

## ANÁLISE DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PACIENTES COM DOR LOMBAR CRÔNICA APÓS INTERVENÇÃO COM ELETROACUPUNTURA: ANÁLISE DO ATP EXTRACELULAR.

NINA FERREIRA BRANDÃO<sup>1,2\*</sup>, VINICIUS ANSOLIN<sup>3</sup>, OTAVIO ANANIAS PEREIRA DA SILVA RIBEIRO<sup>1</sup>, JARDEL ECCO<sup>4</sup>, FILOMENA MARAFON<sup>5</sup>, JOÃO VITOR KROTH<sup>3</sup>, DÉBORA TAVARES DE RESENDE E SILVA<sup>2,6</sup>

### 1 Introdução

A dor lombar crônica não específica (DLCNE) é a principal causa de incapacidade no mundo, e seu tratamento requer uma abordagem multidimensional devido à variabilidade na resposta dos pacientes (Urits *et al.*, 2019). A DLCNE está fortemente associada à sensibilização dos neurônios nociceptores devido à liberação de mediadores moleculares por tecidos lesionados ou inflamados (Zouikr; Karshikoff, 2017). Os tecidos lesionados ou inflamados são associados a liberação de ATP extracelular, ele age como uma molécula sinalizadora para os receptores, como os P2X2/3, e canais iônicos presentes nos terminais nervosos periféricos dos neurônios nociceptores (Zouikr; Karshikoff, 2017). Alguns estudos apontam que a eletroacupuntura nos pontos ST36 e BL60 em ratos com dor inflamatória reduziu significativamente a ativação dos receptores P2X3, diminuindo o disparo neuronal e a dor (Bernier; Ase; Séguéla, 2018; Zhou *et al.*, 2022).

### 2 Objetivos

Este estudo objetivou analisar os efeitos da eletroacupuntura em pacientes com dor lombar crônica não específica, ao quantificar os níveis de ATP extracelular antes e após uma sessão de 20 minutos de eletroacupuntura.

### 3 Metodologia

Este foi um ensaio clínico não randomizado antes e depois em pacientes com DLCNE. A presente pesquisa faz parte de um projeto guarda-chuva intitulado “O impacto das práticas não farmacológicas, como exercícios físicos e PICs como alternativas de tratamentos na dor crônica em condições crônicas de saúde”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFFS (CEP-UFFS), sob parecer nº 6.413.346 e CAAE nº 70754123.0.0000.5564.

O cálculo do tamanho amostral foi realizado considerando um  $\alpha = 0,05$  e poder de 80%, e uma possível perda amostral (20%), optou-se por coletar um número total de 23 indivíduos. Os participantes foram servidores públicos da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó-SC. Os critérios de inclusão foram os descritos por Deyo e colaboradores (2014) e Kong e colaboradores (2020). Já os critérios de exclusão foram os

1 Acadêmica(o) de medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó, contato: nina.brandao@estudante.uffs.edu.br

2 Grupo de Pesquisa: GEPISC

3 Acadêmico de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Chapecó.

4 Fisioterapeuta, Mestrando em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS).

5 Biomédica, Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

6 Fisioterapeuta, Doutora em Ciências da Saúde, Professora na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), **Orientador(a)**.

relatados por Ekedahl e colaboradores (2018), Gonzalez e colaboradores (2021), Bodes Pardo e colaboradores (2018) e 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, eles foram instruídos a deixarem de consumir cafeína 12h antes dos testes (Jacobson et al., 2022).

Todos os voluntários foram informados sobre os procedimentos experimentais antes de darem seu consentimento por escrito, e além disso foram informados de que poderiam encerrar sua participação a qualquer momento. O procedimento foi realizado em uma única sessão de EA para verificar os efeitos agudos pré e 30min após intervenção, realizado em uma sala adequada na UFFS, Campus Chapecó. Na linha de base os participantes preencheram questionários sobre informações demográficas. Além disso, foi relatado pelos participantes o histórico de tabagismo e hábitos alcoólicos.

A intensidade da dor foi avaliada no início do estudo usando a escala numérica de classificação da dor (NPRS), onde 0 representa nenhuma dor e 10 a pior dor imaginável. A incapacidade devido à dor foi avaliada usando o Questionário de incapacidade de Roland Morris (RMDQ). Este 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 (Nusbaum et al., 2001; Roland; Morris, 1983).

A eletroacupuntura 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 o sangue antes e após da EA e os parâmetros inflamatórios, assim como as atividades enzimáticas do sistema purinérgico foram verificadas.

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). Ademais, a análise de luminescência foi realizada utilizando um leitor de microplacas Varioskan (ThermoScientific®). Os resultados foram expressos em nanomolar (nM).

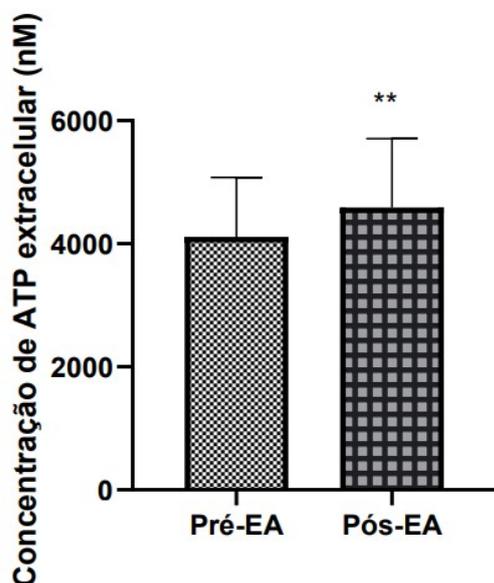
As características dos participantes foram analisadas por meio de estatística descritiva. Os dados foram relatados como frequência (proporção) e média  $\pm$  desvio padrão (DP). Para análise dos dados do sistema purinérgico e perfil inflamatório os outliers foram removidos previamente. Após foi realizado uma análise de normalidade dos dados. Em seguida, a comparação dos valores agudos pré e pós a EA foi realizada através do teste t pareado de Student caso os dados apresentarem 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. 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 e Discussão

O estudo incluiu 23 participantes, majoritariamente mulheres (60,87%), com idade média de 46,65 anos. Os sintomas duraram em média 21 semanas, e a dor média foi de 3,87 na escala NPRS, com 39,13% relatando dor leve, 52,17% dor moderada e 8,70% dor intensa. O nível médio de incapacidade foi de 9,609 no RMDQ. Além disso, 30,43% usavam medicamentos e 56,52% já haviam feito tratamento não-farmacológico para a dor.

A quantidade de ATP extracelular foi estatisticamente significativa, sendo que os valores encontrados foram de  $4110 \pm 966$  nM pré-EA e  $4589 \pm 1121$  nM pós-EA, com valor de  $p < 0,0036$ .  $N = 23$ . Essa diferença sugere que a EA pode influenciar a liberação de ATP no organismo, possivelmente contribuindo para os efeitos terapêuticos observados.

Figura 1. Quantificação de ATP extracelular pré-EA e pós-EA em indivíduos com DLCNE. Os dados foram expressos em nanomolar (nM) de ATP no soro. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. Eixo X= concentração de ATP pré e pós EA.



O ATP intracelular é conhecido como uma fonte de energia para o funcionamento do organismo. Entretanto, ele pode ser liberado no espaço extracelular e pode atuar como uma molécula sinalizadora em casos de apoptose, necrose, lesão mecânica ou pela ativação de células inflamatórias (Burnstock, Geoffrey, 2009). Em condições patológicas ou inflamatórias o aumento dos níveis de ATP extracelular são percebidos em decorrência da sua elevada liberação (Inoue, 2022). Esse ATP liberado por diferentes tipos celulares está envolvido no início do processo da dor, pois ele estimula terminações nervosas sensoriais locais, combinando-se com os receptores P2X2/3, e produz um aumento da nocicepção (Kim; Moudgil, 2017).

O mecanismo analgésico fisiológico associado a EA aponta que o ATP extracelular se liga aos receptores P2X3 nos neurônios do DRG para ativar nociceptores e transmitir sinais de dor. Com EA no ponto de acupuntura (ST36 e BL60) para uma dor inflamatória produzida pela injeção de Adjuvante Completo de Freund (CFA) em ratos houve uma redução significativa da 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).

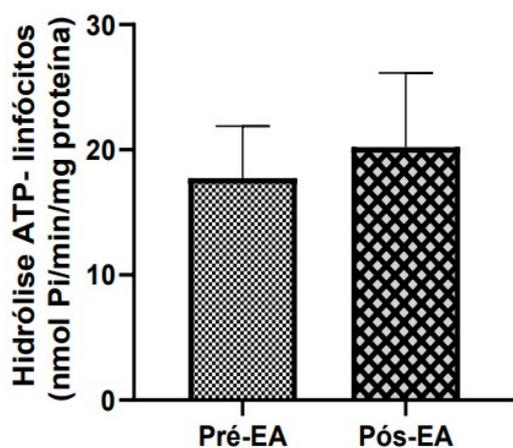
Estudos também apontam que o ATP é liberado em resposta à estimulação mecânica através da EA, e quando liberado ele atua como um transmissor que se liga aos receptores purinérgicos, incluindo os receptores P2X e P2Y (Burnstock, 2016). No meio extracelular o ATP pode ser rapidamente degradado em ADO pelas ectonucleotidases extracelulares para exercer seus efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em pessoas com dores crônicas (Zuo

*et al.*, 2023).

Poucos estudos avaliaram a atividade do ATP extracelular em humanos com a aplicação da EA, sendo a grande maior parte dos estudos realizado em animais. O resultado desse estudo vai ao encontro do estudo de Wei e colaboradores, (2022), no qual buscaram analisar em tempo real e capturar sinais rápidos do ATP extracelular *in vivo* durante a após a EA. Neste estudo 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.

Não houveram diferenças significativas para a 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) (Figura 2). Valor de  $p = 0,0525$ ,  $N=23$ .

Figura 2. Hidrólise de ATP em linfócitos em pessoas com DLCNE antes e após EA. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística: teste t de Student pareado\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).



## 5 Conclusão

A eletroacupuntura de baixa frequência por 20 minutos mostrou-se eficaz na modulação da sinalização purinérgica e das respostas inflamatórias em pessoas com dor lombar crônica não especificada, sugerindo que a liberação de ATP e sua rápida conversão em adenosina podem contribuir para efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios. Esses resultados apoiam a EA como uma alternativa não farmacológica para o alívio da dor lombar crônica.

## Referências Bibliográficas

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.

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

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

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

**Palavras-chave:**

Sistema purinérgico; Inflamação; Eletroacupuntura; Dor lombar crônica; ATP extracelular.

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES-2023-0429

**Financiamento**

Somente para bolsistas: EDITAL Nº 73/GR/UFGS/2023: GRUPO 1 (Bolsas IC) - CNPq.