

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**NEUROTRANSMISSORES ESPINAIS DO SISTEMA
DESCENDENTE DE CONTROLE DA NOCICEPÇÃO
ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA POR
ELETROACUPUNTURA COM 2HZ E 100HZ EM RATOS**

Josie Resende Torres da Silva

**RIBEIRÃO PRETO
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia
Laboratório de Mecanismos Centrais do Controle da Dor

**NEUROTRANSMISSORES ESPINAIS DO SISTEMA
DESCENDENTE DE CONTROLE DA NOCICEPÇÃO
ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA POR
ELETROACUPUNTURA COM 2HZ E 100HZ EM RATOS**

JOSIE RESENDE TORRES DA SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2009

Josie Resende Torres da Silva

**NEUROTRANSMISSORES ESPINAIS DO SISTEMA
DESCENDENTE DE CONTROLE DA NOCICEPÇÃO
ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA POR
ELETROACUPUNTURA COM 2HZ E 100HZ EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado.

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Silva, Josie Resende Torres da

Neurotransmissores espinais do sistema descendente de controle da nocicepção envolvidos na antinocicepção induzida por eletroacupuntura com 2hz e 100hz em ratos / Josie Resende Torres da Silva; Orientador: Wiliam Alves do Prado – Ribeirão Preto, 2009. 89 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Nocicepção. 2. Eletroacupuntura. 3. Mediação espinal. 4. Injeção intratecal. 5. Inibição descendente

FOLHA DE APROVAÇÃO

Josie Resende Torres da Silva

Neurotransmissores espinais do sistema descendente de controle da nocicepção envolvidos na antinocicepção induzida por eletroacupuntura com 2hz e 100hz em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Banca Examinadora

Prof. Dr. William Alves do Prado

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Instituição: ICB – UNICAMP Assinatura: _____

Prof. Dr. João Eduardo de Araújo

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Trabalho realizado com auxílio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CNPq e FAPESP).

EPIGRAFE

**O que ouço, esqueço.
O que eu vejo, lembro.
O que eu faço, aprendo.**

Confúcio

**Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos
pequenos começos.**

Lao Tsé

DEDICATÓRIA

Marcelo, o nosso amor é...
Vida, porque ele é existencial.
Razão, porque ele pondera.
Estudo, porque ele analisa.
Ciência, porque ele investiga.
Filosofia, porque ele pensa.
Verdade, porque ele eterniza.
Ideal, porque ele que se eleva.
Fé, porque ele transcende.
Esperança, porque ele sonha.
Caridade, porque ele auxilia.
Fraternidade, porque ele se expande.
Sacrifício, porque ele se esforça.
Renúncia, porque ele depura.
Simpatia, porque ele sorri.
Trabalho, porque ele constrói.
Religião, porque ele busca a Deus.

Muito obrigada por me fazer tão feliz todos os dias de minha vida.
Eu te amo...

Aos meus pais, José e Bernadeth e aos meus
irmãos, Jóber e Cacá.

Nos momentos de minha ausência dedicados aos
estudos, sempre fizeram entender que o futuro é
feito a partir da constante dedicação no presente.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado, minha eterna gratidão pelos ensinamentos diários, pelo privilégio de sua orientação e pela confiança em mim. Exemplo de ser humano dedicado como pesquisador e como pessoa.

Ao Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada, por ter assumido inicialmente a direção do projeto que viabilizou a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Eduardo de Araújo, incentivador no período de graduação, onde aprendi o valor da pesquisa e da investigação como forma de engrandecimento profissional.

A professora Dra. Márcia Valéria Rizzo Scognamillo Szabó pelos primeiros passos na experimentação e incentivo na busca da pós-graduação.

Em memória do Professor Marco Aurélio Resende Ottoni, exemplo de pessoa e de dedicação para com os alunos, pacientes e amigos. “Você tem brilho interior”. Onde quer que esteja, sei que olha por todos nós. Obrigado pelos ensinamentos e pelo incentivo.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia da FMRP pela contribuição à minha formação científica.

Aos técnicos, Ieda Regina dos Santos Schivo, Paulo Roberto Castania e Marcos Antônio de Carvalho pela disposição e colaboração com o que sempre necessitava na fase experimental deste trabalho.

Aos secretários, Sônia Maria Stefanelli, Fátima Helena Ferreira Petean e José Waldik Ramon, que com muuuuita dedicação e competência, nos auxiliam com as dificuldades burocráticas.

Às Sras. Eliana e Maria Inês, pelo tratamento e cuidadoso manejo de nossos animais do biotério.

Aos meus colegas de laboratório por terem colaborado, ajudado e incentivado em todos os momentos. Pela alegre convivência e amizade.

Ao amigo Guilherme Bertolino, que compartilhou problemas, momentos de tristeza, mas também muitas alegrias.

A todos os colegas do departamento de Farmacologia.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

SILVA, J.R.T. Neurotransmissores espinais do sistema descendente de controle da nocicepção envolvidos na antinocicepção induzida por eletroacupuntura com 2Hz e 100Hz em ratos. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Várias áreas cerebrais modulam a transmissão nociceptiva por projeções para a medula espinal e usa neurotransmissores tanto diretamente em neurônios de projeção quanto em interneurônios. A analgesia induzida pela eletroacupuntura (AIA) tem sido confirmada por experimentos clínicos e experimentais, sendo uma alternativa para o tratamento de síndromes dolorosas. Os mecanismos pelo qual a AIA ocorre, entretanto, ainda não estão completamente elucidados. Esse estudo examina a importância dos neurotransmissores espinais na mediação da AIA. A latência no teste de retirada da cauda (LRC) foi utilizado para avaliar as mudanças produzidas pela injeção intratecal de metisergida (antagonista 5-HT, 30 µg/10µl), atropina (antagonista muscarínico, 20µg/10µl) naloxona (antagonista opióide, 20 µg/10µl) bicuculina (antagonista GABA_A, 0,3µg/10µl), faclofeno (antagonista GABA_B, 20µg/10µl), WB4101 (antagonista α_{1A}, 20µg/10µl) ou idazoxan (antagonista α₂, 20 µg/10 µl) na AIA induzida pela eletroacupuntura (EA) a 2 ou 100 Hz nos acupontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) bilaterais em ratos levemente anestesiados. A LRC foi aumentada significativamente pela EA, sendo que o efeito de 2Hz foi de maior duração que o produzido por 100Hz. Metisergida intratecal diminui o efeito da EA de 2 e de 100Hz. Naloxona ou idazoxan bloqueiam o efeito da EA de 2Hz, mas não de 100Hz. A atropina bloqueou o efeito da EA de 2Hz e reduziu a duração do efeito de 100Hz. A bicuculina ou faclofeno diminui a AIA de 2 ou 100 Hz. Em contraste, WB4101 não alterou o efeito de ambas frequências. Estes resultados nos levam a concluir que os mecanismos da AIA envolvem a ativação de receptores espinais serotoninérgicos, colinérgicos e opioidérgicos. Receptores GABA_A e GABA_B estão envolvidos na modulação da AIA e os receptores α₂-adrenérgicos são necessários para a AIA de 2, mas não de 100Hz, enquanto que receptores α_{1A}-adrenérgicos não parecem estar envolvidos na AIA.

ABSTRACT

SILVA, J.R.T. Spinal Neurotransmitters of Descending Inhibitory Nociceptive Systems on 2 or 100Hz electroacupuncture-induced antinociception in rats. 2009. 89 f. Dissertation (Master) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Several brain areas modulate pain transmission via pathways to the spinal cord and using neurotransmitters to act at both spinally projecting neurons and interneurons targeting the projection neurons. Analgesia induced by electroacupuncture (AIA) has been confirmed by clinical and experimental studies as being a useful alternative for pain management. The mechanisms underlying the AIA, however, are not fully understood yet. This study examines the importance of spinal neurotransmitters in the AIA. The changes in the tail-flick latency (TFL) was used to examine the changes produced by the intrathecal (i.t.) injection of methysergide (5-HT antagonist, 30 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$), atropine (muscarinic antagonist, 20 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) or naloxone (opioid antagonist, 20 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) bicuculine (GABA_A antagonist, 0,3 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$), phaclofen (GABA_B antagonist, 20 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$), WB4101 (α_{1A} antagonist, 20 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) or idazoxan (α_2 antagonist, 20 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) on the AIA induced by the bilateral stimulation at 2 or 100 Hz EA of the Zusanli (ST36) and Sanyinjiao (SP6) acupoints in lightly anesthetized rats. TFL was significantly increased by EA, the effect of 2 Hz lasting longer than that produced by 100 Hz. Intrathecal methysergide decreased the effect of EA at 2 or 100 Hz. Naloxone blocked the effect of EA at 2 but not at 100 Hz. Atropine blocked the effect of EA at 2 Hz and reduced the effect of EA at 100 Hz EA. Intrathecal bicuculine or phaclofen decreased the AIA at 2 or 100 Hz. Intrathecal idazoxan blocked the increase of TFL induced by 2 Hz, but not 100 Hz EA. In contrast, WB4101 was non-effective against AIA. We suggest that the mechanisms of AIA involves activation of spinal 5-HT, muscarinic cholinergic and opioid receptors. Spinal GABA_A and GABA_B receptors are both involved in the modulation of AIA and spinal α_2 -adrenergic receptors are necessary for the 2 but not 100 Hz AIA, while α_{1A} -adrenergic receptors are not be involved in AIA.

ÍNDICE DE FIGURAS

		pág.
Figura 1	Modelo esquemático da localização dos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6)	8
Figura 2	Aparato utilizado para a realização do teste de retirada de cauda.	20
Figura 3	Aparato utilizado para a realização da eletroacupuntura.	21
Figura 4	Posição das agulhas de acupuntura nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) com eletrodos do aparelho.	21
Figura 5	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 2Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de atropina (20µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	28
Figura 6	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 100Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de atropina (20µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	30
Figura 7	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 2Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de metisergida (30µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	32
Figura 8	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 100Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de metisergida (30µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	34
Figura 9	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 2Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante	36

	20 minutos (EA) após injeção de bicuculina (0,3µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	
Figura 10	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 100Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de bicuculina (0,3µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	38
Figura 11	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 2Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de faclofeno (20µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	40
Figura 12	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 100Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de faclofeno (20µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	42
Figura 13	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 2Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de WB4101 (10µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	44
Figura 14	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 100Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de WB4101 (10µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	46
Figura 15	Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 2Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de idazoxan (50µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL).	48

- Figura 16** Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 100Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de idazoxan (50µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL). 50
- Figura 17** Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 2Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de naloxona (20µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL). 52
- Figura 18** Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura 100Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA) após injeção de naloxona (20µg/10µL, i.t.) ou salina (10 µL). 54

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
ÍNDICE DE FIGURAS	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Conceito de dor e nocicepção	2
1.2 Mecanismos nociceptivos	3
1.3 Sistemas inibitórios da nocicepção	5
1.4 Acupuntura	7
1.5 Eletroacupuntura e neurotransmissores medulares	9
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Animais	18
3.2 Injeção intratecal	18
3.3 Teste de retirada de cauda	19
3.4 Eletroacupuntura	20
3.4.1 Método para identificar animais não-respondentes a eletroacupuntura	22
3.5 Histologia	22
3.6 Drogas	22
3.7 Protocolos experimentais	24
3.8 Análise estatística	25

4 RESULTADOS	26
4.1 A acetilcolina participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?	27
4.2 A serotonina participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?	31
4.3 O GABA _A participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?	35
4.4 O GABA _B participam da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?	39
4.5 A noradrenalina (α 1) participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?	43
4.6 A noradrenalina (α 2) participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?	47
4.7 Os peptídeos opióides participam da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?	51
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69



Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1. Conceito de dor e nocicepção

A dor fisiológica é definida pela “*International Association for the Study of Pain (IASP)*” como sendo experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual potencial ou de fato ou, ainda, descrita em termos que sugerem tal dano. Apesar de sua universalidade, a dor é composta de variadas sensações de desconforto (MELZACK e WALL, 1965). Como sugere a definição, a dor é uma experiência complexa e subjetiva, formada por três dimensões psicológicas: a sensorial-discriminativa, que permite identificar o estímulo como doloroso e localizar o local onde a lesão ocorreu; a motivacional-afetiva e a cognitiva-avaliativa, relacionadas com a reação à dor. Estas duas últimas compreendem ampla variedade de comportamentos, desde a simples retirada reflexa do segmento lesado até a ocorrência de complexas respostas emocionais, envolvendo aprendizagem e memória (MELZACK e WALL, 1965; BONICA, 1990; CALVINO e GRILO, 2006).

O termo dor é mais adequado para designar a percepção do estímulo nocivo em seres humanos, enquanto que o termo nocicepção é somente a sensação do estímulo, mais adequado para estudar dor em modelos experimentais animais (NOBACK e col., 1996). Há proporcionalidade entre a intensidade do estímulo nociceptivo e a sensação de dor induzida apenas em algumas raras situações idealmente controladas (i.e. experimentos laboratoriais em humanos; eletrofisiologia e reflexos espinais). O mesmo estímulo pode, portanto, evocar sensações com intensidades diferentes e reações comportamentais diversas.

A sensibilidade à dor pode variar muito em diferentes grupos socioculturais, bem como em função do estado emocional ou das circunstâncias em que ocorre a lesão. Exemplos clássicos incluem soldados que, embora seriamente feridos durante o combate, relatam pouca ou nenhuma dor enquanto estão na batalha, ou ainda, atletas, que freqüentemente não detectam lesões sofridas enquanto estão competindo (BASBAUM e JESSEL, 2000).

Os conceitos mais elaborados sobre modulação da sensibilidade foram fundamentados inicialmente em estudos experimentais que culminaram com a elaboração de teorias sobre a interação sensitiva e sobre as inibições segmentar e suprasegmentar da dor.

1.2 Mecanismos nociceptivos

Um estímulo nocivo aplicado na pele ou em tecidos subcutâneos como articulações e músculos, pode ativar uma série de terminações nervosas livres (nociceptores), que consistem em prolongamentos periféricos de axônios de neurônios sensoriais, cujos corpos celulares situam-se no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal. Esses neurônios, denominados neurônios aferentes primários, são células pseudo-unipolares que, além do ramo periférico, possuem um ramo central que adentra o corno dorsal da medula espinal pela raiz dorsal (LUMB e cols, 2009).

Os nociceptores são amplamente distribuídos na pele, mucosas, vísceras, músculos, periósteo e articulações, e respondem a estímulos nocivos de múltiplas modalidades, como, estímulos térmicos, mecânicos e químicos (SCHAIBLE e RICHTER, 2004). Os nociceptores podem ser classificados em mecanorreceptores,

(ativados apenas por estímulos mecânicos intensos), polimodais (que respondem a qualquer tipo de estímulo nocivo), mecanotérmicos (que respondem a estímulos térmicos de variada intensidade), e receptores para o frio (que são ativados por estímulos nocivos de baixa temperatura).

As fibras dos neurônios aferentes primários essencialmente podem ser classificadas com base em seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução: fibras do tipo A δ , mielinizadas, mais grossas (2-6 μ m de diâmetro) e rápidas condutoras de sinais nociceptivos (12-30 m/s) e fibras do tipo C, amielínicas, mais finas (0,4-1,2 μ m de diâmetro) e de condução mais lenta (0,5-2,0 m/s) (SCHAIBLE e RICHTER, 2004; LUMB e cols., 2009). Enquanto a ativação de fibras A δ está associada à sensação de dor descrita como cortante e bem localizada, a ativação de fibras do tipo C promove sensação de queimação sem localização precisa (LE BARS e cols., 2001). Essa diferenciação tem sido atribuída ao fato de que as fibras A δ respondem com maior frequência de disparos, provendo o sistema nervoso central (SNC) de informações melhor discriminadas.

Após estimulação periférica de natureza e intensidade suficientes para ativar nociceptores, a informação é transduzida em potenciais de ação que percorrem o neurônio aferente primário, o qual estabelece sinapses com neurônios do corno dorsal da medula espinal, denominados neurônios de projeção ou de segunda ordem (SCHAIBLE e RICHTER, 2004). A passagem da informação nociceptiva da fibra aferente primária para o neurônio espinal de projeção envolve a liberação de diferentes neurotransmissores, incluindo peptídeos (colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo, somatostatina), serotonina (5-HT) e aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), além de substância P e adenosina trifosfato (ATP) (WILLIS e COGGESHALL, 1991; WILLIS e WESTLUND, 1997; GEBHART, 2004).

A substância cinzenta da medula espinal é citoarquiteticamente dividida em 10 lâminas: Lâmina I (marginal), II (substância gelatinosa), III e IV (nucleus proprius) e V e VI (lâminas profundas) que compreendem o corno dorsal; a lâmina VII que corresponde à substância cinzenta intermediária; lâminas VIII e IX que compreendem o corno ventral medial e lateral, respectivamente, enquanto a lâmina X é a região que circunda o canal central (GEBHART, 2004; D'MELLO e DICKENSON, 2008).

As lâminas I e II (mais superficiais), V, VI, e a lâmina X, constituem regiões espinais predominantemente implicadas na recepção, processamento e transmissão rostral da informação nociceptiva. Isto acontece porque fibras C nociceptivas projetam-se fortemente para a lâmina II e menos intensamente para a lâmina I, V e X. Por outro lado, fibras A δ nociceptivas de alto limiar, terminam predominantemente na lâmina I, e em menor extensão nas lâminas II e X. Em contraste, as fibras grossas de baixo limiar A β , que conduzem informação não nociceptiva, arborizam profusamente nas lâminas III e IV, menos marcadamente nas lâminas V e VI e de forma bem discreta nas lâminas I e II (GEBHART, 2004; D'MELLO e DICKENSON, 2008).

Após processamento, a informação dolorosa alcança estruturas superiores do SNC através de várias vias ascendentes, que apesar de complexas, podem ser resumidas em: trato espinotalâmico, trato espinomesencefálico, trato espinoparabraquial, trato espinohipotálâmico e trato espinorreticular (para revisão ver MILLAN, 2002).

1.3 Sistemas inibitórios da nocicepção

A nocicepção está sujeita ao controle exercido por alguns mecanismos endógenos, o que foi inicialmente proposto por Head e Holmes (1911), que consideravam que a atividade do tálamo, então considerado o centro da percepção da dor, era continuamente modulada pelo neocórtex, o centro discriminativo da percepção. Posteriormente, foram obtidas evidências diretas de que regiões supraespinais poderiam controlar vias nociceptivas ascendentes, presumivelmente sensoriais (HAGBARTH e KERR, 1954; CARPENTER e PIERSON, 1973). Evidências de que sistemas descendentes podem modular seletivamente a dor foram primeiramente reportadas por Reynolds (1969), que descreveu o fenômeno da analgesia (ou antinocicepção) produzida por estimulação (APE) de estruturas encefálicas em ratos capaz de desencadear supressão específica de comportamentos eliciados por estímulos nocivos. Assim como em roedores, esse tipo de antinocicepção pode ser produzido em humanos pela estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP).

Descobertas subseqüentes demonstraram que a PAG é parte de um circuito do SNC que controla a transmissão nociceptiva em nível espinal (MAYER e cols., 1971; MAYER e PRICE, 1976; REYNOLDS, 1969). A APE foi obtida por estimulação elétrica da SCP (MAYER e cols, 1971; REYNOLDS, 1969), núcleo magno da rafe (NMR) (PROUDFIT e ANDERSON, 1975), núcleo reticular paragigantocelular (AKAIKE e cols., 1978), cerebelo e tálamo ventrobasal (SIEGEL e WEPSIC, 1974), núcleo pretectal anterior (ROBERTS e REES, 1986) e região pontina parabraquial (DESALLES e cols., 1985). A maioria das vias nervosas ativadas a partir dessa estruturas encefálicas descende à medula espinal pelo funículo dorsolateral, e

utilizam como mediadores a serotonina e a noradrenalina (MILLAN, 2002), que inibem a passagem do estímulo do aferente primário para a célula espinal atuando diretamente ou indiretamente, ativando neurônios colinérgicos ou gabaérgicos intrínsecos espinais (D'MELLO e DICKENSON, 2008).

1.4 Acupuntura

A acupuntura é um método da Filosofia Tradicional Chinesa (WHITE e ERNST, 2004) que consiste na inserção de agulhas em pontos anatômicos específicos do corpo para produzir efeitos terapêuticos e analgésicos (GAYNOR, 2000).

A palavra acupuntura deriva dos radicais latinos *acus* e *pungere*, que significam agulha e puncionar (inserir), respectivamente e visa à terapia das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas em pontos específicos, chamados acupontos (JAGGAR, 1992; WANG e cols., 2008). A técnica consiste na estimulação sensorial periférica, provocando liberação de neuropeptídeos locais e a distância, devido envolvimento do SNC e periférico (DAWIDSON e cols., 1999).

A partir de 1970, os efeitos e mecanismos de ação da acupuntura passaram a ser estudados cientificamente. Entretanto, sua difusão vem ocorrendo particularmente a partir de 1990, possibilitando o seu uso terapêutico (ULETT e cols., 1998; HUANG e cols., 2002).

A ação da acupuntura está associada à utilização de pontos específicos na pele que estão agrupados em meridianos. Estes meridianos são linhas imaginárias que cruzam longitudinalmente as extremidades superiores e inferiores, assim como

o tronco (AHN e cols., 2008). Os pontos de acupuntura, denominados de acupontos, são considerados pontos de baixa resistência elétrica da pele e podem ser localizados por aparelho localizador de pontos aplicado na superfície da pele, que identifica áreas de baixa resistência (CHO e CHUN, 1994). Esses sítios receptivos foram empiricamente determinados ao longo de milhares de anos de prática médica (WANG e cols., 2008a). O acuponto é uma região da pele em que é grande a concentração de terminações nervosas sensoriais (LI e cols., 2005). Essa região está em relação íntima com nervos, vasos sanguíneos, tendões, periósteo e cápsulas articulares (VICKERS e cols., 2002). Estudos morfofuncionais identificaram plexos nervosos, elementos vasculares e feixes musculares como sendo os mais prováveis sítios receptores dos acupontos (BROWN, 2005; KIM, 2006). Outros receptores encapsulados, principalmente o órgão de Golgi do tendão de músculos esqueléticos e bulbos terminais de Krause também participam da condução do estímulo do acuponto ao SNC (HWANG, 1992). Além disso, comparados às áreas adjacentes, os acupontos possuem propriedades elétricas diversas como condutância elevada e menor resistência elétrica (HAN e TERENIUS, 1982; LO, 2002).

A combinação das características descritas torna o ponto de acupuntura extremamente reativo ao pequeno estímulo causado pela inserção da agulha (HAN e TERENIUS, 1982; DOWNS e cols., 2005), modificando a ativação e/ou inibição de diferentes áreas no cérebro (BIELLA e cols., 2001; CHIU e cols., 2003; ZHANG e cols., 2003; LEWITH e cols., 2005).

Os pontos, em geral, utilizados na analgesia cirúrgica são o Zusanli (E36) associado ao Sanyinjiao (BP6) ou Hegu (IG4) ou Quchi (IG11) ou Yanglingquan (VB34). Segundo Chiu e cols. (2003), alguns pontos são conhecidos como

“acupontos analgésicos”, porque, com freqüência, promovem analgesia em humanos e animais. Os mais comuns são: Hegu (IG4), Sanyinjiao (BP6) e Yanglingquan (VB34). Outros, no entanto, são ocasionalmente utilizados para analgesia, como Zulinqi (VB41), Quchi (IG11) e Zusanli (E36) (CHIU e cols., 2003).

Uma especificidade é observada entre os acupontos e a área de analgesia, como o ponto Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) promovendo efeito mais intenso no abdome e em patas posteriores, e o Pianli (P6) e o Sanyangluo (TA8) produzindo analgesia mais intensa no tórax e nos patas anteriores (MEDEIROS e cols., 2003).

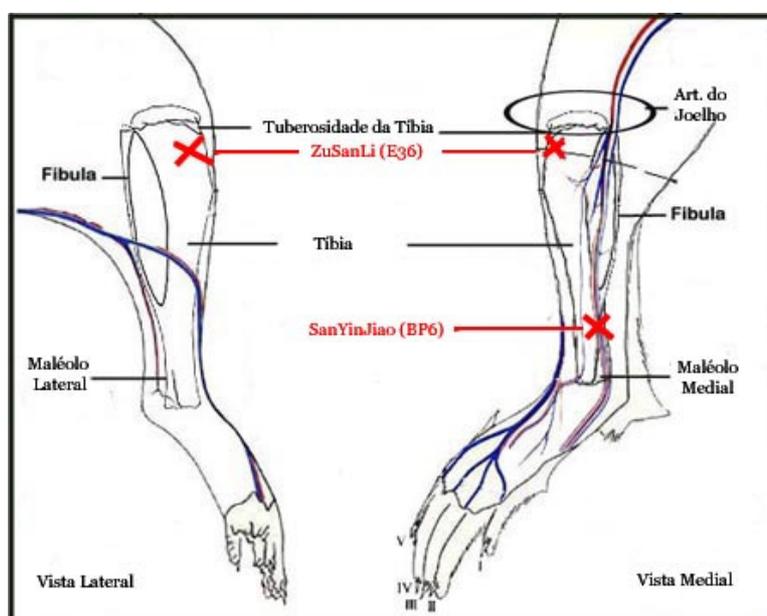


Figura 1 – Modelo esquemático da localização dos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6)

O fato de a acupuntura proporcionar analgesia foi bem estudado por diversos autores (CASSU, 2002; HSIEH e cols., 2001; HAN, 2004; HE, 1985), mas outros resultados de sua aplicação em outras situações clínicas não são amplamente divulgados, sendo o seu uso ainda limitado. As pesquisas elucidam alguns dos mecanismos de ação da acupuntura, porém nem todos os seus efeitos e

mecanismos de ação são explicados (LANGEVIN e cols., 2001; MAYER, 2000), sendo necessários mais estudos experimentais e clínicos.

Sims (1997) demonstrou que a analgesia induzida pela acupuntura (AIA) envolve modulação central. Modelos atuais demonstram que quando o ponto de acupuntura é estimulado, fibras grossas ($A\beta$) e finas ($A\delta$) são estimuladas seletivamente, resultando em ativação de neurônios espinais (LEE e BEITZ, 1993) que transmitem a informação ao SNC (FUKAZAWA e cols., 2005), onde vários núcleos podem ser ativados (TODA, 1982; TAKESHIGE e cols., 1992; LEE e BEITZ, 1993; MEDEIROS e cols., 2003a, 2003b; GUO e cols., 2004; GUO e LONGHURST, 2007). Esses núcleos, principalmente a SCP e NMR parecem ser importantes na AIA (LIU e WANG, 1988), pois sua estimulação inibe neurônios multirreceptivos profundos da medula espinhal através de suas projeções espinais que descendem pelo funículo dorsolateral (DLF) (SANDKÜHLER e GEBHART, 1984; KOVOLOWSKI, 1999; SANDKÜHLER, 1996; ABBOTT e cols., 1996; GEBHART, 2004; LEE e cols., 2007; LIA e cols., 2007).

1.5 Eletroacupuntura e neurotransmissores medulares

A eletroacupuntura (EA) é definida como sendo a estimulação das agulhas de acupuntura com um aparelho gerador de impulsos elétricos (KIM e cols., 2004).

A transmissão da informação nociceptiva está sujeita a modulação em nível espinal por diferentes sistemas. No passado, a identificação dos neurotransmissores e da farmacologia das sinapses que poderiam mediar a transmissão aferente nociceptiva foi parcialmente revelada (YAKSH e cols., 1985).

Dentre os receptores espinais que modulam o processamento nociceptivo estão os receptores opióides, que exercem influência modulatória importante na condução do estímulo nocivo (ver revisão de ZHAO, 2008).

A administração sistêmica de baixas doses de opióides suprime a atividade de neurônios nociceptivos espinais. Os opióides endógenos têm um papel importante na AIA visto que a administração de naloxona, antagonista opióide inespecífico, atenua a ação analgésica da acupuntura (MAYER, e cols.1971; CHENG e POMERANZ, 1981; TAKAGI e cols., 1996).

A EA induz a liberação de opióides endógenos da glândula pituitária para o plasma e é suficientemente capaz de induzir analgesia. Vários estudos demonstram que a EA de baixa frequência (2 Hz) aumenta os níveis liquóricos espinais de encefalina, mas não os de dinorfina A. Já a EA de alta frequência (100 Hz) eleva os níveis liquóricos espinais de dinorfina A, mas não altera os níveis de encefalina (HAN, 2003, 2004; HAHM, 2007). Alguns estudos ainda demonstram que a β -endorfina e a endomorfina produzem efeitos similares aos da estimulação de baixa frequência (HAN e cols., 1999). Com isso, pode-se sugerir que a EA de alta frequência produz analgesia pela liberação de dinorfina A, agonista em receptores opióides κ , enquanto a estimulação de baixa frequência libera endomorfina e β -endorfina, agonistas em receptores opióides δ e μ , e encefalinas (HUANG e cols., 2000; HAN, 2004).

Além da liberação espinal de dinorfinas (HAN e cols., 1999), a EA de alta frequência libera também substâncias não opióides como serotonina (CHENG e POMERANZ, 1981; HAN e TEREINIUS, 1982; CHANG e cols., 2004), noradrenalina e dopamina (CHENG e POMERANZ, 1981, ZHU e cols., 1997; KIM e cols., 2005),

glutamato (ZHANG e cols., 2003), acetilcolina (BAEK e cols., 2005) e ácido gama-aminobutírico (GABA) (HAN, 1982, FUSUMADA e cols., 2007).

A EA ativa fibras nervosas mielinizadas encontradas nos músculos, as quais enviam sinais elétricos para o corno posterior da medula e vários sítios suprasegmentares como córtex, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, ponte e bulbo para produzir inibição espinal da nocicepção. (TAKAGI e cols., 1996; GEBHART, 2004). Na medula espinal as encefalinas e as dinorfinas podem bloquear os sinais aferentes (MUNGLIANI e HUNT, 1995; XING e cols., 2007). No mesencéfalo, as encefalinas podem ativar sistemas descendentes inibitórios, que inibem a transmissão nociceptiva medular através da liberação espinal de monoaminas (PORRECA e cols., 2002; ZHANG e cols., 2005). No sistema pituitária-hipotálamo, a EA pode estimular a liberação de beta-endorfina no sangue para produzir analgesia à distância (WANG e cols, 2008a).

O bloqueio da SCP por naloxona ou anticorpos para receptores μ ou δ atenua significativamente a analgesia induzida pela EA (HAN e cols., 1999; LIU e WANG, 1988). Similarmente, microinjeção de naloxona na área pré-óptica, habenula, área septal, núcleo accubens, amígdala ou no núcleo caudado também bloqueia o efeito da EA (HE e cols., 1985; WU e cols., 1995; ZHANG e cols., 2005).

O mecanismo noradrenérgico parece também representar um importante papel na AIA (ver revisão de ZHAO, 2008), pois os receptores noradrenérgicos também participam do processamento nociceptivo medular. A administração iontoforética de agonistas adrenérgicos na medula espinal produz forte supressão da informação nociceptiva. Também, a administração intratecal de agonistas adrenérgicos induz intensa analgesia, principalmente pela ação farmacológica em receptores α_2 (YAKSH e cols., 1985).

A síntese e a liberação de noradrenalina estão aumentadas no SNC tanto pela acupuntura quanto pela EA. Koo e cols., (2007) demonstraram que a analgesia induzida pela EA (2 Hz) foi completamente bloqueada pela injeção sistêmica de fentolamina (antagonista α -adrenérgico não seletivo) ou injeção intratecal de ioimbina (antagonista α_2 -adrenérgico), mas não por terazosina (antagonista α_1 -adrenérgico), o que é sugestivo de que a analgesia por EA é mediada por receptores α_2 -adrenérgicos na medula espinal (KOO e cols, 2007).

Os receptores serotoninérgicos também são importantes no controle descendente inibitório da nocicepção. O papel fisiológico e farmacológico da serotonina na dor e na analgesia foi demonstrado por Messing e Lytle (1977). Vias descendentes originárias da SCP utilizam o NMR como estação intermediária. O NMR, localizado no tronco cerebral (bulbo) possui fibras que descendem à medula espinal via DLF, liberam principalmente serotonina e terminam em neurônios intrínsecos espinais que contêm encefalina e se localizam no corno dorsal espinal (MILLAN, 2002).

Cheng e Pomeranz (1981) observaram que a deficiência de serotonina parece reduzir o efeito analgésico da acupuntura. Posteriormente, foi demonstrado que a estimulação elétrica dos núcleos da rafe aumentam a liberação de serotonina e que os subtipos de receptores de serotonina envolvidos na modulação produzida por EA são 5-HT₁, 5-HT₂, 5HT₃ (TAKAGI e cols., 1996). Os efeitos analgésicos da EA na dor inflamatória induzida por carragenina (LEE e cols., 2005) ou pela formalina (CHANG e cols., 2004) são sensíveis ao bloqueio de receptores serotoninérgicos 5 HT_{1a} , 5 HT₃ e 5HT₂.

Além dos receptores adrenenérgicos, opióides e serotoninérgicos, receptores colinérgicos também participam do processamento nociceptivo espinal. A

administração iontoforética de agonistas colinérgicos no corno dorsal da medula espinal resulta em inibição dos neurônios nociceptivos assim como a administração intratecal de agonistas colinérgicos induz antinocicepção que pode ser revertida por atropina (MYELINSKI e RANDIC, 1977). Têm sido demonstradas relações da EA com a acetilcolina. A injeção intraventricular de hemicolínio, inibidor da síntese de acetilcolina, causa atenuação dose-dependente dos efeitos da EA. Resultado semelhante foi obtido com a administração de atropina. Eserina, em doses que não alteram o reflexo de retirada da cauda, aumenta o efeito da EA (HAN e TERENIUS, 1982). A EA promoveu efeito antinociceptivo sinérgico potente quando associada ao pré-tratamento com neostigmina (BAEK e cols., 2005).

Por fim, o GABA também tem sido considerado um neurotransmissor que participa da AIA, porém a literatura a respeito é muito escassa (McLENNAN e cols, 1977 apud ZHAO, 2008; FUSUMADA e cols, 2007). O GABA é um neurotransmissor na medula espinal que exerce controle pré-sináptico das fibras primárias aferentes. É encontrado em altas concentrações na superfície do corno dorsal da medula, onde existe um denso *input* de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro que serão controladas pré-sinápticamente por neurônios gabaérgicos (JULIUS e BASBAUM, 2001). Estudos farmacológicos têm demonstrado que existem duas subclasses de receptores para o GABA: GABA_A e GABA_B. A administração intratecal de agonistas GABA_A, mas não de agonistas GABA_B produz antinocicepção em modelos de dor fásica em ratos.

Deste modo, torna-se importante investigar se a analgesia induzida pela EA de alta (100 Hz) e baixa (2 Hz) freqüências de fato envolvem vias descendentes de controle de nocicepção e quais seriam os mediadores químicos responsáveis.



Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Com base no exposto, o presente trabalho avalia quais neurotransmissores espinais estariam envolvidos na antinocicepção induzida pela eletroacupuntura de altas e baixas frequências em modelo de dor fásica em ratos.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar se a antinocicepção induzida pela eletroacupuntura de alta e baixa frequência depende da mediação noradrenérgica em receptores α_1 e/ou α_2 da medula espinal;
2. Avaliar se a antinocicepção induzida pela eletroacupuntura de alta e baixa frequência depende da mediação serotoninérgica da medula espinal;
3. Avaliar se a antinocicepção induzida pela eletroacupuntura de alta e baixa frequência depende da mediação colinérgica muscarínica da medula espinal;
4. Avaliar se a antinocicepção induzida pela eletroacupuntura de alta e baixa frequência depende da mediação opióide da medula espinal;
5. Avaliar se a antinocicepção induzida pela eletroacupuntura de alta e baixa frequência depende da mediação GABAérgica da medula espinal;



Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 140-160 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da USP, mantidos em gaiolas com cinco animais, sob ciclo claro/escuro de 12/12h, temperatura entre 22-23°C e livre acesso à comida e água. Os experimentos foram realizados segundo as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (processo 067/2008).

3.2 Injeção intratecal

A técnica utilizada para injeção intratecal foi a descrita por Papir-Kricheli e cols. (1987), na qual cada animal permanecia anestesiado por isoflurano e era realizada tricotomia da região lombar, antes do procedimento da EA. Com a coluna arqueada, uma agulha hipodérmica nº 26 foi inserida no espaço subaracnóide da cauda eqüina medular, perfurando a região medial entre as vértebras L4 e L5 (± 1) num ângulo de aproximadamente 45°. Quando a agulha entrava no espaço subaracnóide, um reflexo caudal era visualizado indicando que a punção estava correta. As drogas foram injetadas num volume de 5µl adicionados de 5µl de azul de metileno, assim, o volume injetado final foi de 10µl (MESTRE e cols. 1994).

3.3 Teste de retirada de cauda

O grau de antinocicepção foi medido pelo teste de retirada da cauda (D'AMOUR e SMITH, 1941) modificado por Azami e cols., (1982). O animal foi gentilmente imobilizado e a porção da cauda, entre 4 e 6 cm de sua extremidade, posicionada sobre um filamento de níquel-cromo que foi aquecido progressivamente (aproximadamente 9°C/segundo) a partir da temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) até atingir temperatura nociva (53°C) em aproximadamente 3 segundos (Figura 1).

O aquecimento foi automaticamente interrompido ao alcançar 6 segundos com intuito de se evitar dano tecidual. Antes do tratamento, os animais foram testados para determinação do limiar basal para o reflexo de retirada de cauda em três medidas consecutivas realizadas a intervalos de 5 minutos. Após a medida basal, os animais foram levemente anestesiados via cone nasal por vaporização de isoflurano (0,5%) em oxigênio (5 ml) em uma capela de exaustão de acrílico (80cm X 60cm X 60 cm) e posicionados em decúbito dorsal para exposição dos pontos de acupuntura a serem utilizados.

Os testes de retirada da cauda foram realizados antes da anestesia (pré-anestesia), determinando a linha de base, após anestesia (pós-anestesia) por isoflurano, e após a eletroacupuntura (pós-eletroacupuntura), sempre a intervalos de cinco minutos por até 30 minutos.

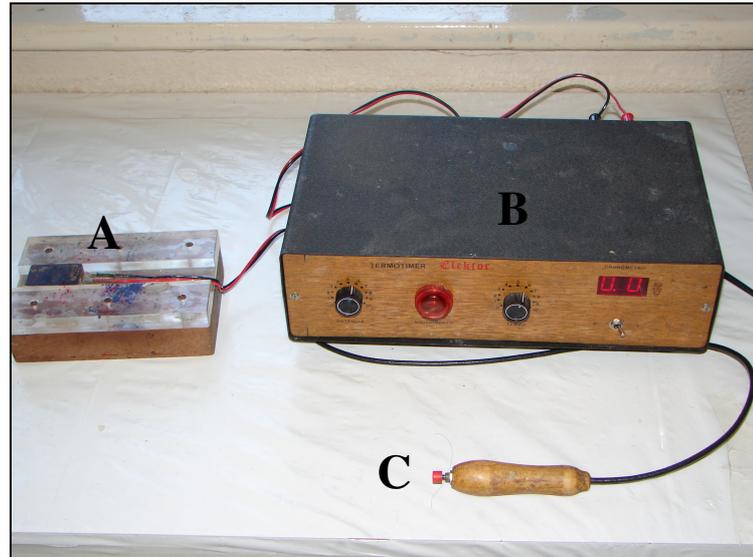


Figura 2 Aparato utilizado para a realização do teste de retirada de cauda: A) plataforma com a espiral de níquel-cromo; B) sistema de controle de aquecimento da espiral e cronômetro digital para marcar as latências; C) acionador do aquecimento da espiral e do cronômetro.

3.4 Eletroacupuntura

Com os animais levemente anestesiados por vaporização de Isoflurano (0,5%), o procedimento de eletroacupuntura iniciou-se com aplicação nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ambas as patas (CASSU e cols., 2008) com agulhas de acupuntura (DBC, de 0,15 mm de espessura e 25 mm de comprimento) (Figura 2). Para a execução da eletroestimulação foi utilizado o aparelho EL 608 (NKL) com frequência de 2Hz ou 100 Hz, largura de pulso de 500 μ s, duração 20 minutos, e intensidade ajustável a cada animal no limiar de contração muscular (entre 0,7 a 1,0 mV) (Figura 3). Animais falso-estimulados (EA sham) foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto que o aparelho de eletroacupuntura foi mantido desligado durante os 20 minutos de falsa estimulação.

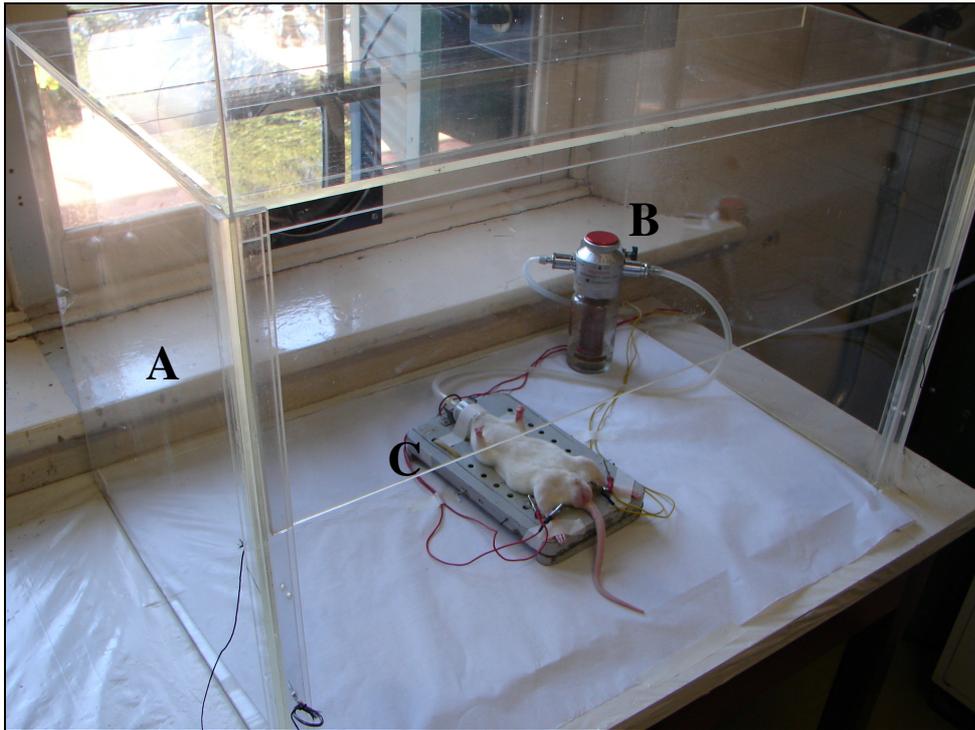


Figura 3 Aparato utilizado para a realização da eletroacupuntura: A) capela de acrílico com exaustor; B) vaporizador de anestésico volátil; C) plataforma para fixação do animal para realização da eletroacupuntura.



Figura 4 Posição das agulhas de acupuntura nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) com eletrodos do aparelho.

3.4.1 Método para identificar animais não-respondentes a eletroacupuntura

Os animais normais podem ser classificados em não-respondentes, pouco respondentes e respondentes, conforme a magnitude da resposta analgésica à EA (TANG e cols., 1997). Para proceder à classificação dos animais de acordo com a resposta analgésica foi realizado um pré-teste 7 dias antes da injeção intratecal.

Antes do pré-teste, os animais foram testados para determinação do limiar basal para o reflexo de retirada de cauda e o procedimento de EA executado como descrito anteriormente. Durante a EA os animais foram avaliados no teste de retirada da cauda nos minutos 5 e 10. Os animais foram classificados como não respondentes e excluídos do estudo quando a resposta no minuto 10 não estivesse acima de 100% da resposta basal (TANG e cols., 1997).

3.5 Histologia

Terminados os testes, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg, i.p.) sacrificados e transeccionados logo acima do local correspondente à injeção intratecal. No corte, a presença de corante no canal vertebral foi considerada como indicativo de local correto de injeção. Apenas os animais com a injeção intratecal posicionada corretamente foram considerados para análises posteriores.

3.6 Drogas

- Isoflurano (Abbott, São Paulo, SP, Brasil)
- Tiopental sódico (Tionembutal, Abbott)

Material e métodos

- Hidrocloridrato de WB 4101 (RBI): antagonista α_1 -adrenérgico. Dissolvido em salina. A dose utilizada foi de 10 μ g/5 μ L (FANG e PROUDFIT, 1998).
- Idazoxam (RBI): antagonista α_2 -adrenérgico. Dissolvido em salina. A dose utilizada foi de 50 μ g/5 μ L (FANG e PROUDFIT, 1998).
- Sulfato de atropina (Sigma): antagonista colinérgico muscarínico. Dissolvido em salina. A dose utilizada foi de 20 μ g/5 μ L (YOON e cols., 2003).
- Maleato de metisergida (RBI): antagonista serotoninérgico. Dissolvido em salina. A dose utilizada foi de 30 μ g/5 μ L (BARBARO e cols., 1985).
- Hidrocloridrato de naloxona (RBI): antagonista opióide. Dissolvido em salina. A dose utilizada foi de 20 μ g/5 μ L (YU e cols., 2002).
- Metiodato de bicuculina (RBI): antagonista GABA_A. Dissolvido em salina. A dose utilizada foi de 0,3 μ g/5 μ L (KAWAMATA e cols., 2002).
- Faclofeno (Sigma): antagonista GABA_B. Dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 5%. A dose utilizada foi de 20 μ g/5 μ L (ARAN e HAMMOND, 1991).

3.7 Protocolo experimental

Os animais previamente selecionados como respondentes foram divididos em grupos EA e EAsham, conforme descrito abaixo e resumido em quadro resumo apresentado a seguir.

Grupos EA

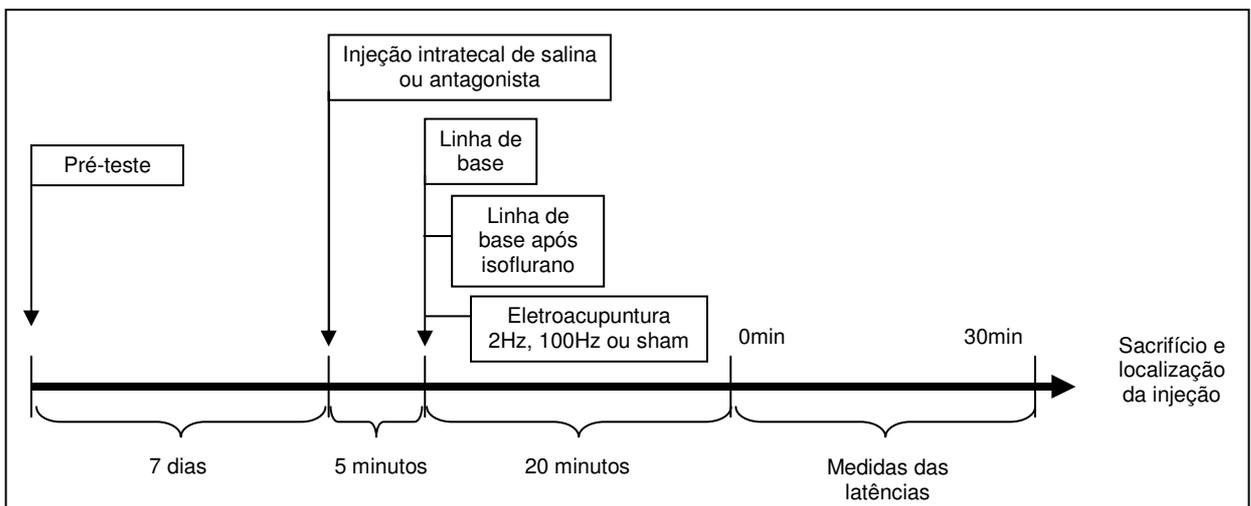
Os animais destes grupos foram submetidos ao registro do limiar basal no teste de retirada de cauda. Em seguida os animais receberam injeção intratecal de salina ou WB 4101 (antagonista α_1 -adrenérgico), idazoxam (antagonista α_2 -

Material e métodos

adrenérgico), atropina (antagonista colinérgico muscarínico), metisergida (antagonista serotoninérgico), naloxona (antagonista opióide), bicuculina (antagonista GABA_A), ou faclofeno (antagonista GABA_B). Cinco minutos mais tarde os animais foram levemente anestesiados por isoflurano e em seguida submetidos a 20 min de EA com freqüência de 2Hz ou de 100Hz nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) bilateralmente, sendo em seguida avaliadas as latências de retirada de cauda. Após execução do teste os animais foram sacrificados e realizada a confirmação do local de administração das drogas.

Grupos Sham EA

Os mesmos procedimentos foram aplicados para os grupos que receberam injeção intratecal de antagonista ou salina e receberam EA com o aparelho desligado (Sham EA).



3.8 Análise estatística

Os efeitos da EA no teste de retirada de cauda nas diferentes condições experimentais foram avaliados por análise de variância multivariada (MANOVA). Os fatores analisados foram tratamentos, tempo e interação tratamento-tempo. No caso de diferença significativa entre tratamentos e/ou interação tempo-tratamento significativa, os dados para cada tempo foram submetidos à análise de variância (One-Way) seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SPSS/PC⁺.



Resultados

4 RESULTADOS

4.1 A acetilcolina participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta freqüência no teste de retirada de cauda?

A EA de baixa freqüência aplicada em animais tratados com salina (Salina/EA2Hz, n=6) promoveu aumento da latência de retirada de cauda para 6,0 s e que se manteve acima de 5,5 s nos 30 minutos seguintes à EA (Fig. 5). Animais tratados com salina e submetidos à falsa EA (Salina/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração na latência no teste de retirada de cauda.

Animais tratados com atropina (20µg/10µL, i.t.) e submetidos à falsa EA (Atropina/Sham EA, n=6) exibiram diminuição significativa das latências a partir dos 15 min posteriores à EA assim mantendo-se até os 30 min (Fig. 5). Animais pré-tratados com atropina submetidos à EA de baixa freqüência (Atropina/EA2Hz, n=6) não apresentaram alterações das latências no período avaliado, i.e., a hiperalgesia térmica produzida pela atropina foi impedida pela EA. As latências basais médias obtidas para os quatro grupos experimentais não foram significativamente diferentes.

As curvas da Figura 5 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 116,60$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 67,04$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 28,06$; $p < 0,001$).

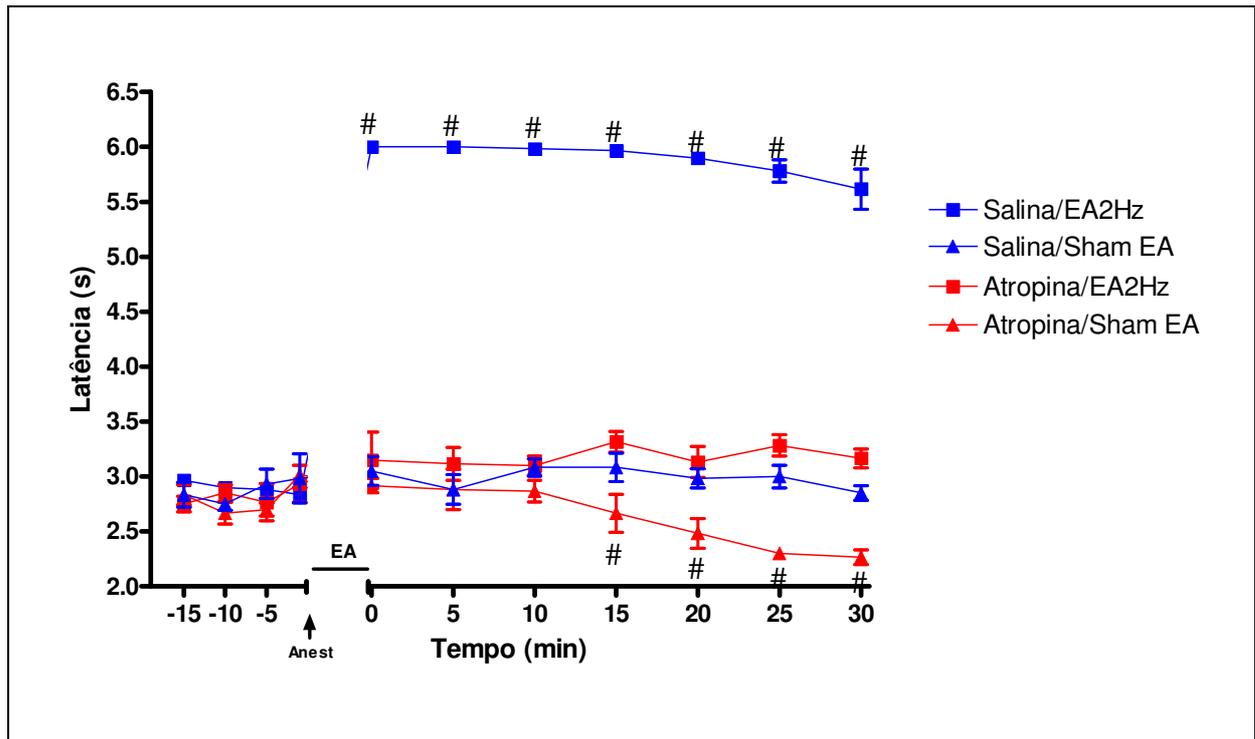


Figura 5 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos (EA). Atropina (20 μ g/10 μ L, i.t.) ou salina (10 μ L) foram administradas 10 minutos antes da EA. Seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos (P < 0,05).

Resultados

A EA de alta frequência aplicada a animais tratados com salina (Salina/EA100Hz, n=6) produziu aumento da latência de retirada de cauda. Diferentemente do produzido pela EA de baixa frequência, observou-se queda importante do efeito já aos 10 minutos após o final da EA e duração menor do efeito analgésico que, no entanto, manteve-se significativamente diferente do grupo falso estimulado (Salina/Sham EA, n=6) por todo o período de experimentação.

A EA de alta frequência aplicada a animais pré-tratados com atropina (Atropina/EA100Hz, n=6) produziu efeito menor e de duração mais curta do que nos animais controles. Animais pré-tratados com atropina e submetidos à falsa EA (Atropina/Sham EA) exibiram diminuição significativa das latências a partir dos 15 min de avaliação, mantendo-se abaixo do controle até os 30 min.

As curvas da Figura 6 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 116,60$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 67,04$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 28,06$; $p < 0,001$).

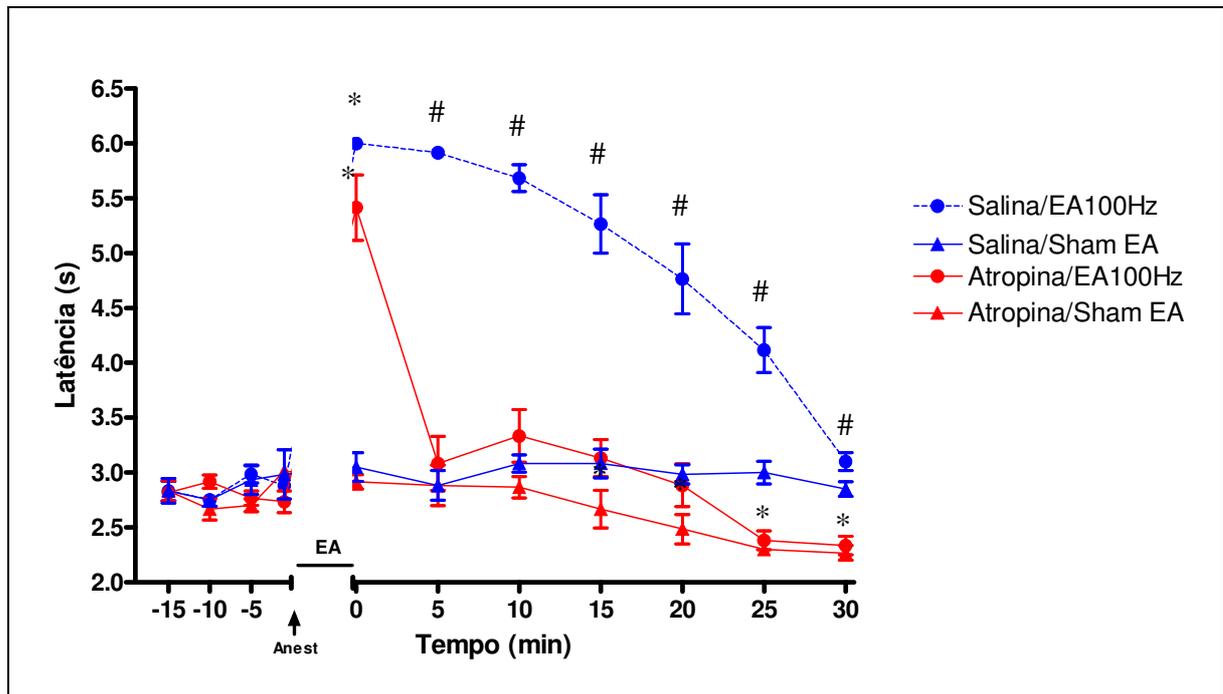


Figura 6 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido após aplicação de eletroacupuntura de alta frequência (100 Hz) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos. A atropina (20 μ g/10 μ L, i.t.) ou salina (10 μ L) foram administradas 10 minutos antes da EA. EA indica o período de eletroacupuntura e seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). (*) diferente do grupo Salina/Sham EA ($P < 0,05$).

4.2 A serotonina participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?

Na estimulação por baixa frequência em animais que receberam administração de salina (Salina/EA2Hz, n=6) houve um aumento imediato da latência de retirada de cauda, produzindo latências iniciais de 6,0 seg e que se manteve acima dos 5,5 segundos nos trinta minutos posteriores à EA (Fig. 7). Os animais que receberam administração de salina e foram submetidos ao protocolo de falsa EA (Salina/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração na latência no teste de retirada de cauda.

Animais tratados com metisergida (30µg/10µL, i.t.) e submetidos à falsa EA (Metisergida/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração significativa das latências (Fig. 5). Animais pré-tratados com metisergida submetidos à EA de baixa frequência (Metisergida/EA2Hz, n=6) não apresentaram alterações no efeito máximo nos tempos 0, 5 e 10 mas o efeito foi de duração mais curta do que nos animais controles.

As curvas da Figura 7 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 422,40$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 156,66$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 54,31$; $p < 0,001$).

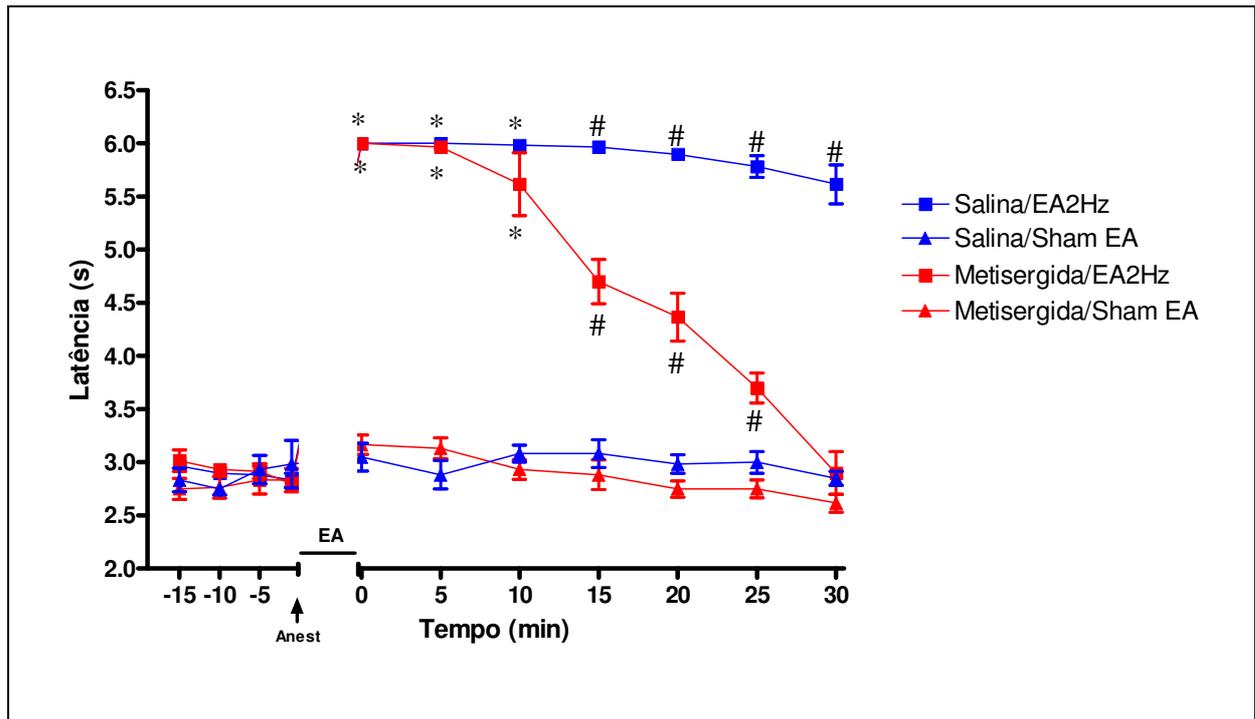


Figura 7 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura (EA) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos. A metisergida ($30\mu\text{g}/10\mu\text{L}$, i.t.) ou salina ($10\mu\text{L}$) foram administradas 10 minutos antes da EA. Seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). (*) diferente do grupo Salina/Sham EA ($P < 0,05$).

A estimulação por alta frequência nos animais que receberam administração de salina (Salina/EA100Hz, n=6) também produziu aumento imediato da latência de retirada de cauda (Fig. 8). Diferentemente do produzido pela EA de baixa frequência, houve queda importante do efeito já 10 minutos após o final da EA e duração menor do efeito analgésico, porém mantendo-se significativamente diferente do grupo falso estimulado (Salina/Sham EA, n=6) por quase todo período de experimentação.

Nos animais que receberam administração de metisergida e protocolo de falsa EA (Metisergida/Sham EA, n=6) não houve alteração das latências. Em animais submetidos ao pré-tratamento com metisergida, a EA com alta frequência (Metisergida/EA100Hz, n=6) produziu latências iniciais semelhantes as do grupo controle estimulado (Salina/EA100Hz, n=6) nos tempos 0 e 5 e queda após esse período com duração mais curta do que nos animais controles.

As curvas da Figura 8 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 116,60$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 67,04$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 28,06$; $p < 0,001$).

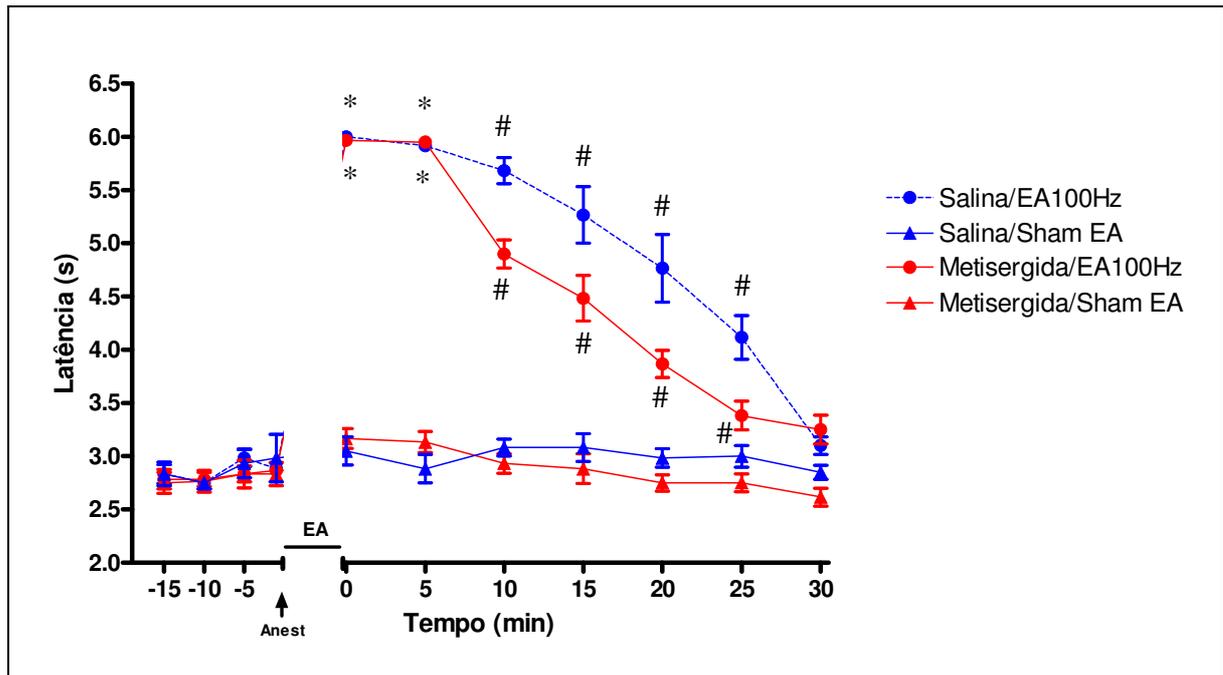


Figura 8 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido após aplicação de eletroacupuntura de alta frequência (100 Hz) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos. A metisergida (30 μ g/10 μ L, i.t.) ou salina (10 μ L) foram administradas 10 minutos antes da EA. EA indica o período de eletroacupuntura e seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 5 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). (*) diferente do grupo Salina/Sham EA ($P < 0,05$).

4.3 O GABA_A participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?

Na estimulação por baixa frequência em animais que receberam administração de salina (Salina/EA2Hz, n=6) houve um aumento imediato da latência de retirada de cauda, produzindo latências iniciais de 6,0 seg e que se manteve acima dos 5,5 segundos nos trinta minutos seguintes à EA (Fig. 9). Animais tratados com salina e submetidos ao protocolo de falsa EA (Salina/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração na latência no teste de retirada de cauda.

Nos animais que receberam pretratamento com bicuculina (0,3µg/10µL, i.t.) e submetidos à falsa EA (Bicuculina/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração das latências. Já animais pré-tratados com bicuculina e submetidos à EA de baixa frequência (Bicuculina/EA2Hz, n=6) apresentaram aumento imediato nas latências de 6,0 seg, no entanto a duração do efeito da EA foi acentuadamente reduzido após 10 min, retornando aos valores basais após 30 minutos. As latências basais médias obtidas para os quatro grupos experimentais não foram significativamente diferentes.

As curvas da Figura 9 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 430,10$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 107,76$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 44,70$; $p < 0,001$).

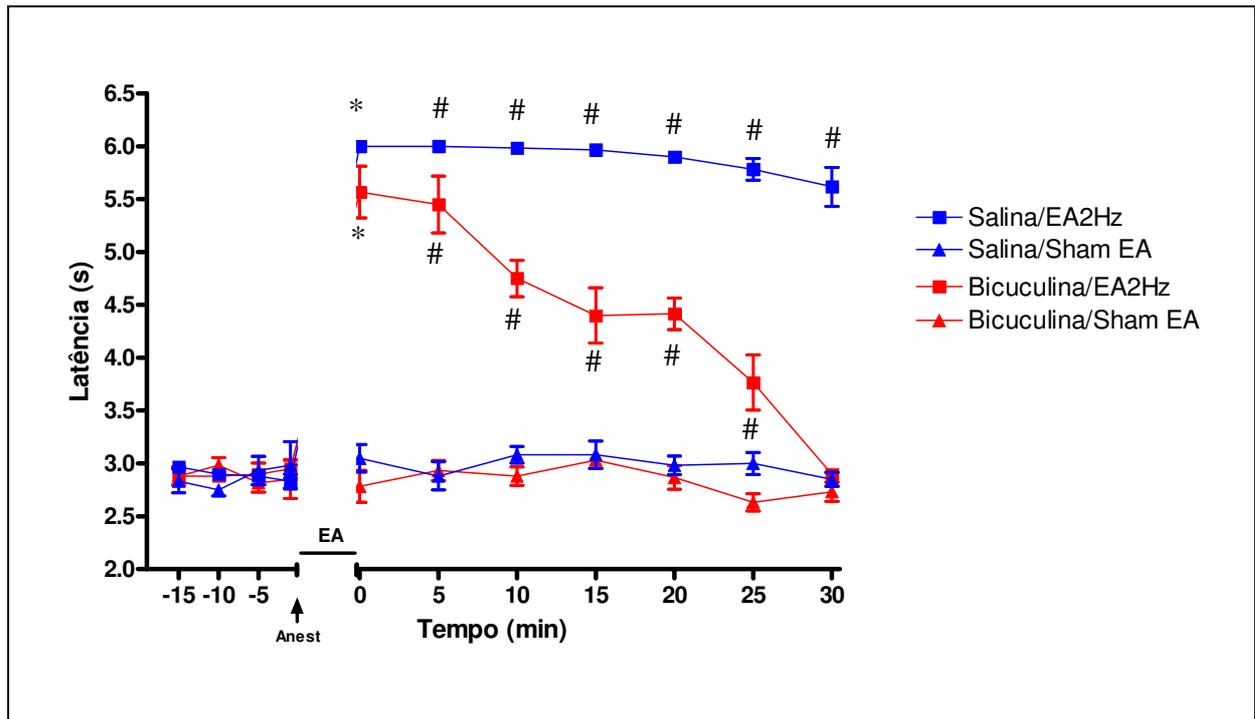


Figura 9 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura (EA) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos. A bicuculina ($0,3\mu\text{g}/10\mu\text{L}$, i.t.) ou salina ($10\mu\text{L}$) foram administradas 10 minutos antes da EA. Seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano ($0,5\%$). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). (*) diferente do grupo Salina/Sham EA ($P < 0,05$).

Resultados

A EA de alta frequência aplicada nos animais tratados com salina (Salina/EA100Hz, n=6) produziu aumento imediato da latência de retirada de cauda (Fig. 10). Diferentemente do produzido pela EA de baixa frequência, observou-se queda importante do efeito já aos 10 minutos após o final da EA e menor duração do efeito analgésico que, no entanto, manteve-se significativamente diferente do grupo falso estimulado (Salina/Sham EA, n=6) por todo o período de experimentação.

A EA de alta frequência aplicada nos animais pré-tratados com bicuculina (Bicuculina/EA100Hz, n=6) produziu aumento imediato nas latências, no entanto a duração do efeito da EA foi mais curta que nos animais controle, acentuadamente reduzida após 10 min não havendo diferença a partir de 15 min de avaliação. Animais pré-tratados com bicuculina e submetidos à falsa EA (Bicuculina/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração das latências

As curvas da Figura 10 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 30,64$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 20,34$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 16,27$; $p < 0,001$).

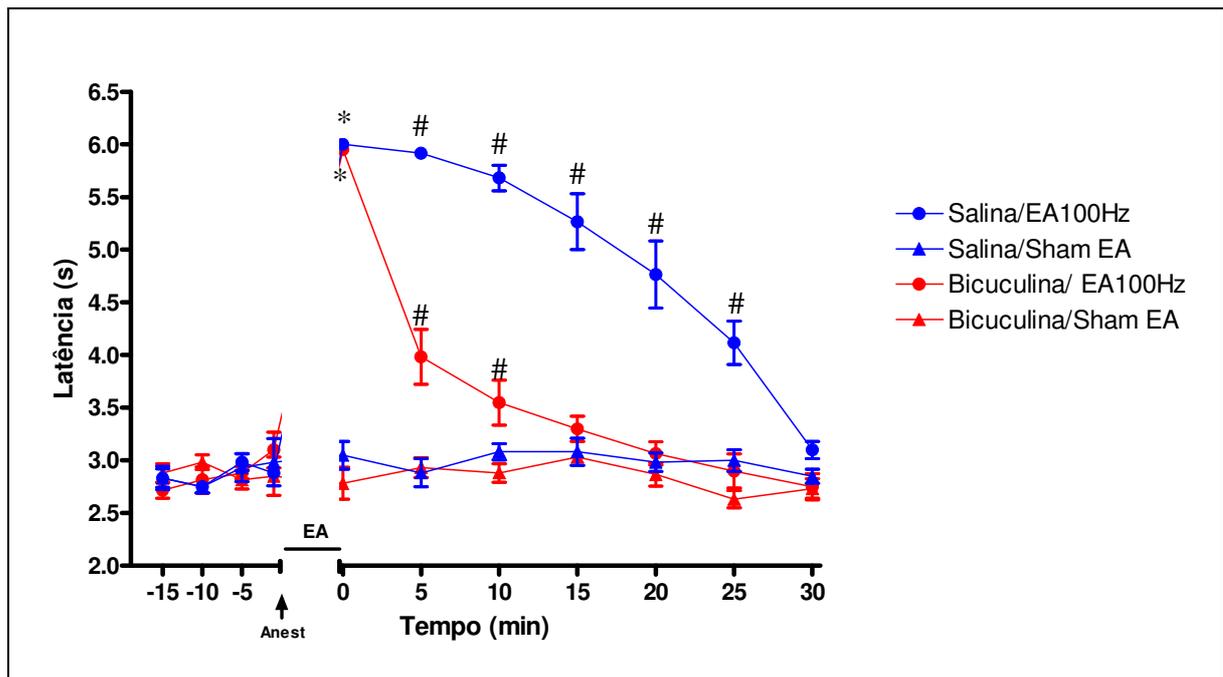


Figura 10 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura (EA) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos. A bicuculina (0,3 μ g/10 μ L, i.t.) ou salina(10 μ L) foram administradas 10 minutos antes da EA. Seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). (*) diferente do grupo Salina/Sham EA ($P < 0,05$).

4.4 O GABA_B participam da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?

A EA de baixa frequência aplicada em animais tratados com salina (Salina/EA2Hz, n=6) promoveu aumento da latência de retirada de cauda para 6,0 s e que se manteve acima de 5,5 s nos 30 minutos seguintes à EA (Fig. 11). Animais tratados com salina e submetidos à falsa EA (Salina/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração na latência no teste de retirada de cauda.

Animais tratados com faclofeno (20µg/10µL, i.t.) e submetidos à falsa EA (Faclofeno/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração das latências. Animais pré-tratados com faclofeno e submetidos à EA de baixa frequência (Faclofeno/EA2Hz, n=6) apresentaram efeito de duração mais curta do que nos animais controles, com diminuição após 5 min do período de avaliação.

As curvas da Figura 11 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 220,11$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 116,44$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 33,84$; $p < 0,001$).

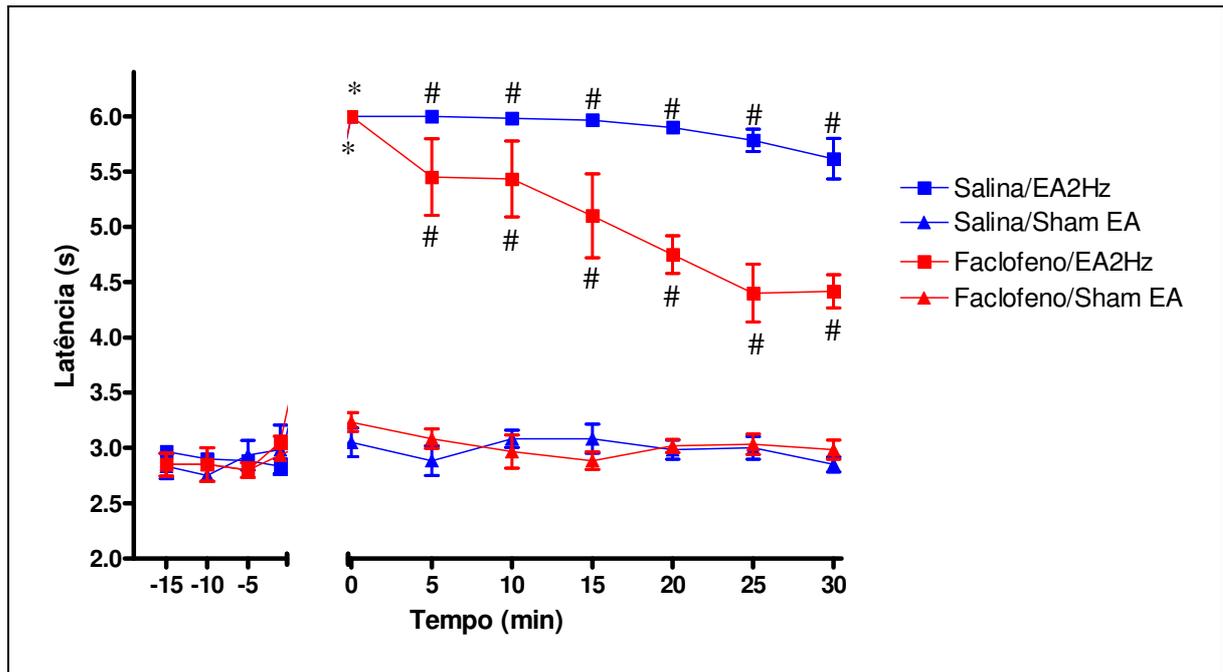


Figura 11 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura (EA) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos. A faclofeno (20 μ g/10 μ L, i.t.) ou salina (10 μ L) foram administradas 10 minutos antes da EA. Seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). (*) diferente do grupo Salina/Sham EA ($P < 0,05$).

Resultados

A EA de alta frequência aplicada a animais tratados com salina (Salina/EA100Hz, n=6) produziu aumento da latência de retirada de cauda (Fig. 12). Diferentemente do produzido pela EA de baixa frequência, observou-se queda importante do efeito já aos 10 minutos após o final da EA e duração menor do efeito analgésico que, no entanto, manteve-se significativamente diferente do grupo falso estimulado (Salina/Sham EA, n=6) por todo o período de experimentação.

A EA de alta frequência aplicada a animais pré-tratados com (Faclofeno/EA100Hz, n=6) Faclofeno (Faclofeno/Sham EA, n=6) produziu efeito de menor intensidade mas de duração mais longa do que nos animais controles. Animais pré-tratados com Faclofeno e submetidos à falsa EA (Salina/EA100Hz) não apresentaram alteração das latências.

As curvas da Figura 12 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 34,35$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 45,54$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 14,34$; $p < 0,001$).

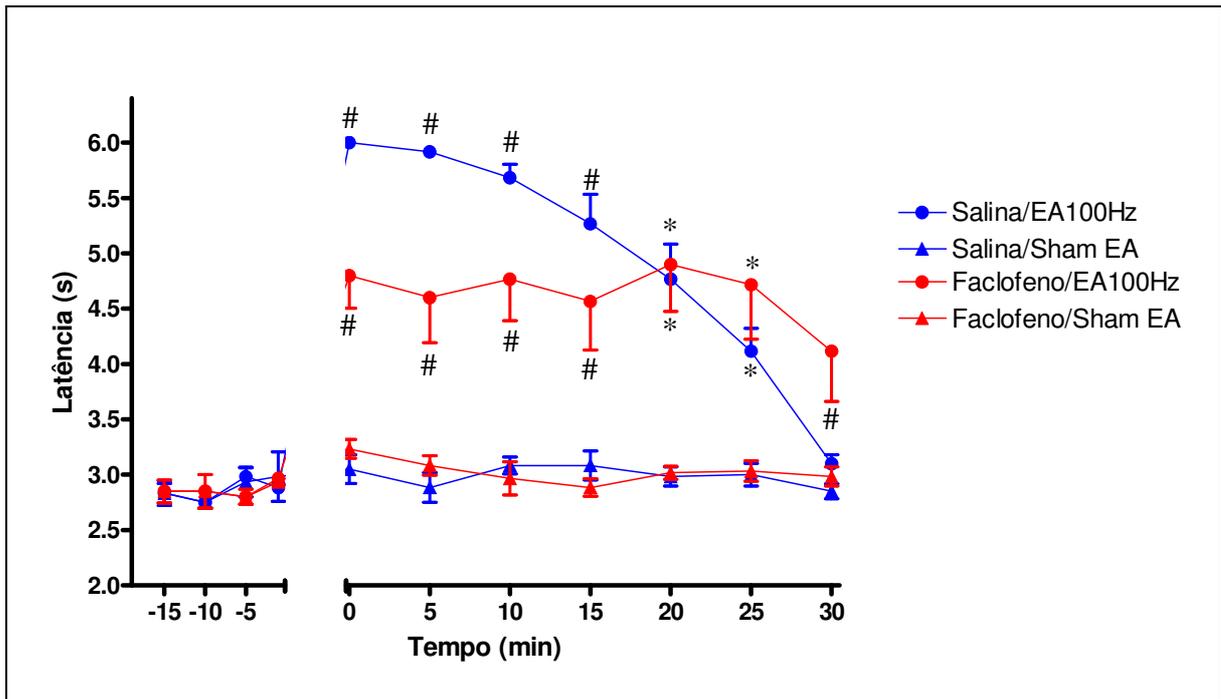


Figura 12 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido após aplicação de eletroacupuntura de alta frequência (100 Hz) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos. O faclofeno (20 μ g/10 μ L, i.t.) ou salina (10 μ L) foram administradas 10 minutos antes da EA. EA indica o período de eletroacupuntura e seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). (*) diferente do grupo Salina/Sham EA ($P < 0,05$).

4.5 A noradrenalina (α 1) participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?

A EA de baixa frequência aplicada em animais que receberam tratamento com salina (Salina/EA2Hz, n=6) promoveu aumento da latência de retirada de cauda para 6,0 seg e que se manteve acima dos 5,5 segundos nos 30 minutos posteriores à EA (Fig. 13). Animais tratados com salina e submetidos ao protocolo de falsa EA (Salina/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração na latência no teste de retirada de cauda.

Nos animais que receberam administração de WB4101 (10 μ g/10 μ L, i.t.) e submetidos à falsa EA (WB4101/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração das latências. Animais pré-tratados com WB4101 e submetidos à EA de baixa frequência (WB4101/EA2Hz, n=6) apresentaram efeito menor e de duração mais curta que nos animais controle. O efeito foi acentuadamente reduzido após 10 min, não havendo diferença em relação ao grupo controle a partir dos 15 minutos de avaliação.

As curvas da Figura 13 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 730,82$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 272,37$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 90,18$; $p < 0,001$).

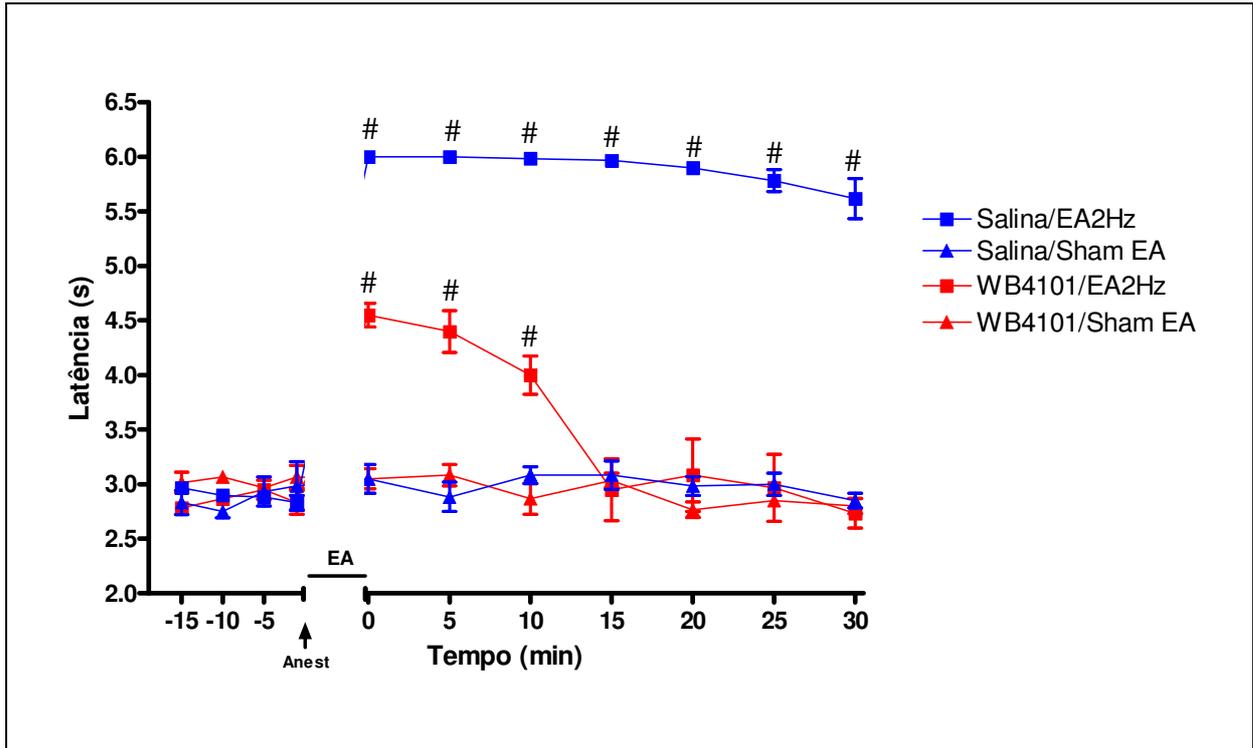


Figura 13 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura (EA) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos. O WB4101 (10 μ g/10 μ L, i.t.) ou salina (10 μ L) foram administradas 10 minutos antes da EA. Seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$).

Resultados

A EA de alta freqüência aplicada a animais tratados com salina (Salina/EA 100Hz, n=6) produziu aumento imediato da latência de retirada de cauda (Fig. 14). Diferentemente do produzido pela EA de baixa freqüência, observou-se queda importante do efeito já aos 10 minutos após o final da EA e duração menor do efeito analgésico que, no entanto, manteve-se significativamente diferente do grupo falso estimulado (Salina/Sham EA, n=6) por todo o período de experimentação.

A EA de alta freqüência aplicada a animais pré-tratados com WB4101 (WB4101/EA100Hz, n=6) produziu efeito semelhante ao do grupo de animais tratados com salina, isto é, queda importante do efeito já aos 10 minutos após o final da EA e duração menor do efeito analgésico que, no entanto, manteve-se significativamente diferente do grupo falso estimulado (Salina/Sham EA, n=6) por todo o período de experimentação. Animais pré-tratados com WB4101 e submetidos à falsa EA (WB4101/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração das latências.

As curvas da Figura 14 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 164,27$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 128,42$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 38,98$; $p < 0,001$).

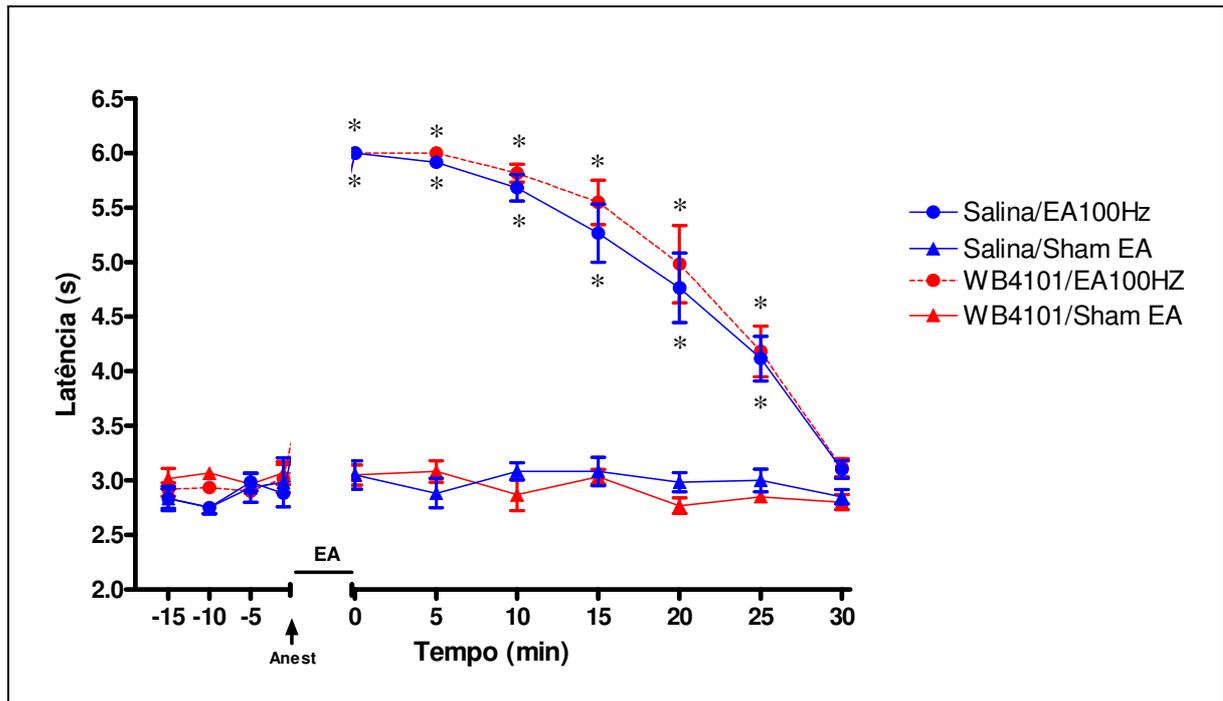


Figura 14 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido após aplicação de eletroacupuntura de alta frequência (100 Hz) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos. O WB4101 (10µg/10µL, i.t.) ou salina (10µL) foram administradas 10 minutos antes da EA. EA indica o período de eletroacupuntura e seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (*) diferente do grupo Salina/Sham EA ($P < 0,05$).

4.6 A noradrenalina (α_2) participa da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?

A EA de baixa frequência aplicada em animais tratados com salina (Salina/EA2Hz, n=6) promoveu aumento da latência de retirada de cauda para 6,0 s e que se manteve acima de 5,5 s nos 30 minutos seguintes à EA (Fig. 15). Animais tratados com salina e submetidos à falsa EA (Salina/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração na latência no teste de retirada de cauda.

Animais tratados com idazoxan (50 μ g/10 μ L, i.t.) e submetidos à falsa EA (Idazoxan/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração das latências. Animais pré-tratados com idazoxan e submetidos à EA de baixa frequência (Idazoxan/EA2Hz, n=6) apresentaram redução do efeito máximo após a EA e duração do efeito menor que do grupo controle, com bloqueio total após 10 min.

As curvas da Figura 15 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 649,57$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 99,61$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 65,99$; $p < 0,001$).

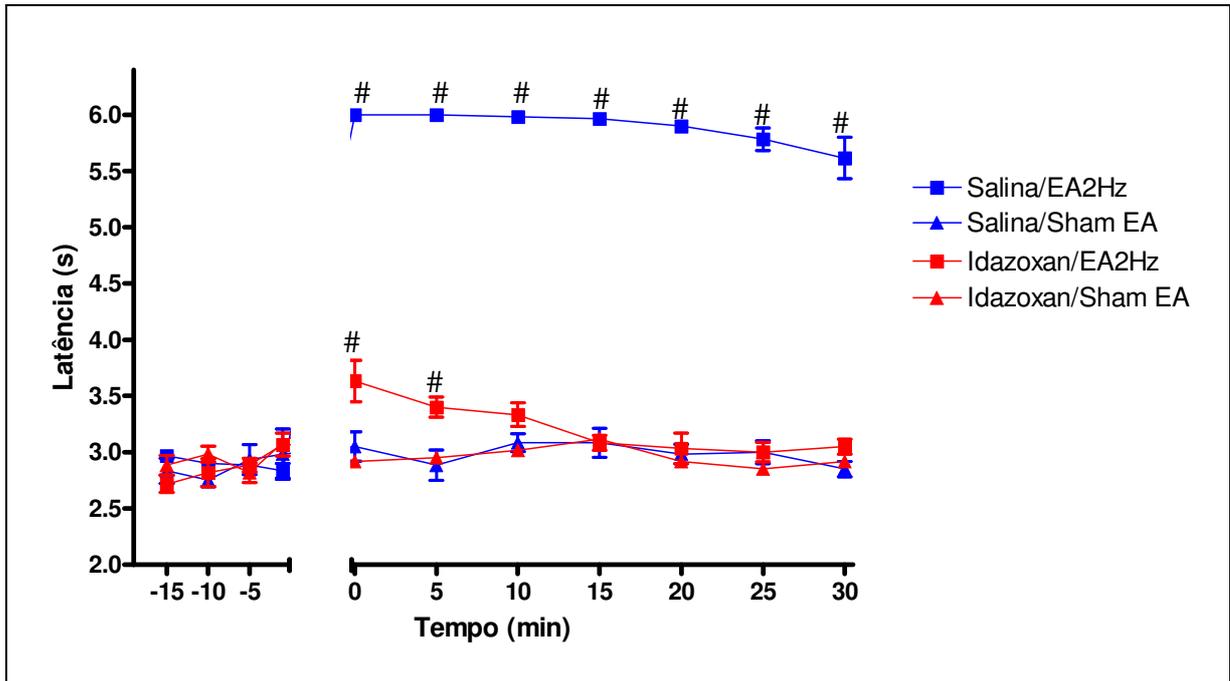


Figura 15 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura (EA) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos. A idazoxan (50µg/10µL, i.t.) ou salina (10µL) foram administradas 10 minutos antes da EA. Seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média ± E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos (P < 0,05).

Resultados

A EA de alta frequência aplicada a animais tratados com salina (Salina/EA100Hz, n=6) produziu aumento da latência de retirada de cauda (Fig. 16). Diferentemente do produzido pela EA de baixa frequência, observou-se queda importante do efeito já aos 10 minutos após o final da EA e duração menor do efeito analgésico que, no entanto, manteve-se significativamente diferente do grupo falso estimulado (Salina/Sham EA, n=6) por todo o período de experimentação.

A EA de alta frequência aplicada a animais pré-tratados com idazoxan (Idazoxan/EA100Hz, n=6) produziu efeito semelhante ao grupo controle (Salina/EA 100Hz), com aumento da inicial da latência e queda importante do efeito já aos 10 minutos após o final da EA. Animais pré-tratados com idazoxan e submetidos à falsa EA (Idazoxan/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração das latências.

As curvas da Figura 16 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 90,15$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 111,84$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 33,47$; $p < 0,001$).

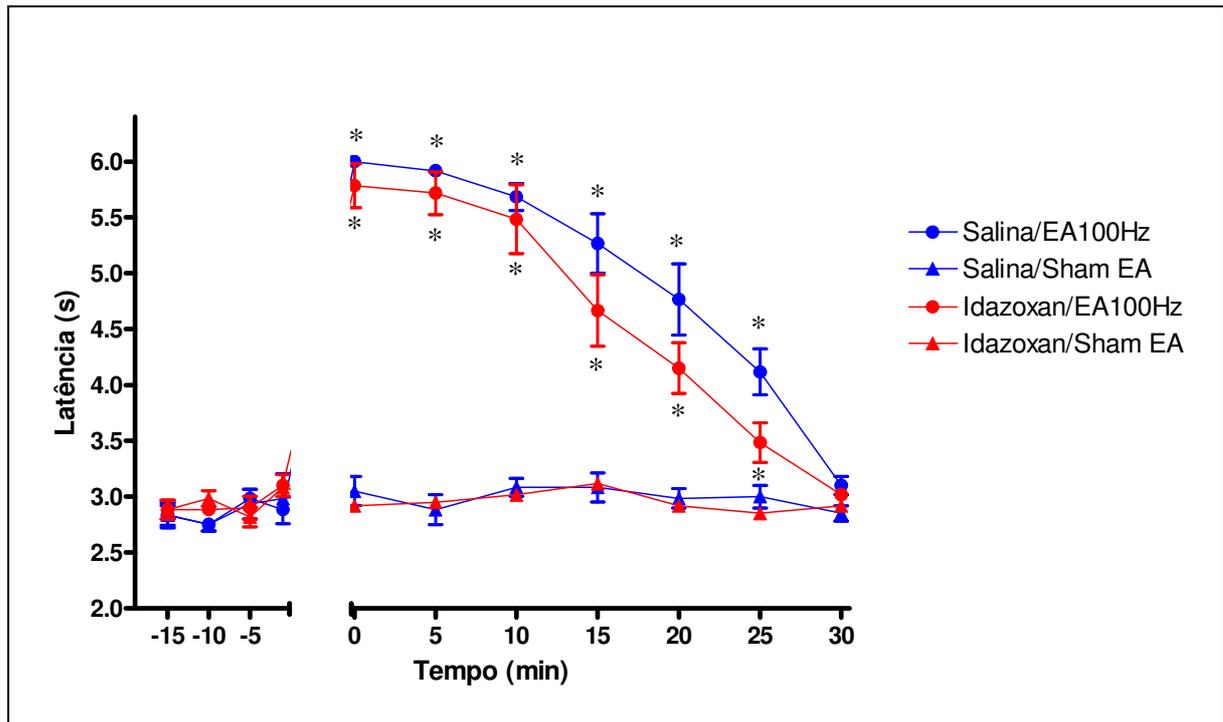


Figura 16 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido após aplicação de eletroacupuntura de alta frequência (100 Hz) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos. O idazoxan (50µg/10µL, i.t.) ou salina (10µL) foram administradas 10 minutos antes da EA. EA indica o período de eletroacupuntura e seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média ± E.P.M. de 6 animais. (*) diferente do grupo Salina/Sham EA (P < 0,05).

4.7 Os peptídeos opióides participam da antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência no teste de retirada de cauda?

A EA de baixa frequência aplicada em animais tratados com salina (Salina/EA2Hz, n=6) promoveu aumento imediato da latência de retirada de cauda para 6,0 s e que se manteve acima dos 5,5 segundos nos 30 minutos posteriores à EA (Fig. 17). Animais tratados com de salina e submetidos ao protocolo de falsa EA (Salina/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração na latência no teste de retirada de cauda.

Animais pré-tratados com Naloxona (20µg/10µL, i.t.) e submetidos à falsa EA (Naloxona/Sham EA, n=6) exibiram bloqueio total do efeito da EA em todo o período de avaliação. Animais pré-tratados com Naloxona e submetidos à EA de baixa frequência (Naloxona/EA2Hz, n=6) não apresentaram alteração das latências. As latências basais médias obtidas para os quatro grupos experimentais não foram significativamente diferentes.

As curvas da Figura 17 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 425,75$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 78,33$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 60,20$; $p < 0,001$).

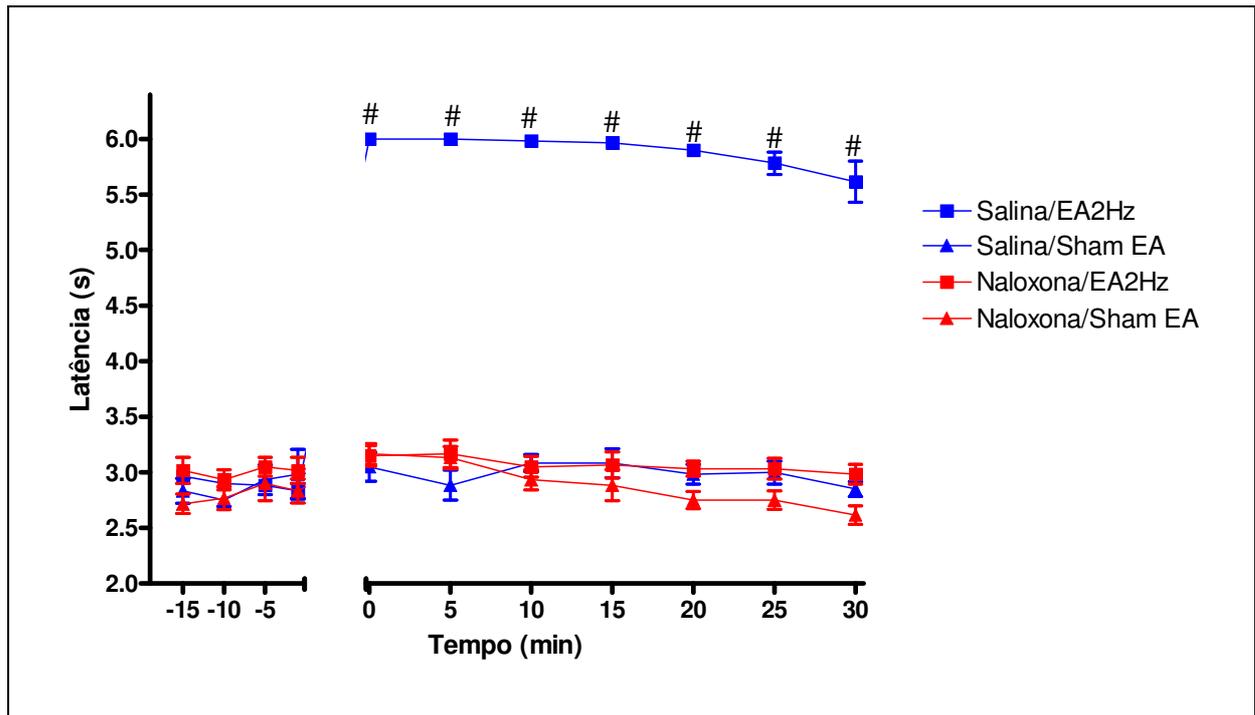


Figura 17 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido pela aplicação de eletroacupuntura (EA) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos durante 20 minutos. A naloxona (20 μ g/10 μ L, i.t.) ou salina (10 μ L) foram administradas 10 minutos antes da EA. Seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média \pm E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$).

Resultados

A EA de alta freqüência aplicada a animais tratados com salina (Salina/EA 100Hz, n=6) produziu aumento imediato da latência de retirada de cauda para 6,0s, no entanto, observou-se queda importante do efeito já aos 10 minutos após o final da EA e duração menor do efeito analgésico que, no entanto, manteve-se significativamente diferente do grupo falso estimulado (Salina/Sham EA, n=6) por todo o período de experimentação (Fig. 18).

A EA de alta freqüência aplicada a animais pré-tratados com naloxona (Naloxona/EA100Hz, n=6) o efeito foi minimamente reduzido em relação ao do grupo controle (Salina/EA100Hz). Animais pré-tratados com naloxona e submetidos à falsa EA (Naloxona/Sham EA, n=6) não apresentaram alteração das latências

As curvas da Figura 18 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,20} = 89,25$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,200} = 86,91$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{30,200} = 22,55$; $p < 0,001$).

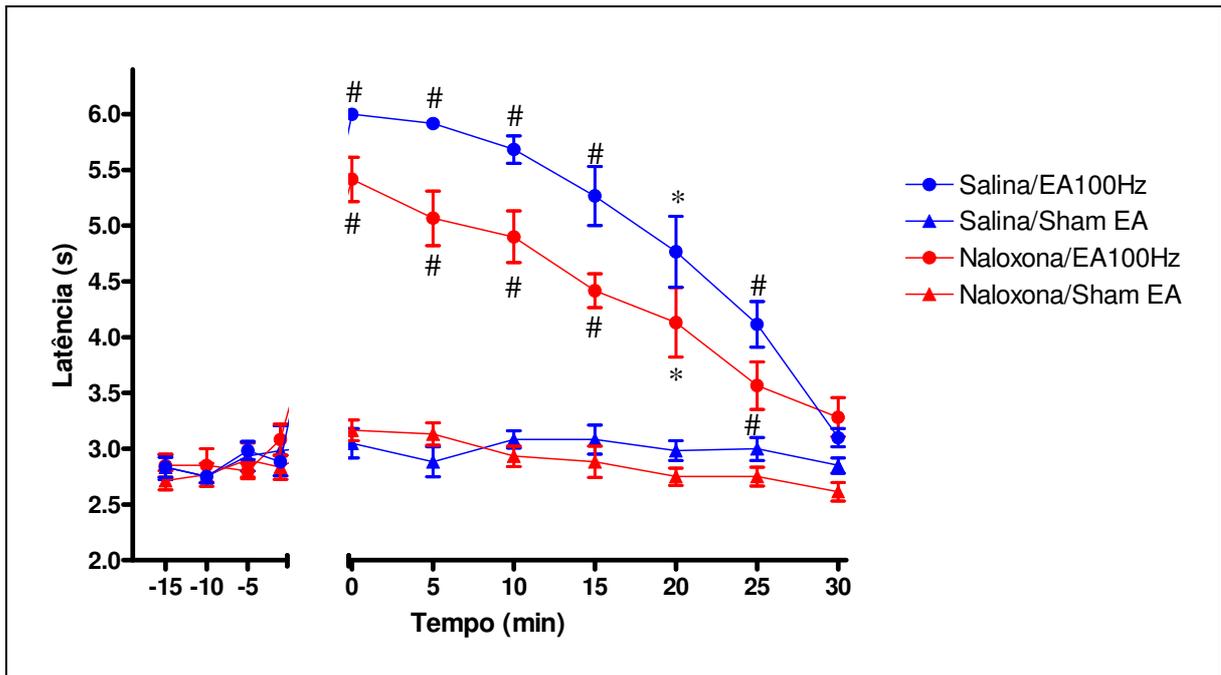


Figura 18 Curvas intensidade-duração do efeito antinociceptivo produzido após aplicação de eletroacupuntura de alta frequência (100 Hz) nos pontos Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) em ratos. O naloxona (20µg/10µL, i.t.) ou salina (10µL) foram administradas 10 minutos antes da EA. EA indica o período de eletroacupuntura e seta indica início da anestesia inalatória com isoflurano (0,5%). Os pontos representam média ± E.P.M. de 6 animais. (#) diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). (*) diferente do grupo Salina/Sham EA ($P < 0,05$).



Discussão

5 DISCUSSÃO

A acupuntura tem sido utilizada na medicina Chinesa há mais de 2.000 anos no tratamento de várias desordens, que podem ser tratadas com o uso de inserção de agulhas longas e finas em pontos específicos da pele (WANG e cols., 2008b). Esta técnica foi aceita na comunidade ocidental como método de tratamento somente a partir da década de 90, quando o NIH (*National Institutes of Health*) publicou um consenso que colocava a acupuntura como parte das intervenções terapêuticas da medicina complementar. Atualmente a OMS (Organização Mundial da Saúde) reconhece a utilização da técnica para o tratamento de 43 tipos diferentes de doenças e a acupuntura é utilizada em mais de 160 países.

A evolução na pesquisa sobre a acupuntura em animais tem sido proporcional a evolução científica e tecnológica mundial, o que proporcionou maior conhecimento das estruturas e atividades do corpo humano através de recursos de imagem como o da ressonância magnética funcional (fMRI) e a tomografia por emissão de pósitron (PET) (BIELLA e cols., 2001; MA, 2004; LEWITH e cols., 2005). Algumas áreas cerebrais são ativadas ou desativadas dependendo do uso de acupuntura manual ou eletroacupuntura em diferentes frequências.

Na experimentação animal muitos tipos de estímulos podem induzir o comportamento de nocicepção, incluindo estímulos químicos, térmicos e mecânicos em tecidos periféricos, além de estimulação elétrica ou lesão de neurônio aferente primário. O modelo de retirada da pata causa nocicepção fásica (ONTTONEN e PERTOVAARA, 2000), é integrado em nível espinal e é sensível a manipulações de

estruturas supraespinais envolvidas com vias descendentes para a medula espinal (MAYER e cols., 1971). Alterações da latência de retirada da cauda devem, então, decorrer da ativação de vias descendentes que modulam a transmissão nociceptiva na medula espinal, uma vez que a retirada de cauda é um reflexo puramente espinal (MILLAN, 2002).

O estresse da manipulação é um fator capaz de alterar o limiar de nocicepção no teste de retirada de cauda (MICZEK e cols., 1986; BRANDÃO e cols., 2000). Para contornar esta limitação, o modelo utilizado para avaliar os efeitos temporais da estimulação pela eletroacupuntura exigiu a anestesia leve dos animais com anestésico inalatório (WEN e cols., 2007). Os resultados obtidos indicam não haver diferenças entre os limiares de resposta no teste antes e logo após o início da anestesia inalatória, sugerindo que o aumento da latência do reflexo de retirada de cauda induzido pela EA ocorreu sem a interferência do fator estresse e sem a participação do anestésico inalatório.

O isoflurano é um agente anestésico geral inalatório halogenado, volátil, e que promove indução e recuperação rápidas do paciente por causa do baixo coeficiente de solubilidade sangue/gás. A concentração alveolar mínima (CAM) — 1,41 nas espécies caninas, e 1,63 nos felinos — proporciona ao isoflurano potência anestésica relativamente alta. O isoflurano sofre biotransformação hepática de apenas 0,2% do anestésico inalado, quantidade insuficiente para provocar dano celular, o que leva à ausência de toxicidade renal ou hepática (EGER, 1984; FANTONI e cols., 1999). Os efeitos cardiovasculares não se alteram com o tempo de exposição ao isoflurano (BERNARD e cols., 1990) e os efeitos cardiorrespiratórios são mínimos, dependendo da dose ministrada desse anestésico. O isoflurano diminui a pressão arterial de maneira dose-dependente, graças ao

decréscimo da resistência vascular sistêmica por meio de efeito estimulante beta-adrenérgico faz cair o débito cardíaco e diminui o tônus simpático (FANTONI e cols., 1999). Também deprime a sensibilidade dos barorreceptores e com isso a frequência cardíaca sofrerá pouca alteração caso ocorra hiper ou hipotensão (EGER, 1984). Com a diminuição da PA, há redução do fluxo sanguíneo periférico e, por conseqüência, da temperatura corporal. O anestésico ainda promove depressão respiratória dose-dependente devido à diminuição da atividade dos quimiorreceptores, o que promove aumento da PaCO₂ e redução do volume-minuto. É potente depressor do SNC, mas promove grau de analgesia leve desde que observada as doses (BERNARD e cols., 1990; FANTONI e cols., 1999). A literatura mostra de forma contundente que a utilização de anestésico inalatório (0,5 a 1,0%) não modifica as respostas do animal à EA (OLIVEIRA e PRADO, 2000; KOO e cols., 2002; MEDEIROS e cols., 2003; KOO e cols., 2007; WEN, 2007).

Como controle do efeito da EA sobre as latências de retirada da cauda dos animais, utilizamos o paradigma de falsa-eletoacupuntura (sham EA). Este recurso varia entre os diferentes autores. Medeiros e cols. (2003a) utilizam como controle a falsa-EA aplicando estímulo elétrico em agulhas propositalmente inseridas fora do acuponto. Já Almeida e cols. (2008) realizam os controles utilizando outros acupontos como forma de comparação. Huang e cols. (2002), do grupo do Dr. Ji-Shen Han da Universidade de Pequim, inserem agulhas nos acupontos, conecta os eletrodos nas agulhas, mas mantém o aparelho desligado no período do experimento, formato que escolhemos para o presente trabalho. Assim, os efeitos observados durante a EA com alta ou baixa frequência parece decorrer da efetiva estimulação elétrica aplicada à agulha, visto que os animais do grupo sham EA não apresentaram alterações nas latências de retirada da cauda.

Para verificar se os animais utilizados neste experimento seriam ou não respondentes à EA, foi realizado pré-teste visando excluir os que não respondiam à técnica. De um total de 240 animais testados, 144 foram respondentes à EA, ou seja, 60% dos animais testados apresentaram elevação do limiar nociceptivo após a EA.

A manifestação ou não de analgesia induzida pela eletroacupuntura ainda é objeto de estudo em vários centros de pesquisa (SEKIDO e cols., 2003; HUANG e cols., 2007). Não se tem certeza sobre o que de fato torna um animal respondente, ou não, à EA. Um experimento que tenta avaliar essas diferenças revelou os diferentes efeitos da antinocicepção induzida pela EA em animais normais e em ratos com inflamação induzida por injeção de carragenina. Os autores demonstraram que em animais que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento com carragenina, a eletroacupuntura pode ou não funcionar. No entanto, todos os animais com hiperalgesia inflamatória, manifestavam antinocicepção quando estimulados com EA (SEIKIDO e cols., 2003).

Nos nossos experimentos, tanto a EA de baixa quanto a de alta frequência promoveu aumento da latência de retirada de cauda, mas a duração do efeito da baixa frequência foi sensivelmente maior do que o da alta frequência. Esses resultados são compatíveis com a noção corrente de que o mecanismo da analgesia por EA difere dependendo da frequência de estimulação utilizada. De fato, experimentos anteriores indicaram a existência de pelo menos dois mecanismos dependentes da frequência: baixas frequências liberam opióides, β endorfina e encefalina, enquanto que altas frequências liberam opióide dinorfina, e noradrenalina, serotonina, acetilcolina e GABA (ROMITA e cols., 1997; HAN, 2003; WANG e cols., 2005; TAGUCHI e TAGUCHI, 2007).

O efeito analgésico da EA de baixa frequência foi bloqueado pelo pré-tratamento com atropina ou naloxona e reduzido pelo pré-tratamento com WB4101, metisergida, faclofeno, bicuculina ou idazoxan. O efeito analgésico da EA de alta frequência foi bloqueado por atropina e reduzido por metisergida, faclofeno, bicuculina e naloxona. O pré-tratamento com WB4101 ou idazoxan não alterou o efeito analgésico da EA de alta frequência.

O efeito da EA de baixa frequência foi bloqueado pelo idazoxam e significativamente reduzido pelo WB4101 (20µg/5µL) em intensidade e duração. Os mesmos antagonistas não alteraram o efeito da EA de alta frequência. Estes resultados são indicativos do envolvimento de receptores α_1 e α_2 no mecanismo da antinocicepção induzida pela EA de baixa frequência.

Resultados semelhantes também já foram observados em diferentes modelos experimentais. Foi demonstrado que o pré-tratamento com idazoxan, mas não com o antagonista α_1 -adrenérgico terazosina diminui a antinocicepção induzida por EA de baixa frequência em ratos com entorse induzido de tornozelo (KOO e cols., 2007). De fato, enquanto a terazosina apresenta alta afinidade para todos os subtipos de receptores α_1 -adrenérgico, o WB 4101 possui maior afinidade para receptores α_{1A} e α_{1C} (BYLUND e cols., 1994). Também foi demonstrado em modelos de dor neuropática, que o bloqueio dos receptores α_2 adrenérgicos diminui o efeito da EA de baixa mas não o de alta frequência. Assim, receptores α_2 têm importante papel na mediação dos efeitos da EA de baixa frequência na dor neuropática (HWANG, 2002; KIM e cols., 2005, KOO e cols., 2007).

Na medula espinal o sistema noradrenérgico é o maior responsável pela modulação das respostas do organismo a estímulos nocivos (PERTOVAARA, 2006).

Vários autores demonstraram que a antinocicepção pode obtida após a administração intratecal de noradrenalina ou estimulação elétrica de núcleos noradrenérgicos (ver MILLAN, 2002; PERTOVAARA, 2006). A injeção intratecal de metoxamina, agonista α_1 -adrenérgico seletivo, 2-[2,6-dietilfenilamino]-2-imidazolina (ST-91), agonista α_2 -adrenérgico seletivo, ou noradrenalina produz antinocicepção no teste de retirada da cauda e da placa quente (HOWE e cols., 1983). Este efeito foi reduzido pela administração de prazosina ou ioimbina, antagonistas α_1 e α_2 -adrenérgico. Isso demonstra a participação de receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos espinais no efeito antinociceptivo da noradrenalina.

As principais fontes de noradrenalina para a medula espinal são os núcleos bulbares que projetam fibras para as lâminas I e II do corno dorsal da medula espinal (NICHOLSON e cols., 2005). Na medula espinal, a noradrenalina inibe a nocicepção através de três mecanismos: ação inibitória nos receptores α_2 -adrenérgicos nas fibras aferentes primárias (inibição pré-sináptica), pela ação direta em receptores α_2 -adrenérgicos de neurônios de projeção (inibição pós-sináptica), ou pela ativação de receptores α_1 -adrenérgicos de interneurônios inibitórios. (ver revisão de MILLAN 2002; PERTOVAARA, 2006).

Nosso estudo também mostrou que a antinocicepção induzida pela EA de alta frequência não envolve mecanismos α_1 e α_2 -adrenérgicos. Não encontramos estudos anteriores que demonstrem o envolvimento de receptores α ou β -adrenérgicos na antinocicepção induzida pela EA de alta frequência, o que é sugestivo de que a antinocicepção induzida por EA de alta frequência independe de mecanismos noradrenérgicos.

O pré-tratamento dos animais com atropina bloqueou os efeitos da EA de baixa frequência e reduziu a intensidade e a duração dos efeitos da EA de alta frequência, fato que sugere a participação de mecanismos colinérgicos muscarínicos neste efeito. Corroborando nossos resultados, Baek e cols. (2005) demonstraram que a injeção intraperitoneal de atropina bloqueia a antinocicepção induzida por EA de baixa frequência na dor inflamatória de ratos. A administração intratecal de atropina ou pirenzepina, antagonista M₁ seletivo, também bloqueia a antinocicepção induzida pela EA de baixa frequência em modelo de dor neuropática em ratos (BAEK e cols., 2005). No conjunto, estes resultados são favoráveis à participação de receptores muscarínicos espinais, especialmente o subtipo M₁, na mediação do efeito antinociceptivo da EA de baixa e alta frequência.

Ainda, a EA de baixa frequência, mas não a de alta, reduziu a hiperalgesia produzida pela administração intratecal de atropina. A atropina administrada em baixas doses é capaz de induzir analgesia, pelo aumento da liberação de acetilcolina, devido ao bloqueio de autorreceptores colinérgicos. No entanto, atropina em altas doses é capaz de produzir hiperalgesia pelo bloqueio dos receptores M₁ pós-sinápticos (GHELARDINI e cols., 1990). De alguma forma, a EA de baixa frequência modifica esse mecanismo, de modo a impedir a hiperalgesia induzida pela atropina.

Estudos têm relacionado o sistema colinérgico central na modulação da dor (EISENACH, 1999). A acetilcolina promove efeitos antinociceptivos pela ativação de sistemas descendentes inibitórios não-colinérgicos, pela sua própria liberação por vias descendentes inibitórias colinérgicas ou após sua liberação por interneurônios inibitórios no corno dorsal da medula espinal (ver revisão MILLAN, 2002). Os

interneurônios colinérgicos intrínsecos espinais possuem seus corpos celulares predominantemente nas lâminas superficiais do corno dorsal e são as fontes predominantes de acetilcolina na medula espinal (FANG e PROUDFIT, 1996; MILLAN, 2002). A administração intratecal de agonistas colinérgicos muscarínicos ou de inibidores da colinesterase é capaz de promover antinocicepção em ratos, gatos e também no homem, atribuindo-se um mecanismo muscarínico nesta ação analgésica (BARTOLINI e cols., 1992; YAKSH e cols., 1995; HOOD e cols., 1996).

O pré-tratamento dos animais com metisergida (30µg/5µL) reduziu significativamente a duração dos efeitos da EA de baixa e alta frequência sem alterar a intensidade desses efeitos. Tais resultados são indicativos de que mecanismo serotoninérgico contribui para a ativação de circuito reverberante responsável pela longa duração deste efeito.

Estudos demonstram a participação do sistema serotoninérgico na AIA. Chang e cols. (2004) relataram que a administração intracerebroventricular de antagonistas 5HT_{1A} e 5HT₃ reduz significativamente a antinocicepção induzida pela EA de baixa frequência na dor induzida pela formalina. Cheng e Pomeranz (1981) demonstram que a tetrabenazina, depletor de monoaminas, assim como o PCPA (para-chlorophenylalanine methyl ester), depletor de serotonina, reduz a antinocicepção induzida pela EA de alta frequência. Além disso, a administração de 5-hidroxi-triptofano (precursor de serotonina) recupera a antinocicepção induzida pela EA após administração de tetrabenazina.

Altas frequências de EA estão relacionadas também com aumento da liberação de serotonina, particularmente no NMR e na medula espinal (HAN e cols., 1999;; TODA, 1982; ZHU e cols., 2004). Lesões eletrolíticas do NMR ou depleção

seletiva da serotonina por 5,6 diidroxitriptamina (HAN e TERENIUS, 1982), ou bloqueio de receptores serotoninérgicos por cinaserina ou metisergida (CHANG e cols., 2004, KIM e cols., 2005) atenua a analgesia por EA.

O pré-tratamento dos animais com faclofeno (20µg/5µL) reduziu a intensidade da antinocicepção induzida pela EA de baixa freqüência e reduziu a intensidade, mas prolongou a antinocicepção induzida pela EA de alta freqüência, o que sugere que mecanismo mediado por receptores GABA_B, modula negativamente as influências inibitórias produzidas pela EA. Por outro lado, receptores GABA_A devem também participar da antinocicepção induzida pela EA, já que o pré-tratamento dos animais com bicuculina (0,3µg/5µL) diminuiu a intensidade e a duração do efeito de ambas as freqüências. Zhu e cols. (1990, 2002) demonstraram que a administração intratecal de antagonistas de receptores GABA_A e GABA_B bloqueia parcialmente a analgesia por EA. O antagonista GABA picrotoxina reduz, enquanto que o diazepam, potencializador da neurotransmissão GABAérgica, aumenta a efetividade da acupuntura manual (ver revisão de HAN e TERENIUS, 1982).

O GABA é o mais abundante e um dos principais neurotransmissores inibitórios do SNC de mamíferos (GOUDET e cols., 2009). Na medula espinal, o GABA é sintetizado em neurônios presentes principalmente nas lâminas II e III do corno dorsal que são envolvidas principalmente com o processamento da informação nociceptiva (COGGESHALL e CARLTON, 1997).

O GABA produz efeito antinociceptivo mediado por receptores GABA_A e GABA_B, (GOUDET e cols., 2009). A ação inibitória mediada pela ativação do receptor GABA_A, resulta do rápido influxo do ânion Cl⁻ que promove efeito hiperpolarizante transitório, com conseqüente redução da excitabilidade da célula

alvo (BOWERY, 1982). Entretanto, a ação mediada pelo receptor GABA_B decorre da redução das correntes de Ca²⁺ e da inibição da adenilil ciclase (MALCANGIO e BOWERY, 1996).

Nosso resultado com o faclofeno poderia ser explicado pela existência de neurônios GABAérgicos controlando pré-sinápticamente a liberação de neurotransmissores pelos sistemas descendentes inibitórios recrutados durante a EA de alta e baixa frequência.

Por fim, nossos resultados também mostram que o pré-tratamento com naloxona (20 µg/5µL) bloqueou os efeitos da EA de baixa frequência e reduziu de modo não significativo a intensidade e a duração dos efeitos da EA de alta frequência, fato sugestivo de mecanismos opióides tem pouca importância neste efeito, possivelmente com maior participação na EA de baixa do que na EA de alta frequência.

Estudos demonstram que a administração de opióides produz resposta antinociceptiva ou reduz o limiar nociceptivo basal, tanto em roedores quanto em humanos (ver revisão de ZHAO, 2008). Estudos extensivos demonstraram que o efeito antinociceptivo produzido pela eletroacupuntura são antagonizados por naloxona (HE e cols., 1985; ZHANG e cols., 2005). Além disso, a EA de baixa frequência (2 Hz) libera encefalinas na medula espinal, enquanto que a estimulação por alta frequência (100Hz) induz a liberação de dinorfina, indicando que a antinocicepção induzida pela eletroacupuntura é mediada por ativação do sistema opióide endógeno. A administração de naloxona bloqueia completamente a analgesia induzida por morfina, sugerindo que a ativação de receptor opióide é o mecanismo primário associado à produção da analgesia (HAN, 2003; 2004).



Conclusão

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem sugerir as seguintes hipóteses em relação à participação dos neurotransmissores espinais na antinocicepção induzida por eletroacupuntura de baixa e alta frequência:

1. O mecanismo noradrenérgico espinal participa da modulação da intensidade e a da duração da AIA de baixa frequência, mas não de alta frequência;
2. O mecanismo serotoninérgico espinal influencia a duração da AIA de alta e baixa frequência, sem afetar a intensidade do efeito.
3. A mediação colinérgica muscarínica espinal parece ser necessária para a intensidade e a duração da AIA de baixa frequência e para a duração da AIA de alta frequência.
4. O mecanismo opioidérgico espinal parece ser necessário para a AIA de baixa frequência e influencia parcialmente a intensidade da AIA de alta frequência.
5. O mecanismo GABAérgico espinal parece ser necessário para a duração da AIA de baixa frequência e participa da regulação da intensidade e da duração da AIA de alta frequência.



Referências bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, F.V., HONG, Y., FRANKLIN, K.B.J. The effect of lesions of the dorsolateral funiculus on formalin pain and morphine analgesia: a dose-response analysis. **Pain**, 65, 17-23, 1996.
2. AKAIKE, A.; SHIBATA, T.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Analgesia induced by microinjection of morphine into, and electrical stimulation of, the nucleus reticularis paragigantocellularis of rat medulla oblongata. **Neuropharmacology**. 17(9):775-8, 1978.
3. ALMEIDA, R.T., PEREZ, A.C., FRANCISCHI, J.N., CASTRO, M.S., DUARTE, I.D. Opioidergic orofacial antinociception induced by electroacupuncture at acupoint St36. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 41(7): 621-6., 2008.
4. ARAN, S.; HAMMOND, D.L. Antagonism of Baclofen-induced antinociception by intrathecal administration of phaclofen or 2-hydroxy-saclofen, but not δ -aminovaleric acid in the rat. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapy**. 257(1): 360-368, 1991.
5. AZAMI, J.; LLEWELYN, M.B.; ROBERTS, M.H. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. **Pain**. 12 (3): 229-46, 1982.

Referências bibliográficas

6. BAEK, Y.H., CHOI, D.Y., YANG, H.I., PARK, D.S. Analgesic effect of electroacupuncture on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: mediation by cholinergic and serotonergic receptors. **Brain Research**. 28; 1057(1-2): 181-5, 2005.
7. BARBARO, N.M.; HAMMOND, D.L. FIELDS, H.L. Effects of intrathecally administered methysergide and yohimbine on microstimulation-produced antinociception in the rat. **Brain Research**. 343: 223-229, 1985.
8. BARTOLINI, A., GHELARDINI, C., FANTELF, L. Role of muscarine receptor subtypes in central antinociception. **British Journal of Pharmacology**, 105: 7782, 1992.
9. BASBAUM, A.I., JESSEL, T.M., The perception of pain. In: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M. **Principles of neural science**. New York: McGraw Hill; p. 472-91, 2000.
10. BERNARD, J.M., WOUTERS, P.F., DOURSOUT, M.F., FLORENCE, B., CHELLY, J.E., MERIN, R.G. Effects of sevoflurane and isoflurane on cardiac and coronary dynamics in chronically instrumented dogs. **Anesthesiology**; 72: 659-62, 1990.
11. BIELLA, G., SOTGIU, M.L., PELLEGATA, G., PAULESU, E., CASTIGLIONI, I., FAZIO, F. Acupuncture produces central activations in pain regions. **NeuroImage**, 14, 60–66, 2001.

Referências bibliográficas

12. BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDÓSSIO, J.E.; DE ARAÚJO, J.E.; CASTILHO, V.M. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23, 863-875, 2000.
13. BROWN, J.H. Stimulation-produced analgesia: acupuncture, TENS and alternative techniques. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, 6 (2), 45-47, 2005.
14. BONICA, J.J. Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. In: BONICA, J.J. **The management of pain**. London, Lea & Febiger, 2nd ed, 1990.
15. BOWERY, N.G. Baclofen: 10 years on. **Trends in Pharmacology Sciences**. 3: 400-403, 1982.
16. BYLUND, D.B., EIKENBERG, D.C., HIEBLE, J.P., LANGER, S.Z., LEFKOWITZ, R.J., MINNEMAN, K.P., MOLINOFF, P.B., RUFFOLO, R.R., TRENDELENBURG, U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacological Reviews**. 46(2): 121-36, 1994.
17. CALVINO, B., GRILO, R.M. Central pain control. **Joint Bone Spine**. 73 (1), 10-16, 2006.
18. CARPENTER, D.; ENGBERG, I.; LUNDBERG, A. Differential supraspinal control of inhibitory and excitatory actions from the fra to ascending spinal pathways. **Acta Physiologica Scandinavica**, 63:103-10, 1965.

Referências bibliográficas

19. CASSU, R.N., LUNA, S.P.L., CLARK, R.M.O., KRONK, S.N. Electroacupuncture analgesia in dogs: is there a difference between uni- and bi-lateral stimulation? **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, 35, 52-61, 2008.
20. CHANG, F.C., TSAI, H.Y., YU, M.C., YI, P.L., LIN, J.G. The central serotonergic system mediates the analgesic effect of electroacupuncture on ZUSANLI (ST36) acupoints. **Journal of Biomedical Science**, 11 (2), 179-85, 2004.
21. CHENG, R.S., POMERANZ, B. Monoaminergic mechanism of electroacupuncture analgesia. **Brain Research**, 215(1-2), 77-92, 1981.
22. CHIU, J.H., CHUNG, M.S., CHENG, H.C., YEH, T.C., HSIEH, J.C., CHANG, C.Y., KUO, W.Y., CHENG, H., HO, L.T. Different central manifestations in response to electroacupuncture at analgesic and nonanalgesic acupoints in rats: a manganese-enhanced functional magnetic resonance imaging study. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, 67, 94-101, 2003.
23. CHO, S.H., CHUN, S.I. The basal electrical skin resistance of acupuncture points in normal subjects. **Yonsei Medical Journal**, 35 (4), 464-474, 1994.
24. COGGESHALL, R.E., CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Research Reviews**, 24, 28-66, 1997.

Referências bibliográficas

25. DAWIDSON, I., ANGMAR-MÂNSSON, B., BLOM, M., THEODORSSON, E., LUNDEBERG, T. Sensory stimulation (acupuncture) increases the release of calcitonin gene-related peptide in the saliva of xerostomia sufferers. **Neuropeptides**. 33(3): 244-50, 1999.
26. DESALLES, A.A.; KATAYAMA, Y.; BECKER, D.P.; HAYES, R.L. Pain suppression induced by electrical stimulation of the pontine parabrachial region. Experimental study in cat. **Journal of Neurosurgery**. 67:397-407, 1985.
27. D'MELLO, R., DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, 101 (1), 8-16, 2008.
28. DOWNS, N.M., KIRK, K., MACSWEEN, A. The effect of real and sham acupuncture on thermal sensation and thermal pain thresholds. **Arch Phys Med Rehabil**, 86, 1252-1257, 2005.
29. EISENACH, J.C. Muscarinic-mediated analgesia. **Life Sciences**, 64, 549-554, 1999.
30. EGER, EI II. Pharmacology of isoflurane. **British Journal of Anaesthesia**, 56: 71S-99S, 1984.
31. FANG, F.; PROUDFIT, H.K. Spinal cholinergic and monoamine receptors mediate the antinociceptive effect of morphine microinjected in the periaqueductal gray on the rat tail, but not the feet. **Brain Research**. 722:95–108, 1996.

Referências bibliográficas

32. FANG, F.; PROUDFIT, H.K. Antinociception produced by microinjection of morphine in the rat periaqueductal gray is enhanced in the foot, but not the tail, by intrathecal injection of α 1-adrenoceptor antagonists. **Brain Research**. 790:14-24, 1998.
33. FANTONI, D.T., CORTOPASSI, S.R.G., BERNARDI, M.M. Anestésicos inalatórios. IN: SPINOSA, H.S., GÓRNIAC, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.103-13.
34. FUKAZAWA, Y., MAEDA, T., HAMABE, W., KUMAMOTO, K., GAO, Y., YAMAMOTO, C., OZAKI, M., KISHIOKA, S. Activation of spinal anti-analgesic system following electroacupuncture stimulation in rats. **J Pharmacol Sci**, 99, 408-414, 2005.
35. FUSUMADA, K., YOKOYAMA, T., MIKI, T., WANG, Z.Y., YANG, W., LEE, N.S., ENDO, Y., TAKEUCHI, Y. c-Fos expression in the periaqueductal gray is induced by electroacupuncture in the rat, with possible reference to GABAergic neurons. **Okajimas Folia Anatomica Japonica**, 84 (1), 1-9, 2007.
36. GAYNOR, J.S. Acupuncture for management of pain. **The veterinary clinics of north American: small animals practice**. 30(4):875-84, 2000.
37. GEBHART, G.F. Descending modulation of pain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 27, 729-737, 2004.

38. GHELARDINI, C., MALMBERG-AIELLO, P., GIOTTI, A., MALCANGIO, M., BARTOLINI, A. Investigation into atropine-induced antinociception. **British Journal of Pharmacology**. 101(1): 49-54, 1990.
39. GOUDET, C., MAGNAGHIC, V., LANDRYD, M., NAGYD, F., GEREAU, R.W., PINA, J.P. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. **Brain Research Reviews**. 60: 43-56, 2009.
40. GUO, Z.L., MOAZZAMIA, A.R., LONGHURST, J.C. Electroacupuncture induces c-Fos expression in the rostral ventrolateral medulla and periaqueductal gray in cats: relation to opioid containing neurons. **Brain Research**, 1030, 103–115, 2004.
41. GUO, Z.L., LONGHURST, J.C. Expression of c-Fos in arcuate nucleus induced by electroacupuncture: Relations to neurons containing opioids and glutamate. **Brain Research**, 1166, 65-76, 2007.
42. HAGBARTH, K.E.; KERR, D.I. Central influences on spinal afferent conduction. **Journal of Neurophysiology**. 17(3):295-307, 1954.
43. HAHM, T.S. The effect of 2 hz and 100 hz electrical stimulation of acupoint on ankle sprain in rats. **Journal Korean Medicine Science**, 22, 347-51, 2007.
44. HAN, J.S., TERENIUS, L. Neurochemical basis of acupuncture analgesia. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 22, 193-220, 1982.

Referências bibliográficas

45. HAN, J.S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends in Neurosciences**, 26 (1), 17-22, 2003.
46. HAN, J.S. Acupuncture and endorphins. **Neuroscience Letters**, 361, 258-261, 2004.
47. HAN, Z., JIANG, Y.H., WAN, Y., WANG, Y., CHANG, J.K., HAN, J.S. Endomorphin-1 mediates 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture analgesia in the rat. **Neuroscience Letters**, 274, 75-78, 1999.
48. HEAD, H., HOLMES, G.M. Sensory disturbances from cerebral lesions. **Brain**, Oxford, 1911, 34: 102-254.
49. HE, L.F., LU, R.L., ZHUANG, S.Y., ZHANG, X.G., PAN, X.P. Possible involvement of opioid peptides of caudate nucleus in acupuncture analgesia. **Pain**, 23 (1), 83-93, 1985.
50. HOOD, D.D., MALLAK, K.A., EISENNACH, J.C. Interaction between intrathecal neostigmine and Epidural clonidine in humans volunteers. **Anesthesiology**, 85:315-325, 1996.
51. HOWE, J.R.; WANG, J.; YAKSH, T.L. Selective antagonism of the antinociceptive effect of intrathecally applied alpha adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapy**. 224(3): 552-558, 1983.

Referências bibliográficas

52. HSIEH, C.L., KUO, C.C., CHEN, Y.S., LI, T.C., HSIEH, C.T., LAO, C.J., LEE, C.J., LI, J.G. Analgesic effect of electric stimulation of peripheral nerves with different electric frequencies using the formalin test. **American Journal of Chinese Medicine**. 28(2): 291-9, 2000.
53. HUANG, C., WANG, Y., CHANG, J.K., HAN, J.S. Endomorphin and μ -opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture stimulation. **Neuroscience Letters**, 294, 159-162, 2000.
54. HUANG, C., HU, Z.P., JIANG, S.Z., LI, H.T., HAN, J.S., WAN, Y. CCKB receptor antagonist L365,260 potentiates the efficacy to and reverses chronic tolerance to electroacupuncture-induced analgesia in mice. **Brain Research Bulletin**, 71, 447-451, 2007.
55. HUANG, C., WANG, Y., HAN, J.S., WAN, Y. Characteristics of electroacupuncture-induced analgesia in mice: variation with strain, frequency, intensity and opioid involvement. **Brain Research**, 945, 20-25, 2002.
56. HWANG, Y.C. Anatomy and classification of acupoints. **Problems in Veterinary Medicine**, 4 (1) 12-15, 1992.
57. HWANG, B.G., MIN, B., KIM, J.H., NA, H.S., PARK, D.S. Effects of electroacupuncture on the mechanical allodynia in the rat model of neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, 320, 49-52, 2002.

Referências bibliográficas

58. JAGGAR, D. History and basic introduction to veterinary acupuncture. **Problems in Veterinary Medicine**, 4 (1), 1-11, 1992.
59. JULIUS, D., BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413 (6852), 203-210, 2001.
60. KAWAMATA, T.; OMOTE, K.; TORIYABE, M.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Intracerebroventricular morphine produces antinociception by evoking gamma-aminobutyric acid release through activation of 5-hydroxytryptamine 3 receptors in the spinal cord. **Anesthesiology**. 96(5): 1175-82, 2002.
61. KIM, J.H., MIN, B.I., SCHMIDT, D., LEE, H.J., PARK, D.S. The difference between electroacupuncture only and electroacupuncture with manipulation on analgesia in rats. **Neuroscience Letters**, 279, 149-152, 2000.
62. KIM, J.H., MIN, B., NA, H.S., PARK, D.S. Relieving effects of electroacupuncture on mechanical allodynia in neuropathic pain model of inferior caudal trunk injury in rat: mediation by spinal opioid receptors. **Brain Research**, 998, 230-236, 2004.
63. KIM, S.K., PARK, J.H., BAE, S.J., KIM, J.H., HWANG, B.G., MIN, B.I., PARK, D.S., NA, H.S. Effects of electroacupuncture on cold allodynia in a rat model of neuropathic pain: mediation by spinal adrenergic and serotonergic receptors. **Experimental Neurology**, 195 (2), 430-436, 2005.

Referências bibliográficas

64. KIM, J. Beyond paradigm: Making transcultural connections in a scientific translation of acupuncture. **Social Science & Medicine**, 62, 2960-2972, 2006.
65. KOO, S.T, LIM, K.S., CHUNG, K., JU, H., CHUNG, J.M. Electroacupuncture-induced analgesia in a rat model of ankle sprain pain is mediated by spinal α -adrenoceptors. **Pain**, 135 (1-2): 11-9, 2007.
66. KOO, S.T, PARK, Y.I., LIM, K.S., CHUNG, K., CHUNG, J.M. Acupuncture analgesia in a new rat model of ankle sprain pain. **Pain**, 99, 423-431, 2002.
67. KOVELOWSKI, C.J., OSSIPOV, M.H., HRUBY, V.J, PORRECA, F. Lesions of the dorsolateral funiculus block supraspinal opioid delta receptor mediated antinociception in the rat. **Pain**, 83, 115-122, 1999.
68. LANGEVIN, H.M., CHURCHILL, D.L., CIPOLLA, M.J. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. **FASEB Journal**, 15(12): 2275-82, 2001.
69. LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**. 53(4), 597-652, 2001.
70. LEE, J.H., BEITZ, A.J. The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia. **Pain**, 52 (1), 11-28, 1993.

Referências bibliográficas

71. LEE, J.H., CHOI, Y.H., CHOI, B.T. The anti-inflammatory effects of 2 Hz electroacupuncture with different intensities on acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. **International Journal of Molecular Medicine**. 16(1): 99-102, 2005.
72. LEE, S.J., LYU, Y.S., KANG, H.W., SOHN, I.C., KOO, S., KIM, M.S., PARK, B.R., SONG, J.H., KIM, J.H. Antinociception of heterotopic electro-acupuncture mediated by the dorsolateral funiculus. **The American Journal of Chinese Medicine**, 35 (2) 251-264, 2007.
73. LEWIS, G.T., WHITE, P.J., PARIENT, J. Investigating acupuncture using brain imaging techniques: the current state of play. **Advance Access Publication**, 10, 315-319, 2005.
74. LI, W.M., CUI, K.M., LI, N., GU, Q.B., SCHWARZ, W., DING, G.H., WU, G.C. Analgesic effect of electroacupuncture on complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in mice: a model of antipain treatment by acupuncture in mice. **Japanese Journal of Physiology**, 55, 339-344, 2005.
75. LIA, A., WANG, Y., XINA, J., LAO, L., REN, K., BERMAN, B.M., ZHANG, R.X. Electroacupuncture suppresses hyperalgesia and spinal Fos expression by activating the descending inhibitory system. **Brain Research**, 1186, 171-179, 2007.

Referências bibliográficas

76. LIU, G.J., WANG, S. Effects of nucleus raphe magnus and locus coeruleus in descending modulation of habenula on pain threshold and acupuncture analgesia. **Acta Pharmacologica Sinica**, 9 (1), 18-22, 1988.
77. LO, S.Y. Meridians in acupuncture and infrared imaging. **Medical Hypotheses**, 58 (1), 72-76, 2002.
78. MA, S.X. Neurobiology of acupuncture: toward CAM. **eCAM**, 1 (1), 41-47, 2004.
79. MAYER, D.J. Biological mechanisms of acupuncture. **Progress in Brain Research**, 122: 457-77, 2000.
80. MAYER, D.J., WOLFLE, T.L., AKIL, H., CARDER, B., LIEBESKIND, J.C. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. **Science**, 174 (16), 1351-1354, 1971.
81. MAYER, D.J., PRICE, D.D. Central nervous system mechanisms of analgesia. **Pain**. 2 (4), 379-404, 1976.
82. MELZACK, R., WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**. 150 (699), 971-979, 1965.
83. MESTRE, C., PÉLISSIER, T., FIALIP, J., WILCOX, G., ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. 32(4): 197-200, 1994.

84. MEDEIROS, M.A., CANTERAS, N.S., SUCHECKI, D., MELLO, L.E.A.M. Analgesia and c-Fos expression in the periaqueductal gray induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats. **Brain Research**, 973, 196-204, 2003a.
85. MEDEIROS, M.A., CANTERAS, N.S., SUCHECKI, D., MELLO, L.E.A.M. C-Fos expression induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 36, 1673-1684, 2003b.
86. MESSING, R.B., LYTLE, L.D. Serotonin-containing neurons: their possible role in pain and analgesia. **Pain**. 4(1): 1-21, 1977.
87. MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, 66 (6), 355-474, 2002.
88. MICZEK, K.A.; THOMPSON, M.L. SCHUSTER, L. Analgesia following defeat in an aggressive encounter: development of tolerance and changes in opioid receptors. **Annals of New York Academy of Sciences**, 467, 14-29, 1986.
89. MUNGLANI, R., HUNT, S.P. Molecular biology of pain. **British Journal of Anaesthesia**, 75, 186–192. 1995.
90. MYSLINSKI, N.R., RANDIĆ, M. Responses of identified spinal neurones to acetylcholine applied by micro-electrophoresis. **Journal of Physiology**. 269(1): 195-219, 1977.

91. NICHOLSON, R.; DIXON, A.K.; SPANSWICK, D.; LEE, K. Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience Letters**. 380:316-321, 2005.
92. NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DEMAREST, R.J. Pain and Temperature. In: WILLIAM, L.; WILKINS, L. **The human nervous system**: structure and function. 5ed. New York, 1996. 9, 123-37.
93. OLIVEIRA, R., PRADO, W.A. Anti-hyperalgesic effect of electroacupuncture in a model of post-incisional pain in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33, 957-960, 2000.
94. ONTTONEN, T.; PERTOVAARA, A. The mechanical antihyperalgesic effect of intrathecally administered MPV-2426, a novel alpha2-adrenoceptor agonist, in a rat model of postoperative pain. **Anesthesiology**, 92, 1740–1745, 2000.
95. PAPIR-KRICHELI, D., GILON, C., CHOREV, M., SELINGER, Z., DEVOR, M. Neurochemical mediators of the behavioural effects of receptor-selective substance P agonists administered intrathecally in the rat. **Neuropharmacology**. 29(11): 1055-65, 1990.
96. PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Progress in Neurobiology**. 80 (2): 53-83.

Referências bibliográficas

97. PORRECA, F., OSSIPOV, M.H., GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends in Neurosciences**, 25 (6), 319-325, 2002.
98. PROUDFIT, H.K.; ANDERSON, E.G. Morphine analgesia: blockade by raphe magnus lesions. **Brain Research**, 98(3):612-18, 1975.
99. REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, 164, 444-445, 1969.
100. ROBERTS, M.H., REES, H. The antinociceptive effects of stimulating the pretectal nucleus of the rat. **Pain**, 25 (1), 83-93, 1986.
101. ROMITA, V.V., SUK, A., HENRY, J.L. Parametric studies on electroacupuncture-like stimulation in a rat model: effects of intensity, frequency, and duration of stimulation on evoked antinociception. **Brain Research Bulletin**, 42 (4), 289-296, 1997
102. SIEGEL, P.; WEPSIC, J.G. Alteration of nociception by stimulation of cerebellar structures in the monkey. **Physiology Behavior**, 13(2):189-94, 1974.
103. SANDKÜHLER, J., GEBHART, G.F. Characterization of inhibition of a spinal nociceptive reflex by stimulation medially and laterally in the midbrain and medulla in the pentobarbital-anesthetized rat. **Brain Research**, 305 (1), 67-76, 1984.
104. SANDKÜHLER, J. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. **Progress in Neurobiology**, 50, 49-81, 1996.

105. SCHAIBLE, H.G., RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Archives Surgery**, 389, 237-243, 2004.
106. SEKIDO, R., ISHIMARU, K., SAKITA, M. Differences of electroacupuncture-induced analgesic effect in normal and inflammatory conditions in rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, 31 (6), 955-965, 2003.
107. SIMS, J. The mechanism of acupuncture analgesia: a review. **Complementary Therapies in Medicine**, 5, 102-111, 1997.
108. TAGUCHI, T., TAGUCHI, R. Effect of varying frequency and duration of electroacupuncture stimulation on carrageenan-induced hyperalgesia. **Acupuncture in Medicine**, 25(3), 80-86, 2007.
109. TANG, N.M., DONG, H.W., WANG, X.M., TSUI, Z.C., HAN, J.S. Cholecystokinin antisense RNA increases the analgesic effect induced by electroacupuncture or low dose morphine: conversion of low responder rats into high responders. **Pain**, 71(1), 71-80, 1997.
110. TAKAGI, J., SAWADA, T., YONEHARA, N. A possible involvement of monoaminergic and opioidergic systems in the analgesia induced by electroacupuncture in rabbits. **Japanese Journal of Pharmacology**, 70, 73-80, 1996.

Referências bibliográficas

111. TAKESHIGE, C., SATO, T., MERA, T., HISAMITSU, T., FANG, J. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. **Brain Research Bulletin**, 29 (5), 617-634, 1992.
112. TODA, K. Response of raphe magnus neurons after acupuncture stimulation in rat. **Brain Research**, 242, 350-353, 1982.
113. ULETT, G.A., HAN, S., HAN, J.S. Electroacupuncture: Mechanisms and clinical application. **Biological Psychiatry**, 44, 129–138, 1998.
114. VICKERS, A., WILSON, P., KLEIJNEN, J. Acupuncture. **Quality and Safety in Health Care**, 11 (1), 92-97, 2002.
115. WANG, S.M., KAIN, Z.N., WHITE, P.F. Acupuncture Analgesia: I. The Scientific Basis. **Anesthesia & Analgesia**, 106 (2), 602-610, 2008a.
116. WANG, S.M., KAIN, Z.N., WHITE, P.F. Acupuncture Analgesia: II. Clinical Considerations. **Anesthesia & Analgesia**, 106 (2), 611-621, 2008b.
117. WANG, Y., ZHANG, Y., WANG, W., CAO, Y., HAN, J.S. Effects of synchronous or asynchronous electroacupuncture stimulation with low versus high frequency on spinal opioid release and tail flick nociception. **Experimental Neurology**, 192, 156-162, 2005.

Referências bibliográficas

118. WEN, Y.R., YEH, G.C., SHYU, B.C., LING, Q.D., WANG, K.C., CHEN, T.L., SUN, W.Z. A minimal stress model for the assessment of electroacupuncture analgesia in rats under halothane. **European Journal of Pain**, 11, 733–742, 2007.
119. WHITE, A., ERNST, E. A brief history of acupuncture. **Rheumatology**. 43(5): 662-3, 2004.
120. WILLIS, W. D.; COGGESHALL, R. E. **Sensory Mechanisms of the Spinal Cord**, 2nd ed. New York: Plenum Press, 1991. 595p.
121. WILLIS, W.D., WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **Journal of Clinical Neurophysiology**, 14 (1), 2-31, 1997.
122. WU, G.C., ZHU, J., CAO, X. Involvement of opioid peptides of the preoptic area during electroacupuncture analgesia. **Acupuncture & Electrotherapeutics Research**, 20 (1), 1-6, 1995.
123. XING, G.G., LIU, F.Y, QU, X.X., HAN, J.S., WAN, Y. Long-term synaptic plasticity in the spinal dorsal horn and its modulation by electroacupuncture in rats with neuropathic pain. **Experimental Neurology**, 208, 323-332, 2007.
124. YAKSH, T.L. Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. **Pharmacology and Biochemical Behavior**. 22, 845–858, 1985.

Referências bibliográficas

125. YAKSH, T.L., GRAFE, M.R., MALKMUS, S. Studies on the safety of chronically administered intrathecal neostigmine methyl sulfate in rats and dogs. **Anesthesiology**, 82: 412-427, 1995.
126. YOON, M.H.; CHOI, J.I.; JEONG, S.W. Spinal gabapentin and antinociception: mechanisms of action. **Journal of Korean Medical Sciences**. 18(2):255-61, 2003.
127. YU, L.C.; LU, J.T.; HUANG, Y.H.; MEUSER, T.; PIETRUCK, C.; GABRIEL, A.; GROND, S.; PIERCE PALMER, P. Involvement of endogenous opioid systems in nociceptin-induced spinal antinociception in rats. *Brain Research*. 26; 945(1): 88-96, 2002.
128. ZHAO, Z.Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in Neurobiology**, 85, 355-375, 2008.
129. ZHANG, G.G., YU, C., LEE, W., LAO, L., REN, K., BERMAN, B.M. Involvement of peripheral opioid mechanisms in electroacupuncture analgesia. **Explore**, 1 (5), 365-371, 2005.
130. ZHANG, S.P., ZHANG, J.S., YUNG, K.K.L., ZHANG, H.Q. Non-opioid-dependent anti-inflammatory effects of low frequency electroacupuncture. **Brain Research Bulletin**, 62, 327-334, 2004.
131. ZHANG, W.T., JIN, Z., CUI, G.H., ZHANG, K.L., ZHANG, L., ZENG, Y.W., LUO, F., CHEN, A.C.N., HAN, J.S. Relations between brain network activation and analgesic effect induced by low vs. high frequency electrical acupoint stimulation in

Referências bibliográficas

different subjects: a functional magnetic resonance imaging study. **Brain Research**, 982, 168-178, 2003.

132. ZHU, J.X., TANG, J.S., JIA, H. Differential effects of opioid receptors in nucleus submedius and anterior pretectal nucleus in mediating electroacupuncture analgesia in the rat. **Acta Physiologica Sinica**, 56 (6), 697-702, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)