

EFEITO INIBITÓRIO DA ACUPUNTURA SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS

(EFFECT OF ACUPUNCTURE ON THE MIGRATION OF NEUTROPHILS TO THE PERITONEAL CAVITY)

(EFECTO INHIBITÓRIO DE LA ACUPUNTURA SOBRE LA MIGRACIÓN DE NEUTRÓFILOS PARA LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES)

M. V. R. SCOGNAMILLO-SZABÓ^{1*}, G. H. BECHARA², F. Q. CUNHA³

RESUMO

A acupuntura é um método terapêutico milenar reconhecido por sua eficácia no tratamento da dor, porém seu efeito sobre processos inflamatórios é ainda pouco conhecido e maiores estudos são necessários. Neste trabalho, é investigado o efeito da acupuntura manual sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina, em ratos. Os resultados indicam que a acupuntura exerce efeito antiinflamatório após injeção intraperitoneal de carragenina. Entretanto, essa ação não depende dos hormônios corticóides. Mais pesquisas poderão elucidar os mecanismos envolvidos na ação antiinflamatória da acupuntura.

PALAVRAS-CHAVE: Acupuntura. Inflamação. Neutrófilos. Ratos. Carragenina.

SUMMARY

Acupuncture is an ancient and empirical therapeutic method known by its efficacy in the treatment of pain. However, the role acupuncture plays on inflammatory process is still poorly understood. Additional research is needed. In this work, we investigated the effect of manual acupuncture on the migration of neutrophils to the peritoneal cavity induced by carrageenam stimuli in rats. Our results indicated that acupuncture presents an anti-inflammatory effect in carrageenam-induced neutrophil migration. Such action does not depend on endogenous corticoids. Further investigation is needed to elucidate the mechanisms involved in the anti-inflammatory action of acupuncture.

KEY -WORDS: Acupuncture. Inflammation. Neutrophils. Rats. Carrageenam.

RESUMEN

La acupuntura es un método terapéutico milenaria reconocido por su eficacia en el tratamiento del dolor, sin embargo su efecto sobre los procesos inflamatorios aun es poco conocido y más estudios son necesarios. En este trabajo es investigado el efecto de la acupuntura manual sobre la migración de neutrófilos para la cavidad peritoneal inducida por la carragenina en ratones. Los resultados indican que la acupuntura ejerce efecto antiinflamatorio después de la inyección intraperitoneal de carragenina. Sin embargo, esa acción no depende de las hormonas corticoides. Investigaciones adicionales podrán aclarar los mecanismos envueltos en la acción antiinflamatoria de la acupuntura.

PALABRAS-CLAVE: Acupuntura. Inflamación. Neutrófilos. Ratones. Carragenina.

¹ Professora do Mestrado em Ciências Veterinárias, FAMEV - UFV, CEP 38400-902, Uberlândia - MG. szabo@asbyte.com.br

² Professor Titular do Departamento de Patologia Veterinária, FCAV - Unesp - Campus de Jaboticabal - SP.

³ Professor Titular do Departamento de Farmacologia, FMRP - USP, Ribeirão Preto - SP.

INTRODUÇÃO

Acupuntura é a estimulação de pontos específicos do corpo com objetivo de atingir um efeito terapêutico ou homeostático (SCHOEN, 1993). Trata-se de uma terapia reflexa, em que o estímulo de uma área age sobre outras. Para este fim, utiliza, principalmente, o estímulo nociceptivo.

O termo acupuntura deriva dos radicais latinos *acus* e *pungere*, que significam agulha e punção, respectivamente. Faz parte de um conjunto de conhecimentos teórico-empíricos, a Medicina Tradicional Chinesa (MTC), e visa à terapia e à cura das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas em pontos específicos (WEN, 1989; JAGGAR, 1992).

Estudos abordando a ação da acupuntura sobre moléstias inflamatórias são escassos na literatura, tornando importante a investigação da interferência da acupuntura sobre o processo inflamatório, visto que esse está presente no desenvolvimento de inúmeros distúrbios. De modo geral, a reação do organismo a dano tecidual, iniciado por trauma mecânico, químico ou invasão de microorganismos, resulta em respostas celulares e humorais rápidas, altamente controladas e complexas levando à ativação de sistemas como o do complemento, o fibrinolítico, o das cininas e a cascata de coagulação do sangue. De grande importância para reação é a liberação de variados mediadores inflamatórios. Este processo é considerado benigno se a resposta inflamatória for regulada adequadamente, para manter células e mediadores químicos somente no local da injúria tissular. O tratamento com acupuntura reduz a resposta inflamatória, diminuindo o volume de exsudato e a migração de leucócitos no modelo de injeção de terebentina no pavilhão auricular de coelhos (KENDALL, 1989b e QINGLAN, 1991b), assim como a temperatura da pele e o perímetro da articulação na artrite experimental em ratos (ZHAO e ZHU, 1990). Corroborando com esses dados, testes clínicos controlados comprovam a eficácia da acupuntura no tratamento de processos inflamatórios como artrites (TOWNSEND et al., 1999; TUMACHI, 1999). SIN et al. (1984) suprimiram a pleurisia aguda induzida por carragenina em ratos com estimulação elétrica do ponto (eletroacupuntura) e observaram que diferentes formatos de onda podem produzir efeitos diversos neste modelo. A supressão do processo inflamatório agudo pôde ser obtida com o uso de onda descontínua (15 e 25 ciclos/min), onda denso-dispersa (15 ciclos/min), pulso periódico de onda dispersa (8 Hz) e densa (50Hz). Porém o uso da onda denso-dispersa (25 ciclos/min) e de ondas “triple” e “sawtooth” induziu aumento do processo (SIN, 1986). Em mulheres, o uso de acupuntura durante o trabalho de parto leva à redução na liberação periférica de substância P (SP) (ZHAO e ZHU, 1992; MA, 1992).

O modelo de injeção intraperitoneal de carragenina em ratos é amplamente utilizado para o estudo da inflamação não imune, visto ser a carragenina uma substância com potente ação quimiotática.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação da acupuntura mediante estímulo inflamatório intraperitoneal em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Cinquenta e três ratos Wistar machos, com peso variando entre 180 a 200g provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP, USP) e mantidos sob condições de temperatura (23-25°C) e ciclo claro/escuro (12:12h) controlados, com livre acesso à ração e água. Os ratos foram divididos nos seguintes grupos:

Para avaliação do efeito da acupuntura sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal:

Controle negativo: cinco ratos recebendo veículo (solução salina) intraperitonealmente;

Controle positivo: doze ratos recebendo irritante (carragenina) intraperitonealmente;

Falso tratado: nove ratos recebendo irritante (carragenina) intraperitonealmente e tratados com falsa-acupuntura;

Tratado: quatorze ratos recebendo irritante (carragenina) intraperitonealmente e tratados com acupuntura;

Para avaliação do efeito da acupuntura sobre o rolamento, adesão e migração de leucócitos em vênulas do mesentério:

Controle positivo: três ratos recebendo irritante (carragenina) intraperitonealmente;

Tratado: seis ratos recebendo irritante (carragenina) intraperitonealmente e tratados com acupuntura;

Para avaliação da interferência dos hormônios do córtex da adrenal sobre o efeito antiinflamatório da acupuntura:

Controle negativo: quatro ratos recebendo veículo (solução salina) por via oral e irritante (carragenina) intraperitonealmente;

Controle positivo: quatro ratos recebendo veículo (solução salina) por via oral, irritante (carragenina) intraperitonealmente e tratados com acupuntura;

Controle tratado: quatro ratos recebendo RU 486 por via oral e irritante (carragenina) intraperitonealmente;

Tratado: quatro ratos recebendo RU 486 por via oral, irritante (carragenina) intraperitonealmente e tratados com acupuntura.

Indução da Peritonite: Após anti-sepsia da pele, foi efetuada a injeção intraperitoneal de solução salina estéril (1mL/cav) ou carragenina (30µg/mL/cav). Todos experimentos foram realizados no período matutino, compreendido entre as 8h e 11h, para evitar interferências circadianas na aplicação da técnica de acupuntura (CHEN

e HE, 1989; STORCH, 2002).

Tratamentos: Os animais foram tratados com acupuntura manual (ou falsa acupuntura) em dois tempos distintos: 10 min e 2h após a injeção do estímulo. A descrição detalhada dos protocolos de tratamento encontra-se no Quadro 1.

Colheita e processamento do exsudato peritoneal: A colheita do material foi efetuada 4h após o estímulo inflamatório. O exsudato peritoneal foi colhido por lavagem da cavidade peritoneal com 10mL de solução PBS/EDTA. Para a contagem global de células inflamatórias, foi utilizado um contador automático de células³ e o resultado expresso como número de células x 10⁶/cavidade. A contagem diferencial foi feita de esfregaços preparados em citocentrífuga⁴ e corados pelo método May-Grünwald-Giemsa (Rosenfeld). As lâminas foram examinadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (1000X). Foram contadas 100 a 200 células, diferenciando-as em três tipos: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares.

Microscopia Vital: ratos que receberam carragenina intraperitoneal e tratados ou não com acupuntura, foram submetidos à microscopia vital 2h após o estímulo inflamatório. Sob anestesia com tribromoetanol i.p. 2,5% (10µL/g ou 250mg/Kg), foi efetuada a abertura da cavidade peritoneal, com exposição do mesentério para observação da microcirculação (vênulas pós-capilares) *in situ*. Os animais foram mantidos sobre placa aquecida (37°C) dotada de área transparente sobre a qual o tecido foi fixado com auxílio de algodão. A preparação foi feita sobre o “charriot” do microscópio⁵ e mantida úmida e aquecida com solução salina a 37°C. Foram avaliados o número de leucócitos em rolamento e aderidos ao endotélio, além do número de leucócitos emigrados para o tecido perivascular correspondente a 1000µm².

Avaliação da interferência dos hormônios do córtex da adrenal sobre o efeito antiinflamatório da acupuntura: Duas horas antes da indução da peritonite, os animais receberam 20mg/Kg de mifepristona⁶ (ou RU-486, um antagonista de receptores de corticóides) diluído em metilcelulose 0,1% por via oral. Para tal, foram mantidos em jejum nas 18 horas que precederam o experimento. A indução da peritonite e o tratamento foram efetuados como descrito.

RESULTADOS

No modelo de peritonite induzida por carragenina, a acupuntura demonstrou efeito antiinflamatório, reduzindo significativamente a migração de neutrófilos ao fim da quarta hora pós-estímulo. O grupo tratado com falsa-acupuntura não diferiu do grupo controle não-tratado (Figura 1).

Os resultados da análise microscópica vital mostraram que, duas horas após o estímulo inflamatório,

o rolamento e a adesão de leucócitos ao endotélio de vênulas do mesentério foram similares nos grupos tratado com acupuntura e controle não-tratado. A avaliação da emigração de leucócitos para o tecido perivascular mostrou uma tendência de a acupuntura em aumentá-la (Figura 2). A inibição da ação dos hormônios corticóides, obtida com a administração prévia de mifepristone (RU-486), não interferiu na inibição da migração de leucócitos decorrente do tratamento com acupuntura em ratos que receberam carragenina intraperitoneal. Entretanto, o pré-tratamento com RU-486 levou à redução na migração de leucócitos nos animais que não receberam pós-tratamento.

DISCUSSÃO

Testes clínicos controlados comprovam a eficácia da acupuntura no tratamento de processos inflamatórios como artrites (TOWNSEND et al., 1999; TUMACHI, 1999). Porém, estudos experimentais sobre a ação da acupuntura em processos inflamatórios são raros (SIN et al. 1984; KENDALL, 1989b; ZHAO e ZHU, 1990 e QINGLAN, 1991b; ZHAO e ZHU, 1992; MA, 1992). Dentre os modelos utilizados em estudos experimentais, a indução na migração de neutrófilos com uso de carragenina por via intraperitoneal é modelo consagrado na investigação do processo inflamatório agudo, por utilizar uma substância com intensa ação quimiotática. Apesar de sua importância, não há registros na literatura científica da utilização desse modelo para a investigação da ação antiinflamatória da acupuntura.

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram uma clara ação antiinflamatória da acupuntura sobre a migração induzida por carragenina na cavidade peritoneal de ratos. Entretanto, sob microscopia intravital realizada 2h após o estímulo inflamatório, o rolamento, a adesão e a migração de leucócitos em vênulas do mesentério não se mostrou diferente entre os grupos. Tal resultado, aparentemente controverso, pode-se dever ao “time-course” da carragenina, a qual não confere rolamento/adesão tão intensos quanto o LPS (dados não expostos) neste mesmo período, ou seja, duas horas após o estímulo.

A partir desse dado, seguimos para investigar a interferência do estresse por contenção (induzido no momento da inserção da agulhas de acupuntura) sobre essa ação antiinflamatória. É sabido que o estresse é capaz de liberar corticóides, hormônios capazes de reduzir a resposta inflamatória (PEREIRA, 2002). Além disso, o agulhamento, um estímulo nociceptivo inespecífico é capaz, por si próprio, de desencadear a liberação de

¹ Coulter AcT

² Cytospin 3; Shandon

³ Nikon Evlipse TE 200

⁴ Sigma Chemical Co.

Quadro 1 - Descrição dos protocolos de tratamento com acupuntura e falsa acupuntura em ratos submetidos à injeção intraperitoneal de carragenina.

<i>Protocolos de Tratamento</i>							
<i>Acupuntura</i>				<i>Falsa Acupuntura</i>			
Tempo	Ponto de Acupuntura	Localização do Ponto	Técnica de Estímulo	Tempo	Ponto Estimulado	Localização do Ponto	Técnica de Estímulo
10 min	1 - Yin Tang	Glabella (região entre os supercílios), acima da intersecção do osso frontal com osso nasais.	Inserção da agulha paralelamente à pele e no sentido dorso-ventral. Três a 10 rotações para esquerda, com permanência da agulha.	10 min	1 – falso Yin-tang	Um cm lateralmente ao Yin Tang	Idêntica à utilizada para o Yin Tang.
	2 - Hou Hai	Entre o ânus e a cauda.	Inserção da agulha paralelamente ao sacro, com profundidade correspondente a 2/3 dele. Rotação bilateral da agulha até obtenção de uma ou mais das seguintes respostas: contração do m. cremáster, elevação da cauda, flexão de ambos membros posteriores. Retirada da agulha.		2 – falso Hou Hai	No ângulo formado entre a cauda e o membro posterior esquerdo.	Inserção da agulha na pele até obtenção de elevação da cauda e/ou flexão de ambos membros posteriores.
	3 – Bai Hui	Espaço lombosacral	Inserção e rotação bilateral da agulha, com sua permanência.		3 – falso Bai Hui	Um cm lateralmente ao Bai Hui.	Idêntica à utilizada para o Bai Hui.
2h	Idem 10 min	Idem 10 min.	Idem 10 min.	2h	Idem 10 min	Idem 10 min.	Idem 10 min.

opióides endógenos, neurotransmissores com ação antiálgica e, em algumas situações, antiinflamatória. Ademais, o fenômeno de obtenção de efeito com um estímulo inespecífico (no caso, o agulhamento) já foi observado com uso da acupuntura em outros modelos (ALVARENGA et al., 1998) e em testes clínicos (FILSHIE e CUMMUNGS, 1999). Neste contexto, optamos pela adoção de um grupo de tratamento com falsa acupuntura. Os resultados demonstram que não há diferença significativa na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal entre os grupos tratados com falsa-acupuntura e controle não tratado, sugerindo não haver o envolvimento de corticóides na ação antiinflamatória da acupuntura. Para testar tal hipótese, pré-tratamos os ratos com um antagonista para receptores de hormônios corticoesteróides (RU-486). O bloqueio da ação dos hormônios corticoesteróides não interferiu no tratamento com acupuntura, demonstrando o não envolvimento desses hormônios no mecanismo antiinflamatório da acupuntura, em nosso modelo experimental.

No conjunto, os dados apresentados no presente trabalho demonstram uma interferência mensurável e significativa da acupuntura sobre o processo inflamatório. Foi demonstrada a ação antiinflamatória da acupuntura e que seu efeito não é devido ao estímulo inespecífico do agulhamento da derme, mas sim à resposta desencadeada pela punção do ponto de acupuntura, conforme mapeado pelos antigos chineses.

De forma geral, a pesquisa da acupuntura reveste-se de grande interesse, na medida em que poderá traduzir conceitos milenares e contribuir para sua incorporação na prática médica. Ao mesmo tempo, a investigação sobre o uso da acupuntura no processo inflamatório experimentalmente induzido abre novas perspectivas para investigações na área, inclusive acerca dos mecanismos de ação dessa técnica.

Estudos pormenorizados serão necessários para entendermos o nível da interferência da acupuntura em diversos tecidos e também para elucidar seus mecanismos de ação. Os resultados aqui apresentados descrevem

experimentos pilotos que servirão como base para estas investigações futuras.

Finalmente, diante do exposto, deve-se considerar o potencial terapêutico da acupuntura em desordens inflamatórias.

ARTIGO RECEBIDO: Janeiro/03

APROVADO: Julho/2004

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, S. A scientific model for acupuncture. Part II. **American Journal of Acupuncture**, v.17, n.4, p.342-360, 1989.
- ALVARENGA, M. A., FERREIRA, J. P. C., MEIRA, C., LUNA, S. P. L. Induction of luteolysis in mares utilizing a micro-dose of prostaglandin F2a in the sacral lumbar space. **Equine Veterinary Science**, v.18, n.3, p.167-168, 1998.
- CHEN, X., HE, Z. A quantitative study of circadian variations in mast cell number in different regions of the mouse. **Acta Anatomica**, v.136, p.222-225, 1989.
- FILSHIE, J., CUMMINGS, M. Eastern Medical Acupuncture. In: ERNST, E., WHITE, A. **Acupuncture, a Scientific Appraisal**. Oxford: Butterworth Heinemann, 1999. p.30-59.
- JAGGAR, D. History and basic introduction to veterinary acupuncture. **Problems in Veterinary Medicine**, v.4, n.1, p.13-15, 1992.
- KENDALL, D. E. A scientific model for acupuncture. Part I. **American Journal of Acupuncture**, v.17, n.3, p.251-68, 1989a.
- MA, H. The effect of acupuncture in the content of substance P in serum of grávida during delivery (Resumo). **Chen Tzu Yen Chiu**, v.17, n.1, p.65-66, 1992.
- PEREIRA, A.M.T.B. (Org.). **Burn out: quando o trabalho ameaça o bem estar do trabalhador**. São Paulo, Editora Casa do Psicólogo, 2002. 316p.
- QINGLAN, W. Research on animal acupuncture-moxibustion immunity. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 24., Rio de Janeiro, RJ, 1991a, **Anais...** p. 57.
- QINGLAN, W. Studies of the regulatory effects of acupuncture on Yin-Yang equilibrium. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 24., Rio de Janeiro, RJ, 1991b, **Anais...** p. 59.
- SCHOEN, A.M. Introduction to veterinary acupuncture: scientific basis and clinica applications. In: ANNUAL CONVENTION THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 39., 1993, California. **Proceedings...** p.39.
- SIN, Y.M. Effect of different waveforms on acute pleurisy during electrical acupuncture. **American Journal of Acupuncture**, v.14, n.1, p.39-42, 1986.
- SIN, Y. M., GWEE, M. S., LOH, M. S. Eletric acupuncture on carrageenan-pleurisy: comparative study using various body regions for stimulation. **American Journal of Acupuncture**, v.12, n.4, p. 355-8, 1984.
- STORCH, K.F., LIPAN, O., LEYKIN, I., VISWANATHAN, N., DAVIS, F. C., WONG, W. H. Extensive and divergenet circadian gene expression in liver and heart. **Nature**, v. 417, p. 78-83, 2002. Disponível em: <endereço eletrônico>. Acesso em: 22 abr. 2002.
- TOWNSEND, S., SATHANATHAN, R., KRISS, S., DORÉ, C. J. The effect of acupuncture on patients with rheumatoid artritis: a ramdomized, placebo-controlled cross over study. **Rheumatology**, v.38, p.864-9, 1999.
- TUMACHI, E. Acupuncture treatment of osteoarthritis. **Acupuncture Medicine**, v.17, p.65-7, 1999.
- WEN, T. S. **Acupuntura Clássica Chinesa**. 2.ed. São Paulo: Ed. Cultrix, 1989. 225p.
- ZHAO, F., ZHU, L. Therapeutic effects of electroacupuncture on acute experimental arthritis in rats. **Chen Tzu Yen Chiu**, v.15, n.3, p.197-202, 1992.