle completo e eficaz de vômitos agudos maior no grupo de eletroacupuntura e acupuntura quente associada com o grupo eletroacupuntura do que o grupo moxabustão de gengibre e grupo controle, com $p < 0,005$.

Preconizou-se a aplicação das terapias de forma bilateral, ou seja, não apenas ipsilateral ao local da cirurgia de LCC, como muitos estudos, mas também contralateral, no membro saudável. Cassu e colaboradores (2008) compararam o efeito analgésico da EA uni e bilateral em resposta a estímulos nociceptivos mecânicos e térmicos em cães. Foi observado maior intensidade, menor período de latência e maior duração da analgesia com a estimulação bilateral da EA, sugerindo um envolvimento do sistema endócrino, com aumento de serotonina e beta-endorfina, além da mediação da analgesia pela acupuntura através de opioides endógenos. Pode-se inferir que os efeitos analgésicos aqui apresentados podem ter sido influenciados pela terapia bilateral, tanto da acupuntura, quanto da moxabustão e implantes de categute nos acupontos VB30, VB34 e ST36.

A efetividade clínica da acupuntura manual, EA e moxabustão é proporcional à quantidade, intensidade e tempo do estímulo aplicado nos acupontos (ZHENG, 2020), podendo apresentar melhores efeitos no tratamento

de hérnia de disco lombar (CHEN et al., 2012), maior efetividade na regulação da expressão gênica (WANG et al., 2012), aumento do fluxo cerebral e redução do dano cerebral (ZHOU et al., 2011), melhora das condições de sono em ratos com abstinência à morfina (LI et al., 2011); que quando comparados aos grupos que receberam baixa intensidade, quantidade e tempo no estímulo aplicado não obtiveram resultados significativos.

Em nosso estudo, não foi comparado diferentes estímulos aplicados nos acupontos, porém, foi determinado um mínimo de 10 sessões, bilateral, a cada dois dias, para evitar possíveis lesões na pele, assim como Cidral-Filho e colaboradores (2011) em seu estudo com acupuntura manual em ratos submetidos à ligadura do nervo espinal. No entanto, nossas agulhas ficaram retidas por 15 minutos nos acupontos dos animais, 5 minutos a mais que no estudo anterior citado.

Seguimos o mesmo período de tratamento para moxabustão, com 10 sessões intervaladas a cada dois dias, bilateral, porém com duração de 10 minutos, para evitar possíveis graus de queimadura na pele, diferindo de alguns estudos de Zhou e colaboradores (2017), com sessão de 30 minutos em ratos submetidos à lesão do nervo poupado para avaliar o efeito analgésico de diferentes temperaturas; de Li e colaboradores (2019), com sessões que também duraram 4 semanas, porém realizadas uma vez ao dia, 15 e 30min/dia em um modelo de neuropatia periférica diabética em ratos para avaliar a neuroinflamação e os efeitos terapêuticos da moxabustão; e de Uryu e colaboradores (2007), que também perdurou 28 dias, entretanto, em dias alternados, com 14 sessões em um modelo de osteoartrite no joelho em ratos para avaliar o efeito analgésico de sessões repetidas da moxabustão.

Não foi observado nenhum efeito colateral nos grupos de tratamento neste estudo. Em uma revisão sistemática da literatura chinesa de Zhang e colaboradores (2010), os efeitos adversos relacionados à acupuntura foram,

principalmente, devido à técnica inadequada, o que gerou alterações a nível dermatológico (infecções), cardiovascular (lesões), hemorrágico (subaracnóidea; cerebral), além de desmaios. A moxabustão também tem relatos em uma revisão sistemática, porém em seis países diferentes, incluindo: alergias, queimaduras, infecção, náuseas e vômitos, alterações que também estão relacionadas com a técnica e à condição do paciente (XU et al., 2014). Com relação aos implantes, as reações adversas se dão pela incorporação de material de origem natural possuir má biocompatibilidade, podendo causar infecções (IGNATOV et al, 2020).

Ao final do tratamento, observou-se que as terapias da MTC obtiveram resultados semelhantes analgésicos que a gabapentina na dose de 60 mg/kg/v.o, também administrada por 28 dias, porém diariamente, quando comparados ao grupo controle positivo. Em estudo semelhante de Labuda e colaboradores (2005) em modelo de constrição do nervo espinal, a gabapentina apresentou maior aumento do limiar de retirada mecânica na dose de 60mg/kg/i.p quando comparada às doses de 30 e 120 mg/kg/i.p, com redução da hiperalgesia mecânica.

Apesar da gabapentina estar incluída como um dos fármacos de primeira escolha no manejo da dor neuropática, por ativar a inibição noradrenérgica descendente por meio da desinibição dos neurônios do locus coeruleus (YOSHIZUMI et al., 2012), administrações diárias e por longos períodos podem trazer efeitos adversos em pacientes que possuem limitações de seu uso (CHANG et al., 2014).

Interessante ressaltar que a estimulação dos acupontos pela acupuntura manual fornece aumento gradual do limiar nociceptivo, gerando um efeito analgésico de duração prolongada (ZHAO, 2008), bem como pelo implante com fio *Catgut*, sendo métodos alternativos para o tratamento da neuropatia, e uma solução para pacientes que possuem limitações farmacológicas, de

deslocamento ao médico e até mesmo financeiras, já que são métodos que apresentam baixo custo (IGNATOV et al, 2020).

Em nosso estudo foi observado que todos os grupos de tratamento foram capazes de diminuir a ativação microglial na medula espinal de ratos após LCC do nervo isquiático. Publicações anteriores demonstraram que a EA reduziu consideravelmente ($p < 0,005$) a atividade de microgliócitos e astrócitos na medula espinal lombar de ratos após duas semanas de intervenção, aliviando a hiperalgesia mecânica e térmica (WANG et al., 2018), e que a gabapentina reduziu as células microgliais, revertendo a hiperalgesia e alodinia em ratos (ZAJACZKOWSKA et al., 2022; ROSA et al., 2017).

Quando ocorre uma lesão no nervo periférico, substâncias químicas como substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, glutamato ativam células microgliais e astrócitos, que levam à hipertrofia, proliferação e à liberação de mediadores pró-inflamatórios, interleucinas e fatores de crescimento (HANSSON et al, 2006). Em nossos resultados, foi encontrado maior imunomarcção de anticorpos Iba-1 nas lâminas do grupo controle positivo, com células microgliais hipertrofiadas e com menos processos.

As terapias da MTC aqui estudadas podem ser consideradas potenciais tratamentos na neuropatia periférica em vista da sua capacidade de inativação microglial espinal. Segundo Chen e colaboradores (2020) a inativação da micróglia e dos astrócitos na medula espinal pode mediar os efeitos analgésicos tanto de forma imediata (pela inativação da micróglia), quanto prolongada (pela inativação de astrócitos). Na fase imediata a acupuntura suprime as vias MAPK e ERK, e na fase prolongada bloqueia a via de sinalização da JNK (CHEN et al., 2020).

A redução da expressão do marcador inflamatório IL-10 nos animais do grupo controle positivo decorreu do processo inflamatório após LCC (COLLOCA et al., 2017), que provocou hipersensibilização de neurônios na

medula espinal lesionada, com a ativação das vias de sinalização das MAPK e ERK (DETLOFF et al., 2008).

Em nosso estudo, as terapias da MTC foram capazes de aumentar a expressão de IL-10, bem como a terapia alopática com a gabapentina. O que corrobora com estudos anteriores que descreveram aumento da citocina antiinflamatória IL-10 em astrócitos, demonstrando efeito analgésico pela acupuntura e EA (CHEN et al., 2020; DAI et al., 2019), e regulação positiva de IL-10 e inibição de citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF-alfa e IL-1beta pela gabapentina, exercendo antinocicepção em ratos neuropáticos (ZAJACZKOWSKA et al., 2022; AHMAD et al., 2021).

Durante o estresse oxidativo, há um aumento da formação de radicais livres, elevação da transmissão sináptica de glutamato, ativação das células da glia, além da regulação positiva de genes relacionados à dor, eventos estes que estão intimamente relacionados à neurotoxicidade (ROSTAMI et al. 2020), o qual a ERO contribui para a ocorrência e a manutenção da dor neuropática (RIFFEL et al. 2018). Ademais, a resposta do sistema antioxidante encontra-se limitada, com redução da expressão e da atividade das enzimas como SOD, CAT e GPx (ALVARADO-SANCHEZ et al., 2019).

O aumento da imunomarcção de SOD, CAT e GPx e da expressão enzimática observada em CAT e SOD pelas terapias da MTC e terapia alopática com a gabapentina indicam presença da atividade antioxidante em meio a condições patológicas, aqui representada pela LCC do nervo isquiático. Nossos resultados estão em consonância à estudos anteriores que descrevem o aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e MDA pelas terapias de acupuntura (LAI et al., 2020; CHEN et al., 2016), e SOD, CAT, GSH, MDA e NO pela gabapentina, inferindo capacidade de redução do estresse oxidativo em ratos com LCC (MAGAR et al., 2018).

Porém, diferem dos resultados de Alvarado-Sanchez e colaboradores (2019), que não observaram alterações significativas na atividade das enzimas antioxidantes, o que se deve, provavelmente, pelo curto período de tratamento da terapia de EA, realizada 5 minutos da lesão medular traumática e com a eutanásia dos ratos 24h após lesão medular para realização dos testes bioquímicos.

A quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR-4 está presente em grande extensão no sistema nervoso, podendo modular a neurotransmissão, neurotoxicidade e interações entre células não neuronais do SNC (LI et al., 2008). Estudos anteriores têm demonstrado sua ativação em diversos tipos de dor (inflamatória, neuropatia diabética, dor por câncer ósseo, hiperalgesia induzida), além de estar envolvido na regulação e manutenção da dor neuropática (LIU et al., 2017).

O aumento da expressão de CXCR-4 em neurônios e astrócitos observado no grupo controle positivo é atribuído à lesão no nervo periférico e aumento da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias na micróglia, importante fator no desencadeamento da dor neuropática (LIU et al., 2019). Nossos resultados revelam que as terapias da MTC e a terapia alopática possuem potencial efeito analgésico, observado pela redução significativa da imunomarcação de CXCR-4 nos ratos após LCC do nervo isquiático, apresentando importante intervenção terapêutica na dor neuropática.

Ao comparar os resultados das terapias da MTC com os da terapia alopática obtidos nesse estudo às publicações científicas descritas anteriormente, fundamentamos a efetividade das terapias alternativas em um modelo de neuropatia periférica, ao passo que abrimos a possibilidade para a padronização de um novo protocolo para o tratamento da dor neuropática, visto que a associação de acupontos na acupuntura é um fator decisivo para um efeito sinérgico.

5 Conclusão

O tratamento com as terapias da Medicina Tradicional Chinesa aumentou o limiar nociceptivo mecânico eficazmente após 15 minutos da aplicação da acupuntura, moxabustão e implante com fio categute nos acupontos VB30, VB34 e ST36. Houve atenuação da alodinia e da hiperalgesia nos animais, com inibição da via CXCR4, redução da ativação microglial, aumento do marcador anti-inflamatório, e aumento da atividade antioxidante. Ainda que preliminares, nossos dados denotam para o potencial uso terapêutico da acupuntura, moxabustão e implante com fio categute nos acupontos VB30, VB34 e ST36 para o tratamento de pacientes com neuropatia periférica.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Isabela Drummond, Raquel Niella, Álvaro Chávez, Claire Marques, Iago Oliveira, AnisCleide Oliveira e Maria Galrao pela assistência em experimentos, Márcia Silva e Ivo Arouca, da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, pelo suporte técnico fornecidos. Ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Os autores não têm conflito de interesse a declarar.

Referências

- AHMAD, K. et al. Microglial IL-10 and β -endorphin expression mediates gabapentinoids antineuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 95, 344–361, 2021.
- ALMEIDA, T. P. *et al.* Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. *Veterinária em Foco*, v. 3, n. 2, p. 107-118, 2006
- ALVARADO-SANCHEZ, B. et al. Electroacupuncture and Curcumin Promote Oxidative Balance and Motor Function Recovery in Rats Following Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurochemical Research*. 44, pages 498–506, 2019.

ALVES, *et al.* Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. **Acta Biomedica Brasiliensia**. v 8, n. 1, 2017.

BARBOSA, B. R. C. **Melhora da qualidade de vida do paciente idoso com osteoartrose pela acupuntura**. Trabalho de conclusão de curso, graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

BARBOSA, K. *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.**, Campinas, 23(4):629-643, jul./ago., 2010.

BARON, R. Neuropathic pain: a clinical perspective. **Handb Exp Pharmacol**, n. 194, p. 3-30, 2009.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

BARREIROS *et al.* Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quím. Nova** 29 (1), 2006.

BASBAUM, A.I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, n. 139, p.267-284, 2009.

BAUTE, V. *et al.* Complementary and Alternative Medicine for Painful Peripheral Neuropathy. **Curr Treat Options Neurol**. 21, 44, 2019.

BENNET & XIE. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain** 1988;33:87-107.

BEZERRA, C. *et al.* Lesão do nervo isquiático e os aspectos regenerativos voltados ao fator de crescimento fibroblástico-2. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**. 2016 jan. /abr.;20(1):83-95

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPICUSUS / Ministério da Saúde**, 2ª Edição, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRIDGE, P. M. *et al.* Nerve crush injuries - a model for axonotmesis. **Exp Neurol**, v. 127, n. 2, p. 284-90, Jun 1994.

BRUHN, J. *et al.* Clinical application of perioperative multimodal analgesia. **Curr Opin Support Palliat Care**. 11:106-111, 2017.

CABYOGLU, M. T.; ERGENE, N.; TAN, U. The Mechanism of Acupuncture and Clinical Applications. **Int J Neurosci**. 116(2):115-25, 2006.

CANTWELL, S.L. Traditional chinese veterinary medicine: The mechanism and management of acupuncture for chronic pain. **Topics in Companion Animal Medicine**. v. 25, p. 53-58, 2010.

CAO, Z. et al. The Peroxiredoxin Family: An Unfolding Story. **Subcell Biochem**. 83:127-147, 2017.

CARDOSO, B. *et al.* Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration? **Molecular Psychiatry**. 2016; 22(3):328-335.

CASSU, R. et al. Electroacupuncture analgesia in dogs: is there a difference between uni- and bi-lateral stimulation? **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**. 35(1), 52–61, 2008.

CHA, M.H. et al. Antiallodynic effects of acupuncture in neuropathic rats. **Yonsei Med J**, v.47, p. 359–366, 2010.

CHANG, C. Y. et al. Gabapentin in Acute Postoperative Pain Management. **Hindawi Publishing Corporation**. Vol 2014, Article ID 631756, 7 pages, 2014.

CHEN, L. *et al.* Endogenous anandamide and cannabinoid receptor-2 contribute to electroacupuncture analgesia in rats. **The Journal of Pain**, v. 10, p. 732-739, 2009.

CHEN, M. R. et al. Effect of warming needle moxibustion on pain threshold in the patient of sciatica. **Zhongguo Zhen jiu = Chinese Acupuncture & Moxibustion**, 25(12): 831-833, 01 Dec, 2005.

CHEN, R. et al. Heat-sensitive moxibustion for lumbar disc herniation: A meta-analysis of randomized controlled trials. **J Tradit Chin Med** 2012; 32:322-8.

CHEN, T. et al. Acupuncture for Pain Management: Molecular Mechanisms of Action. **The American Journal of Chinese Medicine**. Vol. 48, No. 4, 1–19, 2020.

CHEN, Y. B.; CHEN, R. N.; LI, Y. L. Observation on therapeutic effect of type II early diabetic nephropathies intervened by acupoint thread embedding. **Zhongguo Zhen Jiu**, Beijing, v. 32, n. 5, p. 390, 2012.

CHEN, Y. et al. Electroacupuncture pretreatment with different waveforms prevents brain injury in rats subjected to cecal ligation and puncture via inhibiting microglial activation, and attenuating inflammation, oxidative stress and apoptosis, **Brain Research Bulletin**. Vol. 127, pp. 248–259, 2016.

CHIU, J. H. How does moxibustion possibly work? **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

CHONG, M.S.; BAJWA, Z.H. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. **J. Pain Symptom Manage**, v.25, n.5 Suppl, p.S4-S11, 2003. Publishing; 376p, 2007.

CHOU, R. et al. Management of Postoperative Pain: A Clinical Practice Guideline From the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists' Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee, and Administrative Council. **J Pain**. 17:131–157. Feb, 2016.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al, 2011. Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuroscience**, v. 193, p. 370–376. 2011.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**. 3, 17002, 2017.

COUTAUX, A. *et al.* Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine.**; 72: 359-71; 2005.

DA SILVA, M. D. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da acupuntura no acuponto spleen 6 (SP6) em camundongos: análise dos seus mecanismos neurobiológicos.** 2013. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DAI, W. et al. Involvement of Interleukin-10 in Analgesia of Electroacupuncture on Incision Pain. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2019: 8413576, 2019.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149-58, 2000.

DELLAROZA, M. S. G. *et al.* Caracterização da dor crônica e métodos analgésicos utilizados por idosos na comunidade. **Rev Assoc Med Bras**; 54(1): 36-4, 2008.

DENG, H.; SHEN, X. The Mechanism of moxibustion: ancient theory and modern research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p.1-7, 2013.

DeSANTANA, J.; *et al.* Definição revisada de dor pela Associação Internacional para o Estudo da Dor: conceitos, desafios e compromissos. Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED). **Revisão de Narrativa**. 16 de julho de 2020.

DETLOFF, M. et al. Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. **Exp. Neurol**. 212, 337-347, 2008.

DIMITROVA, A. Introducing a Standardized Acupuncture Protocol for Peripheral Neuropathy: A Case Series. **Medical Acupuncture**. Vol. 29, No. 6, dec 1, 2017.

DIXON, W.J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v. 20, p. 441-62, 1980.

DOMINGUES, Jádina Santos Vieira. **Participação dos receptores dos terminais aferentes primários no efeito antinociceptivo da acupuntura na dor inflamatória aguda e neuropática.** 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

DREWES, AM A fisiologia da dor. **Ugeskriftpara Laeger**, v.168, n. 20, pp. 1941-1943, 2006

DRUMMOND, E. et al. Avaliação da não adesão à farmacoterapia de doenças crônicas e desigualdades socioeconômicas no Brasil. **Rev. bras. epidemiol.** 23 17 Jul, 2020.

ERNEST, E.; WHITE, A. Acupuntura: uma avaliação científica. São Paulo: **Manole**, 2001.

FEHRENBACHER, J.C.; TAYLOR, C.P.; VASKO, M.R. Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. **Pain**, v. 105, p. 133-141, 2003.

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

FERGUSON B. Techniques of Veterinary Acupuncture and Moxibustion. Xie's veterinary acupuncture. **Ames: Blackwell Publishing**; cap. 11, p. 329-339, 2007.

FIELD, M.J.; HUGHES, J.; SINGH, L. Further evidence for the role of the alpha (2) delta subunit of voltage dependent calcium channels in models of neuropathic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, p. 282-186, 2000.

FINNERUP, N. B. *et al.* Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. **Pain**, v. 118, n. 3, p. 289-305, Dec 5, 2005.

FINNERUP, N. B. *et al.* Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain**, v. 157, p. 1599-1606, 2016.

FORNASSARI, D. Farmacologia da dor: foco nos opioides. **Casos Clin Miner ósseo Metab.**, v. 11, p. 165-168, 2014.

FRY, L. M. *et al.* Acupuncture for analgesia in veterinary medicine. **Topics in Companion Animal Medicine**; 29: 35-42, 2014. Disponível em <<https://doi.org/10.1053/j.tcam.2014.03.001>>

FUKAI, T. *et al.* Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox signaling**. 2011. 15(6): 1583-1606

GOLDMAN, N., *et al.* Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**, v. 13, p. 883-888, 2010.

GRACE, P.M.; *et al.* Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation. **PNAS**. (24) E3441-E3450, 2016.

GUIDA, F. et al. Behavioral, Biochemical and Electrophysiological Changes in Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. **Int. J. Mol. Sci**, 21(9), 3396, 2020.

HAN, Z. et al. The study on the clinical effectiveness and safety of traditional Chinese medicine acupoint catgut embedding guided by musculoskeletal ultrasound in the treatment of nerve root sciatica. **Medicine (Baltimore)**. 100(13): e25387, 2021.

HANSSON, E. et al. Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation? **Acta Physiologica**, 187(1-2), 321–327, 2006.

HARGREAVES, K. M.; RUPAREL, S. Role of Oxidized Lipids and TRP Channels in Orofacial Pain and Inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 10, p. 1117-1123, Sep 2016. ISSN 0022-0345.

HAYASHI, A. M.; MATERA, J. M. Princípios gerais e aplicações da acupuntura em pequenos animais: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada**. São Paulo, v. 8, n. 2, 2005.

HE, L. et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cell Physiol Biochem**. 44(2):532-553, 2017.

HECKE, V. et al. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**. 155(4):654–662, 2014.

HENNEMANN-KRAUSE, L. et al. Systemic drug therapy for neuropathic pain. **Rev Dor**. São Paulo, 17(Suppl 1): S91-4, 2016.

HERGENROEDER, G. **Circulating autoantibodies in human traumatic spinal cord injury subjects and their relationship to the development of neuropathic pain**. UT GSBS Dissertations and Theses. The Texas Medical Center Library, 2017.

HOHMANN, A. G. *et al.* An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, p. 1108–1112, 2005.

HSU, C. *et al.* New perspectives on patient expectations of treatment outcomes: results from qualitative interviews with patients seeking complementary and alternative medicine treatments for chronic low back pain. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p276, 2014.

HU, L. et al. Electroacupuncture and moxibustion promote regeneration of injured sciatic nerve through Schwann cell proliferation and nerve growth factor secretion. **Neural Regen Res**.13:477-83; 2018.

HUANG, C.; SHEU, T. W. H. Study of the effect of moxibustion on the blood flow. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 63, p. 141-149, 2013.

IGNATOV, O. et al. Acupoint embedding therapy. **Moldovan Medical Journal**. 63(1): 52-58, 2020.

JAGUSTYN, P.; ROMANIAK, A. GABA_A pentin – new therapeutic possibilities. **Neurol. Neurochir. Pol.**, v. 36, p. 971-980, 2002.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-63, set. 1992.

KIM, S. Y. et al. Oligomerization and chaperone activity of a plant 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress. **Plant Science**, volume 177, issue 3, pages 227-232, ISSN 0168-9452, 2009.

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.; SILLAS, T. **Patofisiologia da dor**. Archives of Veterinary Science, v.13, n. 1, p. 1-12, 2008

KLUSAKOVA, I.; DUBOVY, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. **Ann Anat**, v. 191, n. 3, p. 248-59, Jun 2009.

LABIANCA, R. *et al.* Efeitos adversos associados ao tratamento não opióide e opióide em pacientes com dor crônica. **Clin Drug Investig**, v.32, n. 1, p. 53-63, 2012.

LABUDA, C. J. et al. Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. 144, 175–181, 2005.

LAI, F. et al. Acupuncture at Zusanli (ST36) for Experimental Sepsis: A Systematic Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 2020, Article ID 3620741, 2020.

LAVOR, M.S.L.; *et al.* Ischemia-reperfusion model in rat spinal Cord: cell viability and apoptosis signaling study. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.8, p.9941-9949, 2015.

LI, J. et al. Therapeutic effects of moxibustion simultaneously targeting Nrf2 and NF- κ B in diabetic peripheral neuropathy. **Appl Biochem Biotechnol**. 189, 1167–1182, 2019.

LI, L. et al. Effect of lumbar 5 ventral root transection on pain behaviors: a novel rat model for neuropathic pain without axotomy of primary sensory neurons. **Exp Neurol**, v. 175, n. 1, p. 23- 34, 2002.

LI, M. et al. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. **Prog Neurobiol**. 84(2):116-31, 2008.

LI, Y. et al. Electroacupuncture treatment normalized sleep disturbance in morphine withdrawal rats. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2011:361054, 2011.

LIU, C.; LI, R.; SONG, X.; FENG, X. Effect of catgut implantation at acupoints on GABAB and mGluR1 expressions in brain stem of rats with spasticity after stroke. **Journal of Traditional Chinese Medicine, Beijing**, v. 34, n. 5, out. 2014.

LIU, X. et al. CXCR4 antagonist AMD3100 elicits analgesic effect and restores the GlyR α 3 expression against neuropathic pain. **J Pain Res.** 7; 10:2205-2212, 2017.

LIU, Z. et al. CXCL12/CXCR4 signaling contributes to neuropathic pain via central sensitization mechanisms in a rat spinal nerve ligation model. **CNS Neurosci Ther.**25(9):922-936, 2019.

LOMBARD, M. C. et al. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, v. 6, n. 2, p. 163-74, abr. 1979.

MAGAR, S. et al. Ultra-diluted *Toxicodendron pubescens* attenuates pro-inflammatory cytokines and ROS- mediated neuropathic pain in rats. **Sci Rep** 8, 13562, 2018.

MALAN, T.P.; IBRAHIM, M. M.; DENG, H.; LIU, Q.; MATA, H. P.; VANDERAH, T.; PORRECA, F.; MAKRIYANNIS, A. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. **Pain**, v. 93, p. 239-245, 2001.

MATSUMOTO, H. *et al.* "Inhibition by Moxa Smoke of NO Production and iNOS Expression in Mouse Macrophage-like Cells Raw 264.7", **In Vivo**, vol . 19, nº. 2, pp. 471–474, 2005.

MCKUNE, C.M. *et al.* Nociceção e dor. In: TRANQUILLI, W.J. THURMON, J.C. GRIMM, K.A. **Lumb& Jones Anestesiologia e Analgesia Veterinária**. Roca. 2012. p. 38-49

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**; 454, 428–435, 2008.

MENDELL, J. R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med.** 348:1243–55, 2003.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain. 2nd ed. Seattle: **IASP Press**, p. 1. 1994.

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

MIYAZAKI, R.; YAMAMOTO, T. The efficacy of morphine, pregabalin, gabapentin, and duloxetine on mechanical allodynia is different from that on neuroma pain in the rat neuropathic pain model. **Anesthesia and Analgesia**, v. 115, n. 1, p. 182-188, 2012.

MOFFAT, R.; RAE, C.P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. Elsevier Ltd, v.12, n. 1, p.12–15, 2011.

MOON-KYU, L. et al. Effects of Acupuncture at GB30, GB34, and BL40 on Functional Recovery after Sciatic Crushed Nerve Injury in Rats. **The Journal of Korean Medicine**. Vol. 31; issue 3; pages.66-78; 1010-0695; 2010.

MORE, Ari Ojeda Ocampo et al. Acupuntura e dor numa perspectiva translacional. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 44-48, Apr. 2011.

NANDI, A. *et al.* Role of Catalase in Oxidative Stress-and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2019; 9613090.

NETO, O. A. Dor: princípios e prática. Porto Alegre: **Artmed**. p. 163-164; 328-39, 2009.

OLIVA, F. Moxabustão em Animais. **Informativo I.D.H.P.** p. 3., 2011. SCHOEN, A. Acupuntura Veterinária: da arte antiga à medicina moderna. 2.ed. São Paulo: **Roca**. p 624, 2006.

OLIVEIRA JUNIOR, J. et al. Mediadores inflamatórios na dor neuropática. **Rev. dor**, São Paulo, v. 17, supl. 1, p. 35-42, 2016.

ONDREJOVICOVA, A. *et al.* Why acupuncture in pain treatment? **Neuro Endocrinol Lett.**, v. 37, n. 3, p. 163-168, 2016.

PATIL, S. et al. The Role of Acupuncture in Pain Management. **Current Pain and Headache Reports**, 20(4). 2016.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**. 2000;63(7):1035-1042

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: **Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais**. OTERO, P. E. São Paulo: Interbook, 2005. p. 30-74.

PU, Z. et al. Clinical study on different acupuncture and moxibustion methods for prevention and treatment of nausea and vomiting caused by chemotherapy. **Chin J Informat.** (12): 34-37, 2017.

RICHNER, M. et al. The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice. **Journal of Visualized Experiments**, vol. 18, no. 54, pp. 57–66, 2011.

RIFFEL, A. et al. Treatment with ascorbic acid and α -tocopherol modulates oxidative-stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. **Braz J Med Biol Res.** 1, 51(4):e7097, 2018.

ROECKEL, LA. *et al.* Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. **Sci Rep.** 2017;7(1):10406. Published 2017 Sep 4. doi:10.1038/s41598-017-11120-4.

ROSA, A. et al. Gabapentin decreases microglial cells and reverses bilateral hyperalgesia and allodynia in rats with chronic myositis. **European Journal of Pharmacology**. Volume 799, 15, Pages 111-117, 2017.

ROSTAMI, Z. et al. Sex Difference in Trigeminal Neuropathic Pain Response to Exercise: Role of Oxidative Stress. **Pain Res Manag**. 28, 2020:3939757, 2020.

RUTKOVE, S. et al. Overview of polyneuropathy. **UpToDate**. v.19, 2018.

SAADÉ, Nayef E.; JABBUR, Suhayl J. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. **Progress in neurobiology**, v. 86, n. 1, p. 22-47, 2008.

SAFAKHAH, H. et al. Forced exercise attenuates neuropathic pain in chronic constriction injury of male rat: an investigation of oxidative stress and inflammation, **J. Pain Res**. 10, 1457–1466, 2017.

SAINI, P. et al. Poly (lactic acid) blends in biomedical applications. **Adv Drug Deliv Rev**. 107:47-59, 2016.

SANNA, M. Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) Essential Oil Alleviates Neuropathic Pain in Mice With Spared Nerve Injury. *Front. Pharmacol.*, 2019.00472, 2019.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIER, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v.43, p. 205-218, 1990.

SETTA, H. et al. Tratamento da dor neuropática crônica pós-trauma com o uso do bloqueio periférico: relato de caso. **Rev. dor** 13 (3), 2012.

SHAO, X. M. *et al.* Strong Manual Acupuncture Stimulation of "Huantiao" (GB 30) Reduces Pain-Induced Anxiety and p-ERK in the Anterior Cingulate Cortex in a Rat Model of Neuropathic Pain. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, 235491, 2015.

SHERWOOD, E. R. & TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**; 18(3), 385-405, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2003.12.002>

SILVA, J.F. **Efeitos dos hormônios tireoidianos na cinética de migração das células trofoblásticas e no perfil endócrino, angiogênico e imune da placenta de ratas e na expressão gênica das células trofoblásticas de camundongo**. 2014. 162f. Tese (Doutorado em Patologia Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

SONG, Q. et al. Electroacupuncture at Zusanli point (ST36) attenuates pro-inflammatory cytokine release and organ dysfunction by activating cholinergic anti-inflammatory pathway in rat with endotoxin challenge. **Afr J Tradit Complement Altern Med**. vol. 11, no. 2, pp. 469–474, 2014.

- SORKIN, L. S.; YAKSH, T. L. Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 4, p. 609-19, 2009
- SOUSA, A. et al. Experimental models for the study of neuropathic pain. **Rev Dor.** São Paulo, 2016;17 (Suppl 1):S27-30
- STAHL, S. M. *et al.* The diverse therapeutic actions of pregabalin: is a single mechanism responsible for several pharmacological activities? **Trends Pharmacol Sci.**, v. 34: 332-339, 2013.
- STUX, G., BERMAN, B., POMERANZ, B. Basics of acupuncture. 5. ed. **Springer**; p. 340, 2003.
- SUN, J. Mechanism of catgut embedding at acupoints to treat trigeminal neuralgia. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. Volume 38, Issue 5, Page 575, 2009.
- TABO, E. *et al.* Behavioral manifestations of neuropathic pain and mechanical allodynia, and changes in spinal dorsal horn neurons, following L4-L6 dorsal root constriction in rats. **Pain**, v. 80, n. 3, p. 503-20, 1999.
- TAFFAREL, M., *et al.* Acupuncture and analgesia: clinical applications and main acupoints. **Clínica e Cirurgia Cienc. Rural** 39 (9), dez 2009.
- TAN, Y. et al. Moxibustion for the treatment of diabetic peripheral neuropathy. A systematic review and meta-analysis following PRISMA guidelines. **Medicine (Baltimore)**. 99(39): e22286, 2020.
- TAYLOR, C. P. Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin-calcium channel alpha2-delta [Cavalpha2-delta] ligands. **Pain**. 142:13-6, 2009.
- TRAN, K. T. et al. "Gabapentin withdrawal syndrome in the presence of a taper," **Bipolar Disorders**, vol. 7, no. 3, pp. 302–304, 2005.
- UDALL, M. et al. Epidemiology of physician-diagnosed neuropathic pain in Brazil. **J Pain Res**; 12: 243–253, 2019.
- URYU, N. et al. Analgesic Effects of Indirect Moxibustion on An Experimental Rat Model of Osteoarthritis in the Knee. **Acupuncture in medicine**. 25(4):175-183, 2007.
- VAN, H. O.; AUSTIN, S. K.; KHAN R. A.; SMITH, B. H. Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**.; 155(4):654-62, 2014.
- VANEGAS, H. To descending pain-control system in rats, inflammation induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. **Neuros. Letters**; 361: 225-28, 2004.

VELLOSA, J. *et al.* Oxidative stress: an introduction to the state of art. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.1, p.10152-10168Jan. 2021

WALL, P. D. *et al.* Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. **Pain**, v. 7, n. 2, p. 103-11, 1979.

WALL, P. D. introduction to the fourth edition. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres, 1-8p, 1999.

WANG, G. Y. *et al.* Effects of moxibustion temperature on blood cholesterol level in a mice model of acute hyperlipidemia: role of TRPV1. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-7, 2013

WANG, J. *et al.* Repeated electroacupuncture treatment attenuated hyperalgesia through suppression of spinal glial activation in chronic neuropathic pain rats. **BMC Complement Altern Med**. 2018; 18: 74, 2018.

WANG, J. *et al.* Repeated electroacupuncture treatment attenuated hyperalgesia through suppression of spinal glial activation in chronic neuropathic pain rats. **BMC Complement Altern Med** 18, 74, 2018.

WANG, J. *et al.* The effect of repeated electroacupuncture analgesia on neurotrophic and cytokine factors in neuropathic pain rats. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2016.

WANG, K. *et al.* Electroacupuncture frequency-related transcriptional response in rat arcuate nucleus revealed region-distinctive changes in response to low-and high-frequency electroacupuncture. **J Neurosci Res**; 90:1464-73, 2012.

WEI, X. H. *et al.* The up-regulation of IL-6 in DRG and spinal dorsal horn contributes to neuropathic pain following L5 ventral root transection. **Experimental Neurology**, v. 241, p.159 –168, 2013.

WEN-SHAN, S. Introduction to micro-invasive thread-embedding therapy. **Journal of Acupuncture and Tuina Science**. Shanghai, v. 10, n. 3, p. 196-198, 2012.

XIE, H, PREAST, V. Xie's veterinary acupuncture. 1.ed. Oxford: **Blackwell**.

XU, J.; DENG, H.; SHEN, X. Safety of moxibustion: a systematic review of case reports. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p.1-10, 2014

YAN, R.; LIU, X; BAI, J.; YU, J.; GU, J. Influence of catgut implantation at acupoints on leptin and insulin resistance in simple obesity rats. **J Tradit Chin Med**. 32(3): 1-2. ISSN 0255-2922 © 2012 JTCM, 2012.

YIN, C. S. *et al.* A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Res Vet Sci**, v. 84, p. 159-165, 2008.

YOSHIKUMI, M. Gabapentin inhibits γ -amino butyric acid release in the locus coeruleus but not in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury in rats. **Anesthesiology**, v. 116, n. 6, p. 1347-53, 2012.

ZAJACZKOWSKA, R. et al. Mirogabalin Decreases Pain-like Behaviours and Improves Opioid and Ketamine Antinociception in a Mouse Model of Neuropathic Pain. **Pharmaceuticals**. 15(1), 88, 2022.

ZARABIAN, K. et al. The intersection between integrative medicine and neuropathic pain: A case report. **Explore**. ISSN 1550-8307, 2021.

ZELIADT, S. et al. Assessing the Relative Effectiveness of Combining Self-Care with Practitioner-Delivered Complementary and Integrative Health Therapies to Improve Pain in a Pragmatic Trial. **Pain Medicine**. Volume 21, Issue Supplement_2, Pages S100–S109, 2020.

ZHANG, J. et al. Acupuncture-related adverse events: a systematic review of the Chinese literature. **Bull World Health Organ**. 88:915–921C, 2010.

ZHANG, X. et al. Acupoint catgut-embedding therapy: superiorities and principles of application. **Zhongguo Zhen Jiu**. 32(10):947-51, 2012.

ZHANG, Y. et al. Acupoint catgut embedding for the treatment of sciatica: A protocol for a systematic review. **Medicine (Baltimore)**.100(1):e23951, 2021.

ZHAO, L. A Review of Acupoint Specificity Research in China: Status Quo and Prospects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Article ID 543943, 2012.

ZHAO, L. *et al.* A Review of Acupoint Specificity Research in China: Status Quo and Prospects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Volume 2012.

ZHENG, H. et al. Effect of acupoints on acupuncture-moxibustion and its therapeutic mechanism. **World J Tradit Chin Med**. Volume: 6; Issue Number: 3; Page: 239-248, 2020.

ZHENG, J. et al. Different acupuncture and moxibustion methods at Hedong (EX-LE2) for knee osteoarthritis with yang-deficiency and cold-stagnation syndrome. **Chin Acupuncture Moxibustion**. 37:594-8, 2017.

ZHOU, F. et al. Electroacupuncture increased cerebral blood flow and reduced ischemic brain injury: Dependence on stimulation intensity and frequency. **J Appl Physiol** 2011; 111:1877-87

ZHOU, W. *et al.* Analgesic Effect of Moxibustion with Different Temperature on Inflammatory and Neuropathic Pain Mice: A Comparative Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 2017, ID 4373182, 8 pages, 2017.

Anexos

Anexo A- Protocolo do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA - UESC

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos da acupuntura, implantes em acupontos e da moxabustão em modelo de neuropatia periférica induzida pela lesão em nervo", registrada com o nº 033/20 sob a responsabilidade de Prof. Mário Sergio Lima de Lavor, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ (CEUA/UESC) em reunião de 23/02/2021.

Finalidade: () ensino (x) pesquisa
Vigência da autorização: 05/04/2021 a 05/04/2023
Espécie/Linhagem/Raça: ratos / rattus norvegicus
Nº de animais: 60
Peso / idade: 2 meses
Sexo: Machos
Origem: Laboratório de Criação, Manutenção e Experimentação Animal da UESC (Labio)

Rosana Maria de Oliveira Clark
Coordenadora CEUA - UESC

Anexo B: Protocolo de imuno-histoquímica

kit EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link) (Dako North America, Inc., ref. K8002, USA).

1º DIA

PRÉ-TRATAMENTO

1 – Desparafinização em Estufa

Estufa pré-aquecida em 58-65°, deixando escorrer toda a parafina do corte.

2 – Desparafinização em Xilol 1 e 2

(30 min a 1h em cada um. Tempo de acordo com o tecido e a dificuldade em retirar parafina).

3 – Rehidratação seriada

- Álcool ABS I (5 min)
- Álcool ABS II (5 min)
- Álcool ABS III (5 min)
- Álcool 90% (5 min)
- Álcool 80% (5min)
- Álcool 70% (5 min)
- Água corrente (5 min)

4 – Recuperação de epítipo (DM828)

- Recomendação do Kit □ Diluição em 1:50
- **7 mL** de EnVision™ FLEX Target Retrieval (DM828) + **343 mL** de dH2O (Volume p/ 1 cubeta)
- Ajustar pH 6,0
- Pré-aquecer a 65° C;
- Incubar as amostras por 20 min em 95-99° C;

- Incubar as amostras por 20 min em temperatura ambiente.

4 – Wash Buffer (DM831) (5 min)

- Recomendação do Kit □ Diluição em 1:20

- Calcular volume mínimo necessário para todos os banhos da bateria e diluir.

Ex.:

- **50 mL** de (DM831) + **950 mL** de dH₂O (Volume total de 1L);

- Solução de lavagem deve ser armazenada na geladeira.

TRATAMENTO

Sequência baseada em:

Ilie M, Khambata-Ford S, Copie-Bergman C, Huang L, Juco J, Hofman V, et al. (2017) Use of the 22C3 anti-PD-L1 antibody to determine PD-L1 expression in multiple automated immunohistochemistry platforms. PLoS ONE 12 (8): e0183023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183023>

- **Bloqueio de peroxidase (SM801) (5 min)**

- EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801)

- Reagente pronto para uso. Pingar com a pipeta sobre o corte somente o volume necessário para cobri-lo.

- 5 minutos em temperatura ambiente em câmara úmida.

- **Wash Buffer (DM831) (5 min)**

- **Soro bloqueio (30 min)**

- Reagente do Kit antigo (UFMG)

- Protein block

- **Anticorpo Primário (tempo a definir)**

2º DIA

- **Wash Buffer (DM831) (5 min)**
- **Proteína estabilizante (SM804) (30 min)**
 - EnVision™ FLEX + Mouse LINKER (SM804);
 - 30 minutos em temperatura ambiente em câmara úmida;
 - Reagente pronto para uso. Pingar com a pipeta sobre o corte somente o volume necessário para cobri-lo.
- **Wash Buffer (DM831) (5 min)**
- **Anticorpo secundário (SM802) (30 min)**
 - EnVision™ FLEX HRP (SM802)
 - Reagente pronto para uso. Pingar com a pipeta sobre o corte somente o volume necessário para cobri-lo.
 - 30 minutos em temperatura ambiente em câmara úmida.
- **Wash Buffer (DM831) (5 min)**
- **DAB (DM827)**
 - Tempo de revelação a definir por padronização;
 - EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827);
 - Diluir o DAB em solução própria diluidora fornecida pelo Kit;
 - Recomendação □ Diluição (1:50).
 - Calcular volume mínimo necessário para cobrir todos os cortes e diluir.
 - Proteger da luz;
 - Todos os materiais que entrarem em contato com o DAB (ponteiras, ependorffs etc.) devem ser neutralizados com hipoclorito antes de serem descartados.
- **Água corrente (10 min)**

CONTRACOLORAÇÃO E MONTAGEM

- Hematoxilina

- Filtrar antes de utilizar;
- Tempo a definir visualmente no momento da coloração. Não exagerar no tempo, pois excesso de corante atrapalha a visualização da marcação;
- Água corrente (15 min)
- Desidratação;
 - Álcool 70% (3 min)
 - Álcool 80% (3 min)
 - Álcool 90% (3 min)
 - Álcool ABS I (10- 15 min)
 - Álcool ABS II (10 - 15 min)
 - Álcool ABS III (10 - 15 min)
 - Álcool ABS III (10 - 15 min)
- Xilol 1 e 2 (5 -10 min cada)

Anexo C: Anticorpos, diluições, tempos de revelação com diaminobenzidina (DAB) e os seus respectivos códigos.

Tabela 1: Padronização da Imunohistoquímica (Jéssica, 2021).

Anticorp o	Diluiç ão	Tempo de revelação	Códig o
Catalase	1:200	7:50 minutos	sc- 271803
SOD	1:8000	15 segundos	sc- 101523
Iba-1	1:300	10 minutos	sc- 32725
Gpx	1:200	9 minutos	sc- 133160
IL-10	1:2500	3 minutos	sc- 365858
CXCR-4	1:200	5 minutos	sc- 53534

