



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# AVALIAÇÃO DA ACUPUNCTURA SOBRE O SISTEMA IMUNITÁRIO

星  
医  
は  
仁  
術  
鍼  
の  
道  
Yoshi!

MESTRADO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL

ESTELA RITA DE LIMA BANDEIRA LOUREIRO

Coimbra, Junho de 2014



*“The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and science”.*

Albert Einstein



# AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Silvério Cabrita, um muito obrigada pela orientação do meu trabalho em tudo aquilo que o mesmo exigiu: obrigada pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, pela disponibilidade, pelo optimismo, confiança e preocupação.

Ao Professor Doutor Manuel Santos Rosa, um muito obrigada pela disponibilidade, oportunidade de experiência profissional e maturidade científica que me transmitiu.

À Doutora Vera Alves, pela simpatia e dedicação, pela disponibilidade e optimismo.

Ao Doutor Paulo Santos, pela disponibilidade e ajuda ao longo do percurso.

À Dra Iva, pela paciência, disponibilidade e presença amiga.

Ao Prof. Yoshinori, pela serenidade transmitida ao longo dos anos e pelo gosto que me fez chegar pela Acupunctura!

Aos meus Pais e Irmãos, pelo amor, confiança, dedicação e paciência. A eles devo muito daquilo que sou e do que consegui até hoje.

À Ju, pela cumplicidade, pela presença intemporal, pela paciência, pela força e dedicação. Obrigada pelo sentido verdadeiro de amizade, Ju!

Ao Diogo, pela amizade e paciência! Pela honestidade e presença. Obrigada, Diogo!

Ao Ricardo Cabeças, pela disponibilidade, boa disposição e pela paciência.

Aos meus amigos; às pessoas especiais que tenho na minha vida: aos que me acompanharam, aos que estão persistentemente presentes e, sobretudo, aos que acreditam em mim, sabendo-me de cor: às “Joanas”, Mané, Diana, Kiki, Ana, António, Fernando, Mafalda, Gisela e Inês.

Um Muito Obrigada...

Há passos que só damos pelos que nos são.



# Índice

<b>Introdução</b>	<b>1</b>
Perspectiva Histórica: A Acupunctura na Medicina . . . . .	1
A Acupunctura no Ocidente . . . . .	5
Evolução científica da acupunctura . . . . .	8
Conceitos da Medicina Tradicional Chinesa . . . . .	16
Acupunctura e o Sistema Imunitário . . . . .	25
O Sistema Imunitário – Breve Introdução . . . . .	25
O Sistema Imunitário – Aplicação da Acupunctura . . . . .	30
<b>Objectivos</b>	<b>39</b>
<b>Materiais e Métodos</b>	<b>41</b>
Voluntários e Métodos de Acupunctura . . . . .	41
Citometria de Fluxo . . . . .	42
Material e Equipamento . . . . .	43
Reagentes . . . . .	43
Análise do linfograma . . . . .	44
Análise Estatística . . . . .	45
<b>Resultados</b>	<b>47</b>
<b>Discussão e Conclusão</b>	<b>53</b>
<b>Lista de Acrónimos</b>	<b>59</b>



# Lista de Figuras

1	O Imperador Amarelo. . . . .	3
2	Esquema da árvore genealógica das células sanguíneas. Resumo dos modelos descritos de hematopoiese e as vias de diferenciação das diferentes células sanguíneas. IL - interleucina; MHC – I – complexo major de histocompatibilidade da classe I; MCH – II - complexo major de histocompatibilidade da classe II; NK – Natural Killer; Tc – T citotóxico; TGF $\beta$ – transforming growth factor beta; Th – T auxiliar (Retirado e adaptado de Fundamentos de Imunologia). . . . .	28
3	Ilustração esquemática das funções das células imunes do sistema imunológico humano: (A) a imunidade inata; (B) a imunidade adquirida (Retirado e adaptado de Takahashi T et al., 2009). . . . .	31
4	Localização anatômica do ponto 11BX (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupuntura e prática de Acupuntura) . . . . .	34
5	Localização anatômica do ponto 17BX (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupuntura e prática de Acupuntura). . . . .	35
6	Localização anatômica do ponto 23BX (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupuntura e prática de Acupuntura). . . . .	36
7	Localização anatômica do ponto 39VB (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupuntura e prática de Acupuntura). . . . .	37
8	Localização anatômica do ponto 36ES (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupuntura e prática de Acupuntura). . . . .	38

9	Esquemática da análise dos parâmetros celulares por citometria de fluxo. Na figura está representada a dispersão da luz emitida por uma fonte de luz (laser de argon). Esta, ao incidir numa célula ou outra partícula, sofre dispersão frontal (Forward scatter) ou lateral (Side scatter) (reproduzido e adaptado de <a href="http://www.sleury.com.dr/">http://www.sleury.com.dr/</a> . . . . .	43
10	Representação esquemática dos dot plots obtidos pela análise de citometria de fluxo das amostras de sangue dos voluntários. Através da distribuição das populações celulares obtém-se a identificação dos diferentes tipos de células sanguíneas e das diferentes características morfológicas. A identificação baseia-se na verificação da presença de alguns marcadores característicos por intermédio de fluorocromos fluorescentes. . . . .	44
11	População de Linfócitos Totais. O gráfico da figura representa a média da percentagem de linfócitos totais das amostras de sangue dos voluntários, antes (AA) e após (DA) a acupuntura. O gráfico de pontos à direita representa o dot-plot adquirido da análise das amostras por citometria de fluxo onde no eixo dos xx está o que corresponde à dispersão para a frente (FSC) e no eixo dos yy a dispersão lateral (SSC). O FSC correlaciona-se com o tamanho da célula e o SSC correlaciona-se com a diversidade periférica das membranas celulares. Assim, podemos identificar, a partir de uma amostra de sangue total, a população de linfócitos. Os valores do gráfico representam a média ( $\pm$ desvio-padrão). ( $p = 0,17$ ; não significativo). . . . .	47
12	População de Linfócitos T, NK e B. Os gráficos da figura representam a média da percentagem de linfócitos T, NK e B das amostras de sangue dos voluntários, antes (AA) e após (DA) a acupuntura. O gráfico de pontos no canto inferior direito representa o dot-plot adquirido da análise das amostras por citometria de fluxo onde no eixo dos xx está representada a marcação CD8 e CD19 com o fluorocromo FITC e no eixo dos yy a marcação CD3 e CD56 com o fluorocromo PE. Os valores do gráfico representam a média ( $\pm$ desvio-padrão). ( $p$ (Linfócitos T) = $0,2$ ; não significativo; $p$ (Linfócitos B) = $0,6$ ; não significativo; $p$ (Linfócitos NK) = $0,5$ ; não significativo; $p > 0,05$ ). . . .	48

- 13 População de Linfócitos NK CD8+ e CD8-. Os gráficos da figura representam a média da percentagem de linfócitos NK que são CD8+ e NK CD8- das amostras de sangue dos voluntários, antes (AA) e após (DA) a acupuntura. O gráfico de pontos acima representa o dot-plot adquirido da análise das amostras por citometria de fluxo onde no eixo dos xx está representado o marcador CD8 e CD19 ligado a um fluorocromo FITC e no eixo dos yy está representado o marcador CD3 e CD56 ligado a um fluorocromo PE. Os valores do gráfico representam a média ( $\pm$  desvio-padrão). (p (Linfócitos NK CD8+) = 0,6; não significativo; p (Linfócitos NK CD8-) = 0,7; não significativo;  $p > 0,05$ ). . . . . 49
- 14 População de Linfócitos T CD8+, DP, CD4+ e DN. Os gráficos da figura representam a média da percentagem de linfócitos T que são CD8+, DP, CD4+ e DN das amostras de sangue dos voluntários, antes (AA) e após (DA) a acupuntura. O gráfico de pontos acima representa o dot-plot adquirido da análise das amostras por citometria de fluxo onde no eixo dos xx está representado o marcador CD4 ligado a um fluorocromo PercCP e no eixo dos yy está representado o marcador CD8 e CD19 ligado a um fluorocromo FITC. Os valores do gráfico representam a média ( $\pm$  desvio-padrão). (p (Linfócitos T CD8+) = 0,6; não significativo; p (Linfócitos T DP) = 0,2; não significativo; p (Linfócitos T CD4+) = 0,8; não significativo; p (Linfócitos T DN) = 0,1  $p > 0,05$ ). 50



## **Resumo**

A acupuntura é praticada em todo o mundo como um tratamento complementar à medicina convencional. No entanto, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos da acupuntura sobre o sistema imunitário. Neste trabalho, pretende-se avaliar e identificar os efeitos da acupuntura sobre o sistema imunitário através da imunofenotipagem, utilizando a citometria de fluxo. Para isto, recorreu-se a voluntários que foram submetidos a punctura durante três semanas e aos quais foi retirado sangue antes e após a punctura para análise de possíveis alterações nos valores de imunofenotipagem. O estudo foi elaborado com base em 22 voluntários jovens e saudáveis. No início e no final do estudo foram feitas colheitas de sangue, de 5 ml, cada, num total de duas colheitas, para imunofenotipagem com citometria de fluxo. Cada individuo foi submetido durante três semanas a três sessões de acupuntura por semana num total de nove tratamentos nos pontos: 11BX, 17BX, 23BX, 39VB, 36ES. Com este estudo pudemos concluir que a acupuntura não parece alterar significativamente os níveis de linfócitos nas amostras de sangue com base na comparação dos valores da imunofenotipagem antes e após a punctura. Este resultado parece-nos importante no sentido em que, ao demonstrar o papel não prejudicial da acupuntura em pessoas sem doença, evidencia o possível potencial da acupuntura como complemento à medicina ocidental em doentes sem os possíveis efeitos secundários associados aos tratamentos farmacológicos.

**Palavras-Chave:** Acupuntura; Imunofenotipagem; Linfócitos.



## **Abstract**

Acupuncture is practiced worldwide as a complementary treatment to conventional medicine. However, little is known about the physiological mechanisms of acupuncture on the immune system. This study aims to assess and identify the effects of acupuncture on the immune system by immunophenotyping using flow cytometry. To this end, we resorted to volunteers that were subjected to puncture during three weeks and to which blood was taken before and after puncture for analysis of possible changes in the values of immunophenotyping. The study was based on 22 healthy volunteers. At the beginning and end of the study, blood samples were taken, 5 ml each, a total of two harvests for immunophenotyping with flow cytometry. Each individual was subjected for three weeks to three sessions per week in a total of nine treatments with the puncture points: 11BX, 17BX , 23BX , 39VB , 36ES . With this study we concluded that acupuncture does not seem to significantly alter the levels of lymphocytes in blood samples based on comparison of the values of immunophenotyping before and after the puncture. This result seems to us important in the sense that, by demonstrating the non-injurious role of acupuncture in people without the disease, highlights the possible potential of acupuncture as a complement to occidental medicine in patients without the possible side effects associated with the pharmacological therapies.

**Key-words:** Acupuncture; Immunophenotyping; Lymphocytes.



# Introdução

## Perspectiva Histórica: A Acupunctura na Medicina

A Acupunctura, uma antiga arte de curar, é praticada em todo o mundo apesar das dificuldades na conciliação do seu princípio com a medicina baseada na evidência. Estão presentes na literatura artigos científicos e trabalhos de investigação que abordam o estudo dos seus mecanismos. O National Institutes of Health (NIH) e a World Health Organization (WHO) defendem existirem provas convincentes da eficácia da utilização deste tratamento em diversas doenças. A palavra acupunctura provém do latim *acus*, que significa agulha, e *punctum*, que significa punção, assim chamada por um clérigo europeu do século VII durante a sua estadia na Índia. Pode, assim, ser definida como a inserção de agulhas em pontos específicos com um objectivo terapêutico [1].

As origens da acupunctura perdem-se na Pré-História Chinesa, porque com base nos textos da literatura é difícil estabelecer um consenso entre as datas e a origem desta técnica. Os chineses da Idade da Pedra descobriram que aquecendo o corpo com areia ou pedras quentes aliviava as dores abdominais e articulares, o que pode estar na origem da moxabustão que é uma técnica da medicina tradicional chinesa (MTC), em que se utiliza a combustão

[1] Y. Chen, X. Zhang, Y. Fang, and J. Yang. Analyzing the study of using acupuncture in delivery in the past ten years in china. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014:672508, 2014

[2] Wen TS. *Acupuntura Clássica Chinesa*. Editora Cultrix, São Paulo, Brasil, 1985

[3] Ramey D. A true history of acupuncture. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, pages 269–273, 2004

[4] Ma KW. The roots and development of chinese acupuncture: from prehistory to early 20th century. *Acupunct Med*, 10(92):92–99, 1992.

da erva *Artemisia sinensis* e *Artemisia vulgaris*, aplicando assim calor aos pontos de acupuntura colocando directamente a moxa sobre as agulhas e transmitindo um calor através do metal ou aproximando a moxa apenas dos pontos de acupuntura [2]. Em várias partes da China foram encontrados *Zhen Shih* - agulhas de pedra e de espinha de peixe - que datam também da Idade da Pedra (cerca de 3000 a.C.). Não há documentos que indiquem precisamente como foi o desenvolvimento inicial da acupuntura, mas sabe-se que, desde tempos remotos, esta era uma prática muito desenvolvida e aceite entre os chineses [2]. O *Nei Jing*, também chamado “O Clássico de Medicina Interna do Imperador Amarelo”, é um dos textos mais antigos da história chinesa que surgiu do registo das conversas entre o imperador *Huang Di* (também chamado o Imperador Amarelo) e os seus ministros. Esta obra é um dos livros fundamentais da medicina tradicional chinesa, aonde estão descritos aspectos anatómicos, fisiológicos, diagnósticos e terapêuticos das doenças. O Imperador Amarelo teria reinado de 2697 a.C. a 2597 a.C.. No entanto, estas datas e as origens dos textos não são consensuais [3]. Alguns estudiosos da história da China acreditam que o *Nei Jing* foi escrito por um grupo de médicos do Período dos Reinos Combatentes 480-221 a.C. ou no séc. III a.C., época associada à conquista do ferro e aos grandes clássicos da cultura chinesa que originaram o taoísmo (a partir do *Tao Te King* de *Lao Tsé*) e o confucionismo, a filosofia de Confúcio (551 a.C.-479 a.C.). Os sábios da corte elaboraram um resumo da tradição oral médica chinesa daquela época, o que dificultou, muitas vezes, a tradução de datas e conceitos. O livro terá sofrido várias alterações até à versão definitiva que data do século I a.C. [4].

O reconhecimento desta prática que recorria às agulhas com bambu ou osso para abrir abscessos esteve na base do desenvolvimento da acupuntura. Foram encontradas em múmias da idade da pedra tatuagens não decorativas que correspondiam aos locais



Figura 1: O Imperador Amarelo.

dos pontos de acupuntura hoje descritos [4].

Na origem da acupuntura pode estar, também, a sangria, uma técnica originalmente usada para a cura mágica mas que surge descrita nas primeiras pesquisas sobre acupuntura como uma técnica usada por razões “naturalistas” nos pontos de acupuntura segundo a medicina tradicional chinesa. O sentido que percorreu a evolução da acupuntura não foi totalmente estabelecido mas no momento em que a medicina oriental começou a ser codificada, durante o primeiro século a.C., no livro “O Clássico de Medicina Interna do Imperador Amarelo”, a acupuntura era uma terapia com assinatura da medicina tradicional chinesa [5].

A acupuntura é parte integrante da MTC que encontra as suas origens na filosofia Taoista, um dos grandes pilares da cultura e civilização chinesa, ao lado do Confucionismo e do Budismo. Lao Tsé viveu no século VII a.C. aproximadamente e foi um dos grandes filósofos do taoísmo. Escreveu o livro Tao-Te King - “O Livro

[5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002

do Caminho e da Virtude” aonde descreveu a sua concepção do mundo e do homem, e aonde estuda a interação entre o homem como um todo e a Natureza.

A MTC abrange vários conceitos ligados à saúde e à doença. É um grande campo do conhecimento, de origem e concepção filosóficas. Toda a essência da filosofia da medicina chinesa direcciona-se, principalmente, para o estudo dos factores que causam a doença, para o modo de tratar ao longo dos diferentes estadios do processo de adoecer e essencialmente para o estudo das formas de prevenção da doença. Assim, a MTC salienta todos os fenómenos que poderiam levar a alterações orgânicas ou funcionais do organismo que provocando o desequilíbrio levam ao aparecimento de sinais e sintomas de doença. O factor causal do processo de adoecer é, assim, segundo a MTC, um desequilíbrio de energia de origem externa – causado pelo meio ambiente, ou de origem interna – pelas emoções retidas [6]. Assim, a MTC olha o ser humano como um todo na dimensão bio-psico-fisiológica, ou seja ele não é somente entendido como doença, como um órgão apenas, mas pelo contrário, entende o homem como um todo, um ser que procura sempre o equilíbrio em que o corpo e a mente caminham juntos em harmonia, para manter a saúde e a integridade do Ser Humano. Segundo os fundamentos teóricos da MTC, “não há doenças mas pessoas doentes”, salientando a visão holística da MTC, voltando-se o olhar para o indivíduo como um todo [7], [8].

No contexto da MTC desenvolveu-se a acupunctura que é uma técnica terapêutica, que se baseia num conjunto de saberes e procedimentos culturalmente instituídos e dos quais não se pode dissociar, com o objectivo de tratar a doença através da aplicação de agulhas. Na prática a acupunctura consiste na introdução de pequenas agulhas através da pele, em locais específicos denominados de pontos de acupunctura, primeiramente denominados de “buracos”. Além da punctura com agulhas, a acupunctura inclui

[6] Yamamura Y. *Acupuntura Tradicional: A arte de inserir*. Roca Medicina, São Paulo, Brasil, 1ª edition, 1993

[7] H. W. Yuan, L. X. Ma, D. D. Qi, P. Zhang, C. H. Li, and J. Zhu. The historical development of concept from classics of traditional chinese medicine to modern research: Exploitation of the connotation of in chinese medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:639302, 2013

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

outros procedimentos que envolvem a estimulação dos pontos cutâneos através da utilização de várias técnicas, como a moxa. O termo chinês é *Zhenjiu*, *zhen* de agulha (terapia) e *Jiu* de cauterização/moxa [8], [9]. A evolução da humanidade e o conhecimento científico levaram ao aperfeiçoamento da técnica de acupunctura que apesar de antiga, continua a evoluir. No início as agulhas eram de pedra, hoje são de ligas de prata, de ouro ou de aço inoxidável. Paralelamente, houve também um desenvolvimento no uso da moxa, que da utilização de plantas passou para o infravermelho, ultrassom, corrente eléctrica e raio laser. A par da evolução, a teoria também foi evoluindo do "ponto isolado" para a "teoria dos meridianos" que liga os pontos aos órgãos e com a descoberta de novos pontos. Historicamente, houve também uma expansão geográfica da acupunctura que, da China, se difundiu por todo o Oriente (por exemplo, durante a Dinastia Tang, 400 d.C., ela chegou ao Japão) e, mais recentemente, por todo o mundo. Com a investigação científica actual e à luz dos novos conhecimentos e tecnologia, a acupunctura tem sido a base de novas pesquisas sobre a sua função e mecanismos de ação [2].

### A Acupunctura no Ocidente

A medicina praticada no oriente proveniente da China desde há mais de 4000 anos, chegou ao Ocidente em 1255, com a "Viagem à Terra dos Mongóis", de William de Rubruk.

A partir do século XVI, começaram a surgir na Europa as primeiras publicações de padres jesuítas, que viviam longos períodos no Oriente e puderam, assim, conhecer mais detalhadamente a MTC. O primeiro relato escrito, segundo alguns autores, foi feito pelo jesuíta Franciscus Xavier durante as actividades da Companhia das Índias Ocidentais e quando chegou do Japão em 1549 [10].

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[9] Silvério Cabrita AM. Buracos de acupunctura: da estrutura à função. *Revista Portuguesa de Terapêutica Integrada*, 2014

[2] Wen TS. *Acupunctura Clássica Chinesa*. Editora Cultrix, São Paulo, Brasil, 1985

[10] Bechara GH Scognamillo-Szabó MV. Acupunctura: histórico, bases teóricas e sua aplicação em medicina veterinária. *Ciência Rural*, 40(2):491–500, 2010

No século XVII começaram os relatos médicos, feitos por médicos e jesuítas ocidentais que viveram na Ásia, entre eles o holandês Willen Ten Rhijne (1683), o dinamarquês Jakob de Bondt (1642), o alemão Engelbert Kaempfer (1712), e Hermann Buschoff, um padre holandês, em Batávia, que publicou o primeiro livro relacionado com acupunctura e a cura da artrite, o primeiro tratado desenvolvido por um homem ocidental.

Iniciou-se, assim, um período de enorme interesse pela acupunctura na Europa, mas que rapidamente decaiu, tendo permanecido, apenas, alguns entusiastas como Dabry de Thiersant, cônsul francês, que em 1863, publicou *A Medicina dos Chineses*, um livro que trouxe pela primeira vez ao Ocidente uma descrição dos pulsos patológicos [11].

O médico canadiano William Ostler, considerado “Pai da Medicina Moderna” incluiu pela primeira vez num livro de medicina o tratamento com a acupunctura para a lombalgia e dor ciática no livro “*The Principles and Practice of Medicine*”, em 1892 [12].

A partir do século XIX, factores políticos e socio-económicos e a crescente influencia da medicina ocidental na China levaram ao declínio da MTC, que já se encontrava em decadência desde que a última dinastia chinesa (Qing. 1644-1911) tinha caído levando ao fim de um sistema de governo que perdurava há mais de 2000 anos. Em 1929 tentou-se abolir na China a medicina tradicional a favor da medicina ocidental.

Talvez pela presença dos franceses na China, apenas em França ainda havia algum interesse centrado na acupunctura. Em 1917, George Soulié de Morant, o grande difusor do ensino e da prática da acupunctura pelo mundo ocidental regressava à França depois de ter vivido 20 anos na China ao serviço do Ministério de assuntos estrangeiros do seu país, e estimulou que a acupunctura começasse a ser aplicada nas clínicas e hospitais na década de 1920 a 1930. Em 1939 Georges Soulié de Morant com a publica-

[11] Orley Dulcetti Junior. *Pequeno Tratado de Acupuntura Tradicional Chinesa*. Oficinas Gráficas da Organização Andrei Editora Lda, São paulo, Brasil, 2001

[12] A. White and E. Ernst. A brief history of acupuncture. *Rheumatology (Oxford)*, 43(5):662–3, 2004

ção do livro "L'Acupuncture Chinoise"impulsiona a divulgação da acupunctura em França [2], [8], [12].

As bases da prática da acupunctura moderna são instituídas na Europa através de Soulié de Morant que propõe as correlações entre a medicina tradicional chinesa e a medicina ocidental e introduz alguns termos como “energia” e “meridianos”, que permanecem em uso até hoje em algumas escolas ocidentais de acupunctura. As primeira investigações científicas na área da acupunctura foram, também, relaizadas por Soulié em co-autoria com o Dr. Niboyet sobre a electricidade da pele nos pontos de acupunctura [11]. Após a segunda guerra mundial, há um renascimento da acupunctura na China e no resto do Mundo. A República Popular da China foi fundada em 1949, com Mao Tse-tung no poder, e o governo resgatou a medicina tradicional direccionando-a para uma medicina cada vez mais científica a fim de dar resposta à necessidade de cuidados de saúde de toda a população. A partir de 1950, surgem as escolas de medicina tradicional com as disciplinas básicas das ciências biomédicas, farmacoterapia tradicional e acupunctura.

A MTC tornou-se mais popular nos Estados Unidos a partir de 1971, com o artigo escrito no *New York Times* pelo jornalista James Reston, que foi submetido a uma apendicectomia de urgência enquanto acompanhava o presidente norte-americano Richard Nixon numa visita à China e que relatava o efeito da acupunctura no tratamento da dor pós-cirúrgica [8].

A partir de 1972, aumentou a investigação científica no ocidente sobre a acupunctura pela melhoria das relações internacionais, tendo a investigação sofrido um grande impulso após a descrição das endorfinas, encontrando-se uma das razões que justificava o efeito analgésico desta técnica. Em Pequim, em 1979 realizou-se o primeiro Seminário Internacional sobre Acupunctura, Moxabustão e Anestesia organizado pela OMS (Organização Mun-

[2] Wen TS. *Acupunctura Clássica Chinesa*. Editora Cultrix, São Paulo, Brasil, 1985

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[12] A. White and E. Ernst. A brief history of acupuncture. *Rheumatology (Oxford)*, 43(5):662–3, 2004

[11] Orley Dulcetti Junior. *Pequeno Tratado de Acupunctura Tradicional Chinesa*. Oficinas Gráficas da Organização Andrei Editora Lda, São paulo, Brasil, 2001

dial da Saúde) incluindo representantes de 12 países onde foi elaborado uma lista de doenças reconhecidas como tratáveis pela acupunctura.

### **Evolução científica da acupunctura**

Tratar uma dor de cabeça colocando pequenas agulhas nas mãos ou tratar a asma colocando agulhas nos pés desafia a compreensão biomédica moderna.

Há mais de quarenta anos atrás, a maioria dos médicos considerava a acupunctura semelhante a um vudu chinês. Apesar de ser uma teoria “estranha”, num período muito curto, a acupunctura avançou de uma curiosidade cultural para uma terapia alternativa [5].

O cepticismo sobre a sua eficácia continua a existir em países onde a medicina ocidental é a base dos cuidados de saúde, especialmente naqueles em que a acupunctura ainda não foi amplamente praticada. As pessoas questionam se a acupunctura tem um verdadeiro efeito terapêutico, ou se actua apenas através do efeito placebo, o poder da sugestão, ou com a esperança dos doentes em conseguirem um tratamento. Há, portanto, uma necessidade de estudos científicos que avaliem a eficácia da acupunctura em condições clínicas controladas [13].

Os cuidados de saúde mais antigos na China envolviam rituais de prática xamã para deter os espíritos e demónios. Ao mesmo tempo, alguns séculos antes de Cristo, quando os sistemas filosóficos como o confucionismo e o taoísmo começavam a substituir os pensamentos sobrenaturais chineses, a acupunctura e outras práticas associadas começaram a destruir as abordagens mágicas e religiosas de cura. As filosofias emergentes da China requeriam um novo sistema de saúde, livre do pensamento sobrenatural, compatível com “naturalistas”, e com os pressupostos centrados

[5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002

[13] V. S. Sierpina and M. A. Frenkel. Acupuncture: a clinical review. *South Med J*, 98(3):330–7, 2005

no homem. A origem precisa das técnicas de acupunctura é difícil definir, tal como já anteriormente descrito [5], [14].

Ao longo destes mais de 3000 anos de conhecimento, muita experiência foi acumulada à prática da acupunctura de acordo com a grande quantidade de doenças e sintomas que efectivamente podiam ser tratados através deste método. À parte de muitos outros métodos de tratamento que tendiam a ser específicos de determinadas culturas, a acupunctura tem sido utilizada em todo mundo, particularmente desde 1970. Em reconhecimento ao interesse crescente na acupunctura, em todo o mundo, a WHO realizou em Junho de 1979 um simpósio sobre acupunctura em Beijing, China. Reuniram-se diferentes praticantes de acupunctura de todo o Mundo para identificar as condições de saúde que poderiam beneficiar com a prática de acupunctura. Foram identificadas quarenta e três patologias. No entanto, estas indicações não estavam baseadas em ensaios clínicos formais conduzidos de forma científica rigorosa, e sendo assim a sua credibilidade foi questionada [15].

A acupunctura tradicional, ou clássica, como método terapêutico, está vinculada aos fundamentos teóricos, meios semiológicos, propedêuticos e diagnósticos que englobam o tratamento segundo a MTC. O seu descrédito tem vindo a ser ultrapassado, devido aos resultados terapêuticos cada vez mais conhecidos, e progressivamente com a divulgação dos avanços científicos. Há uma crescente evidência, quer pelo aumento dos ensaios clínicos, que demonstram que o efeito da acupunctura não é apenas placebo, quer pelo facto do misticismo associado ao exotismo da civilização chinesa ter vindo a diluir-se com o tempo. Aumenta assim o interesse, e o reconhecimento desta prática quer pelos pacientes, como entre os médicos e outros profissionais de saúde [8].

Para a acupunctura, como para qualquer outra terapêutica, tem de existir evidência clínica da sua segurança e eficácia. A questão

[5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002

[14] B. Kavoussi and B. E. Ross. The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. *Integr Cancer Ther*, 6(3):251–7, 2007

[15] Zhan X. Acupuncture: Review and analysis of reports on controlled clinical trials. *World Health Organization*, pages 1–87, 2002

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

da segurança foi abordada pela FDA (Food and Drug Administration) e, salvo algumas pequenas reservas a acupunctura é considerada segura quando praticada por profissionais experientes. Sendo esta uma das principais razões pela qual é uma técnica tão popular no tratamento da dor crónica e utilizada amplamente em todo o mundo. Ainda que os seus efeitos não sejam tão potentes como os efeitos do tratamento convencional, é muitas vezes reconsiderada tendo em conta os quase nulos efeitos secundários e sem risco de toxicidade quando comparada com determinados fármacos [16], [17].

[16] D. J. Mayer. Acupuncture: an evidence-based review of the clinical literature. *Annu Rev Med*, 51:49–63, 2000

[17] K. Lewis and S. Abdi. Acupuncture for lower back pain: a review. *Clin J Pain*, 26(1):60–9, 2010

A questão da eficácia é muito mais complicada. Muitas vezes as questões de eficácia são variáveis consoante a interpretação. Para alguns autores ainda que a acupunctura não seja mais eficaz que o placebo, é valorizável. Para a FDA, a comparação com o placebo é menos importante do que a comparação com outro tratamento com eficácia já reconhecida. Para o cientista que pretende avaliar os mecanismos envolvidos na ação da acupunctura, pode ser importante demonstrar não só que a acupunctura é mais eficaz do que o tratamento placebo, mas também que o tratamento com acupunctura nos pontos correctos é mais eficaz que acupunctura *sham* (em pontos ao acaso). Para o clínico que tenta tratar condições médicas específicas, o procedimento mais eficaz pode ser definido em termos de localização, de parâmetros de estimulação, e outras variáveis dinâmicas (diagnóstico do pulso, avaliação da língua) envolvidas na MTC [16]. Segundo Mayer (2000) existe uma ampla quantidade de literatura sobre acupunctura contendo ensaios clínicos delineados das formas mais variadas o que os torna muitas vezes difíceis de comparar e analisar utilizando métodos estatísticos, tais como as meta-análises. No entanto, é possível classificar os projectos experimentais num número limitado de categorias e avaliar os seus pontos fracos e forte, bem como caracterizar com mais precisão quais as hipóteses suportadas pela

evidência científica [16].

Nas últimas décadas diversos estudos têm surgido em acupunctura e grandes esforços têm sido direccionados para efectuar estudos clínicos controlados que incluam o uso da acupunctura *sham* ou controlo dos efeitos placebo da acupunctura. No entanto estes estudos ainda são em número muito limitado devido a dificuldade em levar a cabo estes ensaios. Por outro lado foram feitas investigações experimentais no sentido de tentar perceber como funciona a acupunctura e da mesma forma tentar dar algum suporte de evidência e efectividade [15].

Ao contrário da avaliação de um novo medicamento os ensaios clínicos controlados de acupunctura são extremamente difíceis de realizar, especialmente se tem de ser um estudo cego e se tem de ser comparado com um grupo placebo. Vários procedimentos *sham* e placebo foram desenhados, mas não são fáceis de realizar em países como a China, onde a acupunctura é amplamente utilizada, uma vez que a maioria dos doentes sabem muita coisa sobre acupunctura, incluindo a sensação que se tem após a inserção ou durante a manipulação da agulha. Além disso, estes procedimentos são considerados anti-éticos, uma vez que para eles a acupunctura é eficaz. A maioria dos ensaios clínicos controlados por placebo foi realizada em países onde há cepticismo sobre esta prática bem como um interesse na sua investigação [15]. A forma mais correcta de avaliar o efeito terapêutico da acupunctura é compará-lo com o efeito da terapia convencional por meio de ensaios clínicos randomizados ou estudos de grupo, desde que as condições de doença antes do tratamento sejam comparáveis entre os grupos, com estudos sobre os resultados desenvolvidos para todos os pacientes. Devido à dificuldade de descartar o efeito placebo, um estudo comparativo com um grupo controle sem nenhum tratamento pode não ser convincente na avaliação da prática da acupunctura. Estudos retrospectivos, em que o efeito da

[16] D. J. Mayer. Acupuncture: an evidence-based review of the clinical literature. *Annu Rev Med*, 51:49–63, 2000

[15] Zhan X. Acupuncture: Review and analysis of reports on controlled clinical trials. *World Health Organization*, pages 1–87, 2002

[5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[17] K. Lewis and S. Abdi. Acupuncture for lower back pain: a review. *Clin J Pain*, 26(1):60–9, 2010

[16] D. J. Mayer. Acupuncture: an evidence-based review of the clinical literature. *Annu Rev Med*, 51:49–63, 2000

[15] Zhan X. Acupuncture: Review and analysis of reports on controlled clinical trials. *World Health Organization*, pages 1–87, 2002

acupunctura é comparado com os tratamentos anteriores, podem ser pouco importantes se não estiverem bem estruturados. Estudos não comparativos são também de pouca importância, especialmente quando a acupunctura é utilizada para o tratamento de uma doença autolimitada [5],[8],[16],[17].

Outra dificuldade na avaliação da prática da acupunctura é o facto do efeito terapêutico depender muito da competência técnica, ou seja, da selecção e localização dos pontos de acupunctura e da manipulação das agulhas. Isto pode explicar, em parte, as disparidades ou incoerências nos resultados apresentados por diferentes autores, mesmo quando os estudos foram realizados em bases metodológicas correctas.

Avaliar a prática da acupunctura e chegar a conclusões totalmente aceites não é tarefa fácil. Enquanto a eficácia é, sem dúvida, da maior importância, outros factores, incluindo a segurança, custo, disponibilidade e as condições dos serviços de saúde locais também devem ser considerados. Dada a mesma eficácia, esses outros factores podem levar a diferentes avaliações da acupunctura em diferentes países e áreas. No entanto, conclusões são necessárias para que se aplique o seu uso em todo o mundo, especialmente para os países e áreas onde o desenvolvimento da prática da acupunctura traria um grande benefício [15].

Em 1991 ficou determinado pela WHO que nos países em que a acupunctura fizesse parte da cultura do país, poderia ser usada sem problema se de uma forma integrada e de aproximação entre a medicina moderna e a tradicional. No entanto, nos países onde a medicina ocidental é a base do sistema de saúde, a acupunctura requer a existência de evidência objectiva da eficácia baseada em estudos clínicos controlados.

Em 1996, foi revisto na WHO Consultation on Acupuncture realizada em Itália, um projecto de relatório sobre a prática clínica de acupunctura. Surgiu assim a publicação *Acupuncture: review*

*and and analysis of reports on controlled clinical*, com o objectivo de fornecer uma revisão e análise dos ensaios clínicos controlados e assim adequar o uso apropriado da acupunctura integrada nos sistemas de saúde em todo o mundo.

Esta publicação reviu ensaios clínicos controlados. Alguns desses estudos têm fornecido evidências científicas incontestáveis de que a acupunctura é mais eficaz do que o placebo em determinadas patologias. Por exemplo, a dor crónica tem uma melhoria através da acupunctura de 55-85%, e comparada com o tratamento com fármacos como a morfina a melhoria é de 70%, e supera o efeito placebo que é de 30-35%. Além disso, os mecanismos de analgesia através da acupunctura têm sido extensivamente estudados desde o final de 1970, revelando o papel dos factores neuronais e humorais [8],[15],[16].

A revisão realizada por Mayer baseia-se em dois eventos importantes que levaram a um renascimento da publicidade, do interesse, e da controvérsia sobre os usos médicos da acupunctura.

O primeiro foi uma reunião em 1994 intitulada "Workshop on Acupuncture", patrocinada pelo United States National Institutes of Health (NIH) Office of Alternative Medicine and the United States Food and Drug Administration (FDA). Este encontro serviu como base para em 1996 a FDA reclassificar o uso das agulhas de acupunctura de dispositivos médicos da Classe III (experimental) para dispositivos médicos da Classe II (não experimentais mas regulamentados). O segundo evento, o National Institutes of Health (NIH) convocou um Consensus Development Panel (NIHCDP) para rever e avaliar a eficácia clínica da acupunctura. O NIHCDP publicou em Novembro de 1997 o relatório.

O NIHCDP analisou a evidência disponível dos estudos, muitos dos estudos eram pobres, de má qualidade uma vez que a maior parte das investigações era feitas por entusiastas da acupunctura mais do que por acupunctores treinados, tendo chegado a seguinte

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[15] Zhan X. Acupuncture: Review and analysis of reports on controlled clinical trials. *World Health Organization*, pages 1–87, 2002

[16] D. J. Mayer. Acupuncture: an evidence-based review of the clinical literature. *Annu Rev Med*, 51:49–63, 2000

[5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002

[8] Ferreira AA. *A Acupuntura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[14] B. Kavoussi and B. E. Ross. The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. *Integr Cancer Ther*, 6(3):251–7, 2007

[15] Zhan X. Acupuncture: Review and analysis of reports on controlled clinical trials. *World Health Organization*, pages 1–87, 2002

[16] D. J. Mayer. Acupuncture: an evidence-based review of the clinical literature. *Annu Rev Med*, 51:49–63, 2000

[16] D. J. Mayer. Acupuncture: an evidence-based review of the clinical literature. *Annu Rev Med*, 51:49–63, 2000

[5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002

conclusão: “concluíram-se resultados promissores: há evidência de que a acupuntura é eficaz: no pós-operatório em adultos, nas náuseas e vômitos provocados pela quimioterapia, as náuseas da gravidez e na dor de dentes. Há outras situações como dependências, reabilitação pós-AVC, dor de cabeça, irregularidades menstruais, cotovelo de tenista, fibromialgia, dor miofascial, osteoartrite, dor lombar, síndrome do túnel cárpico, asma, em que a acupuntura pode ser útil como adjuvante no tratamento ou é uma alternativa aceitável”. Grande parte destas pesquisas concentraram-se na dor. Há estudos razoáveis (embora às vezes apenas estudos individuais) que mostram o alívio da dor com acupuntura em diversas condições. No entanto, há estudos em que a qualidade da investigação não é suficientemente boa para que se encontre eficácia no tratamento da dor com a acupuntura. [5], [8], [14, 15, 16].

Embora as conclusões destes dois eventos tenha sido controversa, elas constituem as avaliações mais recentes e completas da literatura sobre a eficácia clínica da acupuntura.

A revisão feita por Mayer analisou as catorze condições médicas para as quais o NIHCDP conclui que a acupuntura era eficaz ou podia ser útil. Estas conclusões vão em parte de encontro à opinião do autor concluindo-se assim que a acupuntura é efectivamente eficaz em duas condições: no tratamento das náuseas e vômitos induzidas por quimioterapia e no pós-operatório. Em doze das condições considerou ser possivelmente útil como tratamento adjuvante ou ser uma alternativa aceitável ou poder ser incluído num programa de gestão abrangente. Considera-se assim que pode ser útil em quatro das doze condições: dores de cabeça, dor lombar, dependência alcoólica e paralisia pós-AVC.

Com os dados disponíveis sobre o tratamento destas doze condições, as evidências suportam uma hipótese fraca da acupuntura ser eficaz, mas conclusões definitivas devem ser tiradas com muito cuidado [16].

Há pouca evidência de que a acupuntura é eficaz no tratamento destas condições, mas a ausência de evidência não é a evidência da sua ausência. Por isso são necessários mais estudos, duplamente cegos, controlados com acupuntura *sham* e usando os tratamentos adequados. Devem ser bem claros os pontos fortes e fracos da acupuntura que estão a ser testados e as amostras devem ser suficientes para que se tirem conclusões positivas ou negativas. Sem estas provas, é improvável que a medicina ocidental aceite com entusiasmo esta modalidade de tratamento. Muitos são os artigos de revisão, com estudos mais recentes que têm surgido com os vários ensaios clínicos no sentido de demonstrar a eficácia da acupuntura.

Segundo Kaptchuk *et al.*, desde o início dos anos de 1970, quando a acupuntura começou a suscitar mais interesse na comunidade científica quase 500 ensaios clínicos randomizados avaliaram a sua eficácia. Mais de metade eram ensaios controlados com placebo e os restantes comparavam pragmaticamente a acupuntura ou a acupuntura mais a medicina ocidental comparada apenas com a medicina ocidental. O crescimento das revisões sistemáticas e das meta-análises que usavam critérios de inclusão rigorosos começaram a sintetizar esta pesquisa. Estas revisões relatam frequentemente que os estudos sobre a eficácia da acupuntura são ambíguos ou contraditórios [5].

Também segundo Kaptchuk *et al.*, são exceção quatro estudos controlados randomizados sobre a aplicação da acupuntura nas náuseas e dor de dentes em que os resultados tem sido positivos, e os ensaios clínicos randomizados sobre: dependências e zumbidos, em que os resultados têm sido predominantemente negativo. Outras revisões geralmente usam estudos sobrepostos o que muitas vezes pode levar a interpretações conflituosas [5].

As recomendações da WHO ou da American Academy of Medical Acupuncture (AAMA) são derivadas de painéis de consenso,

[5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002

[5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002

[13] V. S. Sierpina and M. A. Frenkel. Acupuncture: a clinical review. *South Med J*, 98(3):330–7, 2005

[14] A. Aron-Maor and Y. Shoenfeld. Alternative therapies in rheumatic diseases—pros and cons. *Lupus*, 10(7):453–6, 2001

[7] H. W. Yuan, L. X. Ma, D. D. Qi, P. Zhang, C. H. Li, and J. Zhu. The historical development of concept from classics of traditional chinese medicine to modern research: Exploitation of the connotation of in chinese medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:639302, 2013

[19] E. S. Yang, P. W. Li, B. Nilius, and G. Li. Ancient chinese medicine and mechanistic evidence of acupuncture physiology. *Pflugers Arch*, 462(5):645–53, 2011

[20] K. Vanderploeg and X. Yi. Acupuncture in modern society. *J Acupunct Meridian Stud*, 2(1):26–33, 2009

[21] S. K. Kim and H. Bae. Acupuncture and immune modulation. *Auton Neurosci*, 157(1-2):38–41, 2010

bem como dos padrões actuais da prática e das aplicações clínicas comuns, em vez de através de uma análise rigorosa da literatura, baseada em evidências como é da NIH [13].

## Conceitos da Medicina Tradicional Chinesa e Acupuntura versus acupuntura contemporânea

A MTC descreve padrões de doenças que afectam o indivíduo como um todo, descreve alterações dos sistemas e relaciona os diferentes padrões com o ambiente que o rodeia. Muitos destes padrões explicam e integram uma variedade de sinais e sintomas de uma forma correlacional nem sempre conseguida na Medicina Ocidental [18]. De acordo com a filosofia da MTC, a doença é um resultado do desequilíbrio energético do organismo, acreditando-se que a acupuntura é capaz de equilibrar esta energia e, assim, auxiliar o próprio organismo a curar-se. Em termos ocidentais, a acupuntura poderá auxiliar o organismo a curar-se ao provocar certas mudanças fisiológicas, como por exemplo, na estimulação neuronal, aumento da pressão sanguínea, diminuição de espasmos musculares e libertação hormonal, como endorfinas (um dos mecanismos químicos de controlo da dor) e cortisol (esteróide natural). Embora muitos dos efeitos fisiológicos da acupuntura estejam estudados, muitos são ainda mal conhecidos [7], [17], [19],[20],[21].

A MTC envolve procedimentos de diagnóstico e tratamento complexos e interactivos.

Alguns conceitos tradicionais têm de ser entendidos para se conseguir entender as avaliações da acupuntura moderna. Um conceito-chave na MTC é o *Qi*, ou energia vital. O *Qi* flui através do corpo em vias ou canais, chamados de meridianos. Os meridianos pensa-se estarem ligados a vários órgãos do corpo assim como

uns aos outros [14], [22]. Segundo os princípios da MTC, a doença resulta de um desequilíbrio do fluxo de energia dentro destes meridianos. A justificação para o tratamento com a acupunctura é que a punctura em determinados pontos ao longo dos meridianos relacionados com os órgãos em particular, pode restaurar o equilíbrio energético adequado dentro do corpo e assim restaurar a saúde. O tratamento com acupunctura é feito pela punctura manual nos pontos de acupunctura, bem como por outros métodos de estimulação, tal como a estimulação eléctrica (electroacupunctura), calor (moxabustão), pela pressão digital nos pontos (acupressão), ou pela utilização de laser [16].

Muita da controvérsia científica advém da dificuldade em demonstrar o mecanismo de ação da acupunctura e tem sido difícil obter consenso sobre a existência de pontos e meridianos.

Durante muitos anos, foram vários os investigadores que procuraram estudar os mistérios da acupunctura tentando responder a esta questão crucial: se os pontos e canais descritos pela medicina tradicional chinesa eram ou não reais [23].

Segundo a visão absolutamente científica a acupunctura em termos fisiológicos é definida como uma técnica de estimulação eléctrica através de agulhas finas e sólidas que vão estimular nervos periféricos sensitivos e autonómicos que induzem vários mecanismos de autorregulação do nosso organismo através do sistema nervoso, endócrino e imune. É possível obter alguns efeitos locais puncturando qualquer região cutânea.

A inserção de uma agulha na pele, fáschia, músculos e ligamentos, cápsula articular e inserções tendinosas, causa estimulação dos receptores neurológicos periféricos sensitivos nomeadamente as terminações nervosas livres. Estas terminações nervosas são compostas predominantemente por fibras A $\delta$ , na pele e por fibras tipo II-III no músculo, que se interligam, formando uma rede que vai ser responsável pela propagação do estímulo nervoso aos vasos

[22] F. J. Zijlstra, I. van den Berg-de Lange, F. J. Huygen, and J. Klein. Anti-inflammatory actions of acupuncture. *Mediators Inflamm*, 12(2):59–69, 2003

[23] Vernejoul P. Darras JC, Albarède P. Nuclear medicine investigation of transmission of acupuncture information. *Acupuncture in Medicine*, 11(1):22–28, 1993

[24] M. T. Cabyoglu, N. Ergene, and U. Tan. The mechanism of acupuncture and clinical applications. *Int J Neurosci*, 116(2):115–25, 2006

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[9] Silvério Cabrita AM. Buracos de acupunctura: da estrutura à função. *Revista Portuguesa de Terapêutica Integrada*, 2014

[23] Vernejoul P, Darras JC, Albarède P. Nuclear medicine investigation of transmission of acupuncture information. *Acupuncture in Medicine*, 11(1):22–28, 1993

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[25] Helene M Langevin and Jason A Yandow. Relationship of acupuncture points and meridians to connective tissue planes. *The Anatomical Record*, 269(6):257–265, 2002

sanguíneos e células imunitárias locais. Estes receptores periféricos vão propagar o estímulo à rede de neurónios locais e originar o “reflexo axonal”. Este reflexo, que ocorre sem a necessidade de um centro de integração medular, vai induzir um aumento do aporte sanguíneo local, devido à libertação de várias substâncias vasoactivas como a substância P, bradicininas, CGRP (polipeptídeo relacionado com o gene da calcitonina), VIP (péptido intestinal vasoactivo), histamina, serotonina, NGF (Factor de crescimento neural), VGF (factor de crescimento vascular), entre outros [24].

Estas substâncias actuam localmente na pele e músculo promovendo a cicatrização, quer pela vasodilatação, quer por neogénese de vasos sanguíneos, o que justifica o calor e rubor local com a punctura. Associada a estas alterações dermatológicas, pode ainda sentir-se parestesia, prurido ou uma sensação de peso, ou dor tipo “moinha” que é típica da estimulação das fibras tipo II-III do músculo. A nível local há ainda libertação de opióides como a  $\beta$ -endorfina que potenciam a analgesia local, actuando ao nível dos receptores periféricos sensitivos e bloqueando assim, a nocicepção. Estas substâncias são libertadas pelas células inflamatórias locais (granulócitos), demonstrando um tipo de activação do sistema imune pela acupunctura [8].

Para a acupunctura tradicional chinesa para além dos efeitos locais de punctura de qualquer região do corpo existem locais que têm vindo a ser considerados especialmente eficazes, os clássicos “pontos de acupunctura” [9].

Por mais de mil anos na China o trajecto dos meridianos foi traçado pela observação de um fenómeno chamado de “sensação propagada”. Mais recentemente, nas últimas décadas, estudos de resistência eléctrica da pele tem demonstrado existirem variações significativas em pontos localizados que parecem corresponder aos pontos clássicos de acupunctura [23].

Muitos são os investigadores que se têm dedicado a esta ques-

tão e têm sido realizados vários estudos que procuram comprovar a existência dos pontos e meridianos. Parece não se encontrar uma estrutura anatómica que corresponda aos meridianos. No entanto, a morfologia dos pontos parece estar bem definida: são locais de alta condutibilidade eléctrica e baixa impedância [8]. A manipulação destes pontos produz uma reacção de adesão local dos tecidos envolventes à agulha (*needle grasp*) descrita por Yang (1601) como um *tug* na agulha (como se um peixe mordesse a agulha) que parece corresponder a um acoplamento biomecânico agulha-tecido conjuntivo. O efeito *Deqi* (chegada/obtenção do *Qi*) é a percepção deste fenómeno sentido pelo doente [8], [25].

Segundo a MTC, o local onde se situam os pontos é determinante da resposta provocada pela estimulação da agulha, os pontos estão todos interligados numa rede de meridianos que correm longitudinalmente ao longo do corpo, e funcionam como uma rede de canais energéticos comunicantes [25].

Segundo o estudo efectuado por Darras J-C pretendeu-se estudar a migração de uma substância marcada radioactivamente, e que era injectada num ponto de acupunctura. Injectou-se assim o tecnécio  $^{99m}$ , um radioisótopo, num grupo, num ponto qualquer do organismo longe de um ponto de acupunctura e não se verificou migração da substância durante todo o período de observação. No outro grupo injectou-se num ponto de acupunctura. Quando injectado no ponto 07RI (Ponto 7 do meridiano do rim) observou-se na face interna da perna acima do maléolo interno, uma migração regular que se estendeu por 30 cm acima do local de injeção e que correspondia ao trajecto do meridiano do rim. Foram testados outros pontos de acupunctura e em todos os canais traçados pela migração do radioisótopo correspondiam aos meridianos descritos na MTC. Exclui-se ainda que estes canais correspondessem a vasos linfáticos ou estruturas vasculares, uma vez que a velocidade da migração não correspondia a nenhuma destas possibilidades.

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[25] Helene M Langevin and Jason A Yandow. Relationship of acupuncture points and meridians to connective tissue planes. *The Anatomical Record*, 269(6):257–265, 2002

[22] F. J. Zijlstra, I. van den Berg-de Lange, F. J. Huygen, and J. Klein. Anti-inflammatory actions of acupuncture. *Mediators Inflamm*, 12(2):59–69, 2003

[23] Vernejoul P. Darras JC, Albarède P. Nuclear medicine investigation of transmission of acupuncture information. *Acupuncture in Medicine*, 11(1):22–28, 1993

[2] Wen TS. *Acupuntura Clássica Chinesa*. Editora Cultrix, São Paulo, Brasil, 1985

[6] Yamamura Y. *Acupuntura Tradicional: A arte de inserir*. Roca Medicina, São Paulo, Brasil, 1ª edition, 1993

[5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002

[10] Bechara GH Scognamillo-Szabó MV. Acupuntura: histórico, bases teóricas e sua aplicação em medicina veterinária. *Ciência Rural*, 40(2):491–500, 2010

[20] K. Vanderploeg and X. Yi. Acupuncture in modern society. *J Acupunct Meridian Stud*, 2(1):26–33, 2009

[26] Hecker HU. Steveling A. Peucker ET. Kastner J. *Prática de Acupuntura*. Rio de Janeiro, Brasil, 2007

Além disso ainda se concluiu que esta migração era anterógrada e retrógrada o que permite excluir com mais certeza as anteriores hipóteses [23].

Bjorn Nordenstrom, do Instituto Karolinska em Estocolmo, sugeriu que determinados espaços intersticiais nestas estruturas poderiam constituir uma via preferencial para iões e que estas corresponderiam aos meridianos de acupuntura. Concluiu-se ainda neste estudo que a estimulação de um ponto de acupuntura produzia uma estimulação de todo o meridiano e ainda no lado oposto com uma resposta rápida e simultânea com respostas equivalentes na duração e amplitude. Esta resposta simultânea e contra lateral permitem suportar a hipótese de um mecanismo neuroquímico por detrás da transmissão da informação na acupuntura [22], [23].

Apesar dos esforços dos investigadores ainda não se conseguiu a demonstração da sua existência dada a falta de consistência dos estudos, pelo que se torna um entrave ao desenvolvimento da acupuntura. O confronto entre a abordagem tradicional e a abordagem médica contemporânea motivou os estudos científicos, que procuram não só esclarecer quais os mecanismos de ação da acupuntura e qual a melhor abordagem, mas também demonstrar a sua aplicabilidade terapêutica [2], [6].

Em 1960, iniciaram-se as pesquisas de “analgesia pela acupuntura”, quando esta foi utilizada em intervenções cirúrgicas na China. A partir da década de 1970 intensificou-se a investigação sobre os mecanismos de ação. É o conhecimento científico dos mecanismos de ação da acupuntura e o seu papel na analgesia que está na base do modelo médico contemporâneo da acupuntura.

Para além da ação local atrás explicada, a acupuntura ainda tem uma ação segmentar, extra-segmentar e supra-segmentar [5], [10], [20], [26].

A ação segmentar ocorre ao nível da espinhal medula nomea-

damente ao nível dos cornos posteriores. Foi com a Teoria do Gate Control (teoria do portão da dor) de Melzack e Wall, postulada em 1962 e 1965 que permitiu compreender melhor o efeito segmentar da acupunctura porque nos diz como se transmite o impulso nervoso da periferia ao sistema nervoso central (SNC), ao nível dos cornos posteriores da medula (CPM). A fibra nervosa mielinizada e de grande velocidade de condução ( $A\delta$  ou  $A\beta$ ), ao ser estimulada numa área lesada, vai transportar a sua informação mais rapidamente ao SNC que uma fibra não mielinizada e de baixa velocidade de condução que é estimulada pela dor local. Ao chegarem aos CPM, estas fibras mielinizadas vão causar um bloqueio da transmissão do impulso nervoso vindo das fibras mais lentas C. O bloqueio do impulso nociceptivo é feito através da libertação de encefalinas e ácido amino butírico gama (GABA), neurotransmissores inibitórios, libertados pelos interneurónios ao nível dos CPM. Além da punctura, outro tipo de massagem ou electroestimulação tipo estimulação nervosa electro-transcutânea (TENS) também estimulam as fibras de condução rápida e causam bloqueio dos CPM à nocicepção [5], [8], [13], [27].

Para entender esta ação segmentar há ainda que entender o conceito anatómico de segmentos neurológicos segmentares, ou seja que vários tecidos orgânicos do nosso corpo podem ter a mesma inervação ainda que afastados entre si, pois tiveram origem no mesmo segmento embrionário. Assim para actuarmos a nível de uma determinada raiz nervosa colocamos agulhas em estruturas com a mesma inervação do local lesado e assim temos um efeito nos CPM ao nível do segmento medular estimulado. Ou seja: puncturando qualquer tecido orgânico, dermatomo, miótomo ou esclerótomo que tenha a mesma inervação que o tecido orgânico a tratar, a acupunctura vai estimular predominantemente as terminações nervosas livres  $A\delta$  da pele e tipo II-III do músculo, que ao chegarem aos CPM vão inibir a transmissão da dor e originar a

- [5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002
- [8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010
- [13] V. S. Sierpina and M. A. Frenkel. Acupuncture: a clinical review. *South Med J*, 98(3):330–7, 2005
- [27] TF Su, LH Zhang, Miao Peng, CH Wu, Wen Pan, Bo Tian, Jing Shi, Hui-lin Pan, and Man Li. Cannabinoid cb2 receptors contribute to upregulation of b-endorphin in inflamed skin tissues by electroacupuncture. *Molecular pain*, 7:98, 2011
- [8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

analgésia segmentar por depressão das células dos CPM [8].

A ação extra-segmentar situa-se ao nível da medula nos cornos posteriores e partindo da substância peri-aquedutal cinzenta no tronco cerebral, sendo propagado através dos feixes inibitórios descendentes até todos os CPM, deprimindo a actividade das células nervosas aqui localizadas. É um efeito inespecífico ou generalizado, não acontecendo apenas nos segmentos neurológicos estimulados pela agulha, mas em todos os segmentos medulares o que permite uma melhor analgesia geral. A punctura em qualquer parte do corpo desencadeia a acção extra segmentar e potencia o efeito analgésico da acupunctura.

Por fim a ação supra-espinhal ou central, dá-se a nível do córtex cerebral sendo que o impulso é conduzido aos centros de processamento de informação como o córtex somestésico, cerebelo, sistema límbico, córtex pré-frontal, hipotálamo e chega à medula espinal pelos feixes inibitórios descendentes que utilizam a noradrenalina e a serotonina como neurotransmissor para actuarem ao nível das várias células inibitórias nos CPM, que induzem, por sua vez, a libertação de encefalina a nível local inibindo a actividade dos neurónios dos CPM e bloqueando a propagação da dor ao SNC. Cada um destes centros responde ao estímulo da sua maneira.

Muito importante também para a evolução da acupunctura foi na década de 1970, a descoberta do papel dos neurotransmissores como a endorfina e encefalina na produção e modulação da dor. A activação dos sistemas opióides pela acupunctura na dor está bem estabelecida, mas outros sistemas devem participar como a serotonina e a noradrenalina [8].

A acupunctura é uma forma potente de estimulação sensorial. Muitos dos estudos científicos têm se centrado na estimulação sensorial como o principal mecanismo de ação. Como já foi dito os efeitos da acupunctura estão relacionados com a ativação das

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

fibras sensitivas do tipo A e C. Os receptores polimodais também parecem ser mediadores dos efeitos da acupunctura. Tanto a acupunctura como o exercício físico libertam opióides endógenos, o que parece ser essencial para a indução das alterações funcionais dos diferentes sistemas de órgãos. O maior interesse parece estar na  $\beta$ -endorfina, o opióide endógeno que influencia uma variedade de funções hipotalâmicas e autonómicas e é importante na regulação da percepção da dor, resposta ao stress, humor e funções imunológicas.

A identificação da  $\beta$ -endorfina como um mediador do alívio da dor com a acupunctura, representa um marco na investigação sobre a acupunctura, no entanto outros sistemas parecem estar envolvidos na modulação do stress, dor, actividade autonómica e sistema imune. Pesquisas realizadas nos últimos 20 anos tem mostrado que através da acupunctura é possível afectar a síntese, libertação e acção de vários neurotransmissores (catecolaminas, glutamato, acetilcolina, GABA e serotonina) e neuropéptidos (ocitocina, NPY, CCK, VIP, SP entre outros) tanto no sistema nervoso central como periférico [28].

Em resposta a pergunta: Como funciona a acupunctura? O National Center for Complementary and Alternative Medicine (NCCAM) of the National Institute of Health responde: a acupunctura produz os seus efeitos através da regulação do sistema nervoso, ajudando na libertação de neurotransmissores como as endorfinas e células do sistema imune, em locais específicos do corpo. Os estudos têm também demonstrado que acupunctura pode alterar a química do cérebro pela libertação de neurotransmissores e neurohormonas, afectando partes do SNC relacionadas com sensações e funções involuntárias do corpo como reacções imunológicas, regulação da pressão arterial, do fluxo sanguíneo e temperatura do corpo.

Um estudo efectuado por Moffet pretendia demonstrar quais os

[29] H. H. Moffet. How might acupuncture work? a systematic review of physiologic rationales from clinical trials. *BMC Complement Altern Med*, 6:25, 2006

mecanismos fisiológicos que os estudos clínicos proponham para explicar a ação da acupuntura. Concluiu que a maior parte dos ensaios clínicos não explicavam nada sobre os mecanismos, e que nos estudos que explicavam o raciocínio dominante foi sobre a resposta neuro-química, mas que parece ser independente do objetivo e da seleção dos pontos, o que levanta várias questões e merece uma investigação mais profunda. Por isso que é tão importante tentar perceber as bases fisiológicas da acupuntura para tentar produzir resultados reproduzíveis.

A necessidade de confiar nos efeitos da acupuntura e o mais fácil acesso a exames de imagem cerebral permitiu que se comessem a fazer estudos utilizando as diferentes técnicas de neuroimagem.

A investigação das respostas cerebrais à dor por ressonância magnética funcional (RMf), a partir da década de 1990 acabou por influenciar a prática da acupuntura no tratamento da dor. A neuroimagem por RMf e tomografia por emissão de positrões (PET) tem permitido identificar correlações neurais da estimulação periférica por punctura de pontos conhecidos tradicionalmente como eficazes em determinadas patologias [8], [23], [28].

Hui *et al.* (2000) fez um estudo com RMf, no qual puncturou o ponto 04IG, em 13 indivíduos saudáveis, por este ser um dos pontos mais utilizado para analgesia e sedação e fez RMf em todos os doentes. O estudo de imagem demonstra a modulação consistente de várias estruturas bilaterais límbicas e paralímbicas corticais e subcorticais, durante a punctura tanto da mão direita como da mão esquerda. Embora este estudo tenha várias limitações, estes resultados fornecem uma base para os futuros estudos funcionais de imagem cerebral, sobre os efeitos terapêuticos da acupuntura [30].

O sistema límbico integra as vias de comando de resposta ao stress. São conhecidas duas vias de resposta: via de resposta

[8] Ferreira AA. *A Acupuntura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[23] Vernejoul P, Darras JC, Albarède P. Nuclear medicine investigation of transmission of acupuncture information. *Acupuncture in Medicine*, 11(1):22–28, 1993

[28] L. Manni, M. Albanesi, M. Guaragna, S. Barbaro Paparo, and L. Aloe. Neurotrophins and acupuncture. *Auton Neurosci*, 157(1-2):9–17, 2010

lenta, mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e a via de resposta rápida, mediada pelo sistema simpático. A activação do sistema límbico e hipotálamo pela estimulação dos pontos 04IG sustenta a hipótese de que a via aferente da acupunctura recruta estruturas do sistema antinociceptivo descendente. O hipotálamo é muito importante para a homeostase do organismo, este e o sistema límbico participam em interacções pluridimensionais com os sistemas endócrino e autónomo. O efeito calmante da acupunctura também se pensa poderá dever-se à libertação de GABA na amígdala e outras áreas do sistema límbico.

A acupunctura com estudos mais ou menos conclusivos tem vindo a demonstrar a sua eficácia embora ainda muitas questões se levantem.

Também a nível do sistema imunitário se têm realizado vários estudos, sendo a seguir à dor, uma das áreas onde acupunctura mais se destaca.

A modulação autonómica, exercida pela estimulação neural periférica com acupunctura, poderá ser o mecanismo mais importante.

O ponto 36ES tem sido o mais usado nos estudos e tem demonstrado que a acupunctura produz efeitos anti-inflamatórios e tem uma ação reguladora da actividade imunitária [8], [24].

## Acupunctura e o Sistema Imunitário

### O Sistema Imunitário – Breve Introdução

A imunologia foi considerada como uma parte da Microbiologia, durante muito tempo, devido ao facto das primeiras investigações terem sido no domínio da bacteriologia e doenças infecciosas. A conquista do estatuto de ciência autónoma consegue-se, posteriormente, ao longo do tempo, com a introdução dos antígenos e

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010  
[24]M. T. Cabyoglu, N. Ergene, and U. Tan. The mechanism of acupuncture and clinical applications. *Int J Neurosci*, 116(2):115–25, 2006

anticorpos. Os primeiros imunologistas incidiram o seu estudo sobretudo nas interacções químicas entre moléculas solúveis, como os anticorpos e antigénios, presentes no plasma, soro ou fluídos corporais ou, como classicamente, nos humores – designação que deu nome à Imunidade Humoral. No corpo humano é sobretudo nos órgãos linfóides que são desencadeadas as respostas imunológicas, originando o que é conhecido como um sistema capaz de proteger o organismo contra invasões exteriores ou contra células internas alteradas, bem como de manter um equilíbrio homeostático no organismo [31].

[31] Pacheco FC Arosa FA, Cardoso EM. Fundamentos de imunologia. LIDEL, Lisboa, 2007

Assim, sabe-se que as respostas imunológicas são mediadas por linfócitos e células da linha mielóide. Dentro destas últimas existem as células polimorfonucleares (granulócitos e mononucleares, que são os monócitos e as células dendríticas e macrófagos, derivados ambos de monócitos). Os linfócitos também são mononucleares (Figura 2).

Os linfócitos ocupam o papel crucial no sistema conferindo especificidade às respostas imunológicas. Os Linfócitos B (nome derivado inicialmente da sua origem nas aves ser na Bursa de Fabricius, mas actualmente referidos à sua origem e maturação na medula óssea – “Bone marrow”) possuem na membrana plasmática um receptor que é expresso apenas nestas células, receptor de célula B ou BCR (B-Cell-Receptor), com estrutura de uma imunoglobulina e capaz de se ligar e reconhecer antigénios. Os antigénios activam estes linfócitos e conduzem à sua diferenciação em plasmócitos que, por sua vez, produzem anticorpos que se ligam a antigénios sinalizando-os para destruição por parte do sistema imunológico constituindo, portanto, a imunidade humoral. Os linfócitos T, por sua vez assim designados devido à sua maturação ocorrer no timo, são células que participam na imunidade celular, uma vez que os seus agentes efectores são, neste caso, células como: linfócitos T auxiliares ou Th (*T helper*), que ajudam os linfócitos B

na produção de anticorpos, sendo identificados pela presença do marcador CD4; os linfócitos T citotóxicos ou Tc (*T cytotoxic*) que destroem directamente células infectadas por vírus ou células neoplásicas, sendo identificados pela presença do marcador CD8; os linfócitos T reguladores/supressores (Treg/Ts) que são capazes de suprimir respostas imunológicas específicas, sendo identificados pela presença dos marcadores CD4+ CD25+ e Foxp3, sendo este último o Foxp3 um factor de transcrição presente exclusivamente nestas células [32].

Ainda as células Natural Killer (NK), designação devida à capacidade de reconhecer e destruir de forma não específica, produção de quimiocinas e citocinas, efeitos microbicidas e/ou activação de outras células do sistema imunológico, não possuem nem o receptor de células B nem o de células T à superfície celular, mas apresentam vários receptores inibitórios e de activação à superfície [31], [33], [34].

Assim, a reacção do sistema imunológico depende da relação entre a resposta imunológica inata e adquirida. A resposta inata depende sobretudo das células fagocíticas e linfocitárias e factores humorais. A resposta adaptativa é originada quando a reacção é específica inflamatória e há acção de anticorpos específicos (resposta humoral) ou a activação de células efectoras que reconhecem antígenos estranhos ao organismo (resposta celular) [35], [36].

De cada uma das células referidas destacam-se algumas características que poderão ser importantes na compreensão deste trabalho, como sejam: os linfócitos T naïve transformam-se em linfócitos T de memória e/ou efectores através de um processo de diferenciação que envolve alterações de expressão dos receptores de superfície. Os linfócitos T ou Th são CD4+ e os linfócitos T citotóxicos ou Tc são CD8+. Os linfócitos T CD4+ diferenciam-se em Th1 ou Th2, dependendo do padrão de citocinas segregado.

[31] Pacheco FC Arosa FA, Cardoso EM. Fundamentos de imunologia. LIDEL, Lisboa, 2007

[32] J. Pereira de Moura, M. Santos Rosa, V. Alves, A. Mota Pinto, V. Rodrigues, J. M. Silva, and J. J. Alves de Moura. [cd4+, cd8+ and cd19+ cells in individuals with dyslipidemia]. *Acta Med Port*, 26(6):676–82, 2013

[33] Ribatti D Crivellato E, Vacca A. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends in Immunology*, 25:210–7, 2004

[34] O'Farrel C Doherty DG. Innate and adaptative lymphoid cells in the human liver. *Immunological Reviews*, 174:5–20, 2000

[35] Chen W Wahl SH, Vazquez N. Regulatory t cells and transcription factors: gatekeepers in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 16:768–774, 2004

[36] Abbas AK Bluestone JA. Natural versus adaptive regulatory t cells. *Nature Reviews in Immunology*, 3:253–257, 2003

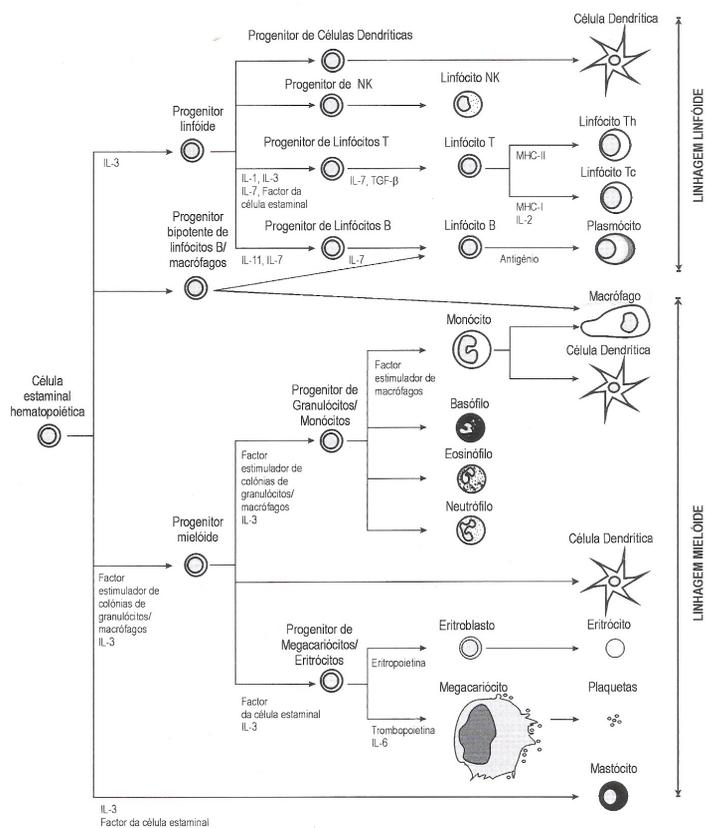


Figura 2: Esquema da árvore genealógica das células sanguíneas. Resumo dos modelos descritos de hematopoiese e as vias de diferenciação das diferentes células sanguíneas. IL - interleucina; MHC - I - complexo major de histocompatibilidade da classe I; MCH - II - complexo major de histocompatibilidade da classe II; NK - Natural Killer; Tc - T citotóxico; TGFβ - transforming growth factor beta; Th - T auxiliar (Retirado e adaptado de Fundamentos de Imunologia).

Os linfócitos Th1 estão envolvidos na regulação de respostas celulares através da IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$  e são responsáveis por promover respostas imunológicas contra bactérias e vírus, mediadas por outros linfócitos, tais como os T CD8+ e NK. Os linfócitos Th2 estão envolvidos na regulação de respostas humorais através da secreção de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-3 e promovem a promoção de anticorpos pelos linfócitos B, assim como respostas mediadas por eosinófilos e mastócitos. O desequilíbrio entre Th1/Th2 pode ser a maior causa de infecções, alergias e doenças autoimunes. Os linfócitos T CD8+ passam por uma fase inicial de actividade efectora citotóxica, seguida de uma fase de contracção e uma fase final de formação de linfócitos de memória. A formação de linfócitos T CD8+ citotóxicos é dependente da ajuda fornecida pelos T CD4+ e da sua interacção com células dendríticas através da expressão nestas do receptor CD40 e ligação ao seu ligando expresso pelas T CD4+. Os linfócitos T CD8 supressores, por sua vez, são originários a partir dos linfócitos T CD8+ na presença de células apresentadoras de antígenos. Os linfócitos T CD4- e CD8- são conhecidos como os DN (double negative cells), enquanto que os linfócitos T CD4+ e CD8+ são conhecidos como os DP (double positive cells) [36],[37],[38],[39].

Os linfócitos NK são semelhantes aos linfócitos T citotóxicos, principalmente por terem origem nos mesmos progenitores linfóides ou possuírem alguns receptores em comum. No entanto, os linfócitos NK expressam à superfície um grande número de receptores com funções quer activadoras quer inibidoras, sendo estes conhecidos como os receptores NK. Estes linfócitos são muito importantes no sistema imunológico uma vez que alguns destes linfócitos têm capacidade para secretar grandes quantidades de citocinas. O marcador CD16 é um receptor dos linfócitos NK que foi primeiramente identificado, bem como o marcador CD56, sendo este o único marcador exclusivo das células NK. É importante re-

[36] Abbas AK Bluestone JA. Natural versus adaptive regulatory t cells. *Nature Reviews in Immunology*, 3:253–257, 2003

[37] Mota I Silva WD. *Bier imunologia básica e aplicada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003*

[38] Campos HS. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide. *Revista Brasileira de Pneumologia Sanitaria.*, 15(1):47–60, 2007

[39] M. Brown and C. Wittwer. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*, 46(8 Pt 2):1221–9, 2000

[21] S. K. Kim and H. Bae. Acupuncture and immune modulation. *Auton Neurosci*, 157(1-2):38–41, 2010

[31] Pacheco FC Arosa FA, Cardoso EM. Fundamentos de imunologia. *LIDEL, Lisboa*, 2007

[36] Abbas AK Bluestone JA. Natural versus adaptive regulatory t cells. *Nature Reviews in Immunology*, 3:253–257, 2003

[37] Mota I Silva WD. Bier imunologia básica e aplicada. *Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 2003

[40] Takashi Takahashi. Hiroyuki Sumino. Tsugiyasu Kanda. Nubuo Yamaguchi. Acupuncture modifies immune cells. *J Exp Clin Med*, 1(1):5, 2009

[35] Chen W Wahl SH, Vazquez N. Regulatory t cells and transcription factors: gatekeepers in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 16:768–774, 2004

[41] F. Ye, D. Liu, S. Wang, and L. Xu. Effects of electro-acupuncture on t cell subpopulations, nk activity, humoral immunity and leukocyte count in patients undergoing chemotherapy. *J Tradit Chin Med*, 27(1):19–21, 2007

ferir que existem linfócitos T com CD56 e, por isso, distinguem-se as células NK das células T pela presença de CD56 e ausência das células CD3+ (CD56+ CD3+) [31], [36], [37], [40].

Por último, os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral (anticorpos) conferindo protecção imediata e de longo prazo a alguns agentes infecciosos [21].

O receptor BCR do linfócito B é constituído por uma imunoglobulina membranar associada a um heterodímero responsável pela transdução de sinal. A expressão do complexo BCR está relacionada com o desenvolvimento linfocitário B e é necessário para a sobrevivência dos linfócitos B maduros na periferia. Após a activação dos linfócitos B pelos BCR há uma diferenciação dos mesmos em plasmócitos que passam a produzir os anticorpos. Os linfócitos B contêm como receptores activadores o CD40 e o CD19. O primeiro é conhecido por desempenhar um papel fundamental na activação dos linfócitos B pertencente à família do receptor do factor de necrose tumoral (TNFR). O CD19 é uma glicoproteína expressa nos linfócitos B desde os estadios mais iniciais permanecendo ao longo da maturação. Os linfócitos B têm como principal função a produção de plasmócitos que, por sua vez, darão origem a anticorpos e a células B memória[21], [31], [35], [41].

### O Sistema Imunitário – Aplicação da Acupuntura

A acupuntura tem sido usada como terapêutica de diversas doenças, incluindo a dor, a asma e até a depressão [42].

Embora a acupuntura pareça beneficiar a modulação do sistema imunitário existem, ainda, várias lacunas de conhecimento, tais como quais as melhores técnicas de tratamento, quais seriam os melhores marcadores bioquímicos, os quais são os melhores pontos de acupuntura. Existem informações sobre a investigação nesta área mas encontra-se muito dispersa o que provoca dificul-

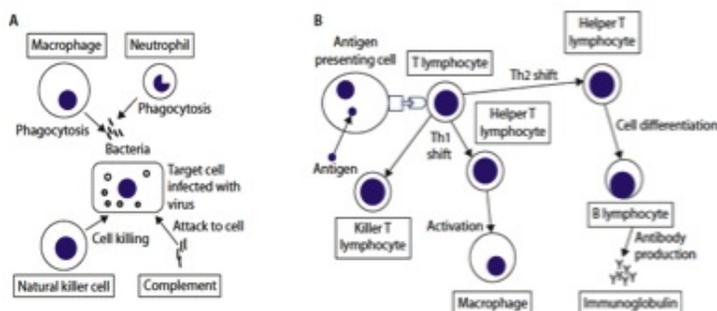


Figura 3: Ilustração esquemática das funções das células imunes do sistema imunológico humano: (A) a imunidade inata; (B) a imunidade adquirida (Retirado e adaptado de Takahashi T et al., 2009).

dade nas conclusões e, assim, na aplicabilidade à clínica. É especulado que a acupuntura estimule alguns nervos sensoriais ou o sistema nervoso autónomo induzindo a recuperação da circulação sanguínea [43].

O sistema imunitário é projectado para não só lutar contra agentes patogénicos, mas também para responder a citocinas e células imunocompetentes causando uma reacção corporal sistémica. Tem sido relatado que a sua função está intimamente relacionada com o cérebro e o sistema endócrino. Recentemente, foi demonstrado o efeito da acupuntura em subpopulações de leucócitos e linfócitos em sangue periférico humano. A acupuntura está associada a diversas alterações imunológicas, pelo que apresenta um papel imuno-modulador importante no sistema imunitário (Figura 3), como a actividade das células do sistema imune como os macrófagos, neutrófilos, células natural killer e linfócitos [40], [44].

A função do sistema imunitário está, ainda, intimamente relacionada com o sistema imunitário neuro-endócrino [44]. O mecanismo subjacente da imuno-modelação induzida pela acupuntura baseia-se, sobretudo, no papel das células natural killer (NK), na citotoxicidade na correção do desequilíbrio da resposta das células Th1/Th2 e na comunicação imuno-neuronal [21].

[43] Kou W, Bell JD, Gareus I, Pacheco-Lopez G, Goebel MV, Spahn G et al. Repeated acupuncture treatment affects leukocyte circulation in healthy ying male subjects : a randomized single-blind two period crossover study. *Brain Behavior and Immunity.*, 19:318–324, 2005

[40] Takashi Takahashi, Hiroyuki Sumino, Tsugiyasu Kanda, Nubuo Yamaguchi. Acupuncture modifies immune cells. *J Exp Clin Med*, 1(1):5, 2009

[44] N. Yamaguchi, T. Takahashi, M. Sakuma, T. Sugita, K. Uchikawa, S. Sakaiharu, T. Kanda, M. Arai, and K. Kawakita. Acupuncture regulates leukocyte subpopulations in human peripheral blood. *Evid Based Complement Alternat Med*, 4(4):447–53, 2007

[45] C. K. Kim, G. S. Choi, S. D. Oh, J. B. Han, S. K. Kim, H. J. Ahn, H. Bae, and B. I. Min. Electroacupuncture up-regulates natural killer cell activity identification of genes altering their expressions in electroacupuncture induced up-regulation of natural killer cell activity. *J Neuroimmunol*, 168(1-2):144–53, 2005

[46] T. Hisamitsu, T. Kasahara, T. Umezawa, T. Ishino, and N. Hisamitsu. The effect of acupuncture on natural killer cell activity. *International Congress Series*, 1238:125–131, 2002

[47] G. S. Choi, S. D. Oha, J. B. Han, H. S. Bae, Y. W. Cho, Y. S. Yun, W. K. Lee, H. J. Ahn, and B. I. Min. Modulation of natural killer cell activity affected by electroacupuncture through lateral hypothalamic area in rats. *Neurosci Lett*, 329(1):1–4, 2002

[42] T. S. Pavao, P. Vianna, M. M. Pillat, A. B. Machado, and M. E. Bauer. Acupuncture is effective to attenuate stress and stimulate lymphocyte proliferation in the elderly. *Neurosci Lett*, 484(1):47–50, 2010

Tem sido demonstrado que a estimulação de determinados pontos, tais como o 04IG e o 36ES, originam ambas alterações imunológicas e funcionais a nível celular que são significativas, como por exemplo a alteração da população linfocitária [42].

Embora as células NK façam parte da resposta imune inata, e não da resposta adaptativa, esta classe de linfócitos desencadeia a resposta adaptativa através da produção de interferão (IFN). Estas células constituem, então, a primeira linha de defesa contra os agentes patogénicos, através da resposta imune inata (45). Um estudo recente demonstrou que a acupunctura aumentou significativamente a actividade das células NK em mulheres com ansiedade ao fim de um mês (21, 42). As células NK são importantes como a uma primeira linha de defesa e como um dos efectores finais na resistência aos tumores, metástases e infecções virais. Pensa-se que o IFN aumenta a actividade citolítica das células NK na morte e ataque às células tumorais. Por outro lado, já foi demonstrado que os peptídeos opióides endógenos aumentam a actividade citolítica e a produção de IFN pelas células NK e que estas células têm receptores opióides na sua superfície celular. Estas evidências suportam a ideia de que a acupunctura aumenta as actividades das células NK através de comunicações neuro-imunológicas, especialmente através do ponto 36ES [45],[46],[47].

Mais ainda, Yu et al., (1997) demonstraram que a estimulação do ponto 36ES por três vezes consecutivas todos os dias aumenta a actividade das células NK através do aumento dos níveis endógenos de interferão em ratinhos BALB/c e ratos Fischer 344 (40, 47, 48). Estudos clínicos demonstraram inclusive que o número de células CD16+ e CD56+, que estão intimamente relacionadas com a actividade das células NK, e os níveis de IFN no sangue periférico de voluntários saudáveis aumentou significativamente após tratamento com electroacupunctura [21].

Relativamente aos linfócitos T e B, não existe nenhuma inter-

pretação conclusiva na literatura. Para alguns autores, tais como Lu et al., [49] e Pavão et al., [42], a acupuntura proporciona um aumento dos linfócitos, enquanto que para outros como Kou et al., [43] e Ferreira et al., [50] encontraram uma diminuição dos mesmos. De qualquer forma, as células CD4+ podem ser diferenciadas em diferentes populações, como Th1 e Th2, com base no padrão de produção de citocinas. Na medicina tradicional chinesa, os pontos 36ES, 11IG, 10BP e 14VG têm estado relacionados a funções imunes e têm sido clinicamente usados para distúrbios do sistema imune, como por exemplo em doenças alérgicas, infecções, síndromes de imunodeficiência, etc [43]. Alguns deste pontos têm sido muito usados em estudos experimentais de avaliação de efeitos imuno-moduladores da acupuntura em humanos e animais.

Takahashi T et al., (2009) verificaram que após o início da acupuntura no ponto 23BX por 20 dias, o rácio de CD4+/CD8+ mostrou ser significativamente reduzido nos dias 3 e 7 comparativamente ao controlo enquanto que as células T ativadas aumentaram no dia 7. De facto, em algumas situações de dor, doentes tratados mostraram um aumento significativo de CD3+ e CD4+ 30 minutos após a acupuntura nos pontos 36ES e 04IG e CD8+ 24 horas após [40].

De acordo com a literatura existente verificamos que de entre os pontos já referenciados alguns destacam-se pela sua acção no sistema imunitário, bem como acção a nível do sangue, dos músculos e ossos, sendo pontos referenciados na literatura segundo a medicina tradicional chinesa, como pontos chave da regulação geral do organismo. Como sejam: 11BX (Dazhu), 17 BX (Geshu), 23BX (Shenshu), 39VB (Xuangzhong) e 36ES (Zusanli).

- ✓ O ponto **11BX** chamado Dazhu localiza-se 1,5 cun lateral à depressão inferior da apófise espinhosa da vértebra T1 (Figura 4). Deve ser puncturado cerca de 0,5 cun perpendicularmente.

[40] Takashi Takahashi, Hiroyuki Sumino, Tsugiyasu Kanda, Nubuo Yamaguchi. Acupuncture modifies immune cells. *J Exp Clin Med*, 1(1):5, 2009

[49] W. Lu, UA. Matulonis, A. Doherty-Gilman, H. Lee, E. Dean-Clover, A. Rosulek, and et al. Acupuncture for chemotherapy-induced neutropenia in patients with gynecologia malignancies: a pilot randomized, sham-controlled clinical trial. *Journal Alternative Complementary Medicine*, 15(7):745–753, 2009

[50] AS. Ferreira, JGM. Lima, TPT. Ferreira, CMT. Lopes, and R. Meyer. Prophylactic effects of short-term acupuncture on zusanli (st36) in wistar rats lipopoly saccharide induced acute lung injury. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 7(10):969–975, 2009

**Nota:** Um *cun* corresponde à largura do polegar, ao nível da articulação interfalângica do dedo da mão do doente.

larmente, ou obliquamente em direcção medial [51]

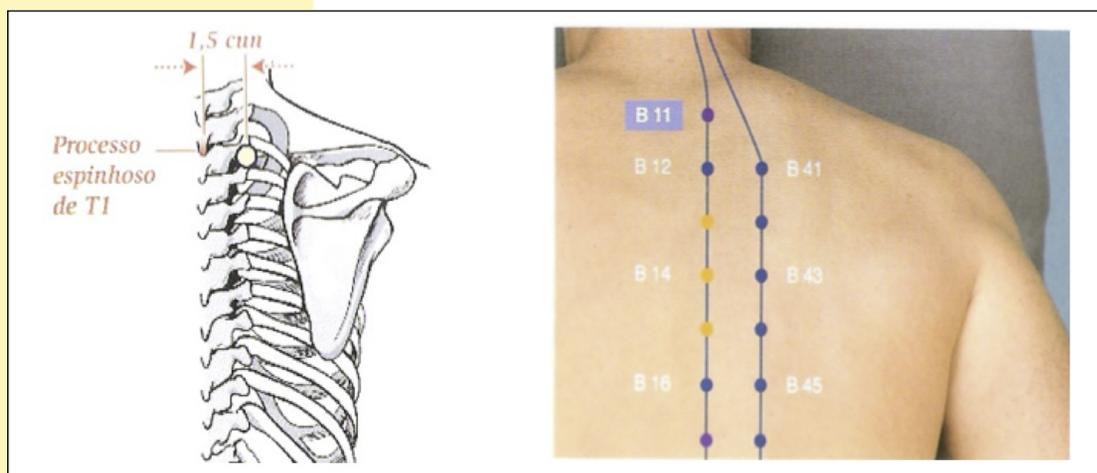


Figura 4: Localização anatómica do ponto 11BX (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupunctura e prática de Acupunctura)

[8] Ferreira AA. *A Acupunctura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[26] Hecker HU. Steveling A. Peuker ET. Kastner J. *Prática de Acupunctura*. Rio de Janeiro, Brasil, 2007

[51] Hecker HU. Steveling A. Peuker ET. Kastner J. *Prática de Acupunctura*. Rio de Janeiro, Brasil, 2007

[51] YL. Lian, CY. Chen, M. Hammes, and BC. Kolster. *Atlas Gráfico de Acupunctura*. H.F.Ullmann, Slovenia, 2005

O principal cuidado a ter é o risco de pneumotórax. Este é um ponto de encontro (*Hui*) dos Ossos. As suas funções segundo a MTC são remover obstruções no meridiano, relaxa os músculos e tendões, fortalece os ossos, expele factores patogénicos externos como vento e calor, tonifica o sangue, e alivia a dor. O ramo medial do ramo posterior do nervo espinal emerge entre a coluna média e lateral dos músculos erectores da espinha, local onde estão situados os pontos do ramo interno do meridiano da bexiga. Este ponto aplica-se nas infecções do trato respiratório superior e na síndrome cervicobraquial [8], [26], [51].

- ✓ O ponto **17BX** também chamado de Geshu, localiza-se 1,5 cun lateral à depressão inferior da apófise espinhosa da vértebra T7. Deve ser puncturado cerca de 0,5 cun perpendicularmente, ou obliquamente no sentido medial e inferior [51].

O principal cuidado a ter é o risco de pneumotórax. Este é um ponto de encontro (*Hui*) do sangue. A agulha de acupunctura atravessa a pele, o tecido celular subcutâneo, o músculo trapézio

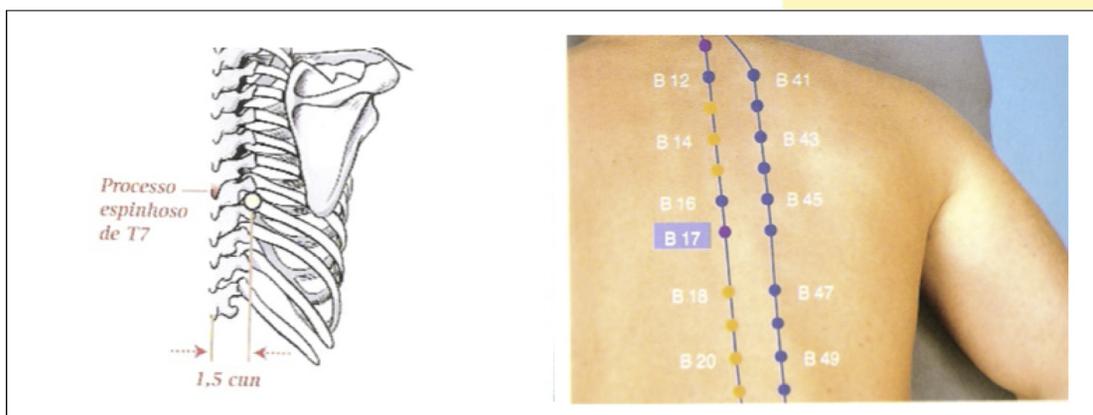


Figura 5: Localização anatômica do ponto 17BX (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupuntura e prática de Acupuntura).

e atinge o músculo erector da espinha; relaciona-se com o ramo do dorso (cutâneo medial e muscular) do 7º nervo torácico. As suas funções segundo a MTC são nutrir e regular o sangue, resolve a estagnação do sangue, elimina o calor do sangue, relaxa o tórax e o diafragma, tonifica o sangue e o Qi, e harmoniza o Qi do estômago. A sua principal aplicação é nas anemias, para parar hemorragias dos orifícios superiores, na asma e soluços. Este é um ponto de influência do Sangue e um ponto de transporte (Shu dorsal) posterior do diafragma[8], [26], [51].

- ✓ O Ponto **23BX** também chamado de Shenshu, localiza-se 1,5 cun lateral à depressão inferior da apófise espinhosa da vértebra L2. Deve ser punturado cerca de 0,5 a 1,5 cun perpendicularmente.

Inervação pelo ramo cutâneo dorsal do segundo nervo espinal dorsal. A agulha de acupuntura atravessa a pele, o tecido celular subcutâneo, a fáscia toraco-lombar e o músculo erector da espinha e atinge o músculo quadrado lombar; relaciona-se com o ramo do dorso (cutâneo medial e muscular) do 2º nervo espinho-lombar e com os nervos íleo-hipogástrico, íleo-inguinal e genito-femoral. As

[8] Ferreira AA. *A Acupuntura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010  
 [26] Hecker HU, Steveling A, Peuker ET, Kastner J. *Prática de Acupuntura*. Rio de Janeiro, Brasil, 2007  
 [51] YL. Lian, CY. Chen, M. Hammes, and BC. Kolster. *Atlas Gráfico de Acupuntura*. H.F.Ullmann, Slovenia, 2005

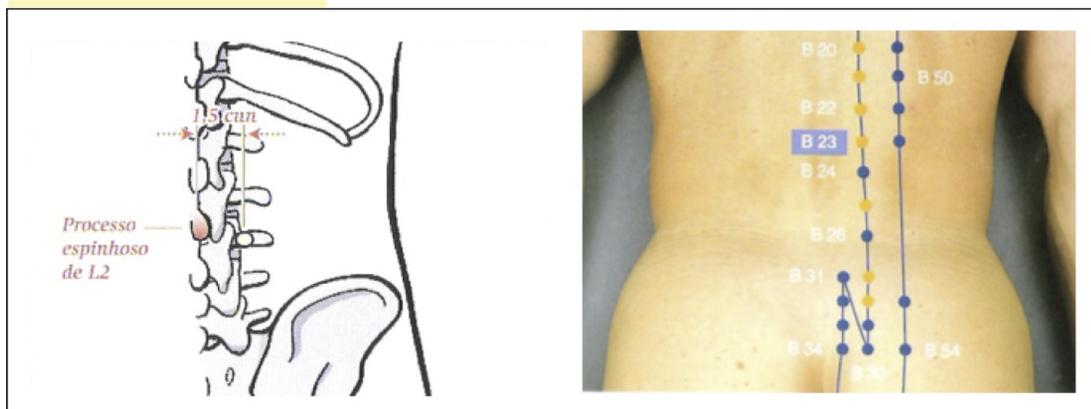


Figura 6: Localização anatômica do ponto 23BX (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupuntura e prática de Acupuntura).

suas funções segundo a MTC é fortalecer o rim, fortalecer a região lombar, tonifica o *Yin* do rim e o *Yang* do rim, suporta a essência (*jing*), nutre o sangue, beneficia os ossos e a medula óssea, beneficia a audição e a visão, suporta o rim para receber o *Qi* e remove a humidade. As suas principais aplicações clínicas são nas disfunções sexuais masculinas, nas disfunções ginecológicas, incontinência urinária e lombalgia. É um ponto de transporte (*Shu* dorsal) posterior do rim [8], [26], [51].

[8] Ferreira AA. *A Acupuntura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010

[26] Hecker HU, Steveling A, Peuker ET, Kastner J. *Prática de Acupuntura*. Rio de Janeiro, Brasil, 2007

[51] YL. Lian, CY. Chen, M. Hammes, and BC. Kolster. *Atlas Gráfico de Acupuntura*. H.F.Ullmann, Slovenia, 2005

- ✓ O ponto **39VB** também chamado *Xuanzhong*, localiza-se 3 cun superior ao ponto mais saliente do maléolo lateral na margem anterior da fíbula. Deve ser puncturado cerca de 0,5 a 2 cun perpendicularmente (Figura 7).

A agulha de acupuntura atravessa a pele e o tecido celular subcutâneo, penetra anteriormente ao tendão dos músculos longo e curto peroneal e, mais profundamente, relaciona-se com o músculo longo flexor dos dedos e longo flexor do hálux: relaciona-se, superficialmente, com o nervo sural e, profundamente, com os ramos musculares do nervo tibial. As suas funções segundo a MTC é nutrir a medula óssea, suporta a essência (*jing*), acalma o vento

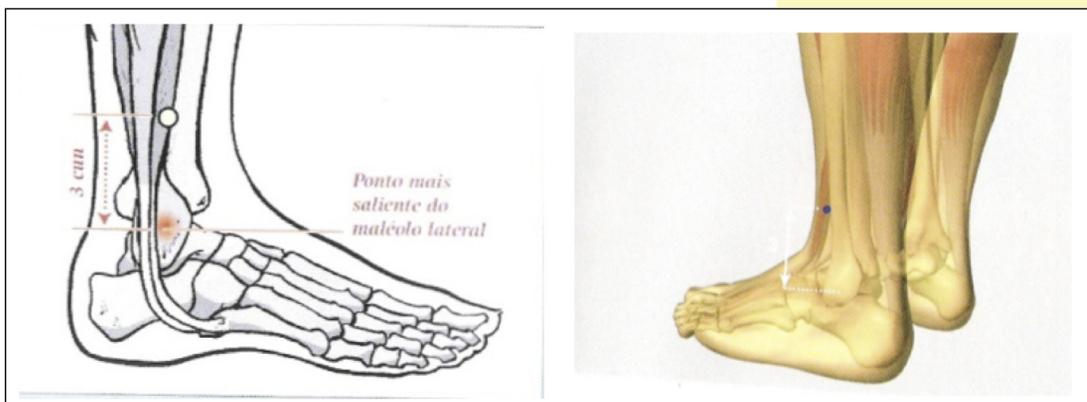


Figura 7: Localização anatômica do ponto 39VB (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupuntura e prática de Acupuntura).

do fígado, esfria o calor e resolve o calor húmido. Este ponto descongiona e activa o meridiano e os seus vasos. É innervado pelo nervo cutâneo sural lateral. É o ponto de encontro (*Hui*) da medula óssea, ou seja nutre a medula óssea, sendo adequado para tratar doenças que afectam a medula óssea, a medula espinhal, o cérebro e os nervos. É um ponto específico para o tratamento de patologia do SNC. A sua principal aplicação clínica é na hemiplegia nas doenças vasculares cerebrais, problemas da coluna cervical e nas dores e perda de força nas pernas [8], [26], [51].

- ✓ O ponto **36ES** também chamado Zusanli, com o joelho ligeiramente flexionado, localiza-se 3 cun inferior ao ponto 35ES, aproximadamente ao nível do limite inferior da tuberosidade da tibia, a largura de um dedo médio até à crista anterior da tibia, no músculo tibial anterior. Deve ser puncturado 0,5 a 1,5 cun perpendicularmente (Figura 8).

Segundo a MTC, as suas funções são fortalecer o corpo e o baço, harmonizar o estômago, restaurar o equilíbrio de *Qi*, descongionar e activar o meridiano e os seus vasos. A sua principal aplicação clínica é o fortalecimento do corpo com efeitos imunológicos, nas disfunções do sistema digestivo, nas dores, movimento

- [8] Ferreira AA. *A Acupuntura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010
- [26] Hecker HU, Steveling A, Peuker ET, Kastner J. *Prática de Acupuntura*. Rio de Janeiro, Brasil, 2007
- [51] YL. Lian, CY. Chen, M. Hammes, and BC. Kolster. *Atlas Gráfico de Acupuntura*. H.F.Ullmann, Slovenia, 2005

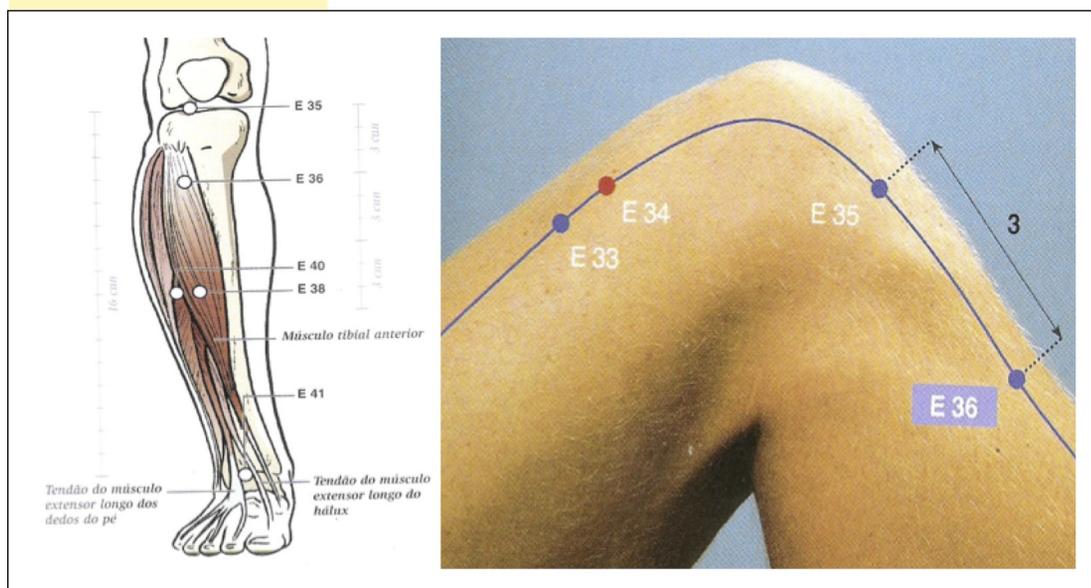


Figura 8: Localização anatômica do ponto 36ES (retirado e adaptado de Atlas Gráfico de Acupuntura e prática de Acupuntura).

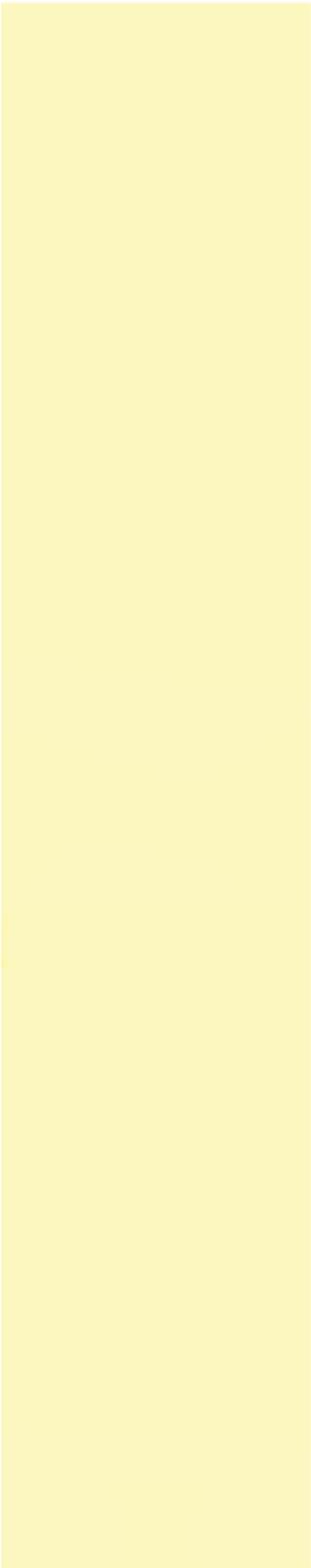
limitado e extremidade do membro inferior [26], [51].

## Objectivos

Ainda que a acupunctura seja praticada em todo o mundo de uma forma complementar à medicina convencional, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos da acupunctura sobre o sistema imunitário. Este estudo pretende compreender possíveis mecanismos fisiológicos do sistema imunitário associados à resposta desta prática clínica para, de uma forma mais clara, entender as possíveis vantagens e desvantagens da implementação desta abordagem como um complemento à medicina convencional.

## *OBJECTIVOS*

---



# Materiais e Métodos

## Voluntários e Métodos de Acupunctura

Foram avaliados um total de 22 indivíduos jovens saudáveis.

Cada voluntário assinou um consentimento informado no início do tratamento e foi realizada a história clínica dos mesmos antes da entrada no estudo.

O ensaio experimental foi realizado após concordância do Comité de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Todos os questionários foram sujeitos a anonimato, assim como as amostras de sangue colhidas com o código ao qual apenas o investigador principal teve acesso.

O critério de exclusão dos voluntários foi a existência de qualquer patologia, ou alguma intercorrência clínica durante as 3 semanas de estudo, pelo que foi tido sempre em consideração o historial clínico dos mesmos.

As agulhas de acupunctura utilizadas foram descartáveis, com as medidas de 0.22x25mms, da marca Ener-Qi, Novasan, S.A. Medical & Health Products, Madrid, Espanha. O método de acupunctura foi realizado nos pontos: 11BX (Dazhu), 17BX (Geshu), 23BX (Shenshu), 39VB (Xuangzhong), 36ES (Zusanli), bilateralmente.

O tratamento com acupunctura foi individualmente realizado com agulhas, que estiveram no local durante quinze minutos, por

um médico com experiência.

Foram colhidos cinco mililitros de sangue da veia do antebraço (mediana) de todos os voluntários uma hora antes do primeiro tratamento de acupuntura, bem como no final do último tratamento ao fim de três semanas. O sangue foi colhido em tubos de colheita de sangue com EDTA.

Os voluntários foram sujeitos a três tratamentos por semana, durante 3 semanas consecutivas, em dias alternados da semana (2<sup>af</sup>, 4<sup>af</sup>, 6<sup>af</sup>), tendo sido sempre feito uma avaliação médica pré-acupuntura.

Após a colheita do sangue, o mesmo foi entregue no laboratório de Imunologia da FMUC onde foram preparadas as amostras para citometria de fluxo.

### **Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo, desenvolvida em 1970, rapidamente se tornou num instrumento essencial na prática clínica e investigação permitindo uma análise rápida e informativa de populações celulares. Através da citometria de fluxo podem ser analisados vários parâmetros celulares, tais como o tamanho e complexidade da célula, o conteúdo de ADN e ARN e a expressão de proteínas da membrana e intracelulares. A informação necessária para a análise dos vários parâmetros é obtida quer pela avaliação da dispersão da luz quer pela emissão de fluorescência de células previamente marcadas com anticorpos específicos conjugados com fluorocromos (Figura 9) [39].

No presente estudo, a citometria de fluxo foi utilizada para determinar o tipo de marcadores celulares expressos pelas células sanguíneas, mais concretamente:

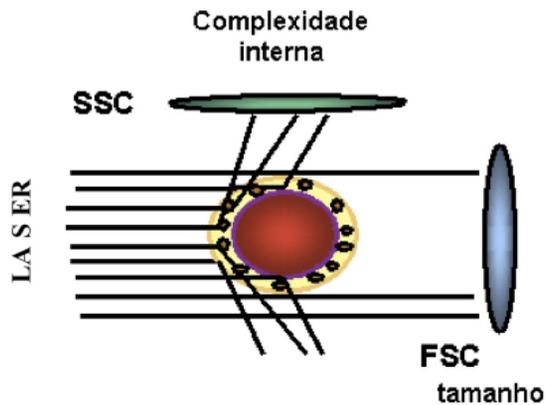


Figura 9: Esquemática da análise dos parâmetros celulares por citometria de fluxo. Na figura está representada a dispersão da luz emitida por uma fonte de luz (laser de árgon). Esta, ao incidir numa célula ou outra partícula, sofre dispersão frontal (Forward scatter) ou lateral (Side scatter) (reproduzido e adaptado de <http://www.sleury.com.dr/>)

## Material e Equipamento

⇒ Material

- ✓ Tubos de citómetro;
- ✓ Material biológico – amostras de sangue dos voluntários.

⇒ Equipamento

- ✓ Citómetro de fluxo BD FACS Canto II (BD Biosciences) software FACS DIVA versão 6.1.3 disponibilizado pelo Instituto de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- ✓ Centrífuga refrigerada (D-78532 Tuttlingen, Hettich Zentrifugar, Universal 320R; Rotor: 6318, Portugal).

## Reagentes

- ✓ PBS (Phosphate Buffer Solution),
- ✓ Kit para o linfograma (Kit Lymphogram Cytognos).

### Análise do linfograma

O linfograma é um teste de imunofluorescência de três cores para a utilização em citometria de fluxo que determina simultaneamente em sangue periférico, medula óssea e outros fluídos corporais as principais subpopulações de linfócitos, incluindo o número total de linfócitos T (CD3 +), linfócitos B (CD19 +) e células natural killer (CD3-CD56 +), bem como T auxiliares (CD3 + CD4 +) e T supressores / citotóxicos (CD3 + CD8 +) (Figura 10).

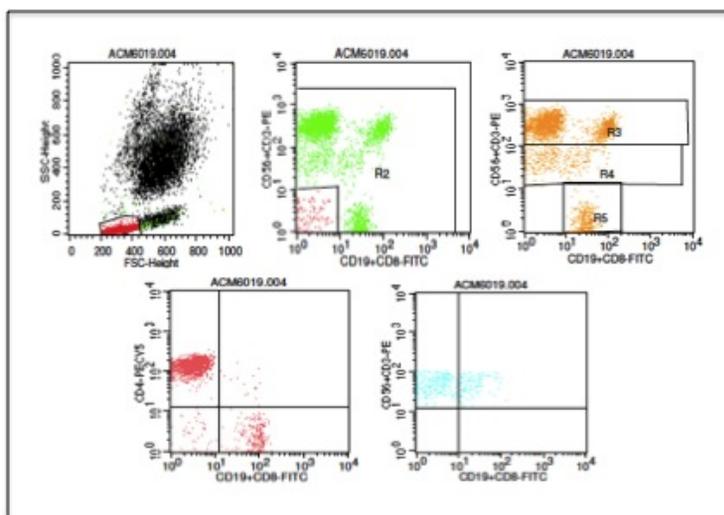


Figura 10: Representação esquemática dos dot plots obtidos pela análise de citometria de fluxo das amostras de sangue dos voluntários. Através da distribuição das populações celulares obtém-se a identificação dos diferentes tipos de células sanguíneas e das diferentes características morfológicas. A identificação baseia-se na verificação da presença de alguns marcadores característicos por intermédio de fluorocromos fluorescentes.

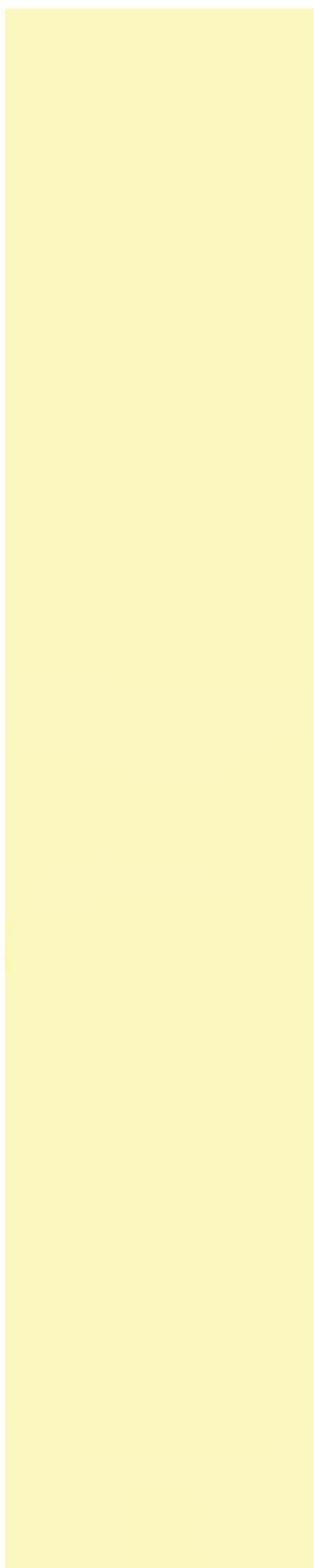
#### Procedimento:

1. Adicionar 50 $\mu$ L de sangue num tubo de 5mL.
2. Adicionar 10 $\mu$ l de kit LYMPHOGRAM.
3. Incubar 15 minutos no escuro à temperatura ambiente.
4. Adicionar 2 ml de BD FACS Solução de Lise.
5. Incubar 10 minutos no escuro à temperatura ambiente.

6. Centrifugar 1500 rpm 5 minutos.
7. Aspirar o sobrenadante.
8. Adicionar 2 ml de PBS.
9. Centrifugar 1500 rpm 5 minutos.
10. Aspirar o sobrenadante.
11. Adicionar 300 $\mu$ L PBS.
12. Passagem das células no citómetro de fluxo.
13. Procedeu-se à leitura no citómetro de fluxo com o programa *FACS DIVA* e posterior análise com o programa *Flow Jo V10*.

### **Análise Estatística**

No presente estudo foi realizado o teste-t student de forma a determinar a significância estatística das amostras antes da acupunctura e após a acupunctura. Considerou-se um valor estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ . Os gráficos e a análise estatística foram realizadas através do GraphPad Prism 5 para Windows (version 5.00; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).



## Resultados

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada neste trabalho para a identificação das diferentes populações celulares que constituem as amostras sanguíneas dos voluntários e que permitem uma análise mais cuidada das possíveis alterações devidas ao procedimento de acupuntura. Esta fenotipagem é conseguida recorrendo à análise da presença de diferentes marcadores celulares que são característicos e da expressão específica de cada uma destas células. Assim, para a avaliação quantitativa, o número de células CD positivas foi contado como sendo indicador de células T, B e NK [32]. As figuras seguintes ilustram os resultados obtidos da fenotipagem.

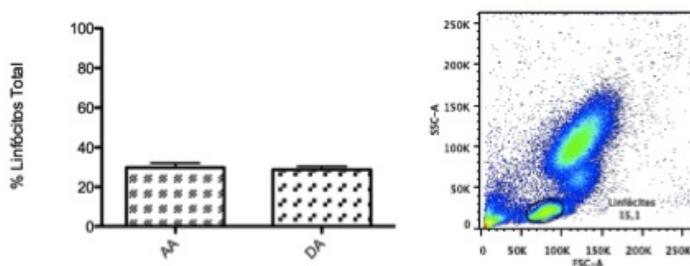


Figura 11: População de Linfócitos Totais. O gráfico da figura representa a média da percentagem de linfócitos totais das amostras de sangue dos voluntários, antes (AA) e após (DA) a acupuntura. O gráfico de pontos à direita representa o dot-plot adquirido da análise das amostras por citometria de fluxo onde no eixo dos xx está o que corresponde à dispersão para a frente (FSC) e no eixo dos yy a dispersão lateral (SSC). O FSC correlaciona-se com o tamanho da célula e o SSC correlaciona-se com a diversidade periférica das membranas celulares. Assim, podemos identificar, a partir de uma amostra de sangue total, a população de linfócitos. Os valores do gráfico representam a média ( $\pm$  desvio-padrão). ( $p = 0,17$ ; não significativo).

## RESULTADOS

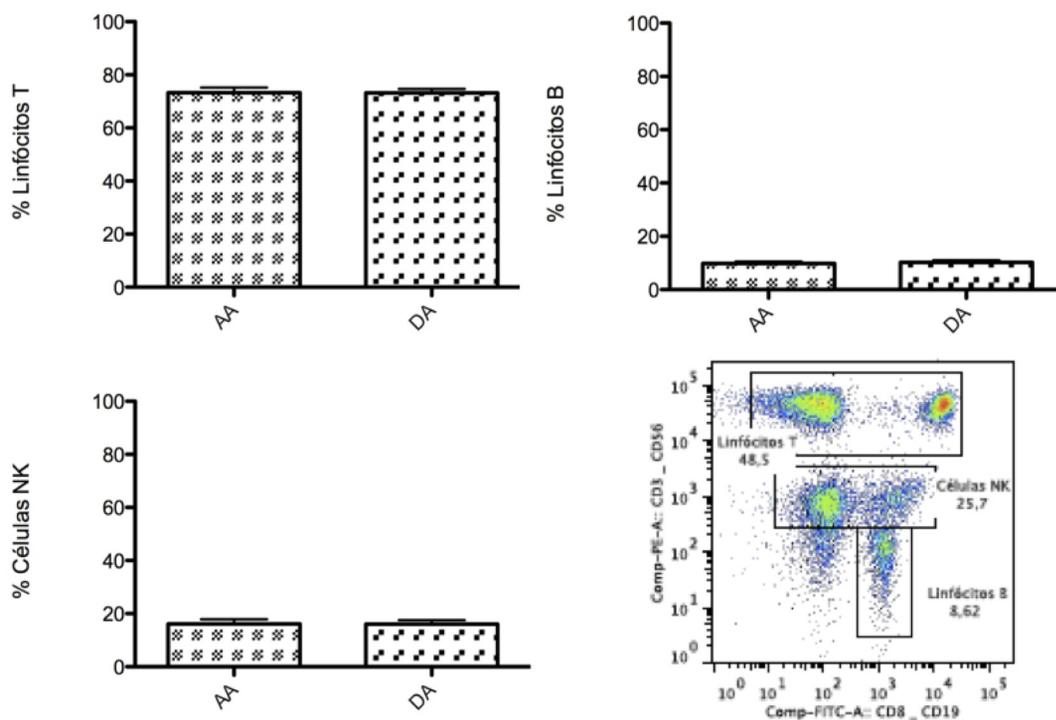


Figura 12: População de Linfócitos T, NK e B. Os gráficos da figura representam a média da percentagem de linfócitos T, NK e B das amostras de sangue dos voluntários, antes (AA) e após (DA) a acupunctura. O gráfico de pontos no canto inferior direito representa o dot-plot adquirido da análise das amostras por citometria de fluxo onde no eixo dos xx está representada a marcação CD8 e CD19 com o fluorocromo FITC e no eixo dos yy a marcação CD3 e CD56 com o fluorocromo PE. Os valores do gráfico representam a média ( $\pm$  desvio-padrão). (p (Linfócitos T) = 0,2; não significativo; p (Linfócitos B) = 0,6; não significativo; p (Linfócitos NK) = 0,5; não significativo; p>0,05).

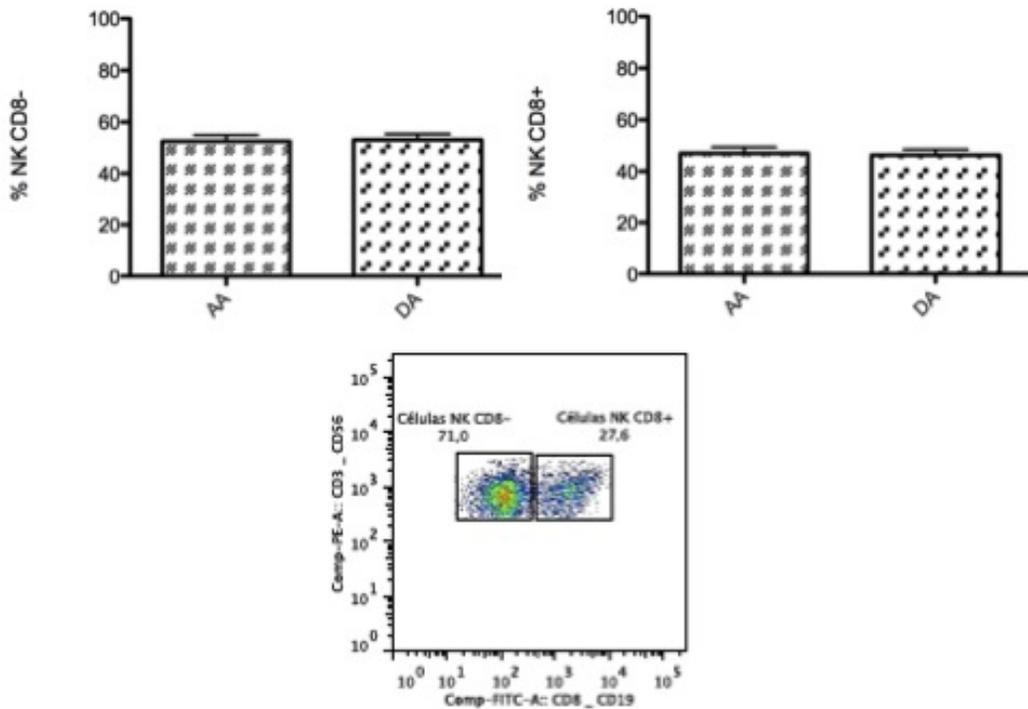


Figura 13: População de Linfócitos NK CD8+ e CD8-. Os gráficos da figura representam a média da percentagem de linfócitos NK que são CD8+ e NK CD8- das amostras de sangue dos voluntários, antes (AA) e após (DA) a acupuntura. O gráfico de pontos acima representa o dot-plot adquirido da análise das amostras por citometria de fluxo onde no eixo dos xx está representado o marcador CD8 e CD19 ligado a um fluorocromo FITC e no eixo dos yy está representado o marcador CD3 e CD56 ligado a um fluorocromo PE. Os valores do gráfico representam a média ( $\pm$  desvio-padrão). (p (Linfócitos NK CD8+) = 0,6; não significativo; p (Linfócitos NK CD8-) = 0,7; não significativo;  $p > 0,05$ ).

## RESULTADOS

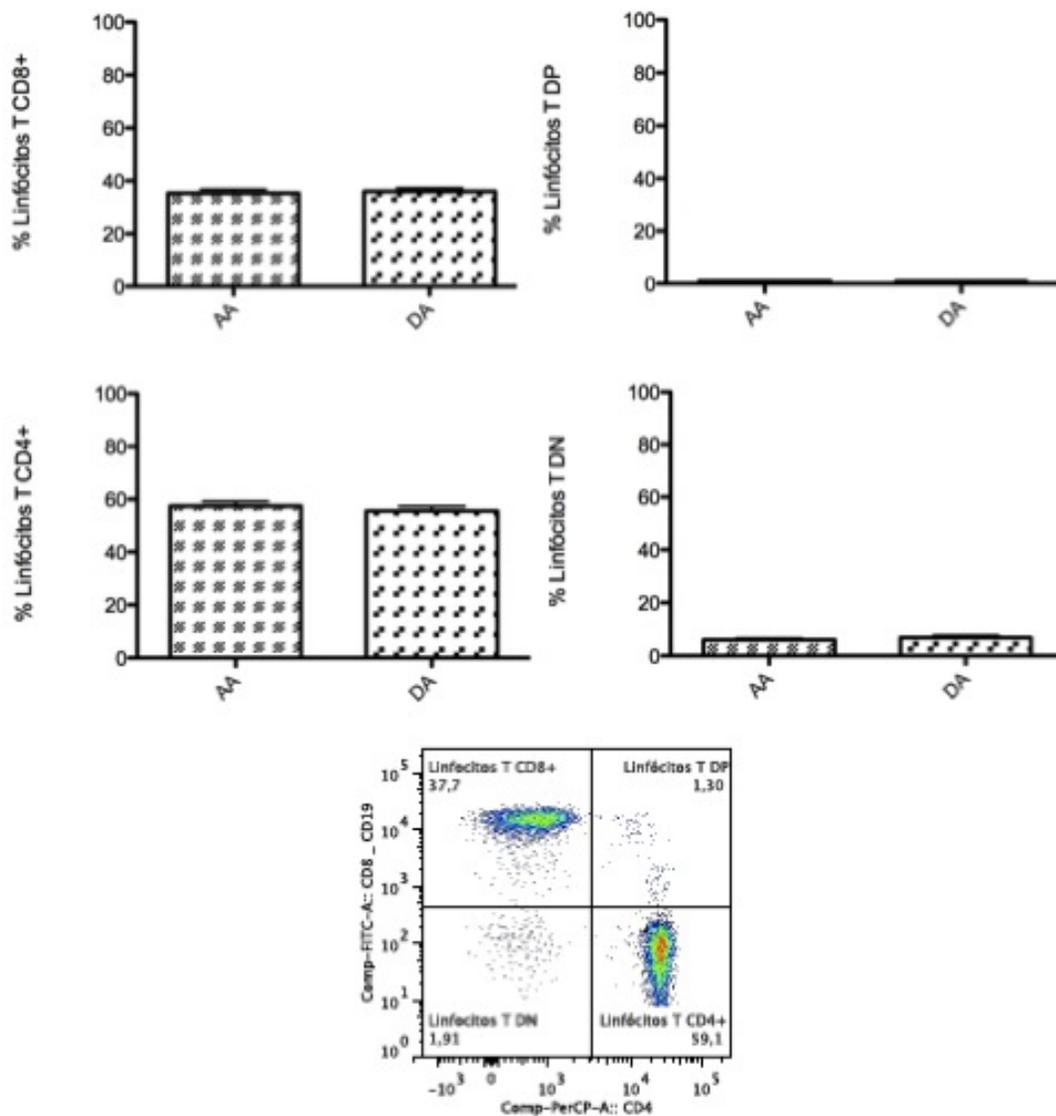
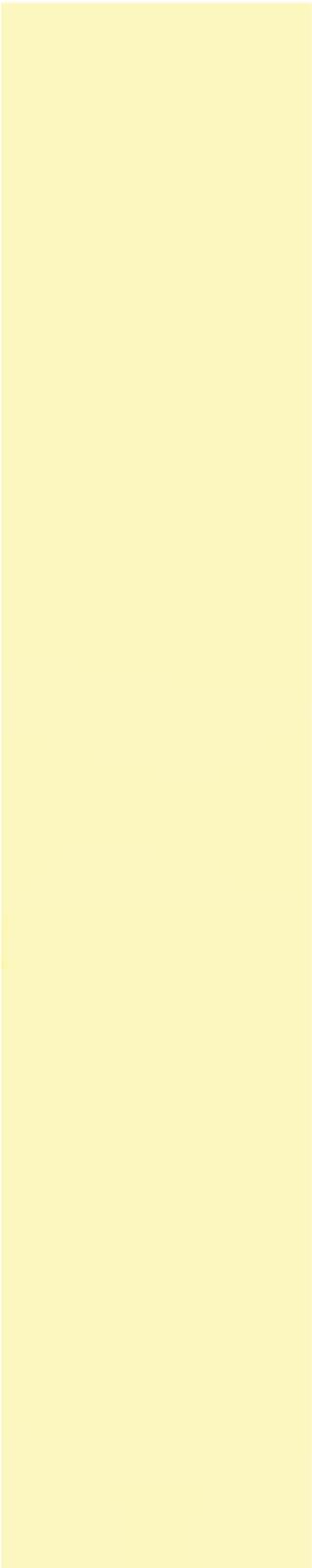


Figura 14: População de Linfócitos T CD8+, DP, CD4+ e DN. Os gráficos da figura representam a média da percentagem de linfócitos T que são CD8+, DP, CD4+ e DN das amostras de sangue dos voluntários, antes (AA) e após (DA) a acupuntura. O gráfico de pontos acima representa o dot-plot adquirido da análise das amostras por citometria de fluxo onde no eixo dos xx está representado o marcador CD4 ligado a um fluorocromo PercCP e no eixo dos yy está representado o marcador CD8 e CD19 ligado a um fluorocromo FITC. Os valores do gráfico representam a média ( $\pm$  desvio-padrão). ( $p$  (Linfócitos T CD8+) = 0,6; não significativo;  $p$  (Linfócitos T DP) = 0,2; não significativo;  $p$  (Linfócitos T CD4+) = 0,8; não significativo;  $p$  (Linfócitos T DN) = 0,1  $p > 0,05$ ).

Podemos verificar que as amostras sanguíneas dos voluntários antes e após o procedimento de acupunctura não apresentam alterações significativas nas células CD56+, intimamente associadas às células NK, bem como nas células CD4+ e CD8+, intimamente associadas à actividade das células T. Os resultados foram obtidos após a realização do teste t-student para comparação de amostras com distribuição normal.



## Discussão e Conclusão

A acupunctura envolve a estimulação de pontos específicos localizados nas linhas de meridianos que correspondem, segundo a medicina tradicional chinesa, a canais de fluxo de energia através do corpo [44], [52], [53]. Na literatura existem vários estudos que relatam os efeitos benéficos da acupunctura, pretendendo-se salientar com este trabalho a literatura que relata os benefícios principalmente sobre o sistema imunitário [21], [44], [54]. O sistema imunitário é constituído por uma rede de órgãos, células e moléculas com o objectivo de manter a homeostase do organismo e defendê-lo de determinadas patologias através dos seus mecanismos de defesa. Comporta, assim, uma quantidade de células e moléculas que modulam as respostas a alterações fisiológicas variadas. Alterações a nível do sistema imunitário podem levar ao aparecimento de várias doenças como as doenças auto-imunes.

Com este trabalho pretendeu-se, assim, avaliar o efeito da acupunctura sobre algumas células do sistema imunitário numa amostra de indivíduos saudáveis. Os nossos resultados não apresentam alterações evidentes ao nível das células do sistema imunitário nos períodos entre o antes e o após a realização de acupunctura.

No entanto, como experiências futuras, seria importante verificar nesta mesma amostra se, de facto, a estimulação afecta a maturação funcional de células imunocompetentes, investigando as manifestações de várias citocinas nas células do sangue através

[44] N. Yamaguchi, T. Takahashi, M. Sakuma, T. Sugita, K. Uchikawa, S. Sakaiharu, T. Kanda, M. Arai, and K. Kawakita. Acupuncture regulates leukocyte subpopulations in human peripheral blood. *Evid Based Complement Alternat Med*, 4(4):447–53, 2007

[52] P. Zhang, J. Li, Y. Han, X. W. Yu, and L. Qin. Traditional chinese medicine in the treatment of rheumatoid arthritis: a general review. *Rheumatol Int*, 30(6):713–8, 2010

[53] J. Roberts, A. Huissoon, J. Dretzke, D. Wang, and C. Hyde. A systematic review of the clinical effectiveness of acupuncture for allergic rhinitis. *BMC Complement Altern Med*, 8:13, 2008

[21] S. K. Kim and H. Bae. Acupuncture and immune modulation. *Auton Neurosci*, 157(1-2):38–41, 2010

[54] T. Sato, Y. Yu, S. Y. Guo, T. Kasahara, and T. Hisamitsu. Acupuncture stimulation enhances splenic natural killer cell cytotoxicity in rats. *Jpn J Physiol*, 46(2):131–6, 1996

[44] N. Yamaguchi, T. Takahashi, M. Sakuma, T. Sugita, K. Uchikawa, S. Sakaiharu, T. Kanda, M. Arai, and K. Kawakita. Acupuncture regulates leukocyte subpopulations in human peripheral blood. *Evid Based Complement Alternat Med*, 4(4):447–53, 2007

de análises de FACS, doseando os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-4 e IFN- $\gamma$  que estão associadas com actividades dos macrófagos e imunidade humoral e celular [44].

Assim, apesar de com este estudo não ter sido possível evidenciar um benefício directo da acupunctura em algumas células dos sistema imunitário, não só porque a população alvo é uma população saudável, mas também porque não obtivemos alterações significativas, na quantificação por citometria de fluxo, das diferentes células do sistema imunitário, antes e após a acupunctura, pudemos de certa forma concluir que a acupunctura parece também não apresentar quaisquer efeitos secundários no sistema imunitário que pudessem ser considerados prejudiciais. Parece-nos importante descartar a possibilidade desta abordagem ser prejudicial e poder contribuir, de certa forma, para a creditação da acupunctura. Este estudo permite-nos, assim, distanciar a acupunctura de um tratamento farmacológico uma vez que num grupo de indivíduos aparentemente saudáveis a acupunctura não parece modificar o perfil imunológico de base, permitindo-nos concluir que provavelmente será isenta dos efeitos secundários presentes nos tratamentos farmacológicos.

No entanto, este estudo fica condicionado por alguns viés como sejam o número pequeno da amostra, sendo que seria importante aumentar a casuística para que conclusões mais fidedignas pudessem ser tiradas. Além disso, ainda que o grupo escolhido fosse homogéneo, indivíduos aparentemente saudáveis, com estilo de vida saudável, na mesma faixa etária e sem intercorrências durante o tratamento, sabe-se de base que muitas situações do dia-a-dia podem interferir no sistema imunitário, sendo que é muito difícil um grupo totalmente homogéneo.

Poderia, também, ser interessante testar este mesmo modelo em indivíduos saudáveis comparando com outro grupo com patologia, incluindo um grupo de indivíduos doentes e tentar identificar

possíveis alterações no perfil imunológico. No entanto, seria importante que este grupo de doentes fosse também homogéneo, devido às alterações celulares e moleculares das diferentes doenças.

Muitos dos doentes que fazem acupunctura referem, não só, os efeitos benéficos para o problema em causa, mas também a sensação de relaxamento, de tranquilidade e bem-estar que sabemos ser, indiscutivelmente, factores preponderantes e determinantes para muitas das sintomatologias em medicina como o stress, ansiedade e depressão. Existem estudos que de facto apresentam resultados nestas áreas da medicina que, muitas das vezes, são até resultantes de sintomas primários relacionados com diversas doenças [55],[56],[57].

De facto, alguns estudos que não apresentaram diferenças significativas na pressão sanguínea, ritmo cardíaco e população linfocitária, antes e após a primeira sessão de acupunctura, verificaram que os tratamentos repetitivos de acupunctura induziram uma redução significativa nos valores de linfócitos ao longo do tempo [43].

No entanto, deve ter-se em consideração que a própria sessão de acupunctura pode influenciar o estado subjectivo do indivíduo e, teoricamente, confundir os resultados. Assim, para demonstrar o efeito real da estimulação de acupunctura seriam necessários ensaios duplamente cegos, controlados por placebo, com um grande número de indivíduos, o que constituem, também, limitações deste estudo e da maioria dos estudos em acupunctura pelo já atrás exposto. Ainda que a população alvo tenha sido um grupo de voluntários saudáveis, os efeitos da acupunctura nestes indivíduos seriam realçados se existisse um grupo de pessoas que não soubesse se, de facto, lhe foi aplicada a técnica ou não, como um placebo, o que no que toca à acupunctura é limitativo.

Encontrar um controlo adequado continua a ser uma metodologia primária de preocupação em investigação na acupunctura. Te-

[43] Kou W, Bell JD, Gareus I, Pacheco-Lopez G, Goebel MV, Spahn G et al. Repeated acupuncture treatment affects leukocyte circulation in healthy ying male subjects : a randomized single-blind two period crossover study. *Brain Behavior and Immunity.*, 19:318–324, 2005

[55] J. G. Quispe-Cabanillas, A. Damasceno, F. von Glehn, C. O. Brandao, B. P. Damasceno, W. D. Silveira, and L. M. Santos. Impact of electroacupuncture on quality of life for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis under treatment with immunomodulators: a randomized study. *BMC Complement Altern Med*, 12:209, 2012

[56] K. Pilkington. Acupuncture therapy for psychiatric illness. *Int Rev Neurobiol*, 111:197–216, 2013

[57] Y. F. Chen, J. H. Liu, N. G. Xu, Z. H. Liang, Z. H. Xu, S. J. Xu, and W. B. Fu. Effects of acupuncture treatment on depression insomnia: a study protocol of a multicenter randomized controlled trial. *Trials*, 14:2, 2013

oricamente, existem duas categorias principais de controlo na acupunctura: a acupunctura *sham*, que envolve a utilização de agulhas que penetram a pele mas em locais da pele ao acaso, que não os considerados pontos de acupunctura e, por outro lado, a acupunctura placebo em que as agulhas não penetram a pele, ou seja, é evidente ao destinatário da técnica que a mesma não lhe foi aplicada, o que na prática não é exequível. A acupunctura *sham* ao utilizar agulhas que penetram a pele superficialmente, ainda que em locais ao acaso, provoca por si só alguns efeitos, o que na realidade deixa de poder ser considerado um grupo controlo pois não é totalmente isento de efeitos. É, de facto, difícil encontrar sobre a pele um local que não seja perto de outros pontos de acupunctura, ou pontos que interfiram com o meridiano, ou mesmo qualquer local na pele que não tenha influência a sua punctura. Ou seja, vários estudos indicam que mesmo a acupunctura *sham* pode induzir respostas em vários níveis do sistema nervoso central [58].

[58] D. Zhu, Y. Gao, J. Chang, and J. Kong. Placebo acupuncture devices: considerations for acupuncture research. evidence-based complementary and alternative medicine. *eCAM*, 2013

[42] T. S. Pavao, P. Vianna, M. M. Pillat, A. B. Machado, and M. E. Bauer. Acupuncture is effective to attenuate stress and stimulate lymphocyte proliferation in the elderly. *Neurosci Lett*, 484(1):47–50, 2010

Embora ainda não esteja claro até que ponto as alterações imunológicas positivas possam traduzir melhorias concretas em aspectos relevantes da saúde, é possível mostrar a potência da combinação sinérgica de intervenções psicológicas e fisiológicas. No estudo de Pavao et al., (2010), a intervenção da acupunctura permitiu, não só a redução significativa dos sintomas de stress, ansiedade e depressão de doze adultos jovens (entre 23 e 38 anos) e de doze idosos (entre 60 e 81 anos), mas também o aumento da população linfocitária [42].

Assim, o tratamento com acupunctura pode proporcionar o máximo de benefícios sem o lado dos efeitos secundários, tais como infecções locais que, como vimos no presente estudo, pudemos descartar ao serem cumpridas todas as medidas de segurança e higiene. Também sabemos que alguns dos parâmetros que poderão ter uma influência significativa neste estudo não foram avaliados, como sejam o tipo de alimentação de cada indivíduo que

pudesse alterar o estado fisiológico basal de moléculas e, consequentemente, das suas células, que respondem a estes mecanismos bioquímicos, como sejam as estudadas aqui. Existem, neste sentido, vários estudos que evidenciam os benefícios da acupuntura na obesidade, uma epidemia inflamatória mundial que se tornou numa prioridade da saúde pública para a qual existe uma necessidade de tratamentos eficazes, como é o exemplo de um estudo que evidência a relação entre a actividade anti-inflamatória e a eficácia da acupuntura para o tratamento da obesidade [59].

A acupuntura também tem sido considerada como uma importante abordagem terapêutica da artrite reumatóide (AR), uma doença inflamatória relacionada com o sistema imunológico que afecta 1% da população em todo o mundo e que está associada ao comprometimento funcional, à permanente incapacidade motora e ao aumento da mortalidade [52].

Partindo de base com os resultados deste trabalho e, uma vez que o perfil imunológico em pessoas saudáveis não foi alterado após a realização de acupuntura, considera-se interessante, futuramente, estudar a resposta imunitária de um grupo de idosos activos à vacinação da gripe sazonal acompanhada de sessões de acupuntura. Escolher-se-ia um grupo de idosos, uma vez que é o grupo etário que adere mais à vacinação contra a gripe sazonal, sendo esta um estímulo de resposta por parte do sistema imunitário. Com isto, pretender-se-ia a realização de uma análise imunológica antes e após a acupuntura em relação a um grupo controlo que, neste caso, seria um grupo de idosos com vacinação mas sem realização de sessões de acupuntura. Assim, poder-se-ia entender mais concretamente se existe um reforço da resposta imunitária no grupo de idosos submetidos a vacinação e acupuntura em relação aos que apenas realizaram vacinação, enfatizando a importância da acupuntura no reforço de resposta do sistema imunitário.

[59] C. Z. Song, Q. W. Wang, and C. C. Song. Does acupuncture modulate anti-inflammation via haemorphin in obesity? *Acupunct Med*, 2014 [52] P. Zhang, J. Li, Y. Han, X. W. Yu, and L. Qin. Traditional chinese medicine in the treatment of rheumatoid arthritis: a general review. *Rheumatol Int*, 30(6):713–8, 2010

Apesar da existência de várias evidências científicas que vêm enaltecer o papel da acupuntura como uma prática, mais do que alternativa, complementar à medicina ocidental, estudos mais aprofundados, com aumento da casuísta, com grupos bem definidos, homogêneos e controlados são necessários, de forma a comprovar a eficácia científica da acupuntura e, assim, ser possível aplicar esta técnica em total segurança e com efeitos benéficos comprovados. O objectivo principal é ser possível conjugar todas as armas terapêuticas ao nosso alcance para se desempenhar um papel cada vez mais importante no tratamento de várias doenças do sistema imunitário, de forma a beneficiar sempre o doente: “ a saúde do meu doente será sempre a minha primeira preocupação” – Hipócrates.

**NIH** National Institute of Health

**WHO** World Health Organization

**MTC** Medicina Tradicional Chinesa

**FDA** Food and Drug Administration

**NIHCDP** Consensus Development Panel

**AAMA** American Academy of Medical Acupuncture

**VIP** Peptídeo intestinal vasoactivo

**NGF** factor de crescimento neural

**VGF** factor de crescimento vascular

**SNC** Sistema Nervoso Central

**CPM** Cornos Posteriores de Medula

**GABA** Gamma aminobutiric acid

**TENS** Estimulação Nervosa Elétrica transcutânea

**NCCAM** National Center for Complementary and Alternative Medicine

**RMf** Ressonância Magnética funcional

**PET** Tomografia de Emissão de Positrões

**BCR** B-cell-receptor

**Th** T helper

**Tc** T cytotoxic

**NK** Natural Killer

**TNFR** Receptor do factor de necrose tumoral

**IFN** Interferão

## *LISTA DE ACRÓNIMOS*

---

**AA** Antes da Acupunctura

**DA** Depois da Acupunctura

---

## Bibliografia

- [1] Y. Chen, X. Zhang, Y. Fang, and J. Yang. Analyzing the study of using acupuncture in delivery in the past ten years in china. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014:672508, 2014.
- [2] Wen TS. *Acupuntura Clássica Chinesa*. Editora Cultrix, São Paulo, Brasil, 1985.
- [3] Ramey D. A true history of acupuncture. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, pages 269–273, 2004.
- [4] Ma KW. The roots and development of chinese acupuncture: from prehistory to early 20th century. *Acupunct Med*, 10(92):92–99, 1992.
- [5] T. J. Kaptchuk. Acupuncture: theory, efficacy, and practice. *Ann Intern Med*, 136(5):374–83, 2002.
- [6] Yamamura Y. *Acupuntura Tradicional: A arte de inserir*. Roca Medicina, São Paulo, Brasil, 1ª edition, 1993.
- [7] H. W. Yuan, L. X. Ma, D. D. Qi, P. Zhang, C. H. Li, and J. Zhu. The historical development of concept from classics of traditional chinese medicine to modern research: Exploitation of the connotation of in chinese medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:639302, 2013.
- [8] Ferreira AA. *A Acupuntura na Medicina*. LIDEL, Lisboa, 2010.

- [9] Silvério Cabrita AM. Buracos de acupuntura: da estrutura à função. *Revista Portuguesa de Terapêutica Integrada*, 2014.
- [10] Bechara GH Scognamillo-Szabó MV. Acupuntura: histórico, bases teóricas e sua aplicação em medicina veterinária. *Ciência Rural*, 40(2):491–500, 2010.
- [11] Orley Dulcetti Junior. *Pequeno Tratado de Acupuntura Tradicional Chinesa*. Oficinas Gráficas da Organização Andrei Editora Lda, São paulo, Brasil, 2001.
- [12] A. White and E. Ernst. A brief history of acupuncture. *Rheumatology (Oxford)*, 43(5):662–3, 2004.
- [13] V. S. Sierpina and M. A. Frenkel. Acupuncture: a clinical review. *South Med J*, 98(3):330–7, 2005.
- [14] B. Kavoussi and B. E. Ross. The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. *Integr Cancer Ther*, 6(3):251–7, 2007.
- [15] Zhan X. Acupuncture: Review and analysis of reports on controlled clinical trials. *World Health Organization*, pages 1–87, 2002.
- [16] D. J. Mayer. Acupuncture: an evidence-based review of the clinical literature. *Annu Rev Med*, 51:49–63, 2000.
- [17] K. Lewis and S. Abdi. Acupuncture for lower back pain: a review. *Clin J Pain*, 26(1):60–9, 2010.
- [18] A. Aron-Maor and Y. Shoenfeld. Alternative therapies in rheumatic diseases—pros and cons. *Lupus*, 10(7):453–6, 2001.
- [19] E. S. Yang, P. W. Li, B. Nilius, and G. Li. Ancient chinese medicine and mechanistic evidence of acupuncture physiology. *Pflugers Arch*, 462(5):645–53, 2011.

- [20] K. Vanderploeg and X. Yi. Acupuncture in modern society. *J Acupunct Meridian Stud*, 2(1):26–33, 2009.
- [21] S. K. Kim and H. Bae. Acupuncture and immune modulation. *Auton Neurosci*, 157(1-2):38–41, 2010.
- [22] F. J. Zijlstra, I. van den Berg-de Lange, F. J. Huygen, and J. Klein. Anti-inflammatory actions of acupuncture. *Mediators Inflamm*, 12(2):59–69, 2003.
- [23] Vernejoul P. Darras JC, Albarède P. Nuclear medicine investigation of transmission of acupuncture information. *Acupuncture in Medicine*, 11(1):22–28, 1993.
- [24] M. T. Cabyoglu, N. Ergene, and U. Tan. The mechanism of acupuncture and clinical applications. *Int J Neurosci*, 116(2):115–25, 2006.
- [25] Helene M Langevin and Jason A Yandow. Relationship of acupuncture points and meridians to connective tissue planes. *The Anatomical Record*, 269(6):257–265, 2002.
- [26] Hecker HU. Steveling A. Peuker ET. Kastner J. *Prática de Acupuntura*. Rio de Janeiro, Brasil, 2007.
- [27] TF Su, LH Zhang, Miao Peng, CH Wu, Wen Pan, Bo Tian, Jing Shi, Hui-lin Pan, and Man Li. Cannabinoid cb2 receptors contribute to upregulation of b-endorphin in inflamed skin tissues by electroacupuncture. *Molecular pain*, 7:98, 2011.
- [28] L. Manni, M. Albanesi, M. Guaragna, S. Barbaro Paparo, and L. Aloe. Neurotrophins and acupuncture. *Auton Neurosci*, 157(1-2):9–17, 2010.
- [29] H. H. Moffet. How might acupuncture work? a systematic review of physiologic rationales from clinical trials. *BMC Complement Altern Med*, 6:25, 2006.

- [30] K. K. Hui, J. Liu, N. Makris, R. L. Gollub, A. J. Chen, C. I. Moore, D. N. Kennedy, B. R. Rosen, and K. K. Kwong. Acupuncture modulates the limbic system and subcortical gray structures of the human brain: evidence from fmri studies in normal subjects. *Hum Brain Mapp*, 9(1):13–25, 2000.
- [31] Pacheco FC Arosa FA, Cardoso EM. Fundamentos de imunologia. *LIDEL, Lisboa*, 2007.
- [32] J. Pereira de Moura, M. Santos Rosa, V. Alves, A. Mota Pinto, V. Rodrigues, J. M. Silva, and J. J. Alves de Moura. [cd4+, cd8+ and cd19+ cells in individuals with dyslipidemia]. *Acta Med Port*, 26(6):676–82, 2013.
- [33] Ribatti D Crivellato E, Vacca A. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends in Immunology*, 25:210–7, 2004.
- [34] O'Farrel C Doherty DG. Innate and adaptative lymphoid cells in the human liver. *Immunological Reviews*, 174:5–20, 2000.
- [35] Chen W Wahl SH, Vazquez N. Regulatory t cells and transcription factors: gatekeepers in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 16:768–774, 2004.
- [36] Abbas AK Bluestone JA. Natural versus adaptive regulatory t cells. *Nature Reviews in Immunology*, 3:253–257, 2003.
- [37] Mota I Silva WD. Bier imunologia básica e aplicada. *Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 2003.
- [38] Campos HS. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide. *Revista Brasileira de Pneumologia Sanitaria.*, 15(1):47–60, 2007.
- [39] M. Brown and C. Wittwer. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*, 46(8 Pt 2):1221–9, 2000.

- [40] Takashi Takahashi, Hiroyuki Sumino, Tsugiyasu Kanda, Nubuo Yamaguchi. Acupuncture modifies immune cells. *J Exp Clin Med*, 1(1):5, 2009.
- [41] F. Ye, D. Liu, S. Wang, and L. Xu. Effects of electroacupuncture on t cell subpopulations, nk activity, humoral immunity and leukocyte count in patients undergoing chemotherapy. *J Tradit Chin Med*, 27(1):19–21, 2007.
- [42] T. S. Pavao, P. Vianna, M. M. Pillat, A. B. Machado, and M. E. Bauer. Acupuncture is effective to attenuate stress and stimulate lymphocyte proliferation in the elderly. *Neurosci Lett*, 484(1):47–50, 2010.
- [43] Kou W, Bell JD, Gareus I, Pacheco-Lopez G, Goebel MV, Spahn G et al. Repeated acupuncture treatment affects leukocyte circulation in healthy ying male subjects : a randomized single-blind two period crossover study. *Brain Behavior and Immunity*, 19:318–324, 2005.
- [44] N. Yamaguchi, T. Takahashi, M. Sakuma, T. Sugita, K. Uchikawa, S. Sakaiharu, T. Kanda, M. Arai, and K. Kawakita. Acupuncture regulates leukocyte subpopulations in human peripheral blood. *Evid Based Complement Alternat Med*, 4(4):447–53, 2007.
- [45] C. K. Kim, G. S. Choi, S. D. Oh, J. B. Han, S. K. Kim, H. J. Ahn, H. Bae, and B. I. Min. Electroacupuncture up-regulates natural killer cell activity identification of genes altering their expressions in electroacupuncture induced up-regulation of natural killer cell activity. *J Neuroimmunol*, 168(1-2):144–53, 2005.
- [46] T. Hisamitsu, T. Kasahara, T. Umezawa, T. Ishino, and N. Hisamitsu. The effect of acupuncture on natural killer cell activity. *International Congress Series*, 1238:125–131, 2002.

- [47] G. S. Choi, S. D. Oha, J. B. Han, H. S. Bae, Y. W. Cho, Y. S. Yun, W. K. Lee, H. J. Ahn, and B. I. Min. Modulation of natural killer cell activity affected by electroacupuncture through lateral hypothalamic area in rats. *Neurosci Lett*, 329(1):1–4, 2002.
- [48] Y. Yu, T. Kasahara, T. Sato, S. Y. Guo, Ya Liu, K. Asano, and T. Hisamitsu. Enhancement of splenic interferon-gamma, interleukin-2, and nk cytotoxicity by s36 acupoint acupuncture in f344 rats. *Jpn J Physiol*, 47(2):173–8, 1997.
- [49] W. Lu, UA. Matulonis, A. Doherty-Gilman, H. Lee, E. Dean-Clover, A. Rosulek, and et al. Acupuncture for chemotherapy-induced neutropenia in patients with gynecologia malignancies: a pilot randomized, sham-controlled clinical trial. *Journal Alternative Complementary Medicine.*, 15(7):745–753, 2009.
- [50] AS. Ferreira, JGM. Lima, TPT. Ferreira, CMT. Lopes, and R. Meyer. Prophylactic effects of short-term acupuncture on zusanli (st36) in wistar rats lipopoly saccharide induced acute lung injury. *Journal of Chinese Integrative Medicine.*, 7(10):969–975, 2009.
- [51] YL. Lian, CY. Chen, M. Hammes, and BC. Kolster. *Atlas Gráfico de Acupuntura*. H.F.Ullmann, Slovenia, 2005.
- [52] P. Zhang, J. Li, Y. Han, X. W. Yu, and L. Qin. Traditional chinese medicine in the treatment of rheumatoid arthritis: a general review. *Rheumatol Int*, 30(6):713–8, 2010.
- [53] J. Roberts, A. Huissoon, J. Dretzke, D. Wang, and C. Hyde. A systematic review of the clinical effectiveness of acupuncture for allergic rhinitis. *BMC Complement Altern Med*, 8:13, 2008.
- [54] T. Sato, Y. Yu, S. Y. Guo, T. Kasahara, and T. Hisamitsu. Acupuncture stimulation enhances splenic natural killer cell cytotoxicity in rats. *Jpn J Physiol*, 46(2):131–6, 1996.

- [55] J. G. Quispe-Cabanillas, A. Damasceno, F. von Glehn, C. O. Brandao, B. P. Damasceno, W. D. Silveira, and L. M. Santos. Impact of electroacupuncture on quality of life for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis under treatment with immunomodulators: a randomized study. *BMC Complement Altern Med*, 12:209, 2012.
- [56] K. Pilkington. Acupuncture therapy for psychiatric illness. *Int Rev Neurobiol*, 111:197–216, 2013.
- [57] Y. F. Chen, J. H. Liu, N. G. Xu, Z. H. Liang, Z. H. Xu, S. J. Xu, and W. B. Fu. Effects of acupuncture treatment on depression insomnia: a study protocol of a multicenter randomized controlled trial. *Trials*, 14:2, 2013.
- [58] D. Zhu, Y. Gao, J. Chang, and J. Kong. Placebo acupuncture devices: considerations for acupuncture research. evidence-based complementary and alternative medicine. *eCAM*, 2013.
- [59] C. Z. Song, Q. W. Wang, and C. C. Song. Does acupuncture modulate anti-inflammation via haemorphin in obesity? *Acupunct Med*, 2014.