

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENDÓGENOS
MOBILIZADOS PELA ELETROACUPUNTURA NO PONTO
E36 PARA A INDUÇÃO DE EFEITO ANTINOCICEPTIVO
EM MODELO OROFACIAL EM RATOS.**

RENATO TEIXEIRA ALMEIDA

BELO HORIZONTE

2010

RENATO TEIXEIRA ALMEIDA

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENDÓGENOS
MOBILIZADOS PELA ELETROACUPUNTURA NO PONTO
E36 PARA A INDUÇÃO DE EFEITO ANTINOCICEPTIVO
EM MODELO OROFACIAL EM RATOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do
Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

2010

“Há mais coisas no céu e na terra, Horácio, do que sonha a tua filosofia ”

William Shakespeare

“A desobediência é uma virtude necessária à criatividade.”

Raul Seixas

**Dedico esse trabalho ao meu yin (às vezes tão yang),
à minha Shakti, que tem sido o equilíbrio dos meus passos e a força para dá-los:**

Fabiana, minha esposa!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

**Ao meu orientador, Professor Igor,
pela aposta em mim desde o início, e
pela coragem de trilhar novos caminhos.
Também pelo poder de construir em mim
o pensamento científico, antes tão distante...
Além disso, por ser um exemplo de orientação,
amizade, afeto e dedicação que se estende
muito além dos limites da UFMG.**

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai-Mãe, pela minha existência.

A Grande Fraternidade Branca, em especial ao Mestre Saint Germain

A meu pai, minha mãe e meu irmão, pelo exemplo de vida no qual sempre me espelho, e pelo amor do qual nunca abro mão.

A meu afilhado Gabriel pela certeza de que o futuro é bom!

A Dr. Patrícia Valério que me abriu as portas, me proporcionando a condição de chegar a esse ponto.

Aos professores do Departamento de Farmacologia e Fisiologia pelas contribuições e exemplos que serão sempre seguidos. Em especial à Andréa, Janete, Márcio Dutra e Márcio Coelho pela alegria e disponibilidade sempre demonstrada para comigo.

Aos queridos amigos do laboratório Thiago, Giovane, Livinha, Luciana, Dani Pacheco pela alegria e alta energia mantida no laboratório, além das preciosas colaborações durante a minha caminhada.

Aos amigos do ICB Luiz Gonzaga, Grazielle, Gabriel Perfeito, Rafael e Gustavo que muito colaboraram pra minha formação, de doutor e de ser humano;

Ao Prof. Dr. Marcelo Mascarenhas, onde tudo começou.

Aos amigos da ABACO-CBA (Associação Brasileira de Artes e Ciências Orientas – Colégio Brasileiro de Acupuntura) pela liberdade de não estar quando deveria estar.

Aos funcionários do biotério, bibliotecas, secretarias, manutenção pela importante contribuição ao trabalho em especial à Celinha, Adelaide, Webster, Jorge e Rinaldo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro

Aos animais de experimentação pela colaboração, mesmo sem o direito de escolha.

HARI OM TAT SAT

SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICOS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
1- Acupuntura.....	18
2- Acupuntura e Dor Orofacial.....	23
3- Acupuntura Experimental.....	29
a) Opióides.....	29
b) Óxido Nítrico.....	31
c) Canabinóides.....	33
d) Ácido δ -amino Butírico (GABA).....	37
e) Noradrenalina.....	38
OBJETIVOS.....	41
JUSTIFICATIVA.....	43
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
1- Animais.....	46
2- Imobilização.....	46
3- Eletroacupuntura.....	48
4-Protocolo Experimental.....	50
a) Teste Algesiométrico.....	50

b) Dosagem de Substâncias.....	53
5- Fármacos Utilizados.....	55
6- Vias de Administração.....	56
7- Avaliação Estatística.....	58
RESULTADOS.....	50
DISCUSSÃO.....	91
1- Óxido Nítrico.....	93
2- Endocanabinóides.....	96
3- Ácido δ -amino Butírico (GABA).....	100
4- Noradrenalina.....	102
CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Ação dos inibidores específicos das NOSintases sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**62**

Gráfico 2 – Ação da aminoguanidina sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**65**

Gráfico 3 – Ação do L-NNA (N^o-propil-L-arginina) sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**66**

Gráfico 4 – Avaliação da variação na concentração de nitrito no líquor do rato após eletroacupuntura no ponto E36..... **68**

Gráfico 5 - Avaliação da variação na concentração de nitrito no plasma do rato após eletroacupuntura no ponto E36.....**70**

Gráfico 6 – Ação da glibenclamida sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**72**

Gráfico 7 – Ação do AM 251 sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**74**

Gráfico 8 – Ação do AM 630 sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**76**

Gráfico 9 – Ação do MAFP sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**78**

Gráfico 10 – Ação do VDM 11 sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**80**

Gráfico 11 – Avaliação da ação da injeção ICV do AM 251 sobre a antinocicepção promovida pela eletroestimulação do ponto E36 sobre o limiar de retirada da face do rato.....**82**

Gráfico 12 – Avaliação da ação da injeção IT do AM 251 sobre a antinocicepção promovida pela eletroestimulação do ponto E36 sobre o limiar de retirada da face do rato.....**84**

Gráfico 13 – Ação do saclofeno sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**86**

Gráfico 14 - Ação da guvacina sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**88**

Gráfico 15 – Ação da ioimbina sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.....**90**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Nervo Trigêmeo: ramos oftálmico, maxilar e mandibular.....	24
Figura 2 – Aparato de contenção do animal para aplicação da eletroacupuntura.....	47
Figura 3 – Localização do ponto E36 e seu agulhamento.....	49
Figura 4 – Teste algesimétrico facial.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AM.....	Aminoguanidina
AS.....	Agulha Seca
ATM.....	Articulação Temporomandibular
DTM.....	Disfunção Temporomandibular
EA.....	Eletroacupuntura
fIRM.....	Imagem por Ressonância Magnética Funcional
FAAH.....	Hidrolase de Ácidos Graxos
GABA.....	Ácido Gama Aminobutírico
IASP.....	Associação Internacional para o Estudo da Dor
ICV.....	Intracerebroventricular
IT.....	Intratecal
IP.....	Intraperitoneal
MTC.....	Medicina Tradicional Chinesa
NiCr.....	Níquel/Cromo
NO.....	Óxido Nítrico
NOS.....	Óxido Nítrico Sintase
NOS _e	Óxido Nítrico Sintase endotelial
NOS _i	Óxido Nítrico Sintase Indutível
NOS _n	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NV.....	Naive
PAG.....	Substância Cinzenta Periaquedutal
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro

THC..... Δ^9 -tetrahydrocannabinol

RESUMO

No presente estudo, investigou-se a capacidade da eletroacupuntura no ponto E36 ativar as vias endógenas NO/GMPc/KATP, canabinóides, GABA e noradrenalina para a obtenção de antinocicepção orofacial em ratos. Para tal, foi utilizada, como modelo algométrico, uma modificação do teste de retirada da cauda, denominado “Tail-Flick”, inicialmente descrito por D’amour & Smith (1941), no qual o estímulo térmico é aplicado à face, ao invés da cauda do animal. Com relação à via do NO, os resultados demonstraram que a antinocicepção causada pela acupuntura ocorre através da participação das isoformas neuronal e indutível da enzima NOSintase, uma vez que a pré-injeção intra-peritoneal dos seus antagonistas específicos N^o-propil-L-arginina (1 e 2 mg/kg) e aminoguanidina (0.5, 1 e 2 mg/kg), respectivamente, conseguiram reverter o aumento no limiar de retirada da face do rato promovido pela acupuntura. O mesmo efeito não foi observado quando da utilização do L-NIO, antagonista da isoforma endotelial da NOSintase. Além disso, a dosagem por colorimetria de nitrito, um metabólito do NO, revelou um significativo aumento (2x) na concentração plasmática após a acupuntura e um aumento consideravelmente maior no fluido cerebrospinal (4x). No que diz respeito à participação de canabinóides na antinocicepção orofacial, os resultados demonstram que a pré-injeção do AM 251, antagonista de receptores CB₁, foi capaz de bloquear o efeito da acupuntura, tanto quando utilizada a via intraperitoneal (1 e 2 mg/kg), quanto com a injeção ICV (1 e 2 µg). Curiosamente, esse efeito não foi obtido quando a via IT foi utilizada para a administração do AM 251. As pré-injeções do MAPF (1 e 2 mg/kg), inibidor da FAAH, enzima que degrada a anandamida, ou do VDM 11 (5 e 10 mg/kg), inibidor de recaptção de desse neurotransmissor, foram capazes de potencializar o efeito da acupuntura tanto em intensidade quanto em tempo de ação. No entanto, o antagonista de receptores CB₂, AM

630 (1 e 2 mg/kg), não foi capaz de promover nenhuma modificação no efeito obtido pela acupuntura do ponto E36. Os sistemas GABAérgico e noradrenérgico, no modelo testado, parecem não estar envolvidos com a antinocicepção orofacial da acupuntura uma vez que o saclofeno (20 mg/kg), antagonista de receptores GABA_B, a guvacina (20, 40 e 80 mg/kg), inibidor da recaptação do GABA e a ioimbina (1, 2 e 4 mg/kg), antagonista de receptores α_2 , não foram capazes de produzir modificações em nenhuma das doses testadas. Esses dados sugerem a participação das vias NO/GMPc/KATP e dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo orofacial obtido pela eletroacupuntura do ponto E36, e que esse efeito parece ocorrer pela ativação de núcleos do sistema nervoso central supra-espinal.

ABSTRACT

In the present study, it was investigated the capacity of electroacupuncture at the St36 acupoint in activate the endogenous pathways NO/cGMP/KATP, cannabinoids, GABA and noradrenaline, to obtain orofacial antinociception in rats. For this, it was used, as algometric model, a “tail-flick test” modification, described by D’amour & Smith (1941) in which the thermal stimulation is applied in the face, instead of the tail of the animal. Results demonstrated that acupuncture is able to activate the NO pathway, with the participation of neuronal and inducible NOS isoforms, since the intraperitoneal injection of both specific antagonists N^o-propyl-L-arginine (1 and 2 mg/kg) and aminoguanidine (0.5, 1 and 2 mg/kg), respectively, were able to reverse the rat facial withdrawal threshold produced by acupuncture. That effect was not observed when a specific endothelial NOS antagonist, L-NIO, was used. Furthermore, measurement by colorimetry technique of nitrite, a NO metabolite, shows a significant growing (2-fold) in plasmatic concentration after electroacupuncture stimulation. This increasing was more pronounced in cerebrospinal fluid (4-fold). The endocannabinoid pathway seems to be also involved in this orofacial antinociception, since that previous injection of the CB₁ specific antagonist, AM 251, was capable in block this acupuncture effect, both when the intraperitoneal (1 and 2 mg/kg), as ICV (1 and 2 µg) injection were used. Curiously, this effect was not obtained when intra-thecal injection was used to administrate AM251. MAPF (1 and 2 mg/kg), inhibitor of FAAH, enzyme that produce degradation of anandamide, and VDM 11 (5 and 10 mg/kg), inhibitor of anandamide reuptake, were capable to produce a growing in the acupuncture antinociception both in intensity and duration of effect. However, AM 630 (1 and 2 mg/kg), a CB₂ specific antagonist, was not able to produce any modification in this analgesic effect produced by acupuncture in St36

acupoint. The GABAergic and noradrenergic systems seem not to be involved with the acupuncture orofacial antinociception since saclofen (20 mg/kg), a GABA_B specific antagonist, guvacine (20, 40 and 80 mg/kg), inhibitor of GABA reuptake, and yohimbine (1, 2 and 4 mg/kg), a α_2 specific antagonist did not provoke any modifications at no one tested doses. These data suggest the participation of NO/cGMP/KATP and endocannabinoid pathways in the acupuncture orofacial antinociception obtained by St36 acupoint, and that this effect seems to occur by structures by the supraspinal central nervous system.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1- Acupuntura:

A medicina tradicional chinesa (MTC) vem sendo usada com frequência no Oriente há mais de 4000 anos e possui uma base teórica específica que norteia a sua terapêutica desde seu início até os dias atuais. A sua base de compreensão está na relação do homem com os elementos e fenômenos da natureza. Porém, essa relação é interpretada de uma forma diferente da ocidental ao colocar o homem como parte integrante e não modificadora dos elementos naturais (Maciocia, 1996). Para a MTC, o "universo" do ser humano, tanto fisiológica quanto psicologicamente, reproduz o que acontece nas relações naturais e está intrinsecamente ligado a elas. Isso faz com que a compreensão do funcionamento psico-fisiológico humano seja de uma forma mais generalista e não-compartimentalizada em sistemas separados e individualizados (Maciocia, 1996).

Além disso, e talvez por causa disso, a forma de validação oriental da prática da MTC foi, por muitos anos, considerável e diametralmente diferente da que é feita no ocidente. Ela se fundamenta em observações feitas através dos anos pelos profissionais e na experiência clínica milenar. Nesse sentido, para a medicina chinesa, quanto mais antigo um texto, mais ele foi testado e, por isso, maior confiabilidade e por conseguinte, maior validade ele tem. Tanto é que o mais antigo texto escrito que se tem notícia sobre o tema se chama *Huang Di Nei Jing* (Clássico de Medicina Interna do Imperador Amarelo) e provavelmente data de 2383 a.C. no qual já havia descrições sobre os efeitos da acupuntura. Esse texto, mais tarde, foi editado, comentado e separado em duas partes que são, até hoje, fontes primordiais para o entendimento tradicional da medicina oriental: o *Su Wen* e o *Ling Shu* (Maciocia, 1996).

A acupuntura, técnica mais conhecida da MTC, se baseia na inserção de agulhas em pontos pré-determinados no corpo. Esses pontos estão localizados sobre supostos canais de energia chamados de meridianos por onde circula o que a MTC chama de *Qi*. A acupuntura possui uma base teórica tradicional que norteia a sua terapêutica desde milhares de anos até os dias atuais. Essa base é composta, dentre outras, pelas teorias dos meridianos e da movimentação do *Qi*, teorias essas que compõem o arcabouço de conhecimento tradicional da MTC (Zhao, 2005).

O *Qi* é uma palavra chinesa que não possui uma tradução literal. O seu significado mais próximo, mas ainda incompleto, seria “energia” ou “energia universal”. De acordo com a teoria chinesa, o *Qi* é o que flui dentro dos meridianos, além de circular junto com o sangue nos vasos sanguíneos. É o que sustenta toda forma de vida e promove energia para a manutenção dos processos fisiológicos (Zhao, 2005). Se o *Qi* se move com suavidade, o sangue irá se mover, então se tem saúde. Se o *Qi* se torna deficiente, ou é impedido de se movimentar ou ainda apresenta sinais de “estagnação”, a patologia se apresenta. Curiosamente, no ocidente, Galeno, em sua teoria da “*rete mirable*” descrevia o funcionamento orgânico de forma semelhante à teoria chinesa demonstrando um paralelo claro da compreensão fisiológica vigente na época entre ocidente e oriente.

A introdução das agulhas nos pontos de acupuntura, de acordo com a teoria tradicional da medicina chinesa, visa à manutenção do fluxo suave e harmonioso do *Qi*, tonificando-o quando este estiver deficiente, sedando-o quando estiver em excesso ou dispersando-o quando estiver estagnado, e desta forma procurando manter a saúde do organismo (Ross, 2003).

Segundo a MTC, os meridianos são canais de energia que percorrem todo o corpo, conduzindo e distribuindo o *Qi* para todas as regiões. Eles são separados em três tipos (Ross, 2003):

- 1- Os chamados principais que são em número de 12, são bilaterais e possuem relação fisiológica direta com o sistema energético que lhe dá o nome;
- 2- Os chamados “Vasos Maravilhosos” que são em número de 8 e não possuem relação direta com os sistemas energéticos;
- 3- Os chamados vasos colaterais que são em grande número e estão relacionados com a pele e os músculos.

Até o momento, ainda persistem várias dúvidas sobre as relações anátomo-fisiológicas conhecidas para os meridianos no corpo humano, pois, ainda não foi localizado nenhum sinal que poderia indicar a existência desses “canais de energia”. Nesse sentido, alguns autores têm realizado trabalhos com o intuito de tentar encontrar a comprovação, à luz da ciência, da existência anátomo-fisiológica dos meridianos. Ma (2003), em um experimento realizado em ratos, utilizando a técnica de “Western blots”, conseguiu demonstrar um aumento da expressão de NO sintase neuronal, enzima formadora de óxido nítrico (NO) nos neurônios, restrito às áreas relacionadas com aquelas descritas para os meridianos do pericárdio na pata anterior, da bexiga na pata posterior, do vaso governador no dorso do animal e do vaso da concepção no ventre do rato. Embasado neste e em vários outros trabalhos (Yang et al., 2000; Chen & Ma, 2003) que demonstram a relação do efeito da acupuntura com a mobilização do NO, Ralt (2005) levanta a hipótese de que esse, por ter uma forma de transmissão de sinal que utiliza também a via de comunicação intercelular

não-neuronal, apresentaria as mesmas características e possibilidades do *Qi* e, desta forma, explicaria a ação da acupuntura pela transmissão de sinais também através dos meridianos e não exclusivamente através dos neurônios. Alguns anos mais tarde, o mesmo grupo demonstrou que a noradrenalina também parece marcar a localização dos meridianos, pois, foi obtido um aumento desse neurotransmissor concomitantemente, e nos mesmos locais onde já havia sido descrito o aumento do NO. Esses locais estão relacionados com a localização tradicional dos meridianos (Chen & Ma, 2005).

Os pontos de acupuntura estão localizados, em sua maioria, sobre os meridianos, e são, tradicionalmente, os locais de punção das agulhas de acupuntura.

Desde a antiguidade, os pontos de acupuntura são nomeados em chinês. Porém, devido à expansão da acupuntura no ocidente, tornou-se necessária a normatização dos nomes dos pontos de uma forma que pudesse ser compreendida em todo o mundo. Ficou estabelecida, então, uma nomenclatura atual que leva em conta o nome do meridiano no qual o ponto se encontra, aliado à sua posição no meridiano. Por exemplo, o ponto denominado em chinês de *Hoku*, por ser o quarto ponto do meridiano do Intestino Grosso passou a ser denominado de IG4; e o trigésimo sexto ponto do meridiano do Estômago, que em chinês se chama *Suzanli*, passou a ser chamado de E36.

Alguns autores resolveram promover estudos no sentido de descobrir evidências da real existência desses pontos procurando pelas possíveis relações anátomo-fisiológicas que os diferenciassse de outras regiões do corpo. Nesse sentido, o trabalho de Evans (1999) indica achados interessantes, dentre os quais o de que, através do mapeamento da pele com eletrodos, há uma diferença de potencial elétrico nas regiões onde estariam localizados os pontos de acupuntura em comparação com outras regiões. Além disso, foi visto que a

sensibilidade destes pontos aumenta com o progresso de uma patologia. Isto é, o ponto se torna mais sensível à palpação na medida em que a doença avança. O autor conclui que os pontos de acupuntura existem em três estágios: latente (sem patologia), passivo (assintomático) e ativo (sintomático).

O achado supracitado foi corroborado por Peña & Martinez (1999) demonstrando que a região onde existe um ponto de acupuntura possui diferenças anatômicas consideráveis em relação às regiões circunvizinhas, a saber: 1) um adelgaçamento do epitélio; 2) uma modificação das fibras colágenas da derme, o que explica a razão da palpação deste local resultar numa depressão ou mesmo numa cúpula; 3) uma rede vascular em espiral rodeada por um entrelaçamento denso em forma de rede de fibras nervosas amielínicas colinérgicas; e 4) uma rede de fibras mielinizadas algumas vezes entrelaçadas. Além disso, foi demonstrado por esse e outros trabalhos (Research Group of Acupuncture Anesthesia, 1973) que a injeção do anestésico local procaína nos pontos impede a ação da acupuntura neste ponto, indicando, mais uma vez, a relação íntima que existe entre o ponto de acupuntura e o sistema nervoso.

As técnicas utilizadas atualmente pela acupuntura para estimulação do ponto são: a estimulação manual, na qual o ponto é puncionado e a agulha é estimulada manualmente pelo terapeuta; e a eletroacupuntura, na qual o estímulo provém de um aparelho eletrônico conhecido como eletro-estimulador. Esse aparelho permite um estímulo com frequência, intensidade e duração pré-definidas.

Kim et al. (2000) compararam, em humanos, o efeito da eletroacupuntura com a eletroacupuntura aliada à estimulação manual e demonstraram que a combinação das duas

formas de estimulação produz um resultado terapêutico mais eficiente do que as formas aplicadas isoladamente.

2- Acupuntura e Dor Orofacial:

A dor é uma queixa comum do ser humano, sendo definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita tal como se o dano estivesse presente. Bonica (1984) publicou um dos poucos trabalhos epidemiológicos sobre o assunto no qual relata que aproximadamente um terço da população de países industrializados sofre de dor crônica. Este fato representa significativo prejuízo devido à perda da produtividade, busca aos serviços de saúde, faltas ao trabalho e diminuição da qualidade de vida.

As dores orofaciais são responsáveis por uma grande parcela das queixas dos pacientes que procuram os centros de tratamento de dor em todo o mundo. De acordo com Lipton et al. (1993), aproximadamente 22% de uma população de 45.711 indivíduos estudados nos Estados Unidos naquele ano, já tiveram alguma queixa de dor orofacial.

Essa sensação dolorosa geralmente é referida nos músculos da mastigação, área pré-auricular e/ou articulação têmporo-mandibular (ATM), e é transmitida ao sistema nervoso central pelo quinto par de nervos cranianos, o nervo trigêmeo, que recebe estímulos sensitivos tanto da região têmporo-mandibular quanto de outras estruturas faciais. Ele possui três ramos bem distintos, a saber: oftálmico, maxilar e mandibular (fig. 1).

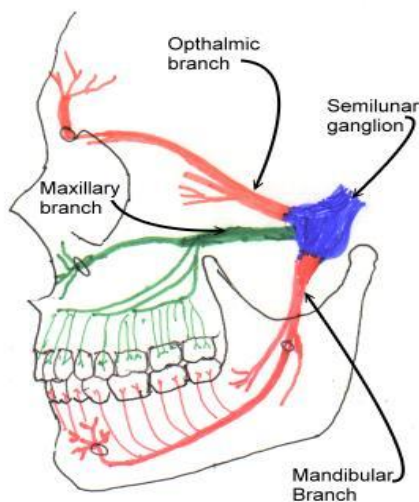


Figura 1 – Nervo Trigêmeo: ramos oftálmico, maxilar e mandibular

Existe, entre os profissionais das áreas concernentes à dor orofacial, uma grande dificuldade em se estabelecer um diagnóstico causal consensual, pois as dores orofaciais têm como característica marcante a multifatoriedade etiológica. Por esse motivo, é notória a necessidade de uma abordagem mais generalista e multidisciplinar em detrimento de uma abordagem menos minimalista e “compartmentalizada” do paciente que apresenta tal patologia. Acreditamos que a medicina tradicional chinesa, da qual a acupuntura é a técnica mais conhecida no ocidente, por ter como forma de abordagem do paciente, e embasamento teórico tradicional, o generalismo, parece ser uma terapêutica bem indicada para preencher essa necessidade.

Após a sua introdução na prática clínica ocidental no início da década de 30, a acupuntura vem sendo amplamente utilizada como terapia analgésica tanto pela medicina

quanto pela odontologia. O fato de que a medicina chinesa tenha começado a se introduzir no ocidente, levou à necessidade de uma compreensão mais científica daquilo que no oriente já proporcionava resultados clínicos positivos há vários séculos. Então, deu-se início a uma série de pesquisas com o intuito de se compreender, à luz da ciência moderna, a sistemática da medicina oriental. Os resultados obtidos até então levaram o “National Institute of Health” (1997) a realizar a primeira “Conferência Para o Desenvolvimento de Consenso em Acupuntura”, a qual sugeriu que a acupuntura tem eficácia confirmada para o tratamento de alguns sintomas, tais quais, náusea pós-operatória e quimioterápica, vícios, asma, é indicada também no auxílio da reabilitação articular e algumas doenças dolorosas, dentre elas, as dores orofaciais (Cao, 2002).

Nesse sentido, vários protocolos experimentais, clínicos e/ou laboratoriais, passaram a ser criados com o intuito de aumentar o conhecimento sobre a ação da acupuntura no tratamento das dores orofaciais.

Um dos primeiros trabalhos clínicos sobre o assunto foi publicado por Hansen & Hansen (1983). Neste estudo, foi avaliada a ação do agulhamento simultâneo dos pontos de acupuntura VB14, *Taiyang*, TA5, E2, E3, E6, E7, IG4 e E44 (em comparação com a acupuntura sham, que é, nesse caso, o agulhamento e eletroestimulação fora do ponto de acupuntura) num grupo de 20 pacientes que sofriam de dor facial crônica por mais de 1 ano. Considerando a metodologia utilizada, os autores concluíram que a acupuntura promove maior alívio da dor facial em comparação com o placebo.

Após esse primeiro resultado positivo, vários trabalhos foram delineados no sentido de comparar a eficácia da acupuntura em relação ao tratamento ocidental utilizado na época, ou seja, o uso de placas, aconselhamento, ajuste oclusal e exercícios musculares para

a mandíbula. Foi demonstrado que a acupuntura obteve resultados positivos semelhantes aos tratamentos convencionais em um grupo de 50 pacientes com disfunção têmporomandibular (DTM), resultados esses que se mantiveram após um acompanhamento de três meses (Raustia & Pohjola, 1985; 1986 a; b). Os autores, apesar de não citarem os pontos utilizados nos trabalhos, concluem que “deve ser dado aos pacientes o benefício de outras terapêuticas que não as tradicionais que podem ser efetivas no alívio dos sintomas subjetivos”. Resultados comparativos semelhantes, inclusive com o mesmo tempo de acompanhamento, foram encontrados em um grupo de 45 pacientes com dor facial ou cefaléia de longo tempo, ambas de origem muscular, que receberam acupuntura no ponto IG4, aliado a pontos *Ah Shi*, que são pontos locais dolorosos não necessariamente reconhecidos como pontos de acupuntura (Johansson et al., 1991).

A acupuntura apresentou resultados favoráveis inclusive para pacientes resistentes a tratamentos estomatognáticos utilizados na época (placas oclusais, ajuste oclusal ou exercícios físicos para a mandíbula), principalmente se a dor for de origem muscular (Johansson et al., 1987).

A comparação do tratamento de acupuntura com o tratamento por placas oclusais também foi feita por List & Helkimo (1992 a; b; 1993) que, em um grupo de 110 pacientes com sinais e sintomas de DTM os quais apresentam dor por mais de 6 meses, foram utilizados os pontos locais *Taiyang*, E6, E7, VB20, todos esses com estimulação manual, e os pontos distais IG4 e E36 com eletroestimulação a uma frequência de 2-3 Hz a uma intensidade de 0,5 mA. Os resultados, obtidos a partir de relatos dos pacientes, demonstraram uma melhora do quadro dos pacientes em ambos os grupos, que se manteve após um ano, sendo ligeiramente superiores para os pacientes que foram tratados por acupuntura (97% para acupuntura e 65% para tratamento por placa oclusal).

Adicionalmente, os autores relataram que os pacientes tratados com acupuntura apresentaram, durante o tratamento, uma sensação de relaxamento (69%) e a melhora do sono (24%).

Quando a seleção de pontos foi feita de acordo com a antiga filosofia da MTC, e não levando em conta a anatomia neural para o tratamento de dores pós-cirúrgicas ou trigeminalgias. Para indução analgésica com finalidade cirúrgica os resultados favoráveis chegaram a mais de 85% dos casos (Silva, 1989).

No entanto, apesar dos vários resultados positivos em relação ao tratamento de dores orofaciais por acupuntura, alguns trabalhos de revisão nos quais foram utilizadas avaliações meta-analíticas fizeram alguns questionamentos. Por exemplo, Ezzo et al. (1999) analisaram 55 trabalhos com o objetivo de avaliar a qualidade dos mesmos no que diz respeito à metodologia aplicada e à fidedignidade dos resultados apresentados, tendo considerado que dois terços eram de baixa qualidade pela falta de relato de avaliação duplo-cego e de uma equivalência de tempo de tratamento entre o grupo controle e o grupo experimental. Os autores preconizam que a dificuldade de se criar uma técnica que corresponda a um grupo controle com tratamento placebo confiável em pesquisas com acupuntura pode ser prejudicial à confiabilidade dos resultados alcançados. A conclusão desta revisão foi que existem evidências limitadas de que a acupuntura é mais efetiva do que o grupo não tratado para dor crônica, sendo inconclusivo o dado de que a acupuntura é mais efetiva do que o placebo.

Além disso, uma revisão posterior (Rosted, 2001), utilizando os mesmos métodos analíticos, encontrou o mesmo problema metodológico. Mas, apesar de encontrar apenas 6 trabalhos randomizados e duplo-cego em 14 avaliados, o autor considera a acupuntura eficaz como terapêutica para as dores orofaciais. Inclusive, propõe uma possível

padronização em relação ao tratamento das DTMs por acupuntura que consiste no uso dos seguintes pontos: E6, E7, ID18, VG20, VB20, B10 como pontos locais e, IG4 como ponto sistêmico com periodicidade semanal por seis sessões. Após a inserção, as agulhas deveriam ser estimuladas manualmente até se conseguir a sensação de *Deqi* (sinal de ativação do ponto de acupuntura que se caracteriza por uma sensação de irritação, entorpecimento, peso ou distensão na área estimulada) e deixadas no local por 30 minutos.

Realmente, parece que os resultados mais recentes das pesquisas clínicas que procuram a efetividade do tratamento orofacial da acupuntura vêm, a cada dia, demonstrando a confiabilidade dessa terapia. Por exemplo, foi descrito que o agulhamento do ponto IG4 por 30 minutos com estimulação manual diminuiu em 50% o nível de dor orofacial crônica (presente por mais de 3 meses) em um grupo de 29 pacientes (Goddard, 2005). Nesse mesmo caminho, outro grupo demonstrou, 2 anos mais tarde, utilizando-se de avaliação duplo-cego, a eficácia analgésica orofacial da acupuntura em comparação com o grupo sham (Smith et al., 2007).

Esses resultados foram corroborados por um trabalho que se utilizou de avaliações de imagem produzidas por ressonância magnética funcional. Foi demonstrado que a eletroacupuntura no ponto IG4 em voluntários ativou áreas cerebrais relacionadas com a musculatura facial além de promover a desativação de áreas cerebrais relacionadas com a via da dor (Wang et al., 2007).

Existem alguns livros publicados na área da MTC que fazem referência ao tratamento preconizado para dores orofaciais, com a estimulação dos pontos E7, TA21, TA17, TA5, VB34, TA2, TA3, VB41 e VB43 para dores na ATM (Yamamura, 1993); *Yintang*, TA3, VB8, VB20, B10, B60, IG4, TA3, TA5, E36, P7, F3 e VG20, para o alívio das dores

orofaciais manifestas como cefaléia (Bastos, 1993) e de uma forma geral pelos pontos IG4, P7, TA5, VB20, F2, VB38, E44, R6 e E36 (Ross, 2003).

3- Acupuntura Experimental:

a) Opióides:

Um experimento, em coelhos, que demonstrou a capacidade do antagonista opióide naloxona, injetada em algumas regiões cerebrais, em atenuar o efeito antinociceptivo induzido pela acupuntura, sugeriu a participação do sistema opióidérgico endógeno nesse efeito (Ji-Sheng et al., 1981). Após esse resultado, vários trabalhos demonstraram, em animais experimentais, também através do uso de antagonismo farmacológico, que a antinocicepção promovida pela acupuntura realmente ocorre via liberação de peptídeos opióides endógenos (Hwang et al., 2002; Ceccherelli et al., 2002). Posteriormente, foi, também, demonstrado que a liberação de diferentes peptídeos opióides pela eletroacupuntura era frequência-dependente, pois, estímulos de baixa frequência (2 a 5 Hz) foram eficazes em promoverem a liberação de metil-encefalina, β -endorfina e endomorfina, enquanto estímulos de alta frequência (100 a 200 Hz) promovem a liberação, preferencialmente, de dinorfina (Chen et al., 1996; Huang et al., 2002; Han et al., 1999).

A ativação da via opioidérgica pela acupuntura também parece estar relacionada com a capacidade antinociceptiva orofacial do ponto E36 em ratos, uma vez que a pré-injeção subcutânea de naloxona foi capaz de inibir essa resposta em um modelo de estímulo térmico facial (Almeida et al., 2008).

A ação opioidérgica da acupuntura parece ocorrer, no sistema nervoso central, em níveis supra-espinhais uma vez que, em modelos de redução de pressão arterial, o efeito hipotensor da acupuntura foi inibido pela injeção intracerebroventricular de naloxona ou de um outro antagonista μ opióide. A injeção intratecal de naloxona não foi eficaz em induzir o mesmo efeito. (Wang et al., 1994; Zou et al., 2000)

Adicionalmente, com o avanço das pesquisas, outras vias endógenas, que não somente a opioidérgica, mostraram sua capacidade em contribuir para a obtenção da analgesia. Tornou-se, então, relevante saber se essas vias também poderiam estar envolvidas no efeito analgésico da acupuntura.

b) Óxido Nítrico:

Uma das vias sobre a qual foi levantada a hipótese do seu envolvimento na ação da acupuntura foi a via L-arginina/NO/GMPc. O óxido nítrico (NO) é um gás com atividade sinalizadora e transmissora que é formado no interior de várias células através da oxidação do nitrogênio terminal da L-arginina, reação catalisada pela enzima NOSintase (NOS). Esta enzima é encontrada em 3 isoformas no organismo, uma indutível (NOSi), e duas constitutivas, uma neuronal (NOSn) e outra endotelial (NOSe) (Moncada et al., 1991; Radomski et al., 1990). O NO sintetizado pela ação das isoformas constitutivas, cuja ativação é dependente da interação com a calmodulina que, por sua vez, é controlada pelos níveis intracelulares de Ca^{2+} , é liberado em pequenas quantidades e por curtos períodos de tempo. A NOSi está potencialmente presente em macrófagos, células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos e linfócitos T e sua expressão é estimulada por citocinas e lipopolissacarídeos bacterianos, além de ser Ca^{2+} -calmodulina independente. O NO atua principalmente através da ativação da enzima guanilil ciclase, e essa, por sua vez,

transforma o GTP intracelular em GMP cíclico (GMPc) que leva, via proteína quinase G, à ativação de canais para K^+ sensíveis a ATP, o que produz, dentre vários efeitos, a antinocicepção (Duarte et al., 1990; Soares et al., 2000; Alves et al., 2004).

Yang et al. (2000) foram um dos primeiros a demonstrar a existência da relação da acupuntura com a via L-arginina/NO/GMPc. Este grupo conseguiu promover inibição das crises epiléticas em ratos através da estimulação com eletroacupuntura dos pontos VC8 e VC16, concomitante à reversão do aumento da expressão da NOSn constitutiva e da NOSi no hipocampo de ratos epiléticos.

Por outro lado, os efeitos hipotensor e bradicárdico induzidos pela eletroacupuntura no ponto E36 parecem ocorrer pela ativação central da via do NO, uma vez que, em ratos, esse efeito foi facilitado pela injeção do precursor L-arginina no núcleo grácil (Chen & Ma, 2003) e coincidiu com um aumento considerável da expressão de NOS nos neurônios da região dorsal desse núcleo e do núcleo do trato solitário médio. Este mesmo grupo levantou a hipótese de que a entrada do estímulo da acupuntura para promover a ativação dos núcleos supracitados ocorre pela região dorsal da via espinotalâmica (Ma, 2004; Ma et al., 2005). Nesse sentido, outro grupo demonstrou, em ratos com hipertensão espontânea, que o tratamento crônico de acupuntura no ponto VG20 (3 semanas) foi capaz de promover uma diminuição de NOSn e um aumento dos níveis de NOSe nas artérias de resistência, bem como a elevação das concentrações de nitrito e nitrato, metabólitos do NO, no plasma, isso com uma paralela diminuição da pressão arterial desses animais (Hwang et al., 2008). Esses efeitos cardiovasculares não foram conseguidos quando foi utilizado um ponto não correspondente ao de acupuntura.

Além disso, em modelos de isquemia cardíaca aguda, a acupuntura nos pontos BP4 e/ou PC6 foi eficaz em recuperar os padrões pré-isquêmicos em ratos, concomitantemente

com o aumento da expressão local das NOSintases (Wang et al., 2008). Entretanto, quando o mesmo modelo foi confrontado com um tratamento crônico (5 dias) o efeito cardíaco regulador foi mantido, porém ao se medir a expressão de RNAm para NOS no bulbo, foi encontrado um aumento para NOS_i e diminuição da expressão para NOS_n (Xia et al., 2008). Essa redução da expressão dessa enzima pela acupuntura também foi medida no hipotálamo após a utilização do ponto E36 em outro trabalho que se utilizou do mesmo modelo de isquemia cardíaca (Kim et al., 2008).

Parece que a mobilização da via NO/GMPc pela acupuntura também possui ações nas vias da dor pois, a estimulação do ponto E36 foi capaz de promover antinocicepção orofacial em ratos, efeito que foi inibido pela pré-injeção subcutânea de um inibidor inespecífico das NOS e de um inibidor da guanilil ciclase, enzima responsável pela ativação do GMPc (Almeida & Duarte, 2008).

c) Canabinóides:

Um outro grupo de substâncias endógenas com capacidade antinociceptiva e sobre o qual pouco ainda se sabe sobre sua relação com a acupuntura são os endocanabinóides.

Após a descoberta e o isolamento do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (Gaoni & Mechoulam, 1964), princípio ativo da maconha (*Cannabis sativa*), produto que já era usado para o tratamento da dor, seu mecanismo de ação começou a ser desvendado. Foram, então, descritos os receptores para a ligação do THC: os do tipo CB₁ (Matsuda et al., 1990; Gerard et al., 1991), que estão localizados principalmente nos terminais neuronais, tanto periféricos quanto centrais, em células gliais e em menor número no sistema reprodutor masculino, alguns sistemas glandulares e na microcirculação (Herkenham et al., 1991; Wagner et al., 1997; Batkai et al., 2001; Fonseca et al., 2005); e os receptores denominados CB₂ (Munro

et al., 1993), que são encontrados em grande quantidade em linfócitos B, e em menor expressão em monócitos e neutrófilos. Posteriormente foi demonstrada a expressão de receptores CB₂ nos gânglios da raiz dorsal e em células microgliais (Munro et al., 1993). Ambos os receptores estão acoplados à proteína G_i inibindo a ação da adenilil ciclase o que resulta num decréscimo de concentração intracelular de AMPc e de proteína quinase do tipo A (Felder & Glass, 1998; Devane et al., 1988; Howlett et al., 1990).

O receptor CB₁, que também está acoplado negativamente a canais para Ca²⁺ e positivamente a canais para K⁺ (Mackie et al. 1995), parece estar bastante envolvido com a capacidade antinociceptiva dos canabinóides uma vez que a administração espinal de seu agonista foi capaz de inibir respostas neuronais preferencialmente em fibras do tipo Aδ e C (Kelly & Chapman, 2001). Além disso, foi demonstrado que a administração de antagonista de receptores CB₁, WIN55,212-2, bloqueou a ação antihiperálgica canabinóide em modelo neuropático de constrição do nervo ciático em ratos (Herzberg et al., 1997).

A evolução dos experimentos que tentavam descrever a via do canabinóide culminou com o isolamento do ligante endógeno anandamida, uma molécula que possui a capacidade de deslocar a ligação específica de agonistas tipo THC e que produz ações canabinóides típicas (Devane et al., 1992). Sua formação ocorre pela clivagem do *N*-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE), um fosfolípide de membrana derivado do ácido araquidônico. Essa clivagem é catalisada pela enzima *N*-acetiltransferase (NAT), que é ativada através de uma reação Ca⁺⁺-dependente via proteína quinase do tipo A que, por sua vez, é ativada pelo aumento intracelular dos níveis de AMPc (Piomelli, 2003). Poucos anos depois, outro ligante foi clonado, assim chamado de 2-araquidonilglicerol (2-AG). Ele é formado a partir da ativação receptor-dependente de uma fosfolipase do tipo C que vai, por clivagem, produzir diacilglicerol (DAG) oriundo, também, de um fosfolípide de membrana.

O 2-AG é, então, formado pela ação hidrolítica da enzima diacilglicerol lipase sobre o DAG (Piomelli, 2003).

O término da ação do endocanabinóide se dá por recaptação não-dependente de ATP. Apesar de ainda não ter sido clonada uma proteína transportadora que facilitaria essa recaptação, já se conhecem substâncias que são capazes de inibi-la como, por exemplo, o VDM11 e o AM 404, o que produziria um aumento no tempo e na ação canabinóide. Depois de reconduzidos ao interior do neurônio, os endocanabinóides são degradados por diferentes enzimas: a anandamida é degradada pela hidrolase de ácidos graxos (FAAH), enquanto que o 2-AG é degradado pela monoacilglicerol lipase (MGL) (Di Marzo, 2006).

Atualmente, já são conhecidos vários outros ligantes endógenos para os receptores canabinóides, tais como noladina, virodamina e *N*-araquidonildopamina. Entretanto, estes ligantes carecem ainda de descrições mais detalhadas sobre suas funções em relação à via dos canabinóides (Guindon & Hohmann, 2009).

É sabido que a estimulação elétrica das porções lateral e dorsal da substância cinzenta periaquedutal é capaz de produzir aumento do limiar de retirada da cauda frente a estímulo térmico mediado por outras substâncias que não os opióides. O fato desse efeito ser parcialmente bloqueado pelo antagonista canabinóide SR141716A demonstra claramente o envolvimento de alguma substância endógena canabinóide. Corroborando a hipótese da ação canabinóide nas porções lateral e dorsal da substância cinzenta periaquedutal, foi demonstrado que a injeção de canabinóides nessas regiões foi também capaz de produzir antinocicepção (Walker et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que as regiões supracitadas produzem a liberação tanto de anandamida quanto de 2-AG após a injeção intraplantar de formalina (Suplita et al., 2005) ou após estímulos estressores como choque na pata do animal. Parece que o estímulo nocivo produz ativação dessas estruturas supra-

medulares que estão envolvidas com o sistema descendente analgésico, e que os canabinóides fazem parte desse complexo arcabouço neuronal ativado por esses estímulos. Interessantemente, a antinocicepção produzida pela liberação dos endocanabinóides frente ao estímulo estressor foi bloqueada por antagonistas de receptores CB₁ e não por antagonistas de receptores CB₂ ou opióides (Hohmman et al., 2005).

Porém, alguns trabalhos demonstraram a ação antinociceptiva, também, dos receptores CB₂, que parece ser restrita à periferia, uma vez que, em modelos animais de dor persistente, seus agonistas HU308 (Hanus et al., 1999) e AM 1241 (Malan et al., 2001) produziram antinocicepção, porém sem os efeitos colaterais típicos da ação central dos canabinóides como, por exemplo, a sedação e a depressão motora.

Apesar da descoberta desse sistema endógeno com capacidade analgésica, muito pouco foi feito no sentido de avaliar se a acupuntura também possui capacidade de mobilização dessa via para a obtenção de seus efeitos, principalmente a antinocicepção. O único trabalho sobre o tema publicado até o presente momento demonstra que a acupuntura nos pontos VB30 e VB34 possui a capacidade de diminuir a nocicepção inflamatória em patas de ratos através da ação em receptores CB₂ e não em CB₁. Essa antinocicepção foi concomitante com o aumento local do nível de anandamida medido por cromatografia líquida de alta performance (Chen et al., 2009).

Em outros modelos que não envolvem a antinocicepção, poucos, porém consistentes resultados foram encontrados sobre a ação da acupuntura sobre a via endocanabinóide. Em um modelo de isquemia cerebral, o pré-tratamento com acupuntura diminuiu a área do infarto, aumentou o escore de recuperação neurológica e diminuiu o nível de apoptose neuronal comparado com grupo controle. Esse efeito foi abolido pelo antagonista CB₁ AM 251, indicando a participação de canabinóides nesse resultado (Wang et al., 2009).

d) Ácido γ -amino butírico (GABA):

Outro sistema inibitório central sobre o qual a acupuntura apresenta potencial capacidade de modulação é o GABA.

O GABA é sintetizado a partir do glutamato pela ação da enzima glutamato descarboxilase (GAD) e estocado em vesículas, nos terminais nervosos, sendo sua liberação Ca^{2+} -dependente (Malcangio & Bowery, 1996). Esse neurotransmissor promove sua ação através da interação com os receptores classificados em 3 superfamílias: GABA_A e GABA_C , ionotrópicos e relacionados com canais para cloreto; e o GABA_B , de características metabotrópicas e pertencentes à superfamília da proteína G, podendo estar relacionados aos canais para Ca^{2+} ou para K^+ . Eles estão localizados, preferencialmente, em interneurônios inibitórios das lâminas I-II do corno dorsal da medula espinhal (Barber et al., 1978; Todd & McKenzie, 1989) onde participam da modulação dos neurônios nociceptivos aferentes primários além de agir na inibição pós-sináptica direta de neurônios motores (Malcangio & Bowery, 1996).

O término da ação GABAérgica é determinada por recaptção ativa. Sendo assim, a inibição da recaptção aumentaria as funções fisiológicas e comportamentais que são mediadas por esse neurotransmissor podendo ser uma ferramenta confiável para avaliar a participação do GABA no modelo testado (Yunger et al., 1984).

Ueda et al. (1987) relataram que o GABA, no cérebro e na medula espinhal, exerce diferentes papéis na transmissão da dor. O sistema gabaérgico cerebral promove a inibição de neurônios opioidérgicos, os quais promovem a ativação do sistema descendente inibitório facilitando, dessa forma, a transferência da informação nociceptiva. Na medula,

por sua vez, esse sistema envolve-se na inibição dos impulsos aferentes, promovendo antinocicepção.

Existem poucos estudos realizados até agora sobre a ação da acupuntura sobre o sistema GABAérgico. O primeiro deles demonstrou que a exposição prolongada ao estímulo elétrico nos pontos B23, B25 e E36 promove a inibição da ação do GABA, predominantemente no tálamo e no núcleo parabraquial, através da liberação de substâncias inibitórias no SNC (Chakrabarti et al., 1988), que parecem ser opióides endógenos (Pomeranz & Chiu, 1976). Essa ação inibitória da eletroacupuntura é reduzida ou completamente inibida pela injeção de diazepam intraperitoneal (Chakrabarti et al., 1989). Além disso, a PAG ventrolateral parece estar envolvida, pois, alguns autores demonstraram através de medida da variação da concentração extracelular de GABA, que a acupuntura parece promover a inibição da ação GABAérgica nessa região cerebral através da ativação da via endocanabinoide (Fu & Longhurst, 2009).

Além disso, mais recentemente, um grupo de pesquisadores demonstrou, em modelo de alodínea, que as injeções por via intra-tecal dos antagonistas GABA_A, gabazina, e GABA_B, saclofeno, foram capazes de inibir o efeito anti-alodíneo da acupuntura no ponto E36. Isto parece sugerir que a acupuntura provocaria a liberação de GABA na medula (Park et al., 2010).

e) Noradrenalina:

Uma vez que foi demonstrado que a eletroacupuntura produz diminuição do stress pela modulação dos níveis séricos de noradrenalina (Yang et al., 2002), parece importante avaliar se esse neurotransmissor também estaria envolvido na antinocicepção orofacial induzida pela estimulação do ponto E36.

São 3 as classes de receptores noradrenérgicos: α_1 , α_2 e β . Os receptores α_1 promovem sua ação pela ativação de canais para Ca^{2+} voltagem-dependentes e fosfolipase C via proteína G_q , enquanto que os receptores do tipo β agem através da ativação da enzima adenilil ciclase através da estimulação da proteína G_s . Por sua vez, os receptores do tipo α_2 promovem, via proteína $G_{i/o}$, a inibição da mesma enzima, produzindo uma ativação de canais para K^+ e uma inibição dos canais para Ca^{2+} (Millan, 1999).

Por ativarem mecanismos excitatórios, os receptores α_1 e β parecem não estar diretamente ligados à capacidade analgésica da via noradrenérgica. Porém, existem alguns trabalhos que demonstraram a ação analgésica dos receptores α_1 , mas essa ação, que ocorre ao nível do corno dorsal da medula, se dá pela ativação de interneurônios inibitórios que, por sua vez, vão inibir ou hiperpolarizar neurônios de transmissão promovendo, assim, a antinocicepção (Millan, 2002).

No entanto, os receptores do tipo α_2 parecem estar diretamente relacionados com a capacidade analgésica da via noradrenérgica, uma vez que a injeção intra-tecal de agonistas específicos para esta classe de receptores foram capazes de produzir um aumento do limiar de retirada da cauda em ratos (Aimone et al., 1987).

A presença de neurônios noradrenérgicos em estruturas relacionadas com a modulação da informação nociceptiva tanto a nível supra-espinal, como locus ceruleus e subceruleus, hipotálamo, PAG, e núcleo magno da rafe, quanto do corno dorsal da medula, mais especificamente lâminas I, II e V (Aimone et al., 1987; Millan, 1999) vem confirmar a capacidade antinociceptiva endógena que essa via possui.

Porém, os resultados com relação à capacidade analgésica da acupuntura via modulação noradrenérgica são, até o momento, controversos. A ioimbina, antagonista

específico dos receptores α_2 , foi incapaz de antagonizar o efeito antinociceptivo da eletroacupuntura no ponto E36 em modelo trigeminal de nocicepção causada por estimulação pulpar em coelhos (Takagi et al., 1996). Porém, essa mesma substância foi capaz de reverter a antinocicepção causada pela eletroacupuntura nos pontos ID6 (Koo et al., 2007) ou a aplicação de veneno de abelha no ponto E36 (Baek et al., 2006), em modelos de artrite induzida por colágeno e de torção ligamentar em ratos.

Em trabalhos nos quais foi feita a medida de noradrenalina após a estimulação por eletroacupuntura os resultados não são menos controversos. Em um trabalho, no qual foi utilizada a cromatografia de alta performance, foi encontrada uma diminuição no nível de noradrenalina no núcleo reticular paragigantocelular que foi concomitante com o aumento no limiar de dor (Wang et al. 1994). Porém, outro grupo demonstrou, através da marcação da molécula de noradrenalina com trício, que a acupuntura provocou um aumento de 40% em média dessa mesma substância em outros núcleos cerebrais tais como, hipotálamo e núcleo caudato (Sun et al., 1985).

Esses dados deixam claro a complexidade da atuação da noradrenalina nas diferentes áreas do sistema nervoso.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Uma vez que já foi demonstrada, em nosso laboratório, a capacidade da eletroacupuntura no ponto E36 em produzir antinocicepção orofacial em ratos, e que esse efeito pode ocorrer através da liberação de opióides endógenos e da ativação da via do óxido nítrico, os objetivos do nosso trabalho foram:

1- Objetivo Geral

Estudar os mecanismos endógenos mobilizados pela eletroacupuntura no ponto E36 para a indução da antinocicepção orofacial em ratos.

2- Objetivos Específicos

1) Determinar qual(is) das 3 isoformas da enzima NOS, a saber: neuronal, endotelial e indutível seria ativada pela acupuntura do ponto E36 para a obtenção da sua ação antinociceptiva orofacial em ratos.

2) Avaliar a possível ativação de canais para K^+ sensíveis a ATP, como mecanismo de finalização da via L-Arginina/NO/GMPc ativada pela acupuntura.

3) Avaliar se esse efeito antinociceptivo orofacial pode ocorrer através da ativação de outros sistemas endógenos já reconhecidas pelo seu efeito antinociceptivo, a saber:

- Canabinóides;

- GABA;

- Noradrenalina.

4) Avaliar se a ação da acupuntura sobre as vias nitrérgicas mobilizadas ocorre ao nível supra-espinhal e/ou espinhal.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A medicina tradicional chinesa (MTC) possui uma base de conhecimento própria construída por mais de 4000 anos que permeia todo o seu modo de funcionamento. No entanto, esse conhecimento adquirido de modo empírico, e até certo ponto fenomenológico, foi colocado em dúvida a partir do século XVIII quando os ocidentais começaram a ter contato com ele. Fez-se, então, necessário um entendimento dessa forma de abordagem terapêutica oriental, bem como dos mecanismos fisiológicos que são mobilizados pelos métodos e manobras utilizadas pela MTC à luz da ciência experimental, para a conquista de uma maior confiabilidade no ocidente daquilo que trazia grandes resultados clínicos positivos principalmente em áreas nas quais a terapêutica ocidental não atua de modo incisivo como, por exemplo, nas dores orofaciais e DTMs. A pesquisa científica, seja clínica ou laboratorial, parece ser o melhor caminho para dirimir tais dúvidas e aumentar essa confiabilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Animais:

Para todos os experimentos, foram utilizados 289 ratos Wistar machos pesando entre 180 e 230 g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos, nos dois dias anteriores e no próprio dia do experimento, em ambiente com condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas com luz iniciando às 07:00 h) e com livre acesso à ração e água durante os experimentos.

2- Imobilização:

Para a aplicação da acupuntura com o animal acordado, se faz necessária a utilização de um aparato de contenção (fig.2). Os ratos foram imobilizados em um cilindro plástico com 2 orifícios no sentido de permitir o livre acesso aos membros posteriores, local da aplicação das agulhas. Modelo semelhante de imobilização é utilizado por Hwang et al. (2002) e Medeiros et al. (2003 a; b). O tempo de imobilização é de 20 minutos, o que corresponde ao tempo necessário para a aplicação da acupuntura.

Com o intuito de se evitar a antinocicepção causada pelo estresse de contenção, os animais foram ambientalizados no aparato de contenção por dois dias, durante 20 minutos por dia. O experimento foi realizado no terceiro dia.

A definição dos tempos de estimulação e de ambientalização ao aparelho de contenção foram determinados em experimentos prévios realizados em nosso laboratório no início de todo o trabalho. Esses resultados estão divulgados na dissertação de mestrado do autor.

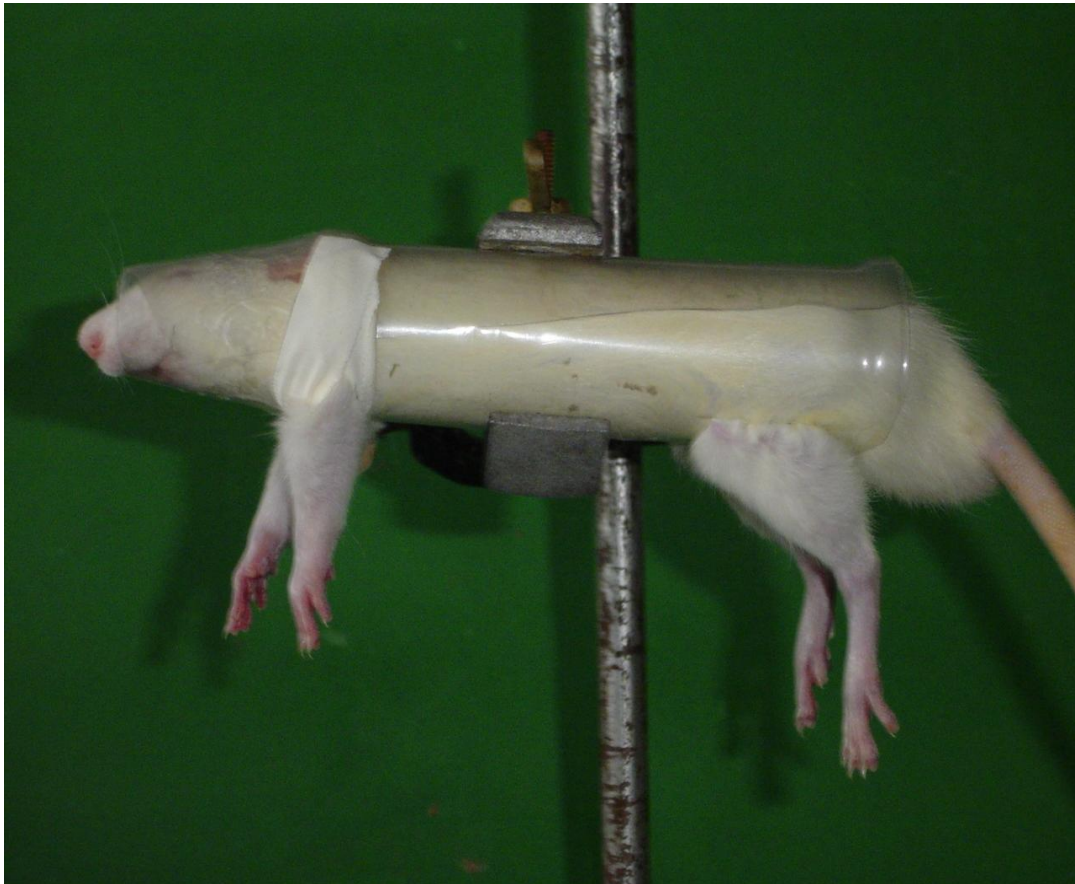
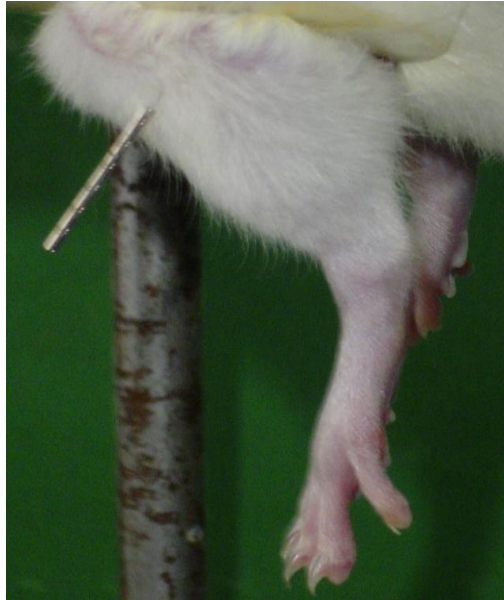


Figura 2 – Aparato de contenção do animal para aplicação da eletroacupuntura

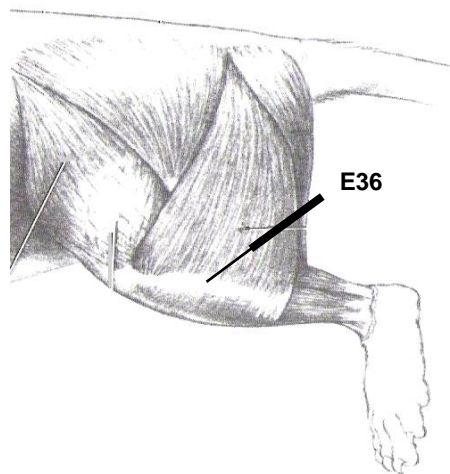
3- Eletroacupuntura:

Foram utilizadas agulhas de aço inoxidável com 7 mm de comprimento da ponta ativa e 0,17 mm de diâmetro inseridas bilateralmente a uma profundidade de 5 mm no ponto de acupuntura E36 (Estômago 36) localizado, no rato, no músculo tibial anterior, 10 mm distalmente à articulação do joelho (fig 3). Para a eletroestimulação, as agulhas foram conectadas ao eletroestimulador (Sikuro DS 100) da seguinte forma: cátodo conectado à agulha no membro inferior do lado direito e ânodo conectado à agulha no membro inferior do lado esquerdo. O tempo de estimulação foi de 20 minutos na frequência de 100 Hz. Os parâmetros foram definidos em experimentos anteriores (resultados não mostrados) sendo escolhidos para este trabalho os mais eficientes com menor frequência e tempo de estimulação. A intensidade do estímulo foi estabelecida com o intuito de aproximar o máximo possível o método de estímulo realizado na prática clínica. Nesse sentido, foi estabelecida uma intensidade sublimiar, para a qual se tem como limite, a contração da musculatura do membro estimulado e/ou vocalização do animal. O valor da intensidade foi, então, fixada em 0,5 mA e o pulso de 100ms.

Muito se tem discutido sobre os grupos controles necessários à validação do efeito da eletroacupuntura. Tem sido sugerido o uso de grupos “sham”, que correspondem ao agulhamento e eletroestimulação em um local não reconhecido como ponto de acupuntura; ou então do uso de um grupo chamado de agulha seca (AS), que é entendido como o agulhamento do ponto de acupuntura, porém sem qualquer estimulação. No nosso estudo, o controle preconizado escolhido foi o grupo agulha seca, considerado o mais próximo do grupo experimental e, portanto, mais adequado a avaliar a ação direta da eletroestimulação no ponto de acupuntura, no nosso caso, o E36.



A



B

Figura 3 – Localização do ponto E36 no rato e seu agulhamento. Foto (A) e esquema (B)

4- Protocolo Experimental

a) Teste algesimétrico

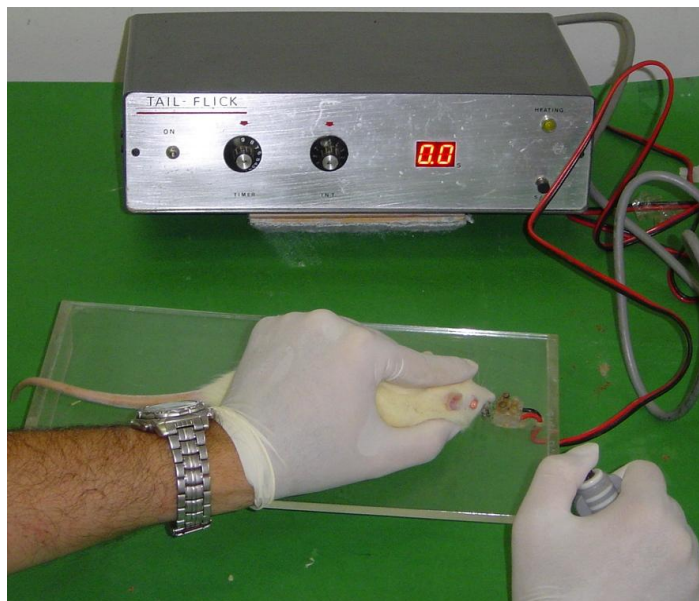
O Teste de retirada da cauda, conhecido também como “Tail-Flick”, inicialmente descrito por D’amour e Smith (1941) é um método bastante utilizado devido à sua sensibilidade, simplicidade e reprodutibilidade. Ele se caracteriza por uma resposta reflexa de retirada da cauda a um estímulo térmico. Como o estudo preconiza o padrão doloroso orofacial, foi feita uma adaptação ao método supracitado no qual o estímulo térmico foi, nesse caso, aplicado na face direita do animal com o propósito de estimular as terminações nervosas sensitivas trigeminais.

Então, para a avaliação do limiar nociceptivo, os animais foram mantidos manualmente com a face direita (região das vibrissas) em contato com uma resistência de NiCr à temperatura ambiente (Fig. 4). A temperatura da resistência é, então, aumentada por uma corrente elétrica até a obtenção do reflexo de afastamento da cabeça pelo rato. O tempo medido entre o início do estímulo e o reflexo de retirada é entendido como limiar nociceptivo do animal. Para ambientalizar os animais ao aparelho algesimétrico, estes foram, no dia anterior ao experimento, submetidos ao protocolo com o mesmo, por duas vezes com um intervalo de 30 minutos entre as submissões.

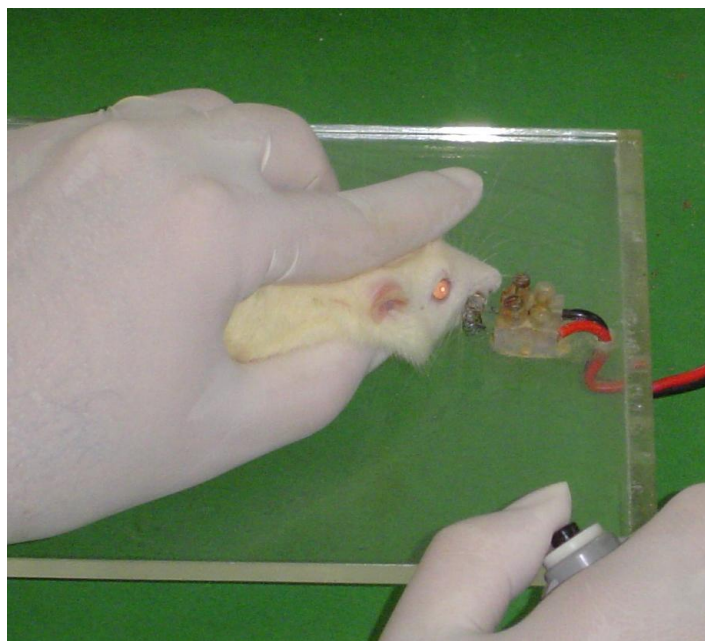
A intensidade do estímulo térmico foi ajustada da forma que o limiar basal se mantivesse entre 3 e 4 segundos. O tempo de corte foi estabelecido em 8 segundos no intuito de evitar danos teciduais ao animal.

A medida da latência basal do animal foi feita imediatamente antes das injeções das substâncias. No caso das injeções feitas por via intraperitoneal (IP), elas ocorreram 10 minutos antes do início da eletroacupuntura ou de forma tal que o pico de ação da droga correspondesse ao início das medidas pós-estimulação. Entretanto, quando da utilização das

vias intracerebroventricular (ICV) e intratecal (IT), a eletroestimulação se iniciou imediatamente após as injeções, pelo fato de essas vias não necessitarem de tempo para absorção dos fármacos. As medidas experimentais foram iniciadas logo após o término da eletroacupuntura. Medidas subseqüentes foram feitas a cada quinze minutos na primeira hora e a cada 30 minutos na segunda e terceira horas. Para substâncias que poderiam provocar um aumento do tempo de ação da eletroacupuntura, o tempo de medida foi estendido por mais duas horas, sendo uma a cada 30 minutos.



A



B

Figura 4 – Aparelho de termoeestimulação facial para teste algesimétrico (A) com posicionamento do animal para estimulação (B)

b) Dosagem de Nitrito (NO_2^-)

- Coleta de plasma e líquido

Para as coletas do plasma sanguíneo e do líquido, feitas imediatamente após o término da eletroacupuntura, os ratos foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de 200 μl de solução anestésica de ketamina 10% (80 mg/kg) e xilazina 2% (16 mg/kg).

O sangue foi coletado através de punção cardíaca. Para tal, o animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal, após o que foi localizado o terceiro espaço intercostal esquerdo, na região imediatamente infra-axilar do rato, onde foi inserida uma agulha pré heparinizada (80 x 1 mm, BD) colocada em 90° com relação à região dorso lateral do animal. O local de inserção foi escolhido por ser reconhecido como de maior facilidade em atingir o ventrículo esquerdo cardíaco, de onde o sangue foi coletado. O volume de coleta foi sempre superior a 1 ml de sangue por animal. Após a coleta, o sangue foi cuidadosamente colocado em tubos Falcon e imediatamente levado a uma centrífuga. O material foi, então, centrifugado por 10 minutos (2000 rpm, 313.6 G) e logo após, o plasma foi separado, e armazenado em tubos eppendorf em freezer a -80°C .

Para a coleta do líquido, o animal, depois de anestesiado, foi colocado em decúbito ventral e então foi feita uma punção entre a protuberância occipital e o processo espinhoso da primeira vértebra cervical do rato, o atlas, com uma seringa de dimensões de 13x 0,3 mm (BD). A coleta do líquido foi feita dentro da cisterna magna, sempre em um volume mínimo de 8 μl por animal, como preconizado por Nirogi et al (2009). Feita a coleta, o material foi acondicionado em um tubo eppendorf e imediatamente submetido a centrifugação por 5 minutos (6500 rpm – 2839.2 G). Logo após, o líquido foi levado a um freezer e armazenado a uma temperatura de -80°C .

c) Quantificação de Nitrito

A quantificação de NO, tanto no líquido, quanto no plasma, foi realizada de forma indireta através da dosagem de nitrito (NO_2^-), uma vez que o NO é altamente instável. Um dos métodos utilizados para a dosagem de nitrito é o ensaio colorimétrico pelo método de Griess. Este método requer que o nitrato (NO_3^-) seja reduzido a NO_2^- sendo este determinado pela reação de Griess. A redução enzimática de NO_3^- para NO_2^- requer a enzima nitrato redutase realizando a reação enzimática de forma mais satisfatória.

Para tal, uma amostra de 100 μl do soro foi adicionada em uma placa de 96-poços e, então, incubada por 30 min a 37 °C na presença de 0.2 U/ml aspergillus nitrato redutase, 50 mM HEPES, 5 μM FAD, e 0.1 mM NADPH totalizando um volume de 500 μl . Para a formação do branco, usado como controle, foi adicionado 100 μl de solução HEPES. Após esse período, 5 μl de LDH (1500U/ml) e 50 μl de ácido pirúvico (100 mM) foram adicionados a cada poço com o intuito de oxidar a reação do NADPH. Esta oxidação do NADPH, catalizada pela LDH, é essencial para a redução dos nucleotídeos de piridina (NADPH à NADH) que é fortemente inibida pela reação do Griess. As amostras permaneceram incubadas por um período de 10 min a 37 °C. Em seguida, 50 μl da solução presente na reação anterior foi transferido para outra placa de 96 poços, seguida da adição de 500 μl de cada um dos reagentes da reação de Griess (0,2% p/v de naftilenoetilenodiamina e 2% p/v de sulfanilamida em 5% (v/v) de ácido fosfórico) e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Logo após, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 543 nm.

5- Fármacos Utilizados:

Para a avaliação da mobilização pela acupuntura das vias endógenas citadas no item objetivos, serão utilizados os seguintes fármacos:

a) NO

- **Aminoguanidina** (TOCRIS – EUA): Inibidor específico da NOSi. Diluído em solução salina

- **NPLA** (N⁰-propil-L-arginina) (TOCRIS – EUA): Inibidor específico da NOSn. Diluído em solução salina

- **L-NIO** (dihidroclorido de N⁵-(1-iminoetil)-L-ornitina) (TOCRIS – EUA): Inibidor específico da NOSe. Diluído em solução salina

- **Glibenclamida** (TOCRIS – EUA): Bloqueador de canais para K⁺ ATP sensíveis diluído em solução salina. Diluído em solução salina com 1% de Tween

b) Canabinóides

- **AM 251** (N-(peperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazole-3-carboxamida) (TOCRIS – EUA): Antagonista de receptor CB₁. Diluído em solução salina com 25% de DMSO

- **AM 630** (6-iodo-2-metil-1-[2-(morfolinil)etil]-1H-indol-3-il(metoxifenil)metanona) (TOCRIS – EUA): Antagonista de receptor CB₂. Diluído em solução salina com 25% de DMSO

- **MAFP** (ácido metil araquidonil fluorfosfonato/(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-5, 8, 11, 14-eicosatetraenil-metil ester fosfofluorídrico) (TOCRIS – EUA): Inibidor de anandamida amidase. Diluído em solução salina com 25% de etanol anidro

- **VDM 11** ((5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(4-hidroxi-2-metilfenil)-5, 8, 11, 14-eicosatetraenamida (TOCRIS – EUA): Inibidor da recaptação de anandamida. Diluído em solução salina com 25% de etanol anidro

c) GABA

- **Saclofeno** (TOCRIS – EUA): Antagonista de receptor GABA_B. Diluído em solução salina

- **Guvacina** (TOCRIS – EUA): Inibidor da recaptação de GABA. Diluído em solução salina

d) Noradrenalina

- **Ioimbina** (TOCRIS – EUA): Antagonista de receptor α_2 adrenérgico. Diluído em solução salina.

6- Vias de Administração

A administração das ferramentas foi realizada através de 3 diferentes vias:

a) Intraperitoneal (IP)

Para avaliação sistêmica do efeito dos fármacos, os animais foram colocados em decúbito ventral e injetados, através de uma seringa hipodérmica com agulhas de 13 x 0,4 mm (BD) na região abdominal, no quadrante inferior esquerdo. O volume das drogas injetado, em cada animal, foi de 1 ml/kg. Para os grupos controle dessa via de administração, foi utilizada solução salina, ou seu respectivo veículo diluente, no mesmo volume.

b) Intracerebroventricular (ICV)

As drogas antagonistas foram injetadas por essa via de administração com o intuito de verificar se a acupuntura induz efeitos em vias neurais supra-espinais. Para tal, foi feita a implantação cirúrgica de cânulas-guia utilizando-se o método descrito a seguir.

O animal foi previamente anestesiado com tribromoetanol (250 mg/kg - IP - Aldrich Chemical Company, Inc.), submetido à tricotomia da região dorsal da cabeça, posicionado no aparelho estereotáxico e por meio de duas barras auriculares a cabeça foi colocada em posição fixa. Após a assepsia da pele com solução de álcool iodado, o anestésico local lidocaína contendo vasoconstritor foi injetado subcutaneamente na região do escalpo a ser aberta, a fim de se evitar sangramento. A seguir, foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo expondo-se a região da calota craniana. A torre do estereotáxico foi colocada em posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal ajustada até que os pontos bregma e lâmbda da calota craniana ficassem nivelados. O ponto de introdução das cânulas-guia (10 mm, confeccionadas a partir da agulhas hipodérmicas da aço inoxidável, 25 x 7 mm) direcionadas para o ventrículo lateral esquerdo foi determinado a partir do bregma levando em conta as coordenadas estereotáxicas obtidas com o atlas de Paxinos e Watson (1986), que são: ântero-posterior = -9,8 mm; latero-lateral = -2,2 mm; dorso-ventral = -6,5 mm. Após a localização do ponto de inserção, foi realizada a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício, foram introduzidas as cânulas-guia e, então, fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica de uso odontológico e de pequenos parafusos de aço inox, colocados na calota craniana previamente às leituras das coordenadas estereotáxicas. Após a completa fixação das cânulas-guia, a torre do estereotáxico foi

removida e com o objetivo de evitar a obstrução das cânulas foi introduzido nas mesmas um mandril de aço inoxidável (10 mm). Como medida profilática, após a cirurgia estereotáxica todos os animais receberam uma associação de antibióticos (0,2 ml de pentabiótico veterinário) por via intramuscular. Esses animais foram mantidos em caixas coletivas, em sala com temperatura e luminosidade controladas por um período de 3 a 4 dias.

As drogas e seus respectivos veículos diluentes foram injetados no ventrículo lateral esquerdo, em um volume de 2 μ l. Para tal, foi utilizada uma seringa Hamilton de 5 μ l (Hamilton, Reno, NV), conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora (33 gauge) na medida de 11 mm.

c) Intratecal (IT)

A utilização dessa via de administração foi escolhida para avaliar a interferência medular no efeito antinociceptivo orofacial da acupuntura no ponto E36.

Para facilitar a exata localização do sítio de injeção, entre a quinta e a sexta vértebra lombar, todos os animais que receberam injeção IT foram depilados no dorso, um dia antes do experimento. Para a injeção, os animais foram sedados por inalação de isoflurano (Cristália, Brasil). Após a localização exata, a injeção foi feita, no volume de 10 μ l utilizando-se de uma seringa hipodérmica acoplada a uma agulha com as dimensões de 13 x 0,3 mm. Esse volume foi utilizado tanto para as drogas antagonistas das vias estudadas quanto para seus respectivos veículos diluentes.

7- Avaliação Estatística

Os resultados serão apresentados como a média aritmética de 3 medidas do limiar de retirada, em segundos, (registro em triplicata) ponto a ponto \pm o erro padrão da média.

Para o tratamento estatístico dos dados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, sendo considerados estatisticamente válidos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1- Via NO/GMPc/KATP

- Ação dos inibidores competitivos específicos das NOSintases sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.

Com o bloqueio do efeito antinociceptivo da acupuntura induzido pela inibição inespecífica das NOSintases e da guanilil ciclase (Almeida & Duarte, 2008), foi demonstrado que, ao menos de uma forma geral, o NO está envolvido na antinocicepção orofacial obtida pela eletroacupuntura no ponto E36. Assim, tornou-se, então, necessário avaliar qual ou quais das 3 isoformas da NOSintase, a saber: indutível, neuronal e endotelial, estariam envolvidas na ação antinociceptiva da acupuntura.

Inicialmente, os resultados do gráfico 1 demonstram que a acupuntura foi capaz de aumentar consideravelmente o limiar de retirada da face do rato frente ao estímulo térmico, atingindo um pico de 6 a 7 segundos na primeira hora de experimento, o que corresponde a quase 100% de aumento se comparado ao limiar do grupo Salina + AS, que é de 3 a 4 segundos. Esse efeito permanece estatisticamente significativo por 150 minutos demonstrando claramente a capacidade antinociceptiva orofacial da acupuntura no ponto E36 em ratos. Esse padrão de resposta antinociceptiva foi mantido em todos os experimentos durante o período do estudo.

Em uma dose considerada eficaz pela literatura (2 mg/kg). Os resultados obtidos (gráfico 1) demonstram que a aminoguanidina e o L-NNA, inibidores das isoformas indutível e neuronal respectivamente, foram capazes de inibir completamente o efeito antinociceptivo da eletroacupuntura. O L-NIO, antagonista da isoforma endotelial, não inibiu o efeito induzido pela acupuntura.

Após esse resultado inicial, o próximo passo foi elaborar uma curva dose-resposta das inibições sobre as isoformas participantes da antinocicepção por acupuntura.

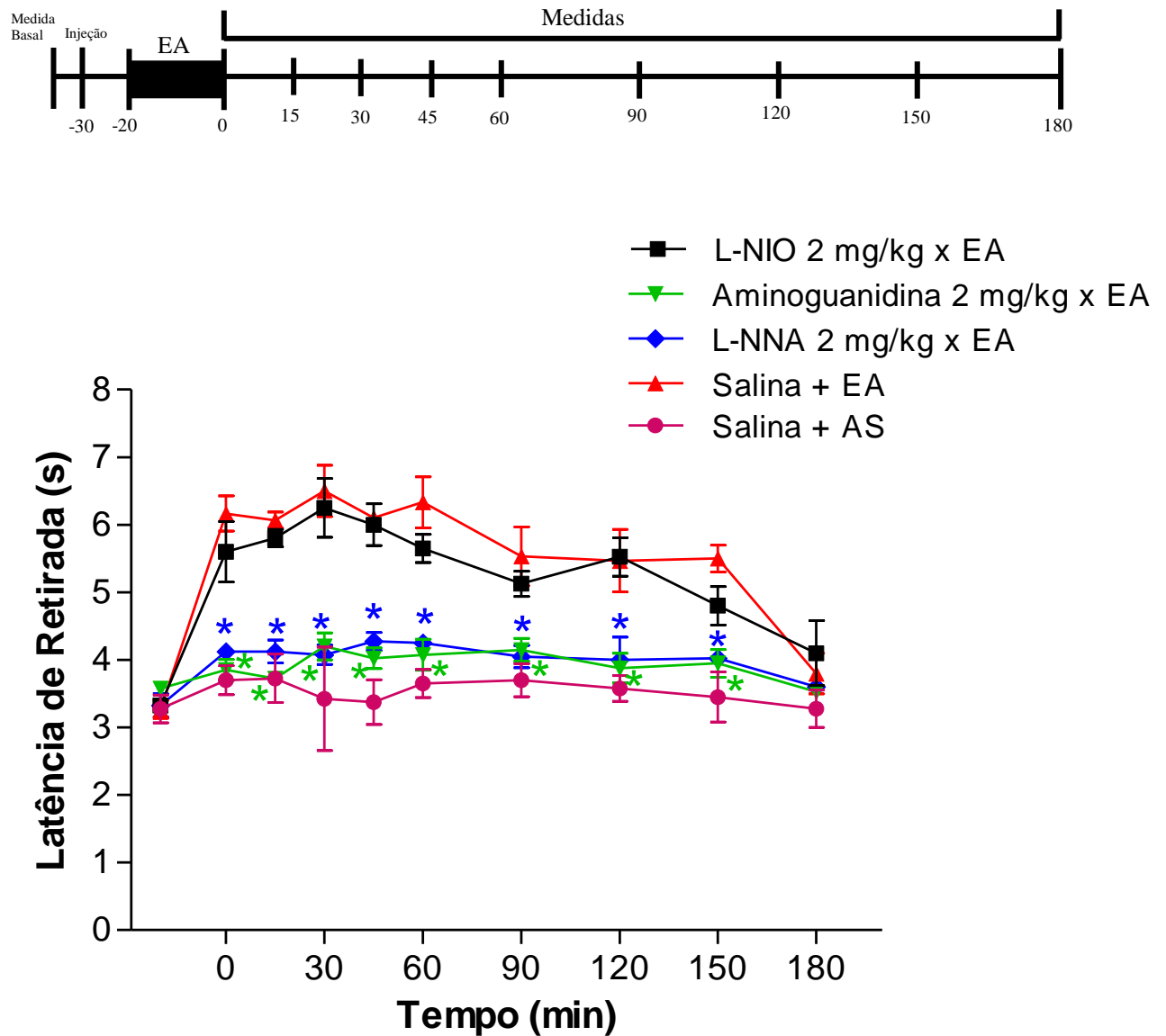


Gráfico 1 – Ação dos inibidores específicos das NOSintases sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção das drogas, que foram administradas 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Salina + EA) ($n=5$).

a) Aminoguanidina

O efeito antinociceptivo da eletroacupuntura foi completamente revertido pela pré-injeção do inibidor da NOS indutível, aminoguanidina, nas doses de 1 e 2 mg/kg (gráfico 2), sendo que com ambas as doses obteve-se resultados semelhantes e que perduraram por quase todo o tempo do experimento. Na menor dose utilizada, 0,5 mg/kg, a resposta foi estatisticamente significativa nos tempos 0, 60, 90, 120 e 150. A menor dose com maior eficácia de aminoguanidina (1 mg/kg + AS) não apresentou qualquer efeito inerente, seja nociceptivo ou antinociceptivo, no modelo testado, quando em comparação com o grupo agulhado no ponto E36, porém sem estimulação (Salina + AS), considerado em nosso método como grupo controle negativo.

b) N^o-propil-L-arginina (L-NNA)

Ao avaliar a capacidade de ação do L-NNA, inibidor da NOSintase neuronal, frente à antinocicepção orofacial da acupuntura (gráfico 3), o resultado foi semelhante ao obtido no experimento anterior tanto em relação ao efeito antinociceptivo da acupuntura, quanto à inibição desse efeito. Somente as duas maiores doses testadas, 1 e 2 mg/kg, foram capazes de inibir a antinocicepção e perduraram por todo o tempo do experimento.

Apesar da menor dose de L-NNA testada (0,5 mg/kg) ter apresentado uma tendência a obter o antagonismo parcial, a avaliação estatística não evidenciou eficácia significativa em bloquear a antinocicepção orofacial da acupuntura no ponto E36, mesmo levando em consideração o resultado positivo no tempo 90 minutos. Assim como com a aminoguanidina, o L-NNA na maior dose testada, 2mg/kg, quando confrontado com o

grupo no qual foi feito o agulhamento sem estimulação (Salina + AS) não produziu efeito, seja anti ou pró-nociceptivo.

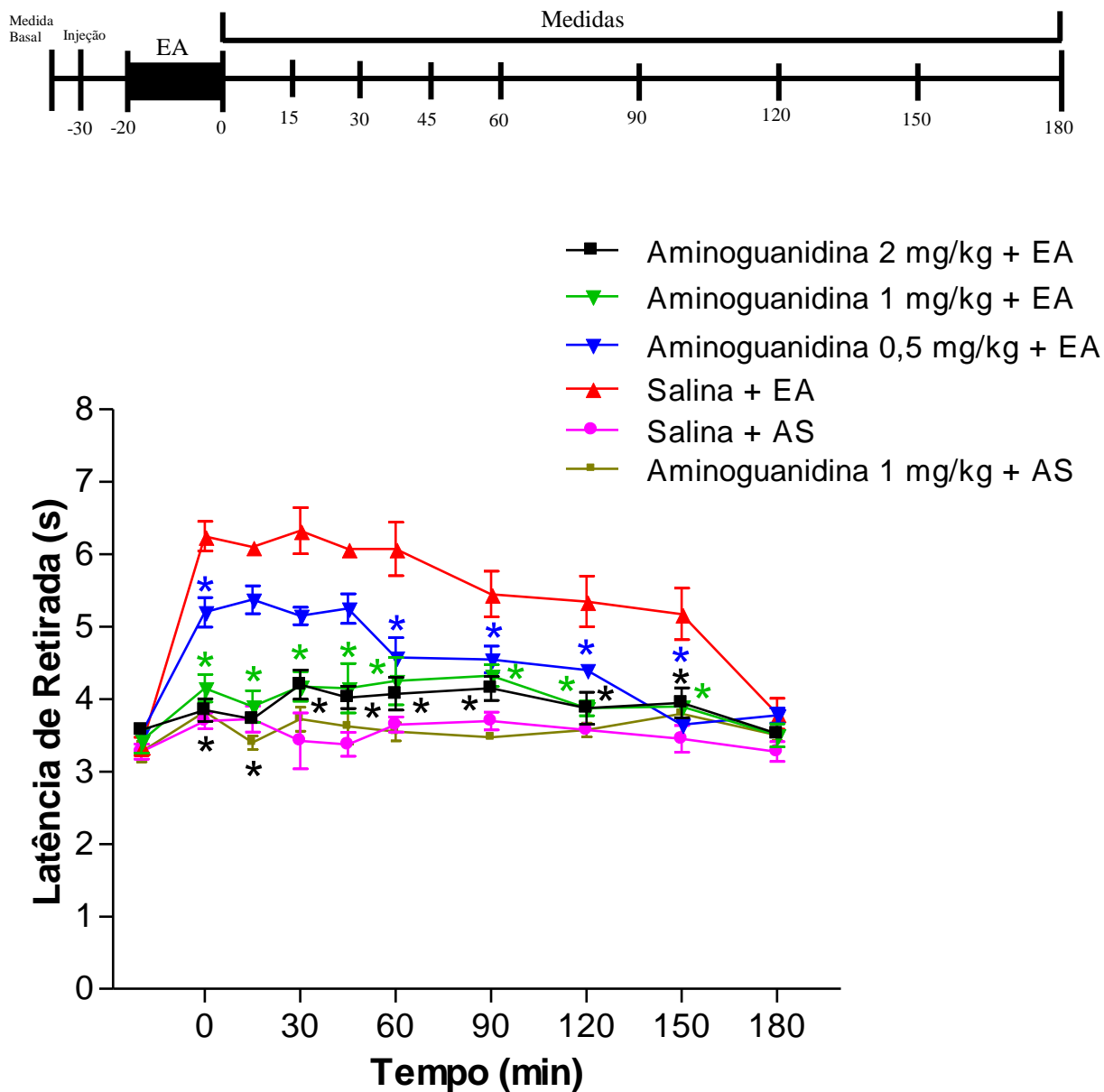


Gráfico 2 – Ação da aminoguanidina sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. A aminoguanidina (0,5, 1, 2 mg/kg) foi injetada 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Salina + EA) ($n=4$).

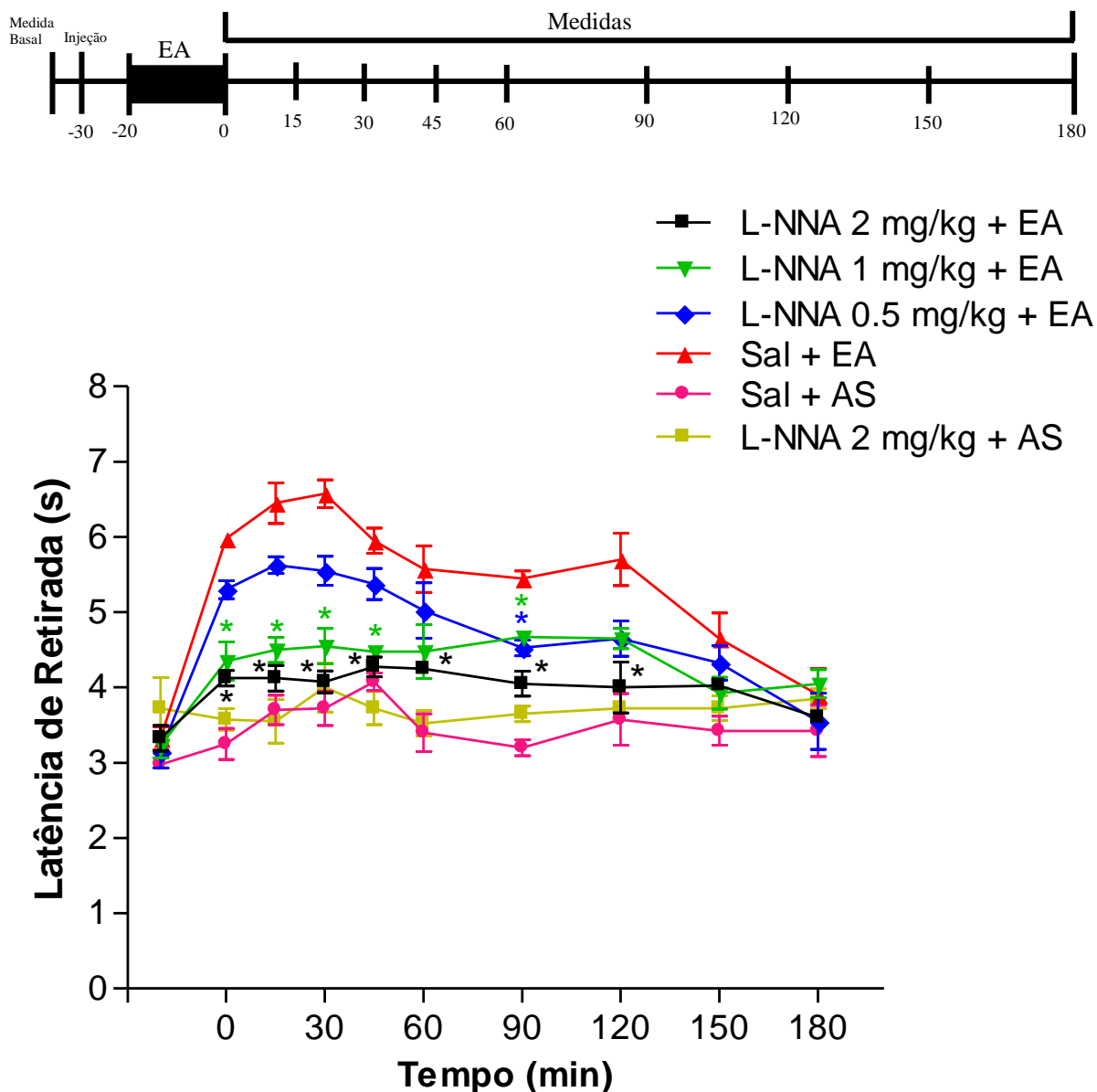


Gráfico 3 – Ação do L-NNA (N^o-propil-L-arginina) sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. O L-NNA (0,5, 1, 2 mg/kg) foi injetado 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Salina + EA) ($n=4$).

- Avaliação da modificação na concentração de nitrito promovida pela eletroestimulação do ponto E36.

a) Líquor

Após a avaliação farmacológica sobre a participação do NO no efeito antinociceptivo orofacial da eletroacupuntura no ponto E36, e com o intuito de reforçar os resultados obtidos, foram feitos experimentos de coleta de líquido e plasma do animal imediatamente após o término do estímulo da eletroacupuntura com a medida da concentração de nitrito nos meios supracitados.

O gráfico 4 representa os resultados da ação da acupuntura sobre a concentração de nitrito, um metabólito conhecido do NO, no líquido. A estimulação elétrica no ponto E36 promoveu um aumento na concentração de nitrito de 4 vezes, quando comparado com o grupo naïve, grupo no qual foi coletado o líquido sem que houvesse qualquer estímulo. Os resultados demonstram, também, que a injeção intra-peritoneal de 2 mg/kg do inibidor da NOS indutível, aminoguanidina, feita 10 minutos antes, faz com que a eletroacupuntura perca a capacidade de aumentar a concentração de nitrito no líquido. Além disso, corroborando resultados prévios, o grupo que foi agulhado no ponto E36, porém sem nenhum estímulo (Agulha Seca), não foi capaz de promover o aumento da concentração de nitrito, quando comparado com o grupo controle (Naive).

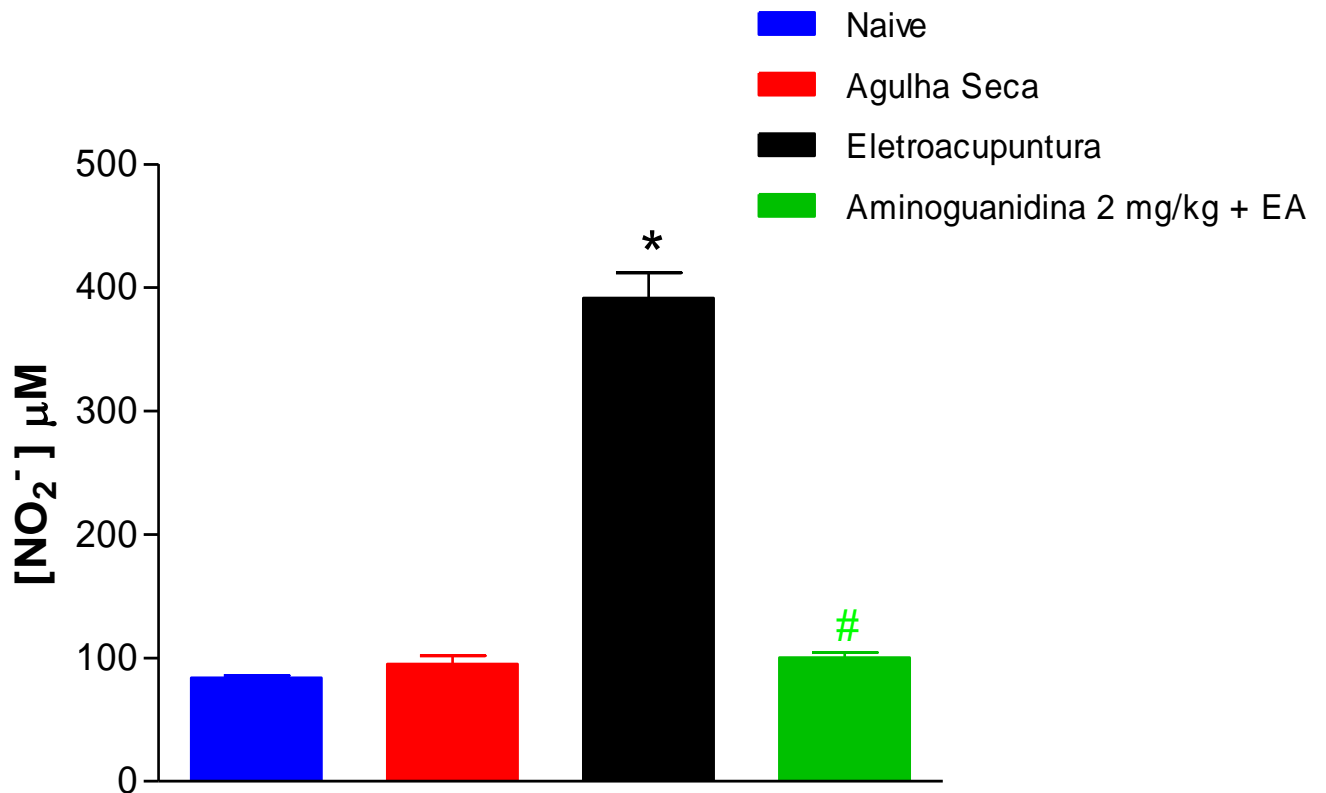


Gráfico 4 – Avaliação da variação na concentração de nitrito no líquido do rato após eletroacupuntura no ponto E36 e da administração de aminoguanidina. A coleta do material foi feita imediatamente após o término da eletroacupuntura, que perdurou por 20 minutos. Cada barra representa a concentração \pm E.P.M. * e # denotam significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo naive e eletroacupuntura, respectivamente ($n=5$).

b) Plasma

O gráfico 5 apresenta os resultados da variação da concentração de nitrito no plasma sanguíneo, coletado imediatamente após o término da eletroacupuntura. Nesse caso, também, a acupuntura foi capaz de promover aumento na concentração de nitrito no plasma, porém de menor magnitude do que o resultado anterior, quando comparado ao grupo controle negativo (Naive). Aqui, também, a aminoguanidina, na concentração de 2 mg/kg injetada intra-peritonealmente, 10 minutos antes da estimulação da acupuntura, foi capaz de inibir o aumento dessa substância no plasma. Mais uma vez, o grupo que representa o agulhamento sem estímulo (Agulha Seca) não obteve resultado significativo.

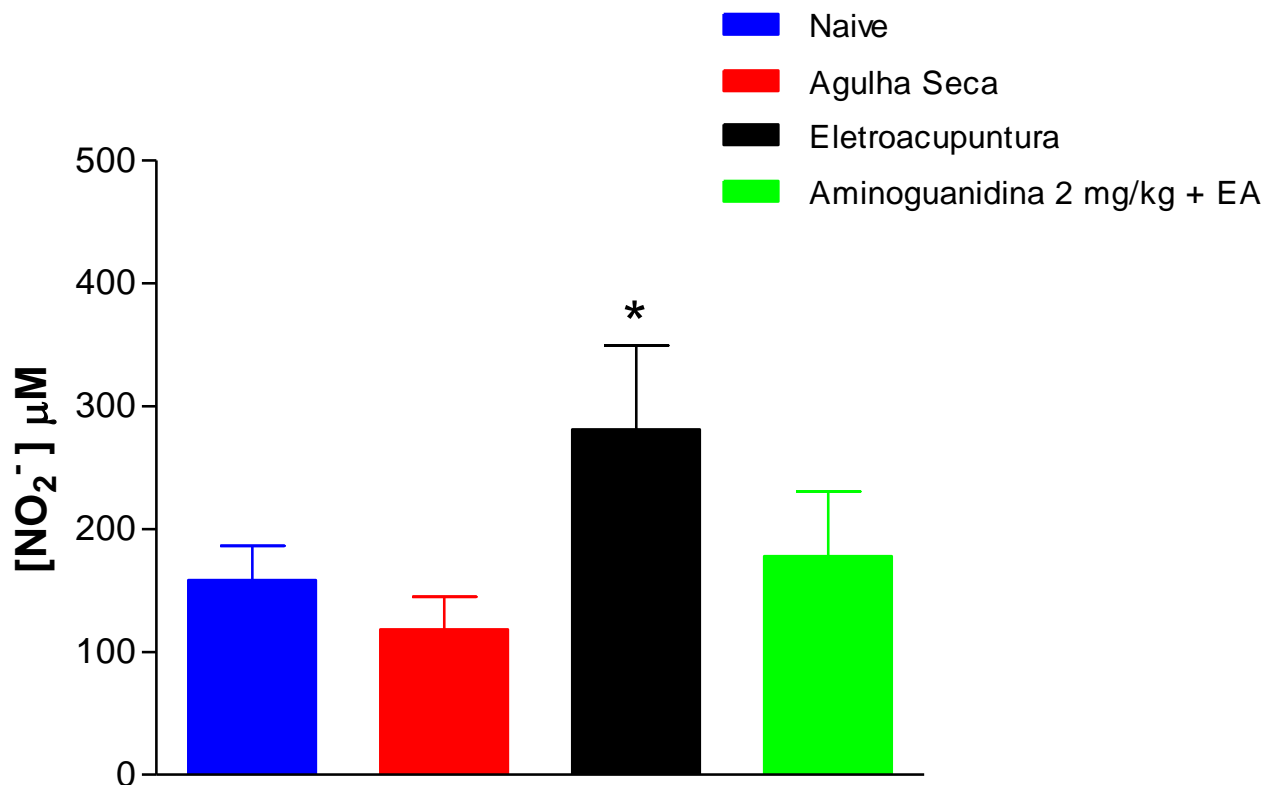


Gráfico 5 – Avaliação da variação na concentração de nitrito no plasma sanguíneo do rato após eletroacupuntura no ponto E36 e da administração de aminoguanidina. A coleta do material foi feita imediatamente após o término da eletroacupuntura, que perdurou por 20 minutos. Cada barra representa a concentração \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles ($n=5$).

- *Ação do bloqueador de canais para K⁺ sensíveis a ATP sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovida pela eletroestimulação do ponto E36.*

Foi descrito pelo nosso grupo, que a ação antinociceptiva da via L-arginina/NO/GMPc ocorre através da ativação final da abertura de canais para K⁺ ATP sensíveis. Uma vez que a acupuntura no ponto E36 parece ativar as isoformas indutível e neuronal da NOsintase. Resolveu-se avaliar se esses canais para K⁺ ATP sensíveis participariam desse efeito antinociceptivo.

Para tal, foi feito um experimento no qual foi realizada uma injeção de glibenclamida, bloqueador dessa classe de canais, 10 minutos antes do estímulo de eletroacupuntura do ponto E36. Os resultados, apresentados no gráfico 6, demonstraram que todas as doses testadas, 1, 2 e 4 mg/kg, foram capazes de inibir, em intensidades diferentes, o efeito antinociceptivo da eletroacupuntura. Curiosamente, a dose de 2 mg/kg, se mostrou eficaz somente na primeira hora, enquanto que a menor e a maior doses, 1 e 4 mg/kg, o foram por quase todo o período de teste, isto é, por 150 minutos. Essas doses obtiveram intensidade de efeitos relativamente diferentes, sendo que a maior dose, nesse experimento, foi capaz de abolir completamente o efeito antinociceptivo da acupuntura se igualando ao grupo controle (Salina + AS) e a dose de 1 mg/kg obteve um antagonismo de menor intensidade, se aproximando do efeito da dose de 2 mg/kg na primeira hora, mas ainda estatisticamente eficaz por 90 minutos, além de apresentar um ponto estatisticamente significativo aos 150 minutos. Nesse caso, também, a dose maior, que obteve eficácia no modelo estudado, quando confrontada com o grupo agulha seca (AS) não foi capaz de causar efeito *per se*.

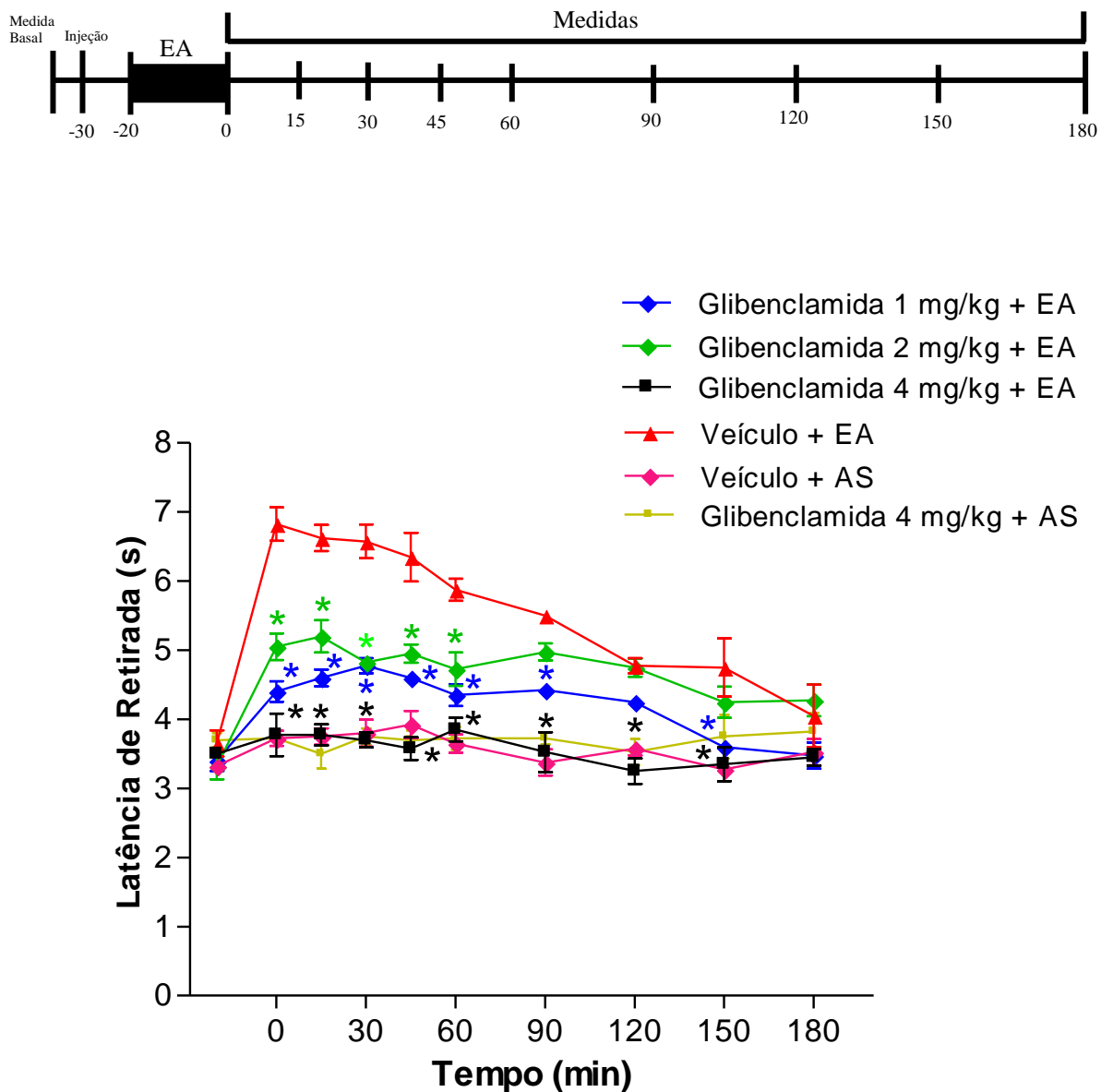


Gráfico 6 – Ação da glibenclamida sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. A glibenclamida (1, 2 e 4 mg/kg) foi injetada 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Veículo + EA) ($n=4$)

2- Via Endocanabinóide

- *Ação do AM 251, antagonista competitivo específico do receptor CB₁, sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.*

Os resultados do gráfico 7 demonstram que o aumento no limiar de retirada da face obtido pela acupuntura foi completamente revertido pela a injeção prévia do antagonista específico de receptor CB₁, AM 251, na maior dose testada, 2 mg/kg, reversão essa que parece ser total uma vez que o resultado obtido foi bastante semelhante ao grupo de agulha seca (veículo + AS), que representa o controle neste experimento. Além disso, essa reversão foi mantida por 150 minutos, o que corresponde a quase todo o tempo do experimento. A dose intermediária utilizada, 1 mg/kg, produziu uma reversão parcial do efeito antinociceptivo da eletroacupuntura, obtendo significância estatística somente no período inicial de teste e em alguns pontos esporádicos após a primeira hora. Apesar de um ponto com relevância estatística obtido aos 30 minutos, a dose de 0,5 mg/kg não foi capaz de produzir antagonismo no modelo estudado. O padrão antinociceptivo da acupuntura na ausência da pré-injeção do antagonista apresentou o mesmo perfil de todos os experimentos anteriores, com um efeito de mais de 150 minutos de duração e pico analgésico obtido por volta dos 30 minutos após o término da eletroestimulação do ponto E36.

A maior dose testada de AM 251 não possui efeito ativo *per se*, seja de anti ou pró-nocicepção.

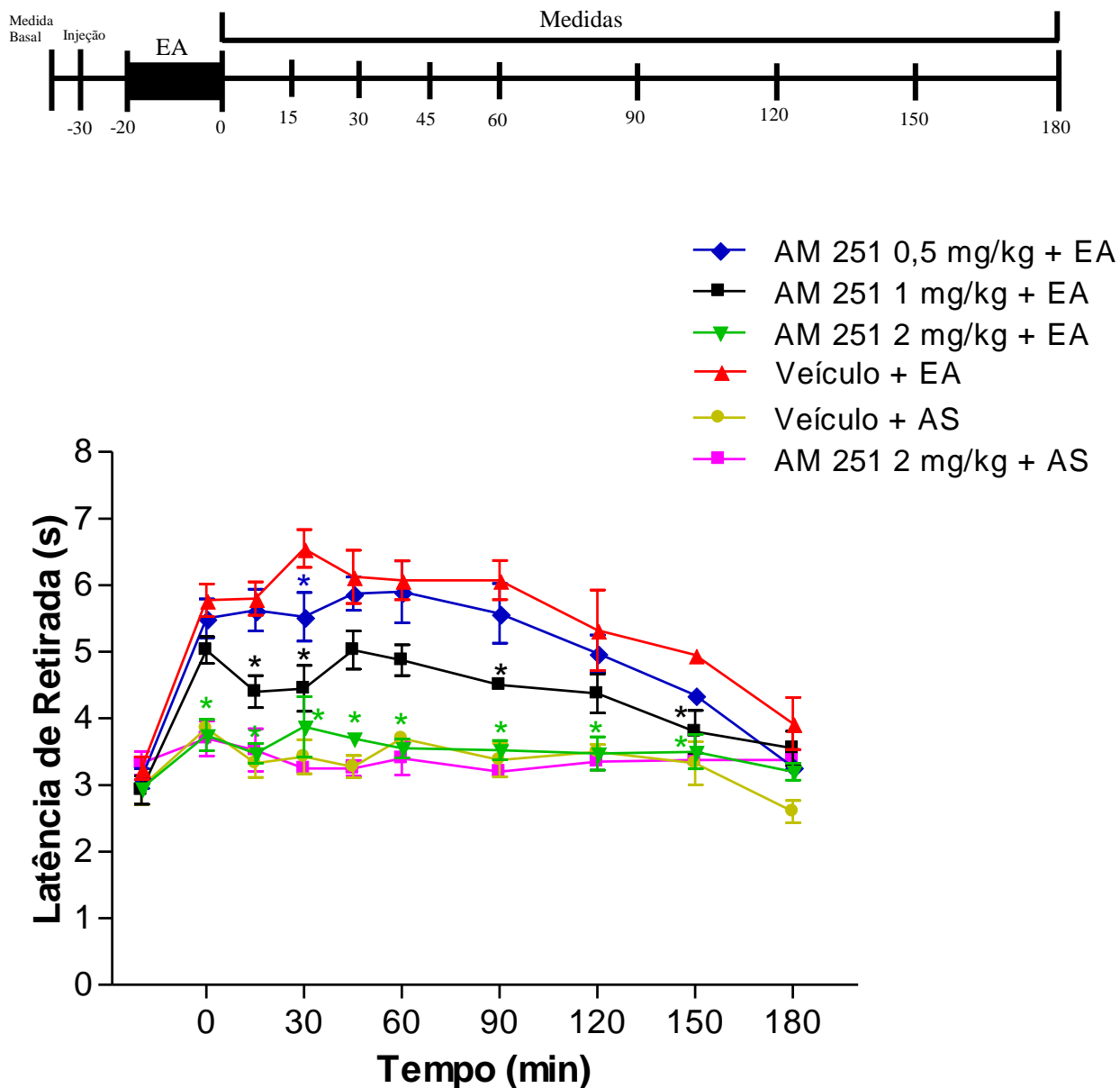


Gráfico 7 – Ação do AM 251 sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. O AM 251 (0.5, 1 e 2 mg/kg) foi injetado 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Veículo + EA) ($n=4$).

- Ação do AM 630, antagonista competitivo específico do receptor CB₂, sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.

Com o resultado positivo frente ao receptor CB₁, o próximo passo foi avaliar se o outro tipo de receptor canabinóide, CB₂, também participa da antinocicepção orofacial produzida pela acupuntura. Porém, os resultados do gráfico 8 demonstram que, quando esse efeito antinociceptivo foi confrontado com a pré-injeção de AM 630, antagonista específico de receptores CB₂, o resultado foi diferente do obtido anteriormente, ou seja, em nenhuma das doses testadas (1 e 2 mg/kg), o AM 630 conseguiu reverter o aumento do limiar de retirada da face do rato obtido pela acupuntura.

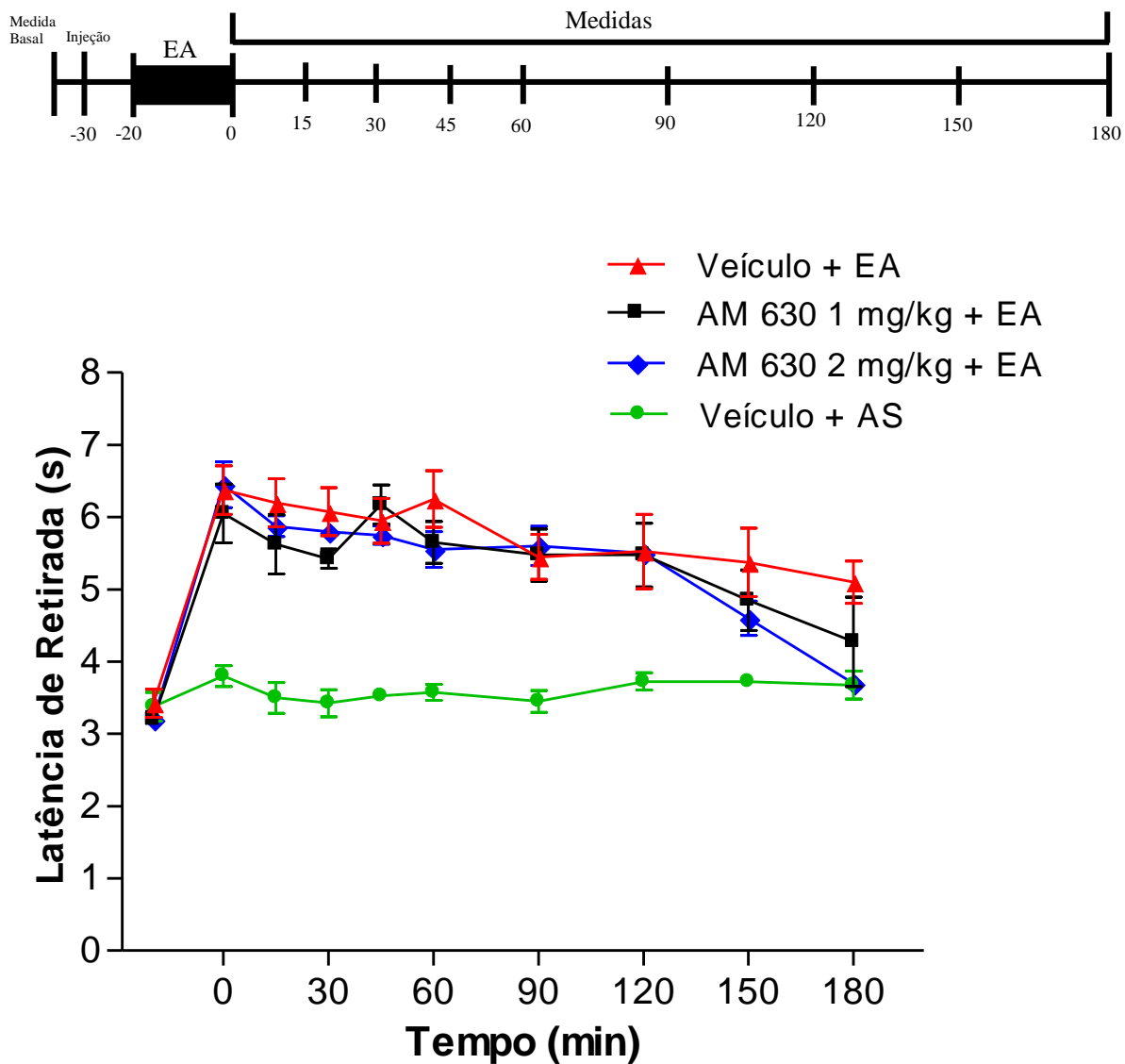


Gráfico 8 – Ação do AM 630 sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. O AM 630 (1 e 2 mg/kg) foi injetado 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. (n=4).

- Ação do MAFP, inibidor da enzima anandamida amidase, sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.

O MAFP, inibidor da anandamida amidase, enzima que degrada a anandamida, na maior dose testada, 2 mg/kg, foi capaz de potencializar consideravelmente a antinocicepção orofacial da acupuntura, uma vez que o pico de aumento na latência de retirada da face, que era de 6,3 segundos (T= 60 minutos) no grupo que foi eletroestimulado no ponto E36 (veículo + EA), elevou-se para 7,3 segundos (T= 30 minutos) no grupo que utilizou a maior dose do inibidor (gráfico 9). Em ambos, esse pico de efeito ocorreu durante a primeira hora de avaliação. Além do aumento do limiar, o MAFP, na maior dose testada, conseguiu prolongar a duração do efeito antinociceptivo da acupuntura de 180 para 270 minutos de forma estatisticamente significativa. A curva de 1 mg/kg se encontra acima do controle (Veículo + AE) sendo estatisticamente significativa aos 30 minutos do experimento e após 1 hora deste.

Curiosamente, quando confrontado com o grupo que foi agulhado no ponto E36, porém não recebeu estímulo de qualquer natureza (Veículo + AS), o MAFP (1 mg/kg + AS) foi capaz de produzir um efeito antinociceptivo dos 15 aos 120 minutos do teste que foi ausente no grupo controle. Entretanto, quando a mesma dose foi injetada em animais naive, nenhuma modificação no aumento do limiar de retirada foi observada. A menor dose testada, 0,5 mg/kg, também não obteve significância estatística nem em elevar o limiar antinociceptivo da acupuntura, nem em prolongar esse efeito.

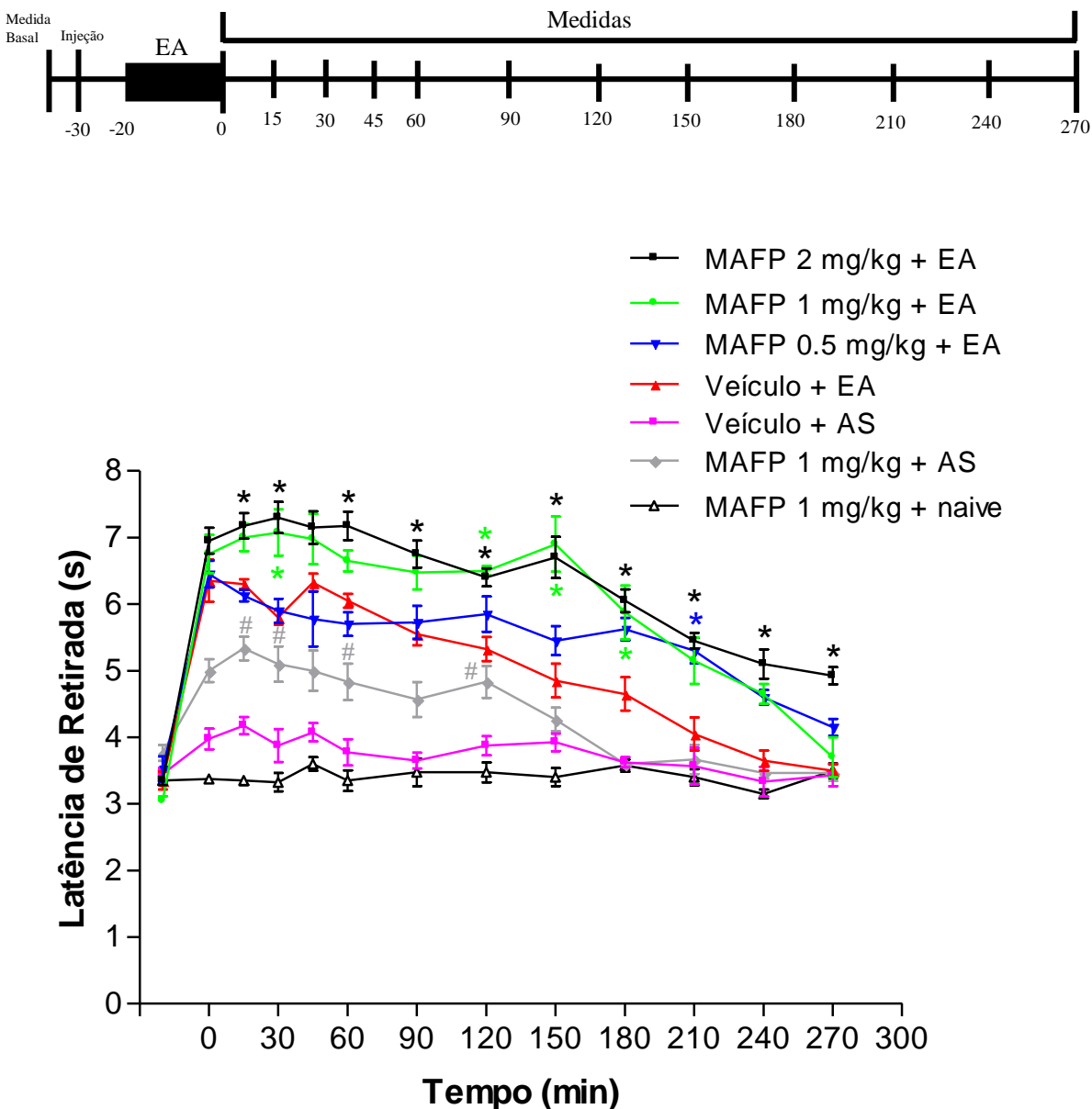


Gráfico 9 – Ação do MAFP sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. O MAFP (0.5, 1 e 2 mg/kg) foi injetado 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Veículo + EA) ($n=4$).

- Ação do VDM 11, inibidor da recaptação da anandamida, sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.

As doses testadas do inibidor da recaptação de anandamida, VDM 11 (5 e 10 mg/kg) foram capazes de prolongar o efeito da acupuntura de 180 minutos (Veículo + EA), para 240 minutos (VDM 11 + EA) (gráfico 10). Nesse caso, também, o grupo que foi agulhado no ponto E36, mas não recebeu eletro-estimulação (Veículo + AS) não foi capaz de promover efeito antinociceptivo algum.

Entretanto, a intensidade de ação antinociceptiva da acupuntura não foi potencializada com a pré-injeção IP do VDM 11, como ocorreu com o MAFP.

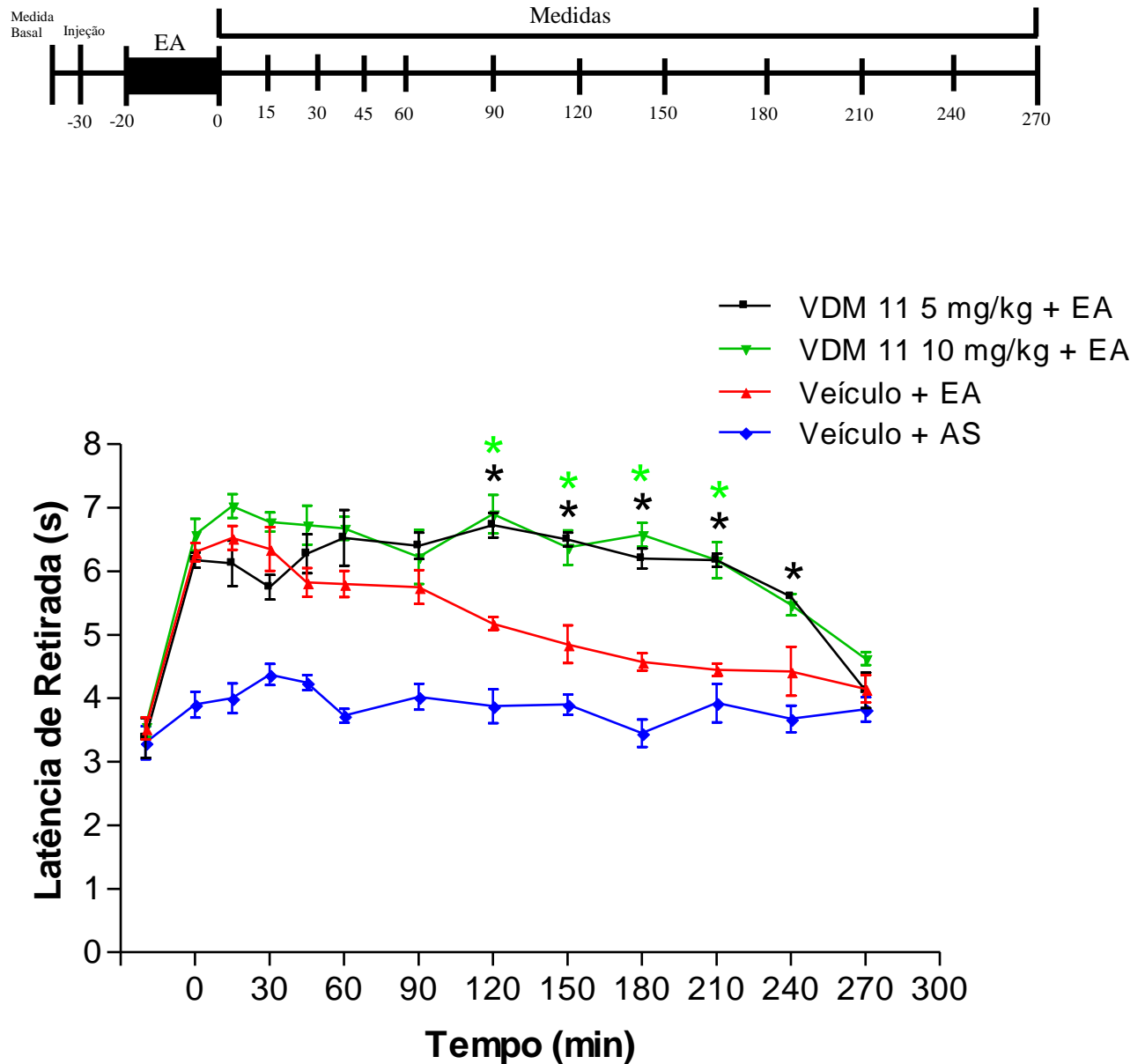


Gráfico 10 – Ação do VDM 11 sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. O VDM 11 (5 e 10 mg/kg) foi injetado 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Veículo + EA) ($n=4$).

- *Avaliação da participação de estruturas supra-medulares e/ou medulares sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36, através da pré-injeção ICV ou IT do AM 251, antagonista específico de receptores CB₁.*

Como o AM 251 mostrou ser eficaz em antagonizar o efeito antinociceptivo orofacial da acupuntura quando administrado sistemicamente, essa substância foi escolhida para avaliar se há participação de estruturas supra-medulares e/ou medulares na ativação do sistema canabinóide. Para tal, foram utilizadas duas vias de administração.

a) intracerebroventricular (ICV)

A pré-injeção ICV de AM 251 apresentou efeito antagonista de forma dose-dependente, pois, quando injetada nas doses de 1 e 2 µg o aumento do limiar nociceptivo que a estimulação do ponto E36 é capaz de produzir, representado no gráfico 11 pelo grupo VEÍCULO + EA, foi completamente bloqueado durante todo o tempo do experimento. Entretanto, a menor dose usada, 0,5 µg, não foi capaz de promover nenhuma modificação sobre esse efeito.

Mais uma vez, o grupo que recebeu o agulhamento no mesmo ponto, porém sem estimulação de qualquer natureza (VEÍCULO + AS), não foi capaz de produzir o aumento de limiar nociceptivo orofacial do rato, mantendo-se no mesmo patamar de resposta temporal por todo o período de avaliação.

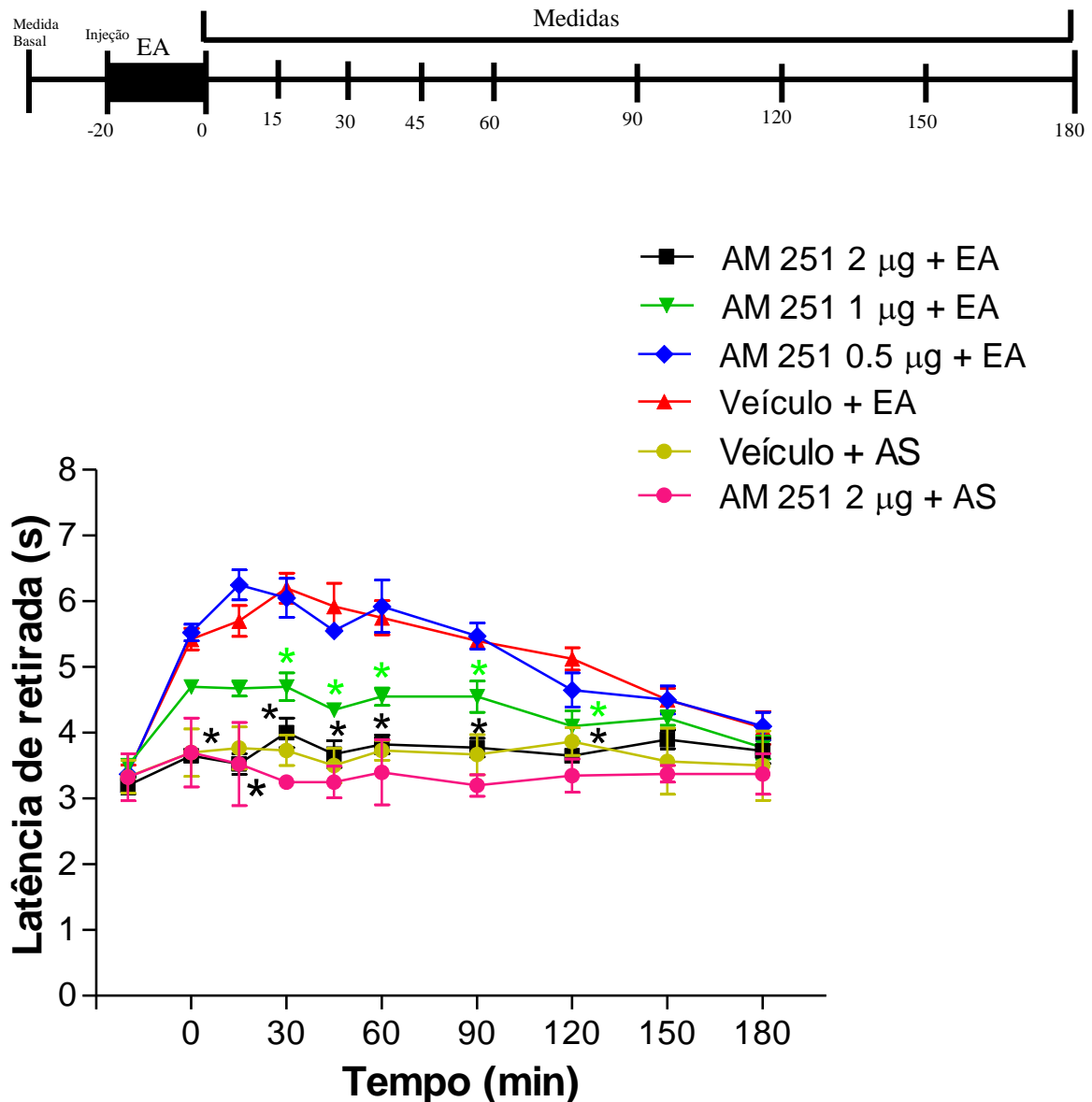


Gráfico 11 – Avaliação da ação da injeção ICV do AM 251 sobre a antinocicepção promovida pela eletroestimulação do ponto E36 sobre o limiar de retirada da face do rato. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. O AM 251 (0.5, 1 e 2 μg) foi injetado imediatamente antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Veículo + EA) ($n=4$).

b) Intra-tecal (IT)

Quando o AM 251 foi testado através da injeção intra-tecal, o antagonismo não foi obtido. Os resultados do gráfico 12 demonstram que a pré-injeção de 10 µg, uma dose considerada alta por trabalhos prévios (Yoon & Choi, 2003; Trang et al., 2006), não foi capaz de antagonizar o aumento do limar nociceptivo trigeminal obtido pela eletroacupuntura do ponto E36.

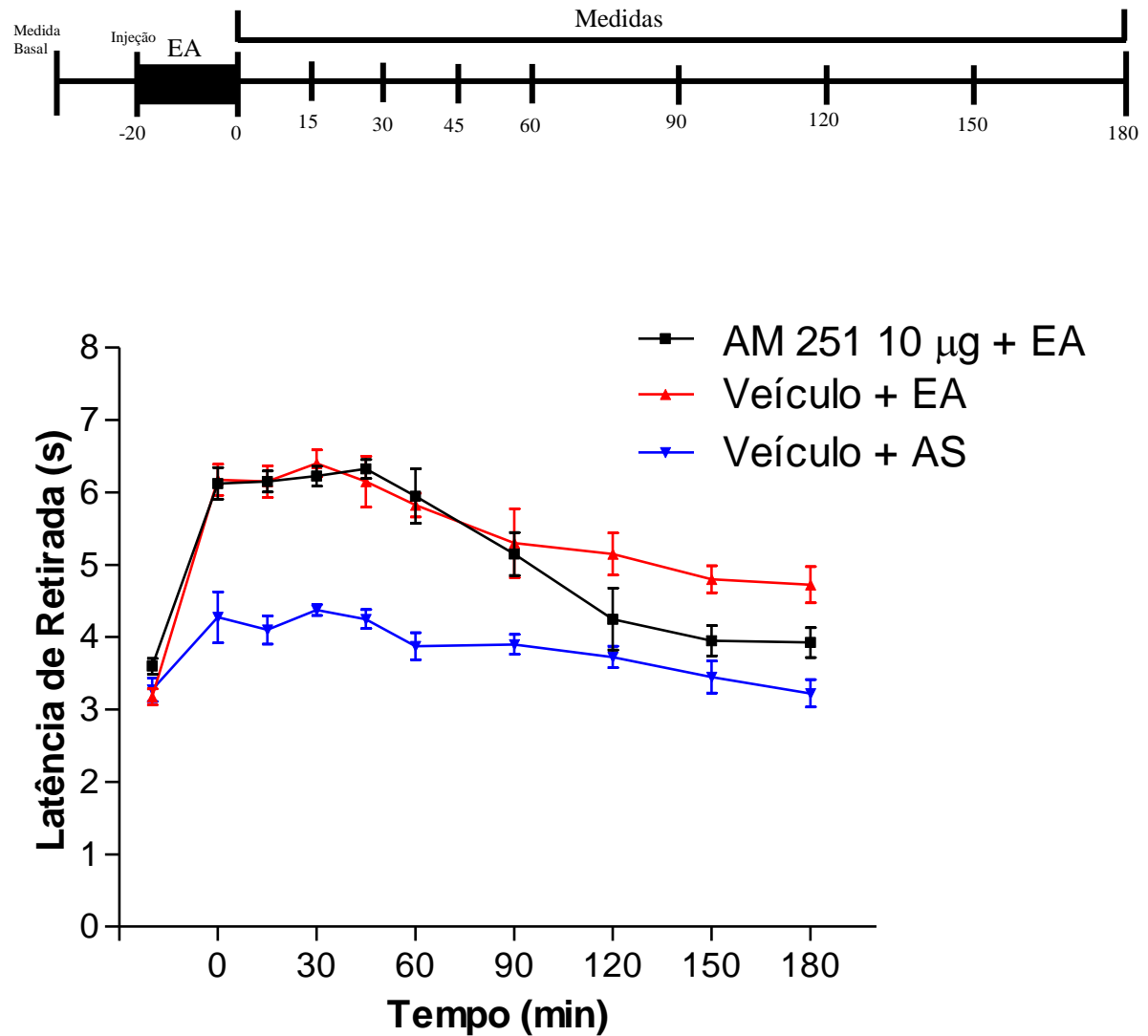


Gráfico 12 – Avaliação da ação da injeção IT do AM 251 sobre a antinociceção promovida pela eletroestimulação do ponto E36 sobre o limiar de retirada da face do rato. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. O AM 251 (10 µg) foi injetado imediatamente antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar ± E.P.M. (n=4).

3- GABA

- *Ação do saclofeno, antagonista competitivo específico de receptores GABA_B, sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.*

O GABA é um dos neurotransmissores inibitórios de maior importância no sistema nervoso central, principalmente no que diz respeito à modulação endógena da dor. Assim, se tornou importante a avaliação desta via como uma das que poderiam ser mobilizadas pela acupuntura no ponto E36.

Porém, os resultados do gráfico 13 demonstraram que a pré-injeção intra-peritoneal do antagonista GABA_B, saclofeno, em uma dose considerada alta por outros experimentos que utilizaram a mesma droga, 20 mg/kg, não conseguiu promover nenhuma modificação na ação antinociceptiva da eletroestimulação do acuponto. A droga não foi capaz de potencializar ou antagonizar a antinocicepção orofacial obtida.

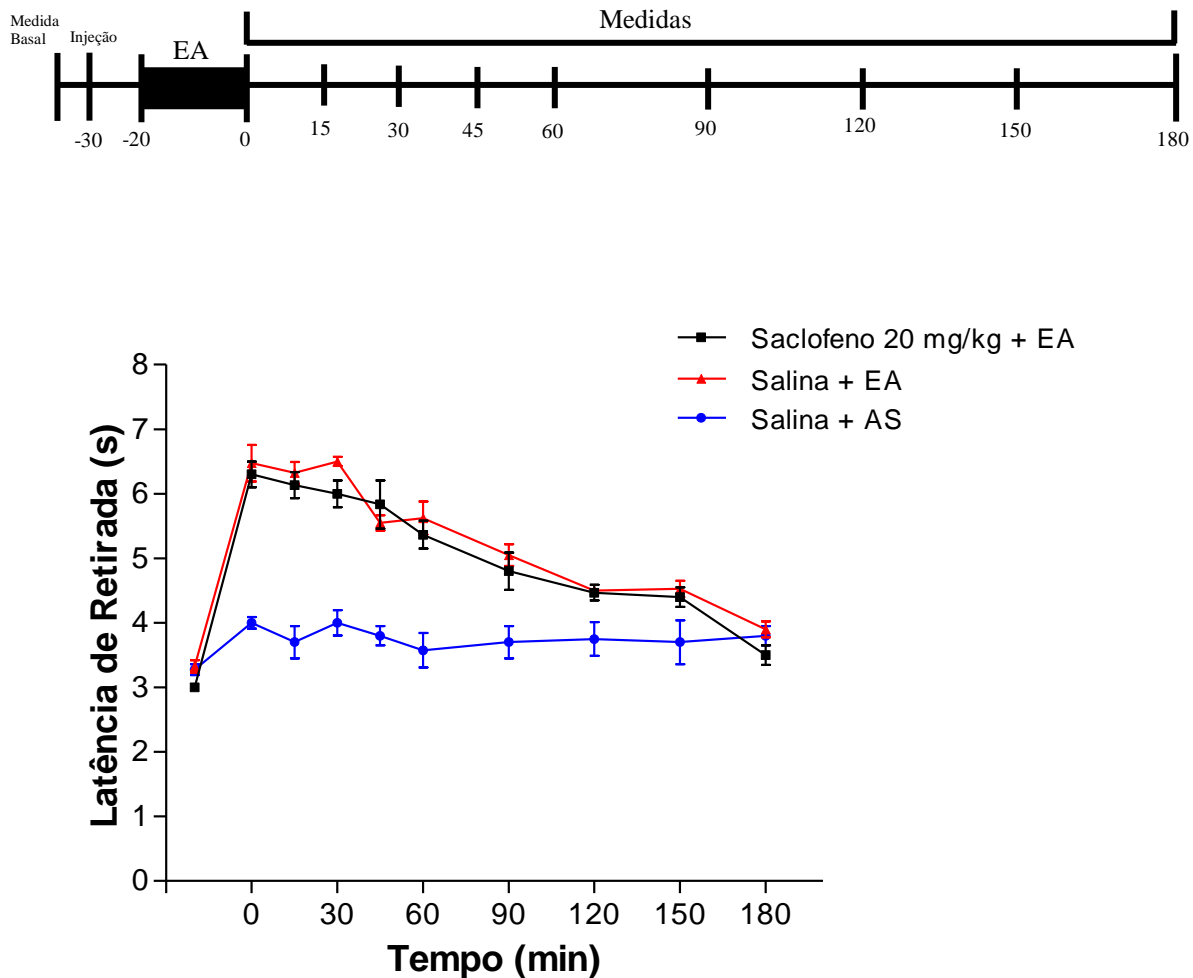


Gráfico 13 – Ação do saclofeno sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. O saclofeno (20 mg/kg) foi injetado 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. (n=4).

- Ação da guvacina, inibidor da recaptação do GABA, sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.

Já que anteriormente foi usado o antagonista de apenas um tipo de receptor GABA, o GABA_B, a utilização de um inibidor de recaptação do GABA, a guvacina, se apresenta como um bom instrumento para o estudo da participação desse neurotransmissor na antinociceção orofacial promovida pela eletroacupuntura no ponto E36.

Entretanto, os resultados obtidos pela pré-injeção de guvacina não foram diferentes daqueles do experimento anterior. Nenhuma das doses testadas (20, 40 e 80 mg/kg) obteve qualquer efeito estatisticamente significativo neste modelo. O gráfico 14 descreve esse resultado.

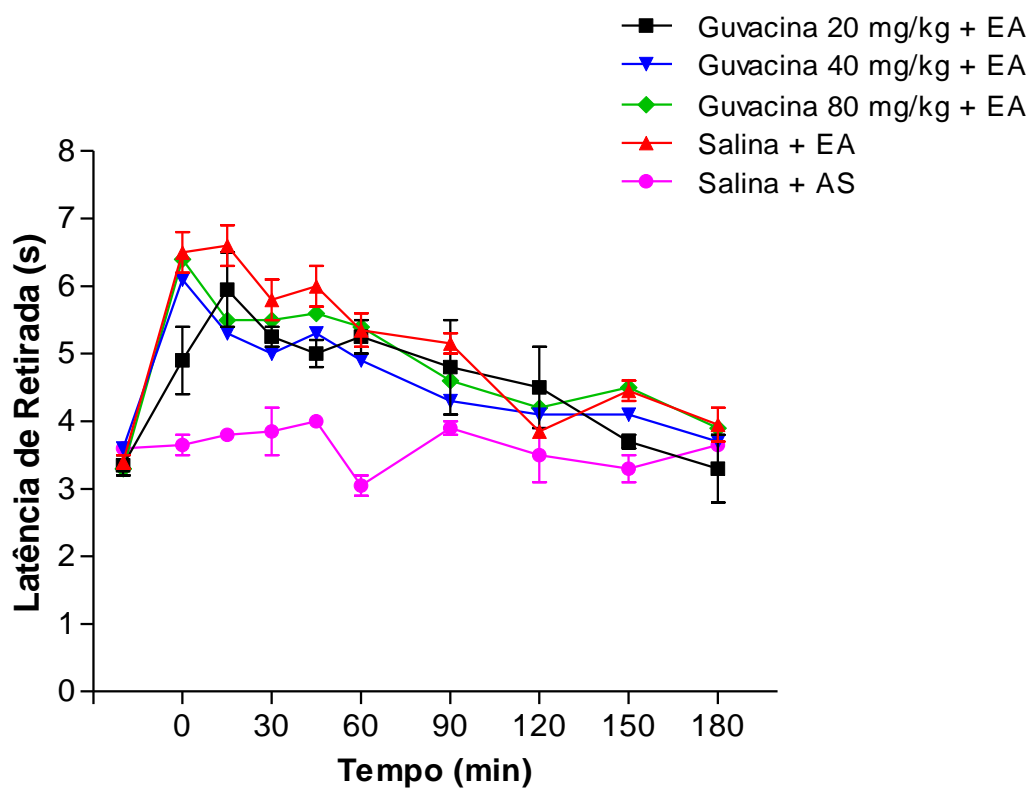
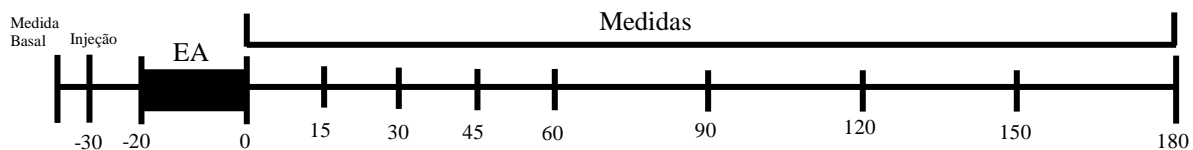


Gráfico 14 – Ação da guvacina sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. A guvacina (20, 40 e 80 mg/kg) foi injetada 10 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. (n=4).

4- Noradrenalina

- *Ação da ioimbina, antagonista competitivo específico de receptores α_2 adrenérgicos, sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36.*

A noradrenalina participa efetivamente do sistema analgésico endógeno descendente, através da ativação do núcleo A7, conhecido como *Locus Coeruleus*, que lança neurônios noradrenérgicos para o corno dorsal. Esses neurônios, através da ação em receptores α_2 , promovem a inibição do sinal nociceptivo. Esse fato faz com que se torne importante a avaliação dessa via no efeito antinociceptivo orofacial da eletroacupuntura

No entanto, os resultados obtidos no experimento que avaliou essa possibilidade, demonstrados no gráfico 15 são controversos, pois, a pré-injeção intraperitoneal de ioimbina, antagonista seletivo de receptores α_2 adrenérgicos, nas doses de 1 e 2 mg/kg não foi capaz de reverter o aumento do limiar nociceptivo do rato obtido pela aplicação de 20 minutos de eletro-estimulação no ponto E36. Curiosamente, a dose de 4 mg/kg de ioimbina obteve um resultado estatisticamente significativo nos tempos de 15, 45 e 90 minutos, exclusivamente, sendo que nos outros tempos de teste, esse resultado não foi obtido.

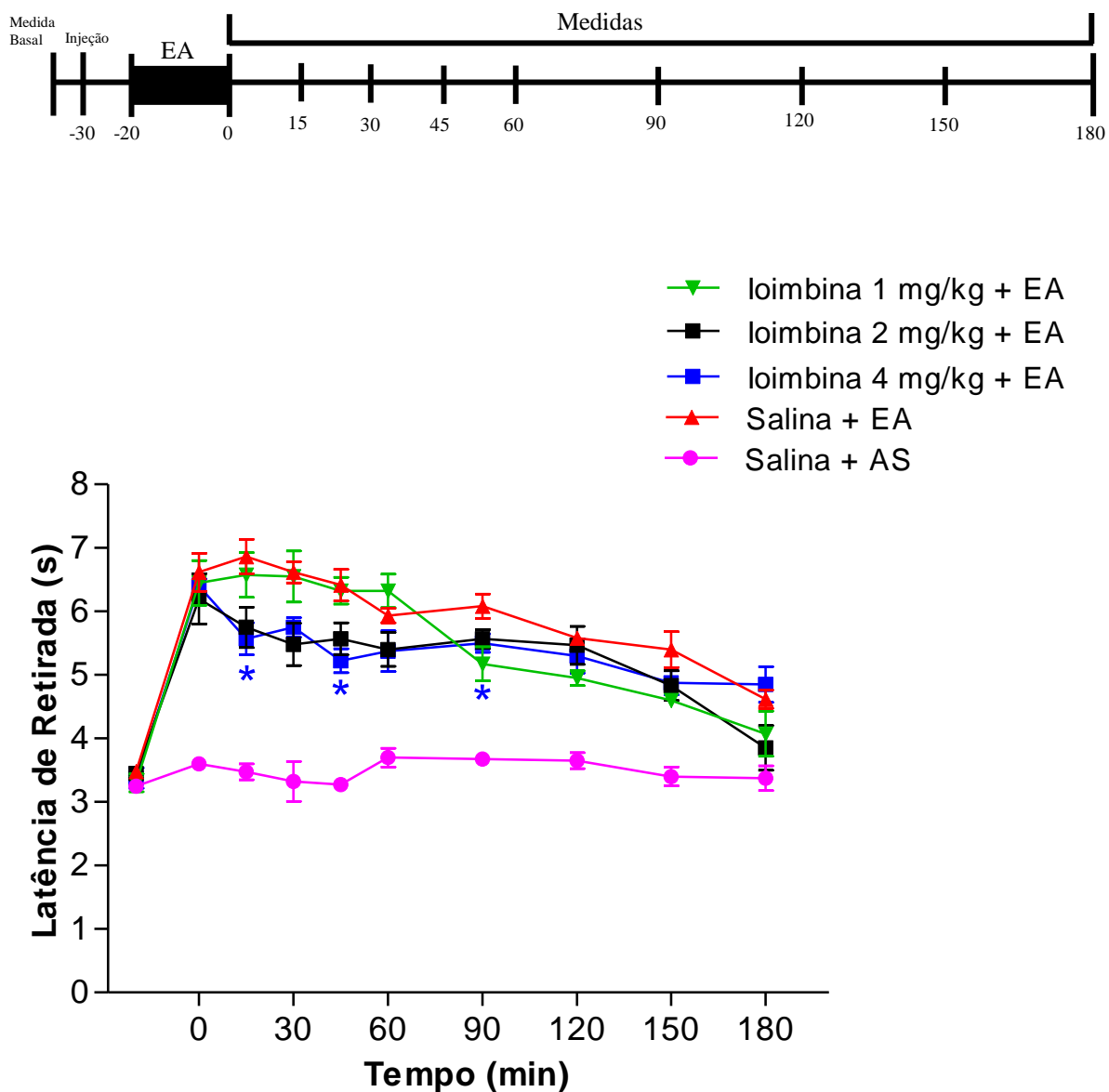


Gráfico 15 – Ação da ioimbina sobre o aumento do limiar de retirada da face do rato promovido pela eletroestimulação do ponto E36. A medida basal foi feita imediatamente antes da injeção da droga. A ioimbina (1, 2 e 4 mg/kg) foi injetada 15 minutos antes do início do estímulo elétrico que durou 20 minutos. Cada ponto representa a medida limiar \pm E.P.M. * denota significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Veículo + EA) ($n=4$).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O questionamento de que “se” a acupuntura possui capacidade de produzir analgesia está sendo respondido positivamente pela literatura científica, apesar de alguns trabalhos de avaliação meta-analítica sugerirem o contrário (Ezzo et al., 1999; Rosted, 2001; White et al., 2002). Essa dúvida levantada por esses autores se deve ao fato dos trabalhos clínicos avaliados não terem, em sua maioria, se utilizado de estudos randomizados e duplo-cego. Realmente, parece que o grande desafio no que concerne às pesquisas sobre acupuntura é a determinação de um grupo controle negativo, ou placebo, que seja fidedigno. Na tentativa de suprir essa lacuna, alguns trabalhos utilizam o agulhamento no ponto de acupuntura, porém sem qualquer estimulação, assim denominado de agulha seca (Knardahl et al., 1998). Outros pesquisadores preconizam como grupo controle a estimulação elétrica em uma agulha inserida em uma região contígua, porém fora do ponto de acupuntura, assim denominado de acupuntura *sham* (Xue et al., 2004).

Porém, os resultados positivos de pesquisas recentes, que avaliaram o efeito da acupuntura em animais favorecem, de forma contundente, a afirmação de que o agulhamento seguido de estimulação dos pontos de acupuntura possui capacidade de produzir antinocicepção (Chen & Ma, 2003; Ceccherelli et al., 2002; Baek et al., 2006). Além disso, ao se introduzir, nessa discussão, alguns trabalhos que avaliaram através de radio-imagem, como ressonância magnética funcional (fIRM), e/ou imagem por emissão de pósitron (Pet-scan), a capacidade da acupuntura em ativar estruturas relacionadas com a via descendente inibitória como, por exemplo, núcleos hipotalâmicos, estruturas do tronco cerebral, principalmente a PAG, o córtex somatossensorio primário, além de diminuir a ativação de outras tais como sistema límbico e amígdala (Hsieh et al., 2006), se pode considerar, atualmente, um fato científico a ação analgésica e antinociceptiva da acupuntura

Sendo assim, o próximo passo parece ser a descrição de “como” essa analgesia obtida pela acupuntura acontece. Nesse sentido, vários pontos já parecem ter sido esclarecidos por pesquisas anteriores. O mais antigo deles descreve a capacidade de ativação da via opioidegérica pela acupuntura (Ji-Sheng, 1981; Hwang et al., 2002; Ceccherelli et al., 2002). Essa descrição é reforçada por trabalhos que demonstraram a ativação de receptores opioidegéricos em diferentes núcleos supra-espinais envolvidos com o sistema analgésico endógeno (Ma, 2004). Nosso grupo demonstrou que a via nociceptiva trigeminal pode ser influenciada pela acupuntura através da sua capacidade de ativação da via opioidegérica endógena (Almeida et al., 2008).

Porém, é sabido que outras vias, com o envolvimento de outras substâncias, que não os opióides de forma direta, também estão envolvidas nesse sistema antinociceptivo endógeno (Millan, 2002). Nosso trabalho, então, foi procurar descobrir se outras vias, já sabidamente participantes desse sistema analgésico endógeno, estariam envolvidas nessa já descrita capacidade antinociceptiva orofacial da eletroacupuntura no ponto E36.

1- Óxido Nítrico

Resultados prévios do nosso grupo demonstraram que a pré-injeção tanto do inibidor inespecífico da enzima NOSintase quanto do inibidor da guanilil-ciclase bloqueiam totalmente o efeito antinociceptivo orofacial da acupuntura sugerindo que a via L-arg/NO/GMPc parece participar desse efeito (Almeida & Duarte, 2008). Nesse sentido, e com o intuito de descrever mais detalhadamente como se dá essa relação, nossos novos resultados demonstraram, no entanto, que somente as isoformas neuronal e indutível da NOSintase parecem ser ativadas pela ação da eletroacupuntura, pois, a pré-injeção dos seus inibidores foi capaz de inibir a antinocicepção da acupuntura. A isoforma endotelial, nesse

modelo, parece não ser influenciada pela acupuntura (gráficos 1, 2 e 3). Apesar da escassez de trabalhos que descrevem o envolvimento da via do NO na antinocicepção da acupuntura, trabalhos nos quais outros métodos foram utilizados levam à percepção de que esses resultados obtidos nestes experimentos, de forma alguma, são inesperados. Trabalhos prévios demonstraram que a acupuntura no ponto E36 produz hipotensão em ratos normotensos concomitantemente com o aumento da expressão da NOSintase neuronal no núcleo grácil (Ma et al., 2005), além de não interferir no fluxo sanguíneo periférico, no qual a isoforma endotelial da NOSintase está envolvida (Hsieh et al., 2006). Além disso, essa técnica foi capaz de diminuir a síntese de óxido nítrico no hipotálamo de ratos hipertensos espontaneamente utilizando o mesmo ponto (Kim et al., 2008). Curiosamente, outro grupo, também utilizando o mesmo modelo experimental com ratos hipertensos demonstrou um aumento da expressão tanto da isoforma neuronal quanto da endotelial de NOSintase provocado pela estimulação do ponto VG20 (Hwang et al., 2008). A diferença entre esses resultados parece estar no local de avaliação da presença da enzima uma vez que, nos primeiros trabalhos ela foi estudada em estruturas do sistema nervoso central, enquanto que no último, a avaliação foi feita em artérias mesentéricas. Além disso, a diferença no ponto utilizado pode ser uma explicação teórica para essa diferença, o que nos levaria a sugerir que o ponto E36 teria uma ação mais central do que o ponto VG20.

No sentido de dirimir a dúvida sobre qual região seria mais afetada pela ação da acupuntura na ativação da via do NO, foi conduzido um experimento no qual foi feita a dosagem de nitrito, um metabólito mensurável do NO, no líquor e no plasma. Os resultados demonstraram que a estimulação do ponto E36 produz um aumento na quantidade de nitrito em ambos os locais, porém com uma considerável diferença em favor do nitrito dosado no líquor onde foi obtido um aumento em 4 vezes do nível da substância supra-citada (gráfico

4), enquanto que, no plasma esse aumento foi significativo porém em um grau consideravelmente menor (gráfico 5). Esses dados corroboram o fato de a acupuntura promover ativação da via L-arg/NO/GMPc.

Como até o presente momento não foi demonstrada uma via antinociceptiva exclusivamente nitrérgica, a conclusão parece ser que o NO atua como parte de outra via antinociceptiva. Nesse sentido, relatos anteriores sugerem que a ação antinociceptiva do NO é dependente da ação de opióides endógenos, agindo como uma “segunda etapa” dessa ação analgésica. Essa hipótese é suportada por vários trabalhos que demonstraram a capacidade dos opióides em atuar através da liberação de NO (Duarte et al., 1990; Duarte & Ferreira, 1992; Amarante et al., 2004; Pacheco et al., 2005). O fato de algumas pesquisas, incluindo uma feita pelo nosso grupo (Almeida et al., 2008), terem demonstrado que a antinocicepção obtida pela acupuntura no ponto E36 foi bloqueada pela pré-injeção de naloxona, um antagonista inespecífico de receptores opióides, indicando que a via opioidérgica estaria envolvida na mediação desse efeito (Ji-sheng et al., 1981; Chen & Ji-Sheng, 1992; Han et al., 1999; Hwang et al., 2002; Ceccherelli et al., 2002) aliado aos resultados obtidos neste trabalho com relação à ação nitrérgica da acupuntura, suportam fortemente a hipótese de que a eletroacupuntura no ponto E36 promove antinocicepção orofacial através da estimulação da via opioidérgica que, então levaria à formação de NO promovendo, assim, seu efeito final analgésico.

O que parece ocorrer na ação antinociceptiva da via L-arg/NO/GMPc foi descrito, ao menos periféricamente, em trabalhos anteriores que demonstraram que o GMPc ativado pela enzima guanilil-ciclase atua em neurônios promovendo o aumento intracelular nos níveis de proteína quinase G o que produziria a abertura de canais para K^+ sensíveis a ATP levando o neurônio a uma hiperpolarização, redundando, dessa forma, em antinocicepção

(Soares et al., 2000; Alves et al., 2004). De fato, a ativação de canais para K^+ ATP sensíveis parece também ser o processo final para a via NO/GMPc também para a antinocicepção da acupuntura no ponto E36, já que nossos experimentos demonstraram, pela primeira vez, a inibição dose-dependente desse efeito pela injeção intra-peritoneal do bloqueador de canais para K^+ ATP-sensíveis glibenclamida (gráfico 6).

2- Endocanabinóide

Com a descoberta dos ligantes endógenos para os receptores canabinóides (Devane et al., 1992) e com a demonstração de que essa via tem participação efetiva no sistema analgésico endógeno (Walker et al., 1999; Malan et al., 2001; Suplita et al., 2005), criou-se a necessidade de descobrir se a acupuntura tem a capacidade de ativar o sistema canabinóide para a obtenção de antinocicepção. Os resultados obtidos neste trabalho que demonstram que a pré-injeção intraperitoneal do AM 251, antagonista específico de receptores CB_1 , consegue bloquear completamente o aumento no limiar de retirada da face do animal indicam uma participação dessa via na antinocicepção trigeminal do ponto E36 (gráfico 7). Realmente, trabalhos anteriores, que não envolvem a acupuntura, já demonstraram que os canabinóides produzem inibição de alodínea e hiperalgesia em modelo de nocicepção neuropática trigeminal (Liang et al., 2007), além de reversão da dilatação de vasos epidurais provocada por estimulação elétrica, capsaicina e NO (Akerman et al., 2003). Essa vasodilatação, que tem sido sugerida como um dos fatores etiológicos da migrânea está diretamente relacionada com a estimulação de terminações nervosas trigeminais. Ambos os efeitos foram provocados pela ação de endocanabinóides em receptores CB_1 e não CB_2 .

Como esses resultados prévios indicaram que o receptor CB₂ parece não participar de mecanismos analgésicos canabinóides trigeminais, nosso grupo resolveu testar se, com relação à antinocicepção orofacial da acupuntura esse fato se repetiria. Para tanto, foi realizado um experimento no qual a eletroestimulação da acupuntura foi precedida por uma injeção intraperitoneal de AM 630, antagonista específico dessa classe de receptores. Como esperado, essa substância não foi capaz de antagonizar o aumento do limiar nociceptivo obtido pela eletroacupuntura do ponto E36 em nenhuma das doses testadas, resultado que sugere e confirma a não-participação dos receptores CB₂ na antinocicepção orofacial da acupuntura neste modelo experimental.

Apesar dos trabalhos prévios que corroboram esse resultado, existem algumas publicações, nas quais foram utilizados modelos animais de dor persistente, que demonstraram a participação dos receptores CB₂ na obtenção do efeito analgésico da via canabinóide (Hanus et al., 1999; Malan et al., 2001). No entanto, existem algumas diferenças metodológicas com relação aos trabalhos que indicam ação antinociceptiva do receptor CB₂ que podem explicar essa aparente diferença de resultados. A mais evidente é que em ambos os trabalhos supracitados, foi realizado o estudo da ação dos canabinóides exclusivamente ao nível periférico, enquanto que, em nossos estudos, e em outros que obtiveram resultados semelhantes ao nosso, foi feita a avaliação da ação sistêmica da injeção do AM 630 o que sugeriria uma ativação central desta via. Além disso, apesar de alguns trabalhos demonstrarem a presença de receptores CB₂ no sistema nervoso central (Gong et al., 2006), parece que estes só se apresentam ativos em condições especiais, como por exemplo, em processos inflamatórios, não tendo ação significativa em condições fisiológicas (Sandoval & Eisenach, 2007), condições essas que foram utilizadas em nosso estudo.

Curiosamente, o único trabalho publicado até então que testou o efeito da acupuntura sobre a ativação da via do canabinóide para a obtenção de antinocicepção obteve esse efeito através da ação de receptores CB₂ e não CB₁ (Chen et al., 2009). No entanto, as diferenças metodológicas já descritas são encontradas também entre esta pesquisa e a realizada pelo nosso grupo, uma vez que, no trabalho supracitado, os estudos foram conduzidos, inclusive com a injeção dos respectivos antagonistas de receptores canabinóides, na pata do animal que estava acometida de dor inflamatória sendo, portanto, mantidas as condições nas quais os receptores CB₂ estariam em maior atividade, isto é, na periferia e com processos inflamatórios ativados, enquanto que, no nosso estudo, todos os testes feitos com o animal mantido em condições fisiológicas e com a utilização de vias para a injeção dos antagonistas que propiciam a ativação central da via do canabinóide o que, como sugerido pelos resultados prévios, se utiliza, preferencialmente, da ativação de receptores CB₁.

Alguns trabalhos que avaliaram a ação da acupuntura sobre a via endocanabinóide ao nível central, porém sem a avaliação de seu efeito analgésico, demonstraram que esta possui a capacidade de reduzir a área de isquemia cerebral pós-infarto através do aumento da produção de 2-AG e de anandamida cerebral e que a ação destes estaria envolvida com a ativação de receptores CB₁ e não CB₂ (Wang et al., 2009). Além disso, parece que a ativação da via do canabinóide pela acupuntura, promoveria através também da ação em receptores CB₁ e não CB₂, uma ativação da região ventro-lateral da PAG (vlPAG), pela capacidade dos canabinóides em inibir a ação inibitória GABAérgica sobre essa via, o que, no caso da publicação citada, modularia a resposta reflexa excitatória sobre a pressão sanguínea. Entretanto, como é sabido que essa região está envolvida na ativação da via descendente inibitória, e que também nesse caso, a vlPAG sofre uma inibição GABAérgica,

poderíamos sugerir que essa ação da acupuntura em ativar o sistema canabinóide poderia explicar seu efeito antinociceptivo originado nessas estruturas centrais superiores (Tjen-A-Looi et al., 2009).

Com o intuito de dirimir as dúvidas com relação ao local de ativação da via do canabinóide pela eletroestimulação do ponto de acupuntura E36 para a obtenção da antinocicepção orofacial, foi feito um grupo de experimentos no qual foi comparada a ação da pré-injeção do AM 251, já comprovadamente eficaz como antagonista do efeito da acupuntura, no modelo estudado, pela via intracerebroventricular (ICV), que promove o antagonismo em estruturas neurais centrais superiores, em comparação com a via intra-tecal (IT), cuja ação antagonista se restringe, num primeiro momento, a neurônios medulares.

Os resultados encontrados demonstram que a pré-injeção ICV do AM 251 bloqueou completamente o aumento do limiar nociceptivo produzido pela acupuntura. Interessantemente, no experimento no qual a via IT foi utilizada, o antagonismo não foi obtido. Sendo assim, esses resultados, aliados a outros já previamente publicados e discutidos acima, fornecem dados que sugerem que a eletroacupuntura do ponto E36, de alguma forma ainda não conhecida, ativa a via do canabinóide em estruturas centrais superiores para a obtenção do seu efeito antinociceptivo orofacial, sem a participação de sítios canabinóides medulares.

Para reforçar a hipótese da participação dos canabinóides no efeito orofacial da acupuntura, foram elaborados experimentos de inibição da recaptação e da degradação da anandamida possivelmente liberada pela acupuntura. Para tal, na tentativa de potencializar o efeito canabinoidegico, utilizou-se o método de inibição dos mecanismos supracitados através da pré-injeção de fármacos específicos, a saber, VDM 11, conhecido inibidor da recaptação da anandamida, e o MAFP, inibidor da ação da FAAH, enzima que degrada essa

substância. O MAFP é conhecido como sendo um dos inibidores mais potentes, com IC_{50} de 2.5 nM, e produz seu efeito através da inativação irreversível do sítio ativo da enzima (Deutsch et al., 1997) enquanto que o VDM 11 tem demonstrado eficácia em algumas patologias que envolvem o sistema canabinóide, tais como, espasticidade na esclerose múltipla e hiperatividade glutamatérgica estriatal, ambos modelos estudados em ratos (Lago et al., 2004).

Os resultados obtidos demonstraram que, no modelo testado, tanto o MAFP quanto o VMD 11 produziram um aumento na ação antinociceptiva da acupuntura. Tanto o MAFP, nas doses de 1 e 2 mg/kg, quanto o VDM 11, nas doses de 5 e 10 mg/kg, foram capazes de prolongar o tempo de atividade antinociceptiva de eletro-acupuntura de 3 horas, obtido no grupo controle (VEÍCULO + EA) para 5 horas. Além disso, o MAFP foi capaz de, na maior dose testada, aumentar também o limiar de retirada da face do animal.

Curiosamente, a pré-injeção intraperitoneal de 1 mg/kg de MAFP produziu um aumento estatisticamente significativo no grupo agulhado sem estimulação (MAFP 1 mg/kg + AS), quando comparado tanto com o grupo que recebeu veículo e agulhamento sem estímulo (veículo + AS) quanto com o grupo que recebeu a mesma dosagem do fármaco e não recebeu agulhamento (MAFP 1 mg/kg + naive). Esse efeito positivo parece se dever ao fato de que, apesar de a agulha dos grupos AS não receberem estímulo elétrico, nem serem movimentadas pelo experimentador, a movimentação do animal durante o tempo de contenção poderia provocar algum tipo de estímulo que foi potencializado pela pré-injeção do MAFP. A incapacidade do MAFP 1 mg/kg injetado por via IP em produzir modificação na latência de resposta do animal no grupo naive demonstra que essa droga não possui efeito inerente no modelo testado.

Esses resultados, obtidos pela primeira vez em experimentos que relacionam a capacidade antinociceptiva orofacial da acupuntura com a via do canabinóide, aliados a outros obtidos pelo nosso grupo e corroborados pela literatura disponível sobre o tema (Chen et al., 2009), sugerem que a via do canabinóide parece participar de forma efetiva na antinocicepção orofacial da eletroacupuntura no ponto E36, em ratos.

3- Ácido δ -amino butírico (GABA)

Poucos são os trabalhos que relacionam a ação da acupuntura com a modulação da via GABAérgica, e o quadro não se apresenta diferente no que diz respeito à ação antinociceptiva da acupuntura.

Com o intuito de procurar aumentar um pouco mais o parco arcabouço de conhecimentos sobre o tema, foram feitos experimentos nos quais se testou a capacidade da eletroacupuntura no ponto E36 ativar a via GABAérgica para a obtenção de antinocicepção orofacial em ratos. No entanto, os resultados demonstraram que nem o antagonista do receptor GABA_B, saclofeno, nem o inibidor da recaptação do GABA, guvacina, em nenhuma das doses injetadas por via intraperitoneal, foram capazes de alterar o aumento do limiar de retirada da face do animal frente a estímulo térmico obtido pela acupuntura.

Esse resultado, no entanto, encontra pouco subsídio nos trabalhos publicados sobre o tema. Entretanto, aqui, também, o emprego de metodologias diversas poderia explicar as diferenças. Os únicos trabalhos publicados até então descrevem que a acupuntura possui capacidade de ativar o GABA para a obtenção de seus efeitos antihiperálgicos (Cao et al., 1993; Park et al., 2010). Entretanto, em ambos os trabalhos, foram utilizados animais em condições patológicas inflamatórias, por produção de processo artrítico ou por de produção de dor neuropática por ligadura. O fato de que o engrama de respostas fisiológica é

consideravelmente diferente entre um animal sadio, como foi usado no presente trabalho, e um animal sofrendo de condição patológica pode explicar a divergência dos resultados encontrados.

No entanto, a publicação de dois trabalhos do mesmo grupo (Tjen-A-Looi et al., 2009, Fu & Longhurst, 2009), que preconizam que a acupuntura produziria uma diminuição das concentrações extracelulares de GABA na região ventro-lateral da PAG levando a alterações cardiovasculares através da ativação de receptores CB₁ pré-sinápticos parece explicar, até certo ponto, essa divergência. Como foi demonstrado pelo presente estudo, a acupuntura possui a capacidade de produzir uma grande liberação de agonistas canabinóides em estruturas do sistema nervoso central superior para a produção de antinociceção, dentre eles hipotálamo, sistema límbico e PAG. Se é entendido que uma das ações canabinóideas na PAG seria de inibição da via do GABA, como descrito nos trabalhos acima, a avaliação da ativação desta mesma via fica, certamente, impossível de ser feita, uma vez que ela está sendo inibida pela acupuntura por processos indiretos, os quais envolvem os endocanabinóides.

4- Noradrenalina

Os resultados encontrados em pesquisas prévias sobre a ação da acupuntura sobre a via noradrenérgica para a obtenção de antinociceção são altamente controversos. E os resultados obtidos nesse estudo só fazem aumentar essa controvérsia, pois, de todas as doses testadas, o antagonista do receptor α_2 ioimbina só foi capaz de inibir o efeito antinociceptivo da acupuntura na dose mais alta e somente em três pontos de teste, sendo que em todos os outros a inibição não foi estatisticamente validada. Como é sabido que esse receptor é, dentre os que são ativados pela noradrenalina, o mais diretamente envolvido na

capacidade analgésica desse neurotransmissor, o resultado obtido sugere que a via noradrenérgica parece ter uma participação menor da antinocicepção orofacial obtida pela eletroacupuntura do ponto E36.

Entretanto, diferentemente dos resultados encontrados nessa pesquisa, existem alguns trabalhos que descrevem que a acupuntura teria, sim, capacidade de mobilização da via noradrenérgica. Porém, parece que algumas questões metodológicas foram responsáveis por essa divergência. Algumas pesquisas que obtiveram resultado positivo sobre a via noradrenérgica se utilizaram de intensidades de estímulo consideravelmente altas, por volta de 2 a 20 mA o que corresponde de 10 a 100 vezes o limiar de tolerância do animal (Yang et al., 2002; Koo et al., 2007). Como descrito anteriormente, o presente estudo se utilizou de métodos os quais se aproximam do uso clínico da acupuntura além de permitir a estimulação com o animal acordado. Para tal, foi utilizada a intensidade de estimulação de 0,5 mA, que é descrita como sub-limiar para o rato (Koo et al., 2007). Essa diferença na intensidade poderia explicar a divergência de resultados, pois, resultados prévios do nosso grupo relacionados à via opioidérgica (dados não mostrados) demonstraram que o aumento da intensidade a níveis supra-limiais promove um efeito analgésico através da ativação de vias que, com níveis sub-limiais não são ativadas. No entanto, se faz necessário um estudo comparativo de intensidades de estimulação com relação às outras vias estudadas para melhor esclarecimento dessa divergência.

Além disso, existem algumas publicações que relatam um aumento da liberação de noradrenalina produzida pela eletroacupuntura no ponto E36, que poderiam colocar em dúvida os resultados obtidos no presente trabalho.

Em um deles (Baek et al., 2006), foi demonstrado que a ioimbina inibe a antinocicepção da acupuntura. Entretanto, a ação antinociceptiva obtida se deve não à

estimulação por acupuntura, mas, sim, à aplicação do veneno de abelha no ponto E36, uma vez que quando solução salina foi injetada no mesmo ponto, o mesmo resultado não foi obtido. Fica claro que os métodos de estimulação são diferentes, e isso pode, certamente, explicar a divergência dos resultados obtidos nas duas pesquisas.

Em outro trabalho mais recente (Murotani et al., 2010), a acupuntura no ponto E36 promoveu antinocicepção concomitantemente com o aumento da liberação de noradrenalina, além de histamina e dopamina, na região ventro-lateral da PAG. Entretanto, o trabalho carece de informações sobre intensidade e frequência de estimulação, o que impede, de alguma forma, a comparação metodológica com o presente estudo, uma vez que já foi demonstrado que a modificação desses parâmetros é de grande influência no resultado do experimento.

Apesar da controvérsia, alguns trabalhos corroboram esse resultado. Dentre eles, um que se utiliza da estimulação trigeminal em coelhos no qual a acupuntura consegue aumentar o limiar algico do animal e a ioimbina, também nesse caso, não foi capaz de inibir esse aumento (Takagi et al., 1996).

Sendo assim, ainda que sejam necessários trabalhos posteriores sobre o assunto, pode-se sugerir que a via noradrenérgica parece ter envolvimento menor na antinocicepção orofacial obtida por uma estimulação sub-limiar do ponto de acupuntura E36.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pelos experimentos realizados, e em relatos de outros trabalhos sobre o tema, o presente estudo sugere a eficácia da eletroacupuntura no ponto E36, na frequência de 100 Hz, 0.5 mA de intensidade, pulso de 100 ms e 20 minutos de estimulação, em produzir antinocicepção orofacial em ratos. Esse efeito parece ocorrer com a participação do NO, através da ação das enzimas NOS indutível e neuronal, sem a participação da NOS endotelial, com a finalização da via pela abertura de canais para K⁺ sensíveis a ATP. Além disso, os endocanabinóides também estão envolvidos, através da ativação de receptores CB₁ e não CB₂. Essa ação da acupuntura sobre o sistema canabinoide parece ocorrer através da ativação de estruturas neurais centrais supra-espinais. Entretanto, o assunto, por ser ainda tema de poucos estudos, ainda está longe de ser completamente compreendido à luz da ciência moderna. Nesse sentido, mais estudos serão necessários para que se consiga compreender, de maneira mais completa a ação dessa técnica oriental milenar.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIMONE, L. D.; JONES, S. L.; GEBHART, G. F. Stimulation-produced descending inhibition from the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus in the rat: mediation by spinal monoamines but not opioids. *Pain*, v. 31, p. 123-136, 1987.

AKERMAN, S.; KAUBE, H.; GOADSBY, P. J. Anandamide is able to inhibit trigeminal neurons using an in vivo model of trigemino-vascular mediated nociception. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 309, p. 56-63, 2003.

ALMEIDA, R. T.; DUARTE, I. D. G. Nitric Oxide/cGMP pathway mediates orofacial antinociception induced by electroacupuncture at the St36 acupoint. *Brain Research*, v. 1188, p. 54-60, 2008.

ALMEIDA, R.T.; PEREZ, A.C.; FRANCISCHI, J.N.; CASTRO, M.S., DUARTE, I.D.G. Opioidergic orofacial antinociception induced by electroacupuncture at acupoint St36. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41(7), p. 621-626, 2008.

ALVES, D. P.; SOARES, A. C.; FRANCISCHI, J. N.; CASTRO, M. S.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D. Additive antinociception effect of the combination of diazoxide, a activator of ATP-sensitive K⁺ channels, and sodium nitroprusside and dibutyryl-cGMP. *European Journal of Pharmacology*, v. 489, p. 59-65, 2004.

AMARANTE, L. H.; ALVES, D. P.; DUARTE, I. D. G. Study of the involvement of K⁺ channels in the peripheral antinociception of the k-opioid receptor agonist bremazocin. *European Journal of Pharmacology*, v. 494, p. 155-160, 2004.

BAEK, Y. H.; HUH, J. E.; LEE, J. D.; CHOI, D. Y.; PARK, D. S. Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the

rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by α_2 -Adrenoceptors. *Brain Research*, v. 1074, p. 305-310, 2006.

BARBER, R. P.; VAUGHN, J.; SAITO, K.; McLAUGHLIN, B. J.; ROBERTS, E. GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Brain Research*, v.141, p.35-55, 1978.

BASTOS, S. R. C. Tratado de Eletroacupuntura: perspectivas científicas, teoria e prática. Ed. Numen, Rio de Janeiro – RJ, p. 415-416, 1993.

BATKAI, S.; JARAI, Z.; WAGNER, J. A.; ET AL. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptor mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nature Medicine*. V. 7, p. 827-832, 2001.

BENSRETI, M. M.; GONZALES, J. P.; SEWELL, R. D. E. Differential effects of SKF 38393 and LY 141865 on nociception and morphine analgesia. *Life Science*, v.33, p.665-668, 1983.

BJÖRKLUND, A.; SKAGERBERG, G. Evidence for a major spinal cord projection from the diencephalic A₁₁ group in the rat using transmitter-specific fluorescent retrograde tracing. *Brain Research*, v.177, p.170-175, 1984.

BONICA, J. J. Pain research and therapy: Recent advances and future needs. In: Kruger L., Liebeskind J. C. *Advances in Pain Research and Therapy*, v. 6, New York, Raven Press, p. 1-22, 1984.

CAO, X. Scientific bases of acupuncture analgesia. *Acupuncture & Electro-therapeutics Researches*, v. 27, p. 1-14, 2002.

CAO, W.; DENG, Y.; DONG, X.; WANG, Y.; LU, Z. Effects of electroacupuncture at different frequencies on the nociceptive response and central contents of GABA and glutamic acid in arthritic rats. *Zhen Ci Yan Jiu*. v.18, p. 48-52, 1993 (Abstract).

CECCHERELLI, F.; GAGLIARDI, G.; RUZZANTE, L.; GIRON, G. Acupuncture modulation of capsaicin-induced inflammation: effects of intraperitoneal and local administration of naloxone in rats. A blinded controlled study. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 8, p. 341-349, 2002.

CHAKRABARTI, S.; GANGULY, A.; PODDAR, M. K. Possible involvement of the GABAergic system in dopaminergic-cholinergic interactions in electroacupuncture-induced analgesia. *Methods and Findings of Experimental and Clinical Pharmacology*, v. 10, p. 545-549, 1988.

CHAKRABARTI, S.; PODDAR, M. K. Effect of Diazepam on electroacupuncture-induced changes in regional γ -aminobutyric acid of the rat central nervous system. *Neuroscience Research*, v. 7, p. 24-32, 1989.

CHEN, J.; MA, S. Effect of nitric oxide and noradrenergic function on skin electric resistance of acupoints and meridians. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v.11, p. 423-431, 2005.

CHEN, L.; ZHANG, J.; LI, F.; QIU, Y.; WANG, L.; LI, Y.; SHI, J.; PAN, H. L.; LI, M. Endogenous anandamide and cannabinoid receptor-2 contribute to electroacupuncture analgesia in rats. *The Journal of Pain*, v. 10, p. 732-739, 2009.

CHEN, S.; MA, S. Nitric oxide in the gracile nucleus mediates depressor response to acupuncture (ST 36). *Journal of Neurophysiology*, v. 90, p. 780-785, 2003.

CHEN, X.; GELLER, E. B.; ADLER, M. W. Electrical stimulation at traditional acupuncture sites in periphery produces brain opioide-receptor-mediated antinociception in

rats. *The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, v. 277, p. 654-660, 1996.

CHEN, X.; JI-SHENG, H., All three types of opioid receptors in the spinal cord are important for 2/15 Hz electroacupuncture analgesia. *European Journal of Pharmacology*. v. 211, p. 203-210, 1992.

CHENG, R. S.; POMERANZ, B. Monoaminergic mechanism of electroacupuncture analgesia. *Brain Research*, v. 29, p. 77-92, 1981.

CHUDLER, E. R.; DONG, W. K. The role of basal ganglia in nociception and pain. *Pain*, v.60, p.3-38, 1995.

D'AMOUR, F. E., SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 72, p. 74-79, 1941.

DAI, J. L.; XU, S. F. The attenuation effect of chlorpromazine on electro-acupuncture analgesia: involvement of dopamine system. *Acupuncture and Electrotherapeutic Research*, v. 16, p. 101-109, 1991.

DAI, J. L.; XU, S. F. Chlorpromazine attenuated electroacupuncture analgesia in conscious rabbits. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, v. 14, p. 388-392, 1993.

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A.; JOHNSON, M.; MELVIN, L. S.; HOWLETT, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, v. 34, p. 605-613, 1988.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEEVENSON, L. A. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v. 258, p. 1946-1949, 1992.

DEUTSCH, D.G.; OMEIR, R.; ARREAZA, G.; SALEHANI, D.; PRESTWICH, G. D.; HUANG, Z.; HOWLETT, A. Methyl arachidonyl fluorophosphate: an irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochemical Pharmacology*, v. 53, p. 255-260, 1997.

DI MARZO, V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Rev. Physiology Biochemical Pharmacology*, v. 160, p. 1-24, 2006.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA, S. H., The molecular mechanism of central analgesic induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *European Journal of Pharmacology*. v. 221, p. 171-174, 1992.

DUARTE, I. D. G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide cyclic GMP pathway. *European Journal of Pharmacology*, v. 186, p. 289-293, 1990.

EVANS, D. Acupuncture. *In: Textbook of pain*, cap. 46, p. 934-944, 1999.

EZZO, J.; BERMAN, B.; HADHAZY, V. A.; JADAD, A. R.; LAO, L.; SINGH, B. B. Is acupuncture effective for the treatment of chronic pain? A systematic review. *Pain*, v. 86, p. 217-225, 2000.

FELDER, C. C.; GLASS, M. Cannabinoid receptor and their endogenous agonists. *Ann. Review Pharmacol. Toxicol.*, p. 179-200, 1998.

FLEETWOOD-WALKER, S. M.; COOTE, J. H. The contribution of brain stem catecholamine cell groups to the innervation of sympathetic lateral cell column. *Brain Research*, v.205, p.141-155, 1981.

FONSECA, F. R.; DEL ARCO, I.; BERMUDEZ-SILVA, F. J.; BILBAO, A.; CIPPITELLI, A.; NAVARRO, M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol & Alcoholism*, v. 40, p. 2-14, 2005.

FU, L. W.; LONGHURST, J. C. Electroacupuncture modulates vIPAG release of GABA through presynaptic cannabinoid CB₁ receptors. *Journal of Applied Physiology*, v. 106, p. 1800-1809, 2009.

GAO, X.; XIN, B. M.; ZHU, C. B.; XU, S.F. Effect of intrathecal injection of dopamine receptor agonists/antagonists on pain and acupuncture analgesia in rats. *Sheng Li Xue Bao*, v. 50, p. 43-48, 1998.

GAONI, Y.; MECHOULAN, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, v. 86, p. 1646-1647, 1964.

GERARD, C. M.; MOLLEREAU, C.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. Journal*, v. 279, p. 129-134, 1991.

GODDARD, G. Short term pain reduction with acupuncture treatment for chronic orofacial pain patients. *Med. Sci. Monit.* v. 11, p. CR71-74, 2005.

GONG, J.; ONAIVI, E. S.; ISHIGURO, H.; LIU, Q.; TAGLIAFERRO, P. A.; BRUSCO A.; URL, G. R. Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research*, v. 1071, p. 10-23, 2006.

GRENN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochemistry*, v.126, p.131-138, 1982.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurological Disorders Drug Target*, v. 8(6), p. 403-421, 2009.

HAN, Z.; JIANG, Y.; WAN, Y.; WANG, Y.; CHANG, J.; HAN, J. Endomorphin-1 mediates 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture analgesia in the rat. *Neuroscience Letters*, v. 274, p. 75-78, 1999.

HANSEN, P. E.; HANSEN, J. H. Acupuncture treatment of chronic facial pain – a controlled cross-over trial. *Headache*, v. 23, p. 66-69, 1983.

HANUS, L.; BREUER, A.; TEHILIBON, S.; SHILOAH, S.; GOLDENBERG, D.; HOROWITZ, M.; PERTWEE, R. G.; ROSS, R. A.; MECHOULAM, R.; FRIDE, E. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, p. 14228-14233, 1999.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L.S.; COSTA, B. R.; RICE, K. C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*. V. 11, 563-583, 1991.

HERZBERG, U.; ELIAV, E.; BENNETT, G. J.; KOPIN, I. J. The analgesic effects of R(1)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in rat model of neurophatic pain. *Neuroscience Letters*, v. 221, p. 157-160, 1997.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA, R. L.; BOLTON, N. M.; NEELY, M. H.; FEGLEY, D.; MANGIERI, R.; KREY, J. F.; WALKER, J. M.; HOLMES, P. V.; CRYSTAL, J. D.;

- DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; PIOMELLI, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, v. 435, p. 1108–1112, 2005.
- HOWLETT, A. C.; BIDAUT-RUSSELL, M.; DEVANE, W. A.; MELVIN, L. S.; JOHNSON, M. R.; HERKENHAM, M. The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends in Neuroscience*, v. 13, p. 420-423, 1990.
- HSIEH, C.; CHANG, Q.; LIN, I.; LIN, J.; LIU, C.; TANG, N.; LANE, H. The study of electroacupuncture on cerebral blood flow in rats with or without cerebral ischemia. *The American Journal of Chinese Medicine*, v. 34, p. 351-361, 2006.
- HUANG, C.; WANG, Y.; JI-SHENG, H.; WAN, Y. Characteristics of electroacupuncture-induced analgesia in mice: variation with strain, frequency, intensity and opioid involvement. *Brain Research*, v. 945, p. 20-25, 2002.
- 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*, v. 320, p. 49-52, 2002.
- HWANG, H. S.; KIM, Y. S.; RYU, Y. H.; LEE, J. E.; LEE, T. S.; YANG, E. J.; LEE, M. S.; CHOI, S. M. Electroacupuncture delays hypertension development through enhancing NO/NOS activity in spontaneously hypertensive rats. *eCAM*, v. 064, p. 1-6, 2008.
- JI-SHENG, H.; LI, S. J.; TANG, J. Tolerance to electroacupuncture and its cross tolerance to morphine. *Neuropharmacology*, v. 20, p. 593-596, 1981.
- JOHANSSON, A.; WAGERSTEIN, C.; WENNEBERG, B.; HARALDSON, T.; CARLSSON, G.E. Akupunkturbehandling vid kronisk smärta i ansikte och huvud. *Tandlakartidningen*, v. 79, 140-144, 1987.

JOHANSSON, A.; WENNEBERG, B.; WAGERSTEN, C.; HARALDSON, T. Acupuncture in treatment of facial muscular pain. *Acta Odontol. Scand.*, v. 49, p. 153-158, 1991.

KELLY, S.; CHAPMAN, V. Selective cannabinoid CB1 receptor activation inhibits spinal nociceptive transmission in vivo. *Journal of Neurophysiology*. V. 86, p. 3061-3064, 2001.

KIM, H. I.; KIM, Y. S.; KANG, S. K.; KIM, C.; PARK, C.; LEE, M. S.; HUH, Y. Electroacupuncture decreases nitric oxide synthesis in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience Letters*, v. 446, p. 78-82, 2008.

KIM, J. H.; MIN, B. I.; SCHIMDT, D.; LEE, H. J.; PARK, D. S. The difference between electroacupuncture with manipulation on analgesia in rats. *Neuroscience Letters*, v. 279, p. 149-152, 2000.

KNARDAHL, S.; ELAM, M.; OLAUSSON, B.; WALLIN, B. G. Sympathetic nerve activity after acupuncture in humans. *Pain*, v. 75, p. 19-25, 1998.

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 α -adrenoceptors. *Pain*, 2007.

LAGO, E.; LIGRESTI, A.; ORTAR, G.; MORERA, E.; CABRANES, A.; PRICE, G.; BIFULCO, M.; BAKER, D.; RUIZ, J. F.; DI MARZO, V. In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *European Journal of Pharmacology*, v. 484, p. 249-257, 2004.

LIANG, Y.; HUANG, C.; HSU, K. The synthetic cannabinoids attenuate allodynia and hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuropharmacology*, v. 53, p. 169-177, 2007.

LIPTON J. A.; SHIP J. A.; LARACH-ROBINSON D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *Journal of American Dental Association*, v. 124, p. 115-121, 1993.

LIST, T.; HELKIMO, M. Acupuncture and occlusal splint therapy in the treatment of craniomandibular disorders. *Acta Odontol. Scand.*, v. 50, p. 375-385, 1992.

LIST, T.; HELKIMO, M.; ANDERSSON, S.; CARLSSON, G. E. Acupuncture and occlusal splint therapy in the treatment of craniomandibular disorders. *Swedish Dental Journal*, v. 16, p. 125-141, 1992.

LIST, T.; HELKIMO, M.; KARLSSON, R. Pressure pain threshold in patients with craniomandibular disorders before and after treatment with acupuncture and occlusal splint therapy: A controlled clinical study. *Journal of Orofacial Pain*, v. 7, p. 275-282, 1993.

MA, S. Enhanced nitric oxide concentrations and expression of nitric oxide synthase in acupuncture points/meridians. *The journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 9, p. 207-215, 2003.

MA, S. Neurobiology of acupuncture: Toward CAM. *eCAM*, v.1(1), p. 41-47, 2004.

MA, S.; MA, J.; MOISE, G.; LI, X. Responses of neuronal nitric oxide synthase expression in the brainstem to electroacupuncture Zusanli (ST 36) in rats. *Brain Research*, v. 1037, p. 70-77, 2005.

MACIOCIA, G. Os Fundamentos da Medicina Chinesa. Ed. Roca, São Paulo-SP, Brasil 8^a ed. 1996.

MACKIE, K.; Lai, Y.; Westenbroek, R.; Mitchell, R. Cannabinoids activate an inward rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neuroscience*. V. 15, 6552-6561, 1995.

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

MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends in Pharmacological Science*, v.17, p.457-462, 1996.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of cannabinoid receptor and functional expression of cloned cDNA. *Nature*, v. 364, p. 561-564, 1990.

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*, v. 973, p. 196-204, 2003.

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*, v. 36, p. 1673-1684, 2003.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, v. 66, p. 355-474, 2002.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43(2), p. 109-136, 1991.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v. 365, p. 61-65, 1993.

MUROTANI, T.; ISHIZUKA, T.; NAKAZAWA, H.; WANG, X.; MORI, K.; SASAKI, K.; ISHIDA T.; YAMATODANI, A. Possible involvement of histamine, dopamine and noradrenaline in the periaqueductal gray in electroacupuncture pain relief. *Brain Research*, v. 1306, p. 62-68, 2010.

PACHECO, D. F.; REIS, G. M. L.; FRANCISCHI, J. N.; CASTRO, M. S. A.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D. G., δ -opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via $\delta 1$ and $\delta 2$ receptors and activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Science*. p. 78, v. 54-60, 2005.

PARK, J. H.; HAN, J. B.; KIM, S. K.; PARK, J. H.; GO, D. H.; SUN, B.; MIN, B. I. Spinal GABA receptors mediate the suppressive effect of electroacupuncture on allodynia in rats. *Brain Research*, v. 1322, p. 24-29, 2010.

PEÑA, N. M.; MARTINEZ, B. A. Analgesia acupuntural quirúrgica – su aplicación en medicina y odontología. *Punto*, p. 5-11, 1999.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 4, p. 873–884, 2003.

POMERANZ, B. & CHIU, D. Naloxone blockade of acupuncture analgesia: Endorphin implicated. *Life Science*, v. 19, p. 1757-1762, 1976.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 87, p. 5193-5197, 1990.

RALT, D. Intercellular communication, NO and the biology of Chinese medicine. *Cell Communication and Signalling*. v. 3, p. 1-8, 2005.

RAUSTIA, A. M.; POHJOLA, R. T. Acupuncture compared with stomatognathic treatment for TMJ dysfunction. Part III: Effect of treatment on mobility. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 56, p. 616-623, 1986

RAUSTIA, A. M.; POHJOLA, R. T.; VIRTANEN, K. K. Acupuncture compared with stomatognathic treatment for TMJ dysfunction. Part I: A randomized study. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 54, p. 581-585, 1985.

RAUSTIA, A. M.; POHJOLA, R. T.; VIRTANEN, K. K. Acupuncture compared with stomatognathic treatment for TMJ dysfunction. Part II: Components of the dysfunction index. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 55, p. 372-376, 1986.

ROSS, J. Combinações dos pontos de acupuntura – A chave para o êxito clínico. Ed. Roca, São Paulo-SP, Brasil, 1ª Ed., 2003.

ROSTED, P. Practical recommendations for the use of acupuncture in the treatment of temporomandibular disorders based on the outcome of published controlled studies. *Oral Diseases*, v. 7, p. 109-115, 2001.

SANDOVAL, A. R.; EISENACH, J. C. Spinal cannabinoid receptor type 2 activations reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology*, v. 106, p. 787-794, 2007.

SILVA, S. A. Acupuncture for the relief of pain of facial and dental origin. *Anesth. Prog.*, v. 36, p. 244-245, 1989.

SKAGERBERG, G.; BJORKLUND, A.; SCHMIDT, R. H. Origin and termination of diencephalo-spinal dopamine system in the rat. *Brain Research Bulletin*, v.9, p.237-244, 1982.

SMITH, P.; MOSSCROP, D.; DAVIES, S.; SLOAN, P.; AL-ANI, Z. The efficacy of acupuncture in treatment of temporomandibular joint myofascial pain: a randomized controlled trial. *Journal of Dentistry*, v. 35(3), p. 295-267, 2007.

SOARES, A. C.; LEITE, R.; TATSUO, M. A.; DUARTE, I. D. Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *European Journal of Pharmacology*, v. 400, p. 67-71, 2000.

SUN, A. Y.; BONEY, F.; LEE, D. Z. Electroacupuncture alters catecholamines in brain regions of rats. *Neurochemical Research*, v. 10, p. 251-258, 1985.

SUPLITA, R. L.; FARTHING, J. N.; GUTIERREZ, T.; HOHMANN, A. G. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in

the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla.

Neuropharmacology, v. 49, p. 1201–1209, 2005.

TAKAGI, J.; SAWADA, T.; YONEHARA, N. A possible involvement of monoaminergic and opioidergic systems in the analgesia induced by electro-acupuncture in rabbits. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 70, p. 73-80, 1996.

TJEN-A-LOOI, S. C.; LI, P.; LONGHURST, J. C. Processing cardiovascular information in the vlPAG during electroacupuncture in rats: role of endocannabinoids and GABA. *Journal of Applied Physiology*, v. 106, p. 1793-1799, 2009.

TODD, A. J.; MCKENZIE, J. GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*, v.31, p.799-806, 1989.

TRANG, T.; MA, W.; CHABOT, J. G.; QUIRION, R.; JHAMANDAS, K. Spinal modulation of calcitonin gene-related peptide by endocannabinoids in the development of opioid physical dependence. *Pain*, v. 126, p. 256-271, 2006.

UEDA, H.; GE, M.; SATOH, M.; TAKAGI, H. I. Subconvulsive doses of intracisternal bicuculline methiodide, A GABA A receptor antagonist, produce potent analgesia as measured in the tail pinch test in mice. *European Journal of Pharmacology*, v.136, p.129-131, 1987.

VUONG, L. A.Q.; MITCHELL, V. A.; VAUGHAN, C. W. Actions of *N*-arachinonyl-glycine in a rat neuropathic pain model. *Neuropharmacology*, v. 54, p. 198-193, 2008.

WAGNER, J. A.; VARGA, K.; ELLIS, E. F.; RZIGALINSKI, B. A.; MARTIN, B. R.; KUNOS, G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature*, v. 390, p. 518-521, 1997.

WALKER, J. M.; HUANG, S. M.; STRANGMAN, N. M.; TSOU, K.; SAÑUDO-PEÑA, M. C. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 96, 12198-12203, 1999.

WANG, H.; JIANG, J.; CAN. X. Changes of norepinephrine release in rat's nucleus reticularis paragigantocellularis lateralis in acupuncture analgesia. *Zhen Ci Yan Jiu*, v. 19, p. 20-25, 1994, abstract.

WANG, M.; XU, W.; HE, L. Mu opiate receptor antagonist blocks electroacupuncture inhibition on noxious blood pressure response in rabbits. *Acupuncture and Electrotherapeutics Research*, v. 19(1), p. 3-9, 1994.

WANG, Q.; PENG, Y.; CHEN, S.; GOU, X.; HU, B.; DU, J.; LU, Y.; XIONG, L. Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system. *Stroke*, v. 40, p. 2157-2164, 2009.

WANG, S. B.; CHEN, S. P.; GAO, Y. H.; LUO, M. F.; LIU, J. L. Effects on electroacupuncture on cardiac and gastric activities in acute myocardial ischemia rats. *World Journal of Gastroenterology*, v. 14(42), p. 6496-6502, 2008.

WANG, W.; LIU, L.; ZHI, X.; HUANG, J.B.; LIU, D.X.; WANG, H. KONG, X.Q.; XU, H.B. Study on regulatory effect of electroacupuncture of hegu point (LI4) in cerebral response with functional magnetic resonance imaging. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, v. 13(1), p. 10-16, 2007.

WHITE, A.; TRINH, K.; HAMMERSCHLAG, R. Performing systematic reviews of clinical trials of acupuncture: problems and solutions. *Clinical Acupuncture and Oriental Medicine*, v. 3, p. 26-31, 2002.

XIA, C. M.; CHEN, J.; WANG, J.; FANG, M. X.; XIAO, F.; CAO, Y. X.; LI, L.; SHEN, L. L.; ZHU, D. N. Differential expressions of nNOS and iNOS in the rostral ventrolateral

medulla induced by electroacupuncture in acute myocardial ischemia rats. *Acta Physiologica Sinica*, v. 60(4), p. 453-461, 2008.

XUE, C. C. L.; DONG, L.; POLUS, B.; ENGLISH, R. A.; ZHENG, Z.; DA COSTA, C.; LI, C. G.; STORY, D. F. Electroacupuncture for tension-type headache on distal acupoints only: a randomized, controlled, crossover trial. *Headache*, v. 44, p. 333-341, 2004).

YAMAMURA, Y. Acupuntura tradicional – A arte de inserir. Ed. Roca, São Paulo – SP, p. 595, (1993).

YANG, C. H.; LEE, B. B.; JUNG, I. S.; SHIM, I.; ROH, P. U.; GOLDEN, G. T. Effect of electroacupuncture on response to immobilization stress. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, v. 72, p. 847-855, 2002.

YANG, R.; HUANG, Z.; CHENG, J. Anticonvulsion effects of acupuncture might be related to the decrease of neuronal and inducible nitric oxide synthases. *Acupuncture & Electro-therapeutics Researches*, v. 25, p. 137-143, 2000.

YOON, M. H.; CHOI, J. I. Pharmacologic interactions between cannabinoid and either clonidine or neostigmine in the rat formaline test. *Anesthesiology*, v. 99, p. 701-707, 2003.

YUNGER, L. M., FOWLER, P. J., ZAREVICS, P., SETLER, P. E. Novel inhibitors of γ -aminobutyric acid (GABA) uptake: anticonvulsant actions in rats and mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics*, v.228, p.109-115, 1984.

ZARRINDAST, M. R.; MOGHADAMPOUR, E. Opposing influences of D1 and D2 dopamine receptor activation on morphine-induced antinociception. *Archives Internationales de Pharmacodynamic et de Therapie*, v.300, p.37-50, 1989. *PNAS*, v. 96, p. 12198-12203, 1999.

ZHAO, C.; STILLMAN M. J.; ROZEN, T. D. Traditional and evidenced-based acupuncture in headache management: theory, mechanism and practice. *Headache*, v. 45, p. 716-730, 2005.

ZOU, C.J.; WANG, H.; GE, L. The central mechanism of depressor-bradycardia effect of “Tinggong”. *Acupuncture & Electro-therapeutics Researches*, v. 25(3-4), p. 145-153, 2000.