

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ISABELLA DE PAULA RIBEIRO ARGÔLO

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSIENTE NO EFEITO
ANTINOCICEPTIVO DA ACUPUNTURA NOS MODELOS DE DOR FÁSICA,
INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA**

ALFENAS/MG
2017

ISABELLA DE PAULA RIBEIRO ARGÔLO

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSIENTE NO EFEITO
ANTINOCICEPTIVO DA ACUPUNTURA NOS MODELOS DE DOR FÁSICA,
INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Neurociência e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva

ALFENAS/MG
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Argôlo, Isabella de Paula Ribeiro.

Participação dos receptores de potencial transiente no efeito antinociceptivo da acupuntura nos modelos de dor fásica, inflamatória e neuropática / Isabella de Paula Ribeiro Argôlo. -- Alfenas, MG, 2017.

66 f.

Orientador: Marcelo Lourenço da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Dor. 2. Nociceptores. 3. Acupuntura. I. Silva, Marcelo Lourenço da. II. Título.

CDD-571.1

ISABELLA DE PAULA RIBEIRO ARGÔLO

“PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSIENTE NO EFEITO
ANTINOCICEPTIVO DA ACUPUNTURA NOS MODELOS DE DOR FÁSICA,
INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA”.

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Biociências Aplicadas à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas . Área de
concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovado em: 18/05/2017

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Guilherme Rabelo de Souza
Instituição: Universidade de São Paulo
– USP

Assinatura:



DEDICATÓRIA

Devoção eterna ao meu Deus, pelo sustento, força e amor, que me permitiu levantar com entusiasmo e alegria, vencendo todas as barreiras impostas diariamente. Dedico ao Renan de Paula Ribeiro Argôlo que se fez luz em meu caminho e se alegrou por mais esta vitória. À minha mãe Edwiges de Paula, que não hesitou em se transfigurar para que meus objetivos fossem alcançados, vivenciando-os comigo.

“Eis aqui a serva do Senhor, faça-se em mim
segundo a Sua palavra.”

Lucas 1, 38

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus Pai, por guiar e vigiar meus caminhos, pois sem teu alento e amor eu nada seria, e a minha intercessora Nossa Senhora Aparecida por rogar instantemente.

À minha mãe Edwiges de Paula Ribeiro que sonha e vive em uma perfeita união ao meu lado, e se abstém de suas vontades em prol das minhas.

Ao meu irmão Raphael de Paula Ribeiro e sua família una, terna e santa pelos louvores e amor concedidos.

Ao meu pai Olimpio Ribeiro Neto, que se fez presente em muitas situações, e pelo carinho e amor.

Aos meus familiares pelo apoio, dedicação e confiança de um futuro promissor.

Ao Professor Doutor Marcelo Lourenço da Silva por ter me feito enxergar além dos meus olhos e vontades iniciais, apresentando assim a ciência e pesquisa que me saciam continuamente, assim como pela orientação, atenção, desprendimento e amizade.

À Professora Doutora Josie Resende Torres da Silva pela amizade, conhecimento e oportunidade ao longo deste período.

Aos meus amigos de caminhada experimental, de pós graduação e de vida, Giovana, Júlia, Laíse, Amanda, Rafaela Santos, Rafaella Rocha, Marcelo Pagotto, Gonçalves Pedro, Marcelo Oliveira, Ravena, Herick, Angélica, Nayara, Izabela, por serem presença constante, pelo respeito, pelo incentivo acadêmico e acima de tudo pelo carinho e amor.

Aos técnicos e amigos, Luiz Tomás e Luciana Costa, pelo convívio diário, atenção, disponibilidade, sorrisos e amizade.

À família de Alfenas, Vera, Maycon, Cris, Gisnay e Danilo, por dividirem comigo as alegrias e por me darem suporte em todas as situações.

À minha mãe escolhida, Ieda, por me devotar tanto amor e me presentear com sua família abençoada.

Em especial aos amigos Leticia Aparecida, pelo amor, sinceridade, solidariedade e acolhimento familiar, Ricardo pela serenidade e abraço acolhedor, Thamyris por todo apoio psicológico, sentimental e espiritual.

À banca pelos ensinamentos, conhecimentos e apontamentos essenciais.

Aos profissionais que de alguma forma permitiram o bom funcionamento do nosso Laboratório Experimental de Fisioterapia, seja na organização, limpeza ou energia positiva.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais- FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Por fim, a todos amigos que cruzaram este caminho especial e participaram ativamente deste processo, seja por uma oração, ou uma palavra de consolo e impulsionamento.

RESUMO

A dor pode ser classificada em inflamatória, neuropática e fásica, que ocorre por um dano do sistema nervoso e estimulação de nociceptores, como os Receptores de Potencial Transiente (TRP's). Nesta família destacamos o TRPV1, TRPM8 e TRPA1, estimulados por substâncias antinociceptivas, como a capsaicina, mentol e metil salicilato, respectivamente. O trabalho objetivou investigar o papel dos TRP's na antinocicepção, pela administração dos agonistas no acuponto Zusanli (ST36), no modelo de dor inflamatória, neuropática e fásica. Foram utilizados 180 ratos Wistars, machos, 6 semanas, entre 250 a 300g. Eles foram submetidos ao modelo de dor inflamatória induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA), dor fásica pelo Teste de Retirada da Cauda, Tail Flick (TF) e dor neuropática por *Chronic Constriction Injury* (CCI). Foi realizada uma injeção subcutânea no acuponto *Zusanli* de 20µL de salina e agonistas dos TRP's, capsaicina, mentol e metil salicilato, nas doses de 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL. Os limiares mecânicos foram avaliados através do aparelho Von Frey digital, antes da administração do CFA e da cirurgia de constrição do nervo ciático, após 4 horas e 72 horas para avaliação hiperalgésica, e 0, 1, 3, 6 e 24 horas após a administração dos agonistas. E os limiares de TF foram avaliados antes e após 0, 1, 3, 6 e 24 horas. A hiperalgesia inflamatória foi revertida significativamente em todos os agonistas. A administração de capsaicina induziu redução do efeito hiperalgésico, em todos os tempos avaliados, nas 3 doses, exceto no tempo após 24 horas de tratamento, onde somente a maior dose induziu redução nos limiares mecânicos. E o tratamento com mentol e metil salicilato, no acuponto, induziu efeito antinociceptivo, em todos os tempos, nas diferentes doses. No grupo de dor fásica, a administração dos agonistas, capsaicina e mentol, apresentou aumento dos limiares de latência, em todos os tempos avaliados nas 3 doses, exceto no T0. E a administração de metil salicilato obteve efeito analgésico, em todas as doses, nos tempos T3, T6 e T24, e somente a maior dose apresentou efeito no T0 e a dose intermediária no T1. No modelo de dor neuropática, a capsaicina, nas doses maior e intermediária, apresentou efeito analgésico em quase todos os tempos. O mentol obteve este efeito em todas as doses e quase em todos os tempos, assim como o metil salicilato. De acordo com os resultados, podemos sugerir que os receptores TRPV1, TRPM8 e

TRPA1 estão envolvidos no efeito anti-hiperalgésico, pela administração de agonistas no acuponto *Zusanli*, no controle da dor inflamatória, fásica e neuropática.

Palavras- chave: Dor, Nociceptores, Acupuntura

ABSTRACT

Pain may be classified as inflammatory, neuropathic and phasic, which occurs by a damage in the nervous system and nociceptors stimulation, such as the Transient Receptor Potential (TRP's). In TRP's group, we highlight the TRPV1, TRPM8, and TRPA1, stimulated by substances anti-nociceptive, such as capsaicin, menthol, and methyl salicylate respectively. This work sought to investigate the role of the TRP's on the antinociception, through administration of agonists in the acupoint Zusanli (ST36), in inflammatory, neuropathic and phasic pain models. The project has composed by 180 male Wistar rats, 6 weeks old, between 250g to 300g. The inflammatory pain model induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA), phasic pain model by Tail Flick (TF) and neuropathic pain model by *Chronic Constriction Injury* (CCI). A subcutaneous injection in the acupoint Zusanli 20 μ L of saline and the TRP's agonists, capsaicin, menthol and methyl salicylate was applied in doses of 0,03 μ g/20 μ L; 0,3 μ g/20 μ L; 3,0 μ g/20 μ L. Mechanical thresholds assessed using a digital Von Frey device before the administration of CFA and after 0, 1, 3, 6 and 24 hours of administration of the agonists. The TF thresholds assessed before and after 0, 1, 3, 6 and 24 hours. Inflammatory hyperalgesia revealed significantly reversed in all agonists. The administration of capsaicin induced the reduction of hyperalgesic effects at all periods, in 3 doses, except for the time after 24 hours of treatment, where only the higher dose induced a reduction in a mechanical threshold. The treatment with menthol and methyl salicylate induced an antinociceptive effect in the acupoint for all the times, in different doses. In phasic pain group, the administration of agonists, capsaicin, and menthol increased the latency thresholds, at all times evaluated in three doses except the T0. In addition, the administration of methyl salicylate obtained an analgesic effect on all doses and on the times T3, T6 and T24, and only the highest dose had an effect on T0 and the intermediate dose on T1. In neuropathic model pain, capsaicin in the highest and intermediate dose showed analgesic effect in all the times. The menthol and the methyl salicylate had this effect in all the dose and the most times. According to the results obtained so far, we suggest that TRPV1, TRPM8, and TRPA1 receptors are involved in anti-hyperalgesic effect by administering agonists in the Zusanli acupoint in the control of inflammatory and phasic pain.

Keywords: Pain, Nociceptor, Acupuncture

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- A SUPERFAMÍLIA TRP	20
FIGURA 2- ESTRUTURA DOS CANAIS IÔNICOS TRP	21
FIGURA 3- NERVO CIÁTICO EXPOSTO.	29
FIGURA 4- AMARRAÇÃO DO NERVO CIÁTICO	30
FIGURA 5- SUTURA DA PELE	31
FIGURA 6- REGIÃO DO ACUPONTO ST36	33
FIGURA 7- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO. MODELO DE DOR FÁSICA.....	36
FIGURA 8- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO. MODELO DE DOR NEUROPÁTICA E INFLAMATÓRIA.	37

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1- LIMIAR NOCICEPTIVO AVALIADO PELO TESTE DE VON FREY DIGITAL NO EFEITO DO AGONISTA PARA O RECEPTOR TRVP1, CAPSAICINA (CAPS.), NAS DOSES DE 0,03 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$, ADMINISTRADOS NO ACUPONTO ST36, SOBRE A DOR INFLAMATÓRIA, PRODUZIDA, APÓS O MODELO EXPERIMENTAL ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)..... 40
- GRÁFICO 2- LIMIAR NOCICEPTIVO AVALIADO PELO TESTE DE VON FREY DIGITAL NO EFEITO DO AGONISTA PARA O RECEPTOR TRPM8, MENTOL (MENTOL), NAS DOSES DE 0,03 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$, ADMINISTRADOS NO ACUPONTO ST36, SOBRE A DOR INFLAMATÓRIA, PRODUZIDA, APÓS O MODELO EXPERIMENTAL ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)..... 41
- GRÁFICO 3- LIMIAR NOCICEPTIVO AVALIADO PELO TESTE DE VON FREY DIGITAL NO EFEITO DO AGONISTA PARA O RECEPTOR TRPA1, SALICILATO DE METILA (SALIC.), NAS DOSES DE 0,03 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$, ADMINISTRADOS NO ACUPONTO ST36, SOBRE A DOR INFLAMATÓRIA, PRODUZIDA APÓS O MODELO EXPERIMENTAL ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)..... 42
- GRÁFICO 4: LIMIAR DE LATÊNCIA(S), AVALIADO PELO TESTE DE RETIRADA DA CAUDA, *TAIL FLICK*, NO EFEITO DO AGONISTA PARA O RECEPTOR TRVP1, CAPSAICINA (CAPS.), NAS DOSES DE 0,03 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$, ADMINISTRADOS NO ACUPONTO ST36, SOBRE A DOR FÁSICA. 43
- GRÁFICO 5: LIMIAR DE LATÊNCIA(S), AVALIADO PELO TESTE DE RETIRADA DA CAUDA, *TAIL FLICK*, NO EFEITO DO AGONISTA PARA O RECEPTOR TRPM8, MENTOL (MENTOL), NAS DOSES DE 0,03 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$, ADMINISTRADOS NO ACUPONTO ST36, SOBRE A DOR FÁSICA. 44
- GRÁFICO 6- LIMIAR DE LATÊNCIA(S), AVALIADO PELO TESTE DE RETIRADA DA CAUDA, *TAIL FLICK*, NO EFEITO DO AGONISTA PARA O RECEPTOR TRPA1, SALICILATO DE METILA (SALIC.), NAS DOSES DE 0,03 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 0,3

	$\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$, ADMINISTRADOS NO ACUPONTO ST36, SOBRE A DOR FÁSICA.....	45
GRÁFICO 7-	LIMIAR NOCICEPTIVO AVALIADO PELO TESTE DE VON FREY DIGITAL NO EFEITO DO AGONISTA PARA O RECEPTOR TRVP1, CAPSAICINA (CAPS.), NAS DOSES DE 0,03 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$, ADMINISTRADOS NO ACUPONTO ST36, SOBRE A DOR NEUROPÁTICA, PRODUZIDA, APÓS O MODELO EXPERIMENTAL <i>CHRONIC CONSTRICTION INJURY</i> (CCI).....	46
GRÁFICO 8-	LIMIAR NOCICEPTIVO AVALIADO PELO TESTE DE VON FREY DIGITAL NO EFEITO DO AGONISTA PARA O RECEPTOR TRPM8, MENTOL (MENTOL), NAS DOSES DE 0,03 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$, ADMINISTRADOS NO ACUPONTO ST36, SOBRE A DOR NEUROPÁTICA, PRODUZIDA, APÓS O MODELO EXPERIMENTAL <i>CHRONIC CONSTRICTION INJURY</i> (CCI).	47
GRÁFICO 9-	LIMIAR NOCICEPTIVO AVALIADO PELO TESTE DE VON FREY DIGITAL NO EFEITO DO AGONISTA PARA O RECEPTOR TRPA1, METIL SALICILATO (SALIC), NAS DOSES DE 0,03 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{G}/20\mu\text{L}$, ADMINISTRADOS NO ACUPONTO ST36, SOBRE A DOR NEUROPÁTICA, PRODUZIDA, APÓS O MODELO EXPERIMENTAL <i>CHRONIC CONSTRICTION INJURY</i> (CCI).	48

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TRP	Receptor de Potencial Transiente
TRPV1	Receptor de Potencial Transiente Vanilóide 1
TRPM8	Receptor de Potencial Transiente Relacionado à Melastatina 8
TRPA1	Receptor de Potencial Transiente com Domínios Anquirina 1
MA	Acupuntura Manual
EA	Eletroestimulação
ATP	Trifosfato de Adenosina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRPC	Receptor de Potencial Transiente canônico
TRPM	Família TRP Melastatina
TRPV	Família TRP Vanilóide
TRPA	Família TRP Com Domínios Repetidos Relacionados À Anquirina
TRPML	Família TRP Mucolipinas
TRPP	Família TRP Policistina
DNA _C	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CCI	Injúria por Constrição Crônica do nervo Isquiático (<i>Chronic constriction injury</i>)
ST36	Acuponto Estômago 36 (Zusanli)
TF	<i>Tail Flick Test</i>
CAPS	Capsaicina
SALIC	Metil Salicilato
EPM	Erro Padrão Da Média
i.pl	Administração Intraplantar
DRG	Gânglio Da Raiz Dorsal
AMG2850	Antagonista De Trpm8
ST37	Acuponto Estômago 37

RTX

Resiniferatoxina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
3	JUSTIFICATIVA	25
4	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVOS GERAIS	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5	METODOLOGIA	27
5.1	ANIMAIS	27
5.2	MODELOS EXPERIMENTAIS	27
5.2.1	Modelo de Dor Fásica – Teste de Retirada da Cauda - <i>Tail Flick</i>	27
5.2.2	Modelo de Dor Inflamatória - Indução da hiperalgesia aguda por CFA	28
5.2.3	Modelo de Dor Neuropática - Modelo de hiperalgesia neuropática periférica ("Chronic Constriction Injury")	28
5.2.4	Testes de nocicepção mecânica- Pressão contínua na pata (Von Frey digital)	31
5.2.5	Administração de agonistas no acuponto ST36	32
5.2.6	Drogas e Diluentes	33
5.2.7	Grupos experimentais	34
5.2.8	Delineamento do estudo	36
7	RESULTADOS	39
8	DISCUSSÃO	49
8.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	55
9	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	66

1 INTRODUÇÃO

Fisiologicamente, a dor é um mecanismo de proteção, vivenciada por quase todos os seres humanos, pois nos permite identificar estímulos externos nocivos sejam físicos, mecânicos e químicos. A dor pode também nos ajudar contra danos físicos e/ou lesões futuras, devido ao caráter de aprendizado, pela experiência sensitiva àquele determinado estímulo inicial, reconhecendo os danos potencialmente prejudiciais. Patologicamente, a dor está associada à redução da qualidade de vida, biopsicossocial, com aparecimento de sintomas nocivos severos e outros como ansiedade, depressão ou insônia. (DWORKIN et al., 2010).

Dentre as manifestações dolorosas, temos a dor inflamatória e neuropática que ocorrem após a geração de um processo inflamatório decorrente de injúria tecidual e lesão de nervos periféricos e/ou centrais, respectivamente, e dor fásica (momentânea) que ocorre similarmente às dores neuropáticas e inflamatórias quanto ao processamento nociceptivo. A resposta nociceptiva é transduzida ao sistema sensorial por meio da ativação dos nociceptores encontrados em toda periferia tecidual e transmitida através das fibras aferentes primárias do tipo C e A- δ . Os neurônios sensoriais primários realizam sua sinapse no corno posterior (ou corno dorsal) da medula espinal, onde, pela liberação de neurotransmissores transmitem a informação para os neurônios de segunda ordem. A informação nociceptiva, ascende então por tratos espinotalâmicos específicos para regiões supraespinais que são interpretadas quanto sua intensidade e localização (JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 2002). Dentre os variados tipos de receptores expressos nos neurônios sensitivos periféricos, podemos destacar os Receptores de Potencial Transiente (TRP's) como sendo de grande importância, pois reconhecem estímulos de variada natureza.

Os TRP's são proteínas de membrana que funcionam como canais iônicos. São divididos em subfamílias, como o receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1) que é estimulado por informação dolorosa e calor, receptor de potencial transiente relacionado à melastatina (TRPM8) que é um integrador da transmissão térmica inferior e o receptor de potencial transiente com domínios anquirina 1 (TRPA1) estimulados pelo frio nocivo (KOBAYASHI et al., 2005). Estudos destacam

algumas substâncias agonistas destes receptores, como a capsaicina, mentol, e metil salicilato (ANDERSEN et al., 2016; HU et al., 2004; NEUBERT et al., 2003), e algumas medidas curativas, como a técnica de acupuntura (LANGEVIN et al, 2001), com conseqüente diminuição da transmissão dolorosa induzindo analgesia duradoura de modelos comportamentais.

A acupuntura é um tratamento da medicina chinesa, composta por um sistema de meridianos com pontos específicos, que envolve a inserção de agulhas em algum sítio, determinado, na superfície do corpo. Esta técnica constitui uma extensa comunicação/vias entre o corpo e meridianos energéticos, além de possuir mecanismos neurais que geram efeitos analgésicos, usualmente utilizados em diversas condições dolorosas (ZHANG et al., 2012; ZHOU, 2010). Além da técnica de inserção de agulhas, um novo método vem sendo estudado na prática de acupuntura. Ele consiste na administração de irritantes químicos em determinados pontos de acupuntura, especialmente o ST36 (estômago 36), resultando em efeito antinociceptivo, em diferentes modelos de dor (GOLDMAN et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A dor, ou nocicepção, é uma experiência vivenciada pela grande maioria dos seres humanos. Pode ser conceituada como “experiência sensitiva e emocional desagradável decorrente ou descrito em termos de lesões teciduais reais e potenciais”, determinada pelo comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da dor (IASP), por ONOFRE e colaboradores (2009). Fisiologicamente, a dor integra o controle de equilíbrio do corpo, a homeostase, para um alerta sobre um possível perigo ao organismo, liberando sinais importantes para detecção de diversas patologias (BASBAUM et al., 2009). Assim, ela estabelece situações com limiares específicos e organizados, que sensibiliza sistemas, como sinal de alerta, que protegem o indivíduo contra futuras lesões. Esta função do corpo de auto preservação, tem o potencial de evitar a evolução de certa manifestação dolorosa, para uma doença debilitante sob condições patológicas, tais como inflamação, cancro, infecção viral, diabetes e outras doenças dolorosas (WOLKERSTORFER et al., 2016).

A experiência da dor física é familiar para todos, no entanto, a intensidade, o caráter e a tolerância da dor são subjetivos, dependendo de cada pessoa. Assim, exames detalhados das características dolorosas, são necessários a fim de recomendar intervenções adequadas, bem como a percepção e os efeitos físicos causados pela dor, que podem ser influenciados por fatores sociais, culturais e psicológicos (WOLKERSTORFER et al., 2016). Assim, a sensação dolorosa em experiências humanas, é determinada pela palavra dor, devido às influências ambientais e emocionais, enquanto que o componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, utilizado em animais, pela ausência de comportamento externo. (FERREIRA et al., 2009). O sistema nociceptivo é a via, onde, os estímulos nocivos são enviados ao cérebro para o processamento doloroso, evidenciando mecanismos periféricos e centrais, como a transdução, transmissão, modulação e percepção, de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo.

Este processamento doloroso ocorre por complexas atividades neuronais, dos sistemas nervosos, periférico e central, que são detectados, inicialmente, no sistema somatossensorial. Um determinado número de receptores de sinalização recebem a

informação externa e compartilham esta informação dolorosa através dos neurônios aferentes primários, processo denominado de transdução nociceptiva (LEE et al., 2016). Portanto, ocorrem alterações no limiar de transdução no neurônio aferente primário, caracterizado pela sensibilização periférica, que são responsáveis pela zona de hiperalgesia primária na região da injúria tecidual (GARRY et al., 2004). Após ser detectada pelo processo de transdução, a informação dolorosa passa por um processo de transmissão, que ocorre por fibras aferentes primárias, que formam conexões diretas ou indiretas com uma das três populações de neurônios do corno dorsal da medula: interneurônios, subdivididos em excitatórios e inibitórios; neurônios proprioespinais que interconectam vários segmentos da medula espinhal; neurônios de projeção que participam da transmissão através da medula espinhal até centros supraespinhais superiores (KLAUMANN et al., 2008).

As fibras nociceptivas são divididas em duas categorias aferentes primárias: as fibras C e as fibras A- δ . As fibras C são de pequeno diâmetro, não mielinizadas e com velocidade de condução lenta, que transportam dor de longa duração e difusa, e as fibras A- δ que possuem um diâmetro médio, levemente mielinizadas e com velocidade de condução intermediária, responsáveis pela dor de curta duração, aguda e lancinante (CATERINA; JULIUS, 2001; BASBAUM et al., 2009). As fibras A- δ respondem somente a estímulos nocivos mecânicos e térmicos, já as fibras C respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, denominados de polimodais. Existem outras fibras, do tipo A- β , que são caracterizadas pela presença de mielina que detectam estímulos inócuos como tato e propriocepção, porém podem responder como nociceptores durante alguns processos patológicos, como a neuropatia, em que ocorre uma plasticidade neuronal (BASBAUM et al., 2009). A partir destas fibras, a informação será transmitida até a medula espinhal que passará por um processo de modulação da dor, e por fim pela percepção dos centros superiores.

A modulação da dor ocorre no corno dorsal da medula espinhal que caracteriza o estímulo transmitido em diferentes aspectos, ocorrendo sinapses com neurônios de segunda ordem por meio da liberação de diversos neurotransmissores, como glutamato e substância P (LIU et al., 1997). Conseqüentemente a informação nociceptiva ascende aos centros superiores, pelos tratos nervosos espinotalâmico ou espinoreticulotalâmico em direção ao tálamo que redireciona essa informação ao

córtex somatossensorial, que processa este estímulo, e determina a localização e intensidade dolorosa (MILLAN, 2002). Esta percepção pode caracterizar a dor, como fásica (nociceptiva), inflamatória e neuropática.

A dor nociceptiva é um alarme mediado por neurônios sensoriais não mielinizados (fibras C) ou finamente mielinizados (fibras A δ), que são sensibilizados e alimentam vias nociceptivas do sistema nervoso central (SNC). Esta sensibilização ocorre por um sistema sensorial de detecção de estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. Os estímulos se codificam em impulsos elétricos por terminais nervosos periféricos, denominados nociceptores, cuja função é indicar uma injúria potencial ou real, e ajustar uma resposta a intensos estímulos externos, bem como mediadores químicos exógenos e endógenos. Em seguida ocorre a transmissão dolorosa, através das fibras nociceptivas, modulação e percepção pelo SNC (COSTIGAN et al., 2009; MILLAN, 2002; WOLKERSTORFER et al., 2016).

Após a percepção da dor, ocorre a ativação de uma via descendente inibitória, com liberação de noradrenalina e serotonina, que inibem a liberação de transmissores da dor, caracterizando uma via eficaz e endógena para solucionar a condição dolorosa (COSTIGAN et al., 2009; MILLAN, 2002; WOLKERSTORFER et al., 2016). Assim, a dor nociceptiva tem como função a proteção do organismo contra uma lesão tecidual, mediante um estímulo externo potencialmente prejudicial como a picada de agulha ou calor excessivo, e ainda estímulos internos como isquemia do miocárdio em pacientes com doença arterial coronariana (TORRES et al., 2006), caracterizando-a como uma dor aguda.

Esta dor aguda (momentânea) gera uma resposta previsível ao trauma (térmica, química ou mecânica), associada a uma causa identificável que ao ser removido desaparece. Além disso, responde bem a um possível tratamento por ser caracterizado como uma dor de curta duração. Assim, este tipo de dor pode ser definido pela IASP como um estímulo repentino e de fácil resolução, e que normalmente não necessita de tratamento (WOLKERSTORFER et al., 2016).

A manifestação de dor inflamatória ocorre por danos no tecido devido aos estímulos nocivos (químicos, físicos, mecânicos), constituindo um desequilíbrio na homeostase, que perturba a integridade do tecido e dispara uma resposta mediada por células efectoras que liberam mediadores químicos e sensibilizam a via periférica. (HARGREAVES; RUPAREL, 2016; KANDEL et al., 2000). Esta sensibilização ocorre

quando nociceptores são expostos aos produtos do dano tecidual e da inflamação (cascata inflamatória), como histamina, bradicinina, citocinas e TNF- α (JULIUS; BASBAUM, 2001). O TNF- α é amplamente considerado como citocina pró-inflamatória, devido ao seu papel principal em iniciar a cascata de ativação de outras citocinas e fatores de crescimento, na resposta inflamatória. Após a lesão ou durante a inflamação, TNF- α é sintetizado e liberado por vários de tipos de células envolvidos no processo (SOMMER; KRESS, 2004). Assim, a resposta inflamatória pode ser dividida em diferentes estágios, assim como a variedade de mediadores inflamatórios liberados ao longo do processo.

Os mediadores liberados na resposta inflamatória, referentes à dor, são divididos em mediadores hiperalgésicos intermediários que são liberados no início e durante a inflamação, e mediadores hiperalgésicos finais, que fazem interação direta com seus receptores específicos ou nociceptores, nos neurônios aferentes primários, provocando sua sensibilização/estimulação (CUNHA et al., 2007), que geram, assim, uma diminuição do limiar de excitabilidade neuronal, aumento da atividade espontânea da célula nervosa e aumento da frequência de disparo por uma resposta a estímulos supralimiares (WALL; MELZACK, 1999). Além das características periféricas, o quadro inflamatório pode gerar danos sistêmicos, como dor, edema, calor e rubor que podem ser controlados pelo próprio organismo ou por terapias medicamentosas. Se estas soluções forem ineficientes o quadro pode ser tornar crônico (KALSO et al., 2004).

A dor crônica ocorre por extrapolação da função de reflexo e/ou defesa do organismo, em condições fisiológicas, associada à redução da qualidade de vida, ansiedade, depressão ou insônia (DWORKIN et al., 2010; KALSO et al., 2004).

Dentre os vários tipos de dor crônica, podemos destacar a dor neuropática, que resulta de doenças/injúrias que acometem o sistema nervoso periférico (SNP) de maneira direta, assim como o sistema nervoso central (SNC), com consequente modificação espinhal e central, respectivamente (SELTZER et al., 1999; BARON; BINDER, 2004; WALKER et al., 1995). O dano tecidual neuronal leva a um aumento da sensibilidade dolorosa de nociceptores, assim como alteração de receptores táteis e proprioceptivos, que passam a perceber uma estimulação inócua como sensação dolorosa. Além disso, ocorrem outras alterações no sistema nervoso que geram uma persistência no envio de sinais de dor, de uma forma prejudicial, até se

tornar patológica. Isto ocorre pela formação de neuromas, gerando aumento na frequência dos potenciais de ação que conduz o influxo sensorial, independente de estimulação periférica (DEVOR, 2006; LIU et al., 2001), levando à características dolorosas intensas.

A intensidade da dor, no entanto, não se relaciona com a quantidade de danos e sintomas, pois ela pode persistir por muito tempo, através de danos teciduais, pela injúria antecedente, mesmo que a lesão inicial tenha sido solucionada (WOLKERSTORFER et al., 2016). E apesar de suas características serem complexas, os principais sintomas da dor neuropática são: hiperalgesia (estímulo doloroso aumentado), decorrente das alterações centrais ou espinhais e a sensibilização continuada dos nociceptores; dor espontânea e alodinia (sensação dolorosa por estímulos não nocivos), que ocorre pela plasticidade neuronal, onde uma fibra tátil ou proprioceptiva responde como nociceptor (BARON; BINDER, 2004; BASBAUM et al., 2009; WALL; GUTNICK, 1974).

Neste modelo de dor, alguns componentes da resposta inflamatória são ativados, gerando a liberação de mediadores e recrutamento de células inflamatórias, como serotonina, substância P, histamina, bradicinina, citocinas, TNF- α , entre outras, para o sítio da lesão. Esta manifestação inflamatória ocorre mediante um processo chamado Degeneração Walleriana, pela lesão nervosa, caracterizado pela remoção de axônios que sofreram decomposição de mielina (TRACEY; WALKER, 1995). Conseqüentemente, essa ativação/liberação de mediadores inflamatórios sensibiliza fibras aferentes primárias, resultando em hiperalgesia na dor neuropática (SOMMER; KRESS, 2004). Portanto, com danos e características tão evidentes e de difícil tratamento, as opções terapêuticas para o controle da dor neuropática têm aumentado nos últimos anos, pois sua compreensão é cada vez mais necessária, buscando esclarecer seus mecanismos.

Muitos estudos, atualmente, tentam elucidar os mecanismos envolvidos na gênese e manutenção da dor neuropática, desde sua fisiopatologia a tratamentos antinociceptivos, a fim de encontrar tratamento eficaz para essa patologia. Dentre as terapias disponíveis, existem estudos que preconizam a acupuntura como um método eficaz para o alívio diante a dor neuropática, e outras manifestações dolorosas.

A acupuntura é um tratamento da medicina chinesa, que corresponde a um sistema terapêutico complexo utilizado há mais de 2000 anos, que foi descrita pela primeira vez no mundo ocidental pelo médico holandês Willem dez Rhyne em 1683. Este método tornou-se usual em condições dolorosas e uma grande variedade de desordens crônicas (LANGEVIN et al, 2001; MELZACK; WALL, 1984;). O procedimento envolve a inserção de agulhas em sítios específicos na superfície do corpo, próximas ou distantes da área dolorosa, que se refere a uma complexa rede de canais (meridianos), conhecidos como pontos de acupuntura ou acuponto (MELZACK; WALL, 1984; SILVA et al., 2012).

Existem várias técnicas da acupuntura que tem por finalidade terapêutica restaurar e recuperar diversos sistemas do corpo, como em um acidente vascular cerebral, epilepsia e tratamento da dor. Dentre estas técnicas temos a acupuntura manual (MA) que pode ser caracterizada pela manipulação, precedida pela inserção das agulhas, eletroestimulação (eletroacupuntura, EA) e moxaterapia por estimulação térmica de pontos de acupuntura. Apesar de sua eficácia, pouco se sabe sobre o mecanismo biológico que ela exerce no organismo. Há um relato sobre a ativação de um opióide endógeno, no corno dorsal da medula, pelos interneurônios inibitórios, durante a acupuntura (WU et al, 2014) e a demonstração de liberação de ATP após acupuntura manual induzindo a liberação de adenosina, com regulação e redução da dor (GOLDMAN et al, 2010).

Além disso, durante a estimulação manual ocorre lesão dos tecidos profundos (músculos) resultando em uma liberação de mediadores pró-inflamatórios, como a histamina, bradicinina, PGE₂, serotonina e ATP que sensibilizam os nociceptores de forma direta ou indireta (BOUCHER et al, 2000). Assim como a estimulação manual, outra técnica de acupuntura vem recebendo destaque, atualmente, pelo seu efeito analgésico mediante diferentes modelos de dor.

Este método de acupuntura consiste em uma administração/injeção de um fármaco, em determinado ponto de acupuntura. Um primeiro estudo elucidou a utilização desta técnica com relevante efeito antinociceptivo. Eles utilizaram a injeção de um irritante químico (adenosina) diretamente sobre o acuponto ST36, e observaram a capacidade, desta técnica, em induzir efeitos semelhantes aos da acupuntura manual ou da eletroacupuntura, concluindo um efeito terapêutico pela administração de um irritante que normalmente provocaria dor (GOLDMAN et al.,

2010). Em 2011, outro estudo realizou uma administração de veneno de abelha sobre um ponto de acupuntura, com achados conclusivos de efeitos e influência terapêutica em um modelo experimental de dor (SILVA et al., 2011). Em outro estudo, observou a abundante expressão de canais neurais e não neurais, nos tecidos que envolvem o ST36, seguido da replicação do efeito analgésico após a injeção de um agonista, destes canais, neste ponto (WU et al., 2014). Em suma, estes estudos indicaram que este acuponto também é sensível a estímulos químicos que reduzem o quadro de dor.

Assim, através do conhecimento sobre a dor e de técnicas de analgesia, pesquisadores precisavam descobrir quais vias participavam da transdução nociceptiva. Por isso, eles realizaram estudos abrangentes, com canais iônicos, para investigar os mecanismos associados à dor.

Existem muitos canais para entrada de íons no genoma humano, em camadas lipídicas impermeáveis que possuem características fundamentais para ativação de sua função, bem como a permeabilidade a diferentes íons, condutância, mecanismos de abertura e fechamento, agonistas e antagonistas, dependência de voltagem e regulações adicionais. Assim, esta ativação pode ocorrer direta ou indiretamente, por meio destas peculiaridades e pela série de eventos moleculares (MINKE; COOK, 2002).

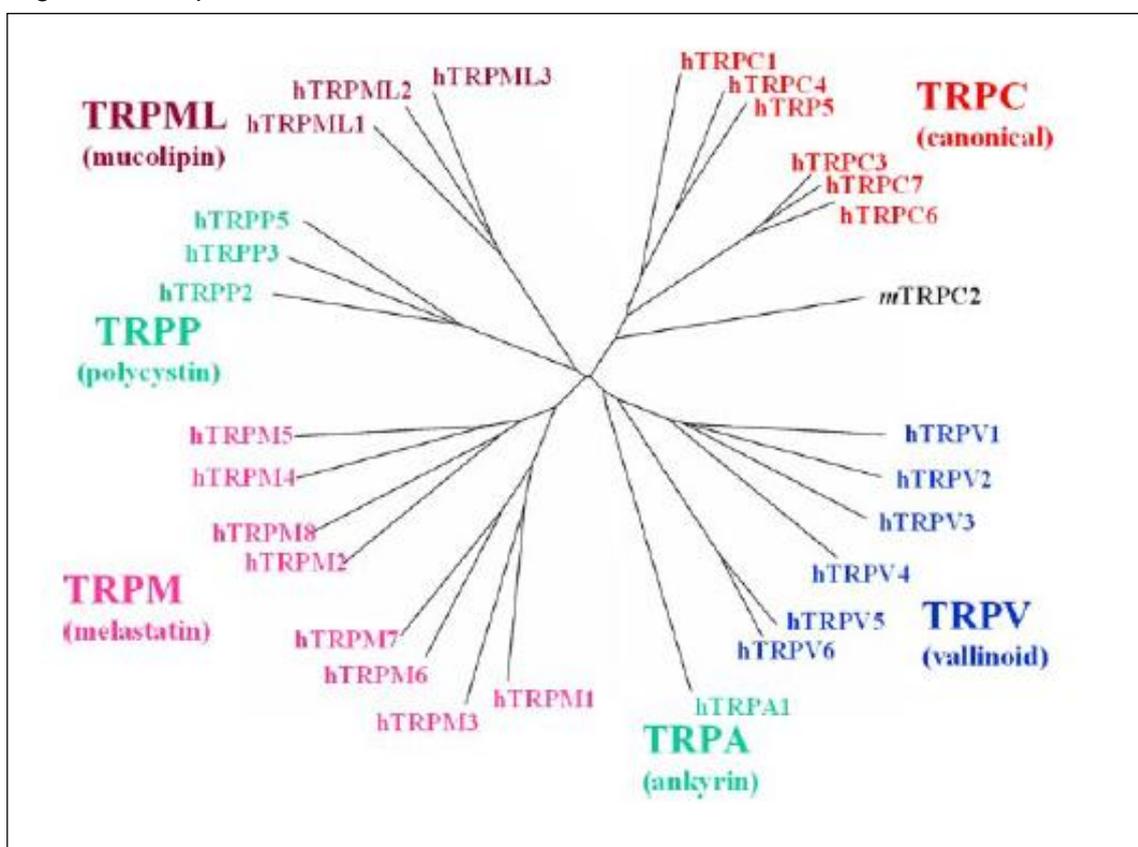
Para abertura dos canais iônicos ou ionotrópicos, que são controlados por ligantes, ocorre uma mudança de conformação para entrada de milhões desses íons através de seus poros. Esta abertura pode ocorrer frente a estímulos dolorosos (inflamação, infecção) que ativam diretamente os canais iônicos gerando um influxo de íons cálcio para dentro da célula, ativando um neurotransmissor sináptico envolvido na transmissão sináptica, que interage com os sítios extracelulares do canal de íons da membrana pós-sináptica (ANDRADE, 2006; FEIN, 2011; HARTZELL et al., 2016). Este processo de abertura de canais iônicos e transmissão sináptica é um processo denominado sinapse.

Os canais também contribuem para alterações na concentração de cálcio livre no citosol e para modulação da sua força motriz, assim como mudanças na polarização de membrana e por formar, possivelmente, vias intracelulares para liberação de cálcio em várias organelas celulares. Esses íons realizam um papel importante em muitos processos celulares, como a contração muscular, proliferação

celular, transcrição de gene, liberação de transmissores e morte celular. Dada a sua importância em todos os tipos de células, não seria surpresa que a disfunção em um desses canais poderia resultar em patogênese de várias doenças (NILIUS, et al., 2007).

A descoberta de uma nova classe de canais de cálcio, uma superfamília de receptores chamada de Receptores de Potencial Transiente (TRP), (FIGURA 1) permitiu a compreensão do influxo de cálcio nas células, e a transdução nociceptiva. O primeiro TRP foi descoberto como componente central de um complexo de fototransdução da mosca do gênero drosófila (ROGER ; HARDIE, 1992).

Figura 1- A superfamília TRP

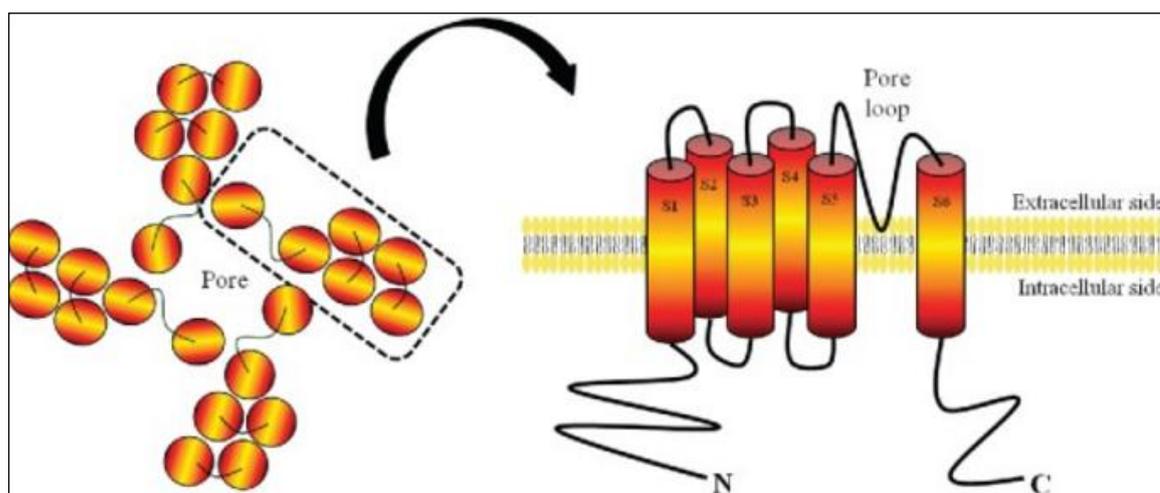


Fonte: NILIUS et al., 2007)

Existem seis famílias de proteínas que compreendem a superfamília TRP: TRPC (família TRP canônica), TRPM (família TRP Melastatina), TRPV (família TRP vanilóide), TRPA (família TRP com domínios repetidos relacionados à anquirina), TRPML (família TRP Mucolipinas) e TRPP (família TRP Policistina). Todos são

subunidades polipeptídicas, possuem seis domínios transmembranares, com exceção de algumas policistinas, que se unem como tetrâmeros para formação de poros que são permeáveis a cátions de forma não seletiva (CLAPHAM, 2003; MONTELL, 2003) (FIGURA 2).

Figura 2- Estrutura dos canais iônicos TRP



Fonte: POLETINI et al., 2015.

Através de buscas de alvos moleculares, para substâncias de ocorrência natural, foi possível a caracterização de muitos canais TRP, principalmente aquelas derivadas de plantas, como a mostarda e pimenta. Seus compostos isolados, capsaicina e isotiocianato de alila, contribuíram para a identificação do receptor TRPV1 e TRPA1 respectivamente. A capsaicina, além da ativação do canal TRPV1, vem sendo utilizada para o estudo de fibras sensoriais (ANDRADE, 2006).

O TRPV1 foi o primeiro receptor identificado com sensibilidade à alta temperatura que envolve a transdução de um estímulo térmico doloroso (CATERINA et al., 1997). Este receptor foi localizado em terminações e corpos celulares de neurônios do gânglio da raiz dorsal e trigeminal, assim como em alguns tipos de células não neuronais (PLANELLAS-CASES et al., 2005), parecendo um integrador da transmissão de estímulos dolorosos físicos e químicos.

O pesquisador Nicholas Jancsó, de origem húngara, foi o primeiro a demonstrar os efeitos da capsaicina, no ano de 1949. Ele demonstrou, em ratas, que essa administração de capsaicina gerava insensibilidade e causava dor, além de vasodilatação. Descreveu também que esta estimulação é seguida por

um estado refratário duradouro, denominado dessensibilização, onde a pele tratada se torna relativamente resistente à capsaicina, e também a outros agentes químicos e ao calor nocivo (JANCSÓ; JANCSÓ-GABOR, 1949). Anos depois, pesquisadores demonstraram que após trinta minutos de aplicação de capsaicina, em ratos adultos e neonatos, ocorria degeneração de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro na raiz dorsal, com diminuição do número de fibras amielínicas (SCADDING, 1980). Assim, conseguiram relacionar a dor, dessensibilização e degeneração, causada pela capsaicina, a uma estimulação de um subgrupo específico de fibras sensoriais, também sensíveis a outros irritantes e ao calor nocivo.

Mesmo com esse avanço em relação à capsaicina, era necessário encontrar o alvo molecular exato onde ela exercia suas ações. Uma das hipóteses era de que cada neurônio sensorial expressava um receptor específico para esta substância. Para isso, ocorreu a descoberta de uma substância chamada resiniferatoxina, um diterpeno extremamente irritante presente no látex seco da planta *Euphorbia resinifera* (HERGENHAHN et al., 1975), que possui um mecanismo de ação comum à capsaicina, como pungência, inflamação neurogênica e diminuição da temperatura corporal (SZALLASI; BLUMBERG, 1989), porém, possuía um efeito dessensibilizante mil vezes mais potente que a capsaicina, possibilitando o estudo do sítio de ação da mesma (SZALLASI; BLUMBERG, 1990). Posteriormente, para confirmar essa expressão, houve um estudo utilizando clonagem do receptor vanilóide, que isolou o DNA complementar (cDNA) que codifica a proteína sensível à capsaicina (CATERINA et al., 1997), demonstrando sua seletividade ao TRPV1.

Assim, com a confirmação de um receptor sensível à temperaturas altas, era necessário localizar receptores sensíveis à temperaturas inferiores, como TRPM8.

Utilizando uma lógica semelhante à descoberta de TRPV1, foi encontrado outro receptor sensível à temperatura, expressos por neurônios sensoriais. A sua temperatura de ativação é abaixo de 26° C, mediado pelo estímulo térmico por neurônios de fibras aferentes primárias (BAUTISTA et al., 2007). Esses neurônios eram sensibilizados por uma substância natural, o mentol. O mentol é um monoterpeno conhecido, com característica de produzir frescor. Assim, um termoreceptor sensível ao frio inócuo e ao mentol foi identificado e chamado de TRPM8 (MCKEMY et al., 2002; PEIER et al., 2002). Além disso, estudos demonstraram que uma aplicação tópica de mentol com uma concentração

relativamente alta (30%), induzia dor ao frio e hiperalgesia, possivelmente pela ativação de nociceptores do tipo C e A- δ , sensíveis ao frio (GAUDIOSO et al., 2012). Embora esta afirmação tenha sido elucidada, estudos tentam comprovar sua função analgésica.

Os mecanismos moleculares e celulares que produzem o efeito analgésico pelo mentol são obscuros. Alguns estudos mostram sua atuação em modelos nociceptivos utilizando ratos e coelhos, possivelmente pela dessensibilização de fibras nociceptivas do tipo C (CLIFF; GREEN, 1994; GALEOTTI et al., 2001). Em adição a este efeito dessensibilizante, o seu efeito antinociceptivo, em culturas de neurônios sensoriais, pode estar relacionado à inativação de correntes de cálcio, assim como a inibição de uma subforma de canais voltagem dependentes de sódio (HAESLER et al., 2002; SWANDULLA et al., 1986; SWANDULLA et al., 1987).

Assim como TRPM8, outro termorreceptor da família TRP, recentemente, foi encontrado apresentando sensibilidade ao frio nocivo, mas não ao mentol, denominado TRPA1 (STORY et al., 2003).

O TRPA1 foi identificado pela primeira vez, como um termorreceptor (estimulação pelo frio), que aumenta a concentração de cálcio intracelular com temperatura de ativação inferior (abaixo de 18° C) do que aquela para ativar TRPM8 (STORY et al., 2003). Foi reconhecido como uma proteína expressa numa linha de células do lipossarcoma, mas foi mais tarde identificado como um membro de uma nova subfamília TRP. Sua estrutura é composta por seis domínios transmembrana, com ambas as porções amino e carboxi terminal intracelulares e com domínios relacionados à proteína anquirina (JAQUEMAR et al., 1999). Foi encontrado, inicialmente, em um subgrupo de neurônios (nociceptores aferentes primários), localizados na raiz dorsal (PAULSEN et al., 2015; STORY et al., 2003), onde detecta estruturalmente diversos compostos nocivos que provocam dor e inflamação neurogênica. O seu papel na transdução nociceptiva é ilustrado pela descoberta de um aumento, em cinco vezes, da corrente interna no potencial de repouso (MCENTIRE et al., 2016). Assim, foi necessária a busca por agonistas, responsáveis por sua ativação e que poderiam atuar de diferentes formas.

Para ativação do receptor TRPA1, existem algumas substâncias de plantas que são capazes de estimular esse receptor, como: isotiocianatos (presentes no óleo de mostarda, no wasabi, na couve de bruxelas, na alcaparra e no rabanete), a

alicina (composto presente no alho), o tetrahydrocannabinol (composto psicoativo da maconha) e o cinamaldeído (encontrado nas cascas de canela) (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; MACPHERSON et al., 2005). Existem também outras substâncias capazes de realizar essa estimulação, como o eugenol presente no óleo de cravo e o metil salicilato, encontrado no óleo de gualtéria (BANDELL et al., 2004), porém eles ativam também os receptores TRPM8 e TRPV1.

Esta ativação está associada à transdução nociceptiva, porém seu papel ainda é desconhecido. Uma proposição para a participação nesta via é pelo aumento da corrente do potencial de ação, após sua ativação (MCENTIRE et al., 2016). Entretanto, TRPA1, também demonstra um potencial significativo para resolução da dor e inflamação, após administração de seus agonistas, como o metil salicilato, que inibe a resposta inflamatória, mediante modelos de dor (WANG et al., 2011). Assim, seus mecanismos de ação e seus efeitos benéficos devem ser bem entendidos e estudados.

Com base nos estudos encontrados sobre os receptores de potencial transiente, envolvendo sua ativação por substâncias agonistas, este estudo busca evidenciar a utilização das substâncias capsaicina, mentol e metil salicilato, no ponto de acupuntura, como método de tratamento em modelos de dor fásica, inflamatória e neuropática.

3 JUSTIFICATIVA

Além da dor física e de origem inflamatória, este projeto abordou, também, a dor de origem neuropática, uma síndrome crônica incurável que ocorre pela lesão do sistema nervoso e caracteriza-se por alodínia (hipersensibilidade a estímulo tátil), hiperalgesia, dor espontânea e ativação repetida de nociceptores. Embora as fibras A- δ e C possuam um importante papel na transmissão da informação nociceptiva, bem como no aparecimento da dor inflamatória, o papel destas fibras na mediação dos efeitos analgésicos, induzidos pela administração de agonistas no acuponto não, estão esclarecidos na literatura. Desta forma, este estudo foi necessário a fim de identificar a participação dos receptores TRP das fibras A- δ e C no efeito de uma técnica de acupuntura no processo de dor física, inflamatória, e neuropática.

4 OBJETIVOS

Abaixo seguem os objetivos gerais e específicos do estudo.

4.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo investigar o papel dos receptores de potencial transientes das fibras aferentes nociceptivas A- δ e C, na condução dos estímulos induzidos pela administração de agonistas de TRP no acuponto ST36, no processo de dor inflamatória, fásica e neuropática.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a ativação do receptor TRPV1 pela capsaicina, no ponto de acupuntura no processo de dor fásica, inflamatória e neuropática
- Investigar a ativação do receptor TRPA1 pelo metil salicilato, no ponto de acupuntura no processo de dor fásica, inflamatória e neuropática
- Investigar a ativação do receptor TRPM8 pelo mentol, no ponto de acupuntura no processo de dor fásica, inflamatória e neuropática

5 METODOLOGIA

Abaixo seguem os materiais e métodos utilizados ao longo da pesquisa.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 180 ratos machos Wistar, 6 semanas, entre 250 a 300g, provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL-MG. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso a ração e água até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (International Association for the Study of Pain) (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL-MG (Protocolo número: 632/2015).

5.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

Neste item serão descritos todos os aspectos éticos de experimentação animal, suas características, os métodos de avaliação, as drogas e a via de administração utilizada, o modelo experimental de dor física, inflamatória e neuropática, e o delineamento do estudo.

5.2.1 Modelo de Dor Física – Teste de Retirada da Cauda - *Tail Flick*

O grau de antinocicepção foi medido pelo teste de retirada da cauda

(D'AMOUR; SMITH, 1941) modificado por Azami et al., (1982). O animal foi gentilmente imobilizado e a porção da cauda, em 2 cm de sua extremidade, posicionada sobre um filamento de níquel-cromo que foi aquecido progressivamente (aproximadamente 9°C/segundo) a partir da temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) até atingir temperatura nociva (53°C) em aproximadamente 3 segundos.

O aquecimento foi automaticamente interrompido ao alcançar 6 segundos com intuito de se evitar dano tecidual. Antes do tratamento, os animais foram testados para determinação do limiar basal para o reflexo de retirada de cauda em três medidas consecutivas realizadas a intervalos de 5 minutos. Após a medida basal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para exposição dos pontos de acupuntura a serem utilizados. Foi realizada injeção de salina ou agonistas de TRP no acuponto e os limiares foram avaliados 0, 1, 3, 6 e 24 h após.

5.2.2 Modelo de Dor Inflamatória - Indução da hiperalgesia aguda por CFA

Foi realizada a administração intraplantar de CFA (100 μL) e o efeito sobre o limiar nociceptivo mecânico, em ratos, foi avaliado pelo teste de Von Frey (CUNHA et al., 2007). O grupo controle recebeu injeção i.pl. de salina (100 μL). Quatro horas após a injeção de CFA, o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado (basal), e em seguida foi realizada injeção de salina ou agonistas de TRP no acuponto e os limiares foram avaliados 0, 1, 3, 6 e 24 h após a administração, pelo Von Frey Digital.

5.2.3 Modelo de Dor Neuropática - Modelo de hiperalgesia neuropática periférica (“Chronic Constriction Injury”)

O modelo experimental de neuropatia que foi utilizado nesse estudo consistiu na amarração do nervo ciático em quatro pontos e constrição crônica deste nervo (CCI) (BENNET ; XIE, 1988). Antes da cirurgia os animais foram anestesiados com

isoflurano a 2% por via inalatória. O nervo ciático foi exposto (FIGURA 3) na região abaixo do glúteo e ligado com quatro amarrações com fio de seda separados por 2 mm (FIGURA 4). A musculatura e a pele sobre os nervos foram suturados, com padrão de 3 amarrações (FIGURA 5). Ao final da cirurgia, os animais foram mantidos sob aquecimento para prevenir a hipotermia e, em seguida, recolocados no biotério de manutenção.

Três dias após o procedimento, os animais foram testados e considerados hiperalgésicos quando o limiar de resposta à aplicação de estímulos mecânicos no teste de Von Frey correspondeu a, pelo menos, 50% do limiar de resposta basal. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado antes da cirurgia de constrição do nervo ciático (basal), após 3 dias, e 0, 1, 3, 6 e 24 h após a injeção de salina ou agonistas TRP no acuponto, onde tiveram os limiares avaliados, através do Von Frey Digital.

Figura 3- Nervo Ciático Exposto.



Fonte: do autor.

Figura 4- Amarração do Nervo Ciático



Fonte- do autor.

Figura 5- Sutura da Pele



Fonte: do autor.

5.2.4 Testes de nocicepção mecânica- Pressão contínua na pata (Von Frey digital)

Os animais foram colocados em uma sala silenciosa, em caixas de acrílico, sobre uma tela de arame que proporciona acesso à pata desses animais, 30 minutos antes da estimulação, para ambientação ao local. O teste foi realizado pelo aparelho Von Frey eletrônico, através de uma ponta de polipropileno, aplicado perpendicularmente, à superfície plantar da pata traseira (FARGHALY et al., 2016). A força utilizada é suficiente para gerar uma resposta, positiva, de retirada da pata (CHAPLAN et al., 1994).

Após a climatização dos animais (aproximadamente 1 hora), ocorreu uma aplicação na região plantar, de forma crescente até que o animal demonstre comportamento nociceptivo, caracterizado por retirada da pata, seguida de lambida

da mesma e/ou “*flinch*”. Nesse método, pelo menos 6 avaliações, com intervalos de 10 segundos, foram feitas, por animal, e assim realizou-se a média.

5.2.5 Administração de agonistas no acuponto ST36

Para a execução da injeção no acuponto foi utilizada seringa (BD 0,70 x 30mm, 22G), com guia para aplicação, mandril de agulha de acupuntura, a 5 mm de profundidade de 20 μ L de salina ou agonistas (TRPV1, TRPA1 e TRPM8) no acuponto Zusanli (ST36), no modelo de dor fásica, e no acuponto ST36 ipsilateral à lesão (FIGURA 6). Como estes agonistas não apresentam descrição na literatura do seu uso sobre acupontos, as doses das drogas foram definidas por um teste de dose-efeito utilizando a via subcutânea como forma de aplicação (0,03 μ g/20 μ L; 0,3 μ g/20 μ L; 3,0 μ g/20 μ L).

Figura 6- Região do Acuponto ST36



Fonte: do autor.

5.2.6 Drogas e Diluentes

Capsaicina (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) 1 mg foi dissolvido em Cloreto de Sódio, estéril, 0,9%, a uma concentração de 0,03 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$, 0,3 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ e 3 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ e armazenado a -20°C .

Metil salicilato (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) 1 mg foi dissolvido em Cloreto de Sódio, estéril, 0,9%, a uma concentração de 0,03 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$, 0,3 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ e 3 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ e armazenado a -20°C

Mentol (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) 1 mg foi dissolvido em Cloreto de

Sódio, estéril, 0,9%, a uma concentração de 0,03 µg/20µL, 0,3 µg/20µL e 3 µg/20µL e armazenado a -20° C

5.2.7 Grupos experimentais

Os animais foram divididos, em 30 grupos experimentais:

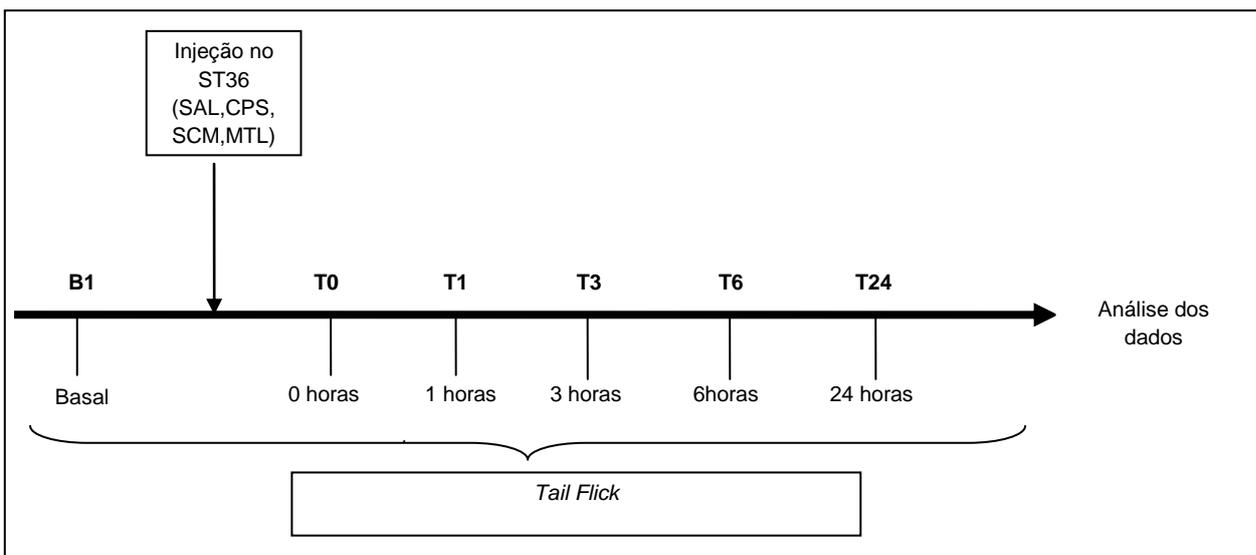
1. CFA e tratados por salina (CFA/SALINA, n=6);
2. CFA e tratados por capsaicina 0,03 µg/20µL (CFA/CAPS.1, n=6);
3. CFA e tratados por capsaicina 0,3 µg/20µL (CFA /CAPS.2, n=6);
4. CFA e tratados por capsaicina 3 µg/20µL (CFA /CAPS.3, n=6);
5. CFA e tratados por mentol 0,03 µg/20µL (CFA / MENTOL1, n=6);
6. CFA e tratados por mentol 0,3 µg/20µL (CFA / MENTOL 2, n=6) ;
7. CFA e tratados por mentol 3 µg/20µL (CFA / MENTOL 3, n=6);
8. CFA e tratados por metil salicilato 0,03 µg/20µL (CFA / SALIC.1, n=6);
9. CFA e tratados por metil salicilato 0,3 µg/20µL (CFA /SALIC.2, n=6);
10. CFA e tratados por metil salicilato 3 µg/20µL (CFA / SALIC.3, n=6);
11. tail flick e tratados com salina (TFL/SALINA, n=6);
12. tail flick e tratados por capsaicina 0,03 µg/20µL (TFL/CAPS.1, n=6);
13. tail flick e tratados por capsaicina 0,3 µg/20µL (TFL/CAPS.2, n=6);
14. tail flick e tratados por capsaicina 3 µg/20µL (TFL/CAPS.3, n=6);
15. tail flick e tratados por mentol 0,03 µg/20µL (TFL/ MENTOL 1, n=6);
16. tail flick e tratados por mentol 0,3 µg/20µL (TFL/ MENTOL 2, n=6) ;
17. tail flick e tratados por mentol 3 µg/20µL (TFL/ MENTOL 3, n=6);
18. tail flick e tratados por metil salicilato 0,03 µg/20µL (TFL/ SALIC.1, n=6);
19. tail flick e tratados por metil salicilato 0,3 µg/20µL (TFL/ SALIC.2, n=6);
20. tail flick e tratados por metil salicilato 3 µg/20µL; (TFL/ SALIC.3, n=6);
21. neuropáticos e tratados por salina (CCI/SALINA, n=6);
22. neuropáticos e tratados por capsaicina 0,03 µg/20µL (CCI/ CPS.1, n=6);
23. neuropáticos e tratados por capsaicina 0,3 µg/20µL (CCI/ CAPS.2, n=6);
24. neuropáticos e tratados por capsaicina 3 µg/20µL (CCI/ CAPS.3, n=6);
25. neuropáticos e tratados por mentol 0,03 µg/20µL (CCI/ MENTOL 1, n=6);

26. neuropáticos e tratados por mentol 0,3 µg/20µL (CCI/ MENTOL 2, n=6) ;
27. neuropáticos e tratados por mentol 3 µg/20µL (CCI/ MENTOL 3, n=6);
28. neuropáticos e tratados por metil salicilato 0,03 µg/20µL (CCI/ SALIC.1, n=6);
29. neuropáticos e tratados por metil salicilato 0,3 µg/20µL (CCI/ SALIC.2, n=6);
30. neuropáticos e tratados por metil salicilato 3 µg/20µL; (CCI/ SALIC.3, n=6);

5.2.8 Delineamento do estudo

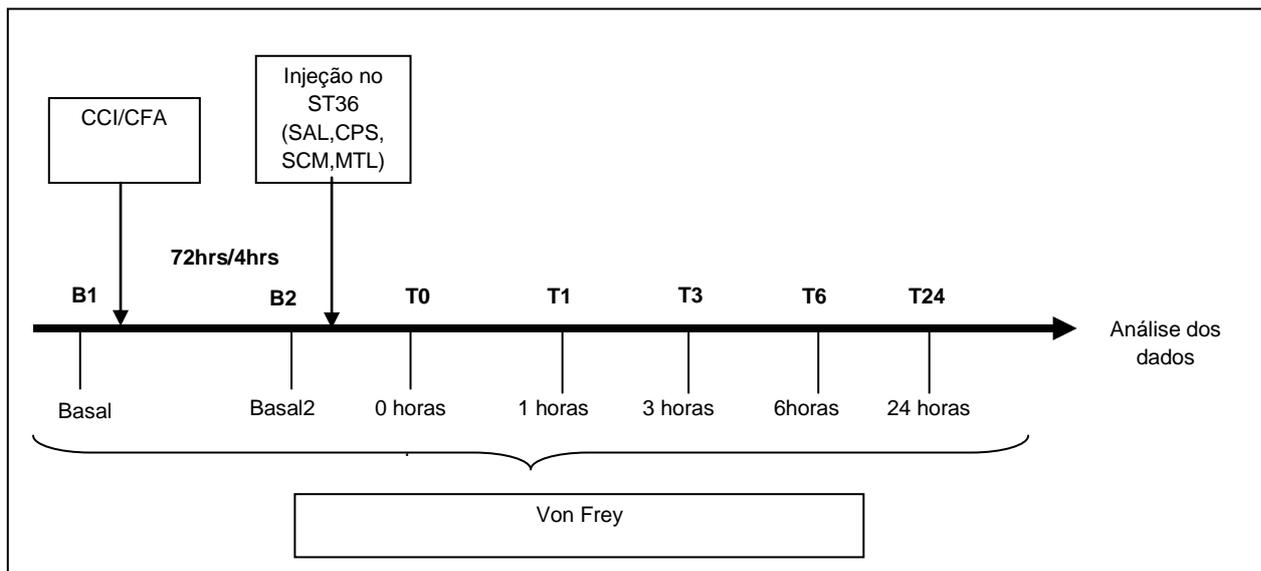
Para o grau nociceptivo de retirada da cauda, através do Tail-Flick, no modelo de dor fásica, foi avaliada uma medida basal (B1) e em seguida em 0, 1, 3, 6 e 24 horas após a administração da droga no ponto de acupuntura (T0,T1,T3,T6,T24) (FIGURA 3).O limiar nociceptivo de retirada da pata, através dos filamentos de Von Frey, no modelo de dor inflamatória foi realizado antes do CFA (B1), após 4 horas antes da administração da droga no ponto da acupuntura (B2), e em seguida em 0 ,1, 3, 6 e 24 horas após a aplicação (T0, T1, T3, T6 e T24). Para o modelo de dor neuropática foi utilizado o mesmo método, entretanto a medida para avaliar a hiperalgesia será realizada 72 horas após a CCI (B2) (FIGURA 4).

Figura 7- Delineamento experimental do estudo. Modelo de Dor Fásica.



Fonte: do autor.

Figura 8- Delineamento experimental do estudo. Modelo de dor neuropática e inflamatória.



Fonte: do autor.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Resultados comportamentais foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 6 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA), dois fatores (tratamento e tempo) ou de um fator (tratamento/tempo). As comparações *post-hoc* foram realizadas pelo teste de múltiplas comparações por meio do teste de Bonferroni usando o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (IBM Corp, Chicago, IL, USA). O nível de significância será de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

O gráfico 1 demonstra o limiar nociceptivo (g), avaliado pelo teste de Von Frey digital, dos grupos que tiveram indução de dor inflamatória após a administração via intraplantar de Adjuvante Completo de Freund (CFA), e que receberam através do ponto de acupuntura (ST36) uma injeção de 20 μ L de salina (SAL), e capsaicina - agonista do receptor transiente de potencial vaniloide do tipo 1 (TRPV1)- em três doses diferentes: 0,03 μ g/20 μ L; 0,3 μ g/20 μ L; 3,0 μ g/20 μ L (CAPS.1, CAPS.2, CAPS.3). A avaliação nociceptiva foi realizada antes da indução com CFA (B1), 4 horas antes da administração da capsaicina (B2), e após 0, 1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24). No grupo CFA/SAL a dor se prolonga desde a indução de CFA até as 24 horas. A dor inflamatória foi revertida nos grupos CFA/CAPS.1 e CFA/CAPS.2 nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas após a administração de capsaicina no acuponto, em relação ao grupo CFA/SALINA. No grupo CFA/CAPS.3 a dor inflamatória diminuiu nos tempos 0, 1, 3, 6 e 24 horas após injeção de capsaicina, quando comparados ao grupo tratado com salina (CFA/SALINA) e com capsaicina nas doses de 0,03 μ g/ μ L (CFA/CAPS.1) e 0,3 μ g/ μ L (CFA/CAPS.2).

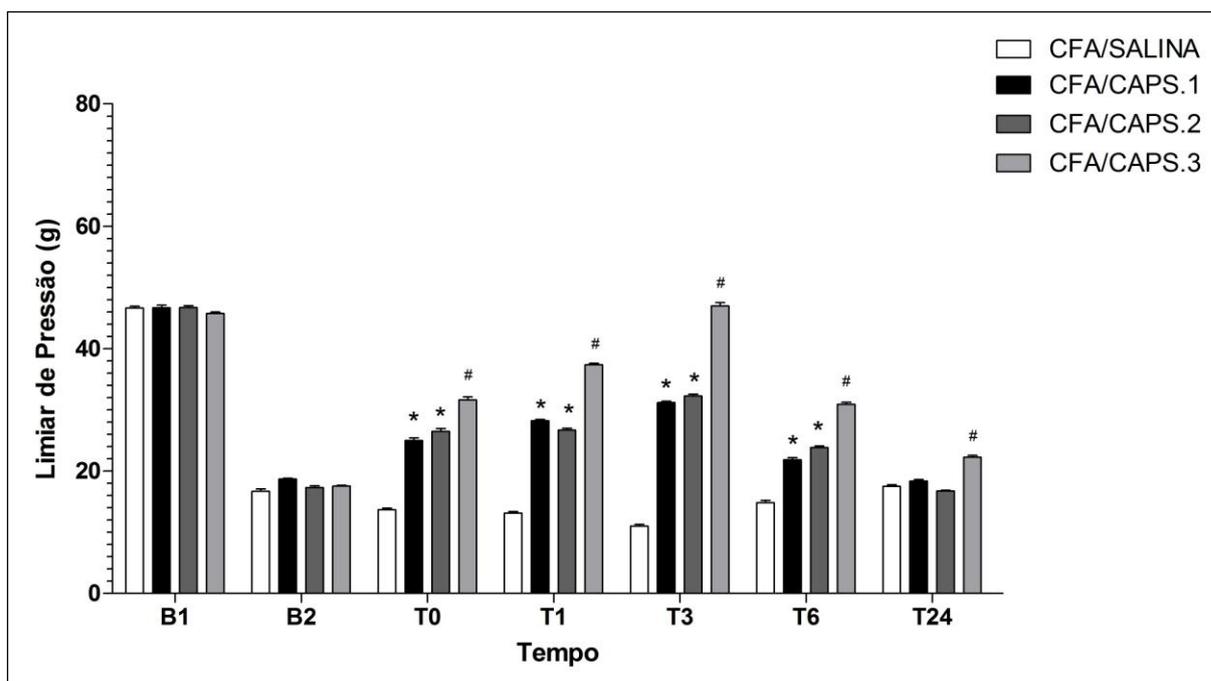


Gráfico 1- Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey digital no efeito do agonista para o receptor TRVP1, capsaicina (CAPS.), nas doses de 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL, administrados no acuponto ST36, sobre a dor inflamatória, produzida, após o modelo experimental Adjuvante Completo de Freund (CFA). A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way* ANOVA seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{6,120} = 3.97$, $p < 0,001$), tratamento ($F_{3,20} = 1.74$, $p < 0,001$) e tratamento x tempo ($F_{18,120} = 313.80$, $p < 0,001$).

Nota: * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (CFA/SALINA); #, em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo CFA/SALINA.

Fonte: do autor.

Para avaliação do limiar nociceptivo (g), com indução de CFA via intraplantar, e injeção no acuponto de 20µL de SAL e mentol - agonista do receptor transiente relacionado à melastatina (TRPM8) - 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL (MENTOL 1, MENTOL 2 e MENTOL 3), foi utilizado também o Von Frey digital. Assim, o gráfico 2 evidencia o resultado da medida basal, antes e após 4 horas da administração do agente inflamatório (B1 e B2), e nos tempos, 0, 1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24), após o tratamento com mentol nas diferentes doses, no acuponto ST36. A dor permaneceu constante em todos os tempos, no grupo CFA/SALINA, desde a indução. A dor inflamatória reduziu nos grupos CFA/MENTOL 1 e CFA/MENTOL 2 nos tempos 0, 1, 3, 6 e 24 horas após a administração de mentol no acuponto, quando comparados ao grupo CFA/SALINA. Houve diminuição da dor inflamatória, no grupo CFA/MENTOL 3, nos tempos 0, 1, 3, 6 e 24 horas após

tratamento, quando comparados ao grupo CFA/SALINA, e também aos grupos CFA/MENTOL 1 e CFA/MENTOL 2.

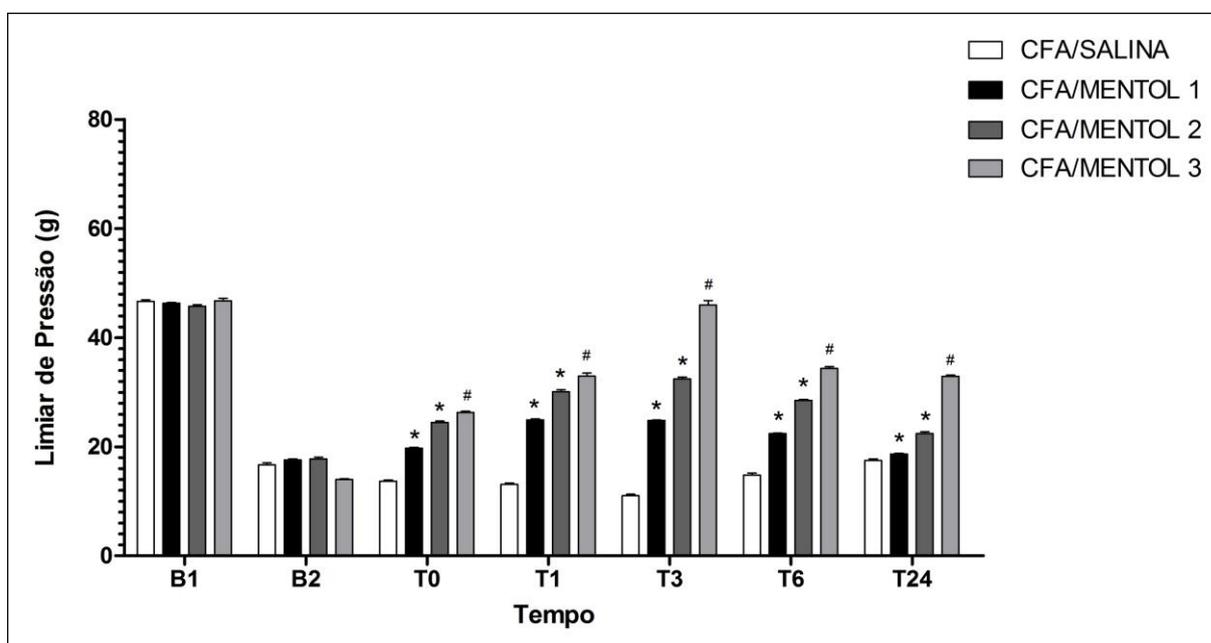


Gráfico 2- Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey digital no efeito do agonista para o receptor TRPM8, mentol (MENTOL), nas doses de 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL, administrados no acuponto ST36, sobre a dor inflamatória, produzida, após o modelo experimental Adjuvante Completo de Freund (CFA). A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way* ANOVA seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{6,120} = 4.01$, $p < 0,001$), tratamento ($F_{3,20} = 1.58$, $p < 0,001$) e tratamento x tempo ($F_{18,120} = 348.30$, $p < 0,001$).

Nota: * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (CFA/SALINA); #, em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo CFA/SALINA.

Fonte: do autor.

O gráfico 3 representa o resultado da administração de metil salicilato no acuponto ST36, mediante a indução de dor inflamatória através do CFA, via intraplantar. Foi administrado 20µL de SAL, e metil salicilato – agonista do receptor de potencial transiente com domínios anquirina 1 - nas doses 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL (SALIC.1, SALIC.2 e SALIC.3). O limiar nociceptivo (g), foi medido através do Von Frey digital e tiveram os seguintes tempos: B1, B2, T0, T1, T3, T6 e T24, medida basal antes e após 4 horas da administração de CFA, e nos tempos 0, 1, 3, 6 e 24 horas, subsequentes à injeção de salina e/ou mentol no acuponto, respectivamente. Todos os grupos obtiveram efeito antinociceptivo em

todos os tempos avaliados, após administração dos agonistas no acuponto, inclusive tardiamente, após 24 horas. E, somente o CFA/SALIC.2 apresentou efeito mediante os demais tratamentos nos tempos T0, T1, T3 e T6, e o CFA/SALIC.1 no tempo T24. No grupo CFA/SAL a dor se prolonga, desde a indução inflamatória por CFA, até às 24horas

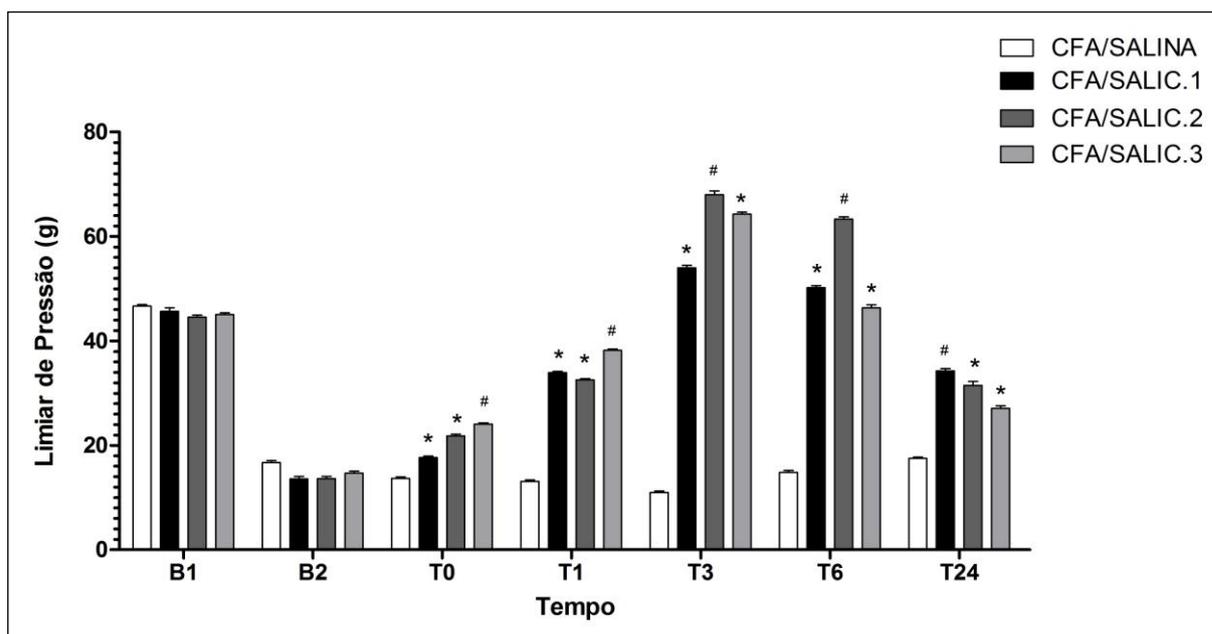


Gráfico 3- Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey digital no efeito do agonista para o receptor TRPA1, salicilato de metila (SALIC.), nas doses de 0,03 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ administrados no acuponto ST36, sobre a dor inflamatória, produzida após o modelo experimental Adjuvante Completo de Freund (CFA). A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way* ANOVA seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{6,120} = 4.49$, $p < 0,001$), tratamento ($F_{3,20} = 2.44$, $p < 0,001$) e tratamento x tempo ($F_{18,120} = 725.49$, $p < 0,001$).

Nota: * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (CFA/SALINA); #, em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo CFA/SALINA.

Fonte: do autor.

O gráfico 4 demonstra o limiar de latência (s), avaliado pelo Teste de Retirada da Cauda, *Tail Flick*, nos grupos com modelo de dor fásica, e que receberam através do ponto de acupuntura (ST36) uma injeção de 20 μL de salina (SAL), e capsaicina - agonista do receptor transiente de potencial vaniloide do tipo 1 (TRPV1)- em três doses diferentes: 0,03 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ (CAPS1, CAPS2, CAPS3). A avaliação nociceptiva foi realizada antes da administração de capsaicina (B1), e após 0, 1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24). No grupo TF/CAPS.1, houve

aumento do limiar de latência, nos tempos 1, 3, 6 e 24 horas, e no TF/CAPS2 nos tempos 0, 1, 3, 6 e 24 horas, após administração do agonista, quando comparados ao grupo TF/SALINA. O grupo TF/CAPS.3 obteve efeito antinociceptivo, pela administração de salicilato na dose de $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$, nos tempos T0, T3 e T6 em relação ao grupo TF/SALINA, e no T1 e T24 em comparação aos demais tratamentos. O grupo TF/SAL apresentou limiar de latência diminuído desde a avaliação inicial às 24 horas de tratamento.

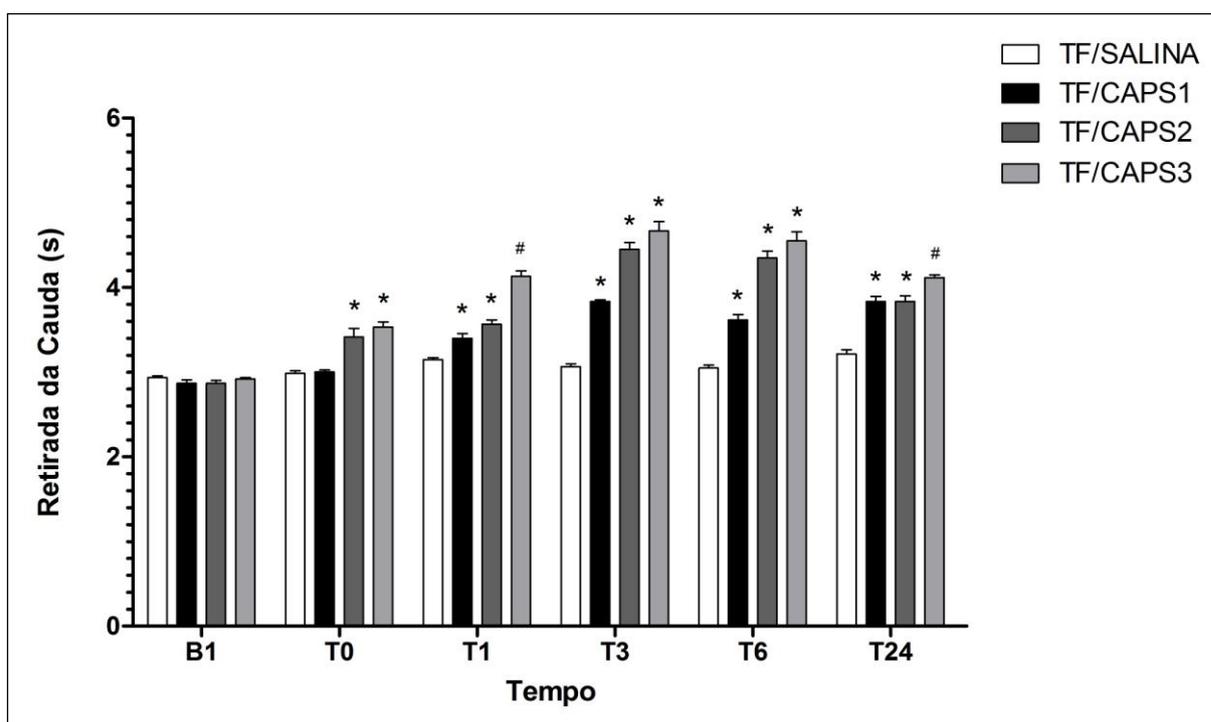


Gráfico 4: Limiar de latência(s), avaliado pelo teste de Retirada da Cauda, *Tail Flick*, no efeito do agonista para o receptor TRVP1, capsaicina (CAPS.), nas doses de $0,03\ \mu\text{g}/20\mu\text{L}$; $0,3\ \mu\text{g}/20\mu\text{L}$; $3,0\ \mu\text{g}/20\mu\text{L}$ administrados no acuponto ST36, sobre a dor fásica. A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way ANOVA* seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{5,100} = 211,436$, $p < 0,001$), tratamento ($F_{3,20} = 225,635$, $p < 0,001$) e tratamento x tempo ($F_{15,100} = 25,774$, $p < 0,001$).

Nota: * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (TF/SALINA); #, em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo TF/SALINA.

Fonte: do autor.

Avaliamos o limiar de latência (s), avaliado pelo Teste de Retirada da Cauda, *Tail Flick*, nos grupos de modelo de dor fásica, e que receberam através do ponto de acupuntura (ST36) uma injeção de $20\mu\text{L}$ de salina (SAL), e mentol -agonista do receptor TRPM8- em três doses diferentes: $0,03\ \mu\text{g}/20\mu\text{L}$; $0,3\ \mu\text{g}/20\mu\text{L}$; $3,0\ \mu\text{g}/20\mu\text{L}$ (MENTOL 1, MENTOL 2, MENTOL 3). Esta avaliação nociceptiva foi realizada antes

da administração de mentol (B1), e após 0, 1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24), demonstrado pelo gráfico 5. O resultado obtido, expresso neste gráfico, foi a diminuição do limiar nociceptivo no grupo TF/MENTOL 1 nos tempos 1, 3, 6 e 24 horas, comparado ao grupo controle (TF/SALINA). O grupo TF/MENTOL 2 resultou em aumento do limiar de latência nos tempos T0, T1 e T3 em relação ao grupo TF/SALINA, e nos tempos T6 e T24 comparado aos grupos TF/MENTOL 1 e TF/MENTOL 3. Houve efeito antinociceptivo no grupo TF/MENTOL 3 nos tempos 0, 3, 6 e 24 horas após a administração de mentol (3µg/µL), em relação ao grupo TF/SALINA, e no T1 em comparação aos demais tratamentos. No grupo que recebeu administração de salina (TF/SAL), no ST36, o limiar nociceptivo não foi alterado, significativamente, em todos os tempos avaliados.

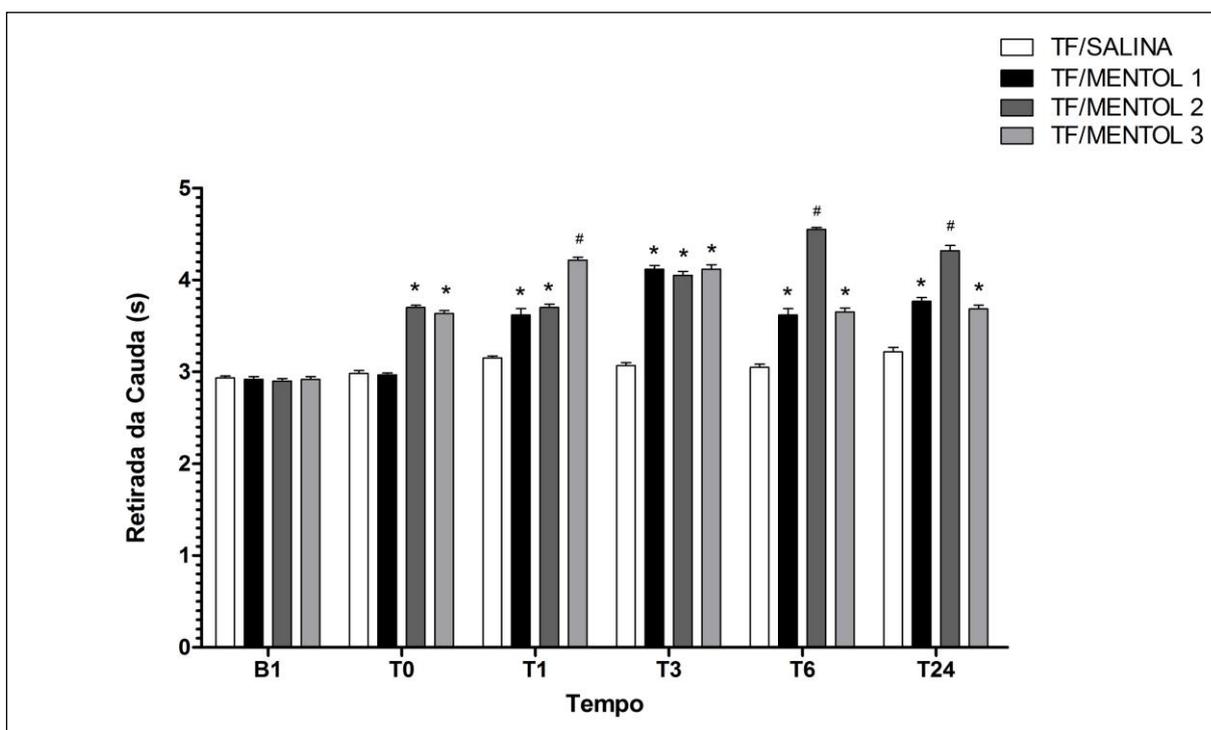


Gráfico 5: Limiar de latência(s), avaliado pelo teste de Retirada da Cauda, *Tail Flick*, no efeito do agonista para o receptor TRPM8, mentol (MENTOL), nas doses de 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL, administrados no acuponto ST36, sobre a dor fásica. A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way ANOVA* seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{5,100} = 307,629$, $p < 0,001$), tratamento ($F_{3,20} = 448,886$, $p < 0,001$) e tratamento x tempo ($F_{15,100} = 60,368$, $p < 0,001$).

Nota: * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (TF/SALINA); #, em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo TF/SALINA.

Fonte: do autor.

O gráfico 6 evidencia o limiar de latência (s), avaliado pelo Teste de Retirada da Cauda, *Tail Flick*, nos grupos que sofreram dor fásica, e que receberam uma

injeção de 20µL de salina (SAL), e metil salicilato -agonista do receptor TRPA1- em três doses diferentes, 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL (SALIC.1, SALIC.2,SALIC.3), através do ponto de acupuntura (ST36). A avaliação de retirada da cauda foi realizada antes da administração de metil salicilato (B1), e após 0 ,1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24). Quando comparados ao grupo TF/SALINA, o limiar nociceptivo aumentou nos grupos: TF/SALIC.1, nos tempos 3, 6 e 24horas; TF/SALIC.2 nos tempos 0, 1, 3, 6 e 24horas; TF/SALIC.3 nos tempos 0, 3, 6 e 24horas. No grupo controle (TF/SAL), a dor se prolonga desde a avaliação inicial às 24 horas de tratamento.

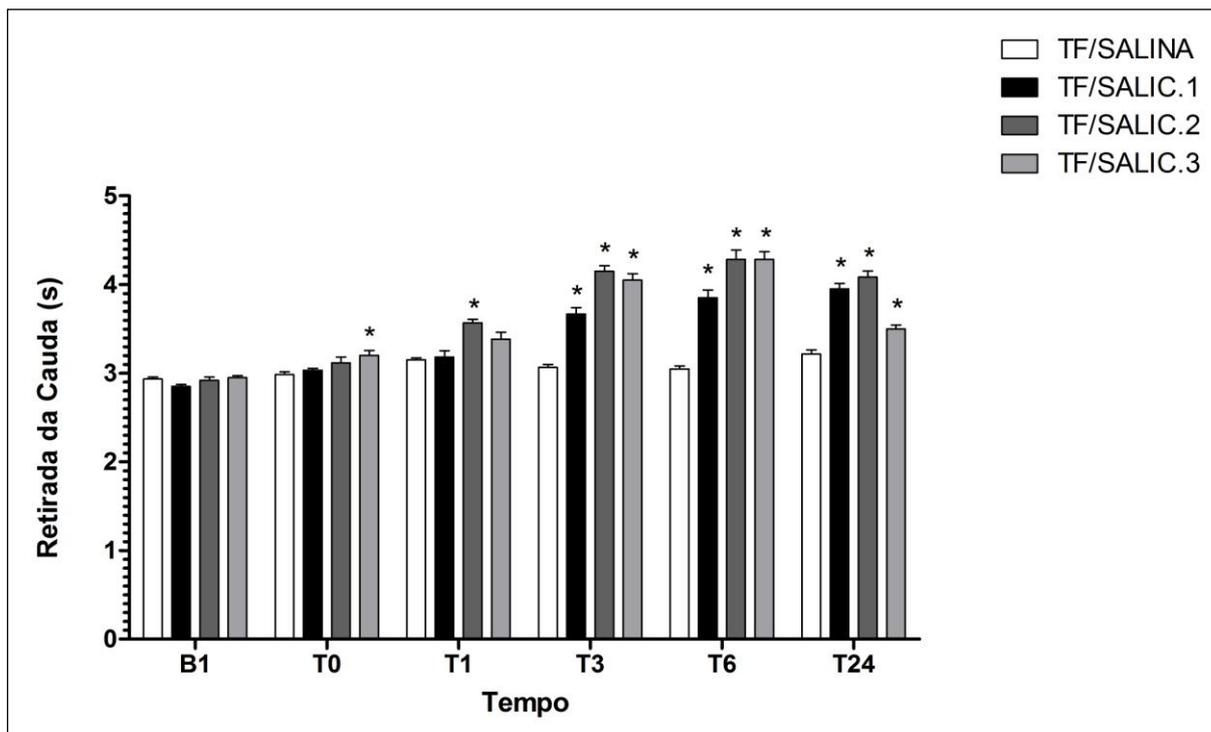


Gráfico 6- Limiar de latência(s), avaliado pelo teste de Retirada da Cauda, *Tail Flick*, no efeito do agonista para o receptor TRPA1, salicilato de metila (SALIC.), nas doses de 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL administrados no acuponto ST36, sobre a dor fásica. A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way ANOVA* seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{5,100} = 185,989$, $p < 0,001$), tratamento ($F_{3,20} = 101,243$, $p < 0,001$) e tratamento x tempo ($F_{15,100} = 22,279$, $p < 0,001$).

Nota: * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (TF/SALINA); #, em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo TF/SALINA.

Fonte: do autor.

O gráfico 7, representa o limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey digital, nos grupos que sofreram dor neuropática, e que receberam uma injeção de 20µL de salina (SAL), e capsaicina -agonista do receptor TRPV1- em três doses diferentes, 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL (CAPS1, CAPS2,CAPS3), através do ponto de acupuntura (ST36). A avaliação nociceptiva foi realizada antes da indução da dor neuropática, através da cirurgia de constrição do nervo isquiático-CCI- (B1), 72 horas após a execução desta técnica (B2), e após 0,1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24), da administração de capsaicina. O efeito analgésico foi

observado nos tempos T1, T3, T6 e T24 no grupo CCI/CAPS2 e nos tempos 3,6 e 24 horas após administração de capsaicina, no grupo CCI/CAPS3. No grupo controle (CCI/SAL), a dor se prolonga desde a avaliação inicial às 24 horas de tratamento.

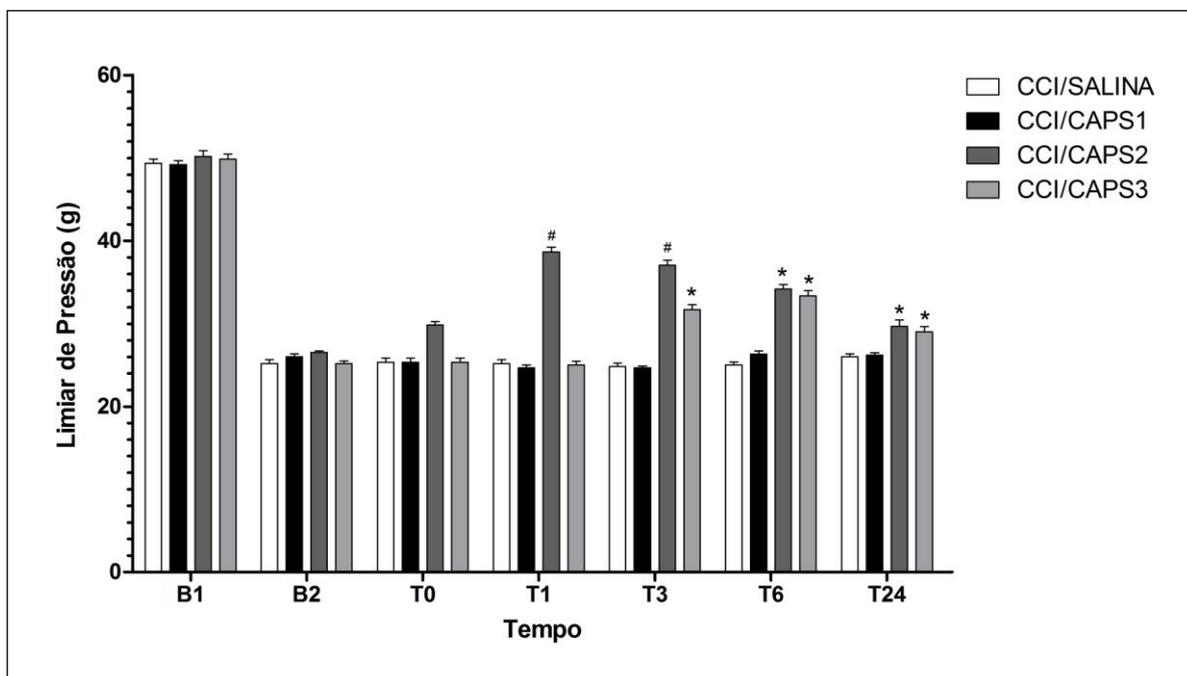


Gráfico 7- Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey digital no efeito do agonista para o receptor TRVP1, capsaicina (CAPS.), nas doses de 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL administrados no acuponto ST36, sobre a dor neuropática, produzida, após o modelo experimental *Chronic Constriction Injury* (CCI). A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way ANOVA* seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{6,120}=1398,450$, $p<0,001$), tratamento ($F_{3,20}=131,791$, $p<0,001$) e tratamento x tempo ($F_{18,120}=42,739$, $p<0,001$).

Nota* Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (CCI/SALINA); #, em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo CCI/SALINA.

Fonte: do autor.

Avaliamos, também, o limiar nociceptivo através do Von Frey digital, nos grupos que sofreram dor neuropática, com administração de 20µL de salina (SAL), e mentol -agonista do receptor TRPM8- em três doses diferentes, 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL (MENTOL 1, MENTOL 2, MENTOL 3), no acuponto ST36. O limiar doloroso foi realizado antes da indução da dor neuropática, através da cirurgia de constrição do nervo isquiático- CCI- (B1), 72 horas após a cirurgia, com efeito hiperalgésico (B2), e 0,1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24), após a administração de mentol no ponto de acupuntura (Gráfico 8). Os grupos CCI/MENTOL 1, CCI/MENTOL 2 e CCI/MENTOL 3 apresentaram efeito antinociceptivo nos tempos T1, T3 e T6, e somente os grupos CCI/MENTOL 1 e CCI/MENTOL 3 no tempo T0, sendo que nenhum grupo obteve efeito tardio, após 24 horas de administração de mentol. O grupo CCI/SALINA apresentou efeito hiperalgésico desde o tempo de avaliação B2 ao T24.

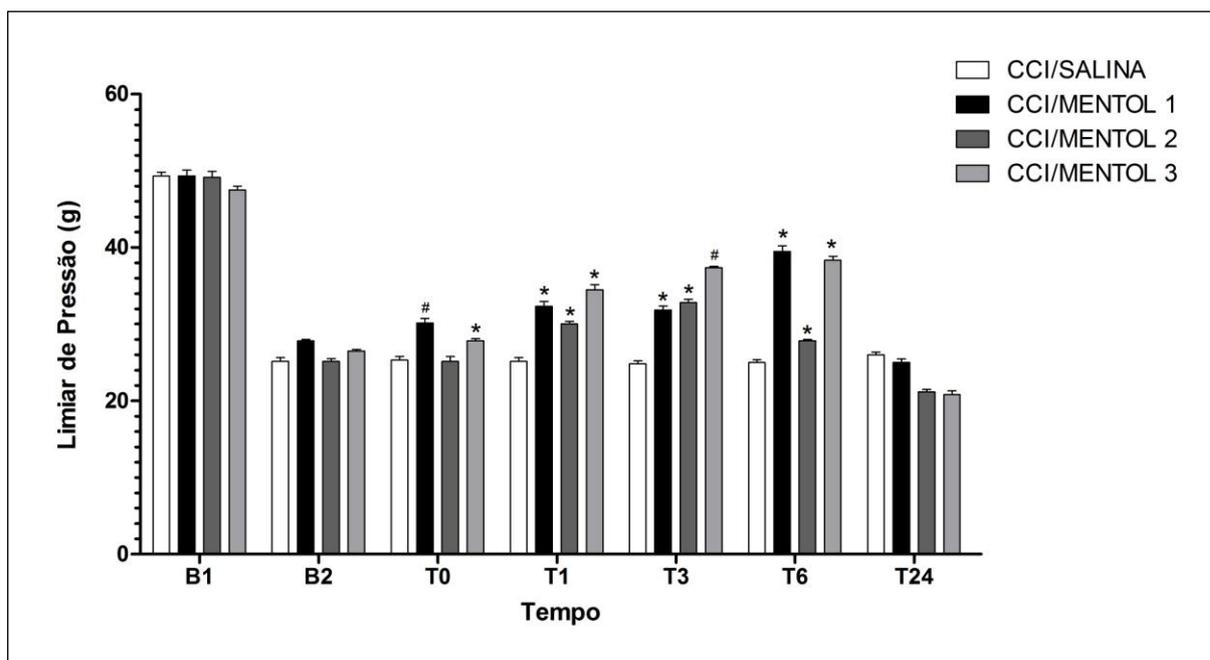


Gráfico 8- Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey digital no efeito do agonista para o receptor TRPM8, mentol (MENTOL), nas doses de 0,03 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ administrados no acuponto ST36, sobre a dor neuropática, produzida, após o modelo experimental *Chronic Constriction Injury* (CCI). A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way ANOVA* seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{6,120}=1399,587$, $p<0,001$), tratamento ($F_{3,20}=91,073$, $p<0,001$) e tratamento x tempo ($F_{18,120}=58,749$, $p<0,001$).

Nota: * Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (CCI/SALINA); #, em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo CCI/SALINA.

Fonte: do autor.

O gráfico 9 corresponde à avaliação nociceptiva, através do Von Frey Digital, no modelo de dor neuropática pela constrição do nervo isquiático (CCI), pela administração de 20 μL salina, e metil salicilato, agonista de TRPA1, no acuponto ST36, nas doses 0,03 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$; 0,3 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$; 3,0 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$. O limiar nociceptivo foi realizado antes da indução da dor neuropática, através da cirurgia de constrição do nervo isquiático- CCI- (B1), 72 horas após a cirurgia (B2), e 0,1, 3, 6 e 24 horas (T0, T1, T3, T6 e T24), após a administração de mentol no ponto de acupuntura.

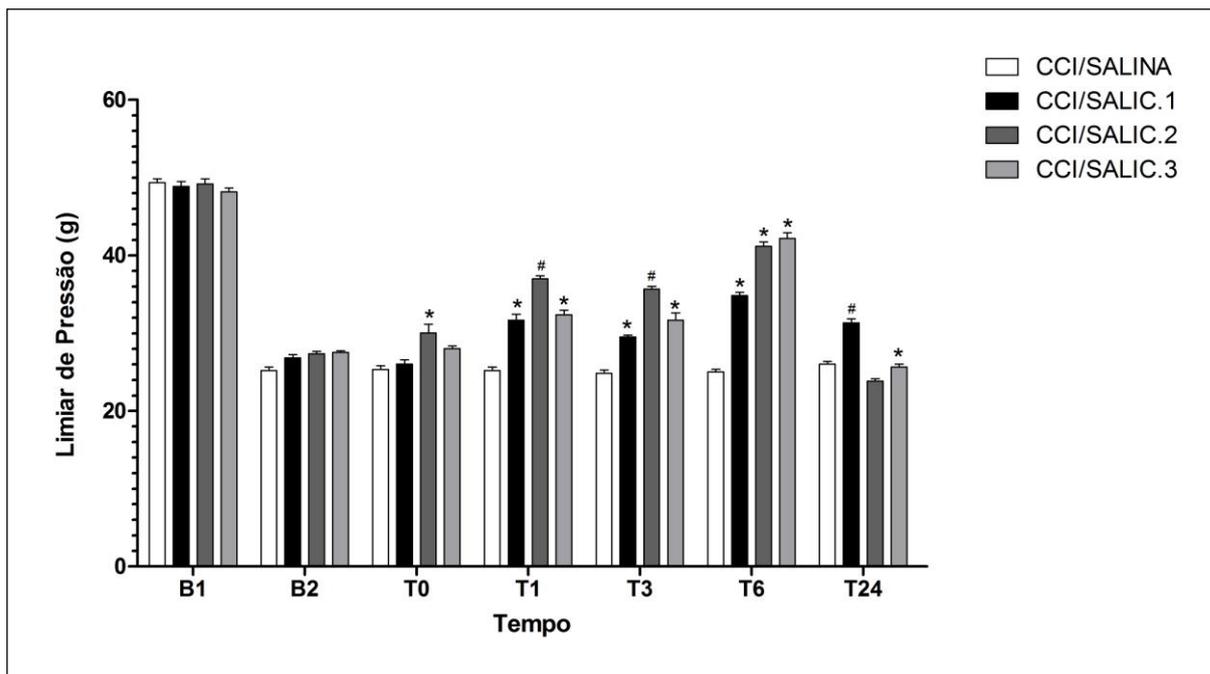


Gráfico 9- Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey digital no efeito do agonista para o receptor TRPA1, metil salicilato (SALIC), nas doses de 0,03 µg/20µL; 0,3 µg/20µL; 3,0 µg/20µL administrados no acuponto ST36, sobre a dor neuropática, produzida, após o modelo experimental *Chronic Constriction Injury* (CCI). A análise estatística foi realizada utilizando-se *one-way ANOVA* seguido de *Bonferroni post hoc tests*, com interação em relação ao tempo ($F_{6,120}= 953,547$, $p<0,001$), tratamento ($F_{3,20}= 116,209$, $p<0,001$) e tratamento x tempo ($F_{18,120}=45,654$, $p<0,001$).

Nota:* Denota uma diferença significativa em relação ao grupo controle (CCI/SALINA); #, em relação aos demais tratamentos utilizados, e ao grupo CCI/SALINA.

Fonte: do autor.

Assim, os grupos CCI/SALIC.1, CCI/SALIC.2 e CCI/SALIC.3 apresentaram efeito analgésico nos tempos T1, T3 e T6. Somente o grupo CCI/SALIC.2 resultou em efeito nociceptivo no tempo T0, e os grupos CCI/SALIC.1 e CCI/SALIC.3 tiveram efeito tardio às 24 horas, após administração de metil salicilato no acuponto. O grupo CCI/SALINA obteve efeito hiperalgésico desde B2 ao T24.

8 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho, até o momento, evidenciaram a caracterização de algumas vias do processo de transdução decorrentes da ativação dos receptores, TRPV1, TRPM8 e TRPA1. Desta forma, um dos principais achados foi que a administração, de agonistas destes receptores, capsaicina, mentol e metil salicilato, respectivamente, no acuponto Zusanli, induziram antinocicepção, nos modelos de dor inflamatória e dor fásica. Esta ideia é suportada por dados experimentais que confirmam a transdução nociceptiva destes receptores, por meio do influxo de cálcio, em diferentes tipos de dor, assim como sua dessensibilização, e consequente diminuição do quadro algico em altas concentrações destes agonistas (MCENTIRE et al., 2016). Estudos que corroboram com esta proposição evidenciam a sensibilização e aumento da expressão, de TRPV1, TRPM8 e TRPA1, na condição dolorosa, pela liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios (ALAWI; KEEBLE J, 2010; ANDERSEN et al., 2016; BAUTISTA et al., 2006). Entretanto, altas concentrações dos agonistas, capsaicina, mentol e metil salicilato, convertem o estado hiperalgésico, possibilitando analgesia persistente (ANAND; BLEY, 2011; BANDELL et al., 2004; GAUDIOSO et al., 2012). Portanto, utilizar estes agonistas para o controle da hiperalgesia, induzida pelo aumento da expressão de TRP's, parece uma abordagem relevante para a diminuição da condição dolorosa (MCENTIRE et al., 2016). Por isso, um dos principais achados deste trabalho demonstrou que a capsaicina, mentol e metil salicilato, causou o aumento do limiar nociceptivo, quando administrados no acuponto Zusanli, nos modelos de dor inflamatória e fásica.

A dor inflamatória é estabelecida pela liberação de mediadores inflamatórios após lesão tecidual como, bradicinina, prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que estimulam diretamente e causam a sensibilização de nociceptores de detecção de dor, com consequente estimulação central (JI et al., 2014). Como método de indução inflamatória, foi utilizado um modelo de dor inflamatória, amplamente usual, que consiste em uma administração intraplantar de 100µL de CFA, causando uma cascata inflamatória e hipersensibilidade local. Este modelo foi adotado por ser associado a um aumento da expressão dos TRP's, incluindo

TRPV1, TRPM8 e TRPA1, indicando a participação destes receptores na dor inflamatória, pela administração intraplantar deste componente em ratos (WANG et al., 2015). Outro estudo demonstrou que a administração subcutânea de CFA, em ratos, aumentou a expressão destes receptores e resultou em hiperalgesia inflamatória (LEVINE; HABER, 2007).

Neste contexto, resultados deste estudo mostraram que a administração de capsaicina, no modelo de dor inflamatória, resultou em analgesia, mediada pelo receptor TRPV1, através da dessensibilização deste receptor, assim como em estudos prévios onde os efeitos analgésicos da capsaicina, em tecidos inflamados, refletiam uma resposta maior sobre TRPV1 (SHIN et al., 2002; TOMINAGA et al., 1998). Sob estas condições, estudos que utilizaram o mesmo modelo, com administração de CFA em ratos machos e posterior administração de capsaicina intraplantar, obtiveram resultados com efeitos analgésicos semelhantes (BAAMONDE et al., 2005). Outro estudo, com 2 tipos de modelos experimentais, para dor inflamatória, demonstrou o efeito analgésico, mediante administração única de capsaicina (10 µg; i.pl.), em ratos, com duração de 6 dias, na dor inflamatória por carragenina, e 30 dias por CFA (MENÉNDEZ et al., 2004).

Embora a técnica de acupuntura Chinesa seja secular, e pode ser considerada uma manobra terapêutica com efeitos analgésicos sistêmicos (SONG et al., 2014), pouco se sabe sobre sua participação no tratamento de condições dolorosas, e possíveis vias sensoriais ativadas, com administração direta de drogas em pontos específicos, desta técnica. Um estudo evidenciou, em ratos, uma alta concentração de receptores sensoriais e suas fibras aferentes, em um acuponto localizado em um tecido muscular (LI et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo de TAO (1989), em que demonstrou esta alta expressão, em acupontos específicos, em coelhos. Dentre estes pontos, o acuponto Zusanli (ST36), pode ser utilizado frente à diminuição/ausência de respostas imunes, atenuação da resposta inflamatória, entre outras manifestações patológicas (SUO et al., 2010). Assim, pesquisas comprovaram a abundante expressão de canais neurais e não neurais, nos tecidos que o envolvem, seguido da replicação do efeito analgésico após a injeção de um agonista, destes canais, neste ponto (WU et al., 2014).

Goldman e colaboradores (2010) indicaram benefícios clínicos, pela administração direta (20µl) de um agonista do receptor de adenosina, no acuponto Zusanli, em um modelo de dor inflamatória (CFA) e neuropática (injúria do nervo ciático), constatando um efeito nociceptivo em ambos os modelos. WU e colaboradores (2014) demonstrou o efeito da administração da capsaicina no acuponto Zusanli, em um modelo de dor inflamatória, realizado em ratos, evidenciando a replicação do efeito analgésico. Em 2006, Kyo e Yu, demonstraram a eficácia de uma pasta de capsaicina, no acuponto ST36, no controle da dor pós-operatória, em humanos, comparada à administração de opioides, demonstrando a diminuição da exigência destes opioides, no pós-operatório, em virtude do uso da capsaicina. Além disso, nosso estudo obteve resultado significativo em relação à analgesia, obtida através da administração do agonista de TRPM8, mentol, no modelo de dor inflamatória.

Em busca de um termorreceptor, sensível à temperaturas inferiores, descobriram o TRPM8, presente em neurônios sensoriais e no gânglio da raiz dorsal (DRG), através da ligação de uma substância natural que causava frescor, o mentol (LEVINE; HABER; 2007). Apesar de seu mecanismo de ação ser desconhecido, este estudo evidenciou o efeito terapêutico do mentol. E outros estudos sugerem sua participação na inativação de canais de sódio voltagem dependentes (GAUDIOSO et al., 2012). Os autores realizaram um estudo experimental e investigaram os neurônios do gânglio da raiz dorsal, de ratos, com utilização de concentrações diferentes de mentol, e concluíram o potencial analgésico desta substância, através do bloqueio de um subtipo dos canais de sódio voltagem dependente, subsequente à ativação de TRPM8.

Além disso, o mentol pode ser um potente agente antiinflamatório, demonstrado pelo estudo de XUE e colaboradores (2015), pela utilização de L-Menthone, extraído da menta, onde observaram a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (interleucinas e fator de necrose tumoral). Neste mesmo contexto, um estudo demonstrou o papel do mentol, num modelo de dor inflamatória (CFA), através de um tratamento prévio por um antagonista de TRPM8, AMG2850, seguido por uma administração de mentol, onde houve inativação deste receptor nos terminais nervosos, fazendo com que a dor inflamatória persistisse (LEHTO et al., 2015). Em busca de estudos, sobre a administração de mentol no acuponto Zusanli,

não obtivemos resultados satisfatórios. Em um estudo, encontramos um efeito distinto na terapia de pontos de acupuntura, e consequente administração de medicamentos, incluindo o mentol, onde sua administração não resultou em um efeito antinociceptivo (ZHANG et al., 2006). Assim como TRPM8, analisamos outro receptor, da família dos TRP's, que parece exercer um papel importante na antinocicepção hiperalgésica, o TRPA1.

O Receptor de Potencial Transiente com domínios relacionados à anquirina (TRPA1), é um termorreceptor ativado por temperaturas inferiores, de 17° C, e que sua ativação pode ser convertida em sensações dolorosas, independente da qualidade do estímulo e de como ela será interpretada. Este receptor é ativado por diversas substâncias naturais, como isoticianatos (presente no óleo de mostarda), eugenol (presente no óleo de cravo), alicina (componente do alho), metil salicilato (presente no óleo de Gualtéria), dentre outras (BANDELL et al., 2004). Assim como este estudo, observamos um papel importante do agonista metil salicilato, no efeito analgésico, em diferentes condições dolorosas, através do TRPA1. Estudos adicionais ainda são necessários para elucidar este ponto, embora haja a participação de metil salicilato na antinocicepção inflamatória, como descreve WANG e colaboradores (2011), em um estudo de modelo inflamatório, em ratos, por CFA, carragenina e formalina. Estes autores utilizaram um tratamento com metil salicilato, após administração de um componente inflamatório, e concluíram um resultado positivo nas diferentes fases inflamatórias, evidenciando a participação na atividade analgésica.

Resultados semelhantes foram demonstrados em outro estudo, utilizando a carragenina e formalina como indutores inflamatórios, demonstrando a participação de uma pomada de metil salicilato no controle da dor inflamatória, onde observou o efeito antiinflamatório, dose-dependente, desta substância (CALVO,2006). Apesar de nenhum estudo evidenciar resultados terapêuticos, pela administração de metil salicilato no ST36, um estudo, apoiou a ideia da alta expressão de receptores TRPA1 no acuponto Zusanli, em um modelo de crise epilética, induzida em ratos, e estimulação deste acuponto, associado ao ST37, concluindo que a via de transdução por TRPA1 participa da reversão deste quadro, além de ser regulada positivamente, através de resultados pelo Western Blot (LIN; HSIEH, 2014). Outro tipo de modelo de dor foi testado neste estudo, através do *Tail-flick Test*, que avalia

o comportamento doloroso fásico (momentâneo), pela exposição a um estímulo térmico, medido entre a exposição ao calor radiante na cauda, até sua retirada evidente. Neste modelo, a antinocicepção é vista como um aumento na latência de retirada da cauda (D'Amour e Smith, 1941; modificado por Nance e Sawynok, 1987). Estes dados proporcionam suporte pré-clínico para a utilização de fármacos, ou suas combinações, para o tratamento da dor inflamatória/crônica (HERNÁNDEZ-DELGADILLO et al., 2003).

O *Tail-flick Test* (teste de retirada da cauda) é um ensaio, de latência térmica, que tem sido amplamente utilizado para avaliar o efeito antinociceptivo de vários fármacos, administrados sistemicamente. Este teste envolve tanto estruturas espinhais quanto supra espinhais, dependendo da intensidade da estimulação. Este estímulo térmico converte o reflexo de retirada da cauda, puramente espinhal, em uma reação mais complicada que envolve estruturas neurais altas (FOROUD; VESAL, 2015). O estudo mencionado avaliou o efeito antinociceptivo das drogas, meloxicam, tramadol, morfina e suas combinações, com injeção intraperitoneal, utilizando a avaliação do *Tail-flick Test* 45, 60, 75, 90 e 120 minutos após cada administração, concluindo que o tramadol, a morfina e sua combinação obtiveram resultados antinociceptivos, em ratos, diferentemente do meloxicam.

Assim como achados de nosso trabalho, com a diminuição da nocicepção, pela exposição ao estímulo térmico doloroso, através da administração de capsaicina, um estudo utilizou a capsaicina tópica, e um gel específico para dermatites, para avaliar o efeito destas drogas em patologias de pele, em humanos, e exibiram uma conclusão efetiva, determinando o efeito analgésico, avaliado por meio do *Tail-flick Test*, além da diminuição da irritação da pele por uma histopatologia (RAZA et al., 2014). Da mesma forma, ABDELHAMID e colaboradores (2014) avaliaram o efeito antinociceptivo frente a um estímulo térmico (*tail-flick*), pela administração intratecal de capsaicina e RTX (análogo ultra potente da capsaicina), evidenciando efeito analgésico da capsaicina 30 minutos após a injeção, e de 28 dias pela RTX, caracterizando a participação, e expressão positiva do TRPV1 neste modelo. Da mesma forma, o agonista de TRPM8, mentol, demonstrou características antinociceptivas em relação a este modelo de dor.

Nossos resultados confirmam aqueles descritos por GALEOTTI e colaboradores (2002), que utilizaram administração de mentol,

intracerebroventricular, para investigar seu efeito antinociceptivo, em um modelo denominado placa quente, similar ao *Tail-flick Test*, mas com estímulos térmicos na região plantar. Eles concluíram que o mentol aumentou o limiar de dor e que possui propriedades analgésicas, possivelmente pela inibição das correntes de cálcio. Outro estudo demonstrou o papel de mentol no efeito analgésico, em um modelo térmico, pelo teste da placa quente. Assim, eles observaram que a administração tópica de mentol na região plantar dos ratos aumentou a latência de retirada da pata, ou seja, a diminuição do estado doloroso, dose-dependente, frente ao estímulo térmico. Estes resultados são geralmente consistentes e suportam a teoria de que TRPM8 seria um alvo periférico de modulação da dor (KLEIN et al., 2010), além da supressão nociceptiva, por estímulo nocivo térmico (ALBIN et al., 2008; GREEN, 2005). Assim, conseguimos demonstrar a participação do agonista de TRPM8, mentol, no aumento do limiar doloroso, bem como metil salicilato, que obteve resultados satisfatórios também.

Embora, este estudo evidenciou o efeito analgésico de metil salicilato no modelo de dor fásica, não encontramos achados que corroborassem com estes resultados.

Além destes modelos - dor inflamatória e dor fásica - nós investigamos o efeito antinociceptivo dos agonistas de TRP no modelo "*Chronic Constriction Injury*" (CCI), que consiste em uma amarração do nervo ciático, em quatro pontos, para simular uma hérnia discal, com conseqüente efeito hiperalgésico, modelo que foi descrito por BENNET e XIE em 1988. A partir deste método doloroso, realizamos a administração de capsaicina, agonista de TRPV1, no acuponto ST36. Estes resultados, antinociceptivos, corroboram com o estudo de Zhang e colaboradores em 2014, que realizou uma administração intratecal de capsaicina, no modelo de constrição crônica do nervo ciático, que resultou em efeito antinociceptivo, mediante avaliação térmica e mecânica, o que não o categorizou como tardio, já que ao terceiro dia após a cirurgia, com repetido tratamento, este efeito não apareceu. Assim também, um estudo de SZIGETI et al., 2012, resultou em analgesia e diminuição de receptores TRPV1, através da administração perineural de capsaicina, frente a um modelo de dor neuropática, onde ocorreu secção do nervo ciático. Neste mesmo modelo, também realizamos uma injeção no ponto de acupuntura, Zusanli, porém com administração da substância mentol.

Assim, este estudo demonstrou a redução da hiperalgesia pós-cirúrgica, similarmente a um estudo de PATEL e colaboradores em 2014, que administrou mentol nas patas traseiras de animais por via tópica, em um modelo de dor neuropática, pela ligação de duas ramificações do nervo ciático, apresentando o mesmo efeito, somando-se com uma diminuição de TRPM8, comprovando sua participação. Em uma experimentação clínica, houve uma aplicação cutânea de mentol, em pacientes com dor neuropática, o que resultou em efeito analgésico em uma relação de 6/8. Portanto, acredita-se que o mentol, através de seu receptor TRPM8, é uma substância com propriedades analgésicas no modelo de dor neuropática. Dentre estas substâncias alvo, de TRP's, o metil salicilato apresentou efeito antinociceptivo no modelo de constrição do nervo ciático. Entretanto, não encontramos estudos que confirmassem esta hipótese, sugerindo dessa forma novos estudos.

8.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A quantidade de animais foram insuficientes para readequação do estudo, e inserção de novos grupos experimentais, assim como a técnica de CCI SHAM (sem amarraduras no nervo ciático), como grupo controle. Esta dificuldade encontrada no presente estudo se deve à perda de animais, variações de peso e pela não aprovação da liberação de animais pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais (CEUA). Outra dificuldade encontrada se deve a outros fatores, dentre eles quedas constantes de energia na UNIFAL-MG-MG, Campus II e por condições ambientais e sanitárias do Biotério Central.

9 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, podemos concluir que os receptores, TRPV1 (receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 1), TRPM8 (receptor de potencial transiente relacionado à melastatina) e TRPA1 (receptor de potencial transiente com domínios anquirina 1), participam ativamente do controle da nocicepção fásica, inflamatória e neuropática, através da administração de seus agonistas capsaicina, mentol e metil salicilato no acuponto ST36, induzindo analgesia.

REFERÊNCIAS

ABDELHAMID, R. E.; KOVACS, K. J.; HONDA, C. N.; NUNEZ, M. G.; LARSON, A. A. Resiniferatoxin (RTX) Causes a Uniquely Protracted Musculoskeletal Hyperalgesia in Mice by Activation of TRPV1 Receptors. **The Journal of Pain**, v. 14, p. 1629-1641, 2013.

ALAWI, K.; KEEBLE, J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 125, p 181–195, 2010.

ALBIN, K.C.; CARSTENS M.I.; CARSTENS, E. Modulation of oral heat and cold pain by irritant chemicals. **Chem Sens**, v. 33, p. 3–15, 2008.

ANAND, P.; BLEY, K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch, **British Journal of Anaesthesia**, v. 4, p 490–502, 2011.

ANDERSEN, H.H.; GAZERAN, P.; ARENDT-NIELSEN, L. High-concentration L-menthol exhibits counter-irritancy to neurogenic inflammation, thermal and mechanical hyperalgesia caused by TRPA1-agonist transcinamaldehyde. **Journal of Pain**, 2016.

ANDERSSON, D.A.; GENTRY, C.; ALENMYR, L.; KILLANDER, D.; LEWIS, S.E.; ANDERSSON, A.; BUCHER, B.; GALZI, J.L.; STERNER, O.; BEVAN. S.; HO"GESTA, T.T. E.D.; ZYGMUNT, P.M. TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Delta(9)- tetrahydrocannabinol. **Nat Commun** v. 2, p. 551, 2011.

ANDRADE, E.L. Caracterização farmacológica *in vitro* e *in vivo* de substâncias naturais como ativadoras do receptor TRPA1 em roedores. Florianópolis, 2006. 111 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)– Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

AZAMI, J.; LLEWELYN, M.B.; ROBERTS, M.H. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. **Pain**, v. 12, p. :229–246, 1982.

BAAMONDE, A.; LASTRA, A.; JUAREZ, L.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L. TRPV1 desensitisation and endogenous vanilloid involvement in the enhanced analgesia

induced by capsaicin in inflamed tissues, **Brain Research Bulletin**, v. 67, p 476–481, 2005.

BANDELL, M.; STORY, G.M.; HWANG, S.W.; VISWANATH, V.; EID, S.R.; PETRUS, M.J.; EARLEY, T.J.; PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, n. 849-857, 2004.

BARON, R.; BINDER, A.; How neuropathic is sciatica? The mixed pain concept. **Orthopade**, v. 33, p. 568-575, 2004.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BAUTISTA, D. M.; JORDT, S.E.; NIKAI, T.; TSURUDA, P. R.; READ, A. J.; POBLETE, J.; YAMOA, E. N.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents , **Cell** **124**, **1269–1282**, March 24, 2006.

BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; GLAZER, J. M.; TSURUDA, P. R.; BASBAUM, A. I.; STUCKY, C. L.; JORDT, S.E.; JULIUS, D., The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature**, v. 448, 2007.

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.

BOUCHER, T.J.; OKUSE, K.; BENNETT, D.L.; MUNSON, J.B.; WOOD, J.N.; MCMAHON, S.B. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. **Science**, v.6, n. 290, p. 124-127, 2000.

CALVO, M.I. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology** v. 107, p. 380–382, 2006.

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway Annu. **Rev. Neurosci**, v. 24, p. 487–517, 2001.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CHAPLAN, S.R. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v.53, p. 55-63, 1994.

CLAPHAM, D.E.; TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 426, p. 517-524, 2003.

CLIFF, M.A.; GREEN, B.G. Sensory irritation and coolness produced by menthol: evidence for selective desensitization of irritation. **Physiol Behav** , v. 56, p. 1021–9, 1994.

COSTIGAN M.; SCHOLZ J.; WOOLF J.C. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Rev Neurosci**, n.32, p. 1–32, 2009.

CUNHA, T.M.; VERRI, J.R.; POOLE, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. **Immune and Glial Regulation of Pain**, p. 67–83, 2007.
D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 72, p. 74-79, 1941.

DEVOR, M.; Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **J Pain**, v. 7, p. 3-12, 2006.

DWORKIN, R. H. et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 85, p. S3–S14, 2010.

FARGHALY, H.S.M., MAHMOUD, A.M., ABDEL-SATER, K.A. Effect of dexmedetomidine and cold stress in a rat model of neuropathic pain: Role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . **European Journal of Pharmacology**, 2016.

FEIN, A. **Nociceptores**: As células que sentem dor. Dor On Line, 2011. Disponível em: < <http://www.dol.inf.br/nociceptores>>. Acesso em: 16 dez 2015.

FERREIRA, S.H. et al. Dor Inflamatória. In Dor - Princípio e prática. **São Paulo: Artmed**, 2009.

FOROUD, M.; VESAL, N. Evaluation of the anti-nociceptive effects of morphine, tramadol, meloxicam and their combinations using the tail-flick test in rats **Veterinary Research Forum**. v. 6 (4), p. 313 – 318, 2015.

GALEOTTI, N.; MANNELL, L. D. C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDIN, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v. 322, p. 145–148, 2002.
GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BAGHIROLI, L.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of (+)- and (–)-menthol. **Planta Med**, v. 67, p. 174–6, 2001.

GARRY, E.M.; JONES, E.; FLEETWOOD-WALKER, S.M. Nociception in vertebrates: key receptor participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals. **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 2, p. 216-224, 2004.

GAUDIOSO, C.; HAO, J.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; GABRIAC, M.; DELMAS, P. Menthol pain relief through cumulative inactivation of voltage-gated sodium channels, **Pain**, v. 153, p 473–484, 2012.

GOLDMAN, N.; CHEN, M.; FUJITA, T.; XU, Q.; PENG, W.; LIU, W.; JENSEN, T.K.; PEI, Y.; WANG, F.; HAN, X.; CHEN, J.F.; SCHNERMANN, J.; TAKANO, T.; BEKAR, L.; TIEU, K.; NEDERGAARD, M. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**. v. 13, p. 883–888, 2010.

GREEN, B.G. Lingual heat and cold sensitivity following exposure to capsaicin or menthol. **Chem Senses**, v. 30, p. 201–202, 2005.

HAESELER, G.; MAUE, D.; GROSSKREUTZ, J.; BUFLER, J.; NENTWIG, B.; PIEPENBROCK, S.; DENGLER, R.; LEUWER, M. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. **Eur J Anaesthesiol**, v. 19, p. 571–9, 2002.

HARGREAVES, K. M.; RUPAREL, S. Role of Oxidized Lipids and TRP Channels in Orofacial Pain and Inflammation. **Journal of Dental Research**, 2016.

HARTZELL, C.A.; JANKOWSKA, K.I.; BURKHARDT, J.K.; LEWIS, R.S. Calcium influx through CRAC channels controls actin organization and dynamics at the immunosynapse. **Elife**, 2016.

HERGENHAHN, M.; ADOLF, W.; HECKER, E. Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*. **Tetrahedron Lett**, v. 19, p. 1595-1598, 1975.

HERNÁNDEZ-DELGADILLO, G. P.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J.; SALAZAR, L. A.; CRUZ, S. L. Morphine and dipyrone co-administration delays tolerance development and potentiates antinociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 469, p. 71–79, 2003.

HU, H.H.; TANG, L.X.; LI, X.M. Experimental research of effect of crude and processed *Herba siegesbeckiae* on anti-inflammation and anti-rheumatism. **China Journal of Chinese Materia Medica** v. 29, p. 542–545, 2004.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A. Desensitization of sensory nerve endings (in Hungarian). **Kiserletes Orvostudomány**, v. 2, p. 15, 1949.

JAQUEMAR, D.; SCHENKER, T.; TRUEB, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 7325-7333, 1999.

JI, R.R.; XU, Z.Z.; GAO, Y.J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain **Nat Rev Drug Discov**, v. 13(7), p 533–548, 2014.

JORDT, S.E.; BAUTISTA, D.M.; CHUANG, H.H.; MCKEMY, D.D.; ZYGMUNT, P.M.; HOGESTATT, E.D.; MENG, I.D.; JULIUS, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, v. 427, p. 260- 265, 2004.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception, **Nature**, v. 413, 2001.

KALSO, E. et al. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 372–380, 2004.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Principles of Neural Science, **McGraw-Hill Medical**, 4th edition, 2000.

KOBAYASHI, K.; FUKUOKA, T.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; DAI, Y.; TOKUNAGA, A.; NOGUCHI, K. Distinct Expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in Rat Primary Afferent Neurons with A_δ/C-Fibers and Colocalization with Trk Receptors, **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 493, p. 596–606, 2005.

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

KLEIN, A. H.; SAWYER, C. M.; CARSTENS, M. I.; TSAGARELI, M.; TSIKLAUR, N. I.; CARSTENS, E. Topical application of l-menthol induces heat analgesia, mechanical allodynia, and a biphasic effect on cold sensitivity in rats **Behav. Brain Res.** V. 212(2), p. 179–186, 2010.

KYO, S. K.; YU, M. N. The Analgesic Effects of Capsicum Plaster at the Zusanli Point After Abdominal Hysterectomy. **Anesth Analg**, v. 103, p 709 –13, 2006.

LANGEVIN, H. M., CHURCHILL, D. L., CIPOLLA M. J. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. **The FASEB Journal**, v. 15, p. 2276-2282, 2001.

LEE, J.S.; HAN, J.S.; LEE, K.; BANG, J.; LEE, H. The peripheral and central mechanisms underlying itch **BMB Rep.**, 2016.

LEHTO, S. G.; WEYER, A. D.; ZHANG, M.; YOUNGBLOOD, B. D.; WANG, J.; WANG, W.; KERSTEIN, P. C.; DAVIS, C.; WILD, K. D.; STUCKY, C. L.; GAVVA, N. R. AMG2850, a potent and selective TRPM8 antagonist, is not effective in rat models of inflammatory mechanical hypersensitivity and neuropathic tactile allodynia. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 388, p. 465–476, 2015.

LEVINE, J. D.; HABER, N. A. TRP channels: Targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 989–1003, 2007.

LI, A. H.; J. ZHANG, M.; XIE, Y. K. "Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin-nerve complexes with enriched nerve endings," **BrainResearch**, v. 1012, p. 154–159, 2004.

LIN, Y.W.; HSIEH, C.L. Auricular Electroacupuncture Reduced Inflammation-Related Epilepsy Accompanied by Altered TRPA1, pPKC α , pPKC ϵ , and pERk1/2 Signaling Pathways in Kainic Acid-Treated Rats. **Mediators of Inflammation**, 2014.

LIU, C.N.; RABER, P.; ZIV-SEFER, S.; DEVOR, M.; Hyperexcitability in sensory neurons of rats selected for high versus low neuropathic pain phenotype. **Neuroscience**, v. 105, p. 265-75, 2001.

LIU, H.; MANTYH, P.W.; BASBAUM, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, v.386, p, 721-724, 1997.

MACPHERSON, L.; GEIERSTANGER, B.H.; VISWANATH, V., BANDELL, M.; EID, S.R.; PATAPOUTIAN, A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Curr. Biol**, v. 15, p. 929-934, 2005.

MCENTIRE, D. M.; KIRKPATRICK, D. R.; DUECK, N. P.; KERFELD, M. J.; SMITH, T. A.; NELSON, T. J.; REISBIG, M. D.; AGRAWAL, D. K. Pain transduction: a pharmacologic perspective. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, 2016.

MCKEMY, D.D.; NEUHAUSSER, W.M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor MELZACK R., WALL, P. D. Acupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation. **Postgraduate Medical Journal**, v. 60, p. 893-896, 1984.

MENÉNDEZ, L.; LASTRA, A.; HIDALGO, A.; BAAMONDE, A. The analgesic effect induced by capsaicin is enhanced in inflammatory states, **Life Sciences**, v. 74, p 3235–3244, 2004.

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

MINKE, B.; COOK, B. TRP Channel Proteins and Signal Transduction. **Physiol Rev**, v. 82, p. 429–472, 2002.

MONTELL, C.; Thermosensation: hot findings make TRPNs very cold. **Curr. Biol.** v. 13, p. 476-478, 2003.

NANCE, P.W.; SAWYNOK, J. Substance P-induced long-term blockade of spinal adrenergic analgesia: reversal by morphine and naloxone **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 240, p. 972–977, 1987.

NEUBERT, J.K.; KARAI, L.; JUN, J.H.; KIM, H.S.; OLAH, Z.; IADAROLA, M.J. Peripherally induced resiniferatoxin analgesia, **Pain** v. 104, p. 219–228, 2003.

NILIUS, B.; OWSIANIK, G.; VOETS, T.; PETERS, J.A. Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. **Physiol Rev.** v. 87, p. 165–217, 2007.

ONOFRE, A.N, COSTA, C.M, SIQUEIRA, J.T, TEIXEIRA, M.J. Dor princípios e práticas. **Artmed**, p. 764-778, 2009.

PATEL, R.; GONÇALVES, L.; LEVERIDGE, M.; MACK, S. R.; HENDRICK, A., BRICE N.L.; DICKENSON, A. H. Anti-hyperalgesic effects of a novel TRPM8 agonist in neuropathic rats: a comparison with topical menthol, **Pain**, v. 155, p. 2097-107, 2014.

PAULSEN, C. E. , ARMACHE, J.P. , GAO, Y. , CHENG, Y, JULIUS, D. **Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms**, *Nature*, v. 520, p. 511-517, 2015.

PEIER, A.M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A.C.; REEVE, A.J.; ANDERSSON, D.A.; STORY, G.M.; EARLEY, T.J.; DRAGONI, I.; MCINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v. 108, p. 705-715, 2002.

- PLANELLAS-CASES, R.; GARCIA-SANZ, N.; MORENILLA-PALOA, C.; FERRER-MONTIEL, A. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. **Pflügers Arch**, v. 451, p. 151-159, 2005.
- POLETINI, M. O.; MORAES, M. N.; RAMOS, B. C.; JERONIMO, R.; CASTRUCCI, A. M. L. TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. **Temperature**, v. 2:4, p. 522—534, 2015.
- RAZA, K.; SHAREEF, M. A.; SINGAL, P.; SHARMA, G.; NEGI, P.; KATARE, O. P. Lipid-based capsaicin-loaded nano-colloidal biocompatible topical carriers with enhanced analgesic potential and decreased dermal irritation. **J Liposome Res**, v. 24(4), p. 290–296, 2014.
- RICHNER, M.; BJERRUM O.J.; NYKJAER, A.; VAEGTER, C.B. The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice. **J Vis Exp** v. 18, 2011.
- ROGER, C.; HARDIE, B. M.; The frp Gene Is Essential for a Light-Activated Ca²⁺ Channel in Drosophila Photoreceptors. **Neuron**, v. 8, p. 643-651, 1992.
- SCADDING, J.W. 1980. The permanent anatomical effects of neonatal capsaicin on somatosensory nerves. **J. Anat.** V. 131, n. 3, p. 473-484, 1980.
- SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y.; A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, p. 205-218, 1999.
- SHIN, J.; CHO, H.; HWANG, S.W.; JUNG, J.; SHIN, C.Y.; LEE, S.Y.; KIM, S.H.; LEE, M.G.; CHOI, Y.H.; KIM, J.; HABER, N.A.; REICHLING, D.B.; KHASAR, S.; LEVINE, J.D.; OH, U. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99 (15), p 10150–10155, 2002.
- SILVA, M. L.; SILVA, J. R.T.; PRADO, W. A. The antinociceptive effect of electroacupuncture at different depths of acupoints and under the needling surface. **Chinese Medicine**, v. 7(3), 2012.
- SILVA, M.L.; SILVA, J.R.; PRADO, W.A. (b) The antinociceptive effect of electroacupuncture at, or formalin injection into different depths in the rat tail flick test: a new perspective for the acupoint. **Chinese Medicine**, in press, 2011.
- SILVA, M.L.; SILVA, J.R.T.; PRADO, W. A. The antinociceptive effect of electroacupuncture at different depths of acupoints and under the needling surface. **Chinese Medicine**. v. 7, n. 3, 2012.
- SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: Peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett**, v.6, p.184-7, 2004.
- SONG, Q.; HU, S.; WANG, H.; LV, Y.; SHI, X.; SHENG, Z.; SHENG, W. Electroacupuncture at Zusanli point (st36) attenuates pro-inflammatory cytokine

release and organ dysfunction by activating cholinergic anti-inflammatory pathway in rat with endotoxin challenge. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 11(2), p 469-474, 2014.

STORY, G.M.; PEIER, A.M.; REEVE, A.J.; EID, S.R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T.R.; EARLEY, T.J.; HERGARDEN, A.C.; ANDERSSON, D.A.; HWANG, S.W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112, p. 819-829, 2003.

SUO, X.Y.; DU, Z.H., WANG, H.S.; LI, J.G.; WANG, Y.L.; YAO, S.D.; CHEN, W.M. The effects of stimulation at acupoint ST36 points against hemorrhagic shock in dogs. **Am J Emerg Med**, v. 29, p 1188-1193, 2010.

SWANDULLA, D.; CARBONE, E.; SCHÄFER, K.; LUX, H.D. Effect of menthol on two types of Ca currents in cultured sensory neurons of vertebrates. **Pflugers Arch**, v. 409, p. 52–9, 1987.

SWANDULLA, D.; SCHÄFER, K.; LUX, H.D. Calcium channel current inactivation is selectively modulated by menthol. **Neurosci lett**, v. 68, p. 23–8, 1986.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. **Neuroscience**, v. 30, p. 515-520, 1989.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent TAO, Z. L. The progress of themorphological research on the acupoint, **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 14, p. 397–402, 1989.

SZIGETI, C.; SÁNTHA, P.; KÖRTVÉLY, E.; NYÁRT, I.; HORVÁTH V. J.; DEÁK É.; DUX M.; GULYA K.; JANCSÓ G. Disparate changes in the expression of transient Receptor potential vanilloid type 1 receptor mRNA and Protein in dorsal root ganglion neurons following Local capsaicin treatment of the sciatic nerve in the Rat, **Neuroscience**, v.201, p. 320–330, 2012.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D.; The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21 (3), p 531–543, 1998.

TORRES, L.; DUNLOP, D. D.; PETERFY, C.; GUERMAZI, A.; PRASAD, P. The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, p. 1033–40. 2006.

TRACEY, D.J.; WALKER, J.S.; Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflamm Res**, v. 44, p. 407-411, 1995.

WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A.; Kinins and kinin receptors in the nervous system, **Neurochem Int**, v. 26, p. 1-16, 1995.

WALL, P.D.; GUTNICK, M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. **Exp Neurol**, v. 43(3), p. 580-93, 1974.

WALL, P.D.; MELZACK, R. Textbook of pain. **Churchill Livingstone**, v. 41, n. 1, p. 122-123, 1990.

WANG, C.; LIU, C.; WAN, H.; WANG, D.; SUN, D.; XU, T.; YANG, Y.; QU, Y.; XU, Y.; JING, X.; LIU, J.; CHEN, S.; LIU, Z.; LIN, N. Wu-Tou Decoction Inhibits Chronic Inflammatory Pain in Mice: Participation of TRPV1 and TRPA1 Ion Channels, **BioMed Research International**, 2015.

WANG, J.P.; ZHOU, Y.M.; YE, Y.J.; SHANG, X.M.; CAI, Y.L.; XIONG, C.M.; WU, Y.X.; XU, H.X. Topical anti-inflammatory and analgesic activity of kirenol isolated from *Siegesbeckia orientalis*. **J Ethnopharmacol**, v. 137(3), p. 1089-94, 2011.

WOLKERSTORFER, A.; HANDLER, N.; BUSCHMANN, H. New approaches to treating pain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 1103–1119, 2016.

WU, S.Y., CHEN, W.H., HSIEH, C.L.; LIN, Y.W. Abundant expression and functional participation of TRPV1 at Zusanli acupoint (ST36) in mice: mechanosensitive TRPV1 as an “acupuncture-responding channel” **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 96, 2014.

XUE, J.; LI, H.; DENG, X.; MA, Z.; FU, Q.; MA, S. L-Menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 134, p. 42–48, 2015.

ZHANG, J.; WU, Q.; LIN, D.; CHEN, C.J.; HUANG, D.E. The role of four natures of medicine in acupoint sticking therapy. **Zhongguo Zhen Jiu**, v. 26(1), p. 72-4, 2006.

ZHANG, K.; RAMAMURTHY, S. ; PRIHODA, T. J.; ECKMANN, M. S. Effect of delayed intrathecal administration of capsaicin on neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats, **Journal of Pain Research**, v. 7, p. 547–554, 2014

ZHANG, Z.J.; MINWANG, X.; MCALONAN, G. M. Neural Acupuncture Unit: A New Concept for Interpreting Effects and Mechanisms of Acupuncture, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

ZHOU, F.; HUANG, D.; XIA, Y. Neuroanatomical basis of acupuncture points, **Acupuncture Therapy for Neurological Diseases: A Neurobiological View**, v. 2, p. 32–80, 2010.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p. 109-110, 1983.

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 632/2015, sob responsabilidade de Marcelo Lourenço da Silva, referente ao projeto “Participação dos receptores de potencial transiente no efeito antinociceptivo da acupuntura nos modelos de dor fásica, inflamatória e neuropática”, está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UNIFAL).

Alfenas, 04 de maio de 2015.

Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira
Presidente CEUA/UNIFAL