



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

JARDEL CRISTIANO ECCO

**EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA NO SISTEMA PURINÉRGICO E EM
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ADULTOS COM DOR LOMBAR
CRÔNICA NÃO ESPECÍFICA**

CHAPECÓ

2024

JARDEL CRISTIANO ECCO

**EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA NO SISTEMA PURINÉRGICO E EM
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ADULTOS COM DOR LOMBAR
CRÔNICA NÃO ESPECÍFICA**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciências Biomédicas
da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS
como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciências Biomédicas
sob a orientação da Prof^a Dra
Débora Tavares de Resende e Silva.

CHAPECÓ

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Sc-484, Km 02- Fronteira Sul

Chapecó, SC - Brasil

CEP 89815-899

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Ecco, Jardel Cristiano

EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA NO SISTEMA PURINÉRGICO E EM BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ADULTOS COM DOR LOMBAR CRÔNICA NÃO ESPECÍFICA / Jardel Cristiano Ecco. -- 2024. 78 f.

Orientadora: Doutora Débora Tavares de Resende e Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Chapecó, SC, 2024.

1. Eletroacupuntura. 2. Dor Lombar Crônica. 3. Sistema Purinérgico. 4. Marcadores Inflamatórios. I. Silva, Débora Tavares de Resende e, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JARDEL CRISTIANO ECCO

EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA NO SISTEMA PURINÉRGICO E EM BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ADULTOS COM DOR LOMBAR CRÔNICA NÃO ESPECÍFICA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas defendido em banca examinadora em 07/08/2024.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Débora T. R. Silva

Prof^a Dra. Débora Tavares de Resende e Silva - UFFS

Presidente da banca/orientadora

Prof^a. Dra. Aline Manica - UNOCHAPECÓ

Membro titular externo

Prof^a Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel - UFFS

Membro titular interno

Prof^a Dra. Fabiana Brum Haag - UFFS

Membro titular interno

Chapecó/SC, 07 de Agosto 2024

Dedico este trabalho a todos que direta ou indiretamente me incentivaram, apoiaram e ajudaram, para que esse final de ciclo fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a minha orientadora Professora Débora Tavares de Resende e Silva que esteve comigo nesta trajetória, incentivando e fortalecendo minha aprendizagem, além de me dar a liberdade e confiança para finalizar este trabalho.

Agradeço também em especial a Professora Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel, pelo incentivo, dedicação e ensinamentos.

A servidora Filomena Marafon, pela paciência, ensinamentos, determinação, comprometimento e a enorme ajuda neste trabalho.

Agradeço ao nosso grupo de pesquisa e os que participaram deste projeto, minha gratidão, e a todos os meus colegas discentes e docentes da Pós-Graduação.

Um agradecimento também à Professora Aline Manica e Fabiana Brum Haag por ter participado das bancas de qualificação e da defesa deste trabalho.

Sou grato a Ângela Silva, minha esposa e companheira por todo amor, incentivo, carinho, suporte, paciência que demonstrou por mim e que foi essencial na minha trajetória. A minha filha Lígia pelo amor, carinho e sorriso, os quais me fizeram seguir adiante. Com toda certeza, sem vocês esse título não seria possível.

Estendo também o agradecimento a minha mãe Jandira, meu pai Claudir e minha irmã Bianca pelo amor incondicional e por todo suporte oferecido até hoje.

Por fim, agradeço a agência de fomento CAPES, a qual tenho grande estima e gratidão pelo apoio que me proporcionou e pelos esforços de gestão para uma ciência brasileira forte, de qualidade e que nos orgulha!

RESUMO

O sistema de sinalização purinérgico assim como os marcadores inflamatórios participam da regulação de eventos patológicos e fisiológicos para modulação da dor e inflamação. A eletroacupuntura (EA) pode promover adaptações distintas e influenciar a sinalização purinérgica, assim como o perfil inflamatório. O objetivo deste estudo foi investigar o papel do sistema purinérgico na dor lombar crônica não específica (DLCNE) durante o tratamento com EA. Um total de 23 pacientes com DLCNE de ambos os sexos foram submetidos a uma sessão de EA por 20 minutos e os efeitos agudos foram verificados antes e após esta sessão. A EA foi realizada com profundidade de agulhamento de 5 mm nos pontos de acupuntura Shenshu (BL23, bilateral), Dachangshu (BL25, bilateral), Weizhong (BL40, bilateral), Sanyinjiao (SP6, bilateral) e Xuan zhong (GB-39, bilateral). Os parâmetros de estimulação da EA foram por meio de onda intermitente, frequência baixa de 2 Hz e largura de pulso de 10 mA. Foi coletado sangue antes e após a sessão de EA, e os parâmetros inflamatórios, assim como as atividades e expressão das enzimas do sistema purinérgico foram verificadas. Os resultados mostraram aumento significativo na concentração de ATP extracelular pós-EA ($p < 0,0036$) comparado com pré-EA. Além disso houve aumento da atividade da hidrólise de AMP e ADA pós-EA ($p < 0,0019$ e $p < 0,0021$, respectivamente), e aumento da expressão de e5NT/CD73 pós-EA ($p < 0,0007$). Em relação aos marcadores inflamatórios foi observado aumento nos níveis de IL-10 ($p < 0,0128$). Foi observado uma correlação moderada e positiva entre e5NT/CD73 e IL-10 ($r = 0,5141$), e uma correlação moderada e negativa entre e5NT/CD73 e IL-4 ($r = -0,5266$). Estas observações indicam uma influência da EA na modulação do comportamento enzimático das ectonucleotidases, assim como em marcadores inflamatórios em pessoas com DLCNE.

Palavras-chave: Sistema purinérgico. Inflamação. Interleucinas. Eletroacupuntura. Dor lombar crônica.

SUMMARY

The purinergic signaling system as well as inflammatory markers participate in the regulation of pathological and physiological events for modulation of pain and inflammation. Electroacupuncture (EA) can promote distinct adaptations and influence purinergic signaling, as well as the inflammatory profile. The aim of this study was to investigate the role of the purinergic system in chronic nonspecific low back pain (CNSLP) during EA treatment. A total of 23 patients with CNSLP of both sexes underwent one EA session for 20 minutes and the acute effects were verified before and after this session. EA was performed with a 5 mm needling depth at the acupoints Shenshu (BL23, bilateral), Dachangshu (BL25, bilateral), Weizhong (BL40, bilateral), Sanyinjiao (SP6, bilateral) and Xuan zhong (GB-39, bilateral). The EA stimulation parameters were intermittent wave, low frequency of 2 Hz and pulse width of 10 mA. Blood was collected before and after the EA session, and the inflammatory parameters, as well as the activities and expression of the purinergic system enzymes were verified. The results showed a significant increase in the concentration of extracellular ATP after EA ($p < 0.0036$) compared to pre-EA. In addition, there was an increase in the activity of AMP and ADA hydrolysis after EA ($p < 0.0019$ and $p < 0.0021$, respectively), and an increase in the expression of e5NT/CD73 after EA ($p < 0.0007$). Regarding inflammatory markers, an increase in IL-10 levels was observed ($p < 0.0128$). Regarding inflammatory markers, an increase in IL-10 levels was observed ($p < 0.0128$). A moderate and positive correlation was observed between e5NT/CD73 and IL-10 ($r = 0.5141$), and a moderate and negative correlation between e5NT/CD73 and IL-4 ($r = -0.5266$). These observations indicate an influence of EA in the modulation of the enzymatic behavior of ectonucleotidases, as well as in inflammatory markers in individuals with CNSLP.

Keywords: Purinergic system. Inflammation. Interleukins. Electroacupuncture. Chronic low back pain.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Protocolo de intervenção da EA.....	34
FIGURA 2 – Imagem do equipamento utilizado para EA.....	36
FIGURA 3 – Quantificação de ATP extracelular.....	44
FIGURA 4 – Atividade enzimática de CD39, CD73, ADA.....	45
FIGURA 5 – Expressão de CD39 e CD73.....	46
FIGURA 6 – Quantificação de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α).....	48
FIGURA 7 – Análise de correlação entre ecto-nucleotidasas e citocinas.....	50

LISTA DE TABELAS

QUADRO 1 - Protocolo da Eletroacupuntura.....	35
TABELA 2 - Características dos indivíduos.....	43
TABELA 3 - Análise de correlação de Pearson entre ectonucleotidasas e citocinas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DL – Dor lombar

DLNE – Dor lombar não específica

DLC – Dor lombar crônica

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

TNF - Fator de necrose tumoral

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

PCR - Proteína C reativa

ATP - Adenosina trifosfato

ADP - Adenosina difosfato

ADO - Adenosina

E-NTPDase – Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

e5NT/CD73 - ecto-5'-nucleotidase

ADA - Adenosina Deaminase

A1R - Receptor de adenosina 1

A2AR - receptor de adenosina 2A

A3R - receptor de adenosina 3

EA – Eletroacupuntura

GABA - Ácido gama-aminobutírico

P2XRs - Receptores purinérgicos 2X

P2YRs - Receptores purinérgicos 2Y

EPSCs - Correntes pós-sinápticas excitatórias

GPI - Glicosil fosfatidilinositol

TCR - Receptor de células T

MHCII - Complexo principal de histocompatibilidade da classe 2

APC - Célula apresentadora de antígeno

TH1 – Células T helper 1

TH2 - Células T helper 2

TH17 – Células T helper 17

Tfh - Células auxiliares foliculares
IL 12 - Interleucina 12
IFN - Interferon tipo 1
IL-4 Interleucina 4
IL-6 Interleucina 6
TGF-b - Fator de crescimento transformador beta
IFN- γ - Interferon gama
IL-1 β - Interleucina 1 beta
TNF-a - Fator de necrose tumoral alfa
IL-5 - interleucina 5
IL-13 - interleucina 13
Treg - Células T reguladoras
ENTPD1/CD39 - Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
IL-10 - Interleucina
TCR - Receptor da célula T
MHC-II – Complexos de histocompatibilidade da classe II
APC – Célula apresentadora de antígeno
IL-35 - Interleucina
IL-2 - Interleucina
ACRs - Regiões conservadas da apirase
GPI -Glicosil fosfatidilinositol
MA – Acupuntura manual
AP - Acupuntura
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.2 OBJETIVOS.....	18
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
1.3 JUSTIFICATIVA.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 A NEUROBIOLOGIA DA DOR.....	20
2.2 SISTEMA NEUROIMUNE E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA.....	23
2.3 SISTEMA PURINÉRGICO E DOR.....	26
2.4 ELETROACUPUNTURA, SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	31
3.2 PARTICIPANTES.....	31
3.3 PROCEDIMENTOS.....	32
3.4 COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	35
3.4.1. Coleta de material biológico e protocolos experimentais.....	35
3.4.2. Protocolo de separação de soro e plasma.....	35
3.4.3. Protocolo de separação dos linfócitos.....	36
3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....	37
3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	37
3.6.1. Determinação da atividade da E-NTPDase1 (CD39).....	37
3.6.2. Determinação da atividade da Ecto-5'-nucleotidase (CD73).....	38
3.6.3. Atividade ADA.....	38
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE ATP.....	39
3.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS.....	39
3.9 Avaliação da expressão enzimática de ENTPD1/CD39 e e5NT/CD73 por citometria de fluxo.....	40
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS.....	40

4. RESULTADOS	41
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	41
4.2 PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICO.....	43
4.3 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS.....	46
5.4.1 Correlação entre ectonucleotidases e citocinas.....	47
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCUSSÃO	57
7. REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	71
ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

A acupuntura tem sido usada na China há milhares de anos para aliviar muitos tipos diferentes de dor com base nas teorias da medicina tradicional chinesa. A Acupuntura Tradicional Chinesa é uma terapia popular de 3000 anos. Ela é baseada em conceitos metafísicos de “ch'i” (Qi), uma suposta energia corporal que corre por canais hipotéticos chamados “meridianos”. Uma das premissas básicas da medicina tradicional chinesa é que há centenas de pontos de acupuntura distribuídos por todo o corpo humano e podem ser ativados por agulhas de acupuntura para aliviar a dor (Davis, 1975).

Com o aumento das publicações de pesquisa, aumentaram também as evidências de que a acupuntura pode ser explicada em uma base fisiológica em vez de metafísica. Com o desenvolvimento da tecnologia moderna, temos uma melhor compreensão dos mecanismos por trás desses antigos métodos de tratamento chineses (Chen et al., 2020).

Duas formas de AP podem ser utilizadas, a acupuntura manual (AM) envolve levantar e empurrar as agulhas ou girá-las até que uma sensação de Deqi seja alcançada, que é descrita como uma sensação de dor, dormência, plenitude ou peso, por outro lado a eletroacupuntura (EA) foi desenvolvida na década de 1950, onde as agulhas são conectadas a um estimulador elétrico que fornece impulsos de alta ou baixa frequência, ou uma combinação de ambos. A frequência, a voltagem, a forma de onda e a duração da estimulação elétrica contribuem para a padronização da EA (Lin; Kotha; Chen, 2022).

Embora a eficácia da AP e da EA seja amplamente reconhecida, o mecanismo de ação para os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios EA não é claro (Lv; Yang; Yin, 2021; Patel et al., 2020). É proposto que a analgesia induzida pela AP é um efeito abrangente que começa pela ativação de pontos de acupuntura, que possuem estruturas anatômicas especiais. Os sinais induzidos pela acupuntura são então transmitidos para a medula espinhal e áreas relevantes do cérebro, onde aumentam ou diminuem múltiplos neurotransmissores, moduladores e fatores inflamatórios para aliviar a dor (Zhao, 2008).

Para estudar o mecanismo analgésico da acupuntura, vários estudos empregaram tecnologia moderna, como raios X, tomografia computadorizada e ressonância magnética funcional e biologia molecular. Pesquisas modernas mostraram que a analgesia é essencialmente uma manifestação de processos integrativos em diferentes níveis no sistema nervoso central e periférico envolvendo neurotransmissores e neuromoduladores (Qiao et al., 2020).

O esclarecimento dos mecanismos de ação subjacentes da AP ou EA é um desafio de grande significância teórica e prática. As redes neurais e imunológicas são essenciais no mecanismo dos efeitos da EA (Gong et al., 2020; Li et al., 2021). No sistema nervoso os efeitos da EA são principalmente focados na analgésica, por outro lado, no sistema imunológico estão focadas no efeito anti-inflamatório, no entanto uma interação entre os dois sistemas é fundamental para os efeitos observados (Dou et al., 2021). Dentre os mecanismos citocinas pró e anti-inflamatórias, produzidas por numerosas células que têm efeitos específicos nas interações e comunicações entre células relacionadas ao sistema imunológico, desempenham um papel integral na iniciação, perpetuação e regulação negativa da resposta imune (Zhang et al., 2023). Além de seu papel na resposta imune, as citocinas pró-inflamatórias sensibilizam os nociceptores diretamente ou por meio da estimulação da liberação de agentes que modulam a nocicepção tanto na periférica quanto centralmente (Klyne; Barbe; Hodges, 2017; Watkins; Maier, 2003). Estudos prévios mostraram uma produção significativamente aumentada de fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) em pessoas com dores agudas e crônicas (Lim et al., 2020; Teodorczyk-Injeyan; Triano; Injeyan, 2019).

Ao contrário dos bem estudados marcadores inflamatórios envolvidos na dor, o mecanismo de sinalização do sistema purinérgico por meio dos nucleosídeos e nucleotídeos são poucos compreendidos nas condições de dores crônicas (Zimmermann, 2021). A sinalização purinérgica é uma das vias de sinalização importantes para o início da acupuntura (Qiao et al., 2020). A sinalização purinérgica é uma das principais vias de modulação da dor e inflamação (Magni; Riccio; Ceruti, 2018). Essa sinalização ocorre por meio de moléculas sinalizadoras adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP),

e adenosina (ADO). Estas moléculas de sinalização usam de seus receptores da família P1 e P2 para produzir seus efeitos, e são hidrolisadas pelas ectoenzimas ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (ENTPD1/CD39), ecto-5'-nucleotidase (e5NT/CD73) e adenosina deaminase (ADA) presentes na superfície celular (Junger, 2011).

A sinalização purinérgica pode desencadear alterações tanto pró-inflamatórias, quanto anti-inflamatórias e estar envolvida na nocicepção e anti-nocicepção (Burnstock, 2016). Estudos revelam o envolvimento da sinalização purinérgica como mecanismo celular subjacente à analgesia induzida por eletroacupuntura (EA) (Burnstock, 2013; Goldman et al., 2010). No entanto, poucos estudos ou nenhum analisou os efeitos da EA em pessoas com dor lombar crônica. A dor lombar (DL) afeta pessoas de todas as idades e é a principal causa de dor, incapacidade e limitações funcionais em todo o mundo (Hoy et al., 2012, 2014). A DL pode ser classificada como específica e inespecífica, sendo a DL específica definida como casos causados por fontes teciduais estruturais identificáveis de dor ou patologia agressiva, infecciosa ou inflamatória. Em contraste, a DL inespecífica descreve a maioria dos casos, mais de 90%, em que nenhuma fonte tecidual específica de sintomas pode ser identificada e nos casos em que os sintomas são persistentes, o termo dor lombar crônica não específica (DLCNE) é frequentemente usado (Maher; Underwood; Buchbinder, 2017).

Em uma revisão recente publicada pela base de dados Cochrane foi mostrado que a AP é eficaz na diminuição da dor e na melhora da função imediatamente após sua aplicação em pessoas com DLCNE (Mu et al., 2020). Apesar de sua ampla utilização em pacientes com dores, os mecanismos biológicos de ação da EA ainda não estão bem compreendidos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da EA na atividade e expressão das ectonucleotidases e em biomarcadores inflamatórios em pacientes com DLCNE. Além disso, foi investigado se existe uma correlação entre as ectonucleotidases as citocinas após a EA.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da eletroacupuntura na atividade das ectonucleotidases e nos biomarcadores inflamatórios em pacientes com dor lombar crônica inespecífica.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Analisar a atividade enzimática das nucleotidases; Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1 (ENTPD1/CD39), Ecto 5' nucleotidase (5'-NT/CD73) e adenosina desaminase (ADA) antes e depois da EA em linfócitos.

b) Quantificar os níveis séricos de ATP extracelular antes e depois da EA;

c) Determinar os níveis séricos de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (perfil TH1 e TH2) antes e depois da EA;

d) Analisar a frequência/expressão dos linfócitos CD39+ e CD73+ totais e suas subpopulações antes e depois da EA;

g) Correlacionar a atividade das ectonucleotidases com os marcadores inflamatórios.

1.3 JUSTIFICATIVA

A DL está entre as condições de saúde com maior prevalência no mundo, sendo a principal causa de incapacidade nas pessoas, além de gerar um grande impacto na saúde pública provocando altos custos (Nascimento; Costa, 2015).

A DL é frequentemente tratada por profissionais de saúde primários com medicamentos que incluem anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), paracetamol e opioides. No entanto, as pessoas que se utilizam destes medicamentos podem estar sob maior risco de sofrer eventos adversos, dependência e até morte (Anderson; Shaheed, 2022).

A EA é um tratamento não farmacológico de baixo custo, minimamente invasivo, com poucos riscos, e apresenta um tamanho de efeito baixo a moderado na melhora da dor e inflamação em pessoas com DLC. No entanto, os mecanismos neurobiológicos de ação ainda são pouco compreendidos (Mu et al., 2020).

O sistema purinérgico é um sistema que está envolvido na regulação neuroimune da dor e da inflamação, e estudos pré clínicos mostram que a EA consegue modular o sistema de sinalização purinérgico, no entanto em seres humanos poucos estudos foram realizados para entender os mecanismos neurobiológicos de ação, principalmente em pessoas com dores musculoesqueléticas (Gong et al., 2020).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A NEUROBIOLOGIA DA DOR

A associação internacional para o estudo da dor (IASP) define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a dano tecidual real ou potencial. Além disso, define que a dor que surge de dano real ou ameaçado ao tecido não neural é devida à ativação de nociceptores (Raja et al., 2020). Estímulos nocivos podem atuar como um dispositivo de alerta provocando uma resposta protetiva para eventuais outros danos. Esta resposta é considerada adaptativa, e tende a desaparecer logo após a remoção do estímulo nociceptivo. No entanto, por outro lado, como ocorre nos casos de dores crônicas contínuas ou recorrentes, esta resposta se torna mal adaptativa, gerando fenômenos de hiperalgesia e muitas vezes alodinia (Inoue; Tsuda, 2021).

A pele, assim como outros tecidos do corpo (ossos, músculos, ligamentos, cápsulas articulares, fáscia, vísceras e vasos sanguíneos, bem como nas meninges e bainhas dos nervos periféricos) são densamente inervados por nociceptores. O tipo mais simples de receptor sensorial é chamado de terminação nervosa livre. Após a ativação, os nociceptores traduzem essas informações por meio de potenciais de ação e liberação de neurotransmissores através do corno dorsal da medula espinhal para posterior transmissão às estruturas supraespinhais e, finalmente, ao cérebro (Fenton; Shih; Zolton, 2015; Griensven, 2014).

Os nociceptores são geralmente eletricamente silenciosos e transmitem potenciais de ação tudo ou nada somente quando estimulados. Para que o estímulo seja interpretado como dor, a atividade nociceptora requer que as informações periféricas chegam aos centros superiores, o que normalmente depende da frequência dos potenciais de ação nos aferentes primários, da somação temporal dos sinais pré e pós-sinápticos e das influências centrais (Woolf; Ma, 2007).

Como parte disso, a nociceção é transmitida através das fibras nociceptivas alfa delta (Ad) mielinizadas e fibras C não-mielínicas. Outro subgrupo de fibras C, as fibras C-táteis (CT), está envolvida no processamento do toque afetivo. Essas fibras não-mielínicas e de condução lenta (0,9 metros por segundo), localizadas na pele humana, são reativas a uma pressão mecânica muito baixa de 0,3 a 2,5 newtons e são altamente sensíveis à estimulação (Djoughri; Lawson, 2004).

As fibras aferentes primárias terminam em lâminas diferentes dependendo de sua função. A lâmina I (zona marginal) contém uma alta densidade de neurônios de projeção que processam informações nociceptivas. Existem neurônios nociceptivos específicos que são excitados apenas por nociceptores e neurônios de ampla faixa dinâmica (também na lâmina V-VI) que respondem tanto a estímulos nociceptivos quanto mecanorreceptivos (Bourne; Machado; Nagel, 2014).

A lâmina II também é chamada de substância gelatinosa, são estruturas complexas chamadas glomérulos, através das quais um terminal aferente primário pode fazer contato sináptico com vários dendritos periféricos, terminais axonais e corpos celulares. A lâmina II é a principal entrada aferente de fibras C e de fibras A-delta, e pode desempenhar um papel na modulação dos neurônios de projeção espinotalâmicos e espinobulbares por meio de seus numerosos interneurônios inibitórios (Bourne; Machado; Nagel, 2014; Griensven, 2014).

Os sinais somatossensoriais são transmitidos ao longo de dois sistemas ascendentes na medula espinhal. O sistema anterolateral e o sistema anteromedial transmitem informações predominantemente sobre dor e temperatura, mas também algumas informações táteis, e são compostos por três vias: o trato espinotalâmico, o trato espinoreticular e o trato espinomesencefálico. Já o sistema coluna dorsal-lemniscal medial carrega informações sobre a sensação tátil e a propriocepção dos membros (Ballantyne; Fishman; Rathmell, 2019).

O tálamo representa o elo final na transmissão de impulsos ao córtex cerebral, processando quase todas as informações sensoriais e motoras antes

de sua transferência para o córtex cerebral. O tálamo dorsal contém a maioria das projeções corticais, enquanto o tálamo ventral se projeta diretamente para o tálamo dorsal via neurônios contendo ácido gama-aminobutírico (GABA). Após ascendem para o córtex cerebral somatosensorial (S1 e S2), córtex insular e cingular anterior. Outros neurônios projetam axônios para o hipotálamo, formação reticular, substância cinzenta periaquedutal, núcleo medial e intratálâmico, e estruturas encefálicas anteriores que são responsáveis pelas respostas neuroendócrinas e emocionais a dor (Basbaum et al., 2009).

O sistema imunológico tem um papel crítico na dor, liberando mediadores moleculares que sensibilizam os neurônios nociceptores. A lesão e a inflamação dos tecidos estão intimamente ligadas ao aumento da sensação de dor. Os terminais nervosos periféricos dos nociceptores possuem receptores e canais iônicos que detectam mediadores moleculares liberados durante a inflamação (Zouikr; Karshikoff, 2017).

Estudos mostram que os mediadores inflamatórios estão envolvidos na patogênese da dor lombar crônica, e que a dor tende a diminuir com a resolução da resposta imune tecidual, destacando a importância do sistema imunológico e inflamatório na sensibilização neuronal (Pinho-Ribeiro; Verri; Chiu, 2017).

O ATP e a ADO são neurotransmissores que participam da modulação da dor. O ATP é liberado da maioria dos tipos de células durante a deformação mecânica em resposta ao estresse de cisalhamento, estiramento ou inchaço osmótico, bem como à hipóxia e a vários agentes. Os terminais nervosos sensoriais nociceptivos na pele, articulações e músculos são ativados por ATP. Os receptores P2X formam canais que podem contribuir para correntes pós-sinápticas excitatórias em neurônios e desencadear outras funções celulares em células não neuronais. Os receptores P2Y e de ADO podem ativar sistemas de segundos mensageiros, incluindo cálcio, adenosina monofosfato cíclico (cAMP), inositol-1,4,5-trifosfato e outras moléculas de sinalização através de proteínas G acopladas para modular atividades celulares nociceptiva ou anti-nociceptiva (Burnstock, 2013; Hamilton; McMahon, 2000).

2.2 SISTEMA NEUROIMUNE E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

As células Treg CD4⁺ regulam as células imunes e não imunes nas respostas imunológicas por meio da produção de citocinas, por isso são chamadas de células T auxiliares (Th). Após a ativação, as células T se diferenciam em células efetoras T auxiliar 1 (Th1), células T auxiliar 2 (Th2), células T auxiliar 17 (Th17) que produzem citocinas e outros mediadores imunológicos (Dong, 2021). As células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ são células reguladoras importantes de quase todas as respostas imunes e medeiam funções supressoras tanto através da produção de citocinas, incluindo fator de crescimento transformador beta (TGF- β), interleucina 10 (IL-10) e interleucina (IL-2), quanto diretas pelo contatos célula-célula (Buckner, 2010; Ding; Xu; Bromberg, 2012).

As células Tregs CD4⁺ e seu desenvolvimento são criticamente dependentes da indução de Foxp3. As células imunes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tem a função de suprimir a proliferação e a liberação de citocinas pró-inflamatórias das células efetoras Th1-Th2 e/ou inibir diretamente as células apresentadoras de antígeno (Sakaguchi et al., 2006; Shevach et al., 2006).

A ativação das células Tregs CD4 é iniciada quando o receptor da célula T (TCR) reconhece um peptídeo específico apresentado nos complexos principais de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e se ligam a uma célula apresentadora de antígeno (APC) ou a um linfócito T efetor suprimindo a resposta imunológica através, principalmente, da secreção de IL-10 e TGF- β que inibem a formação de linfócitos Th1 (Setoguchi et al., 2005).

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória produzida por células imunes ativadas, e desempenha um papel fundamental no controle das respostas imunitárias. As células imunitárias, especialmente Tregs, induzem a produção de IL-10 para manter a homeostase imunitária (Mellor; Munn, 2011).

Outra citocina essencial é a IL-2 (Malek, 2003) A IL-2 é um modulador importante, sendo que as Tregs CD25 são extremamente sensíveis a esta citocina. A IL-2 é um potente modulador das respostas imunitárias e é elevada no caso de uma resposta imunitária ativa permitindo subsequentemente a restauração da homeostase imunitária mediada por Tregs após a fase efetora (Malek, 2003; Sakaguchi et al., 2006).

Quando estimuladas as células T CD4-Th1 secretam predominantemente a citocina interferon gama (IFN- γ), que ativa macrófagos, e, por consequência, estimula a produção de interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) induzindo um perfil pró-inflamatório local e sistêmico. Após isso, as células T CD4-Th2 secretam citocinas, como interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 13 (IL-13) para modular negativamente a diferenciação dos perfis Th1 e Th17. Por outro lado, as células Tregs reguladores produzem interleucina 10 (IL-10) o que induz a produção de anticorpos e apresentam perfil anti-inflamatório (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Outro aspecto importante é que as células T CD4 apresentam uma alta expressão ENTPD1/CD39 e e5NT/CD73, o que ajuda distinguir as células Treg CD4+/CD25+/Foxp3+ de outras células T. As células Tregs com CD39 e CD73 catalisam rapidamente a conversão de ATP em ADO para suprimir localmente as funções das células T efectoras (Deaglio et al., 2007; Dwyer et al., 2010).

As ectonucleotidases são enzimas designadas para hidrolisar nucleotídeos extracelulares expressas em alto nível pelas células do sistema imunológico, principalmente na superfície celular (Cekic; Linden, 2016; Zimmermann, 2021).

A ENTPD1/CD39 é uma proteína de membrana integral que fosfohidrolisa ATP e, de forma menos eficiente, ADP, de maneira dependente de Ca²⁺ e Mg²⁺, para produzir AMP. A ENTPD1/CD39 humana é composta de 510 aminoácidos com sete potenciais locais de glicosilação ligados a N, 11 resíduos Cys e duas regiões transmembrana compreendendo os segmentos terminais NH₂ e COOH, e um grande domínio hidrofóbico extracelular, que inclui cinco domínios altamente conservados, conhecidos como regiões

conservadas da apirase (ACRs), que são essenciais para a atividade catabólica da enzima (Heine et al., 2001). A expressão de CD39 é regulada por diversas citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e hipóxia (Eltzschig et al., 2009; Heine et al., 2001).

A e5NT/CD73 é uma proteína de membrana ancorada ao glicosil fosfatidilinositol (GPI) que catalisa a hidrólise do AMP extracelular em ADO. A e5NT/CD73 regula diversos processos fisiológicos que são modulados pela ADO, incluindo hipóxia, inflamação e transporte de íons epiteliais. A e5NT/CD73 é expressa em neurônios nociceptivos peptidérgicos e não peptidérgicos e em seus terminais axônicos na medula espinhal e na pele (Hunsucker; Mitchell; Spychala, 2005; Sowa; Taylor-Blake; Zylka, 2010; Zimmermann, 1992).

Foi demonstrado que as ectonucleotidases ENTPD1/CD39 e e5NT/CD73 são fundamentais na produção de ADO pelas células Treg e, portanto, são consideradas parte do seu arsenal imunossupressor (Kobie et al., 2006).

Além das ectonucleotidases, nucleosídeos e nucleotídeos medeiam uma variedade de funções biológicas, tanto em funções de sinalização de curto prazo quanto em funções de sinalização de longo prazo, como inflamação, coagulação e neurotransmissão, e são regulados pela atividade das ectonucleotidase (Burnstock, G., 2009).

O ATP presente dentro da célula é bem conhecido como uma fonte de energia universal para o funcionamento do organismo, no entanto, quando liberado no espaço extracelular, o ATP pode atuar como uma molécula sinalizadora em várias células do corpo humano. A liberação das moléculas de ATP provém principalmente de células em apoptose e necrose, lesionadas mecanicamente ou ainda pela ativação de células inflamatórias. Sob condições fisiológicas é observado que os aumentos na concentração extracelular de ATP são transitórios. No entanto, sob condições patológicas ou inflamatórias, há um aumento dos níveis extracelulares de ATP devido à sua alta liberação (Inoue, 2022).

Existe uma regulação positiva da expressão de ectonucleotidases que promove sequencialmente a hidrólise de ATP e o acúmulo de ADO (Huang et al., 2021). É observado em estudos que as ectonucleotidases ENTPD1/CD39 e e5NT/CD73 contribuem para a atividade imunossupressora da FoxP3+ Treg, promovendo a geração de ADO, que atua diretamente nas células T para modular sua ativação através de cascatas de sinalização controladas pelos receptores de adenosina A2A (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007). Além disso é visto que o ATP extracelular exerce efeitos opostos nas células T CD4+ ativadas e regulatórias através da ativação dos receptores P2X, e que a ativação dos receptores P2X7 pelo ATP inibe o potencial supressivo e a estabilidade das células T. Por outro lado, a ENTPD1/CD39 ajuda controlar esta estabilidade (Schenk et al., 2011; Trabanelli et al., 2012).

2.3 SISTEMA PURINÉRGICO E DOR

O sistema de sinalização purinérgico compreende principalmente os receptores extracelulares que são ativados por ATP, ADP ou ADO e ectoenzimas que convertem ATP em ADO por hidrólise sequencial dos grupos fosfato (Ulrich; Illes; Glaser, 2023).

A molécula de ATP tem sido considerada principalmente como fonte de energia para as células. No entanto, atualmente é atribuído ao ATP um papel muito importante como molécula sinalizadora extracelular (Burnstock, Geoffrey, 2009). O ATP ativa os receptores do tipo P2, que são divididos em receptores purinérgicos 2X (P2XRs) ionotrópicos e receptores purinérgicos 2Y (P2YRs) metabotrópicos (Burnstock, 2016). Os receptores P2X têm dois domínios transmembrana e são canais iônicos controlados por ligantes triméricos que podem se agrupar como hetero ou homoméricos; as sete subunidades clonadas são denominadas P2X (1-7) em humanos. São canais catiônicos não seletivos acionados apenas por ATP. Sua ativação causa despolarização da membrana e influxo intracelular de Ca²⁺. Por outro lado, os receptores P2Y são receptores acoplados a G de sete transmembranas, denominados P2Y (1,2,4,6,10,11-14), codificados por genes distintos e ativados pelo ATP. A

maioria dos receptores P2Y está acoplada à proteína Gq, desencadeando a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (Burnstock, 2016; Lagomarsino; Kostic; Chiu, 2021).

Já os receptores P1 são ativados pela ADO produzida pela degradação enzimática por ectonucleotidases e são compostos por quatro subtipos diferentes de receptores acoplados à proteína G de sete transmembranas, denominados receptores de adenosina A1, A2A, A2B e A3 (Sowa; Taylor-Blake; Zylka, 2010). Eles são ativados pela ADO com afinidades de ligação distintas (Ciruela, 2020). Além disso, a ectoenzima ADA é uma enzima que hidrolisa a ADO em inosina, além de inibir a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-1 (Bhagavatham et al., 2021; Martins et al., 2016).

O ATP liberado por diferentes tipos de células está envolvido no início da dor, agindo nos purinoceptores nociceptivos nas terminações nervosas sensoriais (BURNSTOCK; WOOD, 1996). Em particular, foi demonstrado que tensões mecânicas, como estiramento, cisalhamento, mudança de meio ou estresse osmótico, evocam a liberação de ATP de vários tipos de células, presumidamente como ocorre na DLCNE (Bodin; Burnstock, 2001; Burnstock; Wood, 1996; Praetorius; Leipziger, 2009).

A evidência mais forte da transmissão sináptica excitatória mediadora de ATP veio do estudo de MacDermott e colegas (1997). Eles encontraram correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSCs) em neurônios da substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinal que foram bloqueados por um antagonista do receptor P2X (Bardoni et al., 1997).

É observado que o ATP estimula as terminações nervosas sensoriais locais, combinando-se com os receptores P2X2/3, e produzindo um aumento da nocicepção (Kim; Moudgil, 2017). Além disso é observado que nos terminais periféricos dos nociceptores sensoriais primários, assim como no corno dorsal da medula espinal o ATP pode atuar na transmissão pré-sináptica e pós-sináptica provocando excitação dos receptores P2X2 e P2X3 (Burnstock, 2006). Por outro lado, estudos enfatizaram o papel da ADO na produção de

antinocicepção, atuando principalmente nos receptores de adenosina A2A (Sawynok, 2016).

Atualmente novos papéis foram propostos para o ATP na transdução de estímulos não nocivos na periferia. Foi visto que o ATP liberado pelos queratinócitos e fibroblastos pode mediar a mecanossensibilização inócua, uma característica na dor crônica através de receptores P2X4 em aferentes primários (Moehring et al., 2018).

Portanto, a sinalização purinérgica é um importante regulador da resposta imune. O ATP extracelular é geralmente um forte sinal pró-inflamatório, enquanto a ADO extracelular produzida a partir da degradação do ATP extracelular é principalmente imunossupressora e anti-inflamatória (Bono et al., 2015).

2.4 ELETROACUPUNTURA, SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

Um novo e intrigante campo de pesquisa sobre o papel do sistema de sinalização purinérgico na nocicepção foi aberto após a publicação da hipótese do Prof. Burnstock sobre o envolvimento das purinas na acupuntura (Burnstock, Geoffrey, 2009). A EA é uma terapia no qual uma corrente elétrica é aplicada através da agulha no ponto de inserção. Esta técnica é considerada uma versão modernizada da acupuntura manual (MA). Evidências mostram que a EA diminui a dor nos pacientes, no entanto pouco ainda se sabe dos mecanismos neurobiológicos de ação envolvidos na analgesia pela EA (Zhang et al., 2022).

Como mecanismo neurobiológico de ação é observado que diferentes frequências de EA têm sido associadas a diferentes mecanismos analgésicos fisiológicos, com EA de baixa frequência (de 2 Hz a 4 Hz) induzindo a liberação de encefalina e ativação dos receptores opioides (μ), e EA de alta frequência (50 Hz a 100 Hz) induzindo a liberação de dinorfina e ativação dos receptores opioides (κ) (Han, 2003). Além disso, é observado em que a EA medeia

interações entre células imunes e nociceptores por outras vias além do sistema opioide, como a via purinérgica para alcançar os efeitos anti-inflamatórios e analgésicos (Gong et al., 2020).

O sistema purinérgico desempenha diferentes papéis nos processos de dor. Estudos sobre este aspecto têm se concentrado principalmente em sinais celulares induzidos pelo nucleotídeo de purina ATP, receptores P2X3, P2X7, bem como a ADO e seus receptores (Huang et al., 2021). Várias investigações mostraram que a concentração extracelular de purinas, incluindo ATP, ADP, AMP e ADO aumenta nas proximidades de pontos de AP, possivelmente liberadas de mastócitos, queratinócitos e fibroblastos (Gong et al., 2020).

Em neurônios DRG e medula espinal o ATP quando ligado aos receptores P2X3s provoca um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , despolarização e aumento dos potenciais de ação em neurônios sensoriais quando estimulados por EA (Inoue; Tsuda, 2021).

O ATP é liberado devido tecidos danificados, deformação mecânica, hipóxia ou células inflamatórias e se liga aos receptores P2X3 nos neurônios do DRG para ativar nociceptores e transmitir sinais de dor. É observado que EA no ponto de acupuntura (ST36 e BL60) em uma dor inflamatória produzida pela injeção de Adjuvante Completo de Freund (CFA) em ratos conseguiu reduzir significativamente a expressão dos receptores P2X3 no DRG de L6, e deste modo reduziu o disparo neuronal e a dor (Bernier; Ase; Séguéla, 2018; Zhou et al., 2022).

No estudo Xiang e colaboradores (2019), em um modelo de dor inflamatória induzida por CFA em ratos, foi observado um aumento nas expressões proteicas de P2X3 no DRG após a injeção CFA e que a estimulação por EA de 100 Hz atenuou a dor induzida por CFA e reverteu a elevação de P2X3 no DRG L4-6 (Xiang et al., 2019).

Recentemente foi observado que EA promoveu um aumento da expressão de e5NT/CD73 e no conteúdo de ADO na medula espinhal. Além disso, estes aumentos foram observados e sustentados 1 h após a EA (Dai et al., 2022). É observado também que a EA, em um modelo de dor inflamatória

induzida por CFA em ratos, estimula a ativação de células T regulatórias para induzir a produção de níveis mais elevados de IL-10. O número de macrófagos e neutrófilos é reduzido, suprimindo assim a expressão de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , NLRP3 e TNF- α) e, por fim, inibindo a inflamação e a dor (Yu et al., 2023).

Em outro estudo foi demonstrado que a EA no ponto de acupuntura ST36 em ratos modula o equilíbrio de polarização de macrófagos em uma articulação inflamada, inibindo macrófagos M1 pró-inflamatórios e promovendo simultaneamente macrófagos M2 anti-inflamatórios. Isso, por sua vez, inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 e promove a expressão de fatores anti-inflamatórios e de reparo tecidual, incluindo IL-10 e TGF- β (Yang et al., 2021).

Além disso, é observado que a EA induz um aumento da expressão de IL-10 promovendo ativação de células Treg ou polarização de macrófagos do tipo M1 em direção ao tipo M2. Além disso, o aumento de macrófagos do tipo M2 também aumenta o TGF- β para atingir efeito anti-inflamatório (Yu et al., 2020).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este foi um estudo quase experimental antes e depois em pacientes com DLCNE sob parecer nº 6.413.346 e CAAE nº 70754123.0.0000.5564.

3.2 PARTICIPANTES

O cálculo do tamanho amostral foi realizado no programa G Power 8.1.1 (Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Alemanha), no qual $\alpha = 0,05$ e poder de 80%. O tamanho total da amostra obtido foi de 19 participantes. Considerando a possibilidade de perda amostral de 20%, como margem de segurança, optou-se por coletar um número total de 23 indivíduos.

Os participantes da pesquisa foram servidores públicos da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó-SC, os quais foram convidados a participar através do envio de um e-mail.

A aplicação dos critérios de exclusão e inclusão se deu através de relatos e exames físicos. Os critérios de inclusão foram relatar dor na área entre a 12ª costela e a prega glútea, podendo ser acompanhado de dor irradiada para a perna com uma intensidade da dor nas costas de pelo menos 2 em uma escala de classificação numérica de 0 a 10; ter DL por mais de 3 meses; e estar em uma faixa etária de 18 a 65 anos (Deyo et al., 2014; Kong et al., 2020).

Os principais critérios de exclusão foram obter resposta positiva no teste de elevação da perna estendida e teste de Slump, os quais apresentam uma boa acurácia diagnóstica para radiculopatia lombar (Ekedahl et al., 2018; Gonzalez et al., 2021), ausência de diagnóstico prévio autodeclarado de estenose espinhal, fratura, tumor maligno de qualquer tipo, doença

degenerativa, infecciosa ou reumática (artrite reumatoide, espondilite anquilosante e osteoartrose), ou cirurgia prévia na coluna lombar (Bodes Pardo et al., 2018; Moseley; Nicholas; Hodges, 2004).

Os participantes foram autorizados a usar analgésicos e anti-inflamatórios, desde que parassem cinco dias antes da coleta de sangue. Além disso, os voluntários foram instruídos a deixarem de consumir cafeína 12 horas antes dos testes (Jacobson et al., 2022).

Todos os voluntários foram informados sobre os procedimentos experimentais antes de darem seu consentimento por escrito, além disso foram informados de que poderiam encerrar sua participação a qualquer momento. Durante o desenvolvimento da pesquisa o material coletado ficou em posse do pesquisador responsável e no freezer -80 graus no laboratório de pesquisa nas dependências da UFFS, Campus Chapecó, o qual apenas os pesquisadores envolvidos têm acesso.

3.3 PROCEDIMENTOS

O procedimento foi realizado em uma única sessão de EA para verificar os efeitos agudos pré e 30 minutos após intervenção, realizado em uma sala adequada na UFFS, Campus Chapecó.

Na linha de base os participantes preencheram questionários sobre informações demográficas: idade, sexo, comorbidades, duração da dor, se já teve episódios de dor lombar anterior, escolaridade, se estão realizando algum tratamento, se estão utilizando algum medicamento, se praticam atividade física. Além disso, foi relatado pelos participantes o histórico de tabagismo (fumante atual/ex-fumante) e hábitos alcoólicos (frequência e quantidade consumida

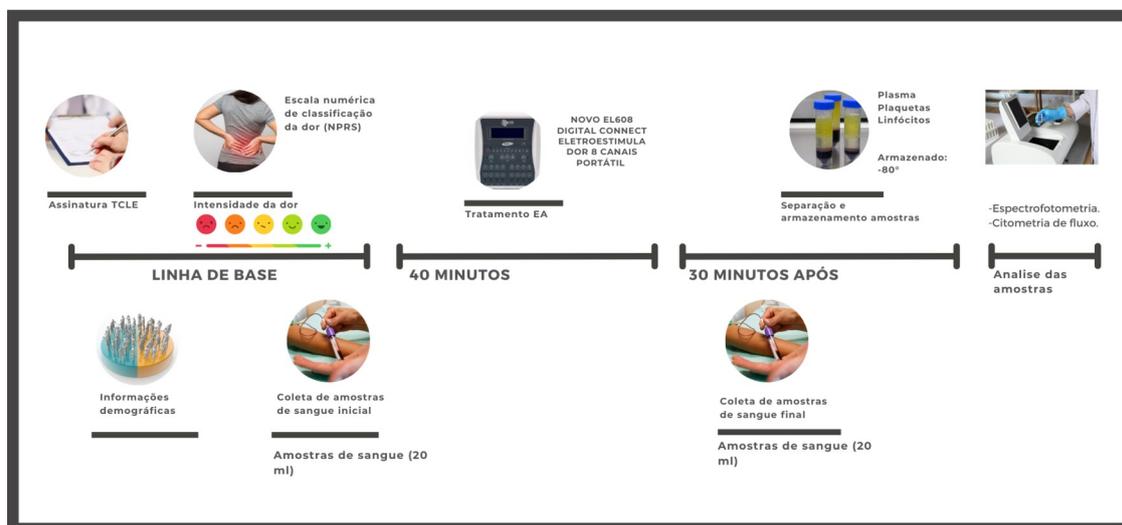
A intensidade da dor e incapacidade devido a dor foram avaliadas no início do estudo usando a escala numérica de classificação da dor (NPRS) e o Questionário de incapacidade de Roland Morris (RMDQ). A NPRS é uma escala numérica onde 0 representa nenhuma dor e 10 representando a pior dor

imaginável. A NPRS mostra ter alto coeficiente de confiabilidade interobservador ($r = 0,88$) (Childs; Piva; Fritz, 2005; Salaffi et al., 2004). A RMDQ é uma medida curta e simples com validade, confiabilidade e responsividade contrastadas. O questionário é uma escala de 24 itens, cujas pontuações variam de 0 (nenhuma deficiência) a 24 (alta deficiência). O RMDQ foi traduzido e adaptado com sucesso para aplicação em pacientes brasileiros, com confiabilidade e validade transversal satisfatória (Nusbaum et al., 2001; Roland; Morris, 1983).

O tratamento com EA foi realizado em uma única sessão de aproximadamente 45 minutos pelo pesquisador responsável J.C.E em uma sala adequada da UFFS campus Chapecó-SC. Os participantes foram posicionados confortavelmente em decúbito ventral e receberam 20 minutos de estimulação elétrica após a colocação de todas as agulhas (Kong et al., 2020) (Figura 1.)

Figura 1. Representação esquemática do protocolo de intervenção da EA.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.



Os pontos de acupuntura que foram utilizados seguiram o protocolo de Torres e colaboradores, (2023). A EA foi realizada com profundidade de agulhamento de 5 mm, com agulhas de 0,25x30m. Os parâmetros de estimulação da EA foram por meio de onda intermitente, frequência baixa de 2 Hz e largura de pulso de 10 mA. A intensidade da estimulação foi ajustada uma

vez para atingir um nível confortável durante o tratamento (Tabela 1). O equipamento de EA utilizado no estudo foi o eletroestimulador Novo EL608 Digital Connect. (Figura 2.)

Quadro 1 – Protocolo EA

Pontos	Localização
BL23 (Shenshu)	Na região lombar, 1,5 polegada lateral à linha média posterior ao nível da borda inferior do processo espinhoso da segunda região lombar vértebra (L2).
BL25 (Dachangshu)	Na região lombar, 1,5 polegada lateral à linha média posterior ao nível da borda inferior do processo espinhoso da quarta coluna lombar vértebra (L4), que está aproximadamente no mesmo nível da crista íliaca.
BL40 (Weizhong)	Na região posterior do joelho, no ponto médio da linha poplítea.
SP6 (Sanyinjiao)	Na região tibial da perna, posterior à borda medial da tíbia, 3 polegadas superior à proeminência do maléolo medial.
GB-39 (Xuan zhong)	Na face lateral do membro inferior, 3 polegadas superior à ponta do maléolo externo, na depressão da borda anterior da fíbula.

Fonte – Adaptado de (Torres *et al.*, 2023).



Figura 2. Imagem do equipamento utilizado para EA.

3.4 COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.4.1. Coleta de material biológico e protocolos experimentais

O material biológico, 20 mL de sangue total, foi coletado por punção venosa antero-cubital antes da EA e 30 minutos após a EA em tubos vacutainer com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), citrato de sódio e tubos sem anticoagulante e com gel para separação do soro, com proteção da luz. O procedimento de coleta foi realizado na UFFS, Campus Chapecó, por um profissional capacitado na área, garantindo a privacidade e sigilo dos indivíduos.

Todo o procedimento de coleta das amostras biológicas, manipulação e descartes de resíduos infectantes foram executados em consonância com as normas de biossegurança, sequencialmente as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com blocos de gelo reciclável e encaminhadas ao laboratório de Bioquímica e Genética da UFFS para processamento das mesmas.

3.4.2. Protocolo de separação de soro e plasma

O tubo contendo gel separador foi centrifugado em centrífuga modelo Sigma 3-16L a uma rotação de 3.500 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação o soro obtido foi separado em três frascos e depositado em eppendorf e armazenado em ultrafreezer Indrel à -80°C.

A partir de um dos tubos com EDTA realizou-se a centrifugação da amostra a uma rotação de 3.500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante contendo o plasma foi depositado em eppendorf e armazenado em ultrafreezer à -80°C.

3.4.3. Protocolo de separação dos linfócitos

Para separação da camada de linfócitos utilizou-se a metodologia de Böyum (1968). Em tubo Falcon contendo 4 mL de sangue total com EDTA adicionou-se 4 mL de solução fisiológica 0,9% (salina), fechou-se o tubo e homogeneizou-se levemente. Após foi realizada a centrifugação dos tubos para separação do material em 3500 rpm por 10 minutos. Com auxílio de uma pipeta foi coletado o Buffy Coat (células da linhagem branca que ficaram dispostas entre a camada de eritrócitos e o plasma) e colocado em um tubo Falcon. No mesmo tubo, foi acrescentado solução e homogeneizado. Em outro tubo Falcon foi colocado 3 ml de Lymphoprep – Ficoll Hypaque e posteriormente adicionou-se levemente o sangue diluído com a salina até atingir a proporção de 1:2, ou seja, 3 ml de Ficoll para 6 ml da amostra diluída, centrifugado a 1800 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação formou-se um gradiente, com uma camada formada por células mononucleares (CMN), semelhante a uma nuvem, entre as camadas Ficoll e Plasma. Essa nuvem foi retirada, depositada em outro tubo falcon, acrescentou-se 10 ml de salina, homogeneizado e centrifugado por mais 5 minutos a 1800 rpm. Após esta etapa foi descartado o sobrenadante por inversão e linfócitos se formaram como uma camada de pellet no fundo do tubo. Acrescentou-se mais 5ml de salina, homogeneizou-se até dissolver o agregado e foi centrifugado a 1800 rpm por 5 min. Nesta etapa foi descartado novamente o sobrenadante por inversão do tubo, adicionado 5 ml de salina, centrifugado a 1800 rpm por 5 min. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante novamente e realizado uma leve homogeneização do concentrado no fundo do tubo. No final foi coletado 30 µl do produto e depositado no Eppendorf identificado como “Linfócitos PCR” e acrescentado 100µl de RNAlater. Com o restante da amostra do fundo do tubo foi realizado uma nova diluição com 300µl de salina e depositado 150µl da diluição em cada um dos eppendorfs identificados como “Linfócitos PUR” e armazenou-se nas condições acima descritas (Böyum, 1968).

3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Para dosagem de proteínas foi utilizado o método de Bradford em comassie (BRADFORD, 1976). Inicialmente foi preparado o reagente azul de comassie, filtrado e armazenado em frasco âmbar. Em seguida foi determinado o Fator de correção, utilizando uma curva de albumina bovina como padrão. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 595 nanômetros (nm), no equipamento Varioskan (ThermoScientific®). As proteínas foram ajustadas nas faixas de 0,1– 0,2 mg/ml para amostras de linfócitos, utilizando solução salina quando necessário (Bradford, 1976).

3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.6.1. Determinação da atividade da E-NTPDase1 (CD39)

A atividade da E-NTPDase foi determinada conforme descrito por Leal e colaboradores, 2005. O meio de reação continha 0,5mmol/L de CaCl_2 , 120mmol/L de NaCl, 5mmol/L de KCl, 6mmol/L de glicose e 50mmol/L de tampão Tris-HCl em pH 8,0, com volume final de 160 μl . U, total de 20 μl das células mononucleares intactas suspensas em solução salina foi adicionado ao meio reacional (0,1 a 0,2 mg/mL de proteína) e pré-incubados por 10min a 37°C e após a primeira incubação, 20 μl de ATP ou ADP foi adicionado. Após realizou-se nova incubação por 70 minutos a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de substrato (ATP ou ADP) na concentração final de 2,0mmol/L interrompida com 150 μl de ácido tricloroacético (TCA) a 15%. Após utilizou-se 20 μL do produto final e 200 μL do reagente colorimétrico verde malaquita para analisar o fosfato inorgânico (Pi). Os controles foram realizados adicionando a preparação enzimática após a adição de TCA para corrigir a hidrólise não enzimática de nucleotídeos. Todas as amostras foram processadas em triplicata e a atividade específica é relatada como nmol Pi liberado/min/mg de proteína. Para realizar a análise, utilizou-se a técnica de absorbância realizada

no leitor de microplacas Luminoskan Microplate Luminometer 392 (ThermoScientific®) com leitura em 630nm.

3.6.2. Determinação da atividade da Ecto-5'-nucleotidase (CD73)

A atividade da e5NT/CD73 foi determinada de acordo com Pilla e colaboradores (1996), modificado por Lunkes e colaboradores (2003). O meio reacional continha 10 mmol/L de MgCl, 120 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de KCl, 6 mmol/L de glicose e 50 mmol/L de tampão Tris-HCl em pH 8,0, com volume final de 160 μ l. Um total de 20 μ l das células mononucleares intactas suspensas em solução salina foram adicionados ao meio reacional (0,1 a 0,2 mg/mL de proteína) e pré-incubados por 10 minutos a 37 °C, e após a primeira incubação, foi adicionado 20 μ l de AMP e realizou-se nova incubação de 70 minutos a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de substrato (AMP) na concentração final de 2,0 mmol/L e interrompida com 150 μ l de TCA 15%. Após, utilizou-se 20 μ l do produto final e adicionou-se 200 μ l do reagente colorimétrico (verde de malaquita) para analisar o fosfato inorgânico (Pi) liberado. Os controles foram realizados adicionando a preparação enzimática após a adição de TCA para corrigir a hidrólise não enzimática de nucleotídeos. Todas as amostras foram processadas em triplicata e a atividade específica é relatada como nmol Pi liberado/min/mg de proteína. Todas as amostras foram processadas em triplicata e a atividade específica é relatada como nmol Pi liberado/min/mg de proteína. Para realizar a análise, utilizou-se a técnica de absorbância realizada no leitor de microplacas Luminoskan Microplate Luminometer 392 (ThermoScientific®) com leitura em 630nm.

3.6.3. Atividade ADA

A atividade da enzima ADA foi determinada de acordo com Giusti e Galanti (1984). O processo é dividido em fase I (reação enzimática), fase II (reação colorida) e fase III (dosagem da atividade). Na fase I foi adicionado 30 μ l de amostra e em seguida foi aplicada a solução de ADO. No branco da

amostra foi adicionado tampão fosfato. As reações foram incubadas à 37 °C por 60 minutos. Na fase II, foram adicionados fenol/nitroprussiato e hipoclorito às amostras, no branco da amostra foi adicionado ADO e incubado à 37 °C por 30 minutos. Por fim, na fase III foi realizada a leitura das absorbâncias a 620 nm. Uma curva padrão foi preparada com (NH₄)₂SO₄. Para realizar a análise, utilizou-se a técnica de absorbância realizada no leitor de microplacas Luminoskan Microplate Luminometer 392 (ThermoScientific®) com leitura em 630nm.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE ATP

As análises de quantificação de ATP extracelular foram realizadas com o kit ATP Determination (Invitrogen ®) seguindo as instruções do fabricante. O material biológico utilizado foi o soro. O ensaio é baseado na exigência absoluta da luciferase para ATP na produção de luz (emissão máxima 560 nm em pH 7,8). A análise de luminescência foi realizada utilizando um leitor de microplacas Varioskan (ThermoScientific ®). Os resultados foram expressos em nanomolar (nM).

3.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

Para determinação dos parâmetros inflamatórios, os níveis de INF- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 foram analisados em amostras de plasma utilizando o kit comercial CBA (Cytometric Brad Array) Kit II, para citocinas humanas de perfil Th1/Th2 da BD Biosciences™ (San Diego, CA, EUA – Catálogo: 551809). O procedimento experimental consiste na preparação de um mix de citocinas utilizando seis populações de beads com distintas intensidades de fluorescência, seguido da adição da amostra e da conjugação com anticorpo de captura específico, após período de incubação, as amostras foram capturadas em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus (San Diego, CA, EUA). Os resultados obtidos foram analisados pelo CBA Analysis Software (BD

Biosciences™) pelo cálculo da equação da reta utilizando os valores obtidos na curva padrão.

3.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO ENZIMÁTICA DE ENTPD1/CD39 e e5NT/CD73 POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliação da expressão das ectonucleotidases ENTPD1/CD39 e e5NT/CD73 foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-humanos conjugados com os fluoróforos CD39-PE (Clone TU66, catálogo 555465, BD Bioscience) e CD73-FITC (Clone AD2, catálogo 561254, BD Bioscience). A técnica de marcação utilizou 100 µL de células mononucleares do sangue periférico/linfócitos extraídos conforme técnica descrita acima e 5-20 µL de anticorpo conforme protocolo padronizado pelo fabricante, as amostras foram incubadas por 30 minutos e posteriormente lavadas com solução salina para realização da leitura. Após a marcação, as células foram capturadas (10.000 eventos) usando citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus (San Diego, CA, EUA). Os dados foram obtidos pela leitura dos eventos avaliando os parâmetros de tamanho da célula (FSC, do inglês *Forward Scatter*), granulosidade (SSC, do inglês *Side Scatter*) e intensidade de fluorescência no respectivo canal de leitura, e posteriormente comparados com um controle não marcado. Ao final, os resultados foram expressos em percentual de células marcadas em relação ao controle e analisados estatisticamente para obtenção da expressão das ectonucleotidases.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

As características dos participantes foram analisadas por meio de estatística descritiva. As variáveis qualitativas foram avaliadas por frequência (n inteiros e porcentagem, e as variáveis quantitativas por média ± desvio padrão média e SD. Para análise dos dados do sistema purinérgico e perfil inflamatório os outliers foram removidos previamente com o método de Grubbs. Após foi realizado uma análise de normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Kolmogorov-Smirnov . Em seguida, a comparação

dos valores agudos pré e pós a EA foi realizada através do teste t pareado de Student caso os dados apresentem uma distribuição normal, ou por meio do teste de Wilcoxon caso os dados não apresentassem uma distribuição normal. As análises foram feitas através do software GraphPad Prism, versão 8.01, San Diego, CA, EUA. A análise de correlação foi realizada por meio do coeficiente de correlação de Pearson. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No estudo participaram 23 indivíduos, com a maioria 14 (60,87%) sendo mulheres. A média de idade das participantes foi de $46,65 \pm 12,31$ anos. A média de duração dos sintomas foi de $21,00 \pm 13,30$ semanas. Em relação ao nível de dor dos participantes, estes apresentaram uma dor média de $3,87 \pm 1,01$ com base na NPRS. Destes 9 (39,13%) participantes descreveram a dor como dor leve, 12 (52,17%) dor moderada e 2 (8,70%) dor intensa. O nível de incapacidade medido pelo RMDQ foi de $9,609 \pm 3,299$. Sete participantes (30,43%), faziam o uso de medicamentos e 13 (56,52%) já realizaram algum tipo de tratamento não-farmacológico para tratar a dor (Tabela 2).

Tabela 2. Características basais dos indivíduos.

Variáveis	
N°	23
Mulheres	14 (60,87%)
Homens	11 (47,83%)
Idade (anos)	$46,65 \pm 12,31$
Duração da dor (semanas)	$21,00 \pm 13,30$
N° de comorbidades [n(%)]:	
0	16 (70%)
1	7 (30%)

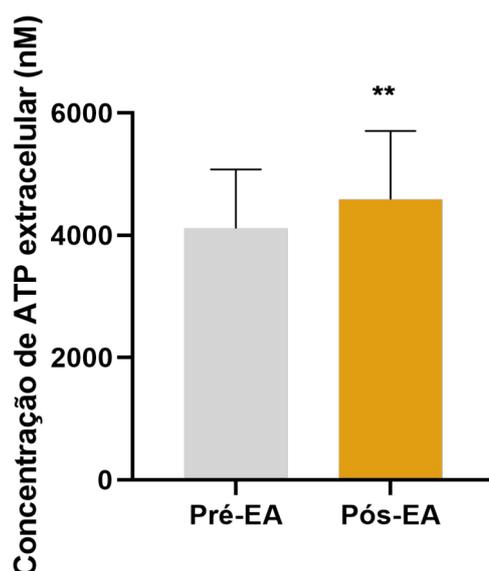
Realizando algum tratamento para dor [n(%)]:	
Sim	13 (56,52%)
Não	10 (43,48%)
Medicamento para dor [n(%)]:	
Sim (Quais?)	7 (30,43%)
Anti-inflamatório:	2 (28,77%)
Analgésicos:	5 (71,43%)
Não	16 (69,57%)
Prática de atividade /exercício físico regular [n(%)]:	
Sim	16 (69,57%)
Não	7 (30,43%)
Fumante [n(%)]:	
Sim	0 (0%)
Não	23 (100%)
Uso de álcool [n(%)]:	
Sim	0 (0%)
Não	23 (100%)
Escala numérica de classificação da dor (NPRS) (cm)	3,87 ± 1,01
Escala descritiva verbal da dor [n(%)]:	
Sem dor	0
Dor leve	9 (39,13%)
Dor moderada	12 (52,17%)
Dor intensa	2 (8,70)
Dor insuportável	0
Nível de incapacidade dos participantes (RMDQ)	9,609 ± 3,299

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão.

4.2 PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICO

A Figura 3 apresenta níveis extracelulares de ATP quantificados por bioluminescência no microambiente extracelular no soro pré-EA e pós-EA. Foi observado uma diferença significativa na quantidade de ATP extracelular, sendo que os valores encontrados foram de 4110 ± 966 nM pré-EA e 4589 ± 1121 nM pós-EA, com valor de $p < 0,0036$. $N = 23$.

Figura 3 - Quantificação de ATP extracelular

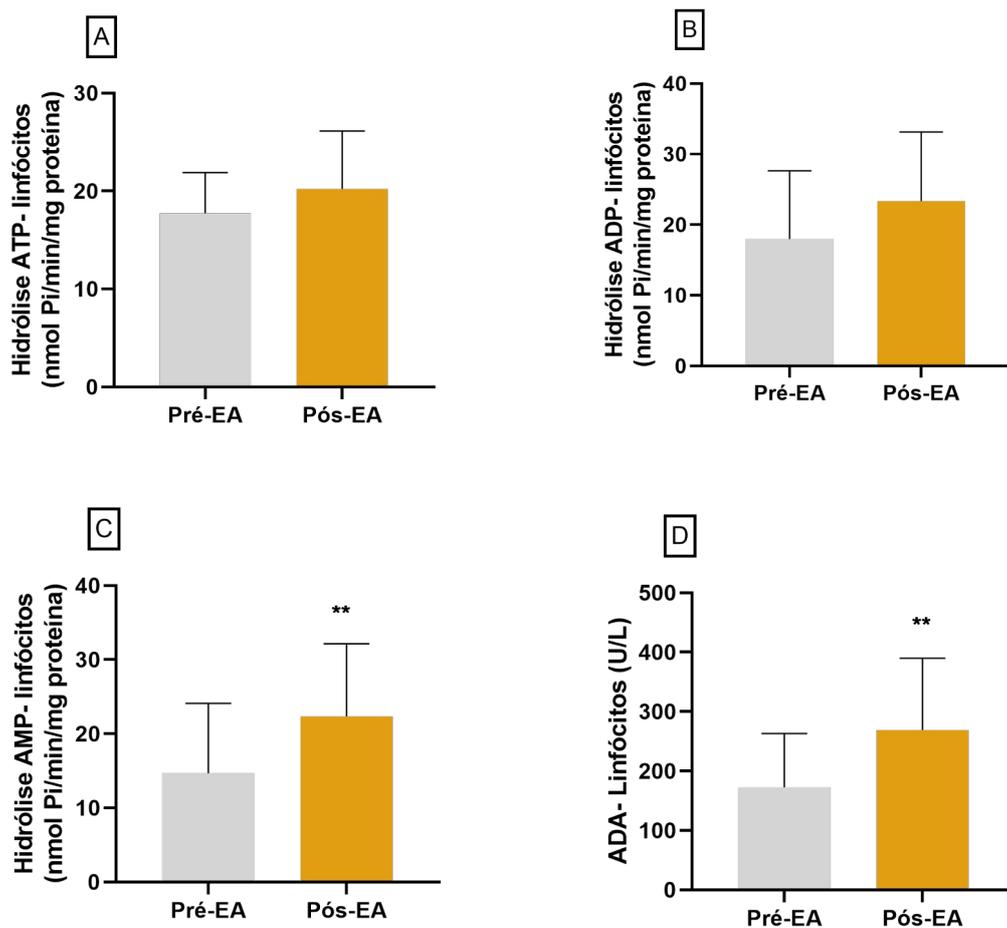


Nota: Níveis extracelulares de ATP pré-EA e pós-EA em indivíduos com DLCNE. Os dados foram expressos em nanomolar (nM) de ATP no soro. Análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. Eixo X= concentração de ATP pré e pós EA.

Os níveis de hidrólise de ATP, ADP, AMP e da ADA em linfócitos sanguíneo de indivíduos com DLCNE no pré-EA e pós-EA são mostrados na Figura 4a, b, c e d, respectivamente. Como resultado foi observado um aumento na hidrólise de AMP e da ADA pós-EA quando comparado com pré-

EA, com os seguintes valores: hidrólise de AMP pré-EA $14,69 \pm 9,43$ nmol Pi/min/mg, e pós-EA $22,35 \pm 9,80$ nmol Pi/min/mg, valor de $p = 0,0019$, $n=21$; e na atividade da ADA pré-EA $172,8 \pm 90,38$ U/L, pós-EA $268,9 \pm 120,7$ U/L, valor de $p = 0,0021$, $n=23$.

Figura 4 - Atividade das ectoenzimas purinérgicas E-NTPDase (CD39), ecto-5'-nucleotidase (CD73) e ADA em amostras de linfócitos em pessoas com DLCNE pré-EA e pós-EA

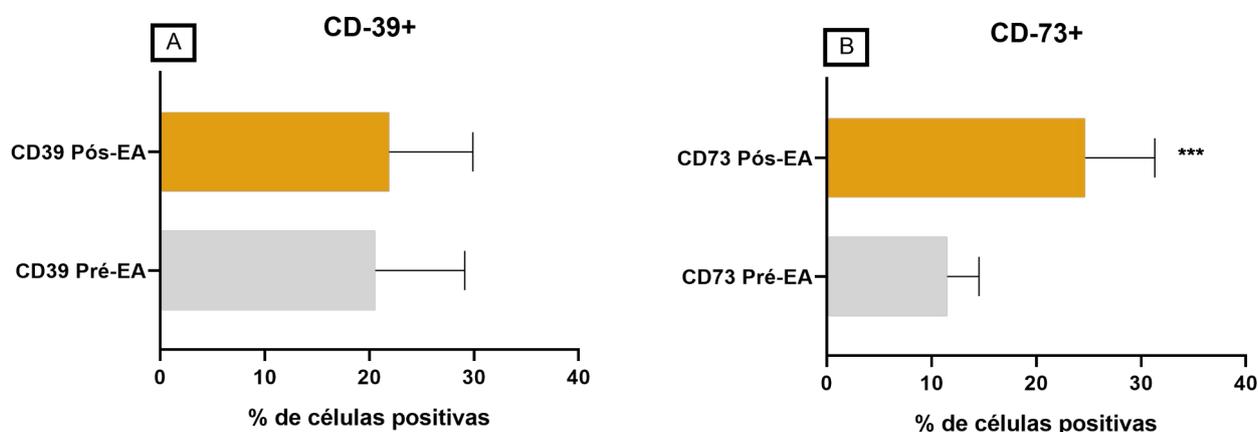


Nota: Hidrólise de ATP, ADP, AMP ADO em linfócitos em pessoas com DLCNE antes e após EA. A atividade de CD39 foi medida pela hidrólise de ATP/ADP para AMP. A atividade de CD73 foi medida pela hidrólise de AMP para ADO, enquanto a conversão de ADO à inosina foi medida pela ADA. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Análise estatística: teste t de Student pareado* ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

Não houve diferenças significativas para as outras variáveis analisadas, sendo que os valores encontrados foram: hidrólise de ATP pré-EA ($17,74 \pm 4,148$ nmol Pi/min/mg) e pós-EA ($20,22 \pm 5,921$ nmol Pi/min/mg). Valor de $p = 0,0525$, $n=23$. Hidrólise de ADP pré-EA ($17,98 \pm 9,675$ nmol Pi/min/mg) e pós-EA ($23,34 \pm 9,80$ nmol Pi/min/mg), valor de $p=0,0912$, $n=20$. Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão.

A figura 5 mostra a proporção média da expressão de ENTPD1/CD39 e e5NT/CD73 em linfócitos pré e pós EA. Não foi observado mudanças significativas na expressão de ENTPD1/CD39, sendo que os valores observados foram $20,56 \pm 8,556$ pré-EA e $21,90 \pm 8,006$ pós-EA, com um valor de $p < 0,6567$. $N=23$. Por outro lado, foi observado um aumento de células que expressam e5NT/CD73 de $11,49 \pm 3,05$ % pré-EA para $24,69 \pm 6,63$ pós-EA, com um valor $p < 0,0007$. $N=23$.

Figura 5 - Porcentagem de células que expressam ENTPD1/CD39 e e5NT/CD73 em amostras de linfócitos em pessoas com DLCNE pré-EA e pós-EA.

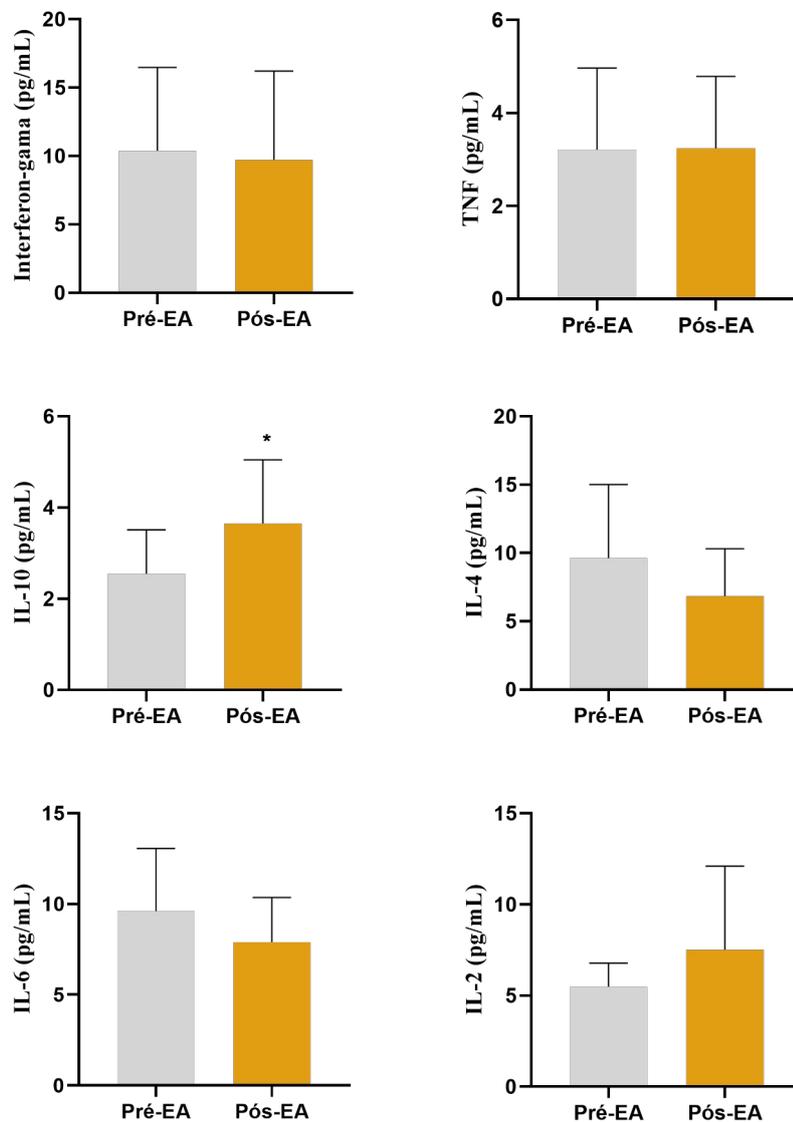


Nota: A figura mostra a porcentagem de células que expressam A. ENTPD1/CD9 e B. e5NT/CD73. Os dados são expressos em % de células positivas. Análise estatística: teste t de Student pareado. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$); significa estatisticamente significativa.

4.3 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

A Figura 6 apresenta a análise das interleucinas inflamatórias no plasma de pessoas com DLCNE pré e pós EA. Foi observado um aumento significativo de IL-10 pós-EA em pessoas com DLCNE, sendo que os valores observados foram: Nível de IL-10 no plasma pré-EA de $2,549 \pm 0,9661$ pg/mL, comparado com pós-EA de $3,653 \pm 1,396$ pg/mL, valor de $p < 0,0128$, $N=17$. Não foram observadas diferenças significativas nos valores pré-EA e pós-EA para as outras interleucinas avaliadas, sendo que os valores observados foram: Nível de IFN- γ no plasma pré-EA de $10,38 \pm 6,102$ pg/mL, comparado com pós-EA de $9,715 \pm 6,497$ pg/mL, valor de $p = 0,7587$, $N=23$. Nível de TNF- α no plasma pré-EA de $3,206 \pm 1,763$ pg/mL, comparado com pós-EA de $3,242 \pm 1,544$ pg/mL, valor de $p=0,8935$, $N=17$. Nível de IL-6 no plasma pré-EA de $9,595 \pm 3,457$ pg/mL, comparado com pós-EA de $7,899 \pm 2,451$ pg/mL, valor de $p = 0,0820$, $N= 21$. Nível de IL-4 no plasma pré-EA de $9,626 \pm 5,376$ pg/mL, comparado com pós-EA de $6,840 \pm 3,468$ pg/mL, valor de $p = 0,0932$, $N=18$. Nível de IL-2 no plasma pré-EA de $5,482 \pm 1,297$ pg/mL, comparado com pós-EA de $7,518 \pm 4,593$ pg/mL, valor de $p = 0,3917$, $N=16$.

Figura 6 - Análise das interleucinas no plasma em pessoas com DLCNE pré-EA e pós-EA



Legenda. Análise das interleucinas no plasma em pessoas com DLCNE pré-EL e pós-EA. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Teste t de Student pareado, *p < 0,05.

4.4 CORRELAÇÕES

5.4.1 Correlação entre ectonucleotidases e citocinas.

Neste estudo também foram realizadas correlações entre as hidrólises dos nucleotídeos do sistema purinérgico e as citocinas pós-EA (Tabela 3).

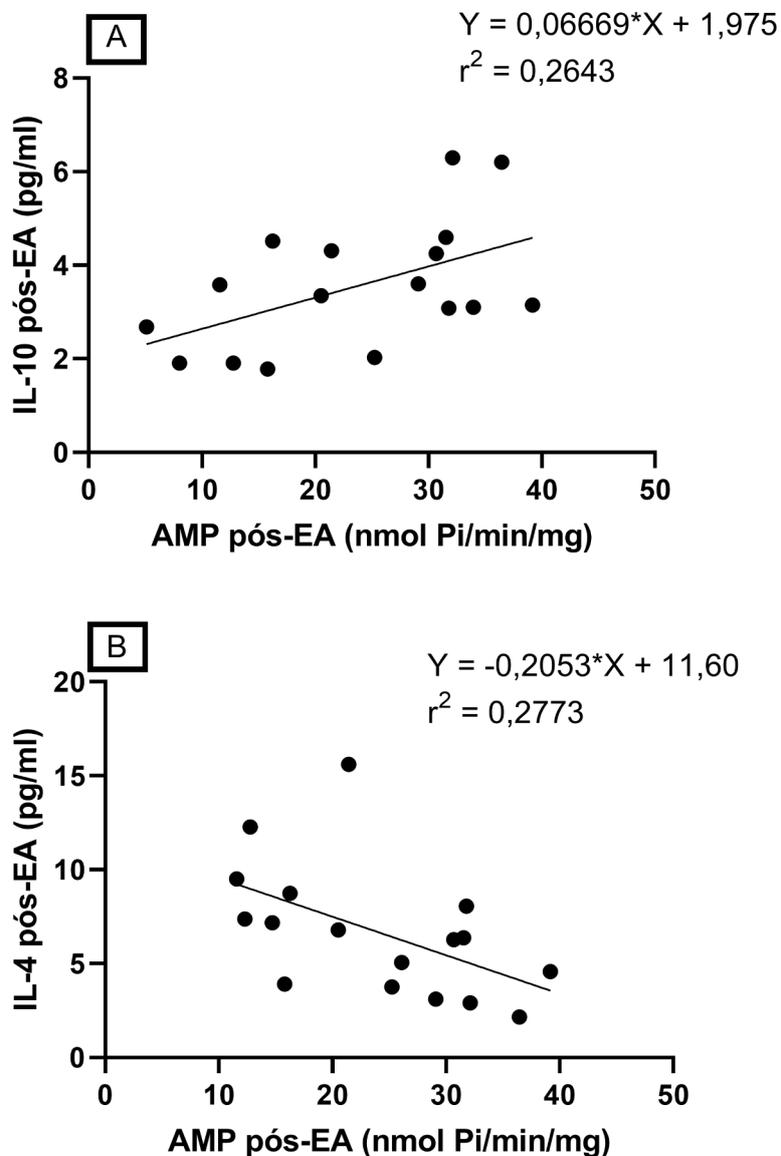
Citocinas	ATP	ADP	AMP	ADA
INF-γ	r = -0,3712 p = 0,089	r = -0,3810 p = 0,0974	r = -0,3007 p = 0,174	r = 0,06595 p = 0,771
TNF	r = -0,3995 p = 0,125	r = -0,1275 p = 0,6639	r = -0,0874 p = 0,747	r = 0,1422 p = 0,599
IL-10	r = 0,0253 p = 0,923	r = 0,02261 p = 0,9362	r = 0,5141* p = 0,035	r = 0,1389 p = 0,595
IL-6	r = -0,116 p = 0,625	r = -0,0143 p = 0,9549	r = -0,2447 p = 0,298	r = 0,1649 p = 0,487
IL-4	r = -0,3584 p = 0,121	r = -0,2397 p = 0,3896	r = -0,5266 p = 0,030♦	r = 0,2966 p = 0,204
IL-2	r = 0,4205 p = 0,406	r = 0,5120 p = 0,2991	r = 0,4549 p = 0,365	r = 0,02701 p = 0,959

Nota: Análise de correlação de Pearson. *Correlação positiva ($p < 0,05$); ♦ Correlação inversa ($p < 0,05$).

Foi observado uma correlação de pearson moderada e positiva entre e5NT/CD73 e IL-10 ($r = 0,5141$), ou seja, enquanto a concentração de e5NT/CD73 aumentou, a concentração de IL-10 também aumentou (Figura 7A). Além disso, uma correlação moderada e negativa foi observada entre e5NT/CD73 e IL-4 ($r = -0,5266$), ou seja, enquanto a concentração de e5NT/CD73 aumentou, a concentração de IL-4 diminuiu (Figura 7B). No entanto, na análise feita pré-EA não foi observado correlação entre as hidrólises dos nucleotídeos do sistema purinérgico e as citocinas.

Na análise de regressão linear simples foi observado uma correlação fraca entre IL-10 e e5NT/CD73 ($r^2 = 0,2643$), ou seja, 26% da variação da IL-10 é explicada pela variação da e5NT/CD73. Além disso, uma correlação também fraca foi observado entre IL-4 e e5NT/CD73 ($r^2 = 0,2773$), ou seja, ou seja, 27% da variação da IL-4 é explicada pela variação da e5NT/CD73.

Figura 7 – Correlação entre e5NT/CD73 e IL-10 pós-EA e entre e5NT/CD73 e IL-4 pós-EA em pessoas com DLCNE



Legenda: Correlação positiva entre AMP e IL-10 pós-EA em pessoas com DLCNE (A). Correlação negativa entre AMP e IL-4 pós-EA em pessoas com DLCNE (B). As análises de correlação foram realizadas usando o coeficiente de correlação de Pearson, * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A DLC é considerada a causa número um de incapacidade no mundo, e a carga da DLC está aumentando, particularmente em países de baixa e média renda, o que está sobrecarregando os sistemas sociais e de saúde. O tratamento da dor lombar varia de pessoa para pessoa, pois nem todos os pacientes respondem à mesma abordagem de tratamento e nenhuma intervenção é completamente eficaz para todos os pacientes, sendo assim é sugerido que uma abordagem multidimensional deve ser ofertada. Nesses pacientes, o manejo visa reduzir os sintomas e a incapacidade, permitindo o retorno às atividades de vida diária (Urits et al., 2019).

À medida que aumenta o número de pacientes com DLCNE, aumenta também a demanda por terapias seguras e eficazes. A EA tem sido recomendada em diversas diretrizes para o tratamento da DL aguda e crônica. Apesar dos estudos mostrarem efeitos positivos da EA no tratamento da DL, os ensaios clínicos são de baixa qualidade, e não há evidências suficientes para tirar conclusões definitivas sobre a eficácia da EA. No entanto, a EA é uma opção de tratamento segura, de baixo custo, minimamente invasiva e com poucos efeitos adversos para DLCNE (Urits et al., 2021; Yan et al., 2023).

Os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios da EA na dor crônica são processos complexos que envolvem múltiplos níveis, multicanais e múltiplos alvos. Eles envolvem os níveis periférico e centrais, o sistema peptídico opioide, o sistema canabinóide, o sistema de sinalização purinérgico, o sistema monócito-macrófago e células gliais nele distribuídas (Zhang et al., 2023). Todas estas respostas globais são coordenadas por sistemas de sinalização celular; entretanto, a participação da sinalização purinérgica nos efeitos da EA ainda permanece obscura apesar dos avanços consideráveis nos últimos anos.

Este é o primeiro estudo a investigar e comparar as respostas agudas das ectonucleotidases em linfócitos do sangue humano e suas relações com

biomarcadores inflamatórios no plasma em pessoas com DLCNE antes e após um protocolo de 20 minutos de EA.

Primeiramente, os resultados indicam um aumento significativo nas concentrações de ATP extracelular no soro pós-EA em pessoas com DLCNE (Fig. 3). O ATP extracelular, e seus produtos hidrolisados desempenham papéis importantes na transmissão da dor (Tam; Salter, 2021). O ATP é liberado dos neurônios somatossensoriais, gânglio da raiz dorsal (DRG) e terminações nervosas livres, sendo região que apresentam uma alta expressão de purinoceptores e de nucleotidasas (Cook et al., 1997; Lewis et al., 1995).

Sob condições fisiológicas normais, as concentrações de ATP extracelular são insignificantes no tecido, no entanto, o ATP quando liberado para o espaço extracelular a partir de células danificadas ou como consequência de tensão de cisalhamento, estiramento, inchaço osmótico ou limitação metabólica, é uma molécula sinalizadora importante na sensação de estímulos nocivos na periferia e na transmissão/modulação de tais impulsos por vias neuronais no SNC (Inoue, 2022).

Após liberação no ambiente extracelular o ATP atua em seus receptores ou é degradado pelas famílias de nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase1–8) que hidrolisa nucleotídeos tri e difosfato em nucleotídeos monofosfatos. A família de nucleotídeos pirofosfatases/fosfodiesterases (NPP) tem sete membros (NPP1–7), mas apenas NPP1, 3, 4 e 5 hidrolisam nucleotídeos e/ou dinucleotídeos. Finalmente, o papel principal da e5NT/CD73 é a formação de ADO, que pode se ligar aos receptores de ADO, sofrer desaminação via ADA ou ser transportado para dentro da célula por transportadores de nucleosídeos (Lopez et al., 2020; Yegutkin, 2014; Zimmermann, 2021).

Atualmente novos papéis foram propostos para o ATP na transdução de estímulos não nocivos na periferia. Foi visto que o ATP liberado pelos queratinócitos e fibroblastos pode mediar a mecanossensibilização inócua, uma característica na dor crônica através de receptores P2X4 em aferentes primários (Moehring et al., 2018). Já é observado em estudos que o ATP é liberado em resposta à estimulação mecânica através da EA, e uma vez

liberado atua como um transmissor que se liga aos receptores purinérgicos, incluindo os receptores P2X e P2Y (Burnstock, 2016). No meio extracelular o ATP pode ser rapidamente degradado em ADO pelas ectonucleotidases extracelulares para exercer seus efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em pessoas com dores crônicas (Wang et al., 2022; Zuo et al., 2023).

Poucos estudos avaliaram a atividade do ATP extracelular e das nucleotidases em sujeitos humanos com a aplicação da EA, sendo a maior parte dos estudos realizado em animais. O resultado do presente estudo vai ao encontro do estudo de Wei-Min e colaboradores, (2022), no qual buscaram analisar em tempo real e capturar sinais rápidos do ATP extracelular in vivo durante e após a EA. O experimento durou 20 minutos e foi observado que a EA gerou um acúmulo de ATP extracelular que alcançou um platô e retornou rapidamente aos níveis basais após a estimulação. No estudo também se observou um acúmulo de ATP extracelular após a EA, no entanto estes valores ainda permaneceram aumentados após 30 minutos.

Os resultados mostraram um aumento significativo nas atividades das enzimas e5NT/CD73 e ADA como demonstrado pela avaliação da hidrólise de AMP em ADO, e ADO em INO imediatamente após a EA em linfócitos (fig. 4). A ADO é um nucleosídeo de purina e um neuromodulador, e regula múltiplas funções fisiológicas e patofisiológicas por meio da ativação de quatro receptores acoplados à proteína G, que são classificados como receptores de adenosina A1, A2A, A2B e A3. A ADO e seus receptores são disseminados no sistema nervoso central e periférico, e desempenham um papel importante no processamento de sinais sensoriais nociceptivos em diferentes modelos de dor (Zhou et al., 2023). Os níveis de ADO são fortemente regulados por múltiplos fatores, incluindo ectonucleotidases ENTPD1/CD39, e5NT/CD73, ADA e transportadores de nucleosídeos de equilíbrio (ENTs) (Liu; Xia, 2015).

Os receptores de ADO são altamente expressos em células B e T e, em particular, em células T CD4 + que expressam FOXP3, o regulador mestre do desenvolvimento e função de células T reguladoras (Di Virgilio; Vuerich, 2015). Estudos têm mostrado que a EA tem efeitos antinociceptivos mediados pelos receptores de adenosina A1, desencadeando a liberação de mais ADO tempo

dependente em amostras de microdiálise coletadas do fluido intersticial de seres humanos (Goldman et al., 2010; Takano et al., 2012). Além disso, foi visto recentemente que a estimulação por meio da EA regulou positivamente a expressão dos receptores de adenosina A3, ativando a via de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que por sua vez, regular positivamente a expressão de ADO e fatores relacionados ao sistema imunológico, promovendo a proliferação celular de fibroblastos e efeitos anti-inflamatórios (Qu et al., 2020).

Recentemente uma estreita relação entre os mastócitos na analgesia por EA foi elucidada. Os pontos de AP são enriquecidos em mastócitos e a EA pode causar deformação das fibras de colágeno e provocar um grande influxo de cálcio e a liberação mediadores intracelulares como ATP e ADO para gerar efeitos analgésico (Lin et al., 2020; Yen et al., 2019). Estudos mostram que a EA induziu com sucesso a remodelação do citoesqueleto de fibroblastos no tecido subcutâneo e que a remodelação do citoesqueleto dos fibroblastos induzida pelo estiramento do tecido envolve a sinalização purinérgica por meio do ATP (Langevin et al., 2006, 2013).

Outro aspecto importante de neste estudo foi um aumento na expressão da e5NT/CD73 em linfócitos pós-EA (fig. 5). A e5NT/CD73 é uma proteína ancorada na membrana que hidrolisa a adenosina 5'-monofosfato (AMP) extracelular em ADO. A e5NT/CD73 desempenha um papel importante na homeostase dos tecidos e na patologia em muitos sistemas orgânicos e na inflamação aguda e crônica, além disso é mostrado que a e5NT/CD73 ajuda a regular a nocicepção em circuitos nociceptivos e representa um novo alvo molecular para o tratamento da dor crônica (Sowa; Taylor-Blake; Zylka, 2010; Zimmermann, 1992).

A e5NT/CD73 é altamente expressa nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e nos terminais dos axônios da lâmina II da medula espinhal (Sowa; Taylor-Blake; Zylka, 2010; Sowa; Voss; Zylka, 2010). O AMP e a ADO no DRG e na medula espinhal têm efeitos antinociceptivos, conforme demonstrado em modelos de dor inflamatória e neuropática (Adebiyi et al., 2019; Yegutkin, 2014).

Estudos anteriores em animais vão ao encontro de nosso estudo. No estudo de Shen e colaboradores, (2021), a EA aplicada por 20 minutos aumentou rapidamente as concentrações extracelulares de ATP. No entanto, este acúmulo de ATP foi rapidamente revertido por meio de um aumento na modulação das ectonucleotidases ENTPD1/CD39 e e5NT/CD73, o que indica que o metabolismo do ATP no sistema nervoso periférico é regulado durante a EA.

Yen e colaboradores, (2019), investigaram o efeito da EA durante 21 dias sobre a concentração de ADO no sangue periférico de ratos com dor inflamatória induzida por colágeno (DIIC). Como resultado foi observado que o tratamento com EA resultou na persistência de altas concentrações de ADO, e aumentou a expressão de CD73 mRNA sangue periférico.

Sabe-se que existe uma relação bem estreita entre o sistema purinérgico e imunológico. O ATP e o ADP extracelulares têm efeitos pró-inflamatórios bem estabelecidos, além de promover a quimiotaxia, produção de IL-6 e TNF- α e agregação plaquetária (Faas; Sáez; de Vos, 2017; Haskó; Cronstein, 2013). Em contraste, a ADO têm funções anti-inflamatórias, antitrombóticas, vasodilatadoras e atua na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (Chen et al., 2012; Faas; Sáez; de Vos, 2017).

Neste estudo foi observado um aumento da IL-10 pós-EL (fig. 6) A IL-10 é uma citocina já bem estudada em modelos de dor inflamatória e neuropática, mostrando que seu aumento desencadeia efeitos anti-inflamatórios e analgésicos (Chen; Donnelly; Ji, 2020; Khan et al., 2015). A IL-10 pode produzir seus efeitos inibindo diretamente a atividade nociceptiva, e/ou a IL-10 pode afetar a nocicepção e o edema indiretamente por meio da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos M1 (Okamoto et al., 2001; Shen et al., 2013). Estudos anteriores têm mostrado que camundongos com nocaute IL-10 tiveram um aumento da nocicepção, e um estudo de revisão publicado recentemente encontrou evidências de níveis aumentados de biomarcadores pró-inflamatórios PCR, IL-6 e TNF- α e níveis diminuídos do biomarcador antiinflamatório IL-10 em pacientes com DLCNE. (Banimostafavi et al., 2021; Laumet et al., 2020; Pinto et al., 2023).

Foi observado em alguns estudos que a EA diminuiu o conteúdo de IL-10 em um modelo de dor muscular inflamatória com redução dos macrófagos M1 (células pró-inflamatórias) e aumento de macrófagos M2 (células anti-inflamatórias e importante fonte de IL-10) (da Silva et al., 2015). Além disso, resultados do estudo Yu e colaboradores, (2020), mostraram que o tratamento com EA aumentou significativamente o limiar mecânico e a latência térmica após a injeção de CFA este efeito foi relacionado a um aumento da expressão de IL-10 nos tecidos da pata e da medula espinhal, o que sugere que o efeito analgésico e anti-inflamatório do tratamento com EA pode ser parcialmente associado à supressão de citocinas pró-inflamatórias mediadas pela indução de IL-10, e que a EA de baixa frequência aliviou a dor neuropática pela ativação da via IL-10/ β -endorfina da microglia espinhal (Ali et al., 2020). Nosso estudo corrobora estudos anteriores, mostrando que a EA de baixas frequências foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 em pessoas com DLCNE.

Uma correlação positiva entre e5NT/CD73 e IL-10 (fig. 7). É visto que a liberação de ATP extracelular resulta em uma produção maciça de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-4 e IL-6 (Jordan et al., 2021). Por outro lado, a ativação dos receptores de ADO por meio de um aumento da ADO extracelular bloqueia a liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-4. Além disso a ADO, atuando em nos receptores de adenosina 2A e 2B, eleva a liberação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Antonioli et al., 2019; Haskó; Cronstein, 2013; Koscsó et al., 2011; Németh et al., 2003). Estudos anteriores têm mostrado uma relação entre o sistema purinérgico e a produção de IL-10. É visto que a ADO aumenta a produção de IL-10 em células microgliais por meio de um processo mediado pelos receptores de adenosina A2A (Koscsó et al., 2013; Németh et al., 2005), e que a fosforilação da proteína quinase AMPK -adenosina 5' monofosfato (AMP) regula as vias de sinalização anti-inflamatórias mediadas por IL-10 em macrófagos (Zhu et al., 2015)

A análise de correlação também mostrou uma correlação negativa entre e5NT/CD73 e os níveis de IL-4 pós-EA (fig. 7). Tem sido observado que a IL-4 pode aumentar significativamente os níveis de expressão dos receptores de adenosina A2B, e que essa mudança na expressão foi acompanhada por um efeito pró-inflamatório aumentado da ADO nos mastócitos humanos. Além

disso, em mastócitos humanos tratados com IL-4 foi visto uma diminuição da expressão dos receptores de adenosina A2A (Hua et al., 2011; Versluis et al., 2008). Os receptores de adenosina A2A têm demonstrado transmitir sinais anti-inflamatórios para células imunes, incluindo mastócitos (Du et al., 2019; Li et al., 2010). Também é visto que o AMP inibiu fortemente a liberação de IL-4, TNF-a e IFN (Romio et al., 2011).

A IL-10 desempenha um papel crítico na redução da sensibilidade à dor e na progressão da inflamação, tornando-a um alvo potencial para a terapia da dor. Em contraste, a IL-4 é uma citocina importante envolvida nas respostas imunes, mas seu papel específico no alívio da dor e no controle da inflamação pode variar daquele da IL-10. As células Treg CD4+CD25+ quando ativadas induzem a produção de IL-10, ajudando a manter a homeostase imune e reduzir a progressão da inflamação. Por outro lado, a IL-10 ajuda a regular negativamente a produção de IL-4 nas células CD4+CD25-th, indicando um mecanismo de feedback negativo. Além disso, a presença de células Treg CD4+CD25+ pode diminuir o número de células CD4+CD25-th produtoras de IL-4. Deste modo, tanto a IL-4 quanto a IL-10 desempenham papéis cruciais na modulação do sistema imunológico e na manutenção da homeostase para uma função imune ideal (Pace; Pioli; Doria, 2005; Yu et al., 2020).

A principal limitação deste trabalho é o tamanho da amostra relativamente pequeno. Apesar do cálculo adequado do tamanho da amostra, são necessários mais estudos randomizados controlados com um tamanho amostral maior para abordar as limitações do presente trabalho. No entanto, os métodos de análise robustos utilizados no presente trabalho garantem que os resultados sejam válidos e replicáveis.

6. CONCUSSÃO

O presente estudo demonstra que uma aplicação de 20 minutos de EA de baixa frequência desencadeia um aumento na atividade e expressão de e5NT/CD73 e ADA, controlando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos, com efeitos persistindo por pelo menos 30 minutos. Além disso, é revelado que o tratamento com EA eleva a concentração de IL-10. Foi observado uma correlação entre e5NT/CD73 e IL-10, bem como e5NT/CD73 e IL-4, o qual sugere uma relação entre ectoenzimas purinérgicas e marcadores inflamatórios, potencialmente proporcionando efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios para indivíduos com DLCNE.

7. REFERÊNCIAS

- ADEBIYI, M. G. *et al.* Differential role of adenosine signaling cascade in acute and chronic pain. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 712, p. 134483, 2019.
- ALI, U. *et al.* Low frequency electroacupuncture alleviates neuropathic pain by activation of spinal microglial IL-10/ β -endorphin pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, [s. l.], v. 125, p. 109898, 2020.
- ANDERSON, D. B.; SHAHEED, C. A. Medications for Treating Low Back Pain in Adults. Evidence for the Use of Paracetamol, Opioids, Nonsteroidal Anti-inflammatories, Muscle Relaxants, Antibiotics, and Antidepressants: An Overview for Musculoskeletal Clinicians. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, [s. l.], v. 52, n. 7, p. 425–431, 2022.
- BALLANTYNE, J.; FISHMAN, S.; RATHMELL, J. P. (org.). **Bonica's management of pain**. Fifth editioned. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2019.
- BANIMOSTAFAVI, E. S. *et al.* Determining Serum Levels of IL-10 and IL-17 in Patients with Low Back Pain Caused by Lumbar Disc Degeneration. **Infectious Disorders Drug Targets**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. e270421185135, 2021.
- BARDONI, R. *et al.* ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 14, p. 5297–5304, 1997.
- BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.
- BENTO, T. P. F. *et al.* Low back pain and some associated factors: is there any difference between genders?. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 79–87, 2020.
- BERNIER, L.-P.; ASE, A. R.; SÉGUÉLA, P. P2X receptor channels in chronic pain pathways. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 175, n. 12, p. 2219–2230, 2018.
- BHAGAVATHAM, S. K. S. *et al.* Adenosine deaminase modulates metabolic remodeling and orchestrates joint destruction in rheumatoid arthritis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 15129, 2021.
- BODES PARDO, G. *et al.* Pain Neurophysiology Education and Therapeutic Exercise for Patients With Chronic Low Back Pain: A Single-Blind Randomized Controlled Trial. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 338–347, 2018.

BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: ATP release. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 26, n. 8–9, p. 959–969, 2001.

BONO, M. R. *et al.* CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. **FEBS letters**, [s. l.], v. 589, n. 22, p. 3454–3460, 2015.

BORSELLINO, G. *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 1225–1232, 2007.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 629–638, 2014.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, [s. l.], v. 97, p. 77–89, 1968.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

BUCKNER, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. **Nature Reviews. Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 849–859, 2010.

BURNSTOCK, Geoffrey. Acupuncture: a novel hypothesis for the involvement of purinergic signalling. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 470–472, 2009.

BURNSTOCK, G. Purinergic Mechanisms and Pain. **Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)**, [s. l.], v. 75, p. 91–137, 2016.

BURNSTOCK, G. Purinergic mechanisms and pain--an update. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 716, n. 1–3, p. 24–40, 2013.

BURNSTOCK, G. Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 433–454, 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: past, present and future. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 3–8, 2009.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 8, p. 661, 2017.

BURNSTOCK, G.; WOOD, J. N. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 526–532, 1996.

CEKIC, C.; LINDEN, J. Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 177–192, 2016.

CHEN, W.-H. *et al.* Attenuation of TRPV1 and TRPV4 Expression and Function in Mouse Inflammatory Pain Models Using Electroacupuncture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, [s. l.], v. 2012, p. 636848, 2012.

CHEN, O.; DONNELLY, C. R.; JI, R.-R. Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 62, p. 17–25, 2020.

CHILDS, J. D.; PIVA, S. R.; FRITZ, J. M. Responsiveness of the numeric pain rating scale in patients with low back pain. **Spine**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 1331–1334, 2005.

CHOLEWICKI, J. *et al.* Can Biomechanics Research Lead to More Effective Treatment of Low Back Pain? A Point-Counterpoint Debate. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 425–436, 2019.

CIRUELA, F. Special Issue: G Protein-Coupled Adenosine Receptors: Molecular Aspects and Beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1997, 2020.

COHEN, S. P.; VASE, L.; HOOTEN, W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 397, n. 10289, p. 2082–2097, 2021.

COOK, S. P. *et al.* Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. **Nature**, [s. l.], v. 387, n. 6632, p. 505–508, 1997.

CORP, N. *et al.* Evidence-based treatment recommendations for neck and low back pain across Europe: A systematic review of guidelines. **European Journal of Pain (London, England)**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 275–295, 2021.

DA SILVA, M. D. *et al.* IL-10 cytokine released from M2 macrophages is crucial for analgesic and anti-inflammatory effects of acupuncture in a model of inflammatory muscle pain. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 19–31, 2015.

DAI, Q.-X. *et al.* Analgesia with 5' extracellular nucleotidase-mediated electroacupuncture for neuropathic pain. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 289–295, 2022.

DEAGLIO, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 204, n. 6, p. 1257–1265, 2007.

DEYO, R. A. *et al.* Report of the NIH Task Force on research standards for chronic low back pain. **Pain Medicine (Malden, Mass.)**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 1249–1267, 2014.

DEYO, R. A.; WEINSTEIN, J. N. Low back pain. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 344, n. 5, p. 363–370, 2001.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, [s. l.], v. 191, p. 117–123, 2015.

DING, Y.; XU, J.; BROMBERG, J. S. Regulatory T cell migration during an immune response. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 174–180, 2012.

DJOUHRI, L.; LAWSON, S. N. A-beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Research. Brain Research Reviews**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 131–145, 2004.

DONG, C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 39, p. 51–76, 2021.

DU, Z.-H. *et al.* Adenosine A2A Receptor Mediates Inhibition of Synovitis and Osteoclastogenesis after Electroacupuncture in Rats with Collagen-Induced Arthritis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, [s. l.], v. 2019, p. 4617464, 2019.

DWYER, K. M. *et al.* Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. **American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 2410–2420, 2010.

EKEDAHL, H. *et al.* Accuracy of Clinical Tests in Detecting Disk Herniation and Nerve Root Compression in Subjects With Lumbar Radicular Symptoms. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 726–735, 2018.

ELTZSCHIG, H. K. *et al.* Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. **Blood**, [s. l.], v. 113, n. 1, p. 224–232, 2009.

FAAS, M. M.; SÁEZ, T.; DE VOS, P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses?. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 55, p. 9–19, 2017.

FENTON, B. W.; SHIH, E.; ZOLTON, J. The neurobiology of pain perception in normal and persistent pain. **Pain Management**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 297–317, 2015.

FOSTER, N. E. *et al.* Prevention and treatment of low back pain: evidence, challenges, and promising directions. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 391, n. 10137, p. 2368–2383, 2018.

GBD 2017 DISEASE AND INJURY INCIDENCE AND PREVALENCE COLLABORATORS. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, 2018.

GBD 2019 DISEASES AND INJURIES COLLABORATORS. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 396, n. 10258, p. 1204–1222, 2020.

GOLDMAN, N. *et al.* Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 883–888, 2010.

GONG, Y. *et al.* The neuro-immune microenvironment of acupoints-initiation of acupuncture effectiveness. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 189–198, 2020.

GONZALEZ, G. Z. *et al.* Low back pain prevalence in Sao Paulo, Brazil: A cross-sectional study. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 837–845, 2021.

GRIENSVEN, H. van (org.). **Pain: a textbook for health professionals**. 2. eded. Edinburgh: Elsevier, Churchill Livingstone, 2014.

HAMILTON, S. G.; MCMAHON, S. B. ATP as a peripheral mediator of pain. **Journal of the Autonomic Nervous System**, [s. l.], v. 81, n. 1–3, p. 187–194, 2000.

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

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. Regulation of inflammation by adenosine. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 4, p. 85, 2013.

HEINE, P. *et al.* The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 268, n. 2, p. 364–373, 2001.

HOY, D. *et al.* A systematic review of the global prevalence of low back pain. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 2028–2037, 2012.

HOY, D. *et al.* The global burden of low back pain: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 968–974, 2014.

HUA, X. *et al.* IL-4 amplifies the pro-inflammatory effect of adenosine in human mast cells by changing expression levels of adenosine receptors. **PloS One**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. e24947, 2011.

HUANG, Z. *et al.* From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 162, 2021.

HUNSUCKER, S. A.; MITCHELL, B. S.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 1–30, 2005.

INOUE, K. The Role of ATP Receptors in Pain Signaling. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 2454–2468, 2022.

INOUE, K.; TSUDA, M. Nociceptive signaling mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 receptors. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 187, p. 114309, 2021.

JACOBSON, K. A. *et al.* Adenosine A2A receptor antagonists: from caffeine to selective non-xanthines. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 179, n. 14, p. 3496–3511, 2022.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews. Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 201–212, 2011.

KHAN, J. *et al.* Interleukin-10 levels in rat models of nerve damage and neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 592, p. 99–106, 2015.

KIM, E. Y.; MOUDGIL, K. D. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines. **Cytokine**, [s. l.], v. 98, p. 87–96, 2017.

KLYNE, D. M.; BARBE, M. F.; HODGES, P. W. Systemic inflammatory profiles and their relationships with demographic, behavioural and clinical features in acute low back pain. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 60, p. 84–92, 2017.

KOBIE, J. J. *et al.* T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 177, n. 10, p. 6780–6786, 2006.

KONG, J.-T. *et al.* Effect of Electroacupuncture vs Sham Treatment on Change in Pain Severity Among Adults With Chronic Low Back Pain: A Randomized Clinical Trial. **JAMA network open**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. e2022787, 2020.

KOSCSÓ, B. *et al.* Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 1309–1315, 2013.

KREINER, D. S. *et al.* Guideline summary review: an evidence-based clinical guideline for the diagnosis and treatment of low back pain. **The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 998–1024, 2020.

LAGOMARSINO, V. N.; KOSTIC, A. D.; CHIU, I. M. Mechanisms of microbial-neuronal interactions in pain and nociception. **Neurobiology of Pain (Cambridge, Mass.)**, [s. l.], v. 9, p. 100056, 2021.

LANGEVIN, H. M. *et al.* Fibroblast cytoskeletal remodeling induced by tissue stretch involves ATP signaling. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 228, n. 9, p. 1922–1926, 2013.

LANGEVIN, H. M. *et al.* Subcutaneous tissue fibroblast cytoskeletal remodeling induced by acupuncture: evidence for a mechanotransduction-based mechanism. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 207, n. 3, p. 767–774, 2006.

LAUMET, G. *et al.* Interleukin-10 resolves pain hypersensitivity induced by cisplatin by reversing sensory neuron hyperexcitability. **Pain**, [s. l.], v. 161, n. 10, p. 2344–2352, 2020.

LEWIS, C. *et al.* Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. **Nature**, [s. l.], v. 377, n. 6548, p. 432–435, 1995.

LI, L. *et al.* Peripheral adenosine A2A receptors are involved in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice. **Neuroscience**, [s. l.], v. 170, n. 3, p. 923–928, 2010.

LIM, Y. Z. *et al.* Association Between Inflammatory Biomarkers and Nonspecific Low Back Pain: A Systematic Review. **The Clinical Journal of Pain**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 379–389, 2020.

LIN, Y.-W. *et al.* Transient receptor potential V1 (TRPV1) modulates the therapeutic effects for comorbidity of pain and depression: The common molecular implication for electroacupuncture and omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 89, p. 604–614, 2020.

LIU, H.; XIA, Y. Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, [s. l.], v. 119, n. 10, p. 1173–1182, 2015.

LOPEZ, V. *et al.* Recombinant expression of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (NPP4) and development of a luminescence-based assay to identify inhibitors. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 603, p. 113774, 2020.

MAHER, C.; UNDERWOOD, M.; BUCHBINDER, R. Non-specific low back pain. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 389, n. 10070, p. 736–747, 2017.

MALEK, T. R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 74, n. 6, p. 961–965, 2003.

MARTINS, C. *et al.* Exercise Training positively modulates the Ectonucleotidase Enzymes in Lymphocytes of Metabolic Syndrome Patients. **International Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 930–936, 2016.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Physiologic control of the functional status of Foxp3+ regulatory T cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 186, n. 8, p. 4535–4540, 2011.

MOEHRING, F. *et al.* Keratinocytes mediate innocuous and noxious touch via ATP-P2X4 signaling. **eLife**, [s. l.], v. 7, p. e31684, 2018.

MORRIS, P. *et al.* A systematic review of the role of inflammatory biomarkers in acute, subacute and chronic non-specific low back pain. **BMC musculoskeletal disorders**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 142, 2020.

MOSELEY, G. L.; NICHOLAS, M. K.; HODGES, P. W. A randomized controlled trial of intensive neurophysiology education in chronic low back pain. **The Clinical Journal of Pain**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 324–330, 2004.

MU, J. *et al.* Acupuncture for chronic nonspecific low back pain. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 12, p. CD013814, 2020.

NASCIMENTO, P. R. C. do; COSTA, L. O. P. Low back pain prevalence in Brazil: a systematic review. **Cadernos De Saude Publica**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 1141–1156, 2015.

NÉMETH, Z. H. *et al.* Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 175, n. 12, p. 8260–8270, 2005.

NUSBAUM, L. *et al.* Translation, adaptation and validation of the Roland-Morris questionnaire--Brazil Roland-Morris. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 203–210, 2001.

OKAMOTO, K. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 169, n. 2, p. 386–391, 2001.

OLIVEIRA, C. B. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of non-specific low back pain in primary care: an updated overview. **European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 2791–2803, 2018.

PACE, L.; PIOLI, C.; DORIA, G. IL-4 modulation of CD4+CD25+ T regulatory cell-mediated suppression. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 174, n. 12, p. 7645–7653, 2005.

PINHEIRO, M. B. *et al.* Symptoms of depression as a prognostic factor for low back pain: a systematic review. **The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 105–116, 2016.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017.

PINTO, E. M. *et al.* The importance of inflammatory biomarkers in non-specific acute and chronic low back pain: a systematic review. **European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 3230–3244, 2023.

PRAETORIUS, H. A.; LEIPZIGER, J. ATP release from non-excitabile cells. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 433–446, 2009.

QU, F. *et al.* Acupuncture induces adenosine in fibroblasts through energy metabolism and promotes proliferation by activating MAPK signaling pathway via adenosine3 receptor. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 235, n. 3, p. 2441–2451, 2020.

RAJA, S. N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [s. l.], v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

ROLAND, M.; MORRIS, R. A study of the natural history of back pain. Part I: development of a reliable and sensitive measure of disability in low-back pain. **Spine**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 141–144, 1983.

ROMIO, M. *et al.* Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, [s. l.], v. 301, n. 2, p. C530-539, 2011.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 212, p. 8–27, 2006.

SALAFFI, F. *et al.* Minimal clinically important changes in chronic musculoskeletal pain intensity measured on a numerical rating scale. **European Journal of Pain (London, England)**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 283–291, 2004.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor targets for pain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 338, p. 1–18, 2016.

SCHENK, U. *et al.* ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. **Science Signaling**, [s. l.], v. 4, n. 162, p. ra12, 2011.

SETOGUCHI, R. *et al.* Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 201, n. 5, p. 723–735, 2005.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 2018.

SHEN, D. *et al.* Acupuncture modulates extracellular ATP levels in peripheral sensory nervous system during analgesia of ankle arthritis in rats. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 411–424, 2021.

SHEN, K.-F. *et al.* Interleukin-10 down-regulates voltage gated sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 247, p. 466–475, 2013.

SHEVACH, E. M. *et al.* The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 212, p. 60–73, 2006.

SHIRI, R. *et al.* The association between smoking and low back pain: a meta-analysis. **The American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 123, n. 1, p. 87.e7-35, 2010.

SLOUMA, M. *et al.* Pro-inflammatory cytokines in patients with low back pain: A comparative study. **Reumatologia Clinica**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 244–248, 2023.

SOWA, N. A.; TAYLOR-BLAKE, B.; ZYLKA, M. J. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits nociception by hydrolyzing AMP to adenosine in nociceptive circuits. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 2235–2244, 2010.

SOWA, N. A.; VOSS, M. K.; ZYLKA, M. J. Recombinant ecto-5'-nucleotidase (CD73) has long lasting antinociceptive effects that are dependent on adenosine A1 receptor activation. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 6, p. 20, 2010.

STEVANS, J. M. *et al.* Risk Factors Associated With Transition From Acute to Chronic Low Back Pain in US Patients Seeking Primary Care. **JAMA network open**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. e2037371, 2021.

TAM, T. H.; SALTER, M. W. Purinergic signalling in spinal pain processing. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 49–54, 2021.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A.; TRIANO, J. J.; INJEYAN, H. S. Nonspecific Low Back Pain: Inflammatory Profiles of Patients With Acute and Chronic Pain. **The Clinical Journal of Pain**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 818–825, 2019.

- TORRES, S. F. *et al.* Effect of Different Frequencies of Electroacupuncture on Chronic Low Back Pain in Older Adults: A Triple-blind, Placebo-controlled, Randomized Clinical Trial. **Pain Physician**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 161–173, 2023.
- TRABANELLI, S. *et al.* Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4+ T cells via purinergic P2 receptor activation. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 189, n. 3, p. 1303–1310, 2012.
- ULRICH, H.; ILLES, P.; GLASER, T. (org.). **Purinergic Signaling in Neurodevelopment, Neuroinflammation and Neurodegeneration**. Cham: Springer International Publishing, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-26945-5>. Acesso em: 30 out. 2023.
- URITS, I. *et al.* Acupuncture for the Management of Low Back Pain. **Current Pain and Headache Reports**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 2, 2021.
- URITS, I. *et al.* Low Back Pain, a Comprehensive Review: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. **Current Pain and Headache Reports**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 23, 2019.
- VAN DEN BERG, R. *et al.* The association between pro-inflammatory biomarkers and nonspecific low back pain: a systematic review. **The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 2140–2151, 2018.
- VERSLUIS, M. *et al.* Effects of IL-4 and IL-13 on adenosine receptor expression and responsiveness of the human mast cell line 1. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 866–873, 2008.
- WANG, L.-N. *et al.* Activation of Subcutaneous Mast Cells in Acupuncture Points Triggers Analgesia. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 809, 2022.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nature Reviews. Drug Discovery**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 973–985, 2003.
- WEI, S. *et al.* Suppression of ASIC activity by the activation of A1 adenosine receptors in rat primary sensory neurons. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 205, p. 108924, 2022.
- WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 353–364, 2007.
- XIANG, X. *et al.* Electroacupuncture Stimulation Alleviates CFA-Induced Inflammatory Pain Via Suppressing P2X3 Expression. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 13, p. 3248, 2019.
- YAN, W.-X. *et al.* Acupuncture for Low Back Pain: Reevaluation of Systematic Reviews and Meta-analyses. **Current Pain and Headache Reports**, [s. l.], v. 27, n. 9, p. 351–369, 2023.

YANG, F. *et al.* ST36 Acupuncture Alleviates the Inflammation of Adjuvant-Induced Arthritic Rats by Targeting Monocyte/Macrophage Modulation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, [s. l.], v. 2021, p. 9430501, 2021.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 473–497, 2014.

YEN, C.-M. *et al.* Distal Electroacupuncture at the LI4 Acupoint Reduces CFA-Induced Inflammatory Pain via the Brain TRPV1 Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 18, p. 4471, 2019.

YU, M.-L. *et al.* Electroacupuncture Relieves Pain and Attenuates Inflammation Progression Through Inducing IL-10 Production in CFA-Induced Mice. **Inflammation**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 1233–1245, 2020.

YU, N. *et al.* Manual acupuncture at ST36 attenuates rheumatoid arthritis by inhibiting M1 macrophage polarization and enhancing Treg cell populations in adjuvant-induced arthritic rats. **Acupuncture in Medicine: Journal of the British Medical Acupuncture Society**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 96–109, 2023.

ZHANG, Q. *et al.* Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on inflammatory pain. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 19, p. 17448069231202882, 2023.

ZHANG, B. *et al.* Revealing the magic of acupuncture based on biological mechanisms: A literature review. **Bioscience Trends**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 73–90, 2022.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZHOU, M. *et al.* Adenosine signaling mediate pain transmission in the central nervous system. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 245–254, 2023.

ZHOU, X. *et al.* Electroacupuncture relieves neuropathic pain by inhibiting degradation of the ecto-nucleotidase PAP in the dorsal root ganglions of CCI mice. **European Journal of Pain (London, England)**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 991–1005, 2022.

ZHU, Y. P. *et al.* Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates IL-10-mediated anti-inflammatory signaling pathways in macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 194, n. 2, p. 584–594, 2015.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **The Biochemical Journal**, [s. l.], v. 285 (Pt 2), n. Pt 2, p. 345–365, 1992.

ZIMMERMANN, H. History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 187, p. 114322, 2021.

ZOUIKR, I.; KARSHIKOFF, B. Lifetime Modulation of the Pain System via Neuroimmune and Neuroendocrine Interactions. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, p. 276, 2017.

ZUO, W.-M. *et al.* The real-time detection of acupuncture-induced extracellular ATP mobilization in acupoints and exploration of its role in acupuncture analgesia. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 69–85, 2023.

APÊNDICES

APÊNDICE A

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFFS

Prezado(a) participante,

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “efeitos da Eletroacupuntura nos marcadores purinérgicos e inflamatórios em pessoas com dor lombar crônica não específica”, esse projeto será desenvolvido pelo acadêmico Jardel Cristiano Ecco, Mestrando em Ciências Biomédicas na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) Campus Chapecó/SC e sob a orientação da Professora Dr^a Débora Tavares de Resende e Silva, pesquisadora responsável e professora dos cursos de graduação em Medicina e Enfermagem e no Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas (PPGCB) nesta instituição. O objetivo geral desta pesquisa é analisar o efeito das terapias não farmacológicas de Eletroacupuntura em pacientes com dor lombar crônica não específica. O convite para a sua participação se deve ao fato de ter sido identificado, preenchendo os critérios de inclusão de nosso estudo. Vale evidenciar, que pacientes com condição crônica de saúde apresentam quadros de dor crônica (DC) com comprometimento da força muscular, inflamações e disfunções articulares.

Caso aceite participar da pesquisa, sua participação ocorrerá de forma voluntária. A partir do aceite, dados sociodemográficos como idade, sexo, comorbidade associada, estratégia farmacológica utilizada, prática de atividade/exercício físico e tabagismo ou alcoolismo, serão coletados. Além disso, nessa etapa serão aplicados os questionários da Escala numérica da dor (NRS), no qual vai avaliar a intensidade de sua dor e o questionário de Roland-Morris no qual vai avaliar sua incapacidade devido a dor. Vale ressaltar que esses instrumentos serão explicados pelos pesquisadores previamente a coleta, caso haja dúvidas. Os questionários serão aplicados antes e após a

técnica de eletroacupuntura. O preenchimento dos questionários e a intervenção se darão no laboratório 2, sala de enfermagem da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Chapecó Unidades Básicas de por meio de entrevista e/ou enviados de forma eletrônica aos pacientes antes e após o protocolo. Outro aspecto avaliado, é o sistema purinérgico (SP), estresse oxidativo (EO) e perfil inflamatório. Desse modo, ocorrerá a coleta de uma amostra de sangue antes do início da intervenção e 30 minutos após a intervenção. Cada coleta colherá uma amostra de 20 ml de sangue que posteriormente as amostras vão ser separadas e armazenadas no laboratório da universidade para avaliação.

Ressalta-se que a sua participação não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se quer ou não participar, bem como desistir da colaboração neste estudo no momento em que desejar, não sendo penalizado por esses motivos. Contudo, sua participação é muito importante para a execução da pesquisa. Apesar dos cuidados éticos, esta pesquisa poderá apresentar riscos e desconfortos a você.

Os efeitos adversos são raros, e os eventos adversos mais comuns são muito leves como, sangramento ou dor no local da agulha, mas estes representam uma reação pretendida da eletroacupuntura.

A eletroacupuntura é um procedimento citado nas principais diretrizes para o tratamento da dor lombar crônica. Já é demonstrado que a acupuntura aumenta os opiáceos endógenos, como dinorfina, endorfina, encefalina e libera corticosteróides, aliviando a dor e melhorando o processo de cicatrização. Além disso, é relatado que eletroacupuntura produz efeitos benéficos e modestos no tratamento de outras condições como cefaleia tensional, cefaleia crônica, enxaqueca, dor miofascial, fibromialgia.

Ressalta-se que não existem despesas pessoais para você em qualquer fase deste estudo e também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Todas as suas informações obtidas nesta pesquisa serão mantidas em sigilo e, em caso de divulgação em publicações científicas, os seus dados pessoais não serão mencionados, preservando seu anonimato. A organização dos dados se dará por meio de planilhas eletrônicas. Após o término da pesquisa, os pesquisadores farão a devolutiva aos participantes via

email/telefone de modo a informar os resultados obtidos em tal estudo. Ademais, as informações coletadas serão arquivadas eletronicamente no computador da coordenadora do presente projeto, em formato de planilhas do Libreoffice, após o tempo de guarda das informações, as mesmas serão excluídas. Caso você tenha dúvidas sobre a condução da pesquisa, você pode entrar em contato com a pesquisadora responsável: Débora Tavares de Resende e Silva, pelo telefone (49) 2049-6409 ou email: debora.silva@uffs.edu.br. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, telefone e whatsapp: (49) 2049-3745 ou Email: cep.uffs@uffs.edu.br. Endereço: Universidade Federal da Fronteira Sul, Bloco da Biblioteca, Sala 310, 3º andar, Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, CEP 89815-899, Chapecó, Santa Catarina, Brasil. Vale destacar que esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEP-UFFS), sob CAAE número _____ e parecer número _____, na data de _____.

Assim, mediante o exposto, solicitamos sua autorização para a realização do projeto e sua participação nele. Autorizo, me disponho a realizar o protocolo de eletroacupuntura: () Sim () Não

Autorizo e me disponho a responder os questionários: () Sim () Não Dessa forma, se você concorda em participar da pesquisa como consta nas explicações e orientações

mencionadas, coloque seu nome no local indicado. Desde já, agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que será também assinado pelas pesquisadoras e orientadora, em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com as pesquisadoras.

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do participante

Nome Completo: _____

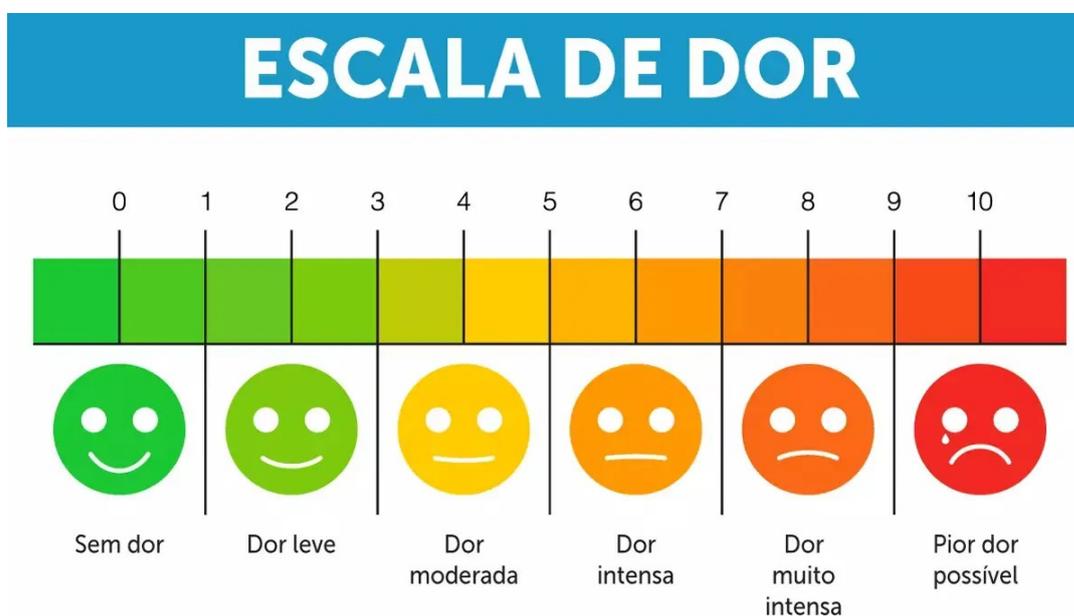
Contato: () _____

E-mail: _____

ANEXOS

ANEXO A - ESCALA NUMÉRICA DE CLASSIFICAÇÃO DA DOR

Avalie como você se sente, nesse momento (ou na última semana), com relação a dor. Considere a linha abaixo como representando a gama completa das diversas intensidades de dor que você possa sentir. As extremidades esquerda e direita indicam o mínimo e o máximo de dor respectivamente. Marque, claramente, essa linha com um traço vertical representativo da quantidade de dor que você sente agora.



ANEXO B - QUESTIONÁRIO DE INCAPACIDADE ROLAND-MORRIS – QIRM

Nome/Iniciais:

Data:

Quando você tem dor, você pode ter dificuldade em fazer algumas coisas que normalmente faz. Esta lista possui algumas frases que as pessoas usam para se descreverem quando tem dor. Quando você ler estas frases poderá notar que algumas descrevem sua condição atual. Ao ler ou ouvir estas frases pense em você hoje. Assinale com um x apenas as frases que descrevem sua situação hoje, se a frase não descrever sua situação deixe-a em branco e siga para a próxima sentença. Lembre-se assinalar apenas a frase que você tiver certeza que descreve você hoje.	
1. Fico em casa a maior parte do tempo por causa da minha dor.	<input type="checkbox"/>
2. Mudo de posição freqüentemente tentando ficar mais confortável com a dor.	<input type="checkbox"/>
3. Ando mais devagar que o habitual por causa da dor.	<input type="checkbox"/>
4. Por causa da dor eu não estou fazendo alguns dos trabalhos que geralmente faço em casa.	<input type="checkbox"/>
5. Por causa da dor eu uso o corrimão para subir escadas.	<input type="checkbox"/>
6. Por causa da dor eu deito para descansar mais frequentemente.	<input type="checkbox"/>
7. Por causa da dor eu tenho que me apoiar em alguma coisa para me levantar de uma poltrona.	<input type="checkbox"/>
8. Por causa da dor tento com que outras pessoas façam as coisas para mim.	<input type="checkbox"/>
9. Eu me visto mais devagar do que o habitual por causa das minhas dores.	<input type="checkbox"/>
10. Eu somente fico em pé por pouco tempo por causa da dor.	<input type="checkbox"/>
11. Por causa da dor tento não me abaixar ou me ajoelhar.	<input type="checkbox"/>
12. Tenho dificuldade em me levantar de uma cadeira por causa da dor.	<input type="checkbox"/>
13. Sinto dor quase todo o tempo.	<input type="checkbox"/>
14. Tenho dificuldade em me virar na cama por causa da dor.	<input type="checkbox"/>
15. Meu apetite não é muito bom por causa das minhas dores.	<input type="checkbox"/>
16. Tenho dificuldade para colocar minhas meias por causa da dor.	<input type="checkbox"/>
17. Caminho apenas curtas distâncias por causa das minhas dores.	<input type="checkbox"/>
18. Não durmo tão bem por causa das dores.	<input type="checkbox"/>
19. Por causa da dor me visto com ajuda de outras pessoas.	<input type="checkbox"/>
20. Fico sentado a maior parte do dia por causa da minha dor.	<input type="checkbox"/>
21. Evito trabalhos pesados em casa por causa da minha dor.	<input type="checkbox"/>
22. Por causa da dor estou mais irritado e mal humorado com as pessoas do que em geral.	<input type="checkbox"/>
23. Por causa da dor subo escadas mais vagarosamente do que o habitual.	<input type="checkbox"/>
24. Fico na cama (deitado ou sentado) a maior parte do tempo por causa das minhas dores.	<input type="checkbox"/>

ANEXO C - Questionários sobre informações demográficas dos participantes

Por favor preenche às informações abaixo referente as suas características individuais.

* Indica uma pergunta obrigatória

1. Nome do participante: *

2. Data de nascimento

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

3. Idade do participante: *

4. Gênero do participante: *

a) Masculino

b) Feminino

Outro

5. Nível de escolaridade do participante: *

a) Ensino Fundamental Completo

b) Ensino Médio Completo

c) Ensino Superior Completo

d) Mestrado

e) Doutorado

f) Pós Doutorado

g) Outro

6. Sua dor já dura mais de 6 meses? *

a) Sim

b) Não

7. Horas de jornada semanal de trabalho: *

8. Apresenta ou já apresentou algum outro problema de saúde abaixo? *

a) Hipertensão arterial

b) Diabetes

c) Obesidade

- d) Colesterol alto
- e) Artrose
- f) Doenças osteomusculares
- g) Câncer
- h) Outra
- i) Não apresento

9. Se sim na resposta não foi contemplada na questão anterior, especifique

10. Você está recebendo ou realizando algum tipo de tratamento para sua dor?
*

- a) Sim
- b) Não

11. Se sim na resposta anterior, qual?

12. Você está usando algum medicamento analgésico ou anti-inflamatório neste momento? *

- a) Sim
- b) Não

13. Se sim na resposta anterior, qual?

14. Você pratica alguma forma atividade física de maneira regular? *

- a) Sim
- b) Não

15. Se sim na resposta anterior, qual?

16. Você é fumante? *

- a) Sim
- b) Não

17. Você consome álcool regularmente? *

- a) Sim
- b) Não