



**UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS  
FACULDADE DE MEDICINA**

**DELANE VIANA GONDIM**

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA  
ELETROACUPUNTURA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN NA  
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS: PARTICIPAÇÃO DO  
SISTEMA ENDOCANABINÓIDE**

**FORTALEZA**

**2012**

**DELANE VIANA GONDIM**

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA  
ELETROACUPUNTURA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN NA  
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS: PARTICIPAÇÃO DO  
SISTEMA ENDOCANABINÓIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção parcial do título de Doutora em Ciências Médicas

Orientador(a): Profa. Dra. Mariana Lima Vale

**FORTALEZA**

**2012**

**DELANE VIANA GONDIM**

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA  
ELETROACUPUNTURA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN NA  
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS: PARTICIPAÇÃO DO  
SISTEMA ENDOCANABINÓIDE**

**29 de Fevereiro de 2012**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Mariana Lima Vale- UFC**

---

**Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito- UFC**

---

**Profa. Dra Aline Alice Cavalcante de Albuquerque- UECE**

---

**Profa. Dra. Maria Carméli Correia Sampaio- UFPB**

---

**Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio- UFPB**

*Aos meus amados filhos, Marcinho e Damille, fonte de luz, alegria, incentivo. Vocês sempre foram a razão de tudo, pois por vocês não desanimei, por vocês me fortaleci. Vocês são dádivas de Deus na minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais: Clóvis e Nazaré (em memória), pelos exemplos passados, pelo estímulo, amor e confiança. Suas palavras sempre estão presentes em cada momento mais árduo, cada fase mais difícil e a cada conquista agradeço a Deus por vocês.

A minha orientadora, Profa. Mariana Lima Vale, pela presença constante em cada etapa desse árduo caminho, pela sua incansável dedicação a pesquisa, pelo seu incentivo e confiança.

À Profa. Gerly Anne de Castro Brito, exemplo de competência e seriedade, pela maneira simples de ser e lidar com a causa acadêmica; pelo sorriso acolhedor e pelas suas orientações.

Aos Professores: Carméli Sampaio, Fábio Sampaio e Aline Cavalcante pelas preciosas contribuições que serão dadas a esse trabalho.

A minha querida irmã, Raquel, presença constante em minha vida, exemplo de determinação e dedicação ao ensino.

Aos meus familiares, em especial: Márcio, Damille, à minha prima-irmã Vaninha e à amada Tia Mazé.

Ao Prof. Armênio Aguiar dos Santos, pela confiança e solicitude.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Alexandre Havt e Josiane Quetz pelo carinho em que fui recebida e pelas preciosas contribuições no desenvolvimento desse trabalho.

A Universidade Federal do Ceará por viabilizar a conclusão desse importante momento.

Aos meus colegas do curso de Odontologia da UFC- *Campus* Sobral pela convivência sempre agradável, pela confiança, respeito e compromisso.

Ao meu mestre, Dr. Agamenon Honório, pelos conhecimentos transmitidos na arte de inserir agulhas e de viver o *Tao*.

Ao meu querido professor, Dr. Marcos Aurélio Rabelo Lima Verde, suas palavras de incentivo sempre permeiam minha vida.

Aos meus amigos do curso de Acupuntura: Érika, Adriana, Lindalva Rabelo, Lindalva Martins, Jorge, Marcos, Cristiana, Valéria, Lélia, Tathiane, em especial a Larissa, companheira de luta no reconhecimento da acupuntura na Odontologia.

Aos meus colegas do laboratório pela convivência agradável, em especial a Isabel, Ana Paula, André Cavalcante e Ricardo.

Às minhas queridas companheiras de pesquisa: Suellen, Jéssyca e Joana Araújo, sem a dedicação de vocês, essa jornada teria sido bem mais árdua.

Aos queridos funcionários, Vandinha, Haroldo, Socorro, Ivone e Rita pela simpatia, solicitude e gentileza.

Aos grandes amigos e irmãos que Deus nos oferece nessa doce aventura que é viver: Heloísa, Davidson Nunes, Renata Adele, Érika, Karuza, Hellíada, Karine, Zarlanya, Alexandre.

Ao meu bem, André, presença fundamental no desenvolvimento e na conclusão dessa etapa. Sua alegria, carinho, incentivo e compreensão foram essenciais para que esse momento fosse concluído com serenidade.

À FUNCAP e CAPES, pelos recursos financeiros disponibilizados, tornando possível a execução deste trabalho.

## RESUMO

Eletroacupuntura (EACP) e o sistema endocanabinóide apresentam efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos experimentais de dor inflamatória. Nosso estudo investigou esses efeitos na artrite aguda induzida por zymosan na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. Foram injetados na ATM de ratos Wistar machos, salina ou zymosan (grupo controle; 2 mg) . EACP de baixa frequência (10 Hz, 30 min) foi realizada nos acupontos (IG4, IG11, E36, E44) ou em pontos *sham* 2 h após ou 1 h antes da administração do zymosan. Antagonistas dos receptores canabinóides CB1 e CB2, respectivamente, AM251 and AM630 (3mg/kg, i.p.) foram administrados previamente ao tratamento com EACP. Hipernocicepção mecânica foi medida através do método de *Von Frey* eletrônico após administração do zymosan. Ratos foram sacrificados 6 h após a indução da artrite e a articulação foi removida para análise histopatológica, verificação da atividade da mieloperoxidase, observação da permeabilidade vascular e análise imunohistoquímica para TNF $\alpha$ , COX-2 e NOSi. Expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 de tecido nervoso da região do trato espinhal do trigêmeo foi realizada após o sacrifício dos animais com artrite na ATM nos tempos de 6 h e 24 h após a injeção do zymosan. Os resultados mostraram que a EACP inibiu a hipernocicepção induzida pelo zymosan comparado aos grupos sham e EACP ( $p < 0,05$ ). AM251 reverteu significativamente o efeito antinociceptivo da EACP, sugerindo que o receptor CB1 está envolvido nesse efeito. EACP inibiu parâmetros inflamatórios como migração neutrofílica, permeabilidade vascular, e imunoexpressão de TNF $\alpha$ , COX-2 e NOSi na ATM comparada ao grupo *sham* ( $p < 0,05$ ). A análise histopatológica mostrou que os animais tratados com EACP reduziu significativamente edema e infiltração periarticular ( $p < 0,05$ ) comparados aos grupos controle e *sham*. Na avaliação dos parâmetros inflamatórios com o uso dos antagonistas canabinóides, verificamos que AM630 reverte o efeito anti-inflamatório do EACP. A expressão gênica do receptor CB1 e CB2 na 6ª hora após a indução da artrite, mostrou *up-regulation* no grupo de animais tratados com EACP. Na 24ª hora, foi observado *down-regulation* da expressão gênica do receptor CB2 quando comparado a 6ª hora, enquanto para o receptor CB1, foi observada maior expressão gênica em relação a 6ª hora. EACP nos acupontos IG4, IG11, E36 e E44 produziu efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório na artrite induzida pelo zymosan na ATM de ratos. Estes efeitos parecem ser mediados pelo sistema canabinóide através da ativação dos receptores CB1 e CB2. Com base em nossos resultados, sugerimos que EACP pode ser utilizada no tratamento das artropatias inflamatórias da ATM.

Palavras-chave: Eletroacupuntura, nocicepção, inflamação, zymosan, ATM e sistema endocanabinóide

## ABSTRACT

Electroacupuncture (EA) and cannabinoids have been reported to have anti-inflammatory and antinociceptive effects in experimental models of inflammatory pain. The present study investigated these effects on zymosan-induced acute arthritis of the rat temporomandibular joint (TMJ). Male Wistar rats were injected with saline or zymosan (control group; 2 mg) into the TMJ. Low frequency EACP (10 Hz, 30 min) was performed at acupoints (LI4, LI11, ST36, ST44) or sham points 2 h after or 1 h before zymosan administration. CB1 and CB2 cannabinoid receptor antagonists, respectively, AM251 and AM630 (3mg/kg, i.p.) were administered before EA treatment. Mechanical hypernociception was accessed by the electronic *Von Frey* method after zymosan administration. Rats were sacrificed 6 h after zymosan administration and the joint was removed for histopathological analysis, myeloperoxidase activity assessment, vascular permeability observations and immunohistochemical analysis to TNF $\alpha$ , COX-2 and iNOS. Gene expression of CB1 and CB2 receptors of nervous tissue in the region of the spinal trigeminal tract was performed after sacrifice of the TMJ arthritic animals in the times of 6<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hour after zymosan injection. The results showed that EA inhibited zymosan -induced hypernociception compared with the control group and with the *sham* group ( $p < 0.05$ ). AM251 significantly reversed the antinociceptive effect of EACP, suggesting that the CB1 receptor is involved in this effect. The results showed that EACP inhibited inflammatory parameters such as neutrophil migration, vascular permeability and TNF- $\alpha$ , COX-2 and NOSi expression in the TMJ compared with the sham group ( $p < 0.05$ ). The inflammatory parameters assessment with the cannabinoids antagonists, we found that AM630 reverses the anti-inflammatory effect of EACP. The CB1 and CB2 gene expression in 6<sup>th</sup> hour after zymosan-induced arthritis, showed up-regulation in the animal group treated with EACP. In the 24<sup>th</sup> hour, it was observed down- regulation of CB2 gene expression at EACP group when compared to 6<sup>th</sup> hour, while for the CB1 receptor, it was observed a higher gene expression in relation to 6<sup>th</sup> hour. EACP in the acupoints, LI4, LI11, ST36 and ST44 produced antinociceptive and anti-inflammatory effects in the arthritis induced by zymosan in the TMJ rats. These effects appear to be mediated through CB1 and CB2 cannabinoid receptors activation. Based in our results, we suggest that EACP can be used in TMJ inflammatory arthropathy treatment.

Keywords: Electroacupuncture, nociception, inflammation, zymosan, TMJ and endocannabinoid system



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURAS</b>	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1. Articulação Temporomandibular- Superfícies articulares e disco articular</b>	23
<b>Figura 2. Complexo Trigeminal</b>	28
<b>Figura 3. Protocolo experimental para administração dos antagonistas AM251 e AM630</b>	55
<b>Figura 4. Avaliação do efeito antinociceptivo da EACP na artrite induzida pelo zymosan na ATM de ratos</b>	65
<b>Figura 5. Avaliação do efeito antinociceptivo da EACP antes e após a indução da artrite pelo zymosan na ATM de ratos</b>	66
<b>Figura 6. Efeito da EACP sobre a migração celular no líquido sinovial da ATM após indução da artrite pelo zymosan</b>	68
<b>Figura 7. Efeito da EACP sobre a permeabilidade vascular na ATM de ratos após a indução da artrite pelo zymosan</b>	70
<b>Figura 8. Fotomicrografias da análise histopatológica da ATM e do tecido periarticular no pós-tratamento com EACP</b>	72
<b>Figura 9 Fotomicrografias da análise histopatológica da ATM e do tecido periarticular no pré-tratamento com EACP</b>	74
<b>Figura 10. Fotomicrografias da imunohistoquímica no tecido sinovial para TNF<math>\alpha</math>, COX2 e NOSi</b>	77
<b>Figura 11. Avaliação do efeito dos antagonistas canabinóides AM630 e AM251 sobre o efeito antinociceptivo do pós-tratamento com EACP</b>	80
<b>Figura 12. Avaliação do efeito dos antagonistas canabinóides AM630 e AM251 sobre o efeito antinociceptivo do pré-tratamento com EACP</b>	81

<b>Figura 13. Fotomicrografias da análise histopatológica do efeito dos antagonistas canabinóides AM251 e AM630 sobre o efeito anti-inflamatório da EACP na ATM</b>	<b>83</b>
<b>Figura 14. Documentação da eletroforese (gel) dos produtos de amplificação de A) Cnb1R (151pb); B) Cnb2R(186pb); e C)YWHAZ (61pb)</b>	<b>86</b>
<b>Figura 15. Efeito da EACP sobre a expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 no trato espinhal do trigêmeo</b>	<b>87</b>
<b>Figura 16. Avaliação da expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 após 24h da indução da artrite pelo zymosan na ATM de ratos tratados com EACP</b>	<b>88</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELAS</b>	<b>Página</b>
Tabela 01. Sequência oligonucleotídeos dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR	60
Tabela 2. Análise da histopatologia da membrana sinovial e tecido periarticular na ATM após indução da artrite pelo zymosan e pós-tratamento com EACP	73
Tabela 3. Análise da histopatologia da membrana sinovial e tecido periarticular na ATM após indução da artrite pelo zymosan e pré-tratamento com EACP	75
Tabela 4. Análise da imunexpressão de TNF $\alpha$ , COX-2, and NOSi na membrana sinovial após indução da artrite pelo zymosan e tratamento com EACP	78
Tabela 5. Análise do efeito do uso dos antagonistas dos receptores canabinóides CB1 e CB2 no tratamento com EACP na histopatologia da membrana sinovial e tecido periarticular na ATM após indução da artrite pelo zymosan	84

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACTH-** Hormônio adrenocorticotrófico
- AMPC-** Adenosina Monofosfato Cíclico
- AM251-** Antagonista do receptor canabinóide 1
- AM630-** Antagonista do receptor canabinóide 2
- ANOVA-** Análise de variância
- ATM-** Articulação Temporomandibular
- BCP-** 1-bromo, 3- cloro-propano
- BP6-** ponto 6 do meridiano do baço-pâncreas
- BSA-** Albumina sérica bovina
- Ca<sup>+2</sup>-** Íon Cálcio
- CB1-** Receptor Canabinóide 1
- CB2-** Receptor Canabinóide 2
- CCK-** Colecistocinina
- CCK-8-** Colecistocinina 8
- cDNA-** Ácido desoxirribonucleico complementar
- CEPA-** Comitê de Ética em Pesquisa Animal
- CFA-** Adjuvante completo de Freund
- CFO-** Conselho Federal de Odontologia
- CRF-** Fator liberador de corticotrofina
- COBEA-** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COX-2-** Ciclo-oxigenase 2
- DAB-** Cromógeno 3, 3'-diaminobenzadina
- DNA-** Ácido desoxirribonucléico
- dNTP-** Desorribonucleotídeo trifosfatado
- DTM-** Desordem Temporomandibular

**EACP-** Eletroacupuntura

**EDTA-** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EPM-** erro padrão da média

**E36-** ponto 36 do meridiano do estômago

**E44-** ponto 44 do meridiano do estômago

**g-** grama

**GABA-** Ácido gama-aminobutírico

**HE-** Hematoxilina- eosina

**Hz-** Hertz

**IFN- $\gamma$ -** Interferon gama

**IG4-** ponto 4 do meridiano do intestino grosso

**IG11-** ponto 11 do meridiano do intestino grosso

**IL-** Interleucina

**i.art.-** Via intra-articular

**i.p.-** Via intraperitoneal

**LAFICA-** Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer

**mA-** Miliampere

**min.-** minutos

**MPO-** Mieloperoxidase

**MTC-** Medicina Tradicional Chinesa

**MyD88-** Proteína 88 de resposta primária de diferenciação mielóide

**NF $\kappa$ B-** Fator nuclear Kappa B

**NGF-** Fator de crescimento neural

**NK-** células *natural killer*

**NMDA-** receptor N-metil- D- aspartato

**NOSi-** Óxido nítrico sintase induzida

**PAR-2-** Receptor protease ativado-2

**PCR-** Reação em cadeia de polimerase

**PBS-** Tampão fosfato-salino

**RNA-** ácido ribonucléico

**RNase-** ribonuclease

**RNAm-** RNA mensageiro

**RT-PCR-** reação em cadeia de polimerase em tempo real

**RT-qPCR-** transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase em tempo real

**RPE-** substância tampão

**RW1-** substância tampão

**s-** segundos

**SNC-** Sistema nervoso central

**SYB- Green-** Agente intercalante utilizado na coloração do DNA para análise em eletroforese dos produtos do PCR

**TGF- $\beta$**  –Fator de transformação de crescimento  $\beta$

**THC-** Tetrahydrocannabinol

**TLR-** Receptor *tool-like*

**TPRV1-** Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1

**TNF $\alpha$ -** Fator de necrose tumoral alfa

**UNICAMP-** Universidade de Campinas

**VB30-** ponto 30 do meridiano da vesícula biliar

**YHWAZ-** gene de referência

**2- AG- 2-** Aracdnol-glicerol

**5- HT- 5-** Hidroxitriptamina

**$\mu$ -** receptor opióide  $\mu$

**$\mu$ g-** micrograma

**$\mu$ L-** microlitro

**$\mu$ m-** micrômetro

**δ**- receptor οπιόide δ

**κ**- receptor οπιόide κ

## SUMÁRIO

**Resumo**

**Abstract**

**Lista de figuras**

**Lista de tabelas**

**Lista de abreviaturas**

**Página**

**1.Introdução 18**

**2. Revisão de literatura 22**

**2.1. Articulação temporomandibular 22**

**2.2. Desordem temporomandibular 24**

**2.3. Dor orofacial- via trigeminal 26**

**2.3.1. Núcleo do trato espinhal do trigêmeo 27**

**2.4. Resposta inflamatória inata 30**

**2.5. Acupuntura 31**

**2.5.1. Fisiologia dos pontos de acupuntura 33**

**2.5.2. Eletroacupuntura 34**

**2.5.3. Analgesia por acupuntura 35**

**2.5.4. Mecanismos anti-inflamatórios da acupuntura 38**

**2.6. Opióides endógenos 39**



<b>2.6.1. Acupuntura e sistema opióide</b>	<b>40</b>
<b>2.7. Sistema endocanabinóide</b>	<b>42</b>
<b>2.7.1. Receptores canabinóides</b>	<b>43</b>
<b>3. Justificativa</b>	<b>46</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Objetivo geral</b>	<b>49</b>
<b>4.2. Objetivo específico</b>	<b>49</b>
<b>5. Materiais e métodos</b>	<b>51</b>
<b>5.1. Animais</b>	<b>51</b>
<b>5.2. Indução da artrite na ATM</b>	<b>51</b>
<b>5.3. Grupos experimentais</b>	<b>52</b>
<b>5.4. Hipernociceção mecânica (teste nociceptivo)</b>	<b>52</b>
<b>5.5. Aplicação da EACP</b>	<b>53</b>
<b>5.6. Coleta do fluido sinovial, ATM e tecidos periarticulares</b>	<b>54</b>
<b>5.7. Aplicação dos antagonistas canabinóides</b>	<b>54</b>
<b>5.8. Avaliação da migração de células para a cavidade articular (contagem de células e atividade de MPO)</b>	<b>55</b>
<b>5.9. Avaliação do aumento da permeabilidade vascular</b>	<b>56</b>
<b>5.10. Análise histopatológica</b>	<b>56</b>
<b>5.11. Imunohistoquímica para TNF<math>\alpha</math>, ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (NOSi)</b>	<b>56</b>
<b>5.12. Análise da expressão gênica dos receptores CB1 e CB2</b>	<b>57</b>
<b>5.12.1. Extração do trato espinhal trigeminal: região do subnúcleo caudal</b>	<b>57</b>
<b>5.12.2 Isolamento do RNA total</b>	<b>58</b>
<b>5.12.3.Reação transcriptase reversa</b>	<b>58</b>
<b>5.12.4. PCR em tempo real (Real Time- PCR, RT-qPCR)</b>	<b>59</b>

<b>5.13. Análise estatística</b>	<b>61</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>63</b>
<b>6.1. Efeito da EACP sobre a hipernocicepção mecânica da artite por zymosan</b>	<b>63</b>
<b>6.2. Efeito da EACP na migração de células</b>	<b>67</b>
<b>6.3. Efeito da EACP na permeabilidade vascular</b>	<b>69</b>
<b>6.4. Análise histopatológica do efeito da EACP</b>	<b>71</b>
<b>6.5. Efeito da EACP sobre a imunexpressão de TNF, COX-2 e NOSi</b>	<b>76</b>
<b>6.6. Participação dos receptores canabinoides no efeito antinociceptivo da EACP</b>	<b>79</b>
<b>6.7. Análise histopatológica do efeito os antagonistas canabinoides AM251 e AM630 sobre o efeito antiinflamatório da EACP na ATM</b>	<b>82</b>
<b>6.8. Expressão gênica dos receptores canabinóides CB1 e CB2 no trato espinhal do trigêmeo</b>	<b>85</b>
<b>7. Discussão</b>	<b>90</b>
<b>8. Conclusões</b>	<b>108</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>110</b>



# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema estomatognático é a unidade funcional do corpo, responsável direta e indiretamente pelas funções de mastigação, deglutição, respiração e fonação. É composto por ossos, articulações, músculos, ligamentos e dentes. A articulação temporomandibular (ATM) que compõe esse sistema é uma articulação sinovial e bilateral, que apresenta uma relação complexa com os músculos da mastigação e superfície oclusal dos dentes.

De acordo com a Academia Americana de Desordens Temporomandibulares, desordens ou disfunções da ATM são um termo coletivo associado à dor, que envolve os músculos da mastigação, a ATM e estruturas associadas. A Sociedade Internacional de Cefaléia (IHS-1987) classifica-a como um subgrupo distinto de desordens musculoesqueléticas e reumatológicas da região orofacial (McNEILL, 1993).

Na disfunção temporomandibular (DTM), as desordens musculoesqueléticas originadas da região cervical ou dos músculos da mastigação são a maior causa de dor não dental na região orofacial. Não existem dados precisos sobre o número de pessoas acometidas com essa patologia, mas estudo norte-americano revela que cerca de 70% da população apresenta pelo menos um sintoma de disfunção articular e 33% de disfunção muscular, entretanto apenas uma em cada quatro pessoas com sinais os reconhece e os reporta como sintoma (DWORKIN et al, 1990).

Estudos relacionam a disfunção da eficiência mastigatória com a severidade da disfunção (DAO et al., 1994) e a dificuldade de realizar a mastigação foi anteriormente já relatada como uma preocupação para o estado nutricional de crianças com disfunção artrogênica decorrente de artrite reumatóide (HARPER et al., 2000)

A DTM tem caráter multifatorial e pesquisas buscam definir os fatores predisponentes, causais e mantenedores da disfunção (OLIVEIRA et al., 2003), pois é um distúrbio que gera impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, comprometendo as atividades diárias, a qualidade do sono e a alimentação (OLIVEIRA et al., 2003). Dessa maneira a avaliação e descrição da dor relacionada a DTM, bem como, a instituição de tratamentos eficazes necessitam de maiores estudos.

Devido seu caráter multifatorial, tratamentos conservadores e reversíveis vêm sendo utilizados, e a acupuntura apresenta essas particularidades. Ela é aplicada através da inserção de finas agulhas sobre regiões específicas da pele denominadas pontos de

acupuntura ou acupontos, resultando em um processo irritativo local com a liberação de histamina, bradicinina, entre outras substâncias, estimulando em seqüência fibras nervosas do tipo A $\delta$ , que conduz o impulso sensorial para estruturas segmentares e supra-segmentares do SNC, tendo como resposta, a ativação da via modulatória descendente da dor ao estimular a liberação de peptídeos opióides endógenos.

Estudos têm reportado que os sistemas opióide e endocanabinóide produzem efeitos comuns, como: hipotermia, antinocicepção e tolerância cruzada à morfina (WELCH e EADS, 1999) e que a administração simultânea de sub-doses analgésicas de morfina e do tetraidrocanabinol (THC) na proporção 1:1 produz um efeito similar ao do uso dessas drogas utilizadas isoladamente, via interação sinérgica (SMITH et al., 1998; CICHEWICZ et al., 1999). Trabalhos realizados em animais sugerem um efeito antinociceptivo sinérgico, sugerindo assim a possibilidade de uso clínico em humanos (SMITH et al., 2007).

O uso dos derivados canabinóides como agentes terapêuticos, principalmente no tratamento da dor, tem sido utilizados há séculos (WALKER e HUANG, 2002) e nas últimas décadas, rigorosos métodos científicos vêm sendo utilizados para determinar seus efeitos na transmissão nociceptiva (WARE et al., 2010). Canabinóides têm ação sobre o caminho neuronal que conduz o impulso doloroso, inibindo neurônios nociceptivos a nível espinal, supra-espinal e periférico. A descoberta dos endocanabinóides na década de 90 levantou a questão do seu papel endógeno na supressão do estímulo doloroso.

Receptores canabinóides (CB1 e CB2) são mais expressos em áreas relacionadas com a modulação descendente do processo doloroso, como matéria cinzenta periaquedutal, sendo expressos também no corno dorsal da medula espinal e gânglio da raiz dorsal, de onde são transportados ao sistema nervoso central (SNC) e para terminais periféricos de neurônios aferentes primários (HOHMANN e HERKENHAM, 1999; SAÑUDO-PEÑA et al., 1999). Dessa maneira, os canabinóides poderiam produzir analgesia por uma ação central na via modulatória descendente da dor, por uma ação direta espinal e/ ou por uma ação no nervo periférico. A descoberta da expressão desses receptores em células do sistema imune alavancou o interesse da comunidade científica no entendimento da ação dos canabinóides nos processos inflamatórios

A acupuntura vem ganhando o reconhecimento da comunidade científica, principalmente pela validação do seu efeito analgésico em pesquisas clínicas (KONG et al., 2005, JUBB et al., 2008) e experimentais (HAN, 2003;HUANG et al., 2008). A

eletroacupuntura (EACP) é um método terapêutico modificado baseado na teoria da acupuntura tradicional, que faz uso de corrente elétrica nos pontos de acupuntura, sendo um método utilizado para analgesia cirúrgica e para o tratamento de dores agudas e/ ou crônicas e processos inflamatórios (TSUI e LEUNG, 2002; VAS e WHITE, 2007), tendo para obtenção desse fim, a liberação de peptídeos opióides endógenos (HAN, 2003; HUANG et al., 2008). Entretanto, o envolvimento de outros mecanismos, como o do sistema endocanabinóide para obtenção de analgesia e ação anti-inflamatória ainda não está claro, necessitando, assim de maiores estudos.

# **REVISÃO DE LITERATURA**



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Articulação Temporomandibular**

O sistema estomatognático é caracterizado como um conjunto de estruturas que desenvolvem funções comuns, tendo como características importantes a participação da mandíbula, para realizar a mastigação, deglutição, fala, auxiliar a respiração e a expressão das emoções. É constituído por um conjunto de estruturas passivas ou estáticas como a própria mandíbula, o osso hióide, a coluna cervical, as duas articulações temporomandibulares (ATMs), os ligamentos, tendões, aponeuroses, os dentes e a mucosa oral, apresentando como constituinte ativo, os músculos (DOUGLAS, 2002).

Do ponto de vista funcional, o sistema estomatognático é constituído pelas ATMs, o componente neuromuscular, as superfícies oclusais e o periodonto. Apesar de apresentarem suas próprias características funcionais, existe uma relação harmônica entre as partes constituintes, garantindo a homeostase do sistema (MOLINA, 1995).

A ATM é uma diartrose sinovial bicondílea complexa, formada a partir da superfície articular do osso temporal e do côndilo mandibular, cujas superfícies são recobertas pela cartilagem articular e unidas por ligamentos revestidos por membrana sinovial. Cada côndilo se articula com uma ampla superfície do osso temporal, constituída pela eminência articular e fossa mandibular (FLETCHER et al., 2004). Um disco fibrocartilaginoso avascular está situado entre as superfícies ósseas articulares e divide a cavidade articular em compartimento superior e inferior. Medial e lateralmente, o disco se funde com a cápsula articular e esta se insere nas porções lateral e medial do côndilo (Figura 1). Anteriormente, o disco se divide e faz inserção na eminência articular do osso temporal e no colo do côndilo. Posteriormente, o disco também se divide, inserindo-se superiormente na fissura escamo-timpânica e inferiormente, no colo do côndilo. Na fixação posterior do disco, encontra-se uma região altamente inervada e vascularizada, formada por tecido conjuntivo frouxo, rico em fibras elásticas, denominado tecido retrodiscal (HERB et al., 2006).

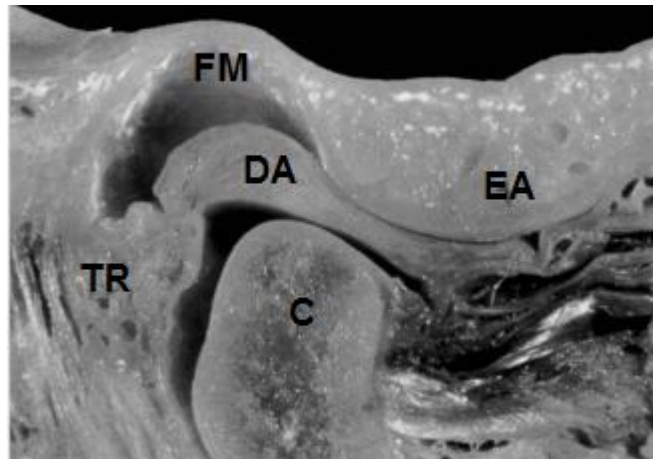


Figura 1. Articulação Temporomandibular- Superfícies articulares e disco articular  
C- côndilo; DA-disco articular; FM-fossa mandibular; EA-eminência articular; TR- tecido  
retrodiscal

<http://ceddar.blogspot.com/p/cirurgia.html>

A cápsula articular envolve a articulação e é constituída por uma superfície externa ou fibrosa e uma superfície interna, sendo esta formada pela membrana sinovial, que se apresenta como dobras de tecido conjuntivo que se projetam para o interior da cavidade articular. A população celular é formada basicamente por fibroblastos e macrófagos denominados de células sinoviais, produtoras de líquido sinovial que é um dialisado do plasma adicionado de proteínas e mucina que leva nutrientes e lubrifica os tecidos avasculares que recobrem o côndilo, a eminência articular e o disco articular. O líquido sinovial confere viscosidade, elasticidade e plasticidade à articulação, apresentando funções metabólicas e funcionais, sendo essencial para lubrificação da superfície articular. A membrana sinovial não cobre as superfícies articulares exceto na zona bilaminar (HERB et al., 2006)

A articulação é estabilizada pelos ligamentos colateral, capsular e temporomandibular. Molina (1995) define funcionalmente os ligamentos como guias que restringem os movimentos mandibulares de rotação e translação, bordejantes e intrabordejantes dentro dos limites estabelecidos pela cápsula, ligamentos, músculos e proprioceptores.

Os músculos masseter, temporal, pterigóide medial e pterigóide lateral são responsáveis pela mastigação, Os músculos supra e infra-hióideos agem sobre o osso

hióide e influenciam o movimento mandibular, coordenando os movimentos de abertura, fechamento, lateralidade e protrusão (HERB et al, 2006).

A ATM recebe o suprimento vascular das artérias temporal superficial, massetérica e maxilar. Sua inervação é realizada principalmente pelo nervo aurículo temporal e em menor extensão, pelos nervos massetérico e temporal posterior profundo (HERB et al., 2006).

As ATMs, como parte integrante do sistema estomatognático, têm sido motivo de exaustivos estudos. Ao longo dos anos, grande avanço tem sido alcançado nas pesquisas das desordens de tal articulação. Com o advento das Academias Americana e Européia de Desordens Craniomandibulares, o enfoque científico sobre o assunto tornou-se mais efetivo e atualmente, mais difundido em todas as partes do mundo. No entanto, é uma patologia que gera muita controvérsia, não apenas em bases conceituais como em bases etiológicas e terapêuticas.

## **2.2. Disfunção Temporomandibular**

O termo DTM inclui um quadro doloroso que envolve os músculos da mastigação, a ATM e estruturas adjacentes. DTM é a maior causa de dor de origem não dentária na região orofacial e é atualmente, considerada uma subclassificação das desordens músculo-esqueléticas (OKESON e LEEUW, 2010). A perda da integridade estrutural, a função alterada ou esforços biomecânicos aplicados no sistema estomatognático podem comprometer a adaptabilidade e aumentar a probabilidade de disfunção do sistema.

Dores locais na ATM ou dores irradiadas pela face, frente, pavilhão auricular e região cervical podem ser resultado de um somatório de fatores (MARBACH et al., 1990). A etiologia parece ser multifatorial e reflete uma interação entre fatores físicos, funcionais e psicossociais (HOTTA et al., 1997) e mecanismos centrais e periféricos têm sido propostos (CARLSON et al., 1998; HUANG et al., 2002). Fatores locais, como trauma da face e pescoço, bruxismo, apertamento, manter a boca aberta por tempo prolongado, têm sido sugeridos como possíveis fatores etiológicos, assim como os distúrbios sistêmicos relacionados ao estresse, ansiedade, depressão, fadiga, distúrbios

do sono (YAP et al., 2002; CELIC et al., 2006; GAMEIRO et al., 2006) e doenças sistêmicas como fibromialgia e artrite reumatóide (BALASUBRAMANIAM, 2007).

Seu diagnóstico depende da avaliação dos sintomas, que são revelados pelo paciente durante a anamnese, e dos sinais, que são pesquisados pelo profissional durante o exame clínico. Os sinais e sintomas da DTM são dor facial ou dor na região da ATM durante o movimento ou no repouso, dor a palpação dos músculos da mastigação, limitação ou desvio da mandíbula durante os movimentos, ruídos articulares, otalgia, cervicalgia e cefaléias. A principal queixa dos pacientes que procuram tratamento é a presença da dor, sendo que 75% da população afetada, apresenta pelo menos um sintoma e 5% necessita de tratamento (NOIMAN et al., 2010).

Trabalhos epidemiológicos transversais em populações de adultos norte-americanos mostram prevalência de 40 a 75% dos indivíduos com pelo menos um sinal de DTM e aproximadamente 33% têm no mínimo um sintoma (DWORKIN et al., 1990). Alguns sinais parecem relativamente comuns em populações de indivíduos saudáveis como sons articulares ou desvios de abertura da boca, que ocorrem em 50% dos indivíduos. Outros sinais, como limitação de abertura de boca, ocorre somente em 5%. Ao analisar os sintomas individuais separadamente, em relação ao gênero, as mulheres apresentam mais cefaléia, estalos e dores musculares e na ATM (OKENSON, 1998). Manfredi (2005), em estudo epidemiológico para DTM realizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), verificou grande prevalência da doença, com níveis de dor moderada e forte entre mulheres e homens jovens (87% das mulheres na faixa etária de 17 a 24 anos, 89.7% das mulheres na faixa etária de 25 a 44 anos e 86.2% das mulheres na faixa etária de 44 a 63 anos e 72,5% dos homens na faixa etária de 17 a 24 anos).

A DTM pode ser classificada em três tipos básicos: desordem dos músculos da mastigação, desordem dos tecidos moles, como deslocamento do disco articular, e desordem articular dos tecidos duros, como a osteoartrite e a osteoartrose (DWORKIN e LERESCHE, 1992).

A osteoartrite e a osteoartrose da ATM são doenças articulares degenerativas. Na osteoartrite, as superfícies articulares do côndilo e da fossa mandibular do osso temporal estão alteradas devido a perda da camada cortical subcondral e a erosão óssea (OKESON, 2008). É sugerido que a sobrecarga das superfícies articulares seja o principal fator etiológico e é evidente a presença de alterações ósseas ativas. À medida que ocorre remodelação óssea, a sintomatologia pode regredir, apesar das alterações

ósseas ainda estarem presentes. A osteoartrose representa, portanto, essa fase adaptativa estável (IOI et al., 2008).

As citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) estão relacionadas com a inflamação das articulações sinoviais e destruição do tecido conjuntivo. Múltiplas citocinas têm sido identificadas no fluido sinovial de pacientes portadores de DTM e estudos sugerem que estas citocinas estão envolvidas nas alterações ósseas, como formação de osteófitos e reabsorção óssea na ATM (TAKAHASHI et al., 1998). O aumento dos níveis dessas citocinas está correlacionado com a gravidade da doença, medida pela intensidade da dor, limitação do movimento e alterações ósseas (KACENA et al., 2001)

Fatores locais, como traumas, hábitos parafuncionais, oclusão instável, sobrecarga mecânica e aumento da fricção articular, podem estar envolvidos na gênese das doenças articulares degenerativas da ATM. Doenças sistêmicas podem afetar o metabolismo da fibrocartilagem e alterar a capacidade adaptativa da ATM, bem como, alterações hormonais podem afetar a remodelação do côndilo mandibular (TANAKA et al., 2008).

Não há um tratamento padrão para a DTM e placas oclusais, medicações alopáticas, como anti-inflamatórios não esteroidais, relaxantes musculares e antidepressivos tricíclicos, terapia física, aconselhamento, tratamento comportamental, cirurgia, vêm sendo utilizados, possibilitando o alívio da dor, o retorno da função e a melhora da qualidade de vida (AL-ANI et al., 2004; DOLWICK, 2007).

O uso da acupuntura no tratamento das dores crônicas vem sendo estimulada devido ao alto índice de eficácia e resolubilidade (ROSTED, 2001; GODDARD, 2002). Tem sido utilizada para o tratamento de diversas patologias e vem se tornando um importante recurso auxiliar a prática odontológica, principalmente pelas suas ações analgésica e anti-inflamatória.

Ensaio clínicos randomizados, revisões sistemáticas e meta-análises têm encontrado melhorias funcionais e alívio da dor com acupuntura em comparação com acupuntura *sham* (acupuntura fora dos acupontos ou falsa estimulação dos mesmos) ou tratamentos educacionais ao paciente (BERMAN et al, 2004;. MANHEIMER et al, 2007;. LEE et al., 2008). Alta qualidade de ensaios clínicos randomizados para a fibromialgia (MARTIN et al., 2006) e dor na ATM (SMITH et al , 2007) e uma revisão

sistemática da ATM e dor (ERNST e WHITE, 1999) concluiu que a acupuntura melhorou significativamente os sintomas. Alguma discordância existe sobre a eficácia da acupuntura para a osteoartrose do joelho e artrite na ATM, embora pesquisas com adequado tempo de tratamento, de modo geral, mostraram resultados favoráveis (KELLY, 2009).

### **2.3. Dor orofacial- via trigeminal**

A dor orofacial compreende 40 % das dores crônicas, que incluem tensão, cefaléias, enxaqueca, dores miofasciais, DTMs e neuralgia trigeminal. A maioria desses transtornos apontam tensão crescente na cabeça e musculatura do pescoço.

O entendimento da anatomia e fisiologia das vias neurais envolvidas no processo da dor crânio-facial, incluindo a decorrente da DTM, é fundamental para fornecer um substrato sólido para o diagnóstico e tratamento (ISRAEL e SCRIVANI,2000).

Qualquer impulso nociceptivo periférico, independente de sua natureza e origem tecidual, percorre vias neurais muito similares (MACHADO, 1993). O estímulo é captado pelo terminal periférico do neurônio de primeira ordem, cujo corpo celular está localizado no gânglio trigeminal. Seu braço periférico constitui o nervo sensorial e, o central, a raiz sensitiva do trigêmeo. No terminal periférico encontram-se estruturas anatômicas e fisiológicas distintas do restante da membrana neuronal: os nociceptores. Estes apresentam características de ativação específicas para cada tipo de estímulo. Sua ativação gera um potencial de ação na membrana do neurônio, que transmitirá sinapticamente o impulso para grupos de neurônios localizados no tronco encefálico, mais especificamente, em núcleos do complexo sensorial do trigêmeo (MACHADO, 1988). Um único neurônio aferente periférico é capaz de trocar sinapses com vários neurônios dos núcleos sensoriais do trigêmeo e da formação reticular adjacente, enquanto desce pelo trato espinhal do trigêmeo.

A via trigêmino-talâmica liga os núcleos sensoriais do trigêmeo (e sua formação reticular adjacente) com regiões do tálamo relacionadas com a sensibilidade. Do tálamo, os impulsos seguem por vias tálamo-corticais até regiões sensoriais específicas do córtex cerebral, onde há a percepção da dor.

### 2.3.1 Núcleo do trato espinal do trigêmeo

O complexo nuclear trigeminal é subdividido, citoarquiteticamente, em núcleo mesencefálico, principal e núcleo do trato espinal do nervo trigêmeo. As porções caudais correspondem às lâminas posteriores do corno posterior da medula espinal e as rostrais às anteriores. O complexo nuclear trigeminal espinal e o núcleo trigeminal principal estão envolvidos na nocicepção facial (NAMBA e NISHIMOTO, 1988). O núcleo trigeminal rostral recebe fibras do subnúcleo caudal e modula a atividade do subnúcleo caudal. As três divisões do nervo trigêmeo estão representadas em todo o complexo trigeminal e alcançam o corno posterior da medula espinal até o quarto segmento cervical (TEIXEIRA, 2001).

O núcleo do trato espinal, mais profundo que o trato espinal do trigêmeo, está localizado logo abaixo do núcleo sensitivo principal, é longo no sentido do crânio-caudal, seu bordo inferior chega ao nível das vértebras cervicais. Pelas suas características ultra-estruturais, é dividido em três sub-núcleos: oral, interpolar e caudal (TEIXEIRA, 1990) (Figura 2.). Apesar desta divisão ultra-estrutural, é importante ressaltar que existe uma ampla integração funcional, com múltiplas vias intra-nucleares ativadoras e inibidoras.

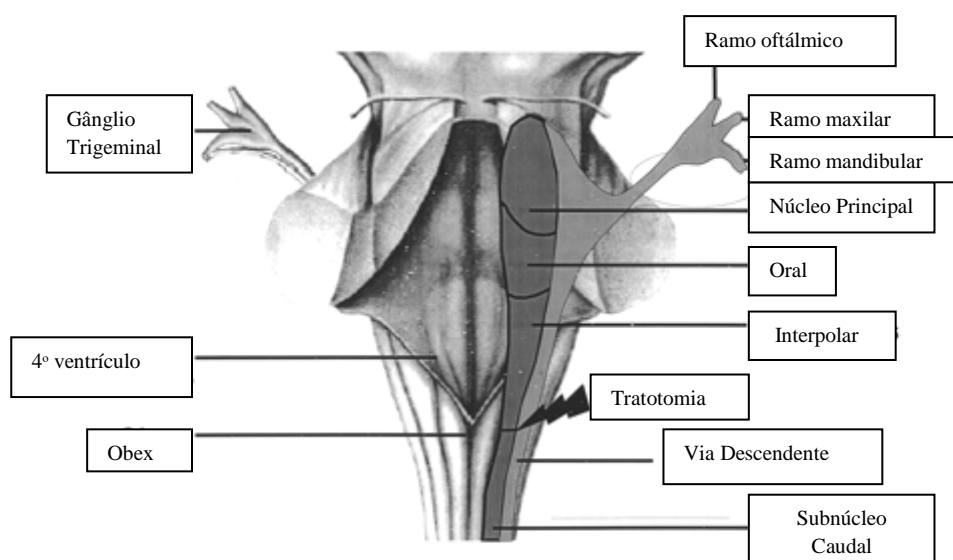


Figura 2. Complexo Trigeminal

Vista dorsal do tronco encefálico com desenho esquemático do complexo sensorial trigeminal

(Fonte: Villanueva e Raboisson, 1994)

O subnúcleo oral é contínuo superiormente com o núcleo sensitivo principal e inferiormente com a parte superior do interpolar, lateralmente ele é margeado pelo trato espinhal do trigêmeo e fascículos deste freqüentemente o cruzam transversalmente, dividindo-o em vários grupos que variam de seção para seção. Na região dorso-medial, os neurônios do subnúcleo oral são de dimensões menores e têm sido implicados com a modulação local do estímulo aferente (inibição ou sensibilização) e com reflexos senso-motores, dada a falta de projeções para o tálamo. A região ventro-lateral possui basicamente neurônios de projeção, principalmente para o tálamo sensorial e para o cerebelo. Todos os neurônios desse subnúcleo recebem estímulos do interior e da região ao redor à cavidade oral (DALLEL et al., 1996). Quase a totalidade de seus neurônios tem a capacidade de recepção de estímulos nociceptivos (PARADA et al., 1997). Além da modulação segmentar, seus neurônios podem ser modulados pelo sistema antinociceptivo supra-segmentar.

A função do núcleo oral consiste: recebimento, modulação local (segmentar) e transmissão para a percepção dos estímulos nociceptivos da região intra e perioral; modificação da postura e dos movimentos mandibulares através da promoção de arcos-reflexo motores regionais com a musculatura mastigatória e também pela sua relação com o cerebelo (DALLEL et al., 1996).

O subnúcleo interpolar está localizado ao nível do bulbo. Superiormente, é contínuo com o oral e caudalmente com o subnúcleo caudal. Através de todo o seu percurso, o interpolar é margeado lateralmente pelo núcleo do trato espinhal do trigêmeo, que lhe fornece as informações dos estímulos periféricos. Sua população neuronal é heterogênea. A maioria das células é de tamanho pequeno a médio (15-20  $\mu$ m). Estas células são semelhantes ao do subnúcleo oral. A característica diferencial deste núcleo é possuir também células grandes. Na fisiologia da dor crânio-facial, poderíamos resumi-lo como sendo muito semelhante ao que foi descrito em relação ao oral, ou seja, recebimento de estímulos nociceptivos da periferia (e de outros subnúcleos do núcleo do trato espinhal) e conseqüente modulação segmentar da dor, recrutamento de vias antinociceptivas supra-segmentares, arcos-reflexo motores, alteração da postura e fisiologia mandibular por meio de vias cerebelares. A diferença com relação ao oral



reside no fato de receber estímulo de outras regiões do crânio e da face que não a região intra ou perioral (MUNHOZ, 1999).

O subnúcleo caudal é o mais pronunciado dos somatosensitivos do trigêmeo. Estende-se da porção inferior do intercalar e desce ao nível do corno posterior da medula espinhal ao nível dos segmentos C2 e C3. A este nível existem grandes relações anatômicas e, por isso funcionais, entre o corno posterior da medula espinhal, que recebe estímulos da região cervical e o núcleo do trato espinhal trigêmeo. Acredita-se que é por esta razão que se observa freqüentemente na prática clínica uma confusão na localização da dor em ambas as regiões. A dor cervical geralmente é referida pelo paciente em regiões cranianas e faciais e, freqüentemente, gera efeitos secundários típicos de patologias dolorosas crânio-faciais (MUNHOZ, 1999).

Tendo como base, achados anatômicos, eletrofisiológicos e observações clínicas, o subnúcleo caudal está intimamente relacionado com a transmissão de estímulos térmicos e nociceptivos da região oral e facial. Sua ultra-estrutura é muito semelhante ao corno posterior da medula espinhal. Em um corte transversal, verificam-se camadas celulares histologicamente distintas, denominadas lâminas de Rexed, que são numeradas de I a VII, onde as lâminas de I a IV representam o caudal propriamente dito, e as lâminas V, VI e VII estão imersas na formação reticular adjacente ao subnúcleo (MUNHOZ, 1999).

Na lâmina I foi observada uma maior quantidade de recebimento de aferentes da pele enquanto a lâmina V, VI e VII recebe grande quantidade de aferentes de estruturas profundas (dentes, músculos, vísceras). A lâmina II é chamada de “substância gelatinosa” por ser praticamente toda constituída por neurônios de circuito local (axônios pequenos), que modulam (inibem ou facilitam) segmentarmente os impulsos aferentes nociceptivos ou não. As lâminas III (parte profunda) e IV são constituídas por neurônios de projeção de estímulos aferentes não-nociceptivos (MUNHOZ, 1999).

Quando se projetam para centros superiores, os neurônios do caudal têm quatro finalidades básicas: a) tornar o estímulo consciente por meio do tálamo; b) recrutar vias anti-nociceptivas pelos núcleos ricos em serotonina e noradrenalina; c) formar uma resposta neuro-vegetativa e aversiva compatível por meio do sistema límbico; d) alterar o padrão postural e de movimentação muscular da mandíbula (e talvez corporal) por meio do cerebelo e de outros centros neuro-motores (MUNHOZ, 1999).

Os neurônios do subnúcleo caudal têm importância capital no processamento da dor facial. O subnúcleo caudal não origina fibras trigeminotalâmicas diretas, mas influencia a dor secundariamente, mediante projeções para os núcleos sensitivos principais (TEIXEIRA, 2001).

#### **2.4. Resposta Inflamatória Inata**

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, além de apresentar como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. Tem como finalidade, a remoção do estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual local.

O sistema imunológico é constituído por uma intrincada rede de órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral. A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio, sendo a primeira linha de defesa do organismo. Seus mecanismos compreendem barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis. A primeira defesa do organismo frente a um dano tecidual envolve diversas etapas intimamente integradas e constituídas pelos diferentes componentes desse sistema (CRUVINEL et al., 2010).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer (NK). Os principais mecanismos da imunidade inata são: fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (CRUVINEL et al., 2010).

A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular iniciada pelas células residentes no tecido imediatamente após o dano. Após uma agressão, ocorrem vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar mediados por aminas vasoativas, histamina e serotonina, liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a agressão. A saída de proteínas para o espaço extravascular é acompanhada de saída de água, e marginalização dos leucócitos, que passam a circular junto ao endotélio. O endotélio local torna-se ativado, expressando moléculas de superfície que favorecem a aderência dos leucócitos e a eventual migração destes para os tecidos. Macrófagos

residentes no tecido lesado liberam citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF- $\alpha$  e quimiocinas (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005).

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas. A resposta adquirida apresenta como principais características: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (CRUVINEL et al., 2010).

## **2.5. Acupuntura**

A acupuntura faz parte da Medicina Tradicional Chinesa, um dos sistemas de saúde mais antigo e conhecido da humanidade que data de 2000 a 3000 anos antes de Cristo. É uma tecnologia de intervenção em saúde que aborda de modo integral e dinâmico o processo saúde-doença, podendo ser utilizada isolada ou de forma integrada com outros recursos terapêuticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os conceitos que estimularam os chineses a usar acupuntura com fins terapêuticos são complexos e difíceis de serem compreendidos pelo mundo ocidental. Foram conceitos baseados na observação da natureza, incluindo, em particular, a crença na existência de dois reguladores cósmicos denominados *Yin* e *Yang*, bem como no fluxo de energia (*Qi*) que percorria o corpo ao longo de 12 canais principais denominados meridianos.

No ocidente, a prática foi introduzida por missionários jesuítas há aproximadamente 300 anos, mas somente nas últimas décadas, vem conquistando merecido reconhecimento da comunidade científica após a melhor compreensão dos seus efeitos neuroendócrinos: sedação, analgesia, ação anti-inflamatória, recuperação motora, hemostasia e homeostasia.

No Brasil, é reconhecida como especialidade médica desde 1995 e atualmente é reconhecida como especialidade em todas as áreas da saúde, com exceção da Odontologia, que a partir da Resolução CFO 82/2008, reconheceu e regulamentou o uso da acupuntura pelo cirurgião-dentista como uma prática integrativa e complementar em saúde bucal, sendo hoje uma habilitação profissional utilizada como recurso terapêutico auxiliar aos procedimentos convencionais na clínica odontológica.

Com efeito, a medicina chinesa e a ocidental são duas ciências médicas com sistemas teóricos diferentes e desenvolvidos sob condições históricas diferentes. Elas são fruto de trabalho árduo, prolongado, inteligência e sabedoria de toda a humanidade, tendo o ser humano como seu objeto de estudo.

Os critérios utilizados para realização de pesquisas clínicas controladas e randomizadas que tornam um estudo confiável põem restrições para um estudo voltado a MTC, que identifica subgrupos de diagnósticos diferenciados para cada padrão de desarmonia, ou seja, para cada alteração da saúde definida pela nossa medicina ocidental.

Nesse aspecto a MTC preconiza um conjunto específico de pontos para tratar cada subgrupo de diagnóstico diferenciado, cuja seleção pode ser modificada com a finalidade de atender as características individuais do pacientes, tornando o tratamento individualizado.

A exigência metodológica requer que os estudos clínicos sigam um protocolo onde os mesmos pontos acupunturais devam ser utilizados em todos os pacientes, confrontado assim com os conceitos da MTC: *yin* e *yang*, cinco elementos, substâncias vitais, teoria dos *Zang Fu*, teoria dos meridianos, pontos, etiologia, semiologia e princípios de diagnóstico.

Entretanto, pesquisas experimentais demonstram que a acupuntura ativa respostas neuroendócrinas através da estimulação do sistema nervoso central (SNC) ou periférico, utilizando-se para isso de meios mecânicos, térmicos e/ ou elétricos, ativando pontos específicos do corpo denominados pontos de acupuntura ou acupontos, que apresentam uma rica concentração de terminações nervosas sensoriais e estão situados próximos a vasos sanguíneos, músculos e cápsulas articulares (WU, 1990; FARBER e TIMO-IARIA, 1994; DRAEHMPAHEL e ZOHMANN, 1997), sendo definidos como pontos de sensibilidade espontânea ao estímulo, apresentando baixa resistência elétrica, com diâmetro de 0,1 a 5 cm e uma área de condutividade elétrica amplamente aumentada comparada às áreas da pele ao redor (SCHWARTZ, 2008; TAFAREL e FREITAS, 2009). O resultado terapêutico da acupuntura é dependente da precisa localização e penetração dos pontos de acupuntura.

O *DeQi* é uma palavra utilizada pelos chineses para definir a sensação causada pela inserção precisa da agulha no ponto de acupuntura, sendo descrita como uma resposta rápida e mista de dor, dormência e formigamento. Estudos relatam que essa sensação é desencadeada pela estimulação simultânea de vários tipos de receptores

localizados nesses acupontos (LI et al., 2004) e embora trabalhos anteriores tenham buscado explicar anatômica e fisiologicamente tais pontos (GUNN et al., 1976; GUNN, 1978, LANGEVIN et al., 2001a, 2001b, 2002; LANGEVIN E YANDOW, 2002) tais características permanecem desconhecidas.

### 2.5.1. Fisiologia dos pontos de acupuntura

Trabalhos evidenciam que os pontos de acupuntura são fisiologicamente caracterizados pela baixa impedância elétrica e, anatomicamente estão relacionados aos planos do tecido conjuntivo (AHN et al., 2010). O tratamento convencional da acupuntura consiste na inserção de agulhas e na manipulação manual das mesmas nos acupontos. O acupunturista manuseia a agulha realizando movimento de rotação ou pistonamento. Tal ação provoca alterações celulares que ocorrem ao longo dos planos do tecido conjuntivo, estimulando a transdução dos sinais e a estimulação sensorial dos mecanorreceptores de tal tecido (LANGEVIN e YANDOW, 2002).

A ativação do ponto de acupuntura excita os receptores periféricos, especialmente os musculares. Xie e colaboradores (1996) demonstraram que esse efeito é dependente do tempo de estimulação, ou seja, quanto maior o tempo de punção no acuponto, um maior número de receptores será ativado. Essa atividade neuronal ativa fibras aferentes e eferentes que são excitadas e propagam esse estímulo numa velocidade de condução baixa, geralmente na faixa de centímetros por segundo, que é uma velocidade de condução bem menor que a de condução normal de fibras nervosas periféricas, estimulando seletivamente um grupo de neurônios motores de um grupo muscular ao longo de um meridiano, que são ativados por impulsos aferentes provenientes não somente do músculo homônimo, do sinergista, bem como do nervo espinhal que inerva o grupo muscular do meridiano (XIE et al, 1996). Nesse mesmo trabalho, esses autores relatam também que as entradas aferentes em outro meridiano são fracas ou não têm efeito.

Li e colaboradores (2004) demonstraram que a densidade de terminações nervosas periféricas na pele e nos músculos é bem maior no ponto de acupuntura que em áreas circunvizinhas, afirmando assim, que é um local onde há um amplo campo receptivo. Liu e colaboradores (2009) afirmaram que há correlação entre a distribuição espacial das terminações nervosas aferentes no acuponto com a atividade especial reflexa proveniente do acupontos do grupo muscular de um meridiano dado.

O estudo da relação do ponto de acupuntura com o SNC conduziu à formulação da teoria neuroendócrina da acupuntura, que esclareceu os mecanismos de ação da acupuntura em relação a seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, mas não foi suficiente para explicar a teoria dos meridianos, cuja definição em termos científicos começa a ser delineada, nestes anos mais recentes, no âmbito de estudos morfológicos que enfatizam a participação do tecido conjuntivo em acupuntura, associados a pesquisas sobre propriedades eletromagnéticas funcionais dos organismos vivos.

Langevin e Yandow (2002) observaram que os meridianos de acupuntura acompanham os planos das fâscias e os pontos de acupuntura coincidem com os planos de clivagem do tecido conjuntivo. Nestes pontos, a superfície de contato da agulha de acupuntura com o tecido conjuntivo é ampla, o que facilita a propagação pelo tecido do sinal gerado pelo estímulo mecânico e a transdução deste sinal nos fibroblastos.

Os sinais biomecânicos, bioelétricos e bioquímicos transmitidos através do tecido conjuntivo, integram o corpo tanto no domínio espacial quanto em relação aos sistemas fisiológicos, pois os múltiplos planos deste tecido são contínuos. Ele permeia órgãos e vísceras e envolve fibras musculares, nervos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos (LANGEVIN e YANDOW, 2002).

### 2.5.2. Eletroacupuntura

Formas distintas são utilizadas para se estimular tais pontos ao longo dos meridianos, como: uso das agulhas, acupressão e eletroacupuntura (EACP). Witzel et al (2011) afirmam que independente do tipo de estímulo, essas técnicas terapêuticas podem afetar o processamento no córtex somatossensorial primário em conjunto com seus efeitos subcorticais.

A EACP é uma modalidade da acupuntura que consiste na utilização de estímulo elétrico que passa através das agulhas ou diretamente através da pele, emitido por meio de um aparelho de eletroestimulação. Liu et al. (2007) afirmaram que a estimulação elétrica de acupontos é efetiva no alívio da dor central e periférica. É usada no tratamento de doenças crônicas e degenerativas, no entanto, pouco se sabe sobre os pontos de acupuntura específicos que inibem a dor inflamatória ou os mecanismos que estão por trás desses efeitos.

Os estímulos elétricos que passam através das agulhas e estimulam os acupontos são capazes de excitar fibras do tipo A $\beta$  (CHUNG et al., 1984; LEVINE et al., 1976; LU et al., 1979; POMERANZ e PALEYM 1979; TODA e ICHIOKA, 1978; WU et al., 1974) e A $\delta$  ( KAWAKITA e FUNAKOSHI, 1982; LEUNG et al., 2005; WU et al., 1974), que podem induzir resposta analgésica, ascendendo sinais através da medula espinhal via funículo ventrolateral até chegar ao cérebro. Observações clínicas e trabalhos experimentais sugerem que a via de sinalização da acupuntura e as vias de dor se encontram entrelaçadas (ZHAO, 2008).

A estimulação elétrica ou manual através das agulhas excita as terminações nervosas periféricas, que ativa o sistema endógeno inibitório da dor através de múltiplos caminhos neuronais (BASBAUM e FIELD, 1984; ANDERSON e LUNDEBERG, 1995), levando a liberação de peptídeos opióides endógenos, incluindo  $\beta$ - endorfina, encefalina, dinorfina e endomorfina-1 (HE, 1987; HAN et al., 1999), bem como substâncias não-opióides, como serotonina, noradrenalina e GABA ( YONEHARA, 2001; ZHU et al., 2002; KIM et al., 2005).

### 2.5.3. Analgesia por acupuntura

A via inibitória descendente da dor, que ativa várias regiões supra-segmentares como: núcleo magno da rafe, matéria cinzenta periaquedutal, locus ceruleos, núcleo arqueado, área pré-óptica, núcleos habenulares, núcleo accumbens, núcleo caudal, área septal e amígdala também participam no processamento da analgesia por acupuntura modulando a resposta antinociceptiva, através de um processo de integração em diferentes níveis no SNC (ZHAO, 2008), levando a liberação de peptídeos opióides endógenos.

Mayer (2000) no seu estudo de revisão concluiu que a naloxona é a droga antagonista da analgesia por acupuntura, confirmando a presença dos peptídeos opióides endógenos nesse tipo de analgesia. Nesse mesmo trabalho, o pesquisador procedeu também a revisão de estudos, que buscaram aferir os efeitos da acupuntura nos níveis de endorfinas e encefalinas no líquido cefalorraquiano e no plasma. Estes forneceram um quadro menos consistente, que foi atribuído à complexidade do tipo de informação: o significado de aumento dos níveis de endorfinas no plasma ainda não está esclarecido e

mesmo no liquor ainda é ambíguo, já que os locais de liberação de endorfinas podem variar com o tipo específico de estimulação por acupuntura.

Pesquisas em animais, embora muito heterogêneas, indicam que ocorre de fato um aumento dos níveis de opióides endógenos em áreas específicas do encéfalo, no líquido cefalorraquiano e no plasma, como consequência de aplicação de acupuntura (MAYER, 2000).

O padrão consistente com a ativação dos mecanismos opióides endógenos é estimulação de alta intensidade e baixa frequência (1-10 Hz) produzida pela acupuntura clássica ou pela eletroacupuntura. A estimulação que utiliza estes parâmetros produz analgesia em todo o corpo, que permanece depois de cessada a estimulação. O sítio crítico deste tipo de analgesia foi identificado como o núcleo arqueado do hipotálamo. Já a estimulação elétrica de baixa intensidade e alta frequência (50-100 Hz) tende a produzir analgesia regional que não dura muito além do período da estimulação e, provavelmente, não libera opióides endógenos. O sítio crítico da analgesia por alta frequência parece estar localizado no tronco encefálico (WANG et al., 1990a, 1990b, 1991).

Takagi e Yonehara (1998) identificaram os subtipos de receptores de serotonina também envolvidos na modulação produzida por EACP: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>3</sub> e Chan et al.(1998) investigaram o conteúdo de substância P em pontos de acupuntura e em pontos de controle na pele, no tecido subcutâneo e no tecido muscular de cães, com o intuito de avaliar seus efeitos fisiológicos nos tecidos periféricos. A concentração de substância P na pele e no tecido muscular foi maior nos pontos de acupuntura do que nos pontos *sham*. A diferença entre os dois grupos de pontos no tecido subcutâneo foi insignificante. Este resultado indicou que o alvo da acupuntura não está apenas na pele ou no tecido muscular, mas em ambos e que a distribuição de substância P nos diferentes tecidos pode ter influência direta no efeito da acupuntura. Os acupontos parecem apresentar grande quantidade de axônios que veiculam substância P.

A implicação das catecolaminas na via eferente da acupuntura que tem início no núcleo reticuloparagigantocelular do mesencéfalo foi estudada por Takeshige e colaboradores (1992). Yang e colaboradores (2010) sugerem que a colecistocinina-8 (CCK-8) antagoniza a analgesia obtida através da EACP, sugerindo que essa substância age como um antiopióide endógeno.

O estímulo produzido pela acupuntura no acuponto é transmitido pelas fibras II e III de nervos profundos (MAYER, 2000) e por fibras do tipo A $\beta$  e A $\alpha$  dos nervos



cutâneos que convergem para a coluna dorsal da medula espinhal, ascende pelo trato ântero-lateral contralateral para o núcleo reticulogigantocelular, para o núcleo magno da rafe e para ambos os lados da substância cinzenta periaquedutal. Estas estruturas são núcleos da formação reticular, uma rede mais ou menos difusa de neurônios que recebe uma síntese da informação sensorial que entra pela medula e pelos nervos cranianos e influencia quase todos os níveis do SNC (AMARAL, 2000).

A partir da formação reticular, a via aferente da acupuntura segue três vias: para o hipotálamo posterior, para a coluna lateral do hipotálamo e para o núcleo centro-mediano do tálamo. As vias do hipotálamo posterior e da coluna lateral do hipotálamo projetam-se para a área septal, de onde partem duas vias: uma ascende para a habênula por intermédio do trato septo-habenular e a outra ascende para o hipocampo dorsal por intermédio do feixe do cíngulo e daí para a habênula por intermédio do trato cortico-habenular. Uma via do núcleo centro-mediano do tálamo também converge para o hipocampo dorsal e daí para o trato habenulointerpeduncular e para o hipotálamo anterior (TAKESHIGE et al., 1992).

Uma via do hipotálamo anterior dirige-se para o núcleo arqueado medial, que se conecta com a região pré-óptica, com a eminência mediana e com o núcleo arqueado posterior, que corresponde ao início da via eferente da acupuntura (TAKESHIGE et al., 1992).

O núcleo arqueado posterior estabelece uma conexão dopaminérgica crítica com o núcleo ventro-medial do hipotálamo. Esta conexão é modulada por  $\beta$ -endorfina, liberada pela hipófise, com ação pré-sináptica na conexão dopaminérgica (TAKESHIGE et al., 1992).

A  $\beta$ -endorfina liberada pela hipófise produz uma facilitação neuro-humoral da via aferente da acupuntura por feedback positivo, devido a presença de receptores para opióides em estruturas ao longo da via. Isto garante a ocorrência de descargas pré-sinápticas repetidas de  $\beta$ -endorfina na conexão dopaminérgica do núcleo arqueado com o núcleo ventro-medial, o que explica o porquê a analgesia por acupuntura persiste após cessado o estímulo acupuntural (TAKESHIGE et al., 1992).

Uma via serotoninérgica e outra noradrenérgica partem do núcleo ventro-medial. A via serotoninérgica passa pela matéria cinzenta periaquedutal ventral e pelo núcleo magno da rafe, de onde partem fibras que percorrem o trato espinhal do trigêmeo e o fascículo dorsolateral da medula, terminando em neurônios internúcleares encefalinérgicos situados no núcleo do trato espinhal do nervo trigêmeo e na substância

gelatinosa da medula espinhal (MACHADO, 1993). A via noradrenérgica se origina nos grupos de neurônios noradrenérgicos da ponte e do bulbo e passa pelo núcleo reticuloparagigantocelular, que também recebe estímulos da região da matéria cinzenta periaquedutal (MACHADO, 1993).

#### 2.5.4. Mecanismos anti-inflamatórios da acupuntura

Estudos demonstram que a acupuntura tem efeito benéfico em doenças inflamatórias, entretanto seu mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido. Li e colaboradores (2008), trabalhando num modelo de edema de pata em ratos, demonstraram que a EACP ativa a secreção do fator liberador de corticotrofina (CRF) no núcleo paraventricular do hipotálamo, que atua nos receptores CRF, aumentando a liberação de ACTH. Esses mesmos autores sugerem que a EACP ativa os neurônios do núcleo paraventricular a secretar CRF, que por sua vez estimula a liberação de  $\beta$ -endorfina para inibir o estímulo nociceptivo (LI et al., 2008)

Estudo realizado por Wang e colaboradores (2010) mostra que a EACP pode efetivamente reduzir os níveis séricos de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 e IL-4 em ratos com dor inflamatória crônica, contribuindo na antinocicepção. Li e colaboradores (2009) em trabalho com ratos artríticos, concluíram que EACP induz ação imunorreguladora sobre os linfócitos, IL-2 e  $\text{TNF}\alpha$ , tendo ação anti-inflamatória. Em estudo clínico, os autores concluíram que a EACP pode efetivamente tratar a osteoartrite do quadril, aliviando a dor articular e auxiliando no restabelecimento da função (SHENG e FAN, 2010).

Lau et al. (2008), em estudo experimental de dor neuropática em ratos, demonstraram que a EACP poderia reduzir a hipersensibilidade após ligadura de nervo espinhal através da inibição da expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) no corno dorsal da medula espinhal.

Trabalhos têm demonstrado que a acupuntura é eficaz no tratamento da dor miofascial (SUN et al., 2010), cólica renal (LEE et al., 1992), angina pectoris (RICHTER et al., 1991), osteoartrite do joelho (CHRISTENSEN et al., 1992), cefaléia tensional (VINCENT, 1990) e fibromialgia (DELUZE et al., 1992). Entretanto, apesar dessa técnica milenar ser amplamente utilizada em seres humanos, sua aplicabilidade em vários distúrbios dolorosos é desafiado pelo seu variável efeito analgésico, bem

como pelo seu concomitante efeito placebo (AMANZIO e BENEDETTI, 1999) ou expectativa emocional do paciente (THOMAS e LUNDEBERG, 1996).

## **2.6. Opióides endógenos**

A dor sensibiliza receptores periféricos nociceptivos e aumenta a hiperexcitabilidade do SNC em relação à transmissão e modulação da informação nociceptiva.

A existência de opióides endógenos foi sugerida após inferir-se que os receptores de morfina do sistema de analgesia deveriam ser receptores para algum peptídeo natural, semelhante a morfina. Os primeiros opióides endógenos foram isolados em 1975 por Hughes e Kosterlitz, recebendo os nomes de met-euencefalina e leu-encefalina (CARVALHO e AZEVEDO, 2000). Posteriormente, encefalinas, dinorfinas e  $\beta$ -endorfinas foram identificadas. Esses três peptídeos são derivados de três grandes moléculas precursoras de poliproteínas, codificadas por três genes distintos: gene da pró-encefalina, gene da pró-dinorfina e gene da pró-opiomelanocortina (BASBAUM e JESSEL, 2001).

A descoberta dos peptídeos opióides endógenos intensificou as pesquisas em busca do entendimento da analgesia pela acupuntura. As três classes principais de peptídeos opióides,  $\beta$  endorfinas, encefalinas e dinorfinas e seus receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  estão amplamente distribuídos nas terminações nervosas periféricas e áreas do SNC relacionadas a nocicepção e dor, apresentando um importante papel na antinocicepção periférica (ZHANG et al., 2004) e central (BASBAUM e JESSELL, 2001; FIELDS et al., 2005).

A  $\beta$ -endorfina está presente na hipófise anterior, lobo intermediário, em núcleos do hipotálamo basal e medial e células do núcleo do trato solitário (centro simpático primário para os arcos reflexos dos barorreceptores e quimiorreceptores). As encefalinas são encontradas no SNC e na periferia, como medula adrenal, no trato gastrointestinal (especialmente no plexo mientérico), medula espinhal (lâminas I e II de Rexed), diversas regiões supra-espinhais do SNC, em particular corpos celulares do globo pálido, núcleos supra-ópticos e paraventriculares do hipotálamo, amígdala e neocórtex. Por sua ampla distribuição, é suposto um grande número de funções para as encefalinas, mas suas projeções estão ainda incompletamente mapeadas. As dinorfinas foram

identificadas no intestino, hipotálamo, hipófise posterior, tronco encefálico e medula espinhal (GOZZANI, 1994)

A analgesia dos opióides é mediada por uma interação complexa entre os receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ . Em relação a ação supra-espinhal, os receptores  $\mu$  parecem ter influência mais importante, enquanto que os receptores  $\delta$  e  $\kappa$  estão envolvidos com a analgesia espinhal (PASTEMAK et al., 1980)

Os receptores  $\mu$  estão amplamente distribuídos em todo o encéfalo, e suas funções estão relacionadas a integração motora-sensorial e percepção dolorosa. Os receptores  $\delta$  são mais limitados em sua distribuição e encontram-se nas áreas relacionadas à olfação, neocórtex, caudado-putamen, núcleo acumbens e amígdala. Parecem ter papel na integração motora, olfação e função cognitiva. Os receptores  $\kappa$  são observados nos núcleos caudado, putamen e accumbens, amígdala, hipotálamo, neurohipófise, eminência média e núcleo do trato solitário. Suas prováveis funções estão relacionadas com balanço hídrico, ingestão alimentar, percepção dolorosa e atividade neuroendócrina (GOZZANI, 1994).

#### 2.6.1. Acupuntura e sistema opióide

A analgesia promovida pelo uso da acupuntura e/ou EACP tem a participação da liberação dos peptídeos opióides endógenos. (POMERANZ & CHIU, 1976). Mayer e colaboradores (1977) mostraram que a naloxona, um antagonista opióide, reverteu parcialmente o efeito analgésico da EACP em polpa dentária de humanos. Pomeranz e Cheng (1979) mostraram que a naloxona bloqueou a resposta antinociceptiva da EACP em neurônios do corno dorsal da medula espinhal de gatos.

Estudos têm mostrado que a acupuntura aumenta os níveis de endorfinas circulantes no cérebro, medula espinhal e no plasma e que a EACP produz uma maior e mais prolongada liberação da mesma comparada ao uso somente das agulhas (HAN et al., 1999). EACP de frequências diferentes podem desencadear a liberação de neuropeptídeos diferentes no SNC. O uso da EACP de baixa frequência acelera a liberação de encefalinas e  $\beta$  endorfinas para ativar receptores  $\delta$  e  $\mu$  no SNC, enquanto na alta frequência há liberação de dinorfina que irá se ligar a receptores  $\kappa$  na medula espinhal (HAN et al., 1986; HAN et al., 1992). Entretanto, em condições patológicas, os

receptores  $\kappa$  parecem não participar da analgesia por EACP. Em ratos com dor inflamatória, a analgesia produzida por acupuntura de 2 Hz e de 100 Hz é obtida pela ativação de receptores  $\mu$  e  $\delta$ , não havendo participação de receptores  $\kappa$  (ZHANG et al., 2004). Além disso, parece que a analgesia induzida por EACP de baixa ou de alta frequência, parece ser mediada por receptores opióides expressos em diferentes núcleos do cérebro. Pesquisas mostraram que lesões no núcleo arqueado aboliram a analgesia por EACP de baixa frequência, mas não a de alta frequência, enquanto que lesões no núcleo parabraquial aboliram a analgesia induzida por EACP de alta frequência, mas não a obtida pela estimulação de baixa frequência (WANG et al., 1990a, 1990b, 1991).

Estudos têm mostrado a presença de mecanismos periféricos na inibição da dor, o que envolve a participação de hormônios, citocinas e neurotransmissores que interagem nas terminações nervosas periféricas, onde também estão presentes receptores opióides (MACHELSKA e STEIN, 2000 ; JANSON e STEIN, 2003).

Diversos mecanismos parecem contribuir para a analgesia periférica mediada pelo sistema opióide durante o processo inflamatório, incluindo aumento da síntese e de transporte de receptores opióides para a periferia (JI et al., 1995); ativação de proteína G (ZOLLNER et al., 2003) aumentando a entrada do íon  $Ca^{+2}$  e liberação do  $Ca^{+2}$  intracelular via ativação de fosfolipase C (CHAN et al., 2000), bem com também pelo aumento da permeabilidade do perineuro (ANTONJEVIC et al., 1995). Fontes endógenas de peptídeos opióides endógenos foram identificados em células do sistema imunológico, como macrófagos, mastócitos e linfócitos (BRACK et al, 2004), onde a liberação local desses opióides pode ser estimulada por um evento estressante e é mediada por uma variedade de hormônios, como o fator liberador de corticotrofina (CRF) e citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 (SCHÄFER et al. 1994), bem como pela ativação simpática (BINDER et al., 2004).

O número de receptores opióides endógenos é praticamente não detectável na periferia, porém na presença de uma reação inflamatória aguda,  $\beta$  endorfina, met-enkefalina e dinorfina têm sido encontrados em tecidos inflamados, onde nos estágios iniciais do processo inflamatório (até a sexta hora), os sistemas opióides, central e periférico, são ativados para inibir o processo nociceptivo. Nos estágios mais tardios (no quarto dia), a antinocicepção é mediada por  $\beta$  endorfina liberada por leucócitos, atuando em receptores  $\mu$  e  $\delta$  periféricos (CABOT et al., 1997, CABOT et al., 2001).

A acupuntura modula a atividade imunológica e a dor inflamatória (ZHANG et al., 2004) e as células do sistema imune são componentes do sistema opióide periférico. Os mecanismos opióides centrais não explicam o porquê que o agulhamento de um ponto de acupuntura ao lado de uma área dolorosa, uma prática comum na clínica, é geralmente mais eficaz no alívio da dor do que agulhamento à distância, um fenômeno que é consonante com a presença de um mecanismo analgésico periférico localizado (ZHANG et al., 2005).

No manejo da dor, os opióides são largamente utilizados na clínica, porém o seu uso em longo prazo é acompanhado por efeitos colaterais, como sedação, náusea, vômito, constipação e depressão respiratória, que diminuem a qualidade de vida dos pacientes, levando à baixa adesão e à rejeição da terapia (BROWDLIE, 1998). Claramente, alternativas à terapêutica opióide seria clinicamente útil no tratamento de dor persistente. Nos últimos anos, os canabinóides têm surgido como alternativas atraentes ou de suplementos à terapia com opióides no tratamento dos estados crônicos de dor (WALKER & HOHMANN, 2005; PACHER ET AL., 2006).

## **2.7.Sistema Endocanabinóide**

Provavelmente, a *Cannabis sativa* é uma das primeiras plantas não alimentícia utilizada pelo homem, cuja produção foi originalmente introduzida pelo povo oriental, havendo registro do uso de seus derivados há milhares de anos.

Seu uso medicinal foi bastante intenso na Europa no século XIX, quando era utilizada terapeuticamente como ansiolítico, analgésico, anticonvulsivante e antiemético. Entretanto, apesar das potencialidades terapêuticas, no início do século XX sua utilização medicinal sofreu pressões sócio-políticas que culminou com o declínio do seu uso, cessando-se também as pesquisas com a planta e seus derivados (BAKER et al., 2000). Em 1937, o congresso americano editou um decreto, proibindo o cultivo, a comercialização e o uso dos derivados dessa planta (CHALSMA e BOYURN, 1994), no entanto, países como a Inglaterra continuaram a fazer seu uso, alimentando assim, as reivindicações por pesquisas que comprovassem os benefícios observados em condições patológicas (BASKER et al., 2000).

Em 1964, o constituinte majoritário da *Cannabis sativa*, denominado  $\Delta^9$  tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ - THC) foi isolado e identificado (GAONI e MECHOULAM, 1964) e cerca de 60 tipos de canabinóides naturalmente oriundos da *Cannabis* já foram obtidos, como o canabinol, canabidiol, canabigerol, canabiciolol e o canabicromeno (MAKRIYANNIS et al., 2005).

A identificação química dos compostos da *Cannabis*, o estudo da sua farmacologia e toxicologia, foi modificada pelas Nações Unidas para a classe II da Convenção de Drogas Psicotrópicas, incentivando assim o seu uso terapêutico, desde que se tivesse controle em relação a sua produção, comercialização e estocagem. Tal atitude contribuiu para o avanço das pesquisas que buscassem a avaliação do potencial terapêutico e a caracterização dos efeitos fisiológicos dos derivados da *Cannabis* (CARLINI et al., 2004).

Apesar do reconhecimento das propriedades psicoativas e do benefício terapêutico da *Cannabis* e seus derivados, somente em 1984, Howlett e Fleming, desvendaram seu mecanismo de ação, onde seus trabalhos demonstraram que os canabinóides inibem a produção de AMPc em cultura de células, sugerindo um sistema de transdução mediado pela ativação de proteínas G (HOWLETT e FLEMING, 1984). Esta descoberta foi seguida pela identificação e clonagem dos receptores CB1 (MATSUDA et al., 1990). Atualmente são conhecidos dois tipos de receptores canabinóides, CB1 e CB2, embora existam evidências de pelo menos mais um tipo de receptor canabinóide não-CB1, não-CB2 (HOWLETT et al., 2002; PIOMELLI, 2003; PERTWEE, 2005).

### 2.7.1. Receptores canabinóides

Os receptores canabinóides CB1 e CB2 são receptores acoplados à proteína Gi/Go e exercem seus efeitos fisiológicos pela inibição da atividade da adenilato ciclase, com conseqüente diminuição dos níveis intracelulares de AMPc (FELDER et al., 1993; VOGEL et al., 1993). Os receptores CB1 também podem aumentar a condutância de canais de potássio (HENRY e CHAVKIN, 1995; MACKIE et al., 1995) ou diminuir a condutância de canais de cálcio atuando indiretamente pela ativação de proteína G e produção de segundos mensageiros (FELDER et al., 1993; MACKIE et al., 1995; GEBREMEDHIN et al., 1999).

A descoberta dos receptores canabinóides estimulou a busca no cérebro por substâncias semelhantes à maconha, sendo hoje denominadas de endocanabinóides. Devane et al. (1992) identificaram o N-aracnoil- etanolamida como um mediador endógeno e o nomeou como anandamida, que significa “felicidade interna”, que é inativada por recaptação celular e por mecanismos de degradação enzimática (SMITH et al., 2010). Há evidências que este ligante e alguns dos seus metabólitos podem se ligar ao receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TPRV1), que é um canal de cálcio não seletivo, que pode ser ativado pela capsaicina (ABRAHAM et al., 2011). Um segundo endocanabinóide, denominado 2- aracnoil-glicerol (2-AG) foi identificado por Mechoulam e colaboradores (1995) e Sugiura e colaboradores (1995). Ambos os compostos apresentam afinidade para os receptores CB1 e CB2. Apesar de outros neurotransmissores, os endocanabinóides não são armazenados em vesículas secretoras, mas parecem ser gerados em demanda, como consequência do aumento da concentração de cálcio intracelular a partir do influxo de  $Ca^{+2}$  ou da mobilização do  $Ca^{+2}$  armazenado dentro das células ( Di MARZO et al., 1994). Todas as enzimas necessárias para a síntese dos endocanabinóides foram encontradas no meio intracelular, apesar de muitos canabinóides exercerem seus efeitos biológicos através da ligação a receptores de membrana no lado extracelular ( KRESS e KUNER, 2009).

Os opiáceos e os endocanabinóides exercem seus efeitos e causam analgesia, sedação, hipotermia, imunomodulação, depressão motora e redução da motilidade intestinal. Estes efeitos são mediados por receptores opióides e canabinóides distintos, que são acoplados a proteína G e principalmente, por ativar  $G_i / G_o$  proteínas (CHILDERS, 1991; HOWLETT et al., 2002), sendo que os principais efeitos intracelulares do receptor CB1 e o receptor  $\mu$  incluem ativação dos canais de cálcio e redução dos níveis de AMPc, que leva à inibição da liberação do neurotransmissor ( SMITH et al., 2007).

Os receptores CB1 estão principalmente expressos em neurônios do SNC e periférico (HOHMANN e HERKENHAM, 1999; FARQUHAR-SMITH et al., 2000), embora possam ser expressos em células e tecidos não neuronais, como na hipófise, células do sistema imune e tecidos do sistema reprodutor (HOWLETT et al., 2002), enquanto os CB2 são expressos principalmente nas células do sistema imune (MUNRO et al., 1993; FACCI et al., 1995), embora tenham sido também identificados em células da micróglia (PERTWEE, 2004).



Estudos sugerem que os receptores canabinóides estão presentes em pontos-chave para a via modulatória da dor, como a terminação periférica e central de aferentes primários, neurônios de segunda ordem localizados no corno dorsal da medula espinhal, circuitos neuronais no tronco encefálico e áreas do cérebro relacionadas a discriminação sensorial, estados afetivos e respostas emocionais relacionadas ao processo doloroso (FREUND et al., 2003; PACHER et al., 2006). Trabalhos têm demonstrado que a ativação dos receptores canabinóides nesses diferentes *loci* podem reduzir a transmissão nociceptiva, porém as contribuições relativas dos receptores CB1, CB2, respectivamente, e da ação dos canabinóides atuando em sítios periféricos e centrais para obtenção do efeito analgésico permanece incerto (WALKER e HOHMANN, 2005)

Pesquisas têm mostrado que os opióides endógenos medeiam a antinocicepção promovida pelos canabinóides. A antinocicepção promovida pelo  $\Delta^9$ -THC parece ser modulada através de receptores opióides  $\mu$  a nível supra-espinhal, enquanto receptores  $\kappa$  modulam essa resposta a nível espinhal (WALKER e HOHMANN, 2005). Estudos também demonstram uma interação sinérgica na resposta antinociceptiva ao administrar morfina e  $\Delta^9$ -THC (WALKER e HOHMANN, 2005).

A eficácia da ação antinociceptiva dos canabinóides tem sido demonstrada em modelos experimentais de dor inflamatória e neuropática (WALKER e HOHMANN, 2005). Em humanos, a ativação de receptores canabinóides no SNC está associada a efeitos colaterais como perda de memória temporária e dependência (PACHER et al., 2006). Tais efeitos estimulam o desenvolvimento de estratégias que suprimam ou reduzam sua ação sobre as funções motoras e cognitivas, sem comprometer seu efeito analgésico.

Receptores CB1 são expressos em neurônios do gânglio da raiz dorsal (AHLUWALIA et al., 2002), em astrócitos nas lâminas I e II da raiz dorsal da medula espinhal (SALIO et al., 2002), além disso, altos níveis de receptores CB1 são encontrados no hipocampo, núcleos da base e cerebelo, áreas relacionadas predominantemente com memória e coordenação motora (WALKER e HUANG, 2002).

Receptores canabinóides CB1 também estão presentes em alta densidade em áreas relacionadas a modulação descendente da dor, tais como matéria cinzenta periaquedutal e camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, a partir do qual são transportados ao nível central e para terminais periféricos de neurônios primários aferentes (HOHMANN e HERKENHAM, 1999). Pesquisas sugerem que a

ativação de agonistas dos receptores CB1 protegem os neurônios da excitotoxicidade causada pelos receptores ácido N-metil- D- aspartato (NMDA) e que essa neuroproteção pode ser causada através da inibição da liberação pré-sináptica do glutamato (SHEN e THAYER, 1998), inibição da liberação intracelular dos íons  $Ca^{+2}$  (ZHUANG et al., 2005), atividade antioxidante (MARSICANO et al., 2002), ou geração de óxido nítrico (KIM et al., 2006).

A localização dos receptores CB2, principalmente nas células do sistema imune, levou a comunidade científica a despertar para o desenvolvimento de agonistas desse receptor que atua seletivamente fora do SNC, no intuito de produzir alívio da dor, com menores efeitos colaterais. Pesquisas têm mostrado que a ativação desses receptores podem causar antinocicepção periférica, inibindo a hiperalgesia inflamatória (QUARTILHO et al., 2003). A ativação dos receptores CB2 nas células do sistema imune pode inibir a liberação de moléculas que sensibilizam os nociceptores periféricos, como o fator de crescimento neural (NGF) (WOOLF et al., 1994). Os mediadores inflamatórios, IL-1 $\beta$  e TNF, são essenciais para a produção da hiperalgesia inflamatória, mas estes parecem contribuir para esse estado pelo aumento do conteúdo de NGF no tecido inflamado (WOOLF e ALCHORNE, 1997).

Estudos em animais têm demonstrado que a ativação dos receptores canabinóides atenuam inflamação e processos nociceptivos em modelos de inflamação cutânea e articular (ELMES et al., 2005; QUARTILHO et al., 2003) e que os receptores CB1 e CB2, bem como os endocanabinóides, anandamida e 2-AG, estão presentes na sinóvia de pacientes portadores de osteoartrite e artrite reumatóide, sugerindo que o sistema canabinóide pode ser um importante alvo terapêutico para o tratamento da dor e inflamação associadas a essa patologia (RICHARDSON et al, 2008). Apesar dos estudos relatarem a participação do sistema endocanabinóide na modulação da nocicepção em modelos de animais e em humanos, o seu papel na analgesia por acupuntura ainda é objeto de investigação.

Wang e colaboradores (2009) relatam que o pré-tratamento com EACP aumenta a produção de anandamida e 2-AG. Chen e colaboradores (2009) sugerem que a EACP potencializa a liberação de anandamida em tecidos inflamados, contribuindo assim no efeito antinociceptivo da EACP em modelo de dor inflamatória em ratos.

### 3. Justificativa

Nos últimos anos a ATM vem sendo objeto de inúmeras pesquisas, o que tem mudado dogmas mantidos no passado. Revistas especializadas nessa área têm alcançado cada vez mais o interesse da classe odontológica. No nosso país temos, desde 2001, uma especialidade odontológica denominada Dor Orofacial e Disfunção Temporomandibular. A temática vem ganhando evidência em congressos e temas como: oclusão, DTM, envolvimento multidisciplinar nos tratamentos das DTM, fisioterapia e medicina no tratamento, dores orofaciais, dentre outros, vêm ganhando merecido destaque.

DTM é a maior causa de dor de origem não dentária na região orofacial e sua etiologia é de caráter multifatorial. É reconhecida por gerar impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, comprometendo as atividades diárias, a qualidade do sono, a alimentação levando a busca por tratamentos reversíveis, menos invasivos e com menores efeitos colaterais. Dentro desse aspecto, observamos que a acupuntura vem se inserindo como importante recurso para o tratamento das DTMs.

Trabalhos sobre os mecanismos de ação da acupuntura revelam estreita relação entre os efeitos da acupuntura e o sistema nervoso central e o periférico. Há evidências científicas de que o estímulo nocivo causado por uma agulha de acupuntura pode proporcionar um efeito analgésico significativo, pela ativação do sistema inibitório descendente, onde é reconhecida cientificamente a participação dos peptídeos opióides endógenos.

Na literatura atual, é crescente o número de publicações relacionando o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da acupuntura e/ ou eletroacupuntura com a ativação dos canabinóides endógenos e receptores canabinóides. Adicionalmente, a constatação da presença dessas substâncias na sinóvia de pacientes portadores de osteoartrite e artrite reumatóide, nos motivou a investigar a participação do sistema endocanabinoide no efeito antinociceptivo e antiinflamatório da eletroacupuntura em um modelo de artrite experimental aguda na ATM de ratos. Essa investigação torna-se importante adicionando novas evidências moleculares ao mecanismo de ação da acupuntura, fornecendo subsídios para a utilização dessa técnica no tratamento das desordens inflamatórias da ATM.

## **OBJETIVOS**

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da EACP no modelo de artrite induzida por zymosan na ATM de ratos, investigando a participação do sistema endocanabinóide.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- Investigar o efeito antinociceptivo da EACP de baixa frequência na hipernocicepção mecânica induzida por zymosan na ATM de rato;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório da EACP de baixa frequência na artrite experimental aguda induzida por zymosan na ATM de rato, analisando os seguintes parâmetros: migração de neutrófilos para a região da ATM, aumento de permeabilidade vascular, análise histopatológica e imunexpressão tissular de citocinas pró- inflamatórias na região articular e periarticular;
- Averiguar o efeito do pré-tratamento e do pós-tratamento da EACP de baixa frequência sobre a nocicepção e sobre os parâmetros inflamatórios citados;
- Investigar a participação do sistema endocanabinóide nas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da EACP na artrite experimental aguda induzida por zymosan na ATM de rato;
- Avaliar o efeito modulatório da EACP sobre a expressão do RNAm dos receptores canabinoides CB1 e CB2 no núcleo espinal trigeminal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **5. Materiais e métodos**

### **5.1. Animais**

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos, com peso oscilando entre 180- 220g, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará- UFC e mantidos no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) em gaiolas de polipropileno recebendo água e comida *ad libitum*, em sala climatizada, com exaustão de gases e redução de ruídos. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC através do protocolo 27/10.

### **5.2. Indução da artrite na ATM**

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0.03 mg/kg, i.p.) e receberam injeção intra- articular de zymosan (2 mg, 40 µl total volume) (CHAVES et al., 2011) dissolvida em solução salina estéril dentro da ATM esquerda, utilizando para isso uma agulha de calibre 30 e seringa de 1ml.

Antes das injeções de zymosan ou de solução salina, a região da pele do animal ao redor da ATM esquerda foi cuidadosamente depilada.

Foi feita a palpação da borda pósterio-inferior do arco zigomático e a agulha foi inserida inferiormente a esse ponto e direcionada no sentido medial e anterior até a agulha tocar o côndilo. Esse contato é aferido através da realização do movimento mandibular e a inserção da agulha na cavidade articular é confirmada pela perda de resistência ao movimento. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 6 ou 24h após a injeção de zymosan e os parâmetros inflamatórios e nociceptivos foram avaliados (CHAVES et al., 2011).

### 5.3. Grupos Experimentais

Cada grupo experimental constou de 6 animais por grupo.

- Normal- grupo de animais não tratados.
- Zymosan( ZY)- 2 mg, 40 µl total volume, ATM esquerda.
- Salina- 40 µl total volume, ATM esquerda.
- Morfina- 5mg/kg, i.p.
- EACP- ZY( 2 mg, 40 µl total volume, ATM esquerda) + tratamento com EACP nos acupontos IG4, IG11, E36, E44 (f = 10 Hz, tempo de repetição = 1 s, intensidade = 3 mA).
- Sham- ZY (2 mg, 40 µl total volume, ATM esquerda) + tratamento com EACP em pontos na região glútea (f = 10 Hz, tempo de repetição = 1 s, intensidade = 3 mA).
- EACP+AM251- ZY (2 mg, 40 µl total volume, ATM esquerda) +AM251(3mg/kg, i.p., 10 min antes do tratamento com EACP) + tratamento com EACP nos acupontos IG4, IG11, E36, E44 (f = 10 Hz, tempo de repetição = 1 s, intensidade = 3 mA).
- EACP+AM630- ZY ( 2 mg, 40 µl total volume, ATM esquerda) + AM630 (3mg/kg, i.p., 10 min antes do tratamento com EACP) tratamento com EACP nos acupontos IG4, IG11, E36, E44 (f = 10 Hz, tempo de repetição = 1 s, intensidade = 3 mA).

### 5.4. Hipernocicepção Mecânica (teste nociceptivo)

O limiar de nocicepção do animal foi obtido através do registro da intensidade de força aplicada na região da ATM, necessário para obtenção de uma resposta reflexa (movimento de retirada da cabeça). Para isso, o aparelho Von Frey eletrônico (Analgesímetro Digital, Insight, São Paulo, Brasil), que é um transdutor de força que mede o limiar de nocicepção em gramas (g), foi aplicado perpendicularmente na região a ser avaliada.

Os animais foram submetidos a sessões de condicionamento ao teste de hipernocicepção mecânica durante os 5 dias que antecederiam a realização do



experimento. Os animais eram mantidos durante 20 min em caixas plásticas e submetidos a aplicação do aparelho Von Frey na região da ATM esquerda.

Um observador foi treinado para a aplicação gradual de pressão na região da ATM do animal e o aparelho era automaticamente removido e o registro da pressão em gramas era obtido assim que o animal realizasse o movimento de retirada da cabeça (DENADAI-SOUZA et al., 2009). É importante ressaltar que esse observador não tinha conhecimento do tipo de tratamento que os animais receberiam.

No sexto dia, antes da avaliação da hipernocicepção, os animais eram tricotomizados na região ao redor da ATM esquerda e eram mantidos em repouso durante 20 min em caixas plásticas. O limiar de nocicepção basal do animal era obtido antes da injeção intra-articular de zymosan ou solução salina e novamente na 4ª h e 6ª h após a indução da artrite aguda.

### **5.5. Aplicação da EACP**

Antes da realização do experimento, os animais foram treinados 5 dias antes da realização do mesmo em camas de contenção especialmente confeccionadas e mantidos nas mesmas durante 20 min. No sexto dia, a artrite da ATM era induzida pela injeção intra-articular do zymosan. Após o tempo de 2h, os animais foram colocados nas camas de contenção, onde ficavam com as patas dianteiras e traseiras, bem como a cauda expostas. Em outro grupo, EACP foi realizada 1h antes da indução da artrite.

Durante a realização da EACP, os animais não foram submetidos a nenhuma técnica anestésica (HUANG et al., 2008; GONDIM et al 2010).

Para este estudo experimental, os animais foram submetidos ao tratamento por EACP, utilizando agulhas de acupuntura com 0,7 mm de diâmetro, inseridas bilateralmente na profundidade de 3 mm nos pontos de acupuntura IG4, IG11, E36 e E44 ou em pontos *sham*, situados na região glútea situados 5 mm lateral e 5 mm abaixo do ponto VB30. O ponto acupuntural IG4 está localizado entre o primeiro e segundo ossos do metacarpo. O ponto IG11 está localizado na prega transversal radial, quando o cotovelo está flexionado, próximo ao epicôndilo lateral do úmero. O ponto E36 está localizado na superfície craniolateral da perna, distal a cabeça da tíbia numa depressão entre o músculo tibial anterior e extensor longo dos dedos. O ponto E44 está localizado no dorso do pé, numa reentrância entre as cabeças do segundo e terceiro metatarso.

Os acupontos e os pontos *sham* foram estimulados bilateralmente com baixa frequência e pulsos retangulares ( $f = 10$  Hz, tempo de repetição = 1 s, intensidade = 3 mA) (LI et al, 2009; GARRIDO- SUAREZ et al., 2009) usando para isso o aparelho para EACP NKL EL 530 (NKL Produtos Eletrônicos LTDA, Santa Catarina, Brasil). O tratamento com EACP foi realizado 1h antes ou 2 h após a injeção de zymosan e foi aplicada durante 30 min.

Morfina (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 10 min. antes da realização do teste nociceptivo em um grupo de animais que não foram submetidos ao tratamento por EACP.

### **5.6. Coleta do fluido sinovial, ATM e tecidos periarticulares**

Para a coleta do fluido sinovial, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. A pele ao redor da ATM foi retirada e o músculo temporal foi cuidadosamente dissecado. Uma agulha de calibre 30 foi inserida através da região posterior da membrana sinovial e a cavidade articular foi lavada por injeção e imediata aspiração de 50 $\mu$ l de um tampão fosfato-salino (PBS) adicionado a 10mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O procedimento de lavagem foi repetido e foi retirado 20  $\mu$ l dos fluidos coletados para a contagem de células e o restante foi estocado a 70°C para a posterior avaliação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) (DENADAI-SOUZA et al., 2009).

Para a retirada da ATM e tecidos periarticulares os ratos foram sacrificados como descrito acima na 6<sup>a</sup> h após a indução da artrite por zymosan. A pele na região da ATM foi removida, o músculo temporal que recobre a articulação foi cuidadosamente dissecado e a ATM e região periarticular foram removidas. Os tecidos foram fixados em solução de formol tamponado a 10% durante 24 h e desmineralizados em solução de EDTA a 10%. Após a desmineralização as peças foram desidratadas e parafinadas. Foram feitos cortes histológicos ao longo do eixo da ATM para a realização de análise histopatológica e imunohistoquímica

### **5.7. Aplicação dos antagonistas canabinóides**

Os antagonistas canabinóides AM 251 (antagonista CB1) e AM 630(antagonista CB2) (3mg/kg, i.p., Tocris Bioscience, Bristol), assim como o veículo (dimetilsulfóxido a 4%), foram administrados 10 min. antes do tratamento com EACP (Figura 3).

A hipernociceção mecânica foi avaliada na 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> horas após a indução da artrite pelo zymosan. Após a 6<sup>a</sup> hora, os animais foram sacrificados e a ATM foi removida para análise histopatológica (Figura 3).

## Protocolo Experimental

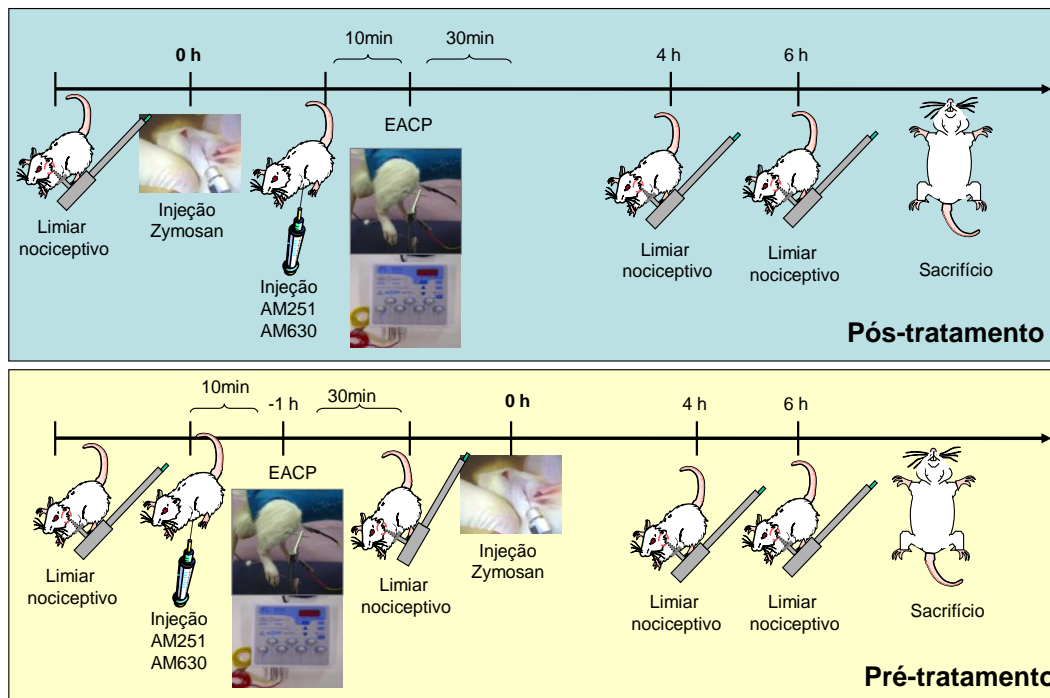


Figura 3. Protocolo Experimental para administração dos antagonistas AM251 e AM630

### 5.8. Avaliação da migração de células para a cavidade articular (contagem de células e atividade de MPO)

Para contagem de células, 20 µl do fluido sinovial coletado foi diluído em 380 µl de solução de Turk. O número total de células brancas foi determinado através de um hemocitômetro (câmara de Neubauer).

O lavado articular coletado previamente foi descongelado, diluído em solução fosfato (pH 6,0) contendo brometo de hexadecil-trimetilamônio e centrifugado em 12,000 x g durante 2 min. A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi medida no sobrenadante de acordo com o método descrito previamente por Bradley e colaboradores (1982). Os resultados são expressos por unidade (U) de MPO por articulação, onde 1 U de MPO é definida como a quantidade de enzima responsável pela degradação de 1  $\mu$ mol de peróxido de hidrogênio/ min, na temperatura de 22°C.

### **5.9. Avaliação do aumento de permeabilidade vascular**

Os animais receberam injeção intravenosa (veia peniana) do corante azul de Evans (25 mg/kg) dissolvido em solução salina 30 min antes do sacrifício (6h após a indução da artrite pelo zymosan). A região da ATM foi dissecada, a ATM removida e pesada. O corante presente no tecido foi extraído por imersão do tecido durante a noite em 2 ml de solução de formamida PA.

A quantidade de corante presente na solução de formamida foi estimada pela absorbância espectrofotométrica a 630 nm. A concentração foi determinada por comparação com uma curva padrão de quantidades conhecidas do corante azul de Evans na solução de extração, que foi avaliada dentro do mesmo ensaio. A quantidade de corante ( $\mu$ g) foi então calculada por mililitro de exsudado (KWAN et al., 1996).

### **5.10. Análise histopatológica**

Secções de 5  $\mu$ m, que incluíam o cômulo, cartilagem articular, disco articular, membrana sinovial e tecido periarticular foram examinados através da microscopia de luz (microscópio Leica). Os espécimes foram corados por hematoxilina- eosina (HE) e os cortes foram avaliados por um examinador cego para o tratamento. Escores de 0-4 foram dados de maneira semi-quantitativa e os seguintes parâmetros foram avaliados: influxo celular na membrana sinovial, influxo celular no tecido periarticular e espessura da membrana sinovial (CHAVES et al., 2011).

### **5.11. Imunohistoquímica para TNF $\alpha$ , ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (NOSi)**

Imunohistoquímica para TNF $\alpha$ , COX-2 e NOSi foi realizada pelo método de streptavidina-biotina-peroxidase em cortes de parafina. O tecido extraído e parafinado foi cortado em secções de 4  $\mu$ m de espessura e montados em lâminas para microscopia revestidas em poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinizados com xileno, reidratados com gradações decrescentes de etanol e depois água. Após recuperação antigênica, com tampão de citrato (pH 6,0, tempo: 15 min.) a 95° C, a peroxidase endógena foi bloqueada duas vezes (10 min) com 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio e a seguir lavadas em PBS. As secções foram incubadas durante a noite (4° C) com os seguintes anticorpos primários feitos em cabra: anti-TNF $\alpha$  e anti COX2 de rato e com o anticorpo primário feito em coelho anti-NOSi de rato (Santacruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos) na diluição 1:100 em PBS acrescido de albumina sérica bovina (BSA 5%).

As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas durante 30 min com os anticorpos biotinizados anti-IgG de coelho ou de cabra (Santacruz Biotechnology, Califórnia, Estados Unidos), na diluição de 1:400 em PBS-BSA 5%. Após lavagem, as lâminas foram incubadas durante 30 min com complexo ABC, um conjugado de avidina-peroxidase (Strep ABC complex, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A imunocoloração foi visualizada com o cromógeno 3, 3'-diaminobenzadina (DAB) com peróxido de hidrogênio. Foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Mayer, e em seguida os cortes foram desidratados em uma série graduada de álcool, diafanizados em xilol e cobertos com lamínula. Secções de controle negativo também foram realizadas simultaneamente, de acordo com o protocolo descrito, porém com o anticorpo primário substituído por PBS-BSA 5%.

A análise por imunohistoquímica consistiu da rotulagem positiva para TNF, COX2 e NOSi determinada pela coloração marrom ao nível do citoplasma das células sinoviais. Cada grupo era composto por 6 animais. Os cortes foram avaliados por um examinador cego para o tratamento. Escores de 0-4 foram dados de maneira semi-quantitativa, de acordo com a marcação: 0- ausência de marcação; 1- fraca marcação sobre a camada de sinoviócitos e sobre o tecido conjuntivo; 2- marcação moderada na camada de sinoviócitos e no tecido conjuntivo; 3- marcação intensa na camada de

sinoviócitos e moderada marcação no tecido conjuntivo; 4- intensa marcação na camada de sinoviócitos e no tecido conjuntivo (GONDIM et al., 2012).

## **5.12. Análise da expressão gênica dos receptores CB1 e CB2**

### **5.12.1. Extração do trato espinhal trigeminal: região do subnúcleo caudal**

Animais submetidos a indução da artrite foram anestesiados com hidrato cloral (0,4ml/ 100g) e decapitados na 6<sup>a</sup> hora ou na 24<sup>a</sup> hora após a injeção do zymosan na ATM. O cérebro e tronco cerebral foram removidos e a região do trato espinhal do trigêmeo foi dissecada e imediatamente congelada em nitrogênio líquido. A quantidade média de tecido isolado por amostra foi de 100 mg. Os tecidos foram pesados e armazenados a -80° C até o momento da extração. RNA total foi isolado de cada amostra utilizando o Mini Kit RNeasy ( Qiagen, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. As secções utilizadas nesse estudo foram cortadas -10,5mm a -14,04 mm a partir do bregma (PAXINOS e WATSON, 1998).

### **5.12.2. Isolamento do RNA Total**

Resumidamente, a amostra foi homogeneizada com Trizol (reagente de lise Qiazol Qiagen, Estados Unidos), utilizando um disruptor de células composto por uma ferramenta de velocidade própria (Dremel 300-N/10, Mexico) e uma haste metálica rotativa. Após o rompimento da membrana e a liberação do ácido ribonucléico (RNA) para o meio, a solução foi centrifugada a 20.000g durante 5 min. e então, 200µl de 1-bromo, 3- cloro-propano (BCP - Fluka, Estados Unidos) foram adicionados ao sobrenadante.

Após a homogeneização e centrifugação (15,000 g, 15min, 4° C), o conteúdo do tubo de 2 ml é separado em 3 fases e o RNA impuro é localizado na fase límpida superior. O passo seguinte consta na montagem do RNA impuro numa coluna de separação, objetivando a remoção de impurezas e, para tanto, álcool 70% e solução tampão RW1 e RPE foram utilizados para lavagens sucessivas do RNA preso a coluna.

A eluição de alta pureza do ácido nucléico ocorre em água livre de RNase. O RNA obtido é quantificado no Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

### 5.12.3. Reação Transcriptase Reversa

Para avaliar a expressão do gene CB1 e CB2, cDNA é construído a partir do RNA isolado por uma reação com uma enzima, transcriptase reversa (SuperScript™ III Reverse Transcriptase System, Invitrogen, Estados Unidos). As amostras de RNA (1 µg) foram incubadas em 4 µL de 5X iScript™ Reaction Mix e 1 µL of iScript™ Reverse Transcriptase (Bio-Rad, USA) com água Milli-Q completando para um volume total de 20 µL por reação. As condições para construção do cDNA foram: 25° C por 5 min, 42° C por 30 min, seguidos de um ciclo final de 85° C por 5 min. O cDNA sintetizado foi mantido em um freezer a - 20° C até sua amplificação por uma reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real Time- PCR).

### 5.12.4. PCR em tempo real (Real Time- PCR, RT-qPCR)

A expressão do gene CB1 e CB2 foi obtida por meio do sistema de detecção em tempo real (iQ5 Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, Estados Unidos). Fosfolipase A2 (ativação da proteína zeta-polípeptídeo pela tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase) foi utilizada como gene de referência (YHWAZ). Os iniciadores de DNA de todos os genes foram desenhados nas bases de sequência de DNA obtida do Centro Norte- Americano de Informação Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; acesso em 4 de Junho de 2010) (Tabela 1). Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados em um volume final de 25 µl de um meio contendo 12.5 µL SYBRGreen Supermix (solução padrão para amplificação com reagentes, contendo SYBRGreen, DNA polimerase, dNTPs e solução salina em concentrações ótimas para PCR em tempo real) 200 nm de primers e 1 µL de cada amostra de cDNA. Amostras negativas também foram testadas, com o cDNA sendo substituído por água Mili-Q autoclavada.

As condições do PCR foram as seguintes: um período de desnaturação inicial de 3 min. a 95° C, seguida por 40 ciclos de amplificação dos genes. Cada ciclo consistiu de uma fase de desnaturação inicial de 30 seg a 95° C, seguida por uma fase de anelamento

de 30 seg. a 61° C e uma fase de extensão de 45 seg. a 72° C. A captação de fluorescência ocorreu a cada ciclo na fase de extensão. Os dados obtidos foram armazenados e analisados pelo software iQ5 Optical System (versão 2.0, Bio-Rad), a fim de avaliar o ciclo limiar (*threshold cycle*, CT) em que a fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência basal para cada ensaio de RT-qPCR. A expressão do gene foi obtido pela aplicação do método matemático de Pfaffl (PFAFFL, 2001), proporcionando a comparação entre a amplificação dos genes de estudo e a amplificação do gene de referência em cada amostra. As amostras foram submetidas a uma etapa de extensão final por 3 min. a 72° C. Para fins de cálculo, ainda segundo Pfaffl (2001), a eficiência de cada amplificação gênica foi determinada, onde a reação foi avaliada em uma dada amostra e 4 diluições seriadas decrescentes (10X) para obtenção dos valores de eficiência, R da curva e slope.

Para a confirmação da especificidade dos produtos amplificados obtidos (amplicons), foi construída uma curva de fusão para cada reação: a temperatura de 1° C a cada 20 seg. com início na temperatura de anelamento do iniciador em questão, alcançando 95° C, gerando desnaturação gradual dos amplicons. As alterações de fluorescência foram medidas, no intuito de se obter a temperatura de fusão (melting temperature, TM) de cada reação, determinando assim a especificidade da amplificação pela obtenção de um pico único em cada reação. Além disso os amplicons foram avaliados quanto ao seu tamanho por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 01. Sequência oligonucleotídeos dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR

Gene	Alvo	Sequência do Primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Banco de genes	Referência
YHAWZ	<i>Rattus norvegicus</i> tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	F- GCTACTTGGCTGA GGTTGCT R- TGCTGTGACTGGT CCACAAT	61	NM_0130 11.3	CHEN et al., 2007
CB1r	<i>Rattus norvegicus</i> neuronal cannabinoid receptor 1	F- CTACGTGGGCTCG AATGACA	151	U40395.1	MARTIR E et al,



		R- GACCAACGGGGAG TTGTCTC			2011
CB2r	<i>Rattus norvegicus</i> peripheral (macrophage) cannabinoid receptor 2	F- GCCTGGTCATGGC TGTCTG R- CAGCAGAGCGGAT CTCTCCA	186	NM_0011 64143.1	ZHANG et al, 2010

*F: iniciador senso; R: iniciador anti-senso.*

### 5.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  EPM das medidas registradas a partir de 6 animais por grupo. Para comparação das médias, foi feita análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Turkey. Para comparação entre duas médias foi utilizado o teste t de Student. Para os dados não-paramétricos, os resultados foram expressos como mediana (mínimo - máximo) e analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunns. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **RESULTADOS**

## 6- Resultados

### 6.1. Efeito da EACP sobre a hipernocicepção mecânica da artite por zymosan

A hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intra-articular do zymosan reduziu o limiar nociceptivo na 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> horas após a administração do agente pro-inflamatório. Nenhuma diferença significativa foi observada entre esses dois pontos ( $p > 0,05$ ).

Na 4<sup>a</sup> hora após a indução da artite, os grupos tratados com EACP, morfina e *sham* mostraram diferença significativa em relação ao grupo tratado com zymosan (111.6%, 86,2 % e 73,9%, respectivamente;  $p < 0,001$ ), e significativa diferença foi encontrada entre os grupos EACP e *sham* (17.8%,  $p < 0,05$ ).

Na 6<sup>a</sup> hora após a injeção do zymosan, os grupos tratados com EACP, morfina e *sham* apresentaram em relação ao grupo de animais tratado com zymosan, resposta antinociceptiva (130.9%, 83,7%, 50.1%, respectivamente;  $p < 0,001$ ). Na 6<sup>a</sup> hora, o grupo tratado com EACP mostrou uma maior resposta antinociceptiva ( $p < 0,001$ ), comparado aos grupos *sham* (34.9%) e morfina (20.4%). Adicionalmente, nesse tempo houve diferença estatística entre os grupos *sham* e morfina (18.27%,  $p < 0,01$ ; Figura 4).

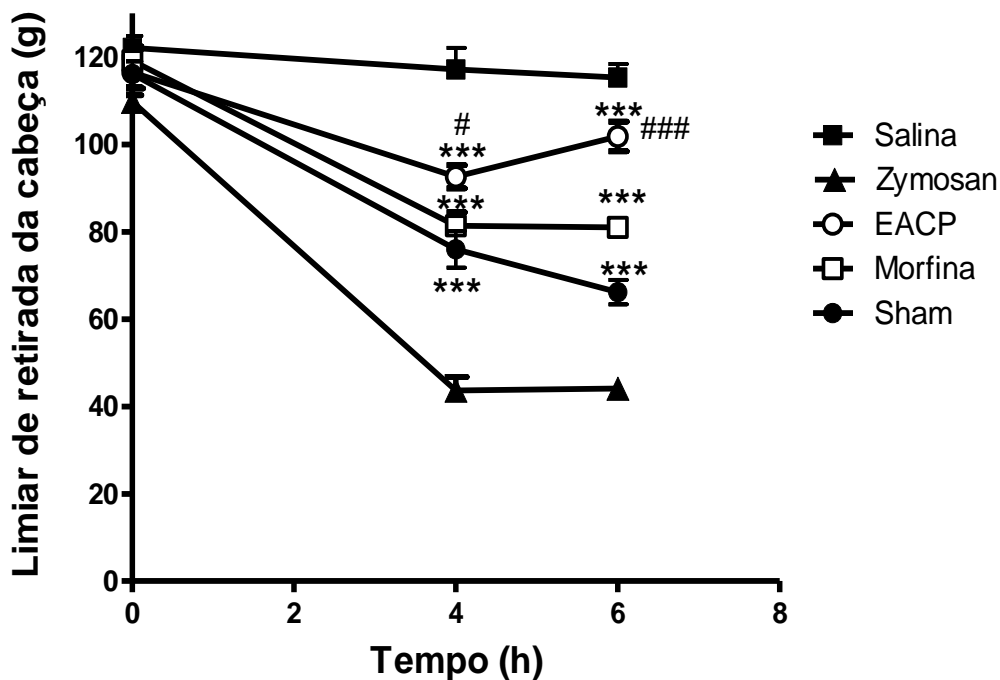
Quando os grupos tratados com EACP e *sham* foram submetidos a esses procedimentos previamente a indução da artrite pela injeção intra-articular do zymosan, houve um incremento no limiar nociceptivo na 4<sup>a</sup> hora após a injeção do zymosan, comparando-se com o controle positivo (EACP, 184.32%,  $p < 0,001$ ; *Sham*, 53.93%,  $p < 0.001$ ).

Diferença significativa também foi encontrada ao se comparar a resposta antinociceptiva dos grupos EACP quando a mesma foi realizada previamente e após a indução da artrite pela injeção do zymosan. Os grupos mostraram diferença estatística (25,4%,  $p < 0,001$ ), e o grupo tratado previamente com EACP mostrou um maior efeito antinociceptivo quando comparado ao grupo zymosan. (184.3% vs. 111.8%).

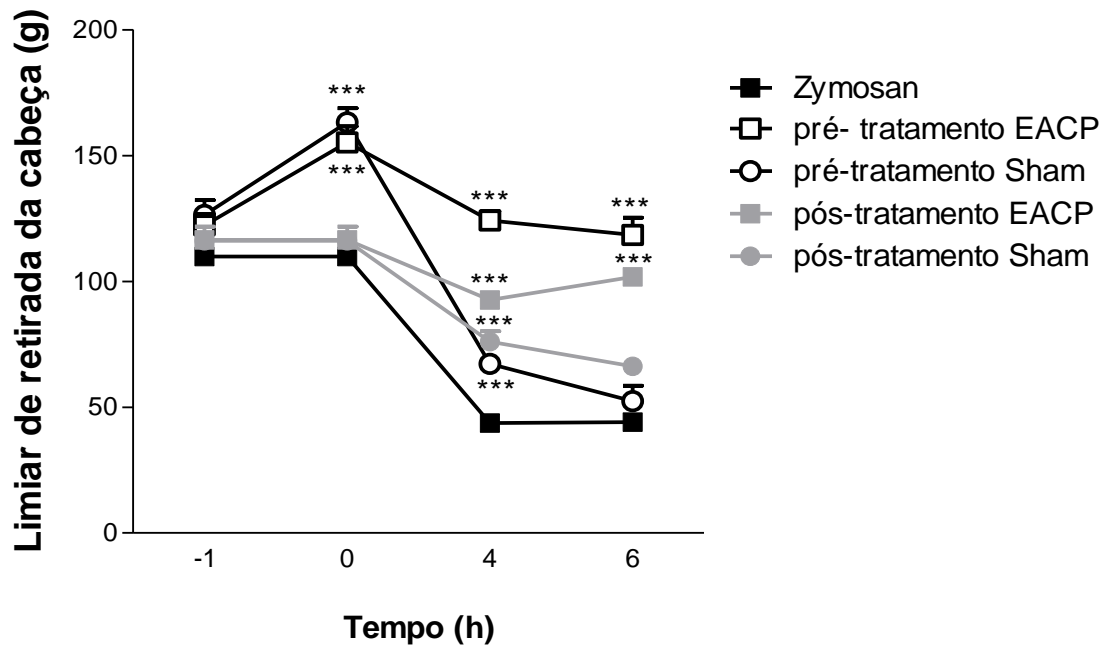
Seis horas após a indução da artrite pelo zymosan, o pré-tratamento com EACP mostrou efeito antinociceptivo, (168.82% comparado ao grupo zymosan,  $p < 0.001$ ), porém não houve diferença estatística entre os grupos tratados com EACP (antes e após a indução da artrite) nesse tempo (Figura 5).

Interessantemente, o limiar nociceptivo dos animais dos grupos EACP e *sham* tratados com esses procedimentos antes da injeção intra-articular de zymosan,

apresentou aumento de 26,9% e 29,1%, respectivamente, quando comparados ao tempo basal, antes da realização dos tratamentos (Figura 5).



**Figura 4. Avaliação do efeito antinociceptivo da EACP na artrite induzida pelo zymosan na ATM de ratos.** O limiar nociceptivo (limiar de remoção da cabeça) foi medido antes (zero hora) e na 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> hora após administração de salina( i. art., ATM esquerda) ou zymosan (2mg, i. art., ATM esquerda). Zymosan ou salina foi administrada imediatamente após a primeira tomada do limiar nociceptivo. Os animais foram tratados com EACP (30 min, 10 Hz, 3 mA, 2 h após administração do zymosan), morfina (5 mg/ kg, i.p., 10 min. antes do zymosan). O grupo *sham* recebeu EACP em pontos na região glútea(30 min, 10 Hz, 3 mA, 2 h após administração do zymosan). Os dados representam a média de  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. Os asteriscos representam a diferença significativa entre o grupo zymosan e os outros grupos ( $***p < 0.001$ , ANOVA seguido do teste Turkey). Os sinais de libra indicam diferenças significativas entre os grupos EACP e *sham* ( $\#p < 0.05$ ,  $###p < 0.001$ ).



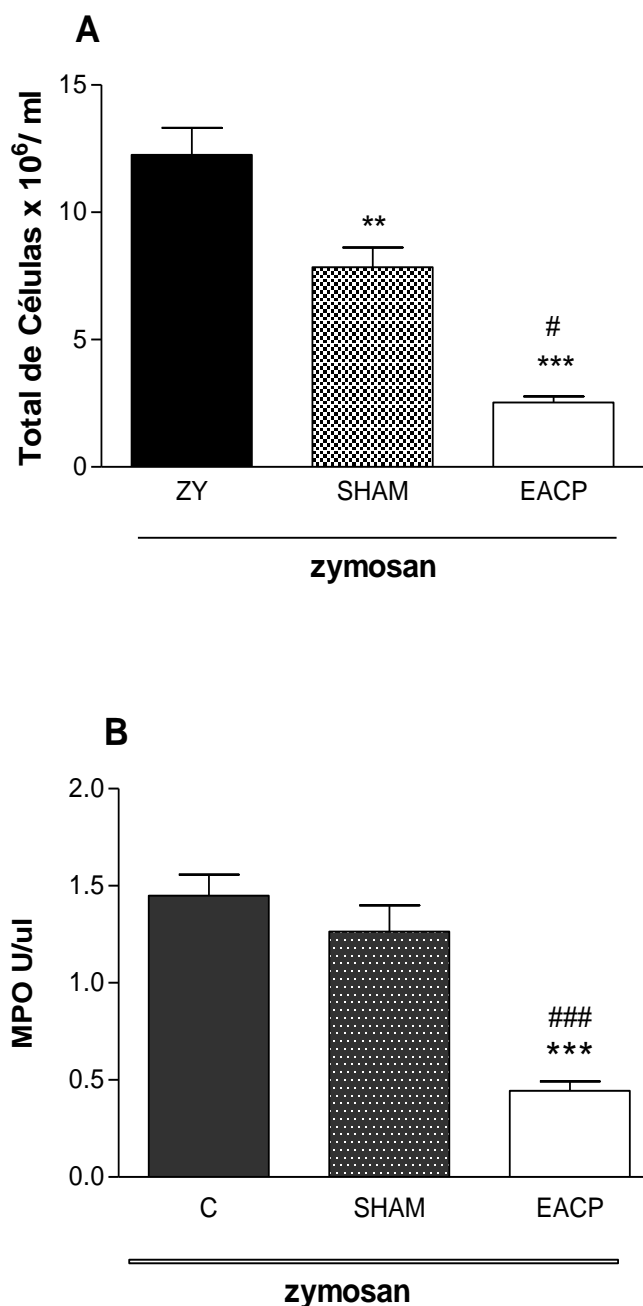
**Figura 5. Avaliação do efeito antinociceptivo da EACP antes e após a indução da artrite pelo zymosan na ATM de ratos.** O limiar nociceptivo (limiar de remoção da cabeça) foi medido 1h antes do tratamento por EACP (-1h), imediatamente antes da anestesia e administração do zymosan (0h) e na 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> h após administração do zymosan (2mg, i. art., ATM esquerda). Os animais foram tratados com EACP (30 min, 10 Hz, 3 mA) 1 h antes do zymosan. O grupo *sham* recebeu EACP em pontos não acupunturais (pontos na região glútea, 30 min, 10 Hz, 3 mA) 1 h antes do zymosan. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. Os asteriscos representam diferença significativa entre o grupo zymosan e os outros grupos (\*\*\*)  $p < 0.001$ , ANOVA seguido do teste Turkey). Os sinais de libra indicam diferença significativa entre os grupos EACP e *sham* (###)  $p < 0.001$ , ANOVA seguido do teste Turkey).

## 6.2. Efeito da EACP na migração de células

Na sexta hora após a injeção do zymosan, os animais foram sacrificados e o líquido sinovial foi removido. Em seguida, foi feita a contagem de células brancas e a detecção enzimática da mieloperoxidase. Os grupos de animais tratados com EACP e *sham* demonstraram uma significativa inibição (EACP, 79,3%,  $p < 0,001$ ; *sham*, 36%,  $p < 0,05$ ) da migração celular, mas essa resposta foi significativamente maior no grupo tratado com EACP quando comparado ao grupo *sham* ( $p < 0,05$ ) (Figura 6A).

MPO é abundantemente expressa nos grânulos azurófilos dos neutrófilos polimorfonucleares e é considerado um marcador da atividade neutrofílica. O aumento dos neutrófilos foi detectado através do aumento da atividade enzimática da MPO no lavado do fluido sinovial.

Nossos dados demonstraram que somente o grupo tratado com EACP inibiu significativamente a atividade da MPO (70.1%,  $p < 0,001$ ; Figura 6B).



**Figura 6. Efeito da EACP sobre a migração celular no líquido sinovial da ATM após indução da artrite pelo zymosan.** Migração celular foi obtida do fluido articular 6h após a administração do zymosan (C, 2 mg, i.art., ATM esquerda). Os animais foram tratados com EACP (30min., 10 Hz, 3mA) 2h após administração do zymosan. (A)- Contagem total de células brancas do fluido articular. (B)- Dosagem da atividade da MPO no fluido articular. As barras representam média de  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. Os asteriscos representam a significativa diferença entre o grupo zymosan (C) e os demais grupos ( $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ , ANOVA seguido pelo teste de Turkey). Os sinais de libra indicam a significativa diferença observada entre os grupos EACP e sham ( $\#p < 0.05$ ,  $###p < 0.001$ , ANOVA seguido pelo teste de Turkey).

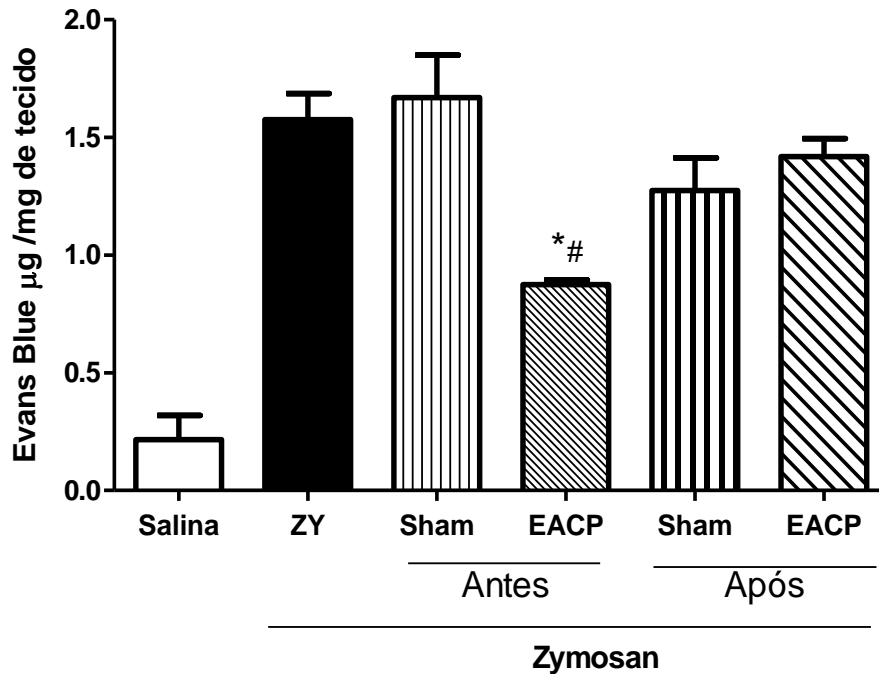


### 6.3. Efeito da EACP na permeabilidade vascular

A permeabilidade vascular pôde ser detectada através do extravasamento do azul de Evans e quantificada por espectrofotometria após as amostras de tecido articular terem ficado por 24h em solução de formamida, em temperatura ambiente para extração do corante.

A injeção de zymosan causou extravasamento do azul de Evans (647,6%) quando comparado a injeção intra-articular de solução salina.

Os grupos de animais tratados com EACP e *sham*, que foram submetidos a esses tratamentos 2h após a injeção intra-articular de zymosan não demonstraram diferença significativa ao se comparar com o grupo controle (Figura 7). No entanto, quando EACP foi realizada como pré-tratamento (1h antes da indução da artrite pelo zymosan), significativa diferença estatística foi observada entre os grupos EACP e ZY (44.5% de inibição,  $p < 0.05$ ). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos *sham* e ZY ( $p > 0.05$ ; Figura 7).

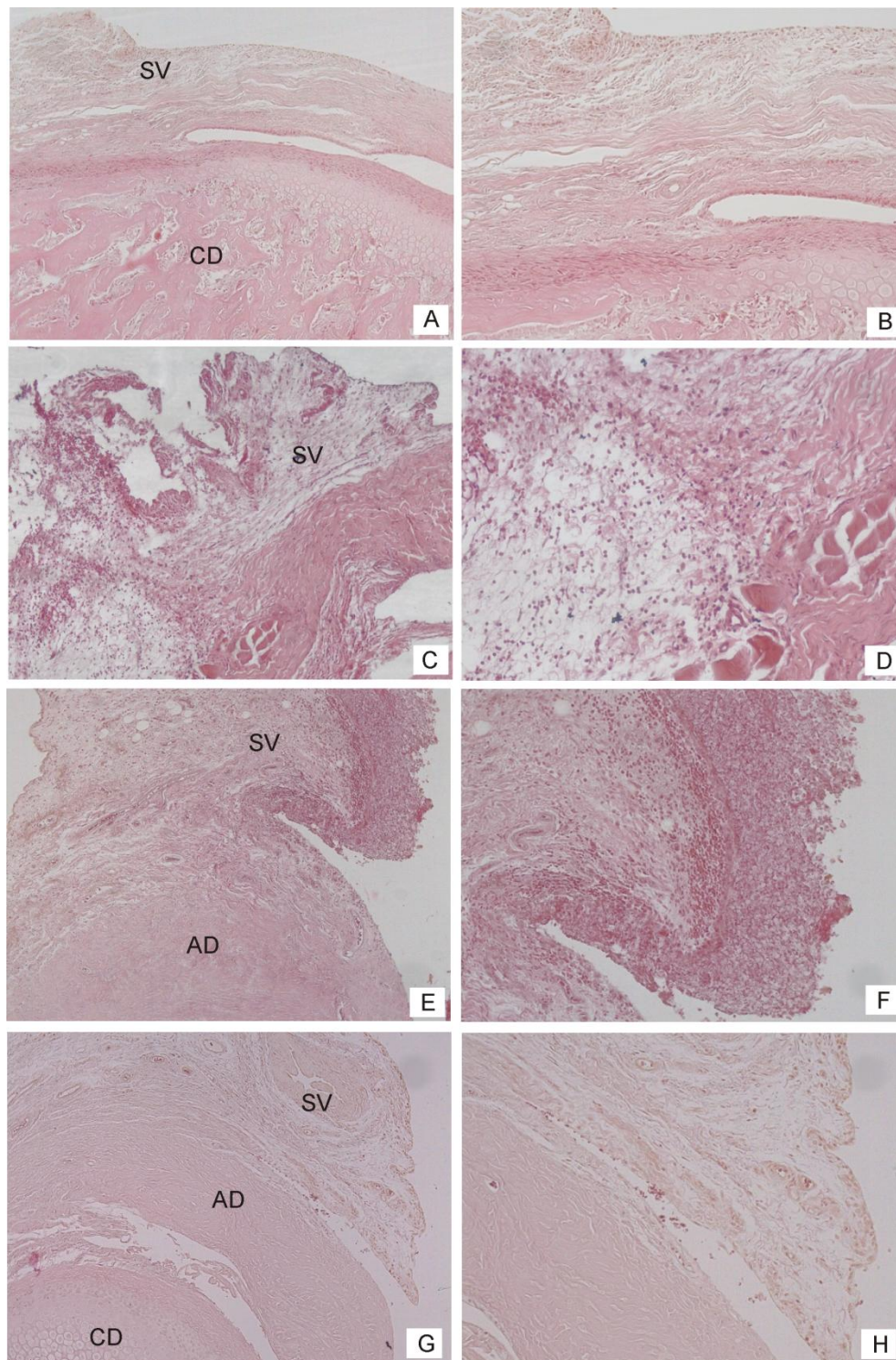


**Figura 7. Efeito da EACP sobre a permeabilidade vascular na ATM de ratos após a indução da artrite pelo zymosan.** A permeabilidade vascular foi obtida após administração de salina (Salina, i. art., ATM esquerda) ou zymosan (ZY, 2 mg, i. art. ATM esquerda) pelo extravasamento do Azul de Evans na ATM e tecido periarticular. Os animais foram tratados com EACP (30 min, 10 Hz, 3 mA) 1h antes ou 2 horas após a injeção de zymosan. O grupo *sham* recebeu EACP em pontos na região glútea (30 min, 10 Hz, 3 mA) 1 h antes ou 2 h após administração de zymosan. Os asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos zymosan (ZY) e os outros grupos ( $*p < 0.05$ , ANOVA seguido pelo teste de Turkey). Os sinais de libra significam a diferença significativa entre os grupos EACP e *sham* ( $\#p < 0.05$ , ANOVA seguido pelo teste de Turkey).

#### 6.4. Análise histopatológica do efeito da EACP

Seis horas após a indução da artrite da ATM pela injeção intra-articular de zymosan, o influxo de células inflamatórias foi maior no grupo zymosan e este foi determinado através de escores, analisando-se a membrana sinovial, o tecido periarticular, bem como a espessura da membrana sinovial (Tabela 2 e 3). Os tipos celulares observados foram predominantemente neutrófilos, característico de inflamação aguda (Figuras 8 e 9).

Os resultados da análise histopatológica dos diferentes grupos são observados na Tabela 2 e 3. Significante decréscimo do infiltrado articular foi observado no grupo tratado com EACP ( $p < 0.01$ ) e *sham* ( $p < 0.05$ ) quando comparado ao grupo ZY. EACP também inibiu significativamente o infiltrado celular na membrana sinovial e o edema sinovial ( $p < 0.05$ ), mas o grupo *sham* não diferiu nesses parâmetros do grupo controle (Tabela 2).



**Figura 8. Fotomicrografias da análise histopatológica da ATM e do tecido periarticular no pós-tratamento com EACP (A e B) ATM- Normal (aumento de 100X e 200X, respectivamente). (C e D) ATM de rato com artrite induzida por zymosan 2mg (aumento de 100X e 200X, respectivamente). (E e F) ATM de rato com artrite induzida por zymosan 2mg (aumento de 100X e 200X, respectivamente) tratados com procedimento *sham* . (G e H) ATM de ratos com artrite induzida por zymosan 2mg após tratamento com EACP nos acupontos (30 min., 10 Hz, 3mA, 2h após a indução da artrite) (aumento de 100X e 200X, respectivamente) SV- sinóvia; AD- disco articular; CD- côndilo da mandíbula.**

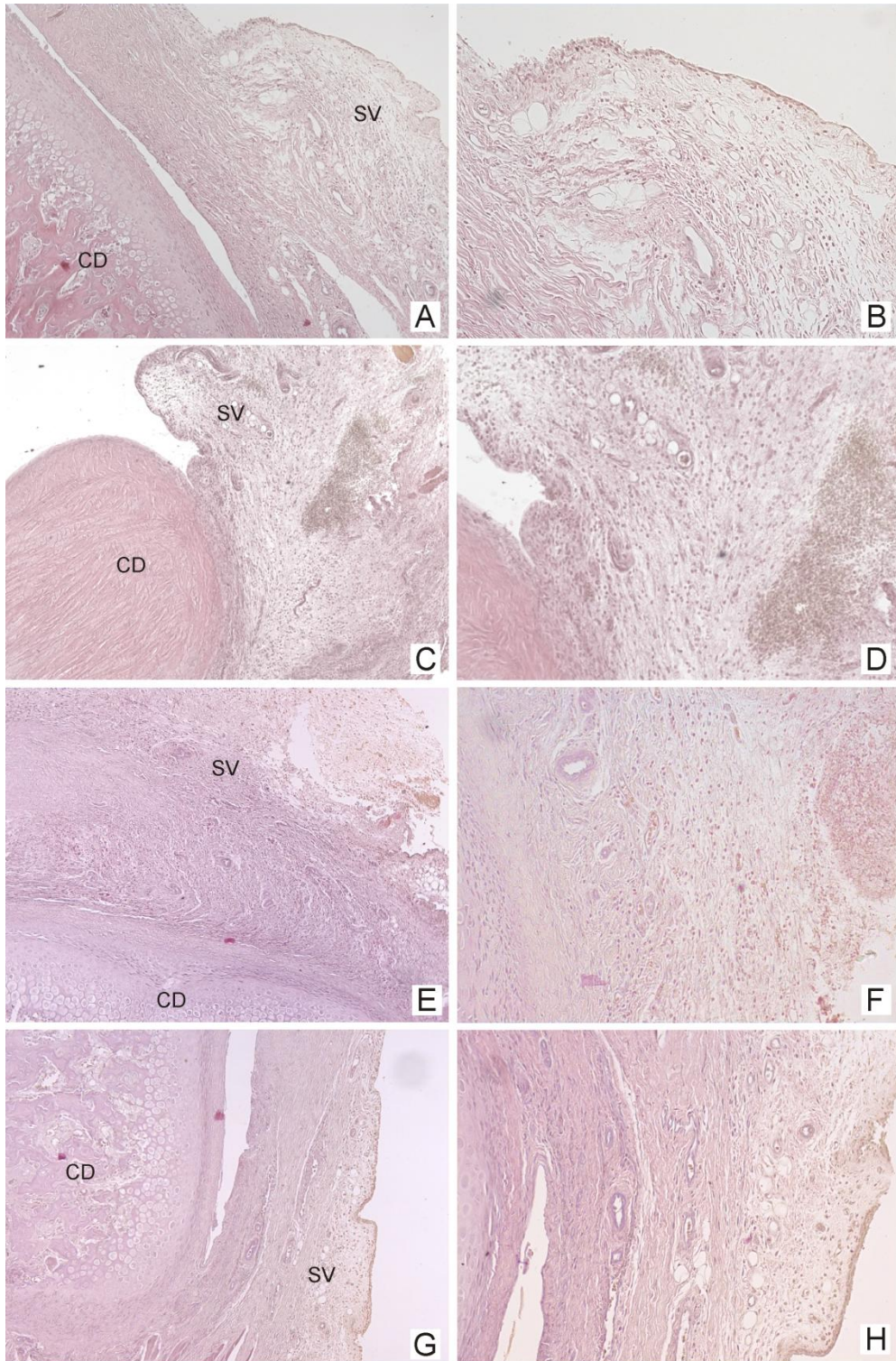


**Tabela 2.** Análise da histopatologia da membrana sinovial e tecido periarticular na ATM após indução da artrite pelo zymosan e pós- tratamento com EACP

	<b>Infiltrado Celular na Membrana Sinovial</b>	<b>Espessura da Membrana Sinovial</b>	<b>Infiltrado Celular Periarticular</b>
<b>Salina</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
<b>ZY</b>	2 (2-4)	4 (2-4)	4 (3-4)
<b>Sham</b>	2 (2-4)	2.5 (2-3)	3 (2-4)*
<b>EACP</b>	0 (0-2)*,#	0 (0-2)*	1 (0-2)**,#

A ATM e tecido periarticular foram removidos 6h após a administração de salina ou zymosan( 2mg, i. art., ATM esquerda). Os animais foram tratado com EACP (30 min, 10 Hz, 3 mA) 2 h após a injeção de zymosan. O grupo *sham* recebeu EACP em não-acupontos na região glútea (30 min, 10 Hz, 3 mA) 2 h após o zymosan . Os dados são apresentados como variação de escores e a mediana dessa variação para o n de 6 animais por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , comparado ao grupo ZY; # $p < 0.05$ , comparado ao grupo *Sham* (Teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).





**Figura 9. Fotomicrografias da análise histopatológica da ATM e do tecido periarticular no pré-tratamento com EACP (A e B) ATM- normal (aumento de 100X e 200X, respectivamente). (C e D) ATM de rato com artrite induzida por zymosan 2mg (aumento de 100X e 200X, respectivamente). (E e F) ATM de rato com artrite induzida por zymosan 2mg (aumento de 100X e 200X, respectivamente) tratados com procedimento *sham* . (G e H) ATM de ratos com artrite induzida por zymosan 2mg após tratamento com EACP nos acupontos (30 min., 10 Hz, 3mA, 1h antes da indução da artrite) (aumento de 100X e 200X, respectivamente). SV- sinóvia; CD- cõndilo da mandíbula.**





**Tabela 3. Análise da histopatologia da membrana sinovial e tecido periarticular na ATM após indução da artrite pelo zymosan e pré-tratamento com EACP**

	<b>Infiltrado Celular na Membrana Sinovial</b>	<b>Espessura da Membrana Sinovial</b>	<b>Infiltrado Celular Periarticular</b>
<b>Salina</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
<b>Zymosan</b>	3 (2-4)	3 (3-4)	4 (3-4)
<b>Sham</b>	3 (2-4)	3 (3-4)	3 (2-4)
<b>EACP</b>	1 (0-2)*,#	0 (0-2)**,#	1 (0-2)**

ATM e tecido periarticular foram removidos 6h após a administração de salina ou zymosan ( 2mg, i. art., ATM esquerda). Os animais foram tratado com EACP (30 min, 10 Hz, 3 mA) 1 h antes da injeção de zymosan. O grupo *sham* recebeu EACP em não-acupontos na região glútea (30 min, 10 Hz, 3 mA) 1 h antes do zymosan . Os dados são apresentados como variação de escores e a mediana dessa variação para o n de 6 animais por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , comparado ao grupo zymosan; # $p < 0.05$ , comparado ao grupo *Sham* (Teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).

## 6.5. Avaliação imunohistoquímica do efeito da EACP sobre a imun expressão de TNF, COX-2 e NOSi

A análise imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , COX-2 e NOSi mostrou um aumento na imun expressão de TNF $\alpha$ , COX-2 e NOSi, que foi caracterizado pela marcação de células com coloração acastanhada nos ratos com artrite na ATM induzida pela injeção de zymosan, comparando-se com animais normais.

Os tipos celulares que mais expressam TNF- $\alpha$ , COX-2 e NOSi são as células sinoviais e os condrócitos do disco e cartilagem articular.

Não foi evidenciado imunomarcção para nenhum dos anticorpos testados nas lâminas utilizadas como controle negativo, onde o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

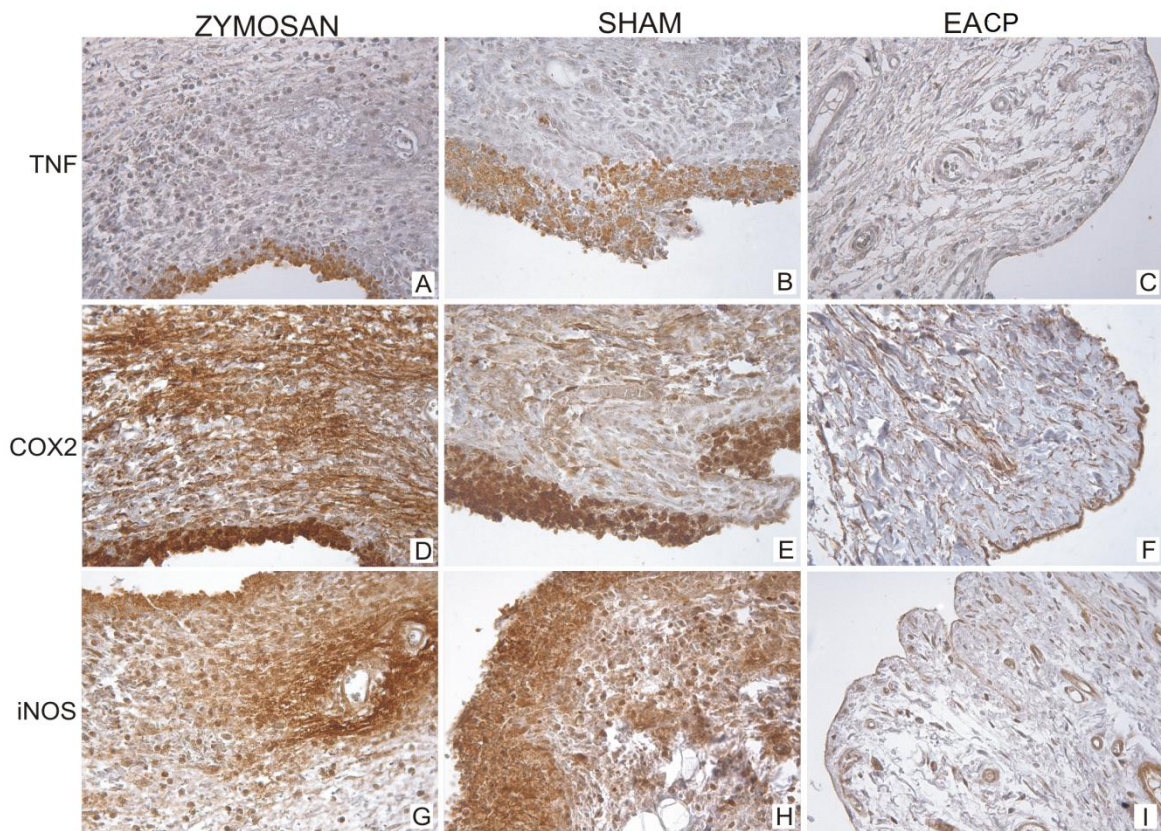
Observou-se intensa marcação para TNF- $\alpha$ , COX-2 e NOSi na ATM do grupo zymosan, 6 h após a injeção intra-articular do zymosan (Figura 9- A, D e G; Tabela 4), principalmente nas células sinoviais e nos condrócitos do disco e cartilagem articular.

O grupo EACP apresenta fraca imunomarcção para TNF- $\alpha$ , COX-2 e NOSi (Figura 9- C, F e I) em relação aos grupos *sham* ( Figura 9- B, E e H) e zymosan (Figura 9- A, D e G).

A Tabela 4 mostra dados da imunomarcção para TNF- $\alpha$ , COX-2 e NOSi na membrana sinovial da ATM após indução da artrite pela injeção do zymosan.

Observou-se diferenças estatísticas nos escores atribuídos para imunomarcção para TNF- $\alpha$ , COX-2 e NOSi entre os grupos EACP e zymosan (Tabela 4).

O grupo EACP apresentou marcação para NOSi significativamente menos intensa em relação ao grupo *sham*. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos *sham* e EACP no que diz respeito a imunomarcção para TNF- $\alpha$  e COX-2.



**Figura 10. Fotomicrografias da imunohistoquímica no tecido sinovial para TNF $\alpha$ , COX2 e NOSi (A, D, G) Imunohistoquímica para TNF $\alpha$ , COX-2 e NOSi de tecido sinovial, respectivamente, em ratos submetidos a indução de arite na ATM por zymosan ( aumento de 400 $\times$ ). (B, E, H) Imunohistoquímica para TNF $\alpha$ , COX-2 e NOSi de tecido sinovial, respectivamente, em ratos submetidos a indução de arite na ATM por zymosan e tratados com procedimento *sham*( aumento de 400 $\times$ ). (C, F, I) Imunohistoquímica para TNF $\alpha$ , COX-2 and NOSi de tecido sinovial, respectivamente, em ratos submetidos a indução de arite na ATM por zymosan e tratados com EACP (aumento de 400 $\times$ ).**

**Tabela 4.** Análise da imunexpressão de TNF $\alpha$ , COX-2, and NOSi na membrana sinovial após indução da artrite pelo zymosan e tratamento com EACP

	<b>TNF</b>	<b>COX-2</b>	<b>NOSi</b>
<b>Salina</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
<b>Zymosan</b>	3 (2-3)	4 (4-4)	4 (4-4)
<b>Sham</b>	2 (2-3)	3 (3-4)	4 (4-4)
<b>EACP</b>	0 (0-2)*	2 (2-3)**	2 (2-3)*#

A ATM e tecido periarticular foram removidos 6 h após administração de salina ou zymosan(2 mg, i.art., ATM esquerda). Os animais foram tratados com EACP (30 min, 10 Hz, 3 mA) 2h após o zymosan . O grupo *sham* recebeu EACP em não-acupontos na região glútea (30 min, 10 Hz, 3 mA) 2h após o zymosan. Os dados são apresentados como variação de escores e a mediana dessa variação para o n de 6 animais por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparado ao grupo Zymosan; # $p < 0.05$ , comparado ao grupo *sham* (Teste Kruskal-Wallis test seguido pelo teste de Dunn).

## 6.6. Participação dos receptores canabinóides no efeito antinociceptivo da EACP

No intuito de verificar a participação do sistema endocanabinóide no efeito antinociceptivo da EACP investigou-se o efeito dos antagonistas dos receptores canabinóides CB1 (AM251) e CB2 (AM630), tanto quando a EACP foi utilizada como pré-tratamento, assim como, quando utilizada como pós-tratamento.

Na 4ª hora após a indução da artrite, foi verificado que a administração de AM630 não reverteu o efeito antinociceptivo da EACP e apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo zymosan (96,85%,  $p < 0,001$ ). Nesse mesmo tempo, foi verificado que o tratamento com AM 251 reverteu o efeito antinociceptivo da EACP ( $p < 0,001$ ; 43,6%) e não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo zymosan. AM251 apresentou menor resposta antinociceptiva quando comparado a administração de AM630 ( $p < 0,001$ ; 55%) (Figura 11).

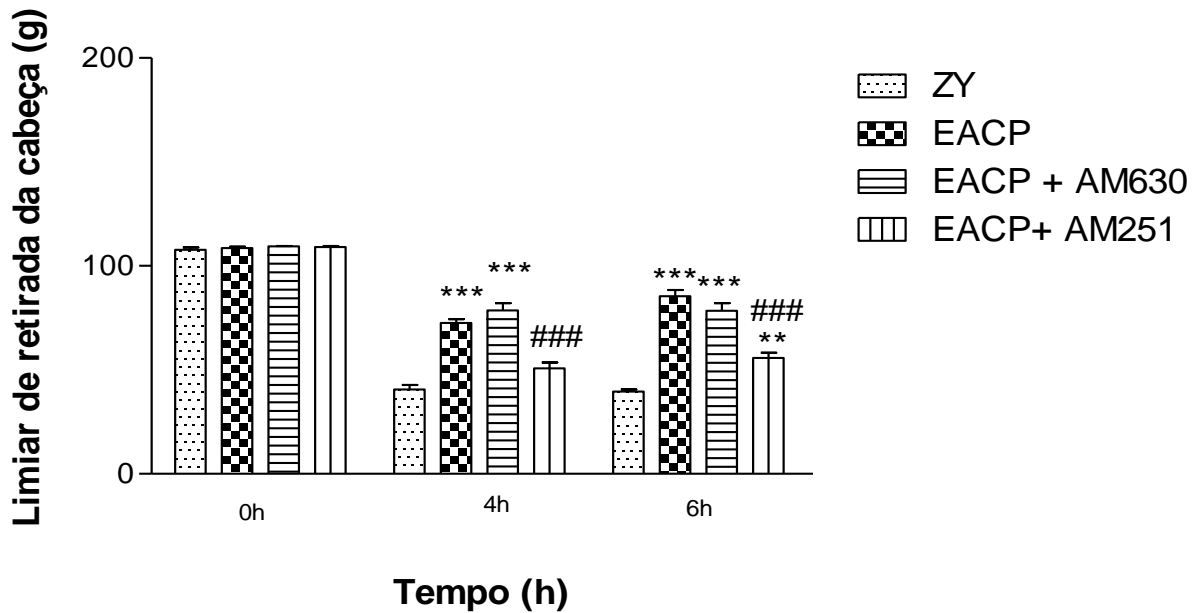
Seis horas após a injeção do zymosan, AM630 não afetou a resposta antinociceptiva obtida com o tratamento com EACP. Nesse mesmo tempo, foi observado significativa diferença entre os grupos zymosan e os grupos que receberam tratamento com EACP e antagonistas canabinóides. AM630 aumentou o limiar nociceptivo (99,17%;  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo zymosan e nesse tempo, AM251 também foi estatisticamente diferente do grupo zymosan (70,42%,  $p < 0,01$ ). AM630 apresentou maior efeito antinociceptivo comparado ao grupo tratado com AM251 (71%,  $p < 0,001$ ) (Figura 11).

Em outro experimento, os antagonistas foram administrados 10 min antes do tratamento com EACP e a EACP foi realizada previamente a indução da artrite (Figura 12). Na 4ª hora, AM630 (154%;  $p < 0,001$ ) e AM251 (91%;  $p < 0,01$ ) aumentaram o limiar nociceptivo quando comparado ao grupo zymosan .

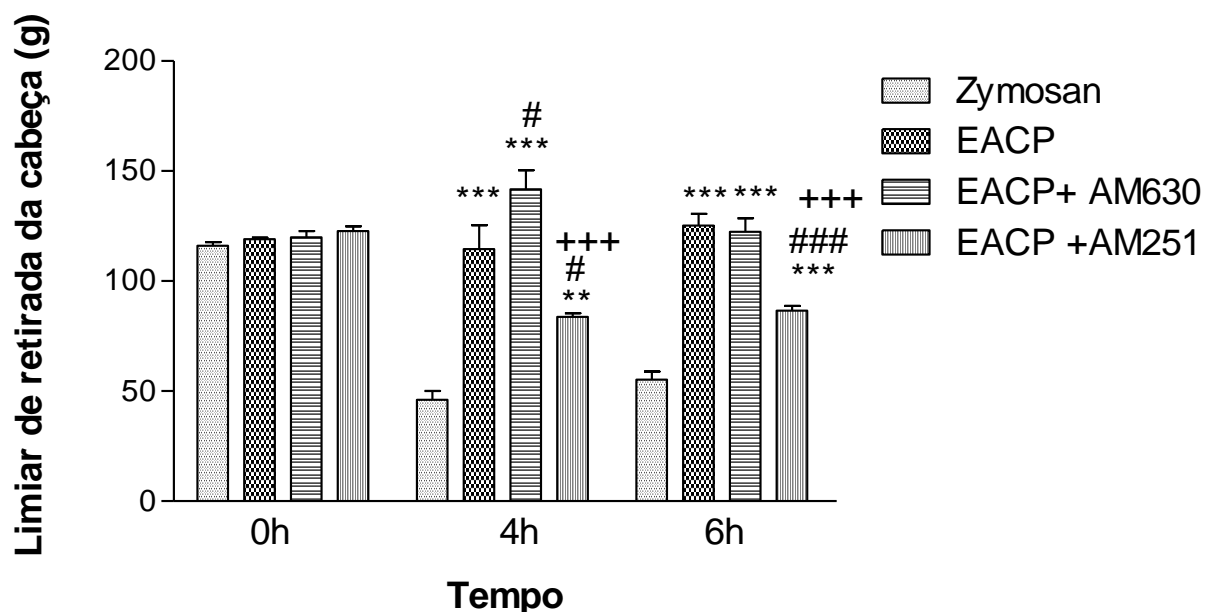
Nesse mesmo tempo, foi observada diferença estatística entre os grupos tratados com EACP e EACP +AM630 ( $p < 0,05$ ; 23,9%), sendo essa associação a que apresentou maior limiar nociceptivo. EACP apresentou maior resposta antinociceptiva quando comparada ao tratamento com AM251 ( $p < 0,05$ ; 59,1%). AM251 apresentou menor resposta antinociceptiva quando comparada ao AM630 ( $p < 0,001$ ; 69,25%) (Figura 12).

Durante a 6ª hora, diferença estatística foi observada entre os grupos zymosan e os tratados com EACP, EACP+ AM 630 e EACP+ AM251 ( $p < 0,001$ ; 113,3%, 110,6%, 78,4%, respectivamente). Nessa mesma hora, AM630 não reverteu o efeito

antinociceptivo da EACP e AM251 inibiu a resposta antinociceptiva da EACP ( $p < 0,001$ ; 44,63%) ( Figura 12).



**Figura 11. Avaliação do efeito dos antagonistas canabinóides AM630 e AM251 sobre o efeito antinociceptivo do pós-tratamento com EACP.** O limiar nociceptivo (limiar de remoção da cabeça) foi medido antes (tempo zero), na 4ª e na 6ª h após administração do zymosan. EACP (30 min, 10 Hz, 3 mA) foi realizada 2 h após a administração do zymosan. Os antagonistas canabinóides AM630 e AM251 foram administrados 10 min antes da aplicação da EACP. Os asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos zymosan e os outros grupos (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA seguido pelo teste de Turkey). Os sinais de libra significam a diferença significativa entre os grupos EACP e EACP+AM251(### $p < 0.001$ , ANOVA seguido pelo teste de Turkey).



**Figura 12. Avaliação do efeito dos antagonistas canabinóides AM630 e AM251 sobre o efeito antinociceptivo do pré-tratamento com EACP.** O limiar nociceptivo (limiar de remoção da cabeça) foi medido antes (tempo zero), na 4ª e na 6ª h após administração do zymosan. EACP (30 min, 10 Hz, 3 mA) foi realizada 1 h antes da administração do zymosan. Os antagonistas canabinóides AM630 e AM251 foram administrados 10 min antes da aplicação da EACP. Os asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos zymosan e os outros grupos (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA seguido pelo teste de Turkey). Os sinais de libra significam a diferença significativa entre os grupos EACP e os grupos EACP + AM630 e EACP + AM251 (# $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$ , ANOVA seguido pelo teste de Turkey). As cruces representam a significativa diferença entre os grupos EACP + AM630 e EACP + AM251 ( +++  $p < 0.001$ , ANOVA seguido pelo teste de Turkey).

## **6.7 Análise histopatológica do efeito os antagonistas canabinoides AM251 e AM630 sobre o efeito antiinflamatório da EACP na ATM**

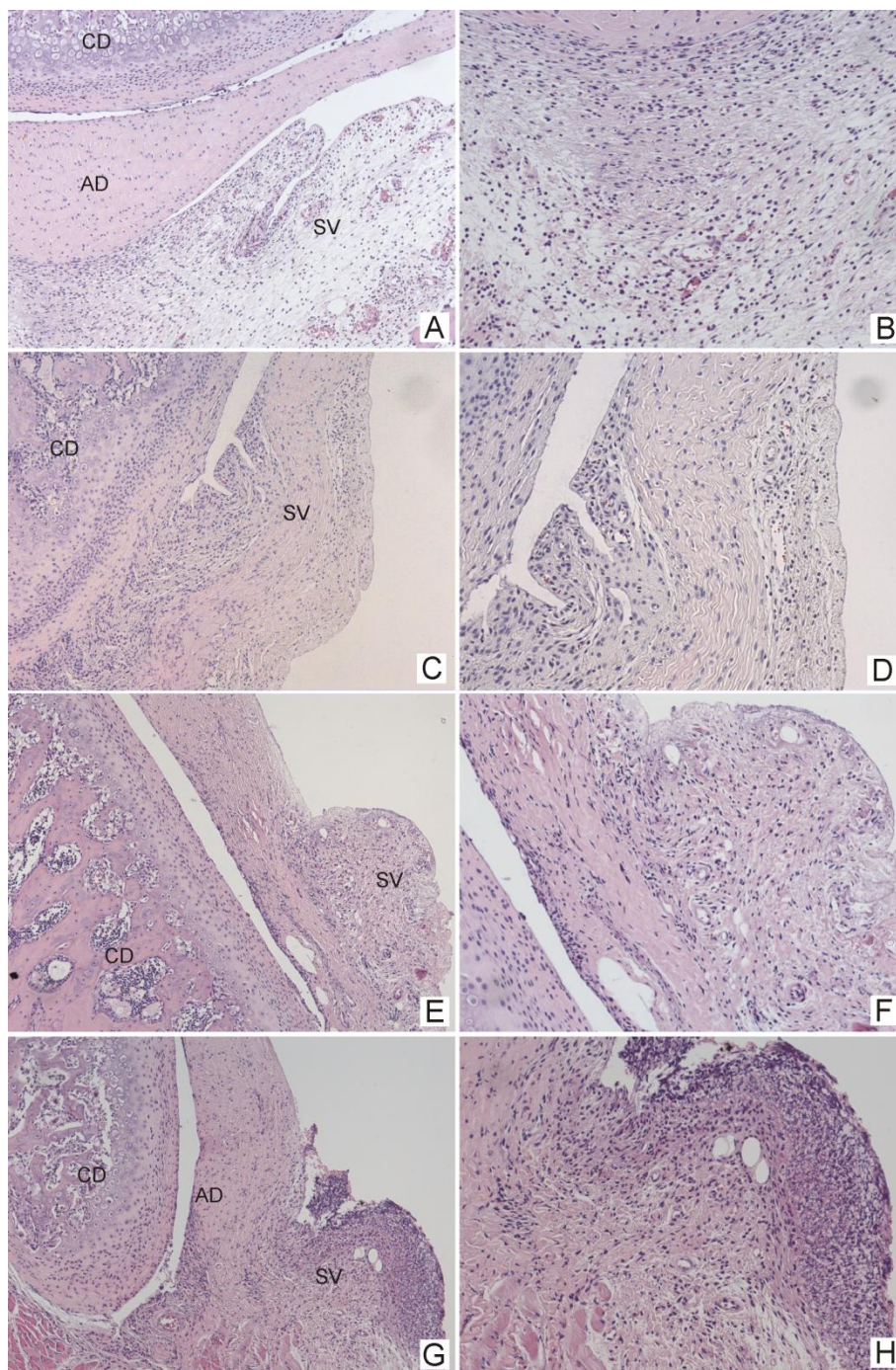
Foi observado na sexta hora após a injeção intra-articular do zymosan e sacrifício dos animais, aumento do influxo de células inflamatórias, especialmente de neutrófilos, para a membrana sinovial e tecido peirarticular, bem como, no aumento da espessura da membrana sinovial (Figura 13- A e B; Tabela 5).

O tratamento com EACP 2h após a indução da artrite reduziu de forma significativa os parâmetros inflamatórios analisados ( Figura 13- C e D; Tabela 5).

O efeito anti-inflamatório da EACP foi mantido mesmo quando o antagonista CB1 (AM251) foi administrado 10 min antes do início da EACP ( Figura 13- E e F; Tabela 5).

Observou-se que a administração do antagonista do receptor CB2 (AM630), 10 min antes da EACP, reverteu o efeito anti-inflamatório, resultando em achados histopatológicos semelhantes ao grupo zymosan ( Figuras 13- G e H; Tabela 5).





**Figura 13. Fotomicrografias da análise histopatológica do efeito dos antagonistas canabinoides AM251 e AM630 sobre o efeito anti-inflamatório da EACP na ATM** (A e B) ATM de rato com artrite induzida por zymosan 2mg (aumento de 100X e 200X, respectivamente). (C e D) ATM de rato com artrite induzida por zymosan 2mg após tratamento com EACP nos acupontos( IG4, IG11, E36 e E44; 30 min., 10 Hz, 3mA, 2h após a indução da artrite) (aumento de 100X e 200X, respectivamente). (E e F) ATM de rato com artrite induzida por zymosan 2mg tratados com EACP+ AM251 (10 min antes do tratamento com EACP)(aumento de 100X e 200X, respectivamente). (G e H) ATM de ratos com artrite induzida por zymosan 2mg após tratamento com EACP+ AM630(10 min antes do tratamento com EACP)(aumento de 100X e 200X, respectivamente) SV- sinóvia; AD- disco articular; CD- côneilo da mandíbula.

**Tabela 5. Análise do efeito do uso dos antagonistas dos receptores canabinóides CB1 e CB2 no tratamento com EACP na histopatologia da membrana sinovial e tecido periarticular na ATM após indução da artrite pelo zymosan.**

	<b>Infiltrado Celular na Membrana Sinovial</b>	<b>Espessura da Membrana Sinovial</b>	<b>Infiltrado Celular Periarticular</b>
<b>Salina</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
<b>Zymosan</b>	4 (3-4)	3 (3-4)	4 (3-4)
<b>EACP</b>	0 (0-2)*	0 (0-2)	0 (0-2)*
<b>EACP+ AM251</b>	0 (0-2)+	0 (0-2)*, ++	0 (0-2)*, +
<b>EACP+ AM630</b>	4 (3-4)#	4 (3-4)#	4 (3-4)#
<b>EACP+ AM251</b>	0 (0-2)+	0 (0-2)*, ++	0 (0-2)*, +

A ATM e tecido periarticular foram removidos 6h após a administração de salina ou zymosan( 2mg, i. art., ATM esquerda). Os animais foram tratados com EACP (30 min, 10 Hz, 3 mA) 2 h após a injeção de zymosan. Os grupos foram tratados com EACP e os antagonistas AM630 e AM251 foram administrados 10 minutos antes do tratamento com EACP . Os dados são apresentados como variação de escores e a mediana dessa variação para o n de 6 animais por grupo. \* $p < 0.05$ , comparado ao grupo Zymosan; # $p < 0.05$ , comparado ao grupo EACP; +  $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$ , comparado ao grupo EACP+AM630 (Teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).

## 6.7. Expressão gênica dos receptores canabinóides CB1 e CB2 no trato espinhal do trigêmeo

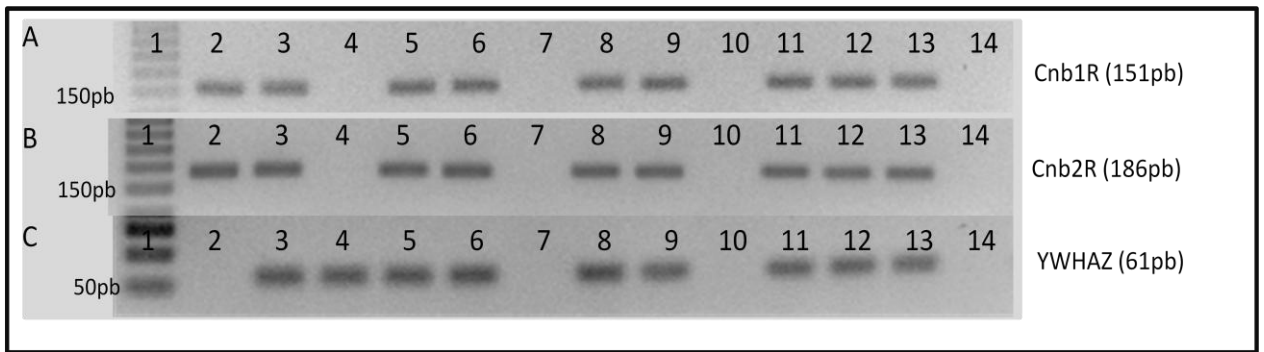
Expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 na região do trato espinhal do trigêmeo foram analisadas após o sacrifício e remoção do tecido cerebral dos animais nas 6<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> horas após a injeção do zymosan na ATM dos animais.

Na Figura 14, observamos os produtos amplificados em relação ao gene de referência em gel de agarose.

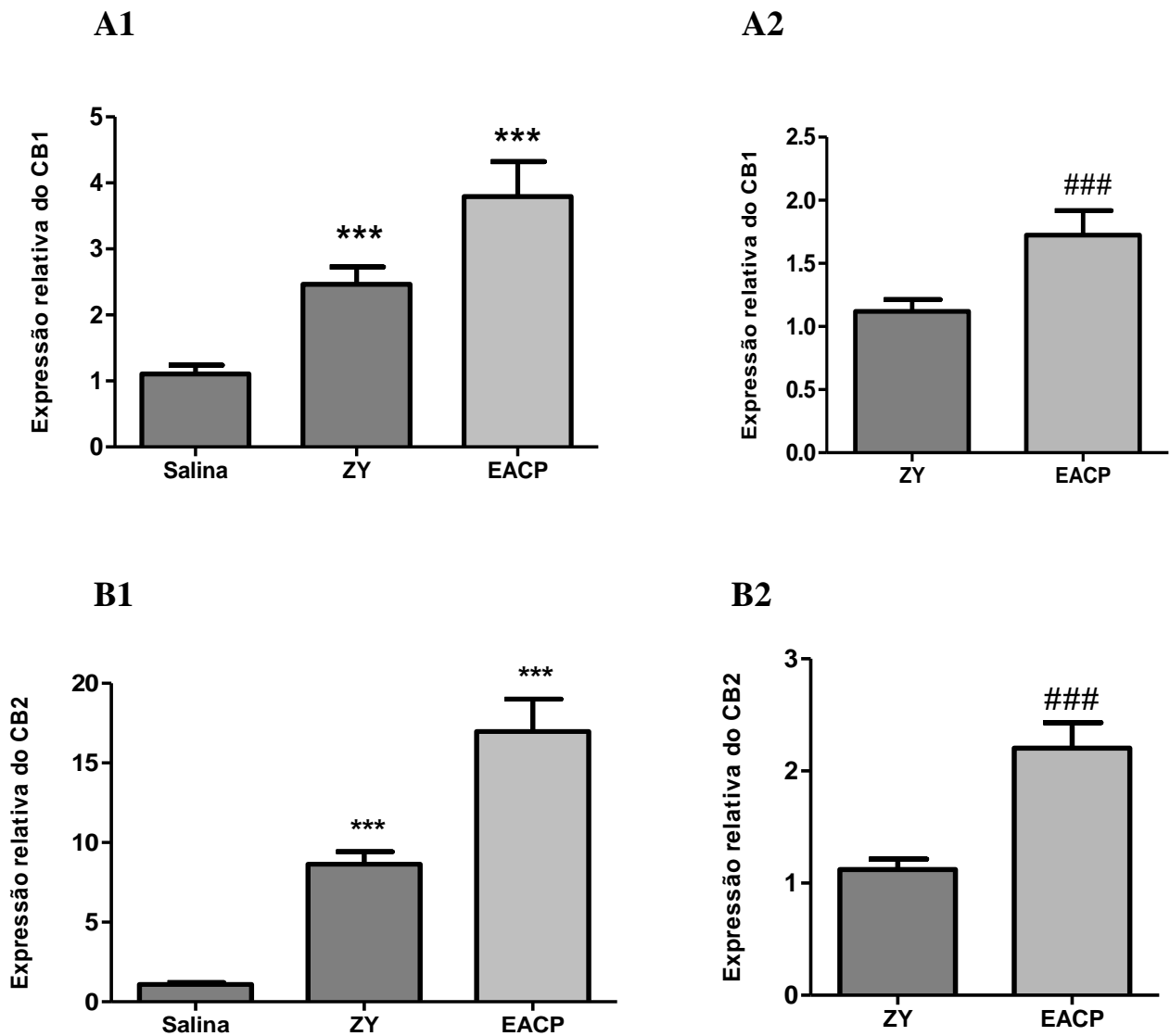
Foi observado na sexta hora um aumento de expressão gênica dos receptores CB1 nos grupos zymosan e EACP ( $p < 0.001$ ; 111% e 178%, respectivamente) em relação ao grupo salina (Figura 15 A1). EACP apresentou maior aumento da expressão gênica do receptor CB1 quando comparado ao grupo zymosan ( $p < 0.001$ ; 53,6%) (Figura 15 A2).

Em relação ao receptor CB2, foi observado aumento da expressão gênica desse receptor nos grupos zymosan e EACP ( $p < 0.001$ ; aumento de 6x e aumento de 15x, respectivamente em relação ao grupo salina (Figura 15 B1). EACP apresentou maior aumento da expressão gênica do receptor CB2 quando comparado ao grupo zymosan de 96,43% ( $p < 0.001$ ) (Figura 15 B2).

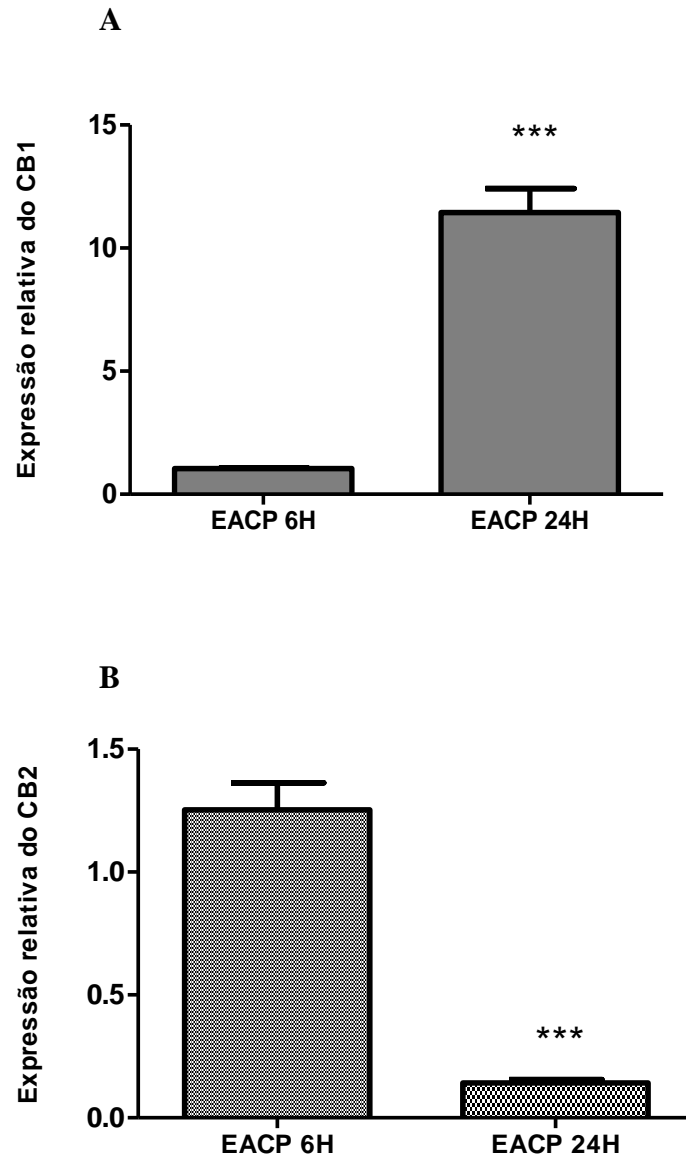
Foi realizada a comparação da expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 nas amostras de tecido cerebral da região do trato espinhal do trigêmeo no tempo de 6 h e 24 h após a indução da artrite por zymosan na ATM no grupo de animais tratados com EACP. Verificamos que houve uma *up-regulation* dos receptores CB1 no grupo EACP no tempo de 24h quando comparado ao grupo de 6h ( $p < 0.001$ ). Em relação ao receptor CB2, foi observada *down-regulation* desse receptor no tempo de 24h ( $p < 0.001$ ) (Figura 16 A e B).



**Figura 14. Documentação da eletroforese (gel) dos produtos de amplificação de A) Cnb1R (151pb); B) Cnb2R(186pb); e C)YWHAZ (61pb) .** Para os géis A, B e C: Coluna 1= marcador molecular (50pb); Colunas 5 e 6= produtos amplificados de 2 animais do grupo *sham*; Colunas 8 e 9= produtos amplificados de 2 animais do grupo zymosan; Colunas 11 a 13= produtos amplificados de 3 animais do grupo EACP; Colunas 7 e 10= somente espaços; Coluna 14= controle negativo (Água Mili-Q, usada como modelo) . Para os géis A e B: Coluna 2 e 3= produtos amplificados de dois animais do grupo salina; Coluna 4= somente espaço. Para o gel C: Coluna 2= somente espaço; Colunas 3 e 4= produtos amplificados de 2 animais do grupo salina.



**Figura 15. Efeito da EACP sobre a expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 no trato espinhal do trigêmeo.** A expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 foi analisada a partir do tecido cerebral de animais sacrificados na 6ª hora após injeção do zymosan (ZY). EACP (30min, 10 Hz, 3mA) foi realizada 2h após a injeção do zymosan. A1: comparação com grupo salina, expressão relativa de CB1; A2: comparação com o grupo zymosan, expressão relativa de CB1; B1: comparação com grupo salina, expressão relativa de CB2 e B2: comparação com o grupo zymosan, expressão relativa de CB2. Os dados representam a expressão relativa dos receptores  $\pm$  EPM de grupos de 6 animais. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas entre os grupos salina e os demais grupos (\*\*\*)  $p < 0.001$ , teste t de Student).# representa a diferença estatística entre os grupos ZY e EACP (###  $p < 0.001$ , teste t de Student).



**Figura 16. Avaliação da expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 após 24h da indução da artrite pelo zymosan na ATM de ratos tratados com EACP.** A expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 foi analisada a partir do tecido cerebral de animais sacrificados na 6<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> hora após injeção do zymosan. EACP (30min, 10 Hz, 3mA) foi realizada 2h após a injeção do zymosan. A: expressão relativa do CB1 na 6<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> hora; B: expressão relativa do CB2 na 6<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> hora. Os dados representam a expressão relativa dos receptores  $\pm$  EPM de grupos de 6 animais. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas entre os grupos EACP-6h e EACP-24h (\*\*\*)  $p < 0.001$ , teste t de Student).

## **DISCUSSÃO**

## 7. Discussão

Os resultados apresentados nesse estudo mostram que a EACP apresenta efeito antinociceptivo e anti-inflamatório no modelo de artrite induzida por zymosan na ATM de ratos. Adicionalmente, observamos que o sistema endocanabinóide está envolvido e que há participação desse sistema quando a EACP é utilizada.

EACP é uma modalidade da acupuntura, que utiliza estímulos elétricos que se propagam através das agulhas inseridas nos pontos de acupuntura. Nas últimas décadas, foi evidenciada estreita relação entre os efeitos da acupuntura e SNC e periférico, bem como a participação vários tipos de neuro-hormônios (YAMAMURA, 2001) através de estudos em humanos e animais (HAN, 2003; MI et al., 2008; ZIJLSTRA et al, 2003).

Autores têm demonstrado que essa técnica foi eficaz em aproximadamente 60-75% de pacientes portadores de dor crônica, tornando-se uma importante ferramenta na odontologia por promover efeitos anti-inflamatórios e analgésicos (ROSTED, 2001; GODDARD, 2002). É considerada um método de estimulação periférica capaz de ativar o SNC, sistema imune e sistema endócrino, promovendo mudanças nas funções sensoriais, motoras, hormonais e cerebrais (MAYER, 2000).

É crescente o número de publicações que não só demonstram seus efeitos, como também investigam possíveis mecanismos de ação. Uma das primeiras explicações para o efeito analgésico foi a participação do sistema opióide, que apresenta importante papel na antinocicepção periférica e central (BASBAUM e JESSELL, 2001; FIELDS et al., 2005) e trabalhos vêm demonstrando o bloqueio da resposta antinociceptiva da EACP em modelos experimentais pela naloxona (MAYER et al., 1977; POMERANZ e CHENG, 1979; GONDIM et al., 2010).

Pesquisas têm demonstrado que opióides endógenos medeiam a antinocicepção induzida pelos canabinóides (CICHEWICZ et al., 1999; CICHEWICZ e MCCARTHY, 2003; MASON et al., 1999), dessa forma procuramos primeiramente investigar o efeito da EACP na artrite aguda induzida pelo zymosan, e com os resultados que obtivemos, procuramos investigar se a EACP poderia ativar o sistema endocanabinóide.

A escolha desse modelo experimental deu-se pelos seguintes fatos: por ser um modelo delineado anteriormente no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer- LAFICA (CHAVES et al., 2011) e por reproduzir em poucas horas uma artrite aguda na ATM, que é um dos distúrbios que podem acometer essa articulação.



Nos últimos anos, as dores orofaciais, onde se inclui a DTM, vêm sendo objeto de pesquisa, sendo crescente o número de publicações relacionado a esse tema.

DTM compreende um grupo não homogêneo de patologias que envolvem a ATM propriamente dita e/ ou os distúrbios relacionados aos músculos da mastigação, caracterizando-se por dor e/ou disfunção. A etiologia dessas condições dolorosas não é claramente compreendida, mas parece ser de caráter multifatorial e reflete uma interação entre fatores físicos, funcionais e psicossociais (OLIVEIRA et al., 2003)

Autores relacionam as desordens funcionais da ATM a um distúrbio do complexo cêndilo-disco, a uma incompatibilidade estrutural das superfícies articulares e à instalação de processos degenerativos e inflamatórios articulares que fazem parte de um grupo de condições que acometem o sistema mastigatório denominado DTM.

A ATM é, portanto, passível às mesmas patologias que as outras articulações do corpo: anormalidades congênitas e do desenvolvimento como deslocamentos, trauma, anquilose, artrites, tumores e alterações do disco intra-articular (CRUSOL- REBELLO et al., 2003), porém as desordens funcionais dos músculos da mastigação são provavelmente a mais comum queixa dos pacientes que buscam tratamento nos consultórios odontológicos (OKESON e LEEUW, 2011). A diferenciação entre DTM de ordem muscular ou articular algumas vezes se torna difícil para o clínico, pois desordens musculares podem mimetizar desordens articulares e as duas condições podem também coexistir.

A inflamação da ATM causa sensibilização central e periférica, que são a base para o surgimento da dor artrítica, que aparece como dor espontânea, hiperalgesia e alodinia (SUN et al., 2008). Mediadores inflamatórios e produtos metabólicos têm importante papel no desenvolvimento de distúrbios articulares (MILAM et al., 1998; KANEYAMA et al., 2004), levando a mudanças na viscosidade do fluido sinovial, que compromete sua habilidade de lubrificar a cartilagem articular, conseqüentemente, alterando o metabolismo da cartilagem (HERB et al., 2006).

O processo inflamatório na região da ATM reduz o limiar nociceptivo na região da articulação e nos tecidos ao redor da mesma. Modelos experimentais em animais com artrite na ATM têm sido propostos para melhor compreensão das condições inflamatórias e nociceptivas que acontecem no curso da patologia (YAILLEN et al., 1979; ZAMMA, 1983; BROTON e SESSLE, 1988; HAAS et al., 1992; LEKKAS, 1994; YU et al., 1995; CARLESON et al., 1996; LUNDEBERG et al., 1996; FIORENTINO et al., 1999; TOMINAGA et al., 1999; REN, 1999; AL-MOBIREEK et

al., 2000; HARPER et al., 2000; IMAI et al., 2001; ROVERONI et al., 2001; TANG et al., 2004; CHAVES et al., 2011).

A inflamação induzida pelo zymosan foi estudada nos anos 70 por Di Luzio e Riggi (1970). Os mecanismos que medeiam o reconhecimento e a fagocitose do zymosan *in vivo* são complexos e fagócitos, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, expressam receptores que estão implicados na resposta celular ao zymosan (Di LUZIO e RIGGI, 1970; FRASNELLI et al., 2005). *In vitro*, tem servido como modelo para estudo da resposta imune inata, porque é capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias e podem ativar o sistema complemento na ausência de imunoglobulinas (FRASNELLI et al., 2005).

A artrite aguda induzida por zymosan em camundongos foi primeiramente descrita por Keystone (1977) e foi obtida pela injeção intra-articular do agente pro-inflamatório (FRASNELLI et al., 2005). Foi sugerido na época que a inflamação foi obtida pela ativação do sistema complemento e pela liberação de hidrolases lisossomiais de macrófagos ativados (SCHORLEMMER et al., 1977).

Frasnelli et al. (2005), buscando elucidar o mecanismo *in vivo* do processo inflamatório induzido pelo zymosan, observaram que a artrite induzida em camundongos não foi tão curta como originalmente descrita em 1970. Os autores demonstraram que a artrite persistiu por mais de 14 dias e também relataram que a artrite induzida pelo agente pro-inflamatório apresentou fases precoces e tardias, apresentando-se bifásica.

Receptores *toll-like* (TLRs) induzem a ativação do fator nuclear kappa B (NFκB) e produção de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18) e servem como receptores para o zymosan. Frasnelli e colaboradores (2005) sugerem que o TLR2 é o principal receptor na sinalização pro-inflamatória na artrite induzida por zymosan em camundongos e que é essencial para o desenvolvimento das respostas imunes específicas ao zymosan. Esses autores concluem que na fase inicial do processo inflamatório, TLR2 tem importante papel e na fase tardia, o desenvolvimento da resposta imune secundária ao zymosan pode contribuir com a manutenção da inflamação articular (FRASNELLI et al., 2005).

Modelos experimentais de artrite aguda induzida por zymosan em joelhos (ROCHA et al., 1999) e ATM (CHAVES et al., 2011) de ratos demonstraram aumento da permeabilidade vascular, migração celular e nocicepção. Chaves et al (2011) mostraram que a injeção intra-articular de 2 mg de zymosan na ATM resultou em

resposta inflamatória intensa, caracterizada por infiltração de leucócitos, extravasamento de plasma, aumento dos níveis de óxido nítrico e da expressão tecidual da enzima NOSi na região da ATM, bem como hipernocicepção mecânica. Chaves e colaboradores (2011) demonstraram que a hipernocicepção foi máxima na quarta hora após a indução da artrite aguda na ATM de ratos, mas que o influxo celular teve seu maior pico na sexta hora. Baseado nesse trabalho, elegemos esses tempos para avaliar os mecanismos que mantêm o processo inflamatório agudo na ATM de ratos e para verificar os possíveis efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo da EACP.

Consistente com o trabalho de Chaves et al. (2011), nosso estudo demonstrou que a injeção intra-articular de zymosan na ATM de ratos causou hipernocicepção e inflamação aguda que se desenvolveu dentro de horas, havendo também aumento da permeabilidade vascular, detectado pelo extravasamento do corante azul de Evans. Observamos também aumento da migração celular no lavado da fluido sinovial. A avaliação da hipernocicepção foi observada também na 24<sup>a</sup> hora ( dados não mostrados) e nesse tempo o limiar nociceptivo já encontrava-se próximo ao basal, não sendo diferente estatisticamente do grupo salina. Como observado por Chaves e colaboradores, o aumento do limiar nociceptivo foi observado até a 6<sup>a</sup> hora e na 24<sup>a</sup> hora esse limiar foi próximo do limiar basal.

O analgesímetro digital utilizado nesse trabalho foi previamente testado e validado por Vivancos e colaboradores (2004) e é baseado nos mesmos princípios dos filamentos de Von Frey, apresentando vantagens sobre este, com medições mais precisas e leitura feita com valores de força em gramas (VIVANCOS et al., 2004). Outros autores têm avaliado a artrite da ATM usando o mesmo método mecânico como no presente estudo (DENADAI-SOUZA et al., 2009, 2010; TESSER-VISCAÍNO et al., 2009).

Denadai-Souza e colegas (2009) relataram o primeiro uso de um medidor de pressão na região da ATM para avaliar a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intra-articular de carragenina. Eles verificaram que a resposta hipernociceptiva foi máxima na 6<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> horas após a injeção do agente pró-inflamatório (DENADAI-SOUZA et al., 2009). Outros trabalhos reportaram a participação do óxido nítrico e do PAR-2 nesse mesmo modelo experimental (TESSER-VISCAÍNO et al., 2009; DENADAI-SOUZA et al., 2010).

Utilizando o modelo de artrite induzida pelo zymosan, pudemos demonstrar o efeito antinociceptivo da EACP através do uso do analgesímetro digital. Verificamos

que EACP aumenta o limiar nociceptivo dos animais submetidos ao agente pró-inflamatório. Os pontos acupunturais utilizados foram selecionados de acordo com trabalhos prévios e também de acordo com a literatura tradicional da medicina chinesa como discutiremos a seguir.

Estudo realizado por Li e colaboradores (2004) verificou que terminais de fibras A e C na pele e músculos de ratos apresentam estreita correlação com o local dos pontos de acupuntura em humanos. Eles mostraram que os acupontos localizados nas patas traseiras de ratos são anatomicamente idênticos aos dos humanos e que os pontos de acupuntura e os trajetos dos meridianos dos ratos se assemelham aos dos seres humanos (LI et al., 2004). Dessa forma elegemos os pontos IG4, IG11, E36, E44, que de acordo com a Medicina Tradicional Chinesa, são acupontos relacionados a dores dentárias e na região da face (SHENG et al.; 2000; JUNG et al., 2006; WONG e WONG, 2008).

E44 é um importante ponto para o tratamento de muitas desordens da cabeça e da face, como: dores de dente, garganta e cefaléias. Nesse propósito a combinação com o ponto IG4 é sugerida na literatura chinesa. E44 e E36, quando conjuntamente aplicados, são utilizados para o tratamento de cefaléias, dores de dente, gengivites e mau hálito (McDONALD, 1995). Sheng e colaboradores (2000) demonstraram que a estimulação acupuntural do ponto E44 ativa neurônios na matéria cinzenta periaquedutal que envia fibras inibitórias descendentes para neurônios nociceptivos na medula espinhal, bem como reduz a expressão da proteína c-Fos no sub-núcleo caudal do trigêmeo, modulando a informação nociceptiva da região da cabeça e face nos centros supra-segmentares do SNC (SHENG et al., 2000).

A estimulação elétrica nos pontos selecionados reduziu significativamente a hipernocicepção quando comparada ao grupo *sham*. Nossos resultados sugerem que a precisa localização do acuponto se faz necessária para obtenção dos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios desejados. Animais *sham* receberam agulhas de acupuntura em outras áreas não relacionadas a esses acupontos e demonstraram efeito antinociceptivo que foi diferente estatisticamente do grupo *zymosan*, entretanto essa resposta antinociceptiva foi significativamente menor quando comparado ao grupo EACP.

Pesquisas clínicas têm demonstrado que a redução da dor obtida através do uso da acupuntura ou eletroacupuntura não é dependente do local de aplicação do estímulo: se realizado em pontos de acupuntura ou em outras áreas do corpo. Autores sugerem que a analgesia obtida pode não estar relacionada ao local do estímulo como previsto pela acupuntura clássica (GODDARD et al., 2002). De acordo com outros dados

experimentais (OH et al., 2006; GONDIM et al., 2010), nossos resultados reforçam que a analgesia obtida em pontos *sham* existe, porém ela não se mantém ao longo do tempo.

As regiões do cérebro relacionadas a analgesia por acupuntura foram estudadas em experimentos com animais e exploradas em cérebros de humanos através de imagens obtidas por ressonância magnética e por tomografia por emissão de pósitrons, mostrando que algumas áreas cerebrais eram ativadas e desativadas, mostrando a relação da sensação acupuntural denominada de *DeQi*, com a eficiência analgesia por acupuntura (ZHAO, 2008).

Santos e Marteleite (2004) relatam que a estimulação promovida pela ação da acupuntura ativa o sistema modulador da dor por hiperestimulação das terminações nervosas de fibras miélicas A- $\delta$ , responsáveis pela condução do estímulo aos centros medulares, encefálicos e eixo hipotálamo-hipofisário. Na medula espinhal, a modulação dos estímulos nociceptivos se dá por inibição pré-sináptica, devido à liberação de encefalinas e dinorfinas. No mesencéfalo, as encefalinas e a ativação do sistema central de modulação da dor resultam na liberação de serotonina e norepinefrina nos sistemas descendentes (SANTOS e MARTELETE, 2004).

A acupuntura é uma eficaz terapia adjuvante no tratamento médico convencional em inúmeras patologias mediadas por citocinas, porém o mecanismo de ação permanece obscuro ( LAU et al., 2010). Trabalhos têm mostrado que acupuntura ativa o sistema imune e influencia a migração celular específica e não-específica, a ativação da proliferação celular e o subsequente envolvimento de células, resultando em um complexo mecanismo de transporte, quebra e limpeza de mediadores inflamatórios bioativos (ROGERS et al., 1992; ZIJLSTRA et al, 2003).

Trabalhos questionam o valor do uso terapêutico da acupuntura em doenças inflamatórias. Hu (1988) acompanhando 25 casos de asma brônquica relatou que a eficácia da acupuntura era diretamente proporcional a quantidade de sessões feitas ao ano pelo paciente, afirmando que um maior número resultava em maior taxa de controle dos sinais e sintomas da doença. Zijlstra e colaboradores (2003) afirmam que o benefício do tratamento por acupuntura em pacientes portadores de artrite reumatóide necessita ser questionado em grandes estudos randomizados. Esses trabalhos reforçaram nosso interesse em investigar a possível ação anti-inflamatória da EACP na artrite induzida por zymosan.

EACP de baixa e alta frequência podem induzir analgesia através de mecanismos centrais distintos. Pesquisas têm demonstrado que o SNC responde

diferentemente a estimulação elétrica periférica. EACP de 2 Hz promove a liberação de encefalina que atua em receptores opióides  $\mu$  e  $\delta$  e a de 100 Hz libera dinorfina que se liga a receptores  $\kappa$  em animais e humanos. Zhang e colaboradores (2003), em estudo em humanos, analisaram imagens por ressonância magnética funcional em indivíduos submetidos a tratamento por EACP. Eles observaram, independentemente do tipo de frequência utilizada, a ativação da área somatossensorial secundária, ínsula, córtex cingulado anterior contralateral e tálamo. Esses mesmos autores observaram que EACP de 2 Hz ativou área motora primária contralateral, área motora suplementar, e giro temporal superior ipsilateral, enquanto correlações negativas foram observadas na região do hipocampo. EACP de 100 Hz ativou o lóbulo parietal inferior contralateral, córtex cingulado anterior ipsilateral, núcleo accumbens, ponte e correlação negativa na região da amígdala contralateral. Os autores concluem nesse trabalho que áreas funcionais do cérebro podem estar correlacionadas com o efeito da analgesia induzida por EACP, em uma dinâmica dependente da frequência de estimulação utilizada.

Nas últimas décadas, as pesquisas estão voltadas para o entendimento dos mecanismos de ação da analgesia por acupuntura ressaltam que há diferenças individuais para obtenção do efeito analgésico obtido por meio dessa técnica. Tais diferenças estão relacionadas a fatores genéticos e a densidade de receptores de CCK. Estudos experimentais relatam a participação desse neuropeptídeo no comprometimento do efeito analgésico da acupuntura (LEE et al., 2002). Zhou e colaboradores (1993) demonstraram que ratos tratados com EACP e que apresentaram fraca resposta antinociceptiva, tiveram um aumento na liberação de CCK. Esses autores observaram que essa resposta era maior em frequências de 100 Hz do que em baixas frequências. Ko e colegas (2006) mostraram um aumento da expressão do RNAm da CCK no hipotálamo de ratos não respondedores a EACP de alta frequência. Assim sendo, no presente estudo, EACP de baixa frequência foi utilizada, evitando-se assim um possível efeito da CCK sobre a resposta do tratamento com EACP.

Embora os mecanismos antinociceptivos da EACP em diferentes frequências estejam bem demonstrados, os mecanismos anti-inflamatórios induzidos pela estimulação da acupuntura em diferentes frequências sobre a inflamação periférica permanece desconhecido. Kim e colaboradores (2008) em trabalho de edema de pata induzido por carragenina, verificaram que tanto a EACP de baixa frequência quanto a de alta frequência reduziram edema, hiperalgesia e atividade da MPO. Nesse estudo, os autores sugerem que a ação anti-inflamatória da EACP de baixa frequência é mediada

por neurônios pós-ganglionares simpáticos e que a ação da EACP de alta frequência é mediada pelo eixo simpático-adrenal-medular, porém outros mecanismos podem estar ativados.

No nosso trabalho, o tratamento por EACP reduziu edema e a espessura da sinóvia comparado aos grupos zymosan e *sham*. Menor infiltrado celular e menor espessura da membrana sinovial e do tecido periarticular também foram observados, bem como redução da migração celular na cavidade articular e da atividade da MPO no fluido sinovial. Assim como já observado por da Silva e colaboradores (2011) também observamos que a acupuntura em pontos *sham* não atua sobre os parâmetros inflamatórios. Esses autores verificaram o efeito anti-inflamatório da acupuntura manual no modelo de peritonite em camundongos utilizando o ponto BP6. Adicionalmente, observaram que a *sham* acupuntura não foi eficaz na redução da migração celular, no extravasamento do líquido peritoneal e na atividade da MPO (da SILVA et al., 2011).

EACP apresentou efeito anti-inflamatório nesse modelo experimental, revertendo os efeitos inflamatórios do zymosan, como: edema, migração celular, aumento da espessura da membrana sinovial e do tecido periarticular. Chaves e colaboradores (2011) utilizaram esses mesmos parâmetros inflamatórios na análise do comportamento pró-inflamatório do zymosan e o tratamento com EACP apresentou efeitos inibitórios de tais parâmetros.

Na análise da permeabilidade vascular, observamos que o extravasamento do corante de azul de Evans no grupo de animais tratados pós-tratados com EACP, não modificou a intensidade da permeabilidade vascular, sugerindo que a EACP realizada nesse protocolo (2h após a indução da artrite) não inibiu eficientemente o edema na ATM e tecido periarticular. Entretanto, nesse mesmo protocolo, a EACP foi eficiente em inibir a migração celular para a cavidade articular e a hipernocicepção. Outros autores (SATO et al., 1986) demonstraram que o edema induzido pelo zymosan tem início 15 min após a sua injeção e parece ser dependente da liberação de histamina pelos mastócitos durante a primeira hora. Dessa forma, pensamos em investigar o efeito do pré-tratamento da EACP, no intuito de avaliar se este seria mais eficaz na inibição do aumento da permeabilidade vascular. O pré-tratamento com EACP foi realizado 1h antes da injeção do zymosan na ATM dos animais e constatamos que o mesmo inibiu o extravasamento do corante azul de Evans na ATM e tecido periarticular, indicando um efeito anti-edematoso.

Autores têm demonstrado que o edema induzido pelo zymosan é significativo já durante a primeira hora e é amplificado durante a terceira e quarta horas (SATO et al., 1986). A inflamação e dor induzida pelo zymosan é um processo dependente da ativação de células residentes (mastócitos e macrófagos) (RIBEIRO et al., 2000), sendo decorrente da degranulação mastocitária, ativação de macrófagos via TLR-2, além da ativação de outros mecanismos (FRASNELLI et al., 2005). Takeshita e colaboradores (2003) afirmam que a migração neutrofílica após injeção do zymosan é dependente da degranulação dos mastócitos, da liberação da histamina, leucotrieno e outros fatores quimiotáticos. Zymosan causa degranulação dos mastócitos através da sinalização dependente de MyD88 via TLR-2 (TAKESHITA et al., 2003). Estes achados podem explicar a razão na qual o pré-tratamento com EACP foi mais eficiente na inibição do edema causado pela injeção do zymosan. Nós sugerimos que a EACP realizada 1h antes da injeção do agente pró-inflamatório pode estabilizar as células mastocitárias, prevenindo a degranulação e reduzindo o infiltrado celular para o interior da cavidade articular. Estes resultados estão de acordo com o trabalho realizado por He e colaboradores (2010) ao concluir que a acupuntura inibe a degranulação de mastócitos em ratos com artrite.

A observação desse efeito diferencial entre o pré-tratamento e pós-tratamento com EACP sobre o edema, nos motivou a investigar o efeito do pré-tratamento em relação ao comportamento antinociceptivo. A resposta antinociceptiva da EACP realizada previamente a indução da artrite pelo zymosan foi intensa. Foi verificado também, aumento do limiar nociceptivo dos animais tratados com EACP, mesmo antes da injeção do zymosan. Animais que receberam pré-tratamento com EACP apresentaram aumento do limiar nociceptivo comparando-se ao tempo basal (antes da realização do tratamento com EACP). Houve também um maior efeito antinociceptivo do pré-tratamento da EACP na 4ª hora quando comparado ao pós-tratamento, não havendo diferença significativa da resposta antinociceptiva na 6ª hora quando comparamos os dois tratamentos. Observamos, portanto, que a EACP utilizada após o desenvolvimento do processo inflamatório, foi eficaz na redução da nocicepção. Também observamos que o procedimento de EACP por si só já causa uma modificação do limiar nociceptivo basal do animal, que foi observado mesmo antes da injeção do zymosan. Essa resposta antinociceptiva é mantida após a injeção do zymosan. Dessa forma podemos sugerir que o efeito antinociceptivo mais acentuado na 4ª hora quando a EACP é dada como pré-tratamento possivelmente é devido ao tempo e também ao



aumento do limiar basal. Com esses resultados, sugerimos que a EACP pode ser eficaz no controle da nocicepção e que pode ser utilizada também preventivamente, reduzindo assim, o desenvolvimento de processos álgicos.

Nosso trabalho também demonstrou que a EACP reduziu a imunoexpressão de TNF $\alpha$ , COX-2 e NOSi, sugerindo que os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório possam ser atribuídos a inibição da liberação de agentes pró-inflamatórios.

TNF $\alpha$  é uma importante citocina envolvida na hiperalgesia inflamatória que desencadeia a liberação de outras citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e IL-8 (CUNHA et al., 1992), além de participar de outros eventos do processo inflamatório, tais como: edema, migração de neutrófilos, febre e liberação de proteínas da fase aguda (DINARELLO et al., 1986; FACCIOLI et al., 1990; CUNHA et al., 1992). Estudo realizado nesse laboratório (LAFICA) demonstrou que TNF $\alpha$  desempenha um importante papel na artrite induzida por zymosan em joelhos de ratos. Vale e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento com talidomida inibe a incapacitação articular, inibindo a produção de TNF $\alpha$  pelas células sinoviais, inibindo assim a hipernocicepção. Nossos resultados sugerem que os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo periférico possam ser atribuídos a inibição do TNF $\alpha$  pelas células sinoviais.

COX-2 pode ser induzida por diversos fatores, tais como: IL-1, IL-2, TNF $\alpha$  e lipopolissacarídeos. Artrite, lesão tecidual e sepse aumenta a produção de COX-2, prostaglandina E2 (PGE2), NOSi e óxido nítrico. Prostaglandinas causam vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e hiperalgesia. Modelos experimentais mostram que o aumento da expressão de COX-2 nos locais de inflamação estão correlacionados temporalmente com o desenvolvimento desse processo (GILROY e COLVILLE-NASH, 2000; WEINBERG, 2000).

NOSi é encontrada em sinoviócitos, condrócitos, células musculares lisas, hepatócitos e linfócitos B (PALMER et al., 1993; MONCADA e HIGGS, 2002). Apresenta ações pró-inflamatórias tais como, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, causa danos teciduais e celulares, pode induzir a COX e causar dor. O peroxinitrito, produzido a partir do óxido nítrico, prepara o cenário para um estado severo de inflamação. Na articulação, diversos tipos celulares podem produzir óxido nítrico, como: macrófagos, condrócitos e células endoteliais. Trabalhos têm demonstrado que o óxido nítrico tem importante participação no desenvolvimento da

artrite aguda induzida por zymosan em joelho (ROCHA et al., 1999) e ATM (CHAVES et al., 2011) de ratos. Chaves e colaboradores (2011) demonstraram aumento dos níveis de nitrito/ nitrato, indicando a formação de óxido nítrico, no fluido sinovial da ATM de ratos com artrite induzida pela injeção de zymosan. Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram aumento da imunomarcagem de NOSi no disco articular, nos condrócitos da cartilagem articular e nas células sinoviais da ATM após injeção de zymosan.

Compreendendo a importância da COX-2 e da NOSi para o desenvolvimento do processo inflamatório, nós investigamos nesse estudo se o efeito anti-inflamatório observado no tratamento com EACP nos acupontos IG4, IG11, E 36 e E44 seria atribuído a uma redução na expressão dessas enzimas. Nós encontramos que a EACP inibiu a imunexpressão de COX-2 e NOSi na membrana sinovial dos ratos com artrite na ATM. Outros trabalhos têm demonstrado que a EACP reduziu a hipernocicepção após ligadura de nervo espinhal, inibiu a expressão de COX-2 no corno dorsal da medula espinhal (LAU et al., 2008; 2010) e reduziu a hiperalgesia inflamatória e edema através da inibição da síntese de COX-2 nos sítios periférico e central ( LEE et al., 2006).

Nossos resultados sugerem que TNF $\alpha$ , COX-2 e NOSi têm importante papel na dor inflamatória da ATM e que a EACP nos acupontos IG4, IG11, E36 e E44 desencadeia efeito antinociceptivo nesse processo através da inibição da produção de TNF $\alpha$  e da expressão de COX-2 e NOSi em células sinoviais. Dessa forma, o tratamento por EACP poderia ser benéfico no tratamento das dores articulares associadas a artropatia inflamatória.

Técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para o estudo da analgesia obtida pelo uso da acupuntura. Receptores acoplados a proteína G, como os receptores opióides, têm sido o alvo principal de estudo (ZHAO et al., 2008). As proteínas G são classificadas como Gs ou Gi/o, estimulando ou inibindo a ativação da adenilato ciclase.

Przewlocki e colaboradores (1987) demonstraram que a toxina *pertussis*, um inibidor da transdução de sinais mediada pela proteína Gi/o, impede a nocicepção mediada pelos receptores opióides. Estudo realizado por Liu e colegas (2005) constatou que a EACP falhou na inibição da hipernocicepção em modelo experimental de dor inflamatória quando um pré-tratamento com essa toxina foi utilizada.

Em trabalho anterior, nós avaliamos o efeito antinociceptivo da EACP no modelo de estimulação da polpa dentária de coelho e constatamos que esse efeito foi abolido com a administração de naloxona (i.p.) 10 min. antes da aplicação da EACP,

demonstrando assim a participação dos peptídeos opióides endógenos na antinocicepção nesse modelo experimental (GONDIM et al., 2010).

É aceito, portanto, que o sistema opióide endógeno tem importante papel para obtenção da analgesia por acupuntura, entretanto o envolvimento de outros mecanismos como o sistema endocanabinóide permanece ainda incerto. Estudos demonstram que agonistas dos receptores canabinóides aumentam o efeito dos agonistas  $\mu$ -opióides em uma variedade de modelos de analgesia, e que combinações de canabinóides e opióides podem produzir efeitos sinérgicos (WALKER e HOHMANN, 2005; PACHER et al., 2006). Nesse trabalho, procuramos verificar a participação do sistema canabinóide na obtenção dos efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo encontrados.

Durante as duas últimas décadas, a comunidade científica tem utilizado rigorosos métodos para determinar os efeitos dos canabinóides na neurotransmissão nociceptiva. Tem sido descrito que essas substâncias diminuem a sinalização de caminhos neurais específicos que transmitem o estímulo doloroso, onde sítios periféricos, espinhais e supra-espinhais têm sido identificados como participantes da analgesia obtida pela ação dos mesmos (HUANG e WALKER, 2002).

O sistema endocanabinóide compreende 2 subtipos de receptores canabinóides, CB1 e CB2, um número de ligantes endógenos, incluindo a anandamida e o 2-AG, uma alta afinidade de sistema de transporte de recaptação e enzimas que participam da síntese e da metabolização dos endocanabinóides.

Receptores canabinóides CB1 são expressos primariamente no SNC e neurônios aferentes primários e receptores CB2 são principalmente expressos em células do sistema imune. Esta diferença de distribuição de receptores CB1 e CB2 sugere um diferente papel desses receptores na dor e na analgesia por acupuntura, porém outras pesquisas sugerem que a localização de expressão desses receptores necessita ser redefinida, pois receptores CB1 são também expressos em células do sistema imune e já foi também observado a expressão de receptores CB2 em células neuronais (BORNER et al., 2008)

Estudos sugerem que canabinóides periféricos estão envolvidos na inibição da dor inflamatória persistente, e que há ativação dos receptores CB2 na obtenção de tal resposta (CHEN et al., 2009). Outros trabalhos relatam a redução da hiperalgesia e inflamação via interação com receptores CB1 (RICHARDSON et al., 1998). Foi demonstrado em estudos prévios que o receptor CB1 está envolvido na obtenção do efeito anti-inflamatório dos canabinóides, estimulando a *up-regulation* do antagonista

do receptor para IL-1 e na inibição da produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-6 e IL-8 (MOLINA-HOLGADO et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2006).

Chen e colaboradores (2009) relatam que a estimulação elétrica nos acupontos localizados nas patas traseiras de ratos influenciam a síntese, liberação, degradação e receptação de anandamida de queratinócitos da epiderme e que há o recrutamento de células do sistema imune para os tecidos inflamados no modelo experimental de edema de pata causado pela injeção de adjuvante de Freund (CFA). Esses mesmos autores sugerem que o tratamento por EACP causa aumento da síntese e liberação de anandamida, excedendo sua receptação e degradação, resultando no aumento da concentração nos tecidos da pele, ressaltando também que receptores CB2 contribuem para o efeito antinociceptivo da EACP nesse modelo experimental.

Walker e Huang (2002) sugerem que os endocanabinóides participam da modulação endógena da dor por interações na matéria cinzenta periaquedutal, estrutura que medeia a supressão do circuito da dor. O bloqueio dos receptores canabinóides CB1 pela ação do antagonista CB1 produz hiperalgesia no teste da formalina e a ação do antagonista bloqueia a analgesia produzida pela estimulação elétrica na matéria cinzenta periaquedutal, sugerindo que a estimulação elétrica nessa região levaria a liberação de anandamida que atuaria em receptores CB1 (WALKER e HUANG, 2002).

Em nosso estudo, avaliamos a participação do sistema endocanabinóide no efeito antinociceptivo da EACP e para isso utilizamos os antagonistas dos receptores CB1 (AM251) e CB2 (AM630). Esses antagonistas foram utilizados previamente ao tratamento com EACP e esta foi realizada após e previamente a indução da artrite pelo zymosan.

O bloqueio dos receptores CB1 inibiu o efeito antinociceptivo da EACP, quando a mesma foi usada tanto no pré-tratamento quanto no pós-tratamento, enquanto que o bloqueio dos receptores CB2 não modificou o comportamento antinociceptivo da EACP.

Através do teste de hipernocicepção mecânica, constatamos que nesse modelo experimental, o efeito antinociceptivo da EACP nos acupontos IG4, IG11, E36 e E44 ocorre com a participação do sistema endocanabinóide e que os receptores CB1 estão envolvidos nessa resposta.

Esse resultado é semelhante ao obtido por Burgos e colaboradores (2010), que avaliaram a antinocicepção mediada pelo sistema canabinóide em modelos de dor orofacial e de dor inflamatória espinhal em teste de injeção de formalina em ratos.

Esses autores concluíram que os receptores CB1 participavam da resposta antinociceptiva na região orofacial e ATM, enquanto os receptores CB2 estariam envolvidos na resposta antinociceptiva espinhal da dor inflamatória.

Estudos têm demonstrado que os canabinóides modulam a resposta inflamatória, suprimindo a proliferação de células T, reduzindo a produção de IL-12 e IFN $\gamma$  (YUAN et al., 2002) e que a ativação dos receptores canabinóides inibem a secreção de citocinas pró-inflamatórias em astrócitos (SHENG et al., 2005) e macrófagos (CORREA et al., 2005). Gardner et al. (2002) sugerem que o Fator de Transformação de Crescimento Beta (TGF- $\beta$ ) regula a expressão do receptor CB2 em linfócitos de maneira autócrina e parácrina. Tem sido sugerido que TGF- $\beta$  regula a expressão de CB2 através de uma alça regulatória negativa como observado em experimentos (GARDNER et al., 2002).

IFN $\gamma$ , que é produzido por células T *helper* e *natural killer*, aumenta a expressão do RNAm e a proteína do receptor CB2 em macrófagos de ratos (CARLISLE et al., 2002) e também aumenta a expressão de CB2 em células da micróglia em modelos experimentais de dor neuropática e esclerose múltipla (RACZ et al., 2008).

Outras pesquisas mostram que há *up-regulation* dos receptores CB1 e CB2 na presença de citocinas pró-inflamatórias (BORNER et al., 2008; LORIA et al., 2008). Jean- Gilles e colaboradores (2010) demonstraram que várias citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF $\alpha$ , induzem significativamente a expressão de RNAm e protéica dos receptores CB1 e CB2. Um inibidor de NF $\kappa$ B parcialmente inibiu a indução de CB1 e CB2 por TNF $\alpha$  em células mononucleares, indicando um papel do NF $\kappa$ B na regulação dos receptores canabinóides por TNF $\alpha$ . *Up-regulation* dos receptores CB1 e CB2 induzido por citocinas pró-inflamatórias representam um mecanismo próprio de controle da inflamação e pode representar um papel neuroprotetor de certos tipos de neuroinflamação (JEAN- GILLES et al., 2010).

Nakajima e colaboradores (2006) demonstraram que o fluido gengival contém níveis detectáveis de anandamida e que receptores canabinóides, CB1 e CB2, eram expressos em fibroblastos na gengiva de humanos e que estes apresentaram *up-regulation* na presença de condições patológicas. Nesse estudo, os autores mostraram que anandamida reduziu a produção de mediadores inflamatórios (IL-6 e IL-8) induzido por *Porphyromonas gingivalis* e que este efeito era abolido com a administração dos antagonistas dos receptores CB1 e CB2 (NAKAJIMA et al., 2006).

Hohmann e Herkenham (1999) e Bridges e colaboradores (2003) demonstraram que canabinóides atuam diretamente no corno espinhal para produzir analgesia e que há

aumento da expressão gênica do receptor CB1 no corno dorsal da medula espinhal, sugerindo como sítio de ação os interneurônios espinhais e neurônios de projeção.

Mbvundula e colegas (2005) estudando o efeito dos canabinóides na produção de óxido nítrico em condrócitos bovinos e na degradação de proteoglicanos na cartilagem sugeriram que os canabinóides podem evitar a degradação da cartilagem em parte por inibição da produção de óxido nítrico induzida por citocinas e também por inibição da degradação de proteoglicanos.

Chen e colaboradores (2009) sugerem que a EACP pode aumentar os níveis de anandamida no tecido inflamado e que esta se liga aos receptores CB2 expressos nas células do sistema imune, dessa forma a EACP pode reduzir os parâmetros inflamatórios por inibição da liberação e da produção de citocinas inflamatórias, ativando o sistema endocanabinóide e representando uma ferramenta para o tratamento de condições inflamatórias.

Baseados nesses estudos, foram também verificados os parâmetros inflamatórios através de observação histopatológica da espessura da membrana sinovial, bem como na análise da presença de infiltrado celular na membrana sinovial e tecido periarticular com uso da EACP e os antagonistas AM251 e AM630. Nesse aspecto, a associação da EACP com o antagonista CB2 demonstrou uma inibição da resposta anti-inflamatória observada anteriormente com o tratamento pela EACP. A utilização do antagonista CB1 não modificou a resposta anti-inflamatória da EACP. Esses resultados sugerem que os receptores CB2 participam da resposta anti-inflamatória da EACP no modelo de dor inflamatória induzida pela injeção de zymosan na ATM de ratos. Esses dados nos levam a inferir que provavelmente o efeito antinociceptivo da EACP deva-se a um efeito central e direto, independente de seu efeito anti-inflamatório. O bloqueio dos receptores CB2 provavelmente não inibe o efeito antinociceptivo da EACP devido ao efeito central que sobrepuja um possível efeito antinociceptivo periférico. Como é bem sabido, substâncias com efeito anti-inflamatório demonstram também efeito analgésico devido à inibição do processo de hiperalgesia primária (resultante da inflamação). Poderia se esperar que o bloqueio de CB2 causasse uma reversão do efeito antinociceptivo da EACP por esse mesmo mecanismo. Entretanto, pensamos que o efeito antinociceptivo central sobrepuja esse efeito periférico. Isso é plausível, visto que os receptores CB1 estão mais envolvidos nos processos neuronais, sendo mais expressos no tecido nervoso. Algumas substâncias como a morfina, dipirona, paracetamol possuem um efeito analgésico direto (LORENZETTI e FERREIRA, 1985; OTTANI et al., 2006;

CUNHA et al., 2010) e não possuem efeito anti-inflamatório. Adicionalmente já foi demonstrado que o paracetamol possui mecanismo analgésico dependente da ativação do sistema canabinoide, e que esse efeito é inibido pelo bloqueio dos receptores CB1 (OTTANI et al., 2006).

Diante desses resultados, buscamos investigar a expressão gênica dos receptores CB1 e CB2 na região do trato espinhal do trigêmeo, local da 1ª sinapse de condução do estímulo nociceptivo na via trigeminal. Observamos na 6ª hora (hora do sacrifício), que EACP apresentou aumento da expressão gênica dos receptores CB1 e CB2. Entretanto, a expressão gênica do receptor CB1 demonstrou *up-regulation* na 24ª hora, enquanto o receptor CB2, sofreu uma *down-regulation* na expressão gênica nesse mesmo tempo.

Estudos relatam a presença do receptor CB1 no SNC. Hohmann e Herkenham (1999) sugerem que esse receptor está expresso em áreas relacionadas a modulação descendente da dor. O receptor CB2, anteriormente foi descrito como um receptor que se expressava exclusivamente na periferia, em células do sistema imune, porém trabalhos recentes demonstraram a presença dos receptores CB2 em quantidades limitadas e locais distintos do cérebro de várias espécies animais, inclusive ratos (WOTHERSPOON et al., 2005; PÁLDY et al., 2008). Foi constatada a expressão do receptor CB2 em algumas células do SNC, incluindo a micróglia. Rivers e Ashton (2010) relatam que essa constatação não foi inesperada já que as células da micróglia são as células imunes residentes do SNC e derivam da mesma linhagem da célula imune periférica. As células da micróglia quando ativadas liberam diversas substâncias algicas com TNF  $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (SHAN et al., 2007) e uma variedade de outras substâncias algicas que aumentam a transmissão nociceptiva (WATKINS et al, 2001; WATKINS e MAIER, 2003; DeLEO et al., 2004) . Independente da liberação de citocinas em injúrias de sítios periféricos, citocinas inflamatórias são induzidas no SNC. Citocinas no SNC, em associação com ativação das células da glia podem influenciar ou modular a atividade neuronal (GUO et al., 2007) Em adição, quando a micróglia é inibida pela minociclina, (inibidor microglial específico), a exacerbação da dor é inibida, sugerindo assim, que a micróglia é importante para a facilitação da dor (SHAN et al, 2007).

Walter e colaboradores (2003) sugerem que endocanabinóides promovem ativação de células microgliais através de ligação ao receptor CB2, não atuando sobre o CB1.

Guo e colaboradores (2007) induziram inflamação do músculo masseter através da injeção de um agente pro-inflamatório (CFA), causando hiperatividade glial na zona



de transição do subnúcleo interpolar e caudal trigeminal. Trabalhos têm demonstrado que a ativação da microglia pode ser suprimida pela ativação dos receptores CB2 (RIVERS e ASHTON, 2010) e que EACP reduziu a hipernocicepção e ativação microglial espinal em modelo de monoartrite em ratos (SHAN et al., 2007). Foi demonstrado que EACP e minociclina, sinergicamente, bloqueiam ativação de micróglia espinal, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de outros transmissores envolvidos com a transmissão da dor, reduzindo hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (SHAN et al., 2007).

Diante dos resultados que obtivemos em relação a expressão gênica dos receptores canabinóides e o que encontramos na literatura, podemos sugerir que a EACP nos acupontos IG4, IG11, E36 e E44 aumenta a liberação de endocanabinóides que se ligam aos receptores CB1 na célula neuronal.

Em contrapartida, a *up-regulation* da expressão gênica observada em relação ao receptor CB2 na sexta hora estaria relacionada a possível inibição da eletroacupuntura sobre as células da micróglia, reduzindo assim a transmissão nociceptiva. Essa inibição poderia ser através do aumento da expressão gênica do receptor CB2, que nessas células parece ter um efeito inibitório.

Como relatado por Chaves e colaboradores (2011) e observado também em nosso trabalho, após 24 horas da injeção do zymosan (resultados não mostrados), o limiar nociceptivo foi próximo ao basal, sugerindo que nesse tempo, a artrite induzida pelo agente pró-inflamatório estaria controlada, o que também foi observado por Frasnelli e colaboradores (2005). Observamos nesse tempo que a expressão gênica dos receptores CB2 do grupo EACP sofreu *dow-regulation*. Sugerimos que nesse tempo, há menor liberação de mediadores inflamatórios, o que não estimularia a expressão gênica dos receptores CB2.

Sugerimos que a *up-regulation* dos receptores CB1 no tempo de 24 horas do grupo de animais tratados com EACP, deve-se ao fato que a possível liberação de endocanabinóides pela estimulação elétrica dos pontos de acupuntura, alteraria os processos neuronais, levando ao aumento da expressão gênica desse receptor.

Dessa forma, nossos resultados reforçam que a EACP poderia ser utilizada em pacientes com artropatias inflamatórias, prevenindo eventos hiperalgésicos e edematosos, sendo útil para o controle da exacerbação aguda de condições crônicas. EACP também ativa o sistema endocanabinóide, agindo tanto na periferia quanto centralmente sobre a ativação dos receptores CB1 e CB2. Um melhor entendimento na



regulação dos receptores canabinóides, bem como a elucidação dos mecanismos que envolvem a interação entre o sistema canabinóide e a terapia por acupuntura e/ ou EACP, adicionam novas evidências moleculares ao mecanismo de ação da acupuntura.

## **CONCLUSÕES**

## 8. Conclusões

Nossos resultados permitem concluir que a EACP possui resposta antinociceptiva no teste de hipernocicepção mecânica induzida por zymosan na ATM de rato. EACP também apresentou efeito anti-inflamatório nesse modelo experimental, reduzindo migração neutrofílica, permeabilidade vascular e reduzindo a imunopressão de TNF- $\alpha$  e das enzimas COX-2 e NOSi na região da ATM. Os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório são observados tanto quando a EACP é realizada previamente, assim como após a indução da artrite na ATM de ratos.

Concluimos também que a EACP ativa o sistema endocanabinóide e essa ativação parece mediar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório nesse modelo. Provavelmente a resposta antinociceptiva da EACP envolve a participação de receptores CB1 enquanto que a anti-inflamatória tem a participação dos receptores CB2. O efeito antinociceptivo da EACP, pelo menos nesse protocolo experimental, parece ser independente do seu efeito anti-inflamatório. EACP atua sobre a expressão gênica dos receptores canabinóides CB1 e CB2 na região do trato espinhal do trigêmeo, podendo isso contribuir para as respostas observadas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, T. S.; CHEN, M. L.; MA, S. X. TRPV1 expression in acupuncture points: Response to electroacupuncture stimulation. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 41, n. 3, p. 129–36, 2011.
- AHLUWALIA, J.; URBAN, L.; BEVAN, S.; CAPOGNA, M.; NAGY, I. Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurons. **Neuroscience**, v. 110, n.4, p. 747-753, 2002.
- AHN, A. C. ; PARK, M.; SHAW, J. R.; MCMANUS, C. A.; KAPTCHUK, T. J.; LANGEVIN, H.M. Electrical impedance of acupuncture meridians: the relevance of subcutaneous collagenous bands. **PLoS One**, vol.5, n. 7, e119070, 2010.
- AL-ANI, M. Z.; DAVIES, S. J.; GRAY, R. J. M.; SLOAN, P.; GLENNY, A. M. Stabilization splint therapy for temporomandibular pain dysfunction syndrome. **Cochrane Database of Systematic Reviews.**, v.1, p. CD002778, 2004.
- AL-MOBIREEK, A. F.; DARWAZEH, A. M. G.; HASSANIN, M. B. Experimental induction of rheumatoid arthritis in temporomandibular joint of the guinea pig: a clinical and radiographic study. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 29, n. 5, p. 286-290, 2000.
- AMANZIO, M.; BENEDETTI, F. Neuropharmacological dissection of placebo analgesia: expectation-activated opioid systems versus conditioning activated specific subsystems. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 484-494, 1999.
- AMARAL, D. G. The Anatomical Organization of the Central Nervous System. In : Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessell, T. M. (eds), **Principles of Neural Science**, 4. ed., part IV, chapter 17, United States of America, McGrawHill, 2000.
- ANTONJEVIC, I.; MOUSA, S. A.; SCHAFER, M.; STEIN, C. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. **Journal of Neuroscience** , v. 15, n. 1, p. 165-172, 1995.
- BAKER, D.; PRYCE, G.; CROXFORD, J. L.; BROWN, P.; PERTWEE, R. G.; HUFFMAN, J. W.; LAYWARD, L. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. **Nature**, v. 404, n. 6773, p.84-87, 2000.
- BALASUBRAMANIAM, R.; DE LEEUW, R.; ZHU, H.; NICKERSON, R. B.; OKESON, J. P.; CARLSON, C. R. Prevalence of temporomandibular disorders in fibromyalgia and failed back syndrome patients: a blinded prospective comparison study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 104, n. 2, p. 204-216, 2007.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 309–338, 1984.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M., 2001. The perception of pain. In: Kandel, E.R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (Eds.), **Principles of Neural Science**. McGraw-Hall, pp. 472–491, 2001.

BELL, E.B. **Dores Orofaciais**. Classificação, Diagnóstico e tratamento. 3a.ed., Quintessence Books, Rio de Janeiro, 1991.

BINDER, W.; MOUSA, S. A.; SITTE, N.; KAISER, M.; STEIN, C.; SCHAFER, M. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 92- 100, 2004.

BORNER, C.; BEDINI, A.; HOLLT, V.; KRAUS, J. Analysis of promoter regions regulating basal and interleukin-4-inducible expression of the human CB1 receptor gene in T lymphocytes. **Molecular Pharmacology**, v.73, n. 3, p. 1013–1019, 2008.

BOWDLE, T. A. Adverse effects of opioid agonists and agonist-antagonists in anaesthesia, **Drug Safety**, vol. 19, n. 3, p. 173– 89, 1998.

BRACK, A.; LABUZ, D.; SCHILTZ, A.; RITTNER, H. L.; MACHELSA, H.; SCHAFER, M.; RESZKA, R.; STEIN, C. Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. **Anesthesiology**, v. 101, n.1, p. 204-211, 2004.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, B. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood** , vol. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BRIDGES, D.; RICE, A. S.; EGERTOVA, M.; ELPHICK, M. R.; WINTER, J.; MICHAEL, G. J. Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 803– 812, 2003.

BROTON, J. G.; SESSLE, B. J. Reflex excitation of masticatory muscles induced by algesic chemicals applied to the temporomandibular joint of the cat. **Archives of Oral Biology**, v. 33, n. 10, p. 741- 747, 1988.

BURGOS, E.; PASCUAL, D.; MARTÍN, M. I.; GOICOECHEA, C. Antinociceptive effect of the cannabinoid agonist, WIN 55, 212-2, in the orofacial and temporomandibular formalin tests. **European Journal of Pain**, vol. 14, n. 1, p. 40-48, 2010

CABOT, P. J.; CARTER, L.; GAIDDON, C.; ZHANG, Q.; SCHÄFER, M.; LOEFFLER, J. P.; STEIN, C. Immune cell-derived –  $\beta$  endorphin: production, release and control of inflammatory pain in rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 1, p. 142- 148, 1997.

CABOT, P. J.; CARTER, L.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Methionine-enkephalin and dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain. **Pain**, vol. 93, n. 3, p. 207- 212, 2001.

CARLESON, J.; ALSTERGREN, P.; APPELGREN, A.; APPELGRE, B.; KOPP, S.; THEODORSSON, E.; LUNDEBERG, T. A model for experimental induction of acute temporomandibular joint inflammation in rats: effects of substance P (SP) on neuropeptide-like immunoreactivity. **Life Sciences**, v. 59, n. 15, p. 1193- 1201, 1996.

CARLINI, E. A. The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol(Delta 9-THC) on humans. **Toxicon**, v.44, n.4, p.461-467, 2004.

CARLISLE, S. J.; MARCIANO-CABRAL, F.; STAAB, A.; LUDWICK, C.; CABRAL, G. A. 2002. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 1, p. 69–82, 2002.

CARLSON, C.; REID, L.; CURRAN, S.; STUDTS, J.; OKESON, J.; FALACE, D., NITZ, A.; BERTRAND, P. M.. Psychological and physiological parameters of masticatory muscular pain. **Pain**, v. 76, n. 3, p. 297- 307, 1998.

CARVALHO, L. A. V.; AZEVEDO, L. O. A Model for the Cellular Mechanisms of Morphine Tolerance and Dependence . **Mathematical and Computer Modelling**, v. 32, n. 7-8, p. 933-953, 2000.

CELIC, R.; PANDURIC, J.; DULCIC, N. Psychological status in patients with temporomandibular disorders. **International Journal of Prosthodontics**, v. 19, n. 1, p. 28- 29, 2006.

CHALSMA, A. L.; BOYURN, D. **Marijuana Situation Assesment**. Washington D.C.: Office of National Drug Control Policy. 1994

CHAN, W. W. ; WEISSENSTEINER, W.D. ; RAUSCH, K.Y., CHEN, K. Y.; WU, L. S.; LIN, J. H.Comparison of Substance P concentration in acupuncture points in different tissues in dogs. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 26, n. 1, p. 13-18, 1998.

CHAN, J. S.; LEE, J.W.; HO, M. K.; WONG, Y. H. Preactivation permits subsequent stimulation of phospholipase C by G(i)-coupled receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 700- 708, 2000.

CHAVES, H. V.; RIBEIRO, R. A.; DE SOUZA, A. M. B.; SILVA, A. A. R.; GOMES, A. S.; VALE, M. L.; BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A. C. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**,2011; 2011: 707985.

CHEN, J.; LEE, C.T.; ERRICO, S.L.; BECKER, K.G.; FREED, W.J. Increases in expression of 14-3-3 eta and 14-3-3 zeta transcripts during neuroprotection induced by delta9-tetrahydrocannabinol in AF5 cells. **Journal of Neuroscience Research** , v. 85, n. 8, p. 1724-1733, 2007

CHEN, L.; ZHANG, J.; LI, F.; QIU, Y.; WANG, L.; LI, Y.; SHI, J.; PAN, H.; LI, M. Endogenous anandamide and cannabinoid receptor-2 contribute to electroacupuncture analgesia in rats. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 7, p. 732-739, 2009.

CHILDERS, SR. Opioid receptor-coupled second messengers. **Life Sciences**, v. 48, n. 21, p. 1991- 2003, 1991.

CHRISTENSEN, B. V.; JUHL, I. U.; VILBECK, H.; BULOW, H. H.; DREIJER, N. C.; RASMUNSEN, H. F. Acupuncture treatment of severe knee osteoarthritis: a long-term study. **Acta Anaesthesiologica Scandinava** , v. 36, n. 6, p. 519- 525, 1992.

CHUNG, J. M.; FANG, Z. R.; HORI, Y.; LEE, K. H.; WILLIS, W. D. Prolonged inhibition of primate spinothalamic tract cells by peripheral nerve stimulation. **Pain**, v. 19, n. 3, p. 259- 275, 1984.

CICHEWICZ, D. L.; MARTIN, Z. L.; SMITH, F. L.; WELCH, S. P. Enhancement mu opioid antinociception by oral delta 9-tetrahydrocannabinol: dose–response analysis and receptor identification. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 2, p. 859–867, 1999.

CICHEWICZ, D. L.; MCCARTHY, E. A. Antinociceptive synergy between delta (9)-tetrahydrocannabinol and opioids after oral administration. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 3, p. 1010–1015, 2003.

CORREA, F.; MESTRE, L.; DOCAGNE, F.; GUAZA, C. Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 441–448, 2005.

CRUSOL-REBELLO, I. M. R.; CAMPOS, P. S. F.; RUBIRA, I. R. F.; PANELLA, J.; MENDES, C. M. C. Evaluation of the relation between the horizontal condylar angle and the internal derangement of the TMJ – a magnetic resonance imaging study. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 176–182, 2003.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; da SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n.4, p. 434-61, 2010.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.107, n. 3, p. 660-664, 1992.

CUNHA, T. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C. M.; DUARTE, H. L.; SOUZA, G. R.; VERRI, W. A. JR.; FUNEZ, M. I.; DIAS, Q. M.; SCHIVO, I. R.; DOMINGUES, A. C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M. M.; HOTHERSALL, J. S.; CRUZ, J. S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 9, p. 4442-4447, 2010.

da SILVA, M. D.; GUGINSKI, G.; WERNER, M. F.; BAGGIO, C. H.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. Involvement of interleukin-10 in the anti-Inflammatory effect of



Sanyinjiao (SP6) acupuncture in a mouse model of peritonitis. **Evidence Based of Complementary and Alternative Medicine**, 2011; 2011:217946.

DALLEL, R., LUCCARINI, P., MOLAT, J-L, WODA, A. Effects of systemic morphine on activity of convergent neurons of spinal trigeminal nucleus oralis in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 314, p. 19-25, 1996.

DAO, T. T.; LUND, J. P.; LAVIGNE, G. J. Comparison of pain and quality of life in bruxers and patients with myofascial pain of the masticatory muscles. **Journal of Orofacial Pain**, v 8, n. 4, p. 350-356, 1994.

DeLEO, J. A.; TANGA, F. Y.; TAWFIK, V. L. Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/ hyperalgesia. **The Neuroscientist**, v.10, n. 1, p. 40- 52, 2004.

DENADAI-SOUZA, A.; CAMARGO, L. L.; RIBELA, M. T.; KEEBLE, J. E.; COSTA, S. K.; MUSCARA, M. N. Participation of peripheral tachykinin NK receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **European Journal of Pain**, v.13, n. 8, p. 812-819, 2009.

DENADAI-SOUZA, A.; CENAC, N.; CASATTI, C.A.; CÂMARA, P.R.; YSHII, L. M.; COSTA, S. K.; VERGNOLLE, N; MUSCARÁ, M. N. PAR(2) and temporomandibular joint inflammation in the rat. **Journal of Dental Research**, v. 89, n.10, p. 1123-8, 2010.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. S.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946- 1949, 1992.

DELUZE, C. H.; BOSIA, L.; ZIRBS, A.; CHANTRAINE, A.; VISCHER, T. H. L. Electroacupuncture in fibromyalgia: results of a controlled trial. **British Medical Journal**, v. 305, n. 6864, p. 1249–1252, 1992.

Di LUZIO, N. R.; RIGGI, S. J. The effects of laminarin, sulfated glucan and oligosaccharides of glucan on reticuloendothelial activity. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 8, n. 5, p.465-473, 1970.

DINARELLO, C. A.; DEMPSEY, R. A.; ALLEGRETTA, M.; LOPRESTE, G.; DAINIAK, N.; PARKINSON, D. R.; MIER, J. W. Inhibitory effects of elevated temperature on human cytokine production and natural killer activity. **Cancer Research**, v. 46, n. 12, p. 6236-6241, 1986.

DOLWICK, M. F. Temporomandibular joint surgery for internal derangement. **Dental Clinics of North America**, v. 51, n. 1, p. 195–208, 2007.

DOUGLAS, C. R. **Tratado de Fisiologia Aplicada à Saúde**. 5ª ed. São Paulo: Robe Editorial, 2002. 1582 p.

DWORKIN, S. F.; HUGGINS, K. H.; LE RESCHE, L.; VON KORFF, M.; HOWARD, J.; TRUELOVE, E.; SOMMERS, E. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders. Clinical signs in cases. **Journal of the American Dental Association**, v.120, n. 3, p. 273 -81, 1990.

DWORKIN, S. F.; LeRESCHE, L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders; review, criteria, examinations and specifications critique. **Journal of Craniomandibular Disorders**, v. 6, n. 4, p. 310–55, 1992.

ELMES, S. J. R.; WINYARD, L. A.; MEDHURST, S. J.; CLAYTON, N. M.; WILSON, A. W.; KENDALL, D. A.; CHAPMAN, V. Activation of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors attenuates the induction and maintenance of inflammatory pain in the rat. *Pain*, v.118, n. 3, p.327–335, 2005.

FACCI, L.; DAL TOSO, R.; ROMANELLO, S.; BURIANI, A.; SKAPER, S. D.; LEON, A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 8, p. 3376–3380, 1995.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents and Actions**, v.30, n.3-4, p. 344-349, 1990.

FARBER, P. L.; TIMO- IARIA, C. Acupuntura e sistema nervoso. **Journal Brasileiro de Medicina**, v. 67, n. 5-6, p. 125-31, 1994.

FARQUHAR-SMITH, W. P.; EGERTOVA, M.; BRADBURY, E. J.; MCMAHON, S. B.; RICE, A. S.; ELPHICK, M. R. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 510–21, 2000.

FELDER, C. C.; BRILEY, E. M.; AXELROD, J.; SIMPSON, J. T.; MACKIE, K. E.; DEVANE, W. A. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.16, p.7656-7660. 1993.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; HEINRICHER, M. M. **Central nervous system mechanisms of pain modulation**. In: Wall, Melzack, (Eds.), *Text book of Pain*. 5<sup>a</sup> ed., Elsevier, 2005.

FIORENTINO, P. M.; CAIRNS, B. E.; HU, J. W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Archives of Oral Biology**, v.44, n. 1, p. 27-32, 1999.

FLETCHER, M. C.; PIECUCH, J. F.; LIEBLICH, S. E. **Anatomy and pathophysiology of the temporomandibular joint**. In Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery, 2<sup>a</sup> ed., Edited by Miloro M. Hamilton (Ontario): BC Decker; 2004: 933–947.

FRASNELLI, M. E.; TARUSSIO, D.; CHOBAZ-PÉCLAT, V.; BUSO, N.; SO, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Research and Therapy**, v. 7, n. 2, p. R370-R378, 2005.

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 1017–66, 2003.

FUJIWARA N, KOBAYASHI K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets –Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-288, 2005.

GAMEIRO, G. H.; DA SILVA ANDRADE, A.; NOUERR, D. F.; DE ARRUDA VEIGA, M. C. F. How may stressful experiences contribute to the development of temporomandibular disorders? **Clinical Oral Investigation**, v.10, n. 4, p. 261–8, 2006.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure , and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v.86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.

GARDNER, B.; ZU, L.X.; SHARMA, S.; LIU, Q.; MAKRIYANNIS, A.; TASHKIN, D. P.; DUBINETT, S. M. Autocrine and paracrine regulation of lymphocyte CB2 receptor expression by TGF-beta. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n.1, p. 91–96, 2002.

GARRIDO-SUAREZ, B. B.; GARRIDO, G.; MARQUEZ, L.; MARTINEZ, I.; HERNANDEZ, I.; MERINO, N.; LUQUE, Y.; DELGADO, R.; BOSCH, F. Preemptive anti-hyperalgesic effect of electroacupuncture in carrageenan-induced inflammation: role of nitric oxide. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 339-344, 2009.

GEBREMEDHIN, D.; LANGE, A. R.; CAMPBELL, W. B.; HILLARD, C. J.; HARDER, D. R. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current. **American Journal of Physiology**, v.276, n. 6, p. H2085-2093, 1999.

GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R. New insights into the role of COX 2 in inflammation. **Journal of Molecular Medicine**, v. 78, n. 3, p. 121-129, 2000.

GODDARD G. Acupuncture and sham acupuncture reduce muscle pain in myofascial pain patients. **Journal of Orofacial Pain**, v. 16, n. 1, p. 71–76, 2002.

GODDARD, G.; KARIBE, H.; MCNEILL, C.; VILLAFUERTE, E. Acupuncture and sham acupuncture reduce muscle pain in myofascial pain patients. **Journal of Orofacial Pain**, vol. 16, n. 1, p. 71- 76, 2002.

GONDIM, D. V.; CARVALHO, K. M.; VALE, M. L. Pain behavior to electroacupuncture in rabbit tooth pulp assay. **Brazilian Journal of Oral Science**, v. 9, n. 4, p. 415-420, 2010.

GONDIM, D.V.; COSTA, J. L.; ROCHA, S. S.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of electroacupuncture on

experimental arthritis of the rat temporomandibular joint. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, no prelo, 2012.

GOZZANI, J. L. Opióides e antagonistas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 44, n. 1, p. 65-73, 1994.

GUNN, C. C. Motor points and motor lines. **American Journal of Acupuncture**, v. 5, n. 1, p. 55– 58, 1978.

GUNN, C. C.; DITCHBUM, F. G.; KING, M. H.; RENWICK, G. J. Acupuncture loci: a proposal for their classification according to their relationship to known neural structures. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 4, n. 2, p. 183– 195, 1976.

GUO, W.; WANG, H.; WATANABE, M.; SHIMIZU, K.; ZOU, S.; LAGRAIZE, S. C.; WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 22, p. 6006– 6018, 2007.

HAAS, D. A.; NAKANISHI, O.; MACMILLAN, R. E.; JORDAN, R. C.; HU, J. W. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. *Archives of Oral Biology*, v. 37, n. 5, p.417-422, 1992.

HAN, J. S.; DING, X. Z.; FAN, S. G. The frequency as cardinal determinant for electroacupuncture analgesia to be reversed by naloxone. **Acta Physiologica Sinica**, v. 38, n.5, p. 475–482, 1986.

HAN, J. I.; WANG, Q. Mobilization of specific neuropeptides by peripheral stimulation of identified frequencies. *News Physiological Science*, v. 7, n. 4, p. 176–180, 1992.

HAN, Z.; JIANG, Y. H.; WANH, Y.; CHANG, J. K.; HAN, J. S. Endomorphine-1 mediates 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture analgesia in the rat. **Neuroscience Letters** , v. 274, n. 2, p. 75-78, 1999.

HAN, J. S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends in Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 17-22, 2003.

HARPER, R. P.; BROWN, C. M.; TRIPLETT, M. M.; VILLASENOR, A.; GATCHEL, R. J. Masticatory function in patients with juvenile rheumatoid arthritis. **Pediatric Dentistry** , v. 22, n.3, p. 200-206, 2000.

HARPER, R. P.; KERINS, C. A.; TALWAR, R.; SPEARS, R.; HUTCHINS, B.; CARLSON, D. S.; MCINTOSH, J. E.; BELLINGER, L. L. Meal pattern analysis in response to temporomandibular joint inflammation in the rat. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 9, p. 1704- 1711, 2000.

HE, T. F., ZHANG, S. H.; LI, L. B.; YANG, W. J.; ZHU, J.; CHEN, Y. F. Effects of acupuncture on the number and degranulation ratio of mast cells and expression of tryptase in synovium of rats with adjuvant arthritis. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v. 8, n. 7, p. 670-677, 2010.

HENRY, D. J.; CHAVKIN, C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus oocytes*. **Neuroscience Letters**, v.186, n.2-3, p.91-94. 1995.

HERB, K.; CHO, S.; STILES, M. A. Temporomandibular joint and dysfunction. **Current Pain and Headache Reports**, v. 10, n. 6, p.408–414, 2006.

HOHMANN, A. G.; HERKENHAM, M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. **Neuroscience**, v.92, n. 4, p. 1171– 1175, 1999.

HOTTA, T. H.; BATAGLION, A.; BATAGLION, C.; BEZZON, O. L. Involvement of dental occlusion and trigeminal neuralgia: A clinical report. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 77, n. 4, p. 343–345, 1997.

HOWLETT, A. C.; FLEMING, R. M. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. **Molecular Pharmacology**, v. 26, n. 3, p.532-538. 1984.

HOWLETT, A. C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; DEVANE, W. A. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 2, p. 161–202, 2002.

HU, J. Clinical observation on 25 cases of hormone dependent bronchial asthma treated by acupuncture. **Journal of the Traditional Chinese Medicine**, v. 18, n. 1, p 27-30, 1998

HUANG, G.; LeRESCHÉ, L.; CRITCHLOW, C.; MARTIN, M.; DRANGSHOLT, M. Risk factors for diagnostic subgroups of painful mandibular disorders (TMD). **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 4, p.284–8, 2002.

HUANG, C.; HUANG, Z. Q.; HU, Z. P.; JIANG, S. Z.; LI, H. T.; HAN, J. S.; WAN, Y. Electroacupuncture effects in a rat model of complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain: antinociceptive effects enhanced and tolerance development accelerated. **Neurochemical Research** , v. 33, n. 10, p. 2107-2111, 2008.

IASP Subcommittee on Taxonomy. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. **Pain**, v.6, p.249-52, 1979.

ISRAEL, H. A.; SCRIVANI, S. J. The interdisciplinary approach to oral, facial and head pain. **The Journal of the American Dental Association**, v.131, n. 7, p. 919–926, 2000.

IMAI, H.; SAKAMOTO-YODA, T.; YAMASHITA, Y. A model for internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint with experimental traction of the mandibular ramus in rabbit. **Oral Diseases** , v. 7, n. 3, p.185-191, 2001.

IOI, H.; MATSUMOTO, R.; NISHIOKA M, GOTO T, NAKATA S, NAKASIMA A , COUNTS A. Relationship of TMJ osteoarthritis/ osteoarthrosis to head posture and dentofacial morphology. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v.11, n.1, p. 8-16, 2008.

JANSON, W.; STEIN, C. Peripheral opioid analgesia. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.4, n. 4, p. 270-74, 2003.

JEAN-GILLES, L.; GRAN, B.; CONSTANTINESCU, C. S. Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system. **Immunobiology**, v. 215, n. 8, p.606-610, 2010.

JL, R. R.; ZHANG, Q.; LAW, P. Y.; LOW, H. H.; ELDE, R.; HOKFELT, T. Expression of mu-, delta-and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 8156–66, 1995.

JUBB, R. W.; TUKMACHI, E. S.; JONES, P. W.; DEMPSEY, E.; WATERHOUSE, L.; BRAILSFORD, S. A blinded randomised trial of acupuncture (manual and electroacupuncture) compared with a non-penetrating sham for the symptoms of osteoarthritis of the knee, **Acupuncture Medicine**, v. 26, n. 2, p. 69–78, 2008.

JUNG, J. Y.; YANG, H. R.; JEONG, Y. J.; VANG, M. S.; PARK, S. W. Effects of acupuncture on c-Fos expression in brain after noxious tooth stimulation of the rat. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 6, p. 989-1003, 2006.

KACENA, M. A.; MERREL, G. A.; KONDA, S. R.; WILSON, K. M.; XI, Y.; HOROWITZ, M. C. Inflammation and bony changes at the temporomandibular joint. **Cells Tissues Organs**, v. 169, n. 3, p. 257–264, 2001.

KANEYAMA, K.; SEGAMI, N.; NISHIMURA, M.; SATO, J.; FUJIMURA, K.; YOSHIMURA H. [The ideal lavage volume for removing bradykinin, interleukin-6, and protein from the temporomandibular joint by arthrocentesis.](#) **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 6, p. 657- 661, 2004.

KAWAKITA, K.; FUNAKOSHI, M. Suppression of the jaw-opening reflex by conditioning a-delta fiber stimulation and electroacupuncture in the rat. **Experimental Neurology**, v. 78, n. 2, p. 461–65, 1982.

KEYSTONE, E. C.; SCHORLEMMER, H. U.; POPE, C.; ALLISON, A. C. Zymosan induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheumatism**, v. 20, n. 7, p. 1396-1401, 1977.

KIM, S. H.; WON, S. J.; MAO, X. O.; JIN, K.; GREENBERG, D. A. Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 691– 696, 2006.

KO, E. S.; KIM, S. K.; KIM, J. T.; LWW, G.; HAN, J. B.; RHO, S. W.; HONG, M. C.; BAE, H.; MIM, B. I. The difference in mRNA expressions of hypothalamic CCK and CCK-A and -B receptors between responder and non-responder rats to high frequency electroacupuncture analgesia. **Peptides**, v. 27, n. 7, p. 1841–1845, 2006.



KONG, J.; FUFA, D. T.; GERBER, A. J.; ROSMAN, I. S.; VANGEL, M. G.; GRACEY, R. H.; GOLLUB, R. L. Psychophysical outcomes from a randomized pilot study of manual, electro, and *sham* acupuncture treatment on experimentally induced thermal pain. **Journal of Pain**, v. 6, n. 1, p. 55–64, 2005.

KRESS, M.; KUNER, R. Mode of action of cannabinoids on nociceptive nerve endings. **Experimental Brain Research**, v. 196, n. 1, p. 79–88, 2009.

KWAN, C.L.; HU, J.W.; SESSLE, B.J. Neuroplastic effects of neonatal capsaicin on neurons in adult rat trigeminal nucleus principalis and subnucleus oralis. **Journal of Neurophysiology**, v.75, n. 1, p. 298-310, 1996

LANGEVIN, H. M.; CHURCHILL, D. L.; CIPOLLA, M. J. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. **FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2275–2282, 2001a.

LANGEVIN, H. M.; YANDOW, J. A. Relationships of acupuncture points and meridians to connective tissues planes. **Anatomical Record**, v. 269, n. 6, p.257–265, 2002.

LAU, W. K.; CHANW, K.; ZHANG, J. L., YUNG, K. K. L., ZHANG, H. Q. Electroacupuncture inhibits cyclooxygenase-2 up-regulation in rat spinal cord after spinal nerve ligation. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 463-468, 2008.

LAU, W. K.; LAU, Y. M.; ZHANG, H. Q.; WONG, S. C.; BIAN, Z. X. Electroacupuncture versus celecoxib for neuropathic pain in rat snl model. **Neuroscience**, v. 170, n. 2, p. 655-661, 2010.

LEE, G. S.; RHO, S.; SHIN, M. K.; HONG, M.; MIN, B. I.; BAE, H. 2002. The association of cholecystokinin-A receptor expression with the responsiveness of electroacupuncture analgesic effects in rat. **Neuroscience Letters**, v. 325, n. 1, p. 17–20, 2002.

LEE, Y. H.; LEE, W. C.; CHEN, M. T; HUANG, J. K.; CHUNG, C.; CHANG, L. S. Acupuncture in the treatment of renal colic. **Journal of Urology** ,v. 147, n. 1, p.16–18, 1992.

LEE, J. H.; JANG, K. J.; LEE, Y. T.; CHOI, Y. H.; CHOI, B. T. Electroacupuncture inhibits inflammatory edema and hyperalgesia through regulation of cyclooxygenase synthesis in both peripheral and central nociceptive sites. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 6, p. 981-988, 2006.

LEKKAS, C. Experimental degenerative temporomandibular joint disease. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 23, n. 6, p. 423-424, 1994.

LEUNG, A.; KHADIVI, B.; DUANN, J. R.; CHO, Z. H.; YAKSH, T. The effect of Ting point (tendinomuscular meridians) electroacupuncture on thermal pain: a model for studying the neuronal mechanism of acupuncture analgesia. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, n. 4, p. 653–661, 2005.

LEVINE, J. D.; GORMLEY, J.; FIELDS, H. L. Observations on the analgesic effects of needle acupuncture (acupuncture). *Pain*, v. 2, n. 2, p. 149–159, 1976.

LI, A. H.; ZHANG, J. M.; XIE, Y. K. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin–nerve complexes with enriched nerve endings. *Brain Research*, v. 1012, n. 1-2, p. 154–159, 2004.

LI, A.; LAO, L.; WANG, Y.; XIN, J.; REN, K.; BERMAN, B. M.; TAN, M.; ZHANG, R. Electroacupuncture activates corticotrophin-releasing hormone-containing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus to alleviate edema in a rat model of inflammation. *BMC Complementary Alternative Medicine*, v. 12, n.1, p. 8:20, 2008.

LI, H.; LI, X. H.; ZHANG, L. F. Influence of electroacupuncture of "Dazhui" (GV 14) "Mingmen" (GV 4) and non-acupoint on the inflammation and immune reactions in adjuvant arthritis rats. *Zhen Ci Yan Jiu*, v. 34, n. 4, p. 225-229, 2009.

LIU, B.; ZHANG, R. X.; WANG, L.; REN, K.; QIAO, J. T.; BERMAN, B. M.; LAO, L. Effects of pertussis toxin on electroacupuncture-produced anti-hyperalgesia in inflamed rats. *Brain Research*, v. 1044, n. 1, p. 87-92, 2005.

LIU, H. X.; TIAN, J. B.; LUO, F.; JIANG, Y. H.; DENG, Z. G.; XION, L.; LIU, C.; WANG, J. S.; HAN, J. S. Repeated 100 Hz TENS for the treatment of chronic inflammatory hyperalgesia and suppression of spinal release of Substance P in monoarthritic rats. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 4, n. 1, p. 65-75, 2007.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *European Journal of Pharmacology*, v. 114, n. 3, p. 375-381, 1985.

LORIA, F.; PETROSINO, S.; MESTRE, L.; SPAGNOLO, A.; CORREA, F.; HERNANGOMEZ, M.; GUAZA, C.; DIMARZO, V.; DOCAGNE, F. Study of the regulation of the endocannabinoid system in a virus model of multiple sclerosis reveals a therapeutic effect of palmitoylethanolamide. *European Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 4, p. 633–641, 2008.

LU, G. W.; LIANG, R. Z.; XIE, J. Q.; WANG, Y. S.; HE, G. R. Role of peripheral afferent by needling point Zusanli. *Science Sinica*, v. 22, n. 6, p. 680–92, 1979.

LUNDEBERG, T.; ALSTEGREN, P.; APPELGREN, A.; APPELGREN, B.; CARLSON, J.; KOPP, S.; THEODORSSON, E. A model for experimentally induced temporomandibular joint arthritis in rats: effects of carrageenan on neuropeptide-like immunoreactivity. *Neuropeptides*, v. 30, n. 1, p. 37-41, 1996.

MACHADO, A. *Neuroanatomia Funcional*. 2. ed., São Paulo, Editora Atheneu, 1993.

MACHELSKA, H.; STEIN, C. Pain control by immune-derived opioids. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 27, p. 533-536, 2000.



MACKIE, K.; LAI, Y.; WESTENBROEK, R.; MITCHELL, R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. **Journal of Neuroscience**, v.15, n.10, p.6552-6561. 1995.

MAKRIYANNIS, A.; MECHOULAM, R.; PIOMELLI, D. Therapeutic opportunities through modulation of the endocannabinoid system. **Neuropharmacology**, v.48, n.8, p.1068-1071. 2005.

MANFREDI, A. P. S. **Estudo da manifestação da disfunção temporomandibular (DTM) influenciada pelo estresse na população de uma universidade pública**. Campinas, 2005. (Dissertação Mestrado- Universidade Estadual de Campinas).

MARBACH, J. J.; RAPHAEL, K. G.; DOHRENWEND, B. P.; LENNON, M. C. The validity of tooth grinding measures: Etiology of pain dysfunction syndrome revisited. **Journal of the American Dental Association**, v.120, n. 3, p. 327-33, 1990.

MASON JR., D. J.; LOWE, J.; WELCH, S. P. Cannabinoid modulation of dynorphin A: correlation to cannabinoid-induced antinociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 378, n. 3, p. 237-248, 1999.

MARSICANO, G.; MOOSMANN, B.; HERMANN, H.; LUTZ, B.; BEHL, C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, n.3, p.448-456, 2002.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561- 564, 1990.

MAYER, D. J. Biological mechanisms of acupuncture. **Progress in Brain Research**, v. 122, p. 457-477, 2000.

MAYER, D. J.; PRICE, D. D.; RAFFI, A. Antagonism of acupuncture analgesia in man by narcotic antagonist naloxone. **Brain Research**, v. 121, n. 2, p. 368-372, 1977.

MBVUNDULA, E. C.; BUNNING, R. A. D.; RAINSFORD, K. D. Effects of cannabinoids on nitric oxide production by chondrocytes and proteoglycan degradation in cartilage. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 635-640, 2005.

McDONALD, J. A short history of point usage: Zusanli. **Pacific Journal of Oriental Medicine**, v. 6, p. 35-44, 1995.

McNEILL, C. H. **Temporomandibular Disorders, guidelines for classification, assessment and management**. The American Academy of Orofacial Pain. Chicago: Quintessence Publishing; 1993.

MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N. E.; SCHATZ, A. R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B. R.; COMPTON, D. R.; PERTWEE, R. G.; GRIFFIN, G.; BAYEWITCH, M.; BARG, J.; VOGEL, Z.

Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.

MI, W. L.; MAO-YING, Q. L.; LIU, Q.; WANG, X. W.; WANG, Y. Q.; WU, G. C. Synergistic anti-hyperalgesia of electroacupuncture and low dose of celecoxib in monoarthritic rats: involvement of the cyclooxygenase activity in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 77, n. 2-3, p. 98-104, 2008.

MILAM, S. B.; ZARDENETA, G.; SCHMITZ, J. B. Oxidative stress and degenerative temporomandibular joint disease: a proposed hypothesis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, n. 2, p. 214-223.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de políticas de saúde. **Política nacional de práticas integrativas e complementares em saúde bucal**: atitude de ampliação e acesso. 1ª ed., Brasília, 2006. 91p.

MOLINA, O.F. **Fisiopatologia craniomandibular: oclusão e ATM**. São Paulo, Pancast, 1995. 677 p.

MOLINA-HOLGADO, F.; PINTEAUX, E.; MOORE, J. D.; MOLINA-HOLGADO, E.; GUAZA, C.; GIBSON, R. M.; ROTHWELL, N. J. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 16, p. 6470–6474, 2003.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.

MUNHOZ, W. C. **Os Núcleos do Complexo Sensorial do Trígêmeo**. Monografia. Biblioteca da Faculdade de Odontologia – UNESP – de São José dos Campos, 1999, 71p.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.

NAKAJIMA, Y.; FURUICHI, Y.; BISWAS, K. K.; HASHIGUCHI, T.; KAWAHARA, K.; YAMAJI, K.; UCHIMURA, T., IZUMI, Y., MARUYAMA, I. Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. **FEBS Letters**, v.580, n. 2, p. 613–619, 2006.

NAMBA, S.; NISHIMOTO, A. Stimulation of internal capsule thalamic sensory nucleus (VPM) and cerebral cortex inhibition deafferentation hyperactivity provoked after Gasserian Ganglionectomy in cat. **Acta Neurochirurgica Supplementum**, v.42, p.243-247, 1988.

NOIMAN, M.; GARTY, A.; MAIMON, Y.; MILLER, U.; LEV-ARI, S. Acupuncture for treating temporomandibular disorder: retrospective study on safety and efficacy. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 3, n.4, p. 260–266, 2010.

OH, J. H.; BAI, S. J.; CHO, Z. H.; HAN, H. C.; MIN, S. S.; SHIM, I.; LEE, H. J.; LEE, H.; LEE, B. H. Pain-relieving effects of acupuncture and electroacupuncture in an

animal model of arthritic pain. **International Journal of Neuroscience**, v. 116, n.10,p. 1139-1156, 2006.

OLIVEIRA, A. S.; BERMUDEZ, C. C.; SOUZA, R. A.; SOUZA, C. M. F.; DIAS, E. M.; CASTRO, C. E. S.; BERZIN, F. Impacto da dor na vida de portadores de disfunção temporomandibular. **Journal of Applied Oral Science**, v. 11, n. 2, p. 138-43, 2003.

OKESON, J. P. **Diagnóstico diferencial e considerações sobre o tratamento**. IN: OKESON, J.P. Dor Orofacial. Guia para avaliação, diagnóstico e tratamento, São Paulo. Ed Quintessence, 1998, p. 113-184.

OKESON, J. P. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**. 6ª edição. Curitiba. Elsevier, 2008.

OKESON, J. P.; LEEUW, R. Differential Diagnosis of Temporomandibular Disorders and Other Orofacial Pain Disorders. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 105–120, 2011.

OTTANI, A.; LEONE, A.; SANDRINI, M.; FERRARI, A.; BERTOLINI, A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 531, n. 1-3, p. 280-281, 2006.

PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 389–462, 2006.

PÁLDY E.; ERIKA BEREZKI, E.; SÁNTHA , M.; WENGER , T.; ANNA BORSODI , A.; ZIMMER, A.; BENYHE, S. CB2 cannabinoid receptor antagonist SR144528 decreases mu-opioid receptor expression and activation in mouse brainstem: Role of CB2 receptor in pain. **Neurochemistry International**, v. 53, n.6-8 , p.309- 316, 2008.

PALMER, R. M.; HICKERY, M. S.; CHARLES, I. G.; MONCADA, S.; BAYLISS, M. T. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.193, n.1, p. 398-405, 1993.

PARADA, C. A.; LUCCARINI, P.; WODA, A. Effect of an NMDA receptor antagonist on the wind-up of neurons in the trigeminal oralis subnucleus. **Brain Research**, v.761, p.313-320,1997.

PASTERNAK, G. W.; ZHANG, A. Z.; TECOTT, L. Developmental differences between high and low affinity opiate binding depression. **Life Science**, v. 27, n. 13, p. 1185-1189, 1980.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**.4th ed., Academic Press, San Diego, 1998.

PERTWEE, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. **Life Science**, v.76, n.12, p.1307-1324. 2005.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** v. 29, n. 9, e45, 2001.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, n.11, p.873-884, 2003.

POMERANZ, B.; CHIU, D. Naloxone blockade of acupuncture analgesia: endorphin implicated. **Life Science**, v. 19, n. 11, p. 1757-1762, 1976.

POMERANZ, B., PALEY, D. Electroacupuncture hypolgesia is mediated by afferent nerve impulses: an electrophysiological study in mice. **Experimental Neurology**, v. 66, n 2, p. 398–402, 1979.

PRZEWLOCKI, R.; COSTA, T.; LANG, J.; HERTZ, A. Pertussis toxin abolishes the antinociception mediated by opioid receptors in rat spinal cord. **European Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 1, p. 91-95, 1987.

QUARTILHO, A.; MATA, H. P.; IBRAHIM, M. M.; VANDERAH, T. W.; PORRECA, F.; MAKRIYANNIS, A.; MALAN, T. P. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 955–960, 2003.

RACZ, I.; NADAL, X.; ALFERINK, J.; BANOS, J. E.; REHNELT, J.; MARTÍN, M.; PINTADO, B.; GUTIERREZ-ADAN, A.; SANGUINO, E.; BELLORA, N.; MANZANARES, J.; ZIMMER, A.; MALDONADO, R. Interferon-gamma is a critical modulator of CB(2) cannabinoid receptor signaling during neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 46, p. 12136–12145, 2008.

REN K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 67, n. 5, p. 711-716, 1999.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p.111-118, 2000.

RICHARDSON, D.; PEARSON, R. G.; KURIAN, N.; LATIF, M. L.; GARLE, M. J.; BARRETT, D. A.; KENDALL, D. A.; SCAMMELL, B. E.; REEVE, A. J.; CHAPMAN, V. Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v.10, n. 2, p. R43, 2008.

RICHARDSON, J. D.; KILO, S.; HARGREAVES, K. M. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. **Pain**, v.75, n. 1,p.111-119, 1998.

RICHTER, A.; HERLITZ, J.; HJALMARSON, A. Effect of acupuncture in patients with angina pectoris. **European Heart Journal**, v.12, n. 2, p. 175–178, 1991.

RIVERS, J. R.; ASHTON, J. C. The development of cannabinoid CBII receptor agonists for the treatment of central neuropathies. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v.10, n.1, p. 47-64, 2010.

ROCHA, F. A. C.; ARAGÃO, A. G. M. JR; OLIVEIRA, R. C.; POMPEU, M. M. L.; VALE, M. R.; RIBEIRO, R. A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485-490, 1999.

ROGERS, P. A.; SCHOEN, A. M.; LIMEHOUSE, J. Acupuncture for immune-mediated disorders. Literature review and clinical applications. **Problems in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 162-193, 1992

ROSTED, P. Practical recommendations for the use of acupuncture in treatment of temporomandibular disorders based on the outcome of published controlled studies. **Oral Diseases**, v.7, n. 2, p. 109–115, 2001.

ROVERONI, R. C.; PARADA, C. A.; CECILIA, M.; VEIGA, F. A.; TAMBELLI, C. H. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain**, v. 94, n. 2, p. 185-191, 2001.

SALIO, C.; DOLY, S.; FISCHER, J.; FRANZONI, M.F.; CONRATH, M. Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 329, n. 1, p. 13-16, 2002

SANTOS, L. M. M.; MARTELETE, M. Acupuntura no tratamento da dor. In: MANICA, J. et al. **Anestesiologia. Princípios e técnicas**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.1307-1309.

SAÑUDO-PEÑA, M. C.; STRANGMAN, N. M.; MACKIE, K.; WALKER, J. M.; TSOU, K. CB1 receptor localization in spinal cord and roots, dorsal root ganglion, and peripheral nerve. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 12, n. 12, p. 1115– 1120, 1999.

SATO, T.; INO, Y.; KOSHIYAMA, Y.; MOTOYOSHI, A.; ODA, M.; IWAKI, M. Inhibitory effects of a novel synthetic protease inhibitor, FUT-175, on the paw edema in rats and zymosan-induced complement activation in vitro. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 587- 589, 1986.

SCHÄFER, M.; CARTER, L.; STEIN, C. Interleukin 1<sub>β</sub> and corticotrophin releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 10, p. 4219-23, 1994.

SCHWARTZ, C. **Quatro patas, cinco direções**. Um guia de Medicina Chinesa para cães e gatos. 1ªed. São Paulo: Ícone, 2008. 470p.

SCHORLEMMER, H. U.; BITTER-SUERMAN, D.; ALLISON, A. C. Complement activation by the alternative pathway and macrophage enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation. **Immunology**, v. 32, n. 6, p. 929-940, 1977.

SHAN, S.; QI-LIANG, M. Y.; HONG, C.; TINGTING, L.; MEI, H.; HAILI, P.; YAN-QING, W.; ZHI-QI, Z.; YU-QIU, Z. Is functional state of spinal microglia involved in the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of electroacupuncture in rat model of monoarthritis? **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 3 , p. 558-568, 2007

SHEN, M.; THAYER, S. A. Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. **Molecular Pharmacology**, v. 54, n. 3, p. 459–462, 1998.

SHENG, L. L.; NISHIYAMA, K.; HONDA, T.; SUGIURA, M.; YAGINUMA, H.; SUGIURA, Y. Suppressive effects of Neiting acupuncture on toothache: an experimental analysis on Fos expression evoked by tooth pulp stimulation in the trigeminal subnucleus pars caudalis and the periaqueductal gray of rats. **Neuroscience Research**, v. 38, n. 4, p. 331-339, 2000.

SHENG, W. S.; HU, S.; MIN, X.; CABRAL, G. A.; LOKENSGARD, J. R.; PETERSON, P. K. 2005. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1 $\beta$ -stimulated human astrocytes. **Glia**, v. 49, n. 2, p. 211–219, 2005.

SHENG, X. P.; FAN, T. Y. Comparative observation on hip osteoarthritis treated with electroacupuncture and medication. **Zhongguo Zhen Jiu**, v. 30, n. 12, p. 982-984, 2010.

SMITH, F.L.; CICHEWICZ, D.; MARTIN, Z. L.; WELCH, S. P. 1998. The enhancement of morphine antinociception in mice by delta 9-tetrahydrocannabinol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 60, n. 2, p. 559–566, 1998.

SMITH, P. A.; SELLEY, D. A.; SIM-SELLEY, L. J.; WELCH, S. P. Low dose combination of morphine and  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol circumvents antinociceptive tolerance and apparent desensitization of receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.571, n. 2-3, p. 129–37, 2007.

SMITH, T. H.; SIM-SELLEY, L. J.; SELLEY, D. E. Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins: novel targets for central nervous system drug discovery? **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 3, p.454-466, 2010.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. 2-Arachidonylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 215, n. 1, p. 89– 97, 1995.

SUN, M. Y.; HSIEH, C. L.; CHENG, Y. Y.; HUNG, H. C.; LI, T. C.; YEN, S. M.; HUANG, I. S. The therapeutic effects of acupuncture on patients with chronic neck myofascial pain syndrome: a single-blind randomized controlled trial. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 38, n.5, p.849-859, 2010.

SUN, S.; CAO, H.; HAN, M.; LI, T. T.; ZHAO, Z. Q.; ZHANG, Y. Q. Evidence for suppression of electroacupuncture on spinal glial activation and behavioral hypersensitivity in a rat model of monoarthritis. **Brain Research Bulletin**, v. 275, n. 1, p. 83-93, 2008.

TAFFAREL, M. O; FREITAS, P. M. C. Acupuntura e analgesia: aplicações clínicas e principais acupontos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2665-2672, 2009.

TAKAGI, J.; YONEHARA, N. Serotonin receptor subtypes involved in modulation of electrical acupuncture. **Journal of Pharmacology**, v.78, n. 4, p. 511- 514, 1998.

TAKAHASHI, T., KONDOH, T.; FUKUDA, M.; YAMAZAKI, Y.; TOYOSAKI, T.; SUZUKI, R. (1998) Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 85, n. 2, p. 135–141, 1998.

TAKASHEGE C, SATO, T.; MERA, T., HISAMITSU, T.; FANG, J. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. **Brain Research Bulletin**, v. 29, n. 5, p. 617- 634, 1992.

TAKESHITA, K.; SAKAI, K.; GANTNER, F. Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, n.3, p. 1072- 1078, 2003.

TANAKA, E.; DETAMORE, M.; MERCURI, L. Degenerative disorders in temporomandibular joint: etiology, diagnosis and treatment. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 4, p. 296-307, 2008.

TANG, M. L.; HAAS, D. A.; HU, J. W. Capsaicin-induced joint inflammation is not blocked by local anesthesia. **Anesthesia Progress**, v. 51, n. 1, p. 2-9, 2004.

TEIXEIRA, M. J. **A lesão do trato de Lissauer e do corno posterior da substância cinzenta da medula espinal e a estimulação elétrica do sistema nervoso central para o tratamento da dor por desafferentação**. São Paulo, 1990. Tese (Doutorado), São Paulo Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 256 p.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, v. 1, n. 4, p. 329- 334, 2001.

TESSER-VISCAÍNO, S. A.; DENADAI-SOUZA, A.; TEIXEIRA, S. A.; ERVOLINO, E.; CRUZ-RIZZOLO, R. J.; COSTA, S. K.; MUSCARÁ, M. N.; CASATTI, C. A. Putative antinociceptive action of nitric oxide in the caudal part of the spinal trigeminal nucleus during chronic carrageenan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint. **Brain Research**, v. 1302, p.85-96, 2009.

THOMAS, M.; LUNDEBERG, T. Does acupuncture work? **Pain**, v. 4, n. 3, p. 1–4, 1996.

TODA, K.; ICHIOKA, M. Electroacupuncture: relations between forelimb afferent impulses and suppression of jaw-opening reflex in the rat. **Experimental Neurology**, v. 61, n. 2, p. 465–470, 1978.

TOMINAGA, K.; ALSTERGREN, P.; KURITA, H.; KOPP, S. Clinical course of an antigen-induced arthritis model in the rabbit temporomandibular joint. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v. 28, n. 6, p. 268-273, 1999.

TSUI, P.; LEUNG, M. C. Comparison of the effectiveness between manual acupuncture and electro-acupuncture on patients with tennis elbow, **Acupuncture Electrotherapy Research**, v. **27**, n. **2**, p. 107–117, 2002.

VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A.; BENEVIDES, V. M.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; RIBEIRO, R. A. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **European Journal of Pharmacology**, v.536, n.3, p. 309-317, 2006.

VAS, J.; WHITE, A. Evidence from RCTs on optimal acupuncture treatment for knee osteoarthritis: An exploratory review. **Acupuncture Medicine**, v. 25, n. 1-2, p. 29–35, 2007.

VILLANUEVA, L.; RABOISSON, P. Aspects périphériques et médullaires de la douleur trigéminal. **Réal Clinical**, v. 5, p. 121–133, 1994.

VINCENT, C. A. The treatment of tension headache by acupuncture: a controlled single case design with time series analysis. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 34, n. 5, p. 553–561, 1990.

VIVANCOS, G. G.; VERRI, W. A. JR; CUNHA, T. M.; SCHIVO, I. R.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medicine Biology Research**, v.37, n. 3, p. 391-399, 2004.

VOGEL, Z., BARG, J., LEVY, R., SAYA, D., HELDMAN, E. E MECHOULAM, R. Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. **Journal of Neurochemistry**, v.61, n.1, p.352-355, 1993.

WALKER, J. M.; HUANG, S. M. Cannabinoid analgesia. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 95, n. 2, p. 127- 35, 2002.

WALKER, J. M.; HOHMANN, A. G. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, p. 509–554, 2005.

WALTER, L.; FRANKLIN, A.; WITTING, A.; WADE, C.; XIE, Y.; KUNOS, G.; MACKIE, K.; STELLA, N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. **The Journal of Neuroscience**, v. **23**, n. 4, p. 1398-1405, 2003.

WANG, Q., MAO, L.M., HAN, J.S. The arcuate nucleus of hypothalamus mediates low but not high frequency electroacupuncture analgesia in rats. **Brain Research**, v. 513, n. 1, p. 60–65, 1990a.

WANG, Q.; MAO, L. M.; HAN, J. The role of periaqueductal gray in mediation of analgesia produced by different frequencies electroacupuncture stimulation in rats. **International Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 2-4, p. 167- 172, 1990b.

WANG, Q.; MAO, L. M., HAN, J. S. 1991. The role parabrachial nucleus in high frequency



electroacupuncture analgesia in rats. **Chinese Journal of Physiology Science**, v. 7, p. 363–371, 1991.

WANG, Q.; PENG, Y.; CHEN, S.; GOU, X.; HU, B.; DU, J.; LU, Y.; XIONG, L. Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system. **Stroke**, v.40, n. 6, p. 2157-2164, 2009

WARE, M. A.; WANG, T.; SHAPIRO, S.; ROBINSON, A.; DUCRUET, T.; HUYNH, T.; GAMSA, A.; BENNETT, G. J.; COLLET, J. P. Smoked cannabis for chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. **Canadian Medical Association Journal**, v. 182, n. 14, p. E694-701, 2010.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 12, p. 9730- 985, 2003.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neuroscience**, v. 24, n. 8, p. 450-455, 2001.

WEINBERG, J. B. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. **Immunology Research**, v. 22, n. 2-3, p. 319-341, 2000.

WELCH, S. P.; EADS, M. Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems. **Brain Research**, v. 848, n. 1-2, p. 183–190, 1999.

WOTHERSPOON, G.; FOX, A.; MCINTYRE, P.; COLLEY, S.; BEVAN, S.; WINTER, J. Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. **Neuroscience**, v.135, n.1, p. 235–245, 2005.

WITZEL, T.; NAPADOW, V.; KETTNER, N. W.; WANGEL, M. G.; HÄMÄLÄINEN, M. S.; DHOND, R. P. Differences in cortical response to acupressure and electroacupuncture stimuli. **BMC Neuroscience**, v. 12, n. 73, p. 1-8, 2011.

WONG, C. L.; WONG, V. C. Effect of acupuncture in a patient with 7-year-history of Bell's palsy. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.14, n. 7, p. 847-853, 2008

WOOLF, C. J.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; MA, Q. P.; CRILLY, P.; WINTER, J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. **Neuroscience**, v. 62, n. 2,327–331, 1994.

WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: The contribution of tumor necrosis factor alpha. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 3, p. 417–424, 1997.

WU, C. P.; CHAO, C. C.; ZHAO, Z. Q.; WEI, J. Y. Inhibitory effect produced by stimulation of afferent nerves on responses of cat dorsolateral fasciculus fibers to nocuous stimulus. **Science Sinica**, v. 17, n. 5, p. 688–697, 1974.

WU, D. Z. Acupuncture and neurophysiology. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 92, n. 1, p. 13- 25, 1990.

YAILLEN, D. M.; SHAPIRO, P. A.; LUSCHEI, E. S.; FELDMAN, G. R. Temporomandibular joint meniscectomy: effects of joint structure and masticatory function in *Macaca fascicularis*. **Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 7, n. 4, p. 255-264, 1979.

YAMAMURA, Y. **Acupuntura tradicional: a arte de inserir**. 2a ed. São Paulo: Editora Roca; 2001.

YANG, C. X.; SHI, T. F.; LIANG, Q. C.; YANG, B. F.; JIAO, R. S.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; XU, M. Y. Cholecystokinin-8 antagonizes electroacupuncture analgesia through its B receptor in the caudate nucleus. **Neuromodulation**, v. 13, n. 2, p. 93-98, 2010.

YAP, A. U.; TAN, K. B.; CHUA, E. K.; TAN, H. H. Depression and somatization in patients with temporomandibular disorders. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 88, n. 5, p.479–84, 2002.

YONEHARA, N. Influence of serotonin receptor antagonists on substance P and serotonin release evoked by tooth pulp stimulation with electro-acupuncture in the trigeminal nucleus caudalis of the rabbit. **Neuroscience Research**, v. 40, n. 1, p. 45–51, 2001.

YU, X. M.; SESSLE, B. J.; VERNON, H.; HU, J. W. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. **Pain**, v.60, n. 2, p. 143-149, 1995.

YUAN, M.; KIERTSCHER, S.; CHENG, Q.; ZOUMALAN, R.; TASHKIN, D. P.; ROTH, M. D. Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. **Journal of Neuroimmunology**, v.133, n. 1-2, p. 124–131, 2002.

XIE, Y.; LI, H.; XIAO, W. Neurobiological mechanisms of the meridian and the propagation of needle feeling along the meridian pathway. **Science China Series C Life Science**, v. 39, n. 1, p. 99-112, 1996.

ZAMMA, T. Adjuvant-induced arthritis in the temporomandibular joint of rats. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 3, p. 1291-1299, 1983.

ZHANG, G. G.; YU, C.; LEE, W.; LAO, L.; REN, K.; BERMAN, B. M. Involvement of peripheral opioid mechanisms in electroacupuncture analgesia. **Explore**, v. 1, n. 5, p. 365-371, 2005.

ZHANG, J.; CHEN, L.; SU, T.; CAO, F.; MENG, X.; PEI, L.; SHI, J.; PAN, H.L.; LI, M. Electroacupuncture increases CB2 receptor expression on keratinocytes and infiltrating inflammatory cells in inflamed skin tissues of rats. **Journal of Pain**, v. 11, n.12, p 1250-1258, 2010.

ZHANG, S. P.; ZHANG, J. S.; YUNG, K. K.; ZHANG, H. Q. Non-opioid dependent anti-inflammatory effects of low frequency electroacupuncture. **Brain Research Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 327–334, 2004.

ZHANG, R. X.; LAO, L.; WANG, X.; REN, K.; BERMAN, B. B. Electroacupuncture combined with indomethacin enhances antihyperalgesia in inflammatory rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 4, p. 793–797, 2004.

ZHANG, W. T.; JIN, Z.; CUI, G. H.; ZHANG, K. L.; ZHANG, L.; ZENG, Y. W.; LUO, F.; CHEN, A. C.; HAN, J. S. Relations between brain network activation and analgesic effect induced by low vs. high frequency electrical acupoint stimulation in different subjects: a functional magnetic resonance imaging study. **Brain Research**, v. 982, n. 2, p. 168- 178, 2003.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanisms underlying acupuncture analgesia. **Progress Neurobiology**, v. 85, n. 4, p. 355-75, 2008.

ZHOU, Y.; SUN, Y.H.; SHEN, J. M.; HAN, J. S. Increased release of immunoreactive CCK-8 by electroacupuncture and enhancement of electroacupuncture analgesia by CCK-B antagonist in rat spinal cord. *Neuropeptides*, v.24, n. 3, p. 139–144, 1993.

ZHU, L. X.; YE, Y.; MO, X. R.; JI, Z. F. 2002. The important role of activation of GABA<sub>B</sub> receptors in acupuncture analgesia. **Acupuncture Research**, v. 27, n. 2, p. 85–91, 2002.

ZHUANG, S. Y.; BRIDGES, D.; GRIGORENKO, E.; MCCLOUD, S.; BOON, A.; HAMPSON, R. E.; DEADWYLER, S. A. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 8, p.1086–1096, 2005.

ZIJLSTRA, F. J.; VANDENBERG DE LANGE, I.; HUYGEN, F. J.; KLEIN, J. Anti-inflammatory actions of acupuncture. **Mediators of Inflammation**, v. 12, n. 2, p. 59–69, 2003.

ZOLLNER, C.; SHAQURA, M. A.; BOPAIAH, C. P.; MOUSA, S.; STEIN, C.; SCHAFER, M. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 202–210, 2003.

