

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAROLINE CADORE RAMIRES

**EFEITO DA ACUPUNTURA NOS TRANSTORNOS DE HUMOR E MEMÓRIA
INDUZIDOS POR NEUROPATIA PERIFÉRICA, ASSOCIADA OU NÃO AO
TRATAMENTO COM GABAPENTINA.**

Uruguiana

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAROLINE CADORE RAMIRES

**EFEITO DA ACUPUNTURA NOS TRANSTORNOS DE HUMOR E MEMÓRIA
INDUZIDOS POR NEUROPATIA PERIFÉRICA, ASSOCIADA OU NÃO AO
TRATAMENTO COM GABAPENTINA.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dra. Morgana Duarte da Silva.

Uruguaiiana

2019

CAROLINE CADORE RAMIRES

**EFEITO DA ACUPUNTURA NOS TRANSTORNOS DE HUMOR E MEMÓRIA
INDUZIDOS POR NEUROPATIA PERIFÉRICA, ASSOCIADA OU NÃO AO
TRATAMENTO COM GABAPENTINA.**

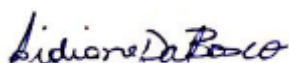
Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Ciências Biológicas II.

Dissertação defendida e aprovada em: 21 de janeiro de 2019.

Banca Examinadora:

Profa. Dr^a. Morgana Duarte da Silva.
Orientadora
(PMPGCF / Unipampa)



Prof. Dr^a. Lidiane Dal Bosco
Membro Titular
(PMPGCF / Unipampa)

Prof. Dr^a. Angela Kemel Zanela
Membro Titular
(Unipampa)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família, pelo apoio mesmo nos momentos mais difíceis, pelo crédito e confiança na minha vocação, pelo incentivo dado (cada um à sua maneira). Amo vocês.

À professora Morgana, minha segunda mãe, minha orientadora, que aceitou o desafio da minha orientação, na medida do possível (risos). Agradeço os ensinamentos, as “chamadinhas” e piadinhas maravilhosas em dia de experimento. Espero que mesmo longe, não esqueça de mim e ainda possa aprender mais com você.

Ao meu grupo de pesquisa, GP Morgs, sem vocês esses resultados não estariam aqui! Em especial ao meu IC preferido, Leandro, você foi, simplesmente, fundamental! Pela companhia, por não medir esforços, ser dedicado e especial. Espero que me desculpe pelas broncas e falta de paciência!

Ao Rafael e ao Daniel, meus colegas de grupo de pesquisa e de multicêntrico, que ajudaram nos experimentos, coleta de material e discussões, parceria e bom humor.

À professora Eloá, meu segundo “pai”, que tentou me mostrar como é realmente ser uma pessoa organizada, por ser gentil em todos os momentos, pelos ensinamentos e por mostrar que quando os experimentos dão errado pela manhã, é melhor ir para casa.

À Ângela, que me acolheu na fisioterapia, acredita no meu potencial, me apresentou o maravilhoso mundo da acupuntura e por ser uma pessoa tão boa.

Aos meus colegas da Pós-Graduação, por dividirem comigo os momentos acadêmicos desses 2 anos, pelas risadas e angústias divididas e se tornarem meus amigos. Vocês foram muito importantes.

À Niége Alves (Ni), minha querida amiga de anos e colega de mestrado, pelas cumplicidades de uma amizade, aceitar o desafio de ir comigo para a UFRGS, pela força e determinação até nos momentos mais controversos, pelas conversas e por me ensinar a realizar grande parte dos testes comportamentais que estão nesse trabalho.

À Letícia (Lê), por ser minha terceira mãe, que cuidou de mim em Minas Gerais, descobriu que a razão das minhas reclamações são sempre fome, por me lembrar de fazer listinhas, ter foco e metas. Obrigada pelos momentos.

Ao pessoal dos laboratórios de pesquisa do Prof. Vanderlei e GPFIS, por ceder os espaços para que as análises e procedimentos cirúrgicos fossem feitos.

À professora Simone Pinton e à Anne, pelas análises de BDNF.

À professora Fran e à Verônica, da UNISUL, que me receberam muito bem em Santa Catarina

Aos professores do Multicêntrico das universidades que visitei pelos ensinamentos deste período.

Ao Laboratório de Dor e Analgesia, da UFMG, por abrirem as portas do laboratório para que eu pudesse aprender mais sobre avaliações de dor em animais, em especial, ao Douglas e ao

Daniel, que em conversas descomprometidas ajudaram a melhorar meu trabalho e deram ideias para os próximos passos. Obrigada.

À Universidade Federal do Pampa, CNPq, FAPERGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo apoio financeiro.

RESUMO

As neuropatias periféricas causam dor crônica e estão associadas a alterações de memória e emocionais tais como depressão e ansiedade. Esses fatores se relacionam com a expressão de marcadores cerebrais, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O tratamento da dor crônica ocorre frequentemente com uso de fármacos. No entanto, tratamentos como a acupuntura podem ser uma terapêutica eficaz neste problema, associada ou não a fármacos existentes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da acupuntura, no acuponto SP6 (Sanyinjiao), isoladamente ou associada ao tratamento diário com gabapentina, sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, bem como os transtornos de humor e memória induzidos pela ligadura parcial do nervo ciático (LPNC) em camundongos. Os procedimentos foram previamente aprovados pelo comitê de ética da UNIPAMPA (n. 038/2017) e realizados em etapas: 1) grupos Falso Operado (FO), Operado (OP – com LPNC) e Acupuntura (LPNC + tratamento com SP6), n=8. O grupo SP6 foi tratado três vezes por semana. Os testes de hipersensibilidade mecânica e térmica foram avaliados diariamente. Após 5 e 10 sessões de acupuntura, os animais foram avaliados no teste de suspensão da cauda (TSC), labirinto em cruz elevado (LCE) e esquivas inibitórias (EI), e seus hipocampus removidos para análise de BDNF por ELISA. Etapa 2 - foram adicionados grupos com LPNC: gabapentina (GB - 10mg/kg, via oral - vo), dose sub efetiva de 5mg/kg vo (GBP1/2) e dose sub efetiva associada à acupuntura (GBP1/2+SP6). Após 10 sessões de acupuntura, os animais foram avaliados no TSC, teste do nado forçado (TNF), LCE e EI, e seus hipocampus removidos para análise de BDNF. A acupuntura reduziu a hipersensibilidade mecânica e térmica e aumentou o tempo de latência do teste da EI, após 30 minutos do treino, com 5 e 10 sessões, induzidos pela LPNC. Ainda, com 10 sessões, houve redução do tempo de imobilidade no TSC e aumento do tempo de latência na EI após 24 horas do treino. Pode-se verificar, que em ambos os tempos avaliados, o SP6 aumentou os níveis de BDNF do hipocampo. Posteriormente, verificamos redução da hiperalgesia mecânica nos grupos GB, GBP1/2 e GBP1/2+SP6. Ainda, os grupos tratados com GB e GBP1/2+SP6 reduziram apenas o tempo de imobilidade no TSC e no TNF. Nenhum dos grupos adicionais modificou a redução de BDNF induzida pela LPNC. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos SP6 e GBP1/2+SP6. Podemos concluir que a acupuntura foi eficaz na redução da hiperalgesia e de problemas como depressão e distúrbios de memória, associados a neuropatia periférica. A associação da GB não contribuiu para aprimorar o efeito da acupuntura em nenhuma das análises observadas, interferindo ainda nos resultados de memória aversiva e nos níveis de BDNF.

Palavras-chaves: Neuropatia, Depressão, Ansiedade, Memória, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

ABSTRACT

Peripheral neuropathies cause chronic pain, which are associated with cognitive, memory and emotional changes, such as depression and anxiety. These factors are related to the expression of brain markers, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The treatment of chronic pain often occurs with the use of drugs. However, treatments such as acupuncture may be an effective therapy in this problem, whether or not associated with existing drugs. Thus, the aim of this study was to verify the effect of acupuncture on acupuncture SP6 (Sanyinjiao), alone or in combination with daily gabapentin treatment, on hypersensitivity, as well as mood and memory disorders induced by partial sciatic nerve ligation (LPNC) in mice. The procedures were previously approved by the ethics committee of UNIPAMPA (n. 038/2017) and performed in stages: 1) False Operated (FO), Operated (OP - with LPNC) and Acupuncture (LPNC + treatment with SP6) groups n=8. The SP6 group was treated three times a week. The mechanical and thermal hypersensitivity tests were evaluated daily. After 5 and 10 treatments with acupuncture, the animals were evaluated in the tail suspension test (TSC), plus maze (PM) and inhibitory avoidance (EI), and their hippocampi removed for BDNF analysis by ELISA. In group 2, groups with gabapentin (GB - 10mg / kg, oral), sub-effective dose of 5mg / kg (GBP1 / 2) and sub-effective dose associated with acupuncture (GBP1 / 2 + SP6) were added. After 10 treatments with acupuncture, the animals were evaluated in the TSC, forced swimming test (TNF), PM and EI, and their hippocampus removed for BDNF analysis. Acupuncture reduced mechanical and thermal hypersensitivity, reduced immobility time in TSC, and increased LAI latency time after 30 minutes of training with 5 and 10 treatments induced by LPNC. Still, with 10 treatments, there was an increase in the latency time in IE after 24 hours of training. It can be verified that in both evaluated times, the SP6 increased the hippocampal BDNF levels. Subsequently, we verified reduction of mechanical hyperalgesia in the groups GB, GBP1/2 and GBP1/2+SP6. Furthermore, the groups treated with GB and GBP1/2+SP6 reduced only the time of immobility in TSC and TNF. None of the additional groups modified the reduction of BDNF induced by LPNC. No statistical differences were observed between groups SP6 and GBP1/2+SP6. We can conclude that acupuncture was effective in reducing hyperalgesia and problems such as depression and memory disorders associated with peripheral neuropathy. The association of GB did not contribute to improve the effect of acupuncture in any of the observed analyzes, still interfering in the results of aversive memory and BDNF levels.

Keywords: Neuropathy, Depression, Anxiety, Memory, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos experimentais de dor neuropática em ratos e camundongos.	18
Figura 2. Design experimental da primeira etapa.....	29
Figura 3. Design experimental da segunda etapa.....	30
Figura 4. Aplicação da agulha de acupuntura no acuponto SP6.....	32
Figura 5. Representação esquemática da aplicação dos filamentos de von Frey.....	33
Figura 6. Representação esquemática da aplicação do teste da acetona.	34
Figura 7. Representação esquemática dos comportamentos de mobilidade (A) e imobilidade (B) no teste da suspensão pela cauda.	35
Figura 8. Representação esquemática dos comportamentos de mobilidade (A) e imobilidade (B) no teste do nado forçado.....	36
Figura 9. Representação esquemática do camundongo na porção central do labirinto em cruz elevado.....	37
Figura 10. Representação esquemática das posições de latência (A) e teste (B) na esQUIVA inibitória.....	38
Figura 11: Efeito do tratamento acupuntura sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio na pata de camundongos com neuropatia periférica induzida por LPNC.....	40
Figura 12: Efeito do tratamento com acupuntura no SP6 no perfil comportamental de depressão, ansiedade e problemas de memória induzidos pela LPNC.....	42
Figura 13: Expressão de BDNF no hipocampo de camundongos com neuropatia periférica após cinco e dez tratamentos com acupuntura no acuponto SP6.....	43

Figura 14: Efeito do tratamento com acupuntura, gabapentina, gabapentina em dose subefetiva e associação da terapia com acupuntura e dose subefetiva sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio na pata de camundongos com neuropatia periférica induzida por LPNC.....45

Figura 15: Efeito do tratamento com acupuntura no SP6 no perfil comportamental de depressão, ansiedade e problemas de memória induzidos pela LPNC.....47

Figura 16: Expressão de BDNF no hipocampo de camundongos com neuropatia após tratamento com acupuntura, gabapentina, gabapentina em dose subefetiva e associação da terapia com acupuntura e dose subefetiva.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

ADT – Antidepressivo Tricíclico

AVE – Acidente Vascular Encefálico

BA – Braços Abertos do aparato do labirinto em cruz elevado

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CEUA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CPNC – Constrição Parcial do Nervo Ciático

EI – Esquiva Inibitória

FO- Falso Operado

GBP- Gabapentina dose efetiva

GBP1/2- Gabapentina dose sub efetiva

GBP1/2+SP6- Gabapentina dose sub efetiva mais acupuntura

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IL – Interleucina

IRSN – Inibidores de Recaptação de Serotonina-Noradrenalina

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

LPNC – Ligadura Parcial do Nervo Ciático

NP – Neuropatia Periférica

OMS – Organização Mundial da Saúde

OP- Operadp

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SP6 – acupontos Sspleen 6 ou Sanyinjiao

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TNF – Teste do Nado Forçado

TSC – Teste de Suspensão da Cauda

UNIPAMPA – Universidade Federal do Pampa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVO	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivo específico.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1.Dor neuropática.....	16
3.1.1. Modelos animais de neuropatia periférica.....	18
3.2.Distúrbios de humor e memória associados a dor crônica.....	19
3.3. Hipocampo e BDNF.....	20
3.4 Tratamentos da dor neuropática.....	21
3.4.1 Farmacológico.....	21
3.4.2 Acupuntura.....	24
4. METODOLOGIA.....	27
4.1.Animais.....	27
4.2.Modelo de indução de dor neuropática.....	28
4.3 Delineamento experimental.....	28
4.4 Tratamentos.....	31
4.4.1 Tratamento farmacológico.....	31
4.4.2 Tratamento com acupuntura no acuponto SP6.....	31
4.4.3 Avaliações comportamentais.....	32
4.4.4 Avaliação de hiperalgesia mecânica.....	32
4.4.5 Avaliação de hiperalgesia térmica ao frio.....	34
4.4.6 Avaliação do comportamento do tipo-depressivo.....	35
4.4.7 Avaliação de comportamento do tipo ansiedade.....	36
4.4.8 Avaliação de memória de curta e longa duração.....	37
4.5 Níveis de BDNF no hipocampo.....	38
4.6 Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1. Hipersensibilidades mecânica e térmica ao frio, em camundongos, induzida por LPNC.....	39
5.2 Aspectos tipo-depressivo e transtornos de memória, em camundongos, induzidos por LPNC.....	41

5.3 Níveis de BDNF no hipocampo de camundongos com LPNC.....	43
5.4 Comparação do efeito da acupuntura com o tratamento farmacológico utilizando gabapentina, em diferentes doses, sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica, induzidas por LPNC em camundongos.....	44
5.5 Comparação do efeito da acupuntura com o tratamento farmacológico utilizando gabapentina, em diferentes doses, sobre os aspectos tipo-depressivo e ansiogênico e transtornos de memória, induzidas por LPNC em camundongos.....	46
5.6 Níveis de BDNF no hipocampo de camundongos com lesão neuropática tratados com gabapentina com dose terapêutica ou sub efetiva, associada ou não ao tratamento com acupuntura	48
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS	55
9. ANEXO I.....	73

1. INTRODUÇÃO

As neuropatias periféricas (NP) são decorrentes de trauma, lesão ou condição patológica que afeta os nervos, causando sintomas como a dor, além de perdas funcionais (VALLAT e MAGY, 2005). Grande parte da população mundial apresenta NP e o índice tende a aumentar com a crescente idade dos indivíduos (ENGLAND e ASBURY, 2004). Nas neuropatias crônicas os neurônios centrais ou periféricos alcançam o limiar para despolarização mais precocemente, gerando descargas que se amplificam e ativam células vizinhas. Diz-se então que, a dor crônica é um estado facilitatório de condução nervosa e estímulos inócuos podem ser interpretados como dor (alodínia) ou possuir resposta ao estímulo doloroso desproporcional à intensidade do mesmo (hiperalgesia) (BEURKE *et al.*, 2002; KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006; KEPLER *et al.*, 2013).

Outro fator a ser considerado acerca da dor crônica é que ela compartilha de mecanismos fisiopatológicos com os transtornos de humor e memória. Uma vez que, existe a ligação entre diferentes áreas encefálicas, como a amígdala e o hipotálamo, existe também a possibilidade de interligação entre depressão, ansiedade, déficits de memória e dor (MILLAN, 2002; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010; KINDLER *et al.*, 2010). Estudos envolvendo depressão associada à dor são mais numerosos, porém, a temática envolvendo dor crônica e depressão ainda necessita de abordagens adicionais. Também são necessários mais estudos que envolvam dor crônica na ansiedade, já que, clinicamente, é possível observar que, algumas vezes, pacientes apresentam depressão e ansiedade concomitantemente (GERRITS *et al.*, 2014; NIMNUAM; HOTOPF; DE HEER, 2014). A dor pode também estar associada a transtornos de memória, uma vez que as etapas para aquisição e consolidação da memória ocorrem em locais encefálicos envolvidos com outros processos neurobiológicos. Dentre eles estão incluídos distúrbios de humor, como depressão e ansiedade, e o processo que leva a percepção da dor, tornando a relação desses transtornos mais próxima (IZQUIERDO, 2002; SIMONS, 2016).

Apesar da sua ocorrência, as neuropatias periféricas possuem poucas terapias disponíveis com o intuito de solucioná-las, tornando seu manejo desafiador (KUJIPERS *et al.*, 2011). O tratamento farmacológico é, geralmente, uma das primeiras opções para redução da sintomatologia da neuropatia, a dor neuropática. Atualmente existem medicamentos considerados de primeira escolha, incluindo os antidepressivos e anticonvulsivantes, como a gabapentina. Os medicamentos de segunda e terceira linha para dor neuropática incluem

lidocaína tópica e opióides (GORE *et al.*, 2006; SADOSKY *et al.*, 2013). Na pesquisa atual, o medicamento escolhido para o tratamento farmacológico foi a gabapentina - droga anticonvulsivante utilizada em diferentes transtornos psiquiátricos e neurológicos como convulsões, enxaqueca, esquizofrenia, ansiedade e tremores (HUSSAIN e AFSHAN, 2008). Esse fármaco é um análogo estrutural do ácido gama-aminobutírico (GABA), agindo na captação ou no metabolismo desse neurotransmissor, sem atuar diretamente sobre os receptores gabaérgicos (GIDAL, 2006). Embora os medicamentos sejam eficazes na redução da dor, eles possuem efeitos adversos associados ao seu uso, principalmente no que diz respeito a dependência e tolerância, que levam o usuário a desvios de conduta e abuso farmacológico (FORNASSARI, 2017).

Tratamentos como a acupuntura, são usados para diversos objetivos na clínica e na pesquisa, sendo um importante modulador da dor, inclusive crônica (WAGNER, R.; MYERS, 1996; KRAYCHETE *et al.*, 2009). O mecanismo analgésico que envolve a estimulação periférica, através da agulha é bastante abrangente e promove estimulação do tronco encefálico e do hipotálamo, liberando neurotransmissores, como os opióides (SORKIN *et al.*, 1997). Porém, é possível que outros mecanismos de ação, tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto no periférico (SNP), ainda não tenham sido identificados. Além disso, muitos estudos avaliam o benefício clínico e eficácia a longo prazo da acupuntura no tratamento de comorbidades associadas à dor, como depressão, ansiedade e déficits de memória (CHAN *et al.*, 2015; GOYATÁ *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2018).

Neste contexto, o presente trabalho busca contribuir para o fornecimento de uma base científica sólida verificando o efeito da acupuntura no acuponto SP6, isoladamente ou associado ao tratamento com gabapentina, sobre os transtornos de humor e de memória induzidos por neuropatia periférica em camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Verificar o efeito da acupuntura no acuponto SP6 sobre os transtornos de humor e memória induzidos por neuropatia periférica, isoladamente ou associado ao tratamento com gabapentina.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se a ligação parcial do nervo ciático (LPNC) é capaz de induzir comportamentos tipo-depressivo e ansiogênico e transtornos de memória em camundongos;
- Verificar o efeito da acupuntura, realizada no acuponto SP6, sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica, os comportamentos tipo-depressivo, ansiogênico e os transtornos de memória em camundongos com neuropatia periférica;
- Analisar o efeito da acupuntura no SP6 sobre os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos com LPNC;
- Comparar o efeito da acupuntura, no acuponto SP6, com o tratamento farmacológico realizado com gabapentina, em diferentes doses, sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica, os comportamentos tipo-depressivo, ansiogênico e transtornos de memória, induzidas por LPNC em camundongos;
- Verificar o efeito do tratamento com acupuntura associado a uma sub efetiva do fármaco gabapentina sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica, os comportamentos tipo-depressivo e ansiogênico e transtornos de memória, induzidas por LPNC em camundongos;

- Averiguar os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos com lesão neuropática tratados com gabapentina com dose terapêutica ou sub efetiva, associada ou não ao tratamento com acupuntura.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O manuscrito que será escrito a partir dos resultados dessa dissertação será enviado para o “Journal of Affective Disorders”, periódico com impacto 3.786 e Qualis A2 na área de Ciências Biológicas II - CAPES.

3.1 Dor neuropática

Desde 2011, define-se a dor neuropática como àquela causada por uma lesão direta ou inflamação de nervos periféricos afetando o sistema somatossensorial (NAVARRO; VIVO; VALERO-CABRE, 2007; COLLOCA *et al.*, 2017). Clinicamente, a dor neuropática possui sintomas como dor espontânea e hipersensibilidade da área afetada em áreas adjacentes, o que pode acometer diretamente a qualidade de vida do paciente, incapacitando-o irreversível ou intermitentemente (ALLEMANN *et al.*, 2015). Algumas condições comuns associadas à dor neuropática incluem neuralgia pós-herpética, neuralgia do trigêmeo, radiculopatia dolorosa, neuropatia diabética, infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), hanseníase, amputação, dor por lesão de nervo periférico e por acidente vascular encefálico (AVE) - na forma de dor pós-AVE central (POSSO *et al.*, 2016).

A dor de origem neuropática tem incidência em 1 a 3% da população mundial (VAN HECKE *et al.*, 2014). Além disso, ocorre com mais frequência em mulheres (8% versus 5,7% em homens), em pacientes com mais de 50 anos de idade (8,9% versus 5,6% naqueles com menos de 49 anos de idade) e afeta, mais comumente, a parte inferior das costas e membros inferiores (BOUHASSIRA *et al.*, 2008). Mundialmente, observa-se a partir de dados levantados em diferentes países como Reino Unido, Estados Unidos, França e Brasil, por questionários próprios, que 7 a 10% da população possui dor crônica com característica neuropática (TORRANCE *et al.*, 2006; VAN HECKE *et al.*, 2014; BOUHASSIRA; ANTAL, 2011; BOUHASSIRA *et al.*, 2008).

O sistema nervoso periférico (SNP) é um conduto de comunicação entre o sistema nervoso central (SNC) e o restante do corpo, incluindo os receptores sensoriais, os nervos e gânglios

associados, bem como os plexos nervosos (VAN DE GRAAFF, 2001). Os nervos são classificados, de acordo com sua distribuição anatômica: os cranianos (12 pares) inervam estruturas da cabeça, e os espinais (31 pares) estão ligados à medula espinal por meio de raízes, posteriores e anteriores, e agrupados como - 8 cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sacrais e 1 coccígeo (DRAKE e MITCHELL, 2004). Há quatro plexos de nervos espinais: cervical, braquial, lombar e sacral (VAN DE GRAAFF, 2001). O plexo de interesse para este estudo é sacral de onde emerge o nervo ciático ou isquiático, que inerva todos os músculos do compartimento posterior da coxa, da perna e do pé (DRAKE; MITCHELL, 2004). As neuropatias que envolvem o nervo ciático são majoritariamente decorrentes de traumas, seja por compressão externa ou por lesão localizada. A compressão do nervo ciático inclui dor na coxa e glúteos, acentuada por movimento de flexão do quadril, adução e rotação interna e, pode ocorrer, debilidade dos músculos isquiotibiais (PARKER, 2002; BARON, 2009).

De acordo com a funcionalidade, um nervo pode ser motor, sensorial ou motor-sensorial (misto). O misto possui fibras nervosas sensoriais (aférentes), motoras (fibras eferentes) e autonômicas (fibras autonômicas). Essas fibras podem ainda ser classificadas de acordo com seu diâmetro em tipo A, B ou C. A patofisiologia dos distúrbios periféricos causadores de dor neuropática, envolvem em sua maioria fibras do tipo C, de pequeno diâmetro e baixa velocidade de condução, não mielinizadas e, fibras do tipo A mielinizadas (fibras A β e A δ) (KLUSAKOVA e DUBOVY, 2009; FINNERUP *et al.*, 2016).

Ainda é de extrema importância que se ressalte a associação entre dor neuropática e o aumento da prescrição de medicamentos e da necessidade de cuidados médicos (MOULIN *et al.*, 2014). Além disso, a dor neuropática periférica pode tornar-se mais comum devido ao envelhecimento da população mundial, ao aumento da incidência de diabetes mellitus, às taxas crescentes de câncer e às consequências da quimioterapia, já que estas doenças afetam todas essas fibras sensoriais (FREEMAN, 2009; STRAVOS e SIMPSON, 2014; THANKUR *et al.*, 2015). Geralmente, os pacientes experimentam parestesias, como queimação, sensação de “choques” e dor resultante de estímulos não nocivos (alodínia), que ao persistirem, tendem a se tornar crônicos e respondem menos aos analgésicos (BENER *et al.*, 2013). Como consequência, indivíduos com dor neuropática apresentam distúrbios do sono, ansiedade e depressão, uma vez que a qualidade de vida é mais prejudicada em pacientes com dor neuropática crônica do que naqueles com dor crônica não neuropática que não provém de nervos danificados ou irritados (ATTAL *et al.*, 2011; FINNERUP *et al.*, 2016).

3.1.1 Modelos animais de neuropatia periférica

A lesão no nervo ciático, em modelos animais, pode ser induzida de diferentes maneiras, incluindo injúria mecânica (secção, esmagamento ou compressão), química, metabólica ou imunológica dirigida ao nervo, gânglio ou medula espinal (SORKIN e YAKSH, 2009). O modelo de Constrição ou Ligadura Parcial do nervo ciático (CPNC ou LPNC) utilizado no presente trabalho é decorrente de uma lesão física (por compressão) dirigida ao nervo e simula uma contusão nervosa. A constrição é realizada usando uma agulha curva e fio de seda (8.0), com o objetivo de capturar em torno de um terço a metade do nervo, dessa forma, em torno de 50% das fibras do nervo são danificadas (SELTER *et al.*, 1990). A figura 1 demonstra as lesões especificamente geradas por trauma físico do nervo periférico, realizados em modelos experimentais em ratos e camundongos (KLUSAKOVA e DUBOVY, 2009).

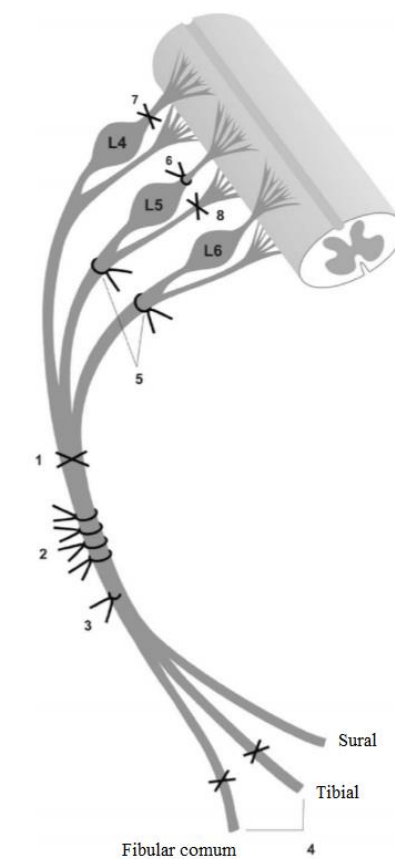


Figura 1: Modelos experimentais de dor neuropática em ratos e camundongos. A ilustração está baseada em danos mecânicos às estruturas nervosas periféricas sendo: (1) Transecção do nervo ciático (WALL *et al.*, 1979). (2) Lesão por constrição crônica (BENNET e XIE, 1988). (3) Ligadura parcial do nervo ciático (SELTZER *et al.*, 1990). (4) Modelo de lesão do nervo poupada (DECOSTERD e WOOLF, 2000). (5) Ligadura dos nervos espinais L5/L6 (KIM;

CHUNG, 1992). (6) Constricção da raiz dorsal (TABO *et al.*, 1999). (7) Rizotomia dorsal (LOMBARD *et al.*, 1979). (8) Rizotomia Ventral (LI *et al.*, 2002).

Fonte: Adaptado de Klusakova e Dubovy (2009).

3.2 Distúrbios de humor e memória associados a dor crônica

A dor crônica representa um potente risco para o desenvolvimento de transtornos de humor e memória, por diversos fatores que aumentam a recorrência desses episódios associados em indivíduos com dor (MILLAN, 2002; GUREJE *et al.*, 2008; MEANS- CHRISTENSEN *et al.*, 2008; SAITO; KAI). Com relação à depressão, existe uma associação bidirecional: a depressão é preditiva de dor persistente e vice-versa (BAIR *et al.*, 2003; OHAYON e SCHATZBERG, 2003; GUREJE *et al.*, 2008). Essa confluência pode ser explicada, pois, existem mecanismos fisiopatológicos compartilhados entre as doenças crônicas e os transtornos de humor, uma vez que, diferentes áreas do encéfalo, como a amígdala e o hipotálamo, desempenham papéis tanto na depressão quanto na dor (MILLAN, 2002; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010; KINDLER *et al.*, 2010)

Existem também evidências, ainda que limitadas, sobre o efeito de doenças e de dor crônica na ansiedade (NIMNUAM; HOTOPF; WESSELY, 2001; GERRITS *et al.*, 2014). É provável que essa associação seja igualmente importante, pois depressão e ansiedade geralmente aparecem juntas (DE HEER, 2014). Além disso, os transtornos de ansiedade e a dor crônica compartilham os processos cognitivos e comportamentais subjacentes, como o aumento da atenção para a ameaça (SAREEN *et al.*, 2005; ASMUNDSON; KATZ, 2009). Até agora, há pouco esclarecimento sobre o efeito de doenças crônicas, especialmente doenças específicas que gerem dor, e a recorrência associada a ela de depressão e ansiedade (NIMNUAM; HOTOPF; WESSELY, 2001).

Outro transtorno importante em indivíduos com dor crônica são os problemas associados a memória (DELLAROZA *et al.*, 2013). Para tanto, é importante ressaltar que a memória é o registro da representação de informações adquiridas através de experiências (SIMONS, 2016). Mais ainda, devido à quantidade de informações recebidas diariamente, apenas uma pequena porcentagem delas é duradoura. O fator que determina tal consolidação é a importância da informação, o grau de atenção e a emoção envolvida no momento da aquisição da mesma, portanto, “somos o que recordamos” (IZQUIERDO, 2002). Os paradigmas experimentais para a inibição dos comportamentos motivados pelo medo são conhecidos desde Pavlov (1927) e, embora suas bases neurais ainda não estejam adequadamente caracterizadas, seus princípios comportamentais são empregados no tratamento psiquiátrico em humanos. Mais

uma vez, estruturas cerebrais comuns às das dores crônicas, tais como, hipocampo e amígdala, participam da circuitaria dos processos emocionais e se interligam para a emissão dos comportamentos aversivos (MATHEWS, 1990; DOLAN, 2002).

3.3 Hipocampo e BDNF

A plasticidade alostática estrutural e funcional – homeostase através de mudanças - é particularmente evidente no hipocampo, uma estrutura localizada nos lobos temporais do encéfalo humano que é chave para memória e regulação do humor, sendo relacionada a questões emocionais complexas (McEWEN, 2007). A região do hipocampo está em meio a um circuito que regula respostas cognitivas e de humor, realizando comunicações com outras áreas como o córtex pré-frontal, amígdala, estriado e outros circuitos subcorticais. Dessa forma, lesões ou distúrbios no hipocampo podem promover alterações no comportamento emocional. De forma interessante, o hipocampo humano é menor em pacientes depressivos em comparação com indivíduos não depressivos (BOLDRINI *et al.*, 2014). Além disso, projeções do hipocampo que se direcionam à amígdala estão envolvidas nos processos de medo e interação social (ADHIKARI, TOPIWALA e GORDON, 2010; PADILLA-COREANO *et al.*, 2016). Sabe-se que a superexpressão de receptores de glicocorticóides (GR) no prosencéfalo durante o desenvolvimento neonatal aumenta a ansiedade e a labilidade afetiva quando adulto, bem como a superexpressão de fator liberador de corticotrofina (CRF). Ainda, a sustentação de níveis elevados de glicocorticóides, como em caso de estresse severo e da dor crônica, podem danificar os neurônios hipocampais, especialmente as células piramidais da região CA3. A natureza precisa desses danos ainda não está totalmente esclarecida, mas pode envolver uma redução na capacidade de ramificação dendrítica, perda de espinhos dendríticos altamente especializados onde os neurônios realizam sinapse glutamatérgica e até alterações na neurogênese (NESTLER *et al.*, 2002; AKIL *et al.*, 2018).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) está intimamente ligado à atividade do hipocampo. Essa proteína atua na promoção do desenvolvimento nervoso sendo a mais amplamente expressa no SNC, onde regula a sobrevivência e diferenciação neuronal e participa criticamente de mecanismos de plasticidade sináptica dependente de sua atividade (RIDDER *et al.*, 2005; MALETIC *et al.*, 2007). Estresse agudo e crônico diminuem os níveis de expressão de BDNF no giro denteado e na camada de células piramidais do hipocampo em roedores (NESTLER *et al.*, 2002). Níveis reduzidos de BDNF no encéfalo estão associados a patogênese da depressão e outros distúrbios cognitivos (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; LARSEN *et al.*,

2010). Ainda, encontra-se na literatura que duas semanas após a lesão do nervo poupado (SNI) ou lesão por constrição crônica (CCI), os níveis de BDNF diminuem no córtex cingulado, no estriado e no hipocampo, enquanto os níveis de outro fator neurotrófico, o fator de crescimento do nervo (NGF), aumentam nas mesmas regiões (AL-AMIN *et al.*, 2011). Esses trabalhos sugerem que os níveis de BDNF diminuídos podem participar da indução ou manutenção da depressão induzida por dor neuropática.

3.4 Tratamentos da dor neuropática

Pelo fato de compreender uma variedade de condições heterogêneas, a dor neuropática é frequentemente grave e de difícil manejo. Portanto, a eficiência das terapias utilizadas é de primordial importância. Além das utilizadas neste estudo, outras terapias são possibilidades para o tratamento da dor neuropática periférica. Alguns tratamentos emergentes, ainda estão em ensaios clínicos de fase II, como é o caso do tratamento com células tronco e agentes bloqueadores de canais de sódio seletivos para subtipos específicos (BRAZ *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015; EMERY; LUIZ; WOOD, 2016). Já os tratamentos intervencionistas, como bloqueios nervosos, podem ser utilizados em pacientes com dor refratária (CRUCRU *et al.*, 2007; DWORKIN *et al.*, 2013). A estimulação elétrica de baixa intensidade de grandes fibras A β mielinizadas é uma estratégia de neuromodulação com o objetivo de aliviar a dor (YEARWOOD *et al.*, 2010). Algumas técnicas de fisioterapia, envolvendo movimento e dessensibilização tátil e dolorosa, também podem ser utilizadas no tratamento da dor neuropática (KLUDING *et al.*, 2012; DOBSON; MCMILLAN; LI, 2014). Por fim, intervenções psicológicas têm como intuito o manejo eficiente da dor e de suas comorbidades quando o tratamento farmacológico é ineficaz (ECCLESTON *et al.*, 2014).

3.4.1. Farmacológico

Nos últimos 15 anos, diversas diretrizes com recomendações práticas baseadas em evidências foram publicadas com o intuito de auxiliar médicos a escolher tratamentos farmacológicos apropriados para o tratamento da dor neuropática (IOANNIDIS, 2005; CHALMERS *et al.*, 2014; DENG *et al.*, 2016). Atualmente, há consenso geral sobre quais medicamentos são apropriados para o tratamento de primeira linha da dor neuropática, enquanto o debate sobre medicamentos de segunda e terceira linha ainda está em aberto. Neste caso, opióides fracos e fortes, embora declarados eficazes no tratamento da dor neuropática, não são considerados uma primeira escolha por suas reações adversas e a preocupações com abuso,

tolerância e dependência. Uma vez em algum desses quadros, o paciente necessita de intervenção médica especializada, acompanhamento rigoroso e o tratamento se torna um grande gasto para o sistema público de saúde (DONWELL; HAEGERICH; CHOU, 2016). Os medicamentos de primeira linha para dor neuropática incluem antidepressivos, sendo exemplos os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina (IRSNs), e anticonvulsivantes que atuam nos canais de cálcio como a pregabalina e a gabapentina (FINNERUP; ATTAL; HAROUTOUNIAN *et al.*, 2015).

Originalmente, os antidepressivos começaram a ser usados no tratamento de dor crônica, pois alguns pacientes também estavam deprimidos e, essas drogas aliviam ambos problemas, dor e depressão. O conceito inicial do mecanismo de analgesia foi o de que essas drogas são capazes de potencializar a atividade das vias inibitórias descendentes, principalmente, a recaptação de serotonina e noradrenalina que as fibras descendentes liberam entre o nociceptor e o neurônio espinotalâmico (BEE; DICKENSON, 2009).

Os antidepressivos mais eficazes para a dor neuropática parecem ser os antidepressivos tricíclicos como a amitriptilina (FORNASSARI, 2017). Esses fármacos afetam múltiplos alvos e essa falta de seletividade contribui para sua eficácia (SUDOH *et al.*, 2003; FINNERUP *et al.*, 2015). Por outro lado, a multiplicidade de alvos dos ADTs é responsável, também, pelas inúmeras reações adversas limitantes de seu uso, por exemplo cardiotoxicidade, boca seca, hipotensão ortostática, constipação e retenção urinária (FORNASSARI, 2017). Com o objetivo de minimizar esses efeitos indesejáveis foram desenvolvidos novos fármacos, os IRSNs seletivos, como a duloxetina, que se mostrou mais eficaz no tratamento da dor neuropática (PELTIER; GOUTMAN; CALLAGHAN, 2014; FINNERUP *et al.*, 2015; REI; SCHAUERHAMER; BELLOWS, 2015).

A pregabalina e a gabapentina são derivadas do ácido gama-aminobutírico (GABA), mas não possuem efeito no sistema GABAérgico. Ambos mecanismos de ação incluem a ligação à subunidade α -2/ δ -1 de canais de cálcio voltagem dependentes do sistema nervoso central (SNC) e da medula espinhal, o que explica suas propriedades farmacológicas analgésicas, ansiolíticas e anticonvulsivantes (STAHL *et al.*, 2013; WIFFEN; DERRY; BELL *et al.* 2017). Canais de cálcio localizados em terminais pré-sinápticos controlam a liberação de neurotransmissores. Por serem sensíveis a diferença de voltagem, esses canais se abrem em resposta a potenciais de ação que surgem da periferia e permitem o influxo de íons cálcio, essencial para a fusão de vesículas sinápticas e liberação de neurotransmissores para a fenda sináptica. Os canais de cálcio controlados por voltagem são compostos de diferentes

subunidades: a subunidade α -2/ δ -1 é responsável pelo tráfego, localização e estabilização do canal na membrana plasmática. Sabe-se que o número de canais de cálcio dependentes de voltagem aumenta nas condições de dor neuropática e pode sustentar uma neurotransmissão aberrante na medula espinhal (LANDMARK, 2007; LANDMARK, 2008). Portanto, é provável que os gabapentinóides, ao se ligarem à subunidade α -2/ δ -1, desestabilizem o complexo que mantém o canal de cálcio na superfície do terminal pré-sináptico, promovendo sua internalização (STAHL *et al.*, 2013). Assim, os gabapentinóides não têm efeito direto sobre as correntes iônicas, mas influenciam o número de canais de cálcio disponíveis na membrana plasmática. Ainda, algumas estruturas do tronco encefálico, das quais se originam as fibras moduladoras descendentes, podem ser um alvo-chave da ação analgésica dos gabapentinóides, porque a expressão de α -2/ δ -1 é muito alta nessas áreas (FORNASSARI, 2017).

A lidocaína é relativamente eficaz e de bom perfil de tolerabilidade em pacientes com neuralgia pós-herpética e alodinia, bem como em pacientes com alodinia decorrente de dor neuropática localizada, incluindo neuralgia pós-herpética, neuropatia diabética dolorosa, dor pós-cirúrgica e pós-traumática relacionada à incisão da pele (DWORKIN *et al.*, 2010; BARON *et al.*, 2016). Sua aplicação tópica, possui vantagens, uma vez que apresenta menor absorção sistêmica e interações medicamentosas. Porém, efeitos adversos ainda são observados quanto a reações cutâneas locais leves devido à aplicação. Mesmo assim, pode ser particularmente benéfica em pacientes idosos (BARON *et al.*, 2016). Esse anestésico têm a capacidade de bloquear canais de sódio voltagem dependentes expressos pelas fibras nervosas, responsáveis pela propagação dos potenciais de ação. Os números, localização, expressão do subtipo e a atividade desses canais estão alterados em diferentes formas de dor neuropática (CARDOSO e LEWIS, 2017).

Opióides fortes, como a morfina, e fracos, como tramadol, são eficazes quando comparados com outras drogas usadas para a dor neuropática (FINNERUP *et al.*, 2015). Estes fármacos já foram considerados medicamentos de segunda linha (DENG *et al.*, 2016). Mais recentemente, foram classificados como drogas de terceira linha, devido a reações adversas proeminentes e preocupações com as possibilidades de abuso, desvio de conduta terapêutica, tolerância e dependência (LABIANCA *et al.*, 2012; FINNERUP *et al.*, 2015). Ensaios clínicos indicaram que, aproximadamente, 50% dos pacientes, em tratamento com opióides, tiveram um evento adverso e mais de 20% descontinuaram o tratamento devido a reações adversas (MOORE; McQUAY, 2005). As reações adversas mais graves do tratamento são constipação, sonolência e comprometimento cognitivo, as quais afetam consideravelmente a qualidade de

vida dos pacientes (NOBLE *et al.*, 2010). Cabe salientar o intenso debate sobre o aumento de mortes causadas por overdose não intencional, já que, provavelmente, pessoas com experiência anterior de abuso de drogas ou pessoas com doenças psiquiátricas, como depressão ou esquizofrenia, tenham um risco maior de desenvolver dependência após o uso contínuo de opióides (LEONARDI *et al.*, 2015).

O efeito analgésico dos opióides é devido à sua ação no cérebro, tronco cerebral, medula espinhal, pois todos os peptídeos opióides endógenos (incluindo β -endorfina e encefalinas) ligam-se a receptores (μ , δ e κ) acoplados à proteína G. Os receptores opióides são acoplados às proteínas G inibitórias, com ativação do receptor inibindo a adenilato ciclase, bem como a produção intracelular de AMPc. No corno dorsal da medula espinhal, os receptores μ constituem a maioria dos receptores opióides, com mais de 70% da localização pré-sináptica ocorrendo nos terminais centrais dos nociceptores (fibras C e A delta). Portanto, a estimulação dos receptores mu-opiídeos na medula espinhal é um mecanismo efetivo de bloqueio da transmissão sináptica, que restringe o número de estímulos nociceptivos que atingem o tálamo e o córtex, nos quais ocorre uma percepção consciente da dor (FORNASARI, 2014).

3.4.2 Acupuntura

A acupuntura é uma terapia da Medicina Tradicional Chinesa utilizada a quase 5 mil anos, cuja expansão se deu através da ampliação das relações comerciais entre a China e outros países, no século VII (MACPHERSON *et al.*, 2007). Atualmente, ao contrário de outros métodos utilizados na Antiguidade, que caíram em desuso, a acupuntura é um campo clínico interdisciplinar da Medicina que abrange tratamento, diagnóstico e prevenção de diversos distúrbios (DORFER *et al.*, 1999; NIH, 1997). Além disso, a acupuntura integra milênios de experiência da Medicina Oriental e conhecimentos contemporâneos sobre morfologia, fisiologia e neurofisiologia (STUX; HAMMERSCHALG, 2005; ONDREJKOVICOVA *et al.*, 2016).

O método da acupuntura baseia-se em influenciar funções do corpo, de forma precisa, por irritação controlada de determinados pontos de meridianos ativos (acupontos) localizados em tecidos profundos com rica inervação sensorial (GOLDMAN *et al.*, 2010; NIH, 1997; ZILKA, 2010). A agulha de acupuntura serve como estímulo sensorial que promove a participação de muitas moléculas endógenas e seus receptores, como os peptídeos opióides, o octapeptídeo colecistocinina (CCK-8), glutamato (receptores NMDA, AMPA e cainato) serotonina (5-HT) e noradrenalina nas fibras sensoriais, vias espinhais e centrais (ZHAO,

2008). Para essa estimulação, podem ser utilizadas agulhas especiais (acupuntura manual), calor (moxabustão), pressão (acupressão), subpressão (sangria), eletricidade (eletroacupuntura), luz (laserterapia), ultrassom (sonopuntura), campo eletromagnético estático ou pulsátil (terapia magnética) ou soluções (farmacopuntura) (ONDREJKOVICOVA *et al.*, 2016).

Em 2003 a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma revisão indicando a terapia com acupuntura para uma relação de mais de cem doenças (WHO, 2003) e em 2006, no Brasil, foi homologada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que permitiu priorizar condutas terapêuticas que utilizassem das terapias complementares (BRASIL, 2006). Nesse contexto, a acupuntura deixou de ser considerada uma terapia alternativa e vem sendo aplicada, principalmente na Atenção Primária, já que é uma técnica de baixo custo e poucos efeitos adversos (WHITE *et al.*, 2008).

A respeito de efeitos adversos, e apesar do desenvolvimento de fármacos que auxiliam no manejo da dor, há uma crescente preocupação com relação ao uso de medicamentos (LAO *et al.*, 2001). Nesse sentido, a acupuntura, quando praticada por profissionais qualificados, tem se revelado uma medida não farmacológica efetiva para o tratamento da dor (WITT *et al.*, 2006). Quanto a sua aplicação no tratamento da dor, apesar da prática clínica sugerir que esta modalidade de tratamento é efetiva no controle da dor, ainda há ceticismo por parte da comunidade científica em relação à recomendação desse tratamento (STUX; HAMMERSCHALG, 2005). Parte dessa descrença é justificado pela falta evidências neurobiológicas que estejam especificamente relacionadas ao estímulo com acupuntura.

Os acupontos, em chinês Shu Xue, que significa aberturas ou buracos na pele de comunicação ou transporte foram descritos através do conhecimento empírico adquirido na prática clínica no decorrer dos séculos (WEN, 1985; ZHOU; BENHARASH, 2014). A teoria dos meridianos foi proposta empiricamente, quando os chineses notaram que havia uma sensação peculiar relacionada com o estímulo dos pontos, a qual chamaram de Qi. Havia, também, um padrão comum do trajeto de irradiação dessa sensação para regiões distantes do corpo e ao conectar esses pontos, traçaram um mapa visível dos 14 meridianos, cada um correspondendo a vários sistemas de órgãos específicos (GONGWANG, 2005; LI *et al.*, 2004). Por outro lado, não foi comprovada do ponto de vista anatômico a existência de pontos e meridianos, apesar de alguns autores conseguirem demonstrar parte de seu trajeto através do mapeamento de radioisótopos injetados no corpo, fotografias infravermelhas e existir uma

ligação entre os acupontos e às cadeias e trilhos anatômicos descritos por Busquet (STUX; HAMMERSCHALG, 2005).

Na pesquisa dos efeitos da acupuntura com o uso de animais, a maioria dos autores utiliza a localização de pontos a partir de anatomia comparada ao humano e as agulhas são inseridas nos animais em regiões do corpo e estruturas anatômicas análogas às do ser humano (YIN *et al.*, 2008). No campo da ciência básica, apesar das muitas descobertas realizadas nas últimas décadas, os mecanismos fisiológicos da analgesia por acupuntura não foram completamente elucidados (STUX; HAMMERSCHALG, 2005). A maioria dos pesquisadores concentrou-se em estudar a analgesia produzida pela eletroacupuntura em suas diferentes formas de estímulo (ZHAO, 2008).

Assim, a analgesia da acupuntura é essencialmente a manifestação de processos de integração em diferentes níveis do SNC com impulsos aferentes de regiões de dor e impulsos advindos dos pontos de acupuntura (ZHAO, 2008). Com base em estudos sobre a temática, procuramos investigar os efeitos da acupuntura manual no acuponto SP6 (Baço Pâncreas 6 ou Spleen 6) ou Sanyinjiao, do mandarim san (três), yin (antônimo de yang), jiao (intersectar). Nesse ponto, acredita-se que ocorra a intersecção de três meridianos yin da perna (Rim, Fígado e baço-Pâncreas). A localização do acuponto SP6 foi descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estando três *cun* acima do ápice do maléolo medial, posterior à margem da tíbia, que foi posteriormente descrita em ratos e camundongos (YIN *et al.*, 2008). Esse acuponto é indicado para dores abdominais, diarreia, ponto mestre em disfunções urogenitais, incontinência, dismenorreia, analgesia para cirurgia abdominal, dentre outras indicações (LIU e ZHAO, 1991; TABOSA *et al.*, 2002; FLEMING, 2006; McCLUGGAGE, 2006).

As pesquisas atuais apontam para o entendimento dos mecanismos da acupuntura e sua efetividade. Visto que, ainda existem divergências entre a validade e eficácia da acupuntura na Medicina ocidental, pesquisas científicas são necessárias, para a comprovação de seus efeitos neurobiológicos. Os modelos animais são pertinentes a esses estudos pois, fornecem evidências claras sobre o mecanismo de ação da acupuntura. Além disso, a acupuntura é uma técnica de baixo custo com efeitos adversos reduzidos ou nulos quando comparada com as intervenções clínicas convencionais. Devemos lembrar também que, o aumento da expectativa de vida do brasileiro, promove um envelhecimento populacional. Essa população apresenta mais doenças crônicas como a dor, uma condição clínica de manejo insatisfatório atualmente e de custo elevado, apesar dos inúmeros esforços na realização de estudos que revertam essa condição e suas comorbidades.

Dessa forma, a caracterização do efeito da acupuntura, isolada ou associada ao tratamento farmacológico, se faz necessário, pois apresenta uma possibilidade de baixo custo, de intervenção menos invasiva, mais eficaz e efetiva, quando comparada às terapias disponíveis atualmente.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos, da linhagem *Swiss*, pesando aproximadamente 35g, obtidos do biotério central da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brasil). Os camundongos foram mantidos em gabinetes, contendo no máximo 6 animais por caixa, com ventilação, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (60-80%) em ciclos de 12 horas de claro-escuro (7:00-19:00), além de livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo.

Para os estudos comportamentais, os animais, foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos na sala de experimento do Biotério da Universidade Federal do Pampa (BIOPAMPA) para aclimatação por, aproximadamente, uma hora antes da realização dos experimentos. Estes foram conduzidos de acordo com as considerações éticas para investigação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983).

O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram mínimos para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos, sendo que os experimentos foram realizados cego ou duplo cego, sempre que possível. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso em Animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, no. do protocolo 038/2017) – Anexo I - e estão de acordo com o “Guidelines for Integrity and Good Practices for the Production, Maintenance or Use of Animals” da resolução do CONCEA, publicação no. 32, 09/2016.

4.2 Modelo de indução de dor neuropática

Utilizou-se a Constrição ou Ligação Parcial do nervo ciático (CPNC ou LPNC) descrito por Klusakova e Dubovy (2009) para verificar o efeito de diferentes tratamentos sobre a neuropatia periférica crônica.

Os animais foram previamente anestesiados, com xilazina (10 mg/kg, i.p.) e cetamina (80 mg/kg, i.p.) e tricotomizados. Após, realizou-se uma pequena incisão na região da coxa

direita entre os músculos quadríceps e isquiotibial. Os músculos foram divulsionados com pinça cirúrgica e as veias dos tecidos aderentes dissecadas, para visualização e exposição do nervo ciático, de acordo com o método descrito para ratos (SELTER; DUBNER; SHIR, 1990) e adaptado para camundongos (MALMBERG; BASBAUM, 1998). Após o procedimento descrito, aproximadamente 1/3 do nervo ciático foi amarrado com fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 6.0, Prolone, não absorvível) e a epiderme suturada com fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond). Após a cirurgia, os animais permaneceram em mesa cirúrgica aquecida a 35°C até recuperação e, posteriormente, foram colocados em suas gaiolas moradias (KLUSAKOVA e DUBOVY, 2009).

4.3 Delineamento experimental

Os procedimentos para avaliar o efeito da acupuntura no acuponto SP6, associado ou não à gabapentina, foram divididos em etapas. Primeiramente (figura 2), buscou-se verificar o efeito do tratamento com acupuntura sobre a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio em um modelo de neuropatia, dividindo os animais em grupos (n=8): 1- Falso Operado (FO) - foi submetido ao procedimento cirúrgico, teve o nervo exposto, porém, não ligado; 2- Operado (OP) - submetido a cirurgia de LPNC e não recebeu tratamento posteriormente; 3- grupo acupuntura (SP6) - submetido à cirurgia e tratado com acupuntura manual (SP6).

Após confirmação da sensibilidade mecânica e térmica ao frio induzida pela LPNC, os animais foram avaliados ao final de 13 dias (contagem iniciada após 7 dias da LPNC) - ou 5 sessões de acupuntura, e 28 dias (contagem iniciada após 7 dias da LPNC) - ou 10 sessões de acupuntura. Essa divisão foi realizada para avaliar o efeito da acupuntura em diferentes fases do desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.

Posteriormente, os camundongos foram submetidos a testes comportamentais, em dias diferentes: suspensão pela cauda (TSC) - no dia 13 ou 28; labirinto em cruz elevado (LCE) - no dia 14 ou 29, período matutino; e esquiiva inibitória - treino no dia 14 ou 29, período vespertino; avaliação memória de curta duração - no dia 14 ou 29 e memória de longa duração no dia 15 ou 30. Para o TSC foram utilizados ainda outros dois grupos experimentais (n=8), para controle do teste: 1- Naive - não sofreu nenhum tipo de intervenção cirúrgica; e 2- Fluoxetina (Flu) - submetido à LPNC e tratado apenas uma vez com fluoxetina (20mg/kg), v.o.

Neste período foram utilizados 40 camundongos (n=8), que foram eutanasiados ao final das avaliações e/ou tratamentos, após 13 dias ou 5 agulhamentos. Ainda, foram utilizados 24 animais (n=8) que foram eutanasiados ao final das avaliações e/ou tratamentos, após 28 dias ou

10 agulhamentos. Os hipocampus dos animais dos grupos FO, OP e SP6 foram removidos para análise do BDNF no dia 30.

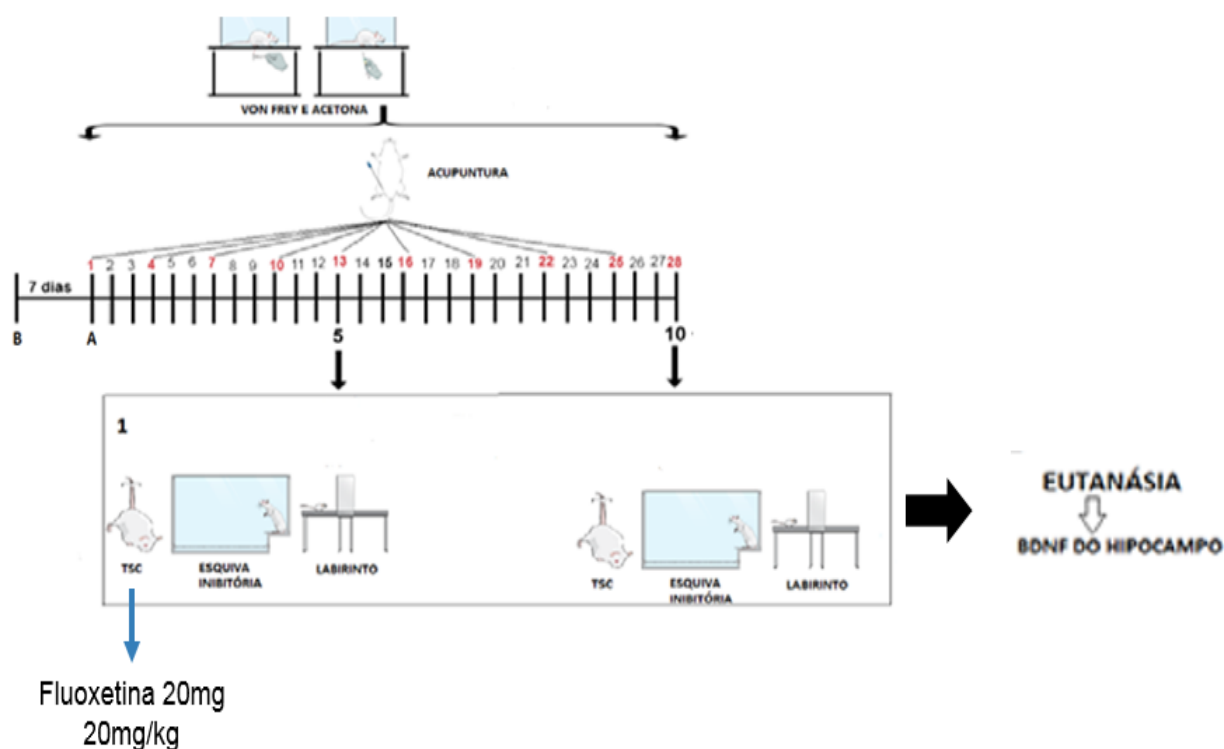


Figura 2: Design experimental da primeira etapa. Os animais foram avaliados para hipersensibilidade, mecânica (von Frey), e para hipersensibilidade térmica ao frio (acetona), antes (B – Basal) e após sete dias (A) da cirurgia da LPNC. Os animais foram tratados com acupuntura (SP6) nos dias marcados em vermelho, totalizando 5 tratamentos ou 10 tratamentos. Ao final de 13 dias – nos grupos FO (falso operado) e OP (operado), ou após 5 sessões de SP6, os animais foram avaliados no teste de suspensão da cauda (TSC), no labirinto em cruz e na esquiwa inibitória. Ainda, em outros animais, ao final de 28 dias – nos grupos FO e OP, ou após 10 sessões de acupuntura, os camundongos foram avaliados no TSC, no labirinto em cruz e na esquiwa inibitória. Após as avaliações, os animais sofreram eutanásia e o hipocampo foi removido para mensuração de BDNF.

Fonte: Próprio autor com uso do site Mind the graph.

Na segunda etapa do protocolo (figura 3), buscou-se avaliar o tratamento de acupuntura em comparação ao tratamento farmacológico. Para isso, usou-se os grupos FO, OP e SP6, com os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Ainda, utilizou-se os grupos (n=8): gabapentina (GB), gabapentina com dose sub efetiva (GB1/2) e uma associação entre os dois tratamentos (GB1/2+SP6). Todos esses grupos foram submetidos à cirurgia de LPNC, porém, o grupo GB foi tratado diariamente com 10mg/kg de gabapentina (v.o); o grupo GB1/2 com 5mg/kg de gabapentina (v.o) diariamente e o grupo GB1/2+SP6 com 5mg/kg, v.o, diariamente e com acupuntura manual no SP6 três vezes por semana. Nessa etapa os animais foram tratados

pelo tempo equivalente à 10 sessões de acupuntura ou 28 dias e utilizou-se um total de 48 animais (n=8).

Ressalta-se que os tratamentos foram iniciados após comprovação da presença de hipersensibilidade mecânica e térmica, e que as análises comportamentais foram realizadas depois de 28 dias – ou 10 tratamentos com acupuntura. Esses camundongos foram submetidos a diferentes testes: suspensão pela cauda (TSC) – no dia 28; teste do nado forçado (TNF) – no dia 29; labirinto em cruz elevado – no dia 30, período matutino; e esquiva inibitória – treino no dia 30 no período vespertino, avaliação memória de curta duração no dia 30 e memória de longa duração no dia 31. No dia 30, os animais do grupo SP6 foram novamente tratados com acupuntura, e os grupos tratados com fármacos receberam a terapia continuamente pelos demais dias.

Ao final das avaliações, no dia 31, os grupos FO, OP, SP6, GB, GB1/2 e GB1/2+SP6 foram eutanasiados e seus hipocampus removidos para análise do BDNF.

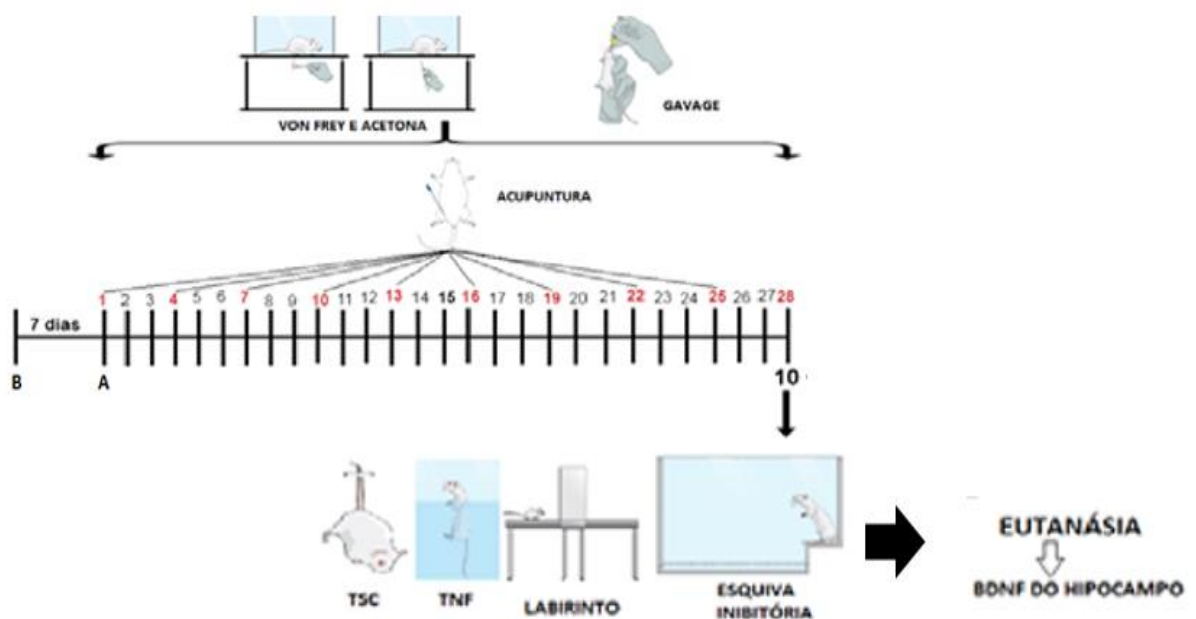


Figura 3: Design experimental da segunda etapa. Os animais foram avaliados para hipersensibilidade, mecânica (von Frey), e para hipersensibilidade térmica ao frio (acetona), antes (B – Basal) e após sete dias (A) da cirurgia da LPNC. Os animais do grupo SP6 e GB1/2+SP6 foram tratados com acupuntura nos dias marcados em vermelho, totalizando 10 sessões. Os animais dos grupos GB (gabapentina), GB1/2 (gabapentina com dose subefetiva) e GB1/2 + SP6 foram tratados com o fármaco gabapentina diariamente, por via oral. Após 28 dias - nos grupos FO, OP, GB e GB1/2, ou após 10 tratamentos com SP6, os animais foram avaliados no TSC, no teste do nado forçado (TNF), no labirinto em cruz e na esquiva inibitória.

Posteriormente, os animais sofreram eutanásia e o hipocampo foi removido para mensuração de BDNF.

Fonte: Próprio autor com uso do site Mind the graph.

4.4 Tratamentos

4.4.1 Tratamento farmacológico

O medicamento que foi utilizado para tratamento convencional farmacológico de dor neuropática foi a gabapentina. As cápsulas de gabapentina (300mg, Biosintética, Guarulhos, SP, Brasil) foram abertas e o seu conteúdo granulado pesado em balança de precisão. A quantidade de massa em miligramas para cada animal foi calculada de acordo com a dose e o peso do animal, sendo descontada a proporção de excipientes que acompanha o medicamento. Depois, o pó era diluído em solução salina 0,9% em quantidade suficiente para completar 30 mililitros ou 60 mililitros de solução, obtendo-se, respectivamente soluções de 10mg/kg e 5mg/kg, administrados via oral (v.o), 1 hora antes da avaliação (HUMMING, 2014).

A fluoxetina (Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, E.U.A.) foi utilizada como controle positivo, em uma das etapas experimentais, e foi administrada v.o, 1 hora antes do teste de suspensão da cauda (TSC), na dose de 20mg/kg.

4.4.2 Tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6

A localização do acuponto SP6 foi descrita, na década de 70, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como “um ponto de intersecção dos meridianos do baço, fígado e rim”. A identificação do SP6 em camundongos foi realizada de acordo com o estudo de Yin *et al* (2008), que identifica a localização de vários pontos de acupuntura em ratos e camundongos. Ele está localizado no ponto distal de uma linha imaginária dividida em 5 pontos, que liga o ponto SP9 (localizado na depressão inferior ao côndilo medial da tíbia, entre a tíbia e o gatrocnêmio) ao maléolo medial da tíbia do animal.

Os animais que receberam acupuntura foram tratados com um intervalo de 2 dias a cada nova sessão como pode ser observado no desenho experimental (item 4.3). Para a realização do tratamento os animais foram contidos cuidadosamente em cilindro de polietileno (7cm x 2,5) com as patas traseiras para fora do cilindro. A pele dos animais foi limpa com álcool e a estimulação da acupuntura manual realizada pela inserção de agulha de aço inoxidável (0,17 x 7mm, marca Dong Bang[®]) utilizando um aplicador. A agulha foi inserida obliquamente a uma profundidade de aproximadamente 2-3 milímetros do acuponto na pata direita, e então

manipulada com as pontas dos dedos do experimentador (girada lentamente para a direita e esquerda de 1-2 segundos). Todo o procedimento levou cerca de 15 segundos. Depois da inserção da agulha, cada animal foi colocado em uma caixa de acrílico transparente (10 x 10 x 10 cm) por 10 minutos (DA SILVA *et al.*, 2013). Os animais permaneceram acordados, sem sinais de estresse e foram observados durante todo o período de tratamento.

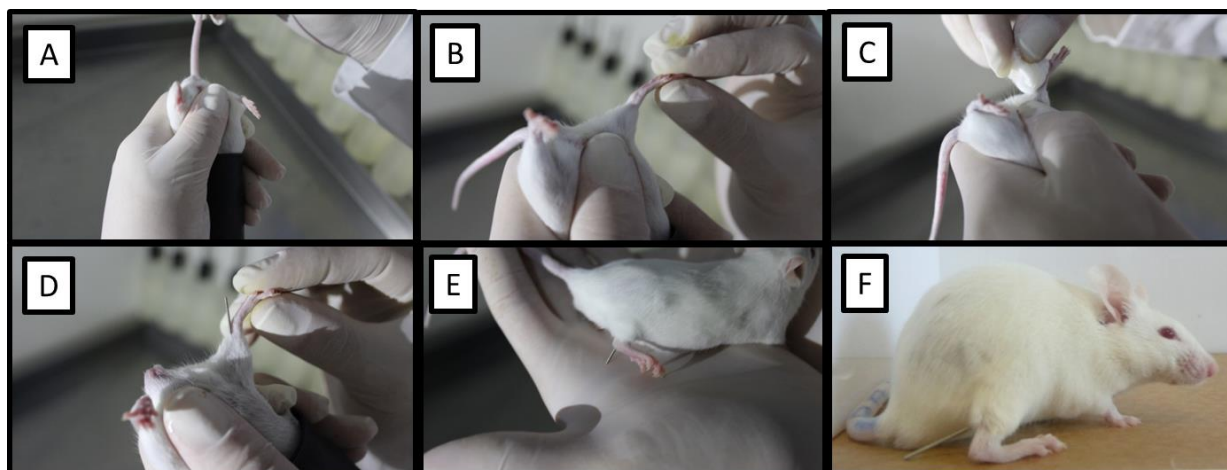


Figura 4: Aplicação da agulha de acupuntura no acuponto SP6. O camundongo foi colocado em um cilindro de polietileno (A) com as patas traseiras para fora (B). A pele dos animais foi limpa com álcool (C) e realizou-se a inserção de agulha de aço inoxidável no acuponto SP6 da pata direita (D). Os animais foram removidos do cilindro (E) e colocados em uma caixa de acrílico transparente. Os camundongos permaneceram acordados, sem sinais de estresse e foram observados durante o tratamento (F).

Fonte: Próprio autor.

4.5 Avaliações comportamentais

4.5.1 Avaliação de hipersensibilidade mecânica

O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado de acordo com o método descrito por Chaplan *et al.* (1994). Os animais foram aclimatados em compartimentos individuais de acrílico, sobre uma plataforma de fundo gradeado, afim de possibilitar o acesso à superfície ventral das patas traseiras dos animais. O estímulo foi direcionado perpendicularmente à superfície plantar dos camundongos.

Foram analisadas as respostas (retirada ou não da pata) em relação à tensão aplicada por vários filamentos de von Frey calibrados para produzir forças (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0 gramas), que produzem diferentes graus de estimulação mecânica (inócua ou nociva). As avaliações iniciaram com aplicação do filamento 0,4g, e no caso de estímulo nocivo – indicado pela retirada da pata – foi utilizado um filamento com menor valor subsequente em gramas. No

caso de estímulo inócuo – indicado pela permanência da pata – foi utilizado o filamento com maior valor subsequente em gramas. Foram realizadas um total de, no máximo, seis aplicações não consecutivas em cada animal. Este método foi proposto por Dixon (1980) e é denominado “up and down”. Os dados obtidos a partir dele fornecem a força correspondente a 50% do limiar de retirada da pata em gramas. A intensa redução no limiar de retirada da pata dos camundongos, caracteriza o aparecimento de hipersensibilidade mecânica.

Os animais foram avaliados para hipersensibilidade mecânica (item 4.5.1) e térmica ao frio (item 4.5.2), antes da cirurgia (avaliação B - basal) e 7 dias após (avaliação A – após a cirurgia). Estes testes têm a finalidade de verificar se os animais apresentavam alguma hipersensibilidade antes da cirurgia, e posteriormente, verificar se os animais não apresentavam sensibilidade compatível com as alterações induzidas pela cirurgia. Não houve necessidade de exclusão de nenhum camundongo, todos os animais utilizados apresentaram respostas adequadas. No 7º dia, iniciou-se as sessões de acupuntura, três vezes por semana, não consecutivos, para evitar lesão da pata por repetidas inserções da agulha. Os animais foram avaliados para hiperalgesia mecânica e térmica, 15 minutos após a intervenção. O tratamento com gabapentina foi administrado diariamente a partir do 7º dia também, v.o, 1 hora antes das avaliações. No grupo GBP1/2+SP6, a dose de gabapentina foi administrada v.o, nos últimos 15 minutos, antes de completar 1 hora, a acupuntura foi aplicada nos animais. Dessa forma, os animais foram avaliados exatamente, 1 hora após a administração de gabapentina e 15 minutos após a aplicação da acupuntura.

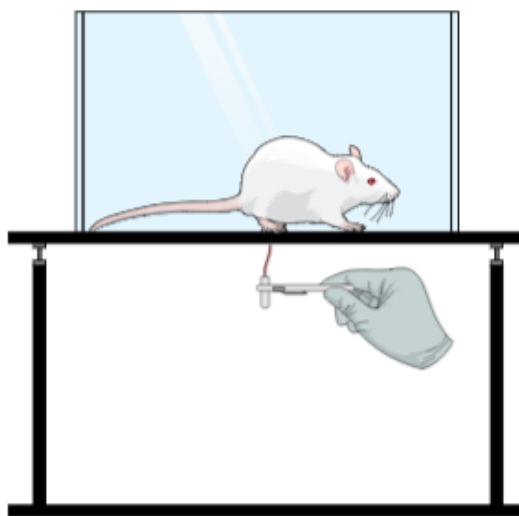


Figura 5. Representação esquemática da aplicação dos filamentos de von Frey.
Fonte: Próprio autor com uso do site Mind the graph.

4.5.2 Avaliação de hipersensibilidade térmica ao frio

Utilizou-se o modelo descrito por Flatters & Bennett (2004), que usa a propriedade volátil da substância acetona para induzir a sensação de frio (10°C). Para tanto, os animais foram colocados em gaiolas suspensas com piso fenestrado para aclimatização. Posteriormente, uma alíquota de 0,05mL de acetona, recolhida de estoque com seringa de 1mL, foi lançada sob a superfície ventral da pata direita do animal. Desta forma, iniciou-se um período de observação de 20 segundos, no qual o pesquisador observava um dos comportamentos, indicados por escore: “0” ausência de comportamento doloroso; “1” retirada rápida da pata e/ou tremor ou batimento da bata no chão (distinguindo entre tremor característico ou *flicking*); “2” para retirada com sustentação prolongada da pata com ou sem repetido *flicking*; “3” para a situação onde o animal lambe a face ventral da pata após *flicking* repetido da pata. Se neste período o animal apresentasse alguma resposta relacionada a dor frente a acetona, o pesquisador adicionava mais 20 segundos ao tempo de observação para detectar mais algum comportamento adicional (40 segundos no total). Neste caso, o observador obtinha como resultado final a resposta de maior escore. Esse protocolo foi realizado três vezes na mesma pata, deixando-se um período de aproximadamente 5 minutos de avaliação entre as medidas. O resultado final foi exposto como a soma dos escores das três análises.

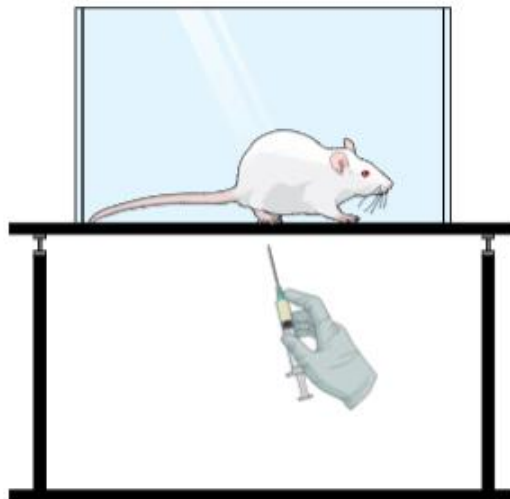


Figura 6. Representação esquemática da aplicação do teste da acetona.
Fonte: Próprio autor com uso do site Mind the graph.

4.5.3 Avaliação de comportamento do tipo-depressivo

O teste de suspensão pela cauda (TSC) foi proposto por Stéru (1985) e consiste em suspender cada animal pela cauda, com auxílio de uma fita adesiva, na bancada de experimentos a uma altura de 1,5 m do chão, com a porção ventral do corpo voltada para a câmera de registros (40 cm na frente do animal) durante 6 minutos. Após a observação não-sistemática dos vídeos obteve-se a definição dos comportamentos: (1) imobilidade: quando houvesse ausência de movimentos bruscos (o animal pode movimentar levemente a cabeça ou as patas dianteiras, sem que mexesse o corpo), ausência total de movimento, o animal também poderia permanecer imóvel segurando suas patas ou sua cauda; ou (2) movimentação difusa ou ritmada: movimentos não repetitivos, em todas as direções possíveis (esquerda, direita, para cima, para trás) ou em pêndulo, idêntica para esquerda e para a direita. Durante o período de avaliação, pelos 6 minutos, foi quantificado o tempo de imobilidade dos animais, em segundos, e esse dado utilizado com resultado do teste - caracterizando o comportamento tipo-depressivo.

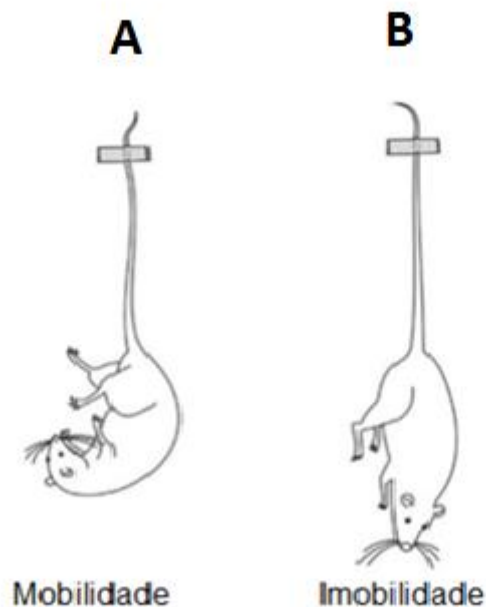


Figura 7. Representação esquemática dos comportamentos de mobilidade (A) e imobilidade (B) no teste da suspensão pela cauda.

Fonte: Adaptado de ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013.

O teste do nado forçado (TNF) seguiu o proposto por Porsolt (1977) para camundongos, o qual consistiu em colocar o animal em um tanque cilíndrico contendo aproximadamente 30 cm de água limpa a 25°C. O animal permaneceu por 6 minutos no cilindro com água, e durante

o teste cada animal apresentou diversos comportamentos que puderam ser mensurados manualmente. Após o término do teste, cada animal foi seco e mantido sob uma lâmpada de 40W para que não sentissem frio. A cada animal a água do cilindro foi substituída por água limpa. O teste foi gravado por uma câmera posicionada a 20 cm da borda do cilindro, para que os registros fossem analisados posteriormente, e classificados como descritos a seguir: (1) imobilidade: ausência de movimentos bruscos, onde o animal apresentou somente movimentos mínimos necessários para manter a cabeça acima da água, ou permanecer boiando sobre a água; (2) nado: movimentos horizontais do animal pelo tanque, normalmente fazendo uma trajetória circular, movimentando as 4 patas vigorosamente; ou (3) escalada: movimento vertical do animal, geralmente apoiando-se nas paredes do tanque, fazendo movimentos como se fosse escalar as mesmas. Durante o período de avaliação foi quantificado o tempo de imobilidade dos animais, em segundos, e esse dado utilizado com resultado do teste - caracterizando o comportamento tipo-depressivo.

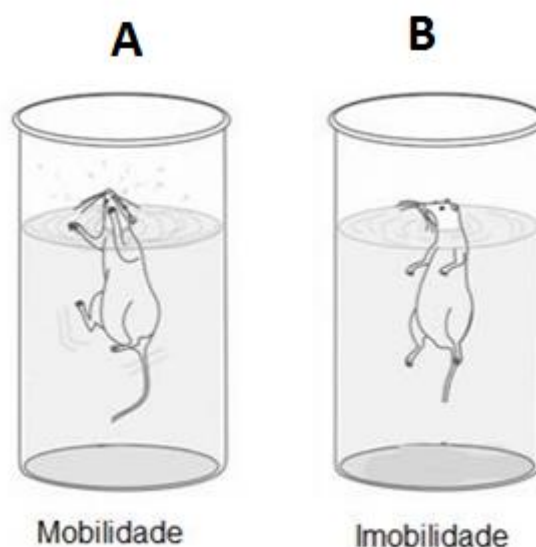


Figura 8. Representação esquemática dos comportamentos de mobilidade (A) e imobilidade (B) no teste do nado forçado.

Fonte: Adaptado de ABELAIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013.

4.5.4 Avaliação de comportamento do tipo-ansiedade

O aparato do labirinto em cruz elevado é composto de dois caminhos que se cruzam ao centro, a uma distância do chão de 40 centímetros, onde dois braços abertos (com 35 centímetros de comprimento e 5 de largura) se encontram a dois braços fechados (de mesmo

comprimento e largura, porém cercado por paredes de 15cm de altura). Segundo o protocolo descrito por Kazlauckas et al (2005), os animais devem ser colocados no centro do aparato, em ambiente de penumbra, com a face voltada para um dos braços abertos e observados individualmente por 5 minutos. Deve-se observar, entre outras análises, o tempo total (segundos) em que os animais permaneceram nos braços abertos (BA), esses valores foram transformados em porcentagem do tempo em relação ao tempo total. Ainda foi quantificado o número de entradas nos braços abertos. Valores elevados nesses dados indicam um animal com menos indicação de comportamento ansiogênico e o contrário um animal com comportamento tipo-ansiolítico.

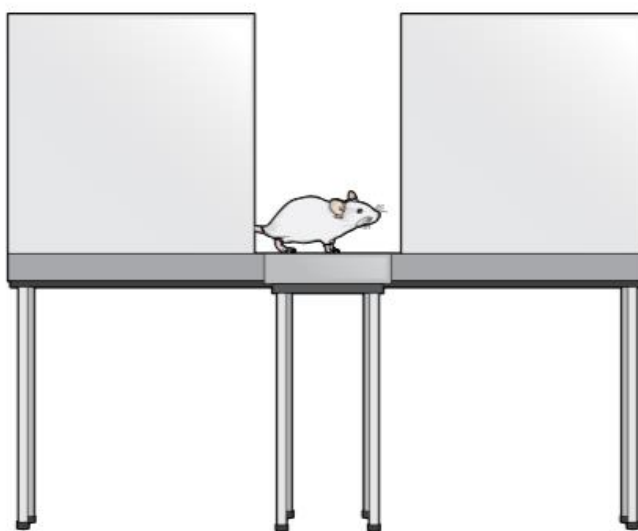


Figura 9. Representação esquemática do camundongo na porção central do labirinto em cruz elevado.

Fonte: Próprio autor com uso do site Mind the graph.

4.5.5 Avaliação de memória de curta e longa duração

O teste da esQUIVA inibitória foi usado para avaliar a memória de curta e longa duração. Esse teste foi desenvolvido de acordo com Kaslauckas et al (2005) e envolve o aprendizado de uma tarefa aversiva, na qual em um treino o animal recebe um choque de baixa intensidade (0,4mA, 0,7 segundos) ao descer de uma plataforma eletrificada com quatro patas. Nas sessões de teste, 30 minutos e 24 horas depois do treino, o animal é exposto novamente àquele ambiente, testando, respectivamente, sua memória de curta e longa duração. Para avaliar a memória foi utilizado o tempo de latência que o animal demorou para descer da plataforma. Tratando-se de

um aprendizado adquirido em apenas uma tentativa é ideal para a avaliação em estudos de memória e aprendizagem envolvendo o hipocampo.

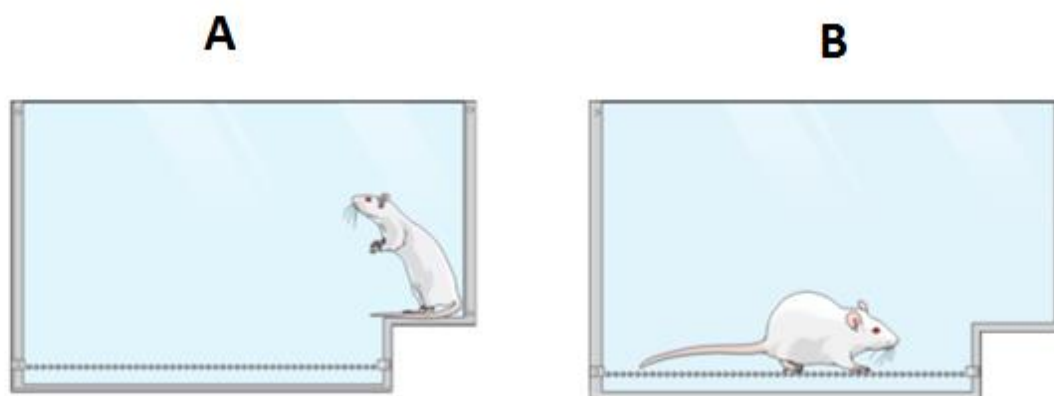


Figura 10. Representação esquemática das posições de latência (A) e teste (B) na esQUIVA inibitória.

Fonte: Próprio autor com uso do site Mind the Graph.

4.6 Níveis de BDNF no Hipocampo

Após eutanásia, os hipocampos dos camundongos foram retirados para dosagem de BDNF, utilizando método ELISA (SALES *et al.*, 2011). Para tanto, o tecido foi congelado a -80 °C até o ensaio. Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados em tampão contendo Tween 20, cloreto de benzetônio, ácido etilenodiaminotetracético - EDTA, albumina sérica bovina - BSA, NaCl, fluoreto de fenilmetanossulfonila e aprotinina. Os sobrenadantes foram processados usando ensaio imunoenzimático (ELISA) da R&D Systems (Minneapolis, MN), sendo que 100 µl da alíquota das amostras foram usadas, de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de BDNF foram estimados por interpolação de uma curva padrão por medidas colorimétricas a 450 nm (comprimento de onda de correção 540 nm) em um leitor de placas ELISA (Berthold Technologies - Apollo 8 - LB 912, KG, Alemanha). O teor de proteína total do sobrenadante foi medido usando o método de Bradford. (SCHLEICHER e WIELAND, 1978).

4.7 Análise estatística

A análise estatística dos grupos experimentais foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, ou ANOVA

seguida de Turkey com múltiplas comparações, ou análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias), seguida de teste post hoc de BonFerroni, quando necessário. Foi utilizado software *GraphPad Prism* versão 5.0 (San Diego, CA:2008).

Para medir a eficácia do tratamento, utilizamos o valor da média do controle comparado ao valor bruto dos dados de cada um dos animais dos grupos tratados – inibição máxima. Ainda, obtivemos o valor em porcentagem equivalente a quanto o tratamento foi capaz de reverter ou impedir um comportamento induzido pela lesão (como no TSC e no NF), levando-se em conta que nesse caso existe um aumento do valor avaliado no grupo tratado em relação ao operado. Nesse caso, pegaram-se os valores individuais dos animais do grupo tratado e realizaram-se duas análises separadas: 1- descontou-se o valor da média do grupo FO (y); 2- descontou-se o valor da média do grupo OP (z). Posteriormente calculou-se: Inibição igual (100) vezes (y-z) dividido pelo valor da média do grupo FO subtraindo-se o valor da média do grupo OP. Esse resultado fornece o dado da inibição máxima, ou inibição máxima reversa, em porcentagem.

5. RESULTADOS

5.1 Hipersensibilidades mecânica e térmica ao frio, em camundongos, induzida por LPNC

A LPNC induziu o desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica na pata ipsilateral dos camundongos operados do 7º dia após o procedimento cirúrgico até os últimos dias de avaliação em relação ao grupo falso operado (Figuras 11A). Os resultados apresentados na figura 10A mostram que a acupuntura, no acuponto SP6 do membro posterior direito, inibiu significativamente a hipersensibilidade mecânica dos animais com LPNC, na 1º sessão de acupuntura (dia 1), com $p < 0,05$. A redução da hiperalgesia mecânica foi encontrada nos demais dias de avaliação, até o décimo tratamento com acupuntura, tendo uma diferença estatística mais significativa nos dias 4, 7, 16 e 22, com $p < 0,0001$ (Figura 11A).

A LPNC também induziu o desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao frio, observado pela avaliação com acetona, que só não foi observada nos dias 13 e 16, comparado ao grupo falso operado (Figura 11B). Neste teste, a acupuntura reduziu significativamente a hipersensibilidade ao frio apenas no 1º dia e nos três últimos tratamentos (dias 22, 25 e 28) (Figura 11B).

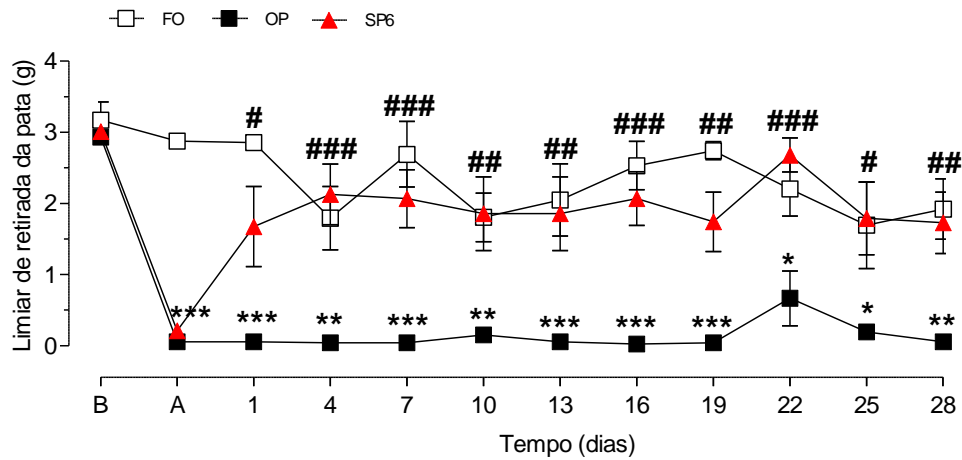
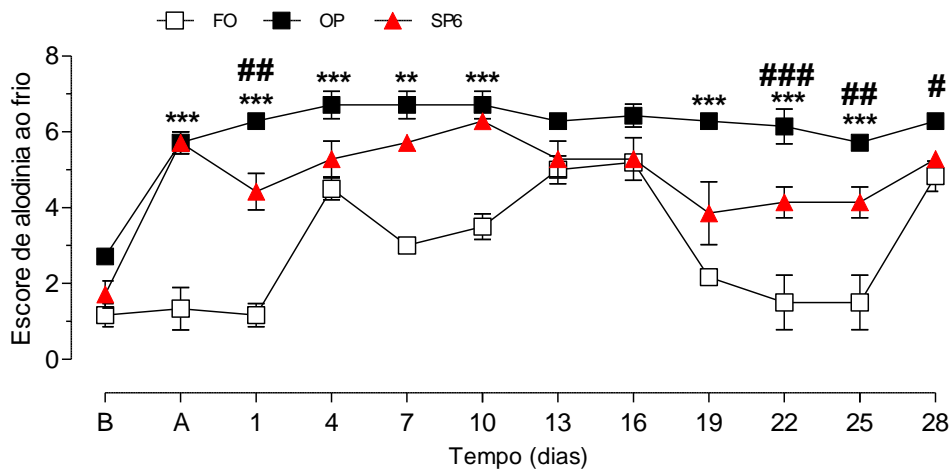
A**B**

Figura 11: Efeito do tratamento acupuntura sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio na pata de camundongos com neuropatia periférica induzida por LPNC. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: FO – falso operado; OP – operado; SP6 – operado e tratado com agulhamento no acuponto SP6. As avaliações de hipersensibilidade mecânica (A) e hipersensibilidade ao frio (B), foram realizadas antes da indução da neuropatia (B: basal) e nos dias 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 35 e 28. (□) representa o grupo FO; (■) representa o grupo OP; e (▲) representa o grupo tratado com acupuntura no acuponto SP6. Foi utilizado análise de variância de duas vias seguida de teste post hoc de BonFerroni. As linhas verticais indicam o S.E.M e os símbolos indicam: * para comparar com o grupo FO (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$), # para comparar com o grupo OP (# $p < 0,05$; ## $p < 0,001$; ### $p < 0,001$).

5.2 Aspectos tipo-depressivo e transtornos de memória, em camundongos, induzidos por LPNC

Como controle do teste de suspensão da cauda, utilizamos um grupo de animais naive e um grupo tratado com um antidepressivo clássico bastante descrito neste tipo de avaliação, a fluoxetina (FLU, 20mg/kg). Pode-se observar na figura 12A que o tratamento com FLU foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão da cauda, com $p < 0,001$ e inibição máxima de $89 \pm 24\%$ em relação ao grupo Naive.

A indução do comportamento tipo-depressivo pela LPNC pode ser observada no teste de suspensão da cauda apenas a partir de 35 dias após a cirurgia ($p < 0,001$), ou seja, 20 dias após o procedimento cirúrgico os animais ainda não apresentavam comportamento tipo-depressivo mesmo com lesão por neuropatia (Figura 12A).

Além disso, podemos observar na mesma figura que, com 5 tratamentos com acupuntura no acuponto SP6, não houve modificação na resposta dos animais. No entanto, com 10 tratamentos, percebeu-se diferença estatística entre o grupo SP6 quando comparado ao grupo de animais operados, com $p < 0,001$ e inibição máxima de 100% em relação ao grupo operado (OP).

Quando realizamos o teste de esQUIVA inibitória (Figura 12B), verificou-se que já com 20 dias após a LPNC, os animais apresentam comprometimento da memória de curto prazo, analisada 30 minutos após o treino do teste ($p < 0,001$), mas não de longo prazo, observada 24 horas depois. Podemos verificar também que com 5 tratamentos com acupuntura, há diferença estatística entre grupo SP6 quando comparado ao OP, com 100% de inibição máxima e $p < 0,001$ (Figura 12B). Ainda, observamos que, quando analisados ao final 35 dias, a LPNC induziu comprometimento da memória aversiva em ambos os tempos, 30 minutos e 24 horas (Figura 12B). Desta forma, percebemos diferença estatística entre grupo SP6 e o OP na avaliação da memória de curta duração ($p < 0,05$) e de longa duração ($p < 0,05$), sendo que a acupuntura reduziu até 100% do comportamento (inibição máxima) (Figura 12B).

No entanto, no labirinto em cruz elevado, em ambos os fatores observados que foram a porcentagem de tempo de o animal ficou no braço aberto (Figura 12C) e o número de entradas no braço aberto (Figura 12D), preditivos de comportamento ansiogênico, não foi observado diferença estatística entre os grupos, tanto no tratamento com 5 sessões de acupuntura quanto no com 10 sessões.

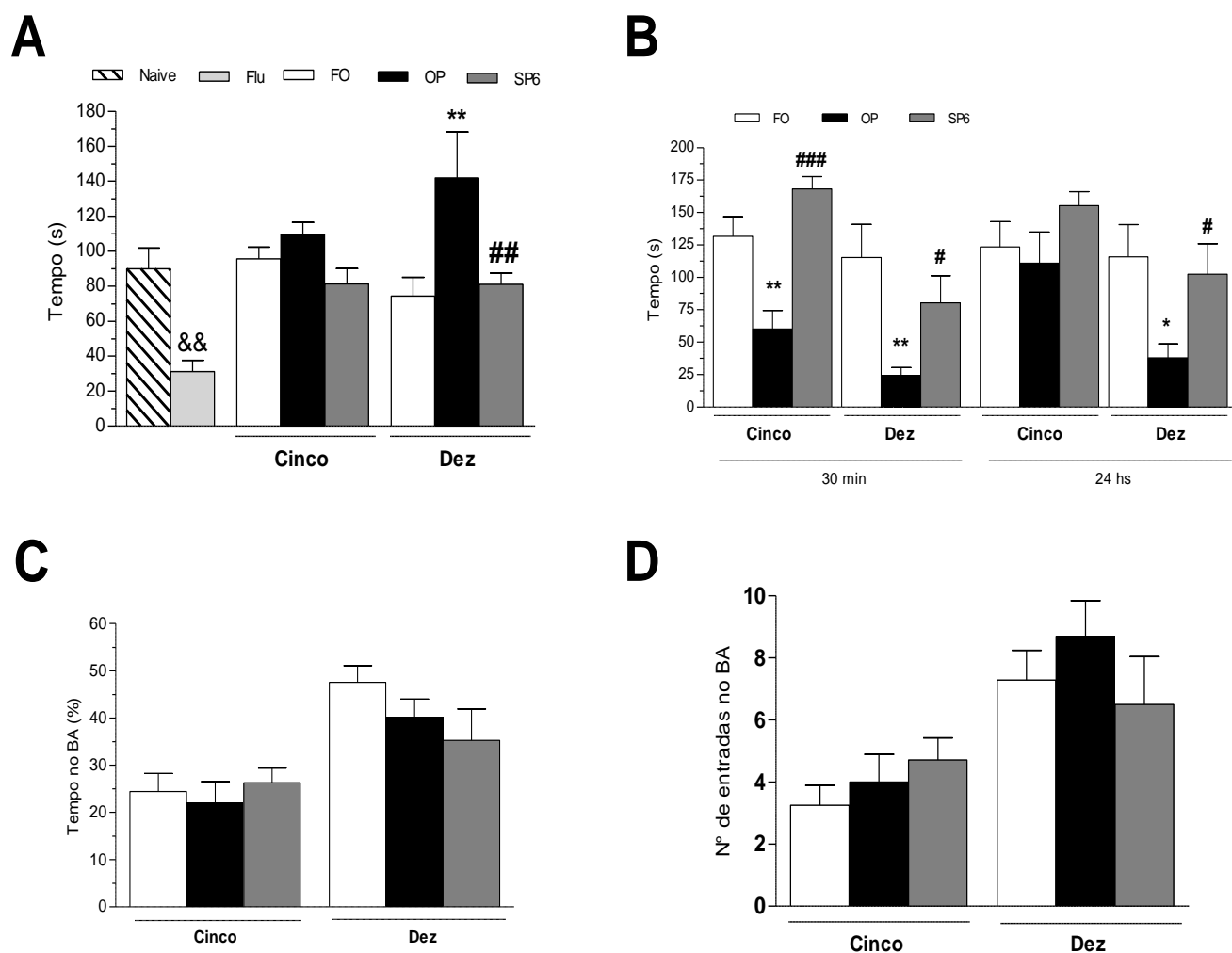


Figura 12: Efeito do tratamento com acupuntura no SP6 no perfil comportamental de depressão, ansiedade e problemas de memória induzidos pela LPNC. Os animais foram divididos em três grupos: FO – falso operado; OP – operado; SP6 – operado e tratado com agulhamento no acuponto SP6. Os animais foram avaliados ao final de 13 dias – nos grupos FO e OP, ou após 5 tratamentos com SP6 – indicado como “Cinco” no eixo X do gráfico. Os animais também foram avaliados ao final de 28 dias (FO e OP), ou após 10 tratamentos com SP6 – indicado como “Dez” no eixo X dos gráficos. A: Tempo de imobilidade durante o teste de suspensão da cauda; B: Tempo de latência na descida no teste de esQUIVA inibitória; C: Tempo de permanência dos animais nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado; D: Número de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado. Análise estatística usando ANOVA de uma via, sendo && $p < 0,001$ comparado ao grupo Naive; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ - comparados ao grupo FO; e # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$ e ### $p < 0,0001$ - comparados ao grupo OP.

5.3 Níveis de BDNF no hipocampo de camundongos com LPNC

O hipocampo dos animais foi coletado para análise de BDNF, no 13º ou no 28º dia após o 1º tratamento, respectivamente 5 e 10 tratamentos com acupuntura após a lesão. Os dados apresentados na figura 13 demonstraram que os animais do grupo OP, em comparação ao grupo FO, apresentaram níveis aumentados de BDNF, após 5 tratamentos ($p < 0,05$). Assim, também estão aumentados os níveis de BDNF no grupo SP6 ($p < 0,05$). No entanto, após 10 tratamentos, o grupo OP - quando comparado ao grupo FO - possuiu níveis de BDNF significativamente reduzidos. De forma interessante, o grupo tratado com o SP6, manteve os níveis de BDNF similares aos animais sem LPNC, com $p < 0,05$ comparado ao grupo OP (Figura 13).

Os hipocampus dos animais foram coletados para análise de BDNF no 13º ou no 28º dia após o 1º tratamento, respectivamente 5 e 10 tratamentos com acupuntura após a lesão. Os dados apresentados na figura 12 demonstraram que os animais do grupo OP, em comparação ao grupo FO, apresentaram níveis aumentados de BDNF, após 5 tratamentos. Assim, também estão aumentados os níveis de BDNF no grupo SP6. No entanto, após 10 tratamentos, o grupo OP quando comparado ao grupo FO, possui níveis de BDNF diminuídos. Já o grupo SP6, os níveis de BDNF continuam aumentados (Figura 13).

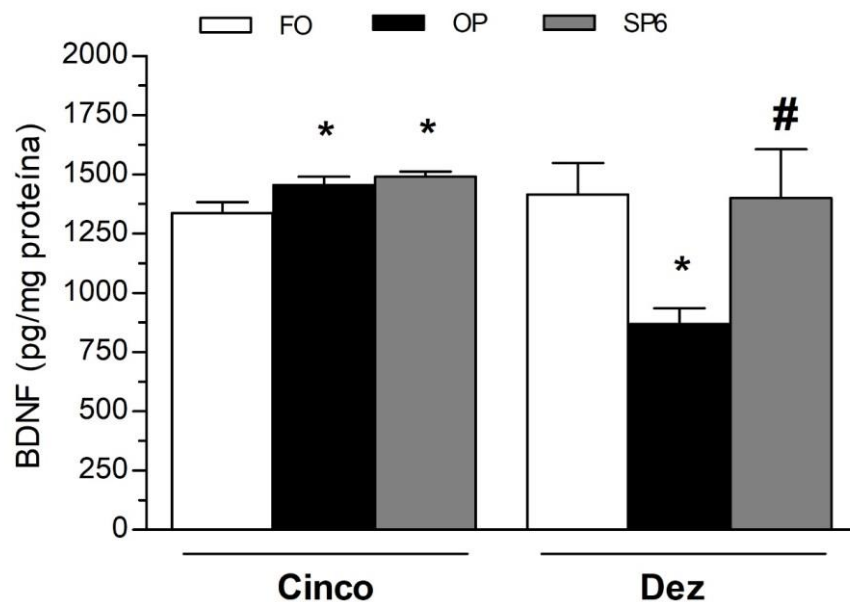


Figura 13: Expressão de BDNF no hipocampo de camundongos com neuropatia periférica após cinco e dez tratamentos com acupuntura no acuponto SP6. As análises foram realizadas nos grupos FO (falso operado), OP (operado) e SP6 (acupuntura). As análises foram realizadas após 13 (5 tratamentos com acupuntura) ou 28 dias (10 tratamentos com acupuntura) – indicados como “Cinco” e “Dez” no eixo X do gráfico. Os dados de BDNF foram expressos em picograma

por miligrama de proteína total. Análise estatística usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, onde * $p < 0,05$ comparado ao grupo FO e # $p < 0,05$ comparado ao grupo OP.

5.4 Comparação do efeito da acupuntura com o tratamento farmacológico utilizando gabapentina, em diferentes doses, sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica, induzidas por LPNC em camundongos

A hipersensibilidade mecânica e térmica dos grupos tratados com gabapentina, associados ou não a acupuntura, foi verificada pelo teste de von Frey e acetona. Quanto à hipersensibilidade mecânica (Figura 14A), podemos observar que, desde o primeiro dia de tratamento com 10mg/kg de gabapentina, existe diferença estatística entre o grupo GB e o operado, tendo maiores inibições nos dias 4, 13, 16 e 19, com $p < 0,0001$. Já na comparação entre os grupos gabapentina em dose subefetiva (GB1/2) e grupo de animais operados, o tratamento com 5mg/kg, teve efeito apenas nos dias 10, 19, 25 (maior diferença estatística, com $p < 0,001$) e 28 (Figura 14A). O tratamento associado de acupuntura e 5mg/kg de gabapentina, por sua vez, apresentou diferença estatística, quando comparado ao controle, no 4º, 13º, 16º 19º e 28º dias, com maior diferença estatística de $p < 0,001$ nos dias 4, 16 e 19 (Figura 14A). É importante salientar que em nenhum momento das análises verificou-se diferença estatística entre os grupos SP6 versus GB1/2 + SP6; entre SP6 e GB; e de forma interessante, entre os grupos GB1/2 + SP6 versus GB1/2.

Quando se analisou a hipersensibilidade térmica (Figura 14B), pode-se observar que, o grupo GB1/2+SP6 não apresentou efeito, com diferença estatística, em nenhum dos dias de avaliação. Já o grupo tratado com 10mg/kg de gabapentina apresentou diferença estatística, quando comparados ao grupo operado, nos dias 1, 7 e 11 e, com 5 mg/kg de gabapentina, apenas no dia 25. Da mesma maneira, em nenhum momento das análises verificou-se diferença estatística entre os grupos SP6 comparado ao grupo GB1/2 + SP6; entre os grupos SP6 e GB; e entre os grupos GB1/2 + SP6 versus GB1/2.

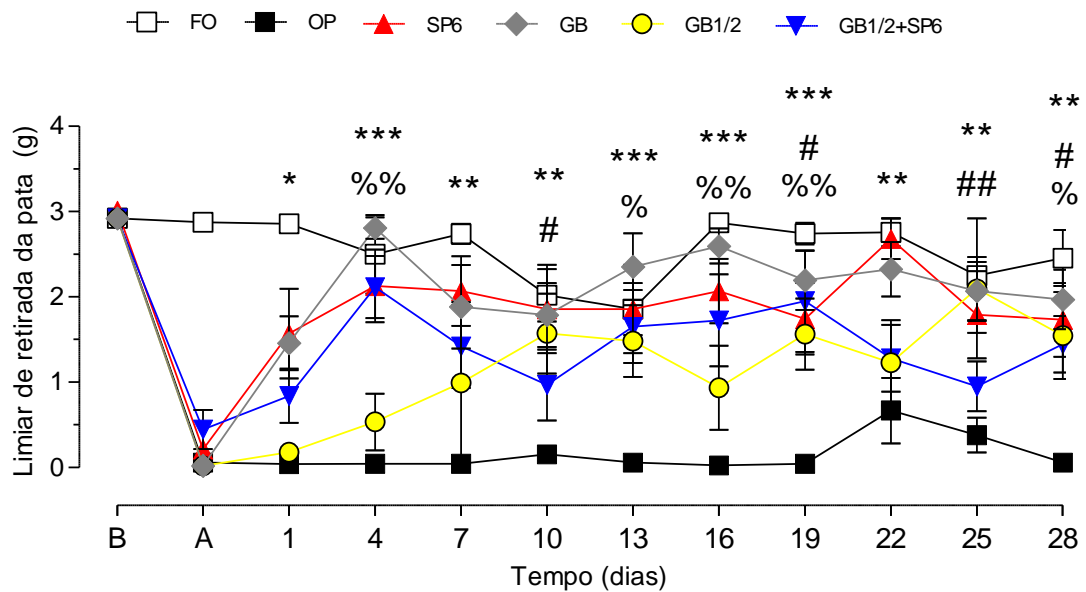
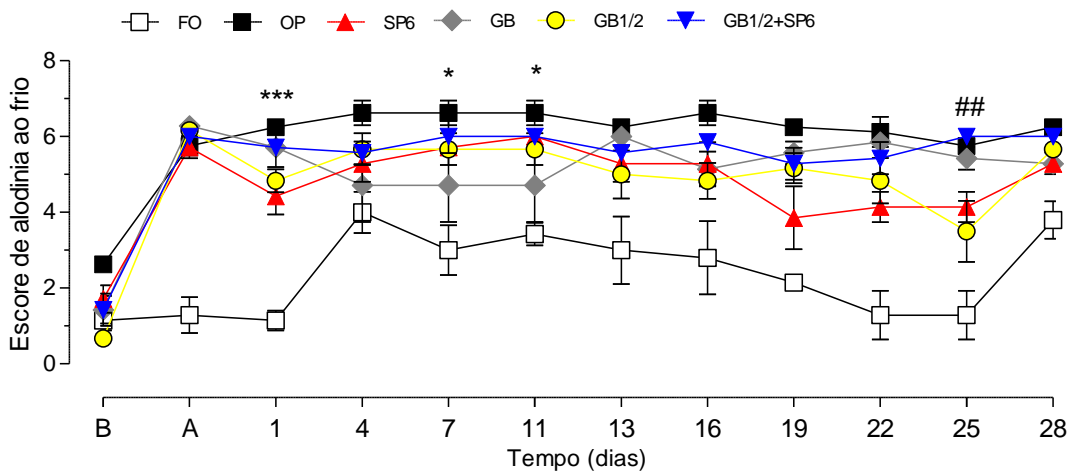
A**B**

Figura 14: Efeito do tratamento com acupuntura, gabapentina, gabapentina em dose subefetiva e associação da terapia com acupuntura e dose subefetiva sobre a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio na pata de camundongos com neuropatia periférica induzida por LPNC. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos: FO – falso operado; OP – operado com LPNC; GB – LPNC + gabapentina; SP6 – LPNC + agulhamento no acuponto SP6; GB1/2 – LPNC + gabapentina em dose subefetiva; GB1/2+SP6 – LPNC + tratamento com gabapentina em dose subefetiva associado ao tratamento com acupuntura. As avaliações de hipersensibilidade mecânica (A) e hipersensibilidade ao frio (B), foram realizadas antes da indução da neuropatia (B: basal) e nos dias 1, 4, 7, 11, 13, 16, 19, 22, 25 e 28. (□) representa o grupo FO; (■) representa o grupo OP; (▲) representa o grupo tratado com acupuntura no

acuponto SP6; (◆) representa o grupo GB; (○) representa o grupo GB1/2; e o (▼) representa o grupo tratado com gabapentina em dose subefetiva associado ao tratamento com acupuntura. Foi utilizado análise de variância de duas vias seguida de teste post hoc de Bonferroni. As linhas verticais indicam o S.E.M e os símbolos indicam: * para comparar com o grupo OP versus o grupo GB (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$), # para comparar com o grupo OP com o grupo GB1/2 (# $p < 0,05$; ## $p < 0,001$), e % para comparar o grupo OP com o grupo GB1/2+SP6 (% $p < 0,05$; %% $p < 0,001$).

5.5 Comparação do efeito da acupuntura com o tratamento farmacológico utilizando gabapentina, em diferentes doses, sobre os aspectos tipo-depressivo e ansiogênico e transtornos de memória, induzidas por LPNC em camundongos

A fim de comparar o efeito da acupuntura com o tratamento farmacológico, realizou-se dois diferentes testes para analisar o comportamento tipo-depressivo: o teste de suspensão da cauda (Figura 15A) e o nado forçado (Figura 15B). Em ambos os testes, o grupo operado apresentou diferença estatística do grupo falso operado, tendo maior tempo de imobilidade nos testes, indicando comportamento tipo-depressivo. Em ambos os testes, o tratamento com gabapentina (10mg/kg) foi capaz de reduzir estatisticamente esse comportamento quando comparado com o grupo operado, com $p < 0,0001$ e inibição de até 100% e $78 \pm 14\%$ da imobilidade, no TSC e no TNF, respectivamente. Porém, o grupo que recebeu gabapentina a 5mg/kg (GB1/2) não apresentou diferença estatística comparado ao grupo operado (Figura 15A e B). O tratamento com acupuntura, grupo SP6, foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade quando comparado com o operado, como observado anteriormente no TSC, bem como, o tratamento com SP6 associado ao medicamento gabapentina (GB1/2+SP6), também inferiu redução da imobilidade dos animais do TSC ($p < 0,05$) e no TNF ($p < 0,0001$) (Figura 15A e B). No entanto, ressalta-se que o grupo tratado com SP6 teve uma inibição máxima do tempo de imobilidade de até 100% no TSC e de $86 \pm 14\%$ no TNF, enquanto o grupo GB1/2+SP6 teve inibição de até 100% no TSC e de $49 \pm 23\%$ no TNF, sem que conseguíssemos observar diferença estatística entre os grupos SP6 comparado ao GB1/2+SP6; o grupo GB versus SP6; e entre o grupo GB e o GB1/2+SP6.

No teste de memória, o tempo de latência que o animal demorou para descer até a plataforma eletrizada pode ser observado na Figura 14C. Quanto maior o tempo de latência, diz-se que maior a consolidação da memória aversiva. Em ambos os tempos - 30 minutos (memória de curta duração) e 24 horas (memória de longa duração), o grupo operado possuiu tempo de latência menor que do grupo falso operado, com $p < 0,001$. Ainda, nota-se que houve

diferença estatística, com o grupo controle, apenas nos animais tratamentos com acupuntura no SP6, sem associação de fármaco ($p < 0,05$).

Como observado nas avaliações anteriores do labirinto em cruz elevado, tanto os valores obtidos na porcentagem de tempo que o animal ficou no braço aberto (Figura 15C) quanto no número de entradas no braço aberto (Figura 15D), preditivos do comportamento ansiogênico, não foi observado diferença estatística entre os grupos, tanto no tratamento com 5 sessões de acupuntura quanto com 10 sessões.

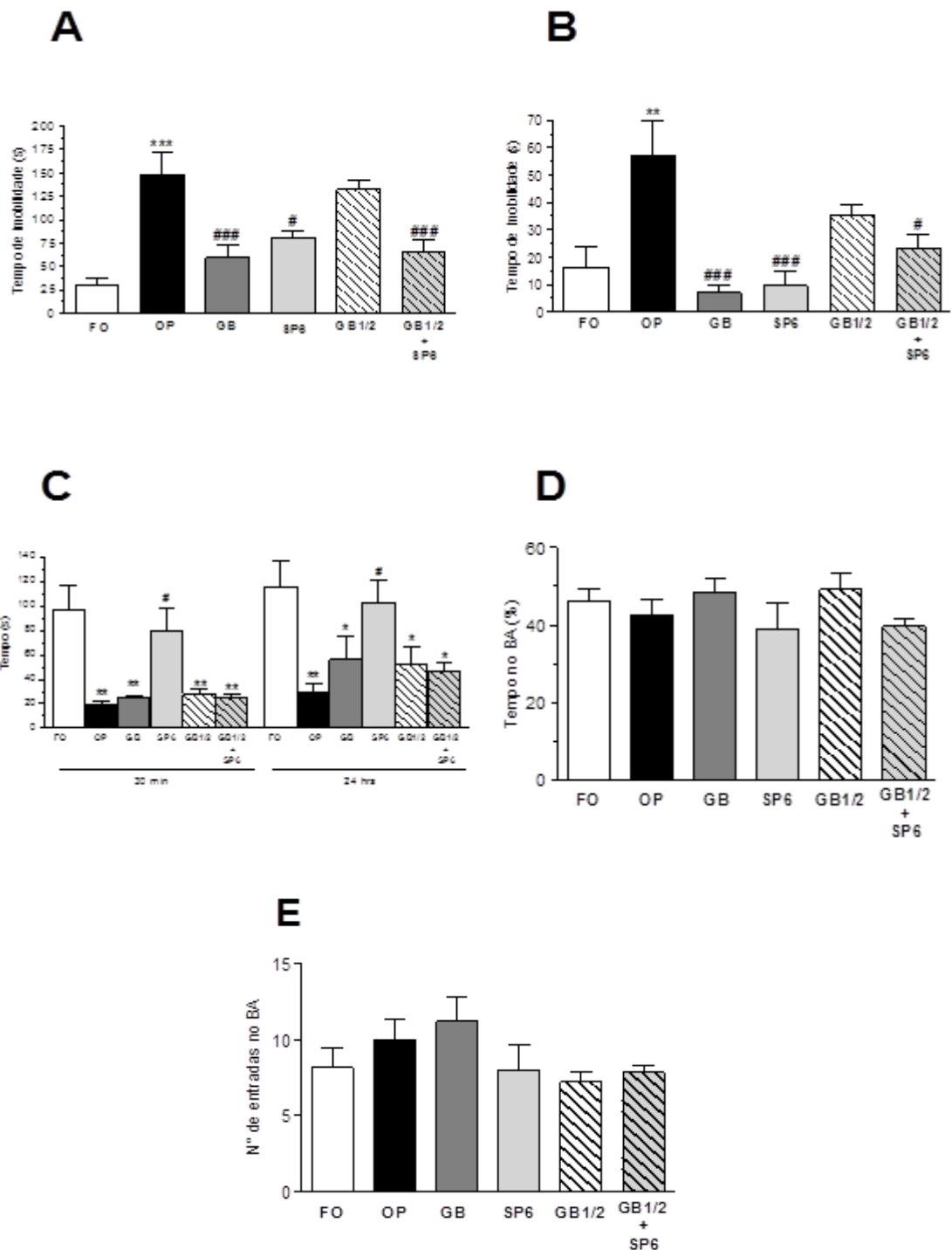


Figura 15: Efeito do tratamento com acupuntura, gabapentina, gabapentina em dose sub efetiva e associação da terapia com acupuntura e dose sub efetiva no perfil comportamental de depressão, ansiedade e problemas de memória induzidos pela LPNC. Os animais foram divididos em grupos: FO – falso operado; OP – operado com LPNC; GB – LPNC + gabapentina; SP6 – LPNC + agulhamento no acuponto SP6; GB1/2 – LPNC + gabapentina em dose sub efetiva; GB1/2+SP6 – LPNC + tratamento com gabapentina em dose sub efetiva associado ao tratamento com acupuntura. A avaliação foi realizada após 28 dias do início da análise da neuropatia ou após 10 tratamentos com SP6. A: Tempo de imobilidade durante o teste de suspensão da cauda; B: Tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado; C: Tempo de latência na descida no teste de esquiiva inibitória; D: Porcentagem de tempo de permanência dos animais nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado; E: Número de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado. Análise estatística usando ANOVA de uma via, sendo * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ - comparados ao grupo FO; e # $p < 0,05$, e ### $p < 0,0001$ - comparados ao grupo OP.

5.6 Níveis de BDNF no hipocampo de camundongos com lesão neuropática tratados com gabapentina com dose terapêutica ou sub efetiva, associada ou não ao tratamento com acupuntura

O hipocampo dos grupos de animais foi coletado para análise de BDNF, no 28º dia após o 1º tratamento, ou seja, 10 tratamentos após a lesão. Os dados apresentados na figura 16 demonstraram que os animais do grupo OP, em comparação ao grupo FO, apresentaram níveis de BDNF diminuídos. Essa diminuição também é observada nos grupos GB, GB1/2 e GB1/2+SP6. No entanto, o aumento dos níveis de BDNF, pode ser observado no grupo SP6, com $p < 0,001$.

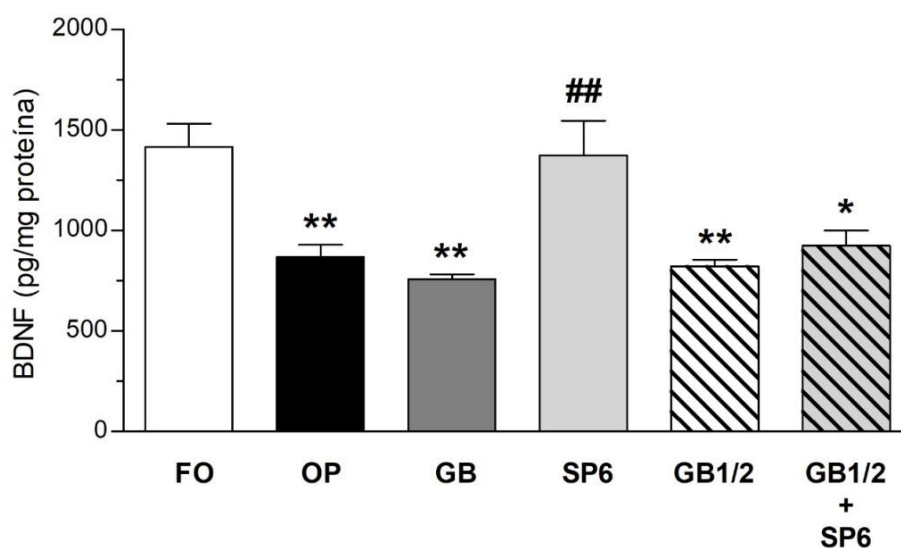


Figura 16: Expressão de BDNF no hipocampo de camundongos com neuropatia após tratamento com acupuntura, gabapentina, gabapentina em dose subefetiva e associação da terapia com acupuntura e dose subefetiva. As análises foram realizadas nos grupos FO (falso operado), OP (operado), GB (gabapentina), SP6 (acupuntura), GB1/2 (gabapentina em dose subefetiva), e GB1/2+SP6 (tratamento com gabapentina em dose subefetiva associado ao tratamento com acupuntura). Os dados de BDNF foram expressos em picograma por miligrama de proteína total. Análise estatística usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ - comparado ao grupo FO e ### $p < 0,01$ comparado ao grupo OP.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, a cirurgia de LPNC induziu hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio nos camundongos. O tratamento com gabapentina foi capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela LPNC, como já esperado. Isso porque, encontra-se descrição na literatura do efeito analgésico desse fármaco tanto em modelos animais (SUZUKI, 2005) quanto em humanos (BACKONJA, 2000). Ademais, a acupuntura manual no SP6 também foi capaz de reduzir significativamente a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela neuropatia desde o primeiro tratamento até o restante dos dias de avaliação (28º dia).

Vários artigos científicos já indicam o efeito analgésico da acupuntura sobre a dor neuropática (CHA et al, 2010; CIDRAL-FILHO et al, 2011; VIEIRA et al, 2018; SHEN et al, 2014). Contudo, o efeito da acupuntura na maioria dos artigos foi obtido utilizando esta técnica combinada a correntes elétricas, conhecida como eletroacupuntura (CHA et al, 2010; MENG e FENG, 2011; WANG et al, 2016; SUI et al, 2016; YAN et al, 2016). Ainda outros artigos demonstraram o efeito analgésico quando acupontos foram combinados (CHA et al, 2010; CIDRAL-FILHO et al, 2011; CHEN et al, 2017; YAN et al, 2016; TAKAGI et al, 2017).

Em um estudo similar ao nosso, de Cidral-Filho e colaboradores (2011), os animais submetidos à ligadura do nervo espinhal (outro modelo de indução de dor neuropática) foram tratados com acupuntura manual. Os dois acupontos utilizados na pesquisa (SP6 e ST36) apresentaram atividade antinociceptiva, reduzindo a hipersensibilidade mecânica. No entanto, nós demonstramos o efeito antinociceptivo obtido pela estimulação manual com agulha, sem eletroestimulação, realizada em apenas um acuponto (SP6) em aplicação unilateral no lado ipsilateral à cirurgia.

A agulha de acupuntura tem a finalidade de estabelecer uma diferença de potencial entre os dois extremos da agulha que, por sua vez, age como um estímulo sobre as membranas celulares e altera o potencial de ação e a condução nervosa, dependendo da profundidade de inserção da agulha (KANDELL, SCHARWARTZ, JESSEL, 1991; GUYTON, 1991). A técnica

de manipulação da agulha (rotação), como é preconizado pelos chineses, é importante pois, diferentes neurotransmissores são liberados, excitando ou inibindo, resultando em interpretações cerebrais distintas e diferentes respostas (MACIOCIA, 2007).

Tanto estímulos nocivos quanto a acupuntura são ao corno posterior da medula espinal, podendo estabelecer sinapses com neurônios motores e com neurônios pré-ganglionares simpáticos (KANDELL, SCHARWARTZ, JESSEL, 1991). Esta via de estimulação em nível somático, provavelmente, tem ação sobre os órgãos internos, logo, a analgesia para uma dor muito intensa pode ser obtida fazendo-se a inserção seguida de estímulos fortes, produzindo, então, um efeito analgésico por liberação de substâncias opióides (KANDELL, SCHARWARTZ, JESSEL, 1991).

A LPNC foi capaz de induzir o comportamento tipo-depressivo nos animais e reduziu a expressão de BDNF na região do hipocampo dos animais após 35 dias da cirurgia, corroborando trabalhos que sugerem que os níveis de BDNF diminuídos podem participar da indução ou manutenção da depressão induzida por dor neuropática (AL-AMIN *et al.*, 2011). O tratamento com acupuntura no SP6 reverteu esses comportamentos. Na China e em outros países do leste asiático, a acupuntura é usada não somente para o tratamento de depressão, mas também em problemas de ansiedade, insônia e estresse (PILKINGTON, 2013). Vários artigos avaliaram as possibilidades do tratamento com acupuntura na depressão em humanos (HADDAD e PALESH, 2014; MO *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2017). Em modelos animais, esses efeitos foram demonstrados utilizando tanto eletroacupuntura quanto acupuntura manual (SHE *et al.*, 2015; LE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2017). Estes estudos corroboram nossos achados de que, após 10 sessões de acupuntura houve redução do tempo de imobilidade dos animais com neuropatia (SHI *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2016; TANAHASHI *et al.*, 2016; XIAO *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2018).

Mais ainda, nosso modelo de indução, simula a dor do tipo crônica neuropática. É comum que alguns pacientes não respondam aos tratamentos farmacológicos com antidepressivos ou que seus efeitos terapêuticos demorem semanas para serem notados. Além disso, esses efeitos benéficos, frequentemente, são acompanhados de alguns efeitos adversos (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Desta forma, saliento este estudo foi pioneiro na investigação do tratamento com acupuntura, uma possibilidade alternativa, ao uso de medicamentos para o tratamento do aspecto tipo-depressivo induzido por dor neuropática.

Neste trabalho, observou-se ainda que a LPNC induziu alterações de memória e reduziu os níveis de BDNF no hipocampo dos animais, após 35 dias da realização da cirurgia. O teste

de esquiva inibitória evoca memórias relacionadas a um evento doloroso (choque elétrico) e sustentam comportamentos de proteção no animal (KAI-YU, 2016). No entanto, essas memórias podem desencadear estados psicológicos negativos, impedindo interações sociais ou permanência em determinados locais. Sabe-se que a dor neuropática periférica é frequentemente acompanhada de redução no desempenho cognitivo. Esse comprometimento é uma das maiores preocupações quando se trata de administração prolongada de drogas que afetam o SNC, pois funções do córtex pré-frontal, incluindo memória de trabalho e atenção, são prejudicadas (BLAKE *et al.*, 2010).

Assim como a melhora da memória, observou-se o aumento da expressão de BDNF no hipocampo dos animais tratados com acupuntura. A atividade do BDNF no hipocampo, no córtex e no prosencéfalo basal é fundamental no processo de aprendizagem e memória (MANNI *et al.*, 2010). Em roedores, o estresse agudo ou crônico diminui a expressão do BDNF, especialmente no hipocampo (BERTON e NESTER, 2006). As neurotrofinas desempenham papéis importantes na produção e desenvolvimento da dor neuropática, porém suas ações podem ser diferentes em outros circuitos neurais. Por exemplo, seu aumento poderia exercer efeitos semelhantes aos antidepressivos a nível do hipocampo (BERTON e NESTER, 2006; PEZET e MCMAHON, 2006) e sua diminuição, pode levar a diminuição da plasticidade, provocando danos e morte neuronal (MALBERG *et al.*, 2000; MALBERG *et al.*, 2005).

Um estudo recente, demonstrou que a eletroacupuntura foi capaz de diminuir a expressão de BDNF e de receptor tirosina kinase (TrkB) na medula espinal de ratos após lesão crônica constritiva (ITO *et al.*, 2018). Outros autores relataram que a eletroacupuntura induziu aumento da regulação do BDNF (LIANG *et al.*, 2002) ou restauraram essa neurotrofina no hipocampo (YIN *et al.*, 2002; MANNI *et al.*, 2010).

Atualmente, sabe-se que tanto aprendizagem quanto memória estão relacionadas ao córtex cerebral e ao hipocampo e que a acupuntura é capaz de reduzir o nível de citocinas inflamatórias e aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase reduzindo o dano cerebral nessas áreas (XU e LI, 2006; XU, 2007; LIU e LEI 2013). Uma revisão sistemática e meta-análise, publicada em 2016, concluiu que em modelo animal, a acupuntura é potencialmente estimulante dos processos de aprendizagem e memória. Essa revisão incluiu 42 estudos (n=944) (KAI-YU, 2016).

Portanto, estratégias que neutralizem os efeitos da dor sob os transtornos de memória são pertinentes aos estudos científicos e o tratamento com acupuntura pode ser estudado como uma dessas alternativas (WANG *et al.*, 2008).

A gabapentina é administrada por longos períodos, nas condições neuropáticas, porém pouco se sabe sobre o efeito dessa droga sobre as funções cognitivas, de aprendizado e memória. A pregabalina, medicamento cujo mecanismo de ação é similar à gabapentina, diminuiu os índices de discriminação e reconhecimento de objetos, quando administrado via intraperitoneal em ratos (SALIMZADE; HOSSEINI-SHARIFABAD; RABBINI, 2017). A associação de gabapentina ou pregabalina e baclofeno, um relaxante muscular também utilizado para o tratamento de neuropatias, causa significativos déficits de memória (SALIMZADE; HOSSEINI-SHARIFABAD; RABBINI, 2017). Essa evidência é importante pois, muitos pacientes fazem uso de medicamentos adicionais, sem prescrição correta ou acompanhamento profissional especializado.

Já foi demonstrado que, em roedores após a lesão do nervo periférico, e em pacientes com dor crônica, que a administração de gabapentina por longos períodos produz analgesia (SUZUKI *et al.*, 2005). Também já foi demonstrado que a administração de um antagonista do receptor 5-HT, pode atenuar os défices cognitivos associados com neuropatia. Esse efeito também é observado quando o tratamento é uma associação entre esses dois fármacos e além disso, o antagonista 5-HT melhorou a eficácia da gabapentina, possibilitando a redução na dosagem do fármaco e a frequência de tratamento, dessa forma possibilitou a redução dos efeitos colaterais (SUZUKI *et al.* 2005). A combinação entre dois medicamentos com o intuito mostrado anteriormente, não se aplica exclusivamente ao tratamento farmacológico. Coerente com estes achados, o presente trabalho mostrou que, o tratamento com gabapentina na dose sub efetiva associado a acupuntura manteve o efeito de redução do aspecto tipo-depressivo, mas não o efeito de melhora da memória induzida pela acupuntura, quando realizada de forma isolada.

As diretrizes farmacológicas para o manejo da dor incluem a gabapentina como fármaco de primeira escolha. Porém, o tratamento das neuropatias é complexo, especialmente devido a imprevisibilidade da eficácia desse medicamento. Os efeitos da gabapentina são devidos a ativação de vias colinérgicas, adrenérgicas, GABAérgicas e do óxido nítrico. Os modelos de lesão, incluindo a ligadura do nervo espinhal (L5-L6) e a LPNC, induzem a plasticidade dos neurônios GABAérgicos e, a administração de gabapentina após essas lesões, reduzem a liberação pré-sináptica de GABA no locus coeruleus e ativa a inibição noradrenérgica descendente através da desinibição de neurônios do locus coeruleus (YOSHIZUMI *et al.*, 2012). A gabapentina também pode aumentar a mieloperoxidase neural e os níveis de

citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e regular a expressão de interleucina (IL)-10 na medula espinal (CÂMARA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013).

No entanto, a maior parte dos medicamentos analgésicos utilizados, como os antidepressivos e opióides, além da necessidade de administração diária apresentam contraindicações, efeitos adversos e pode levar ao desenvolvimento de tolerância (JACKSON, 2006). Um estudo de Jackson (2006) apontou que a acupuntura no SP6, a partir da oitava sessão, mantinha o efeito mesmo nos dias em que os animais não haviam sido tratados (efeito de 24-48hs) e após o último tratamento, se estendeu por um período de quatro dias (96 horas). Este dado é muito relevante, uma vez que um problema comum que ocorre durante a utilização em longo prazo de terapias farmacológicas para o tratamento da dor, como no caso do tratamento opióide (PORTENOY, 1999).

Na meta-análise de Chan e colaboradores (2015) foram incluídos estudos onde houve a associação de acupuntura e medicamentos para o tratamento de depressão maior. 13 ensaios clínicos randomizados envolvendo 1046 indivíduos, apontaram que, a combinação de tratamentos parece resultar em maior eficácia terapêutica do que a terapia farmacológica sozinha. Porém todos os medicamentos utilizados foram administrados em suas doses efetivas e neste trabalho, somente utilizamos a associação de intervenções com uma sub dose do fármaco. Uma possibilidade futura é realizar esse protocolo utilizando a dose efetiva em associação com a acupuntura para verificar seus efeitos.

Porém, esse trabalho mostrou que as doses, efetiva e sub efetiva, de gabapentina reduzem a hiperalgesia induzida por LPNC, como demonstrado na literatura. Esperava-se que mesmo em dose mais baixa, a gabapentina, quando associada com a acupuntura, potencializasse o efeito desta última. Mas isso não foi observado. Mesmo assim, a acupuntura sozinha foi capaz de reduzir o comportamento do tipo-depressivo. Essa informação sugere que, a gabapentina interage na via de sinalização da acupuntura inibindo seu efeito. Porém, mais estudos são necessários para tal comprovação.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo verificamos que a LPNC induziu, além de hiperalgesia mecânica e térmica, comportamento tipo-depressivo e alterações de memória de curto e de longo prazo em camundongos, aproximadamente um mês após a cirurgia. Os transtornos observados nesses animais estão relacionados, ao menos em parte, com uma diminuição de BDNF no hipocampo dos camundongos neuropáticos.

Ainda, demonstramos que a acupuntura reduziu a hiperalgesia induzida pela neuropatia, bem como diminuiu o comportamento tipo-depressivo dos animais. Ademais, a acupuntura melhorou a memória de curta duração, com apenas cinco tratamentos e, com dez tratamentos ela foi capaz de aprimorar a memória de curto e de longo prazo em animais com déficits de memória induzido pela LPNC. De forma interessante, a acupuntura impediu a redução de BDNF induzida pela LPNC no hipocampo dos camundongos, o que pode explicar, pelo menos em parte, os efeitos da acupuntura nesse modelo experimental.

O tratamento com gabapentina, em uma dose efetiva, reduziu a hiperalgesia e diminuiu o comportamento tipo-depressivo dos animais com neuropatia, porém não modificou os níveis de BDNF do hipocampo, bem como não reduziu o déficit de memória dos animais. O tratamento com gabapentina na dose sub efetiva associado a acupuntura manteve o efeito de redução do aspecto tipo-depressivo, mas não o efeito de melhora da memória induzida pela acupuntura, quando realizada de forma isolada. Ainda, o tratamento farmacológico associado a acupuntura reverteu os efeitos do agulhamento no SP6 sobre a expressão de BDNF hipocampal.

Podemos afirmar nesse estudo que a acupuntura, realizada de forma isolada, é um tratamento efetivo no manejo da dor e das comorbidades associadas a neuropatia crônica. No entanto, o fármaco, ou a dose dele, utilizados nesse estudo, não contribuíram para potencializar os efeitos da acupuntura, ao contrário, impediram alguns dos seus efeitos terapêuticos.

Como perspectiva, deve-se realizar mais pesquisas analisando o tratamento com acupuntura associado a diferentes fármacos, com um estudo mais rigoroso das doses utilizadas, pois esses dados poderiam incrementar os resultados encontrados até o presente momento.

8. REFERÊNCIAS

- ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 35, n. 2, 2013.
- ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M.A.; GORDON, J.A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron.*, v. 65, p. 257-269, 2010.
- AKIL, H. et al. Treatment resistant depression: A multi-scale, systems biology approach. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 84, p. 272-288, 2018.
- ALLEMAN, C. J. M. et al. Factors Influencing Dutch Drug Reimbursement Recommendations; A Database Analysis. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 109, n. 2, p. 215 – 225, 2015.
- AL-AMIN, et al. Chronic dizocilpine or apomorphine and development of neuropathy in two animal models II: effects on brain cytokines and neurotrophins. **Exp Neurol**, v. 228, p. 30-40, 2011.
- ASMUNDSON, G. J.; KATZ, J. Understanding the co-occurrence of anxiety disorders and chronic pain: state-of-the-art. **Depress Anxiety**, v. 26, p. 888–901, 2009.
- ATTAL, N. et al. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey. **Pain**, v. 152, p. 2836–2843, 2011.
- BACKONJA, M. et al. Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 280, p. 1831-6, 1998.
- BAIR, M. J. et al. Depression and pain comorbidity: a literature review. **Arch Intern Med**, v. 163, p. 2433-2445, 2003.
- BARON, R. et al. O emplastro medicado com lidocaína a 5%: sua inclusão em diretrizes internacionais de tratamento para o tratamento da dor neuropática localizada e evidências clínicas que sustentam seu uso. **Dor Ther**, v.5, p. 149-169, 2016.
- BARON, R. Neuropathic pain: a clinical perspective. **Handb Exp Pharmacol**, n. 194, p. 3-30, 2009.

- BARR, A. M.; MARKOU, A. Psychostimulant withdrawal as an inducing condition in animal models of depression. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 29, n. 4-5, p. 675-706, 2005.
- BEE, L.; DICKENSON, A. Modulação descendente da dor. Em: Malcangio, M. (Ed). **Plasticidade sináptica na dor**. Nova Iorque: Springer Verlag, 2009. p. 307–335.
- BENER, A. et al. Psychological factors: anxiety, depression, and somatization symptoms in low back pain patients. **Journal of Pain Research**, v. 6, p. 95-101, 2013.
- BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.
- BERTON, E. **More Chinese get free drugs in clinical trials**. Wall St J (East Ed). v. 14, p. B1, B8, 2006.
- BEURKE, J. G. et al. Discos intervertebrais que causam dor lombar secretam altos níveis de mediadores pró-inflamatórios. **J Cirurgia da Articulação Óssea**, v. 84, n. 2, p. 196-201, 2002.
- BLAKE, M. G. et al. Novel long-term anticonvulsant treatment with gabapentin without causing memory impairment in mice. **Epilepsy Behav.** v. 17, n. 2, p. 157-64, 2010.
- BO-HONG, K. et al. Acupuncture improves dendritic structure and spatial learning and memory ability of Alzheimer's disease mice. **Neural Regen Res.**, v. 13, n. 8, p. 1390–1395, 2018.
- BOLDRINI, M. et al. Benzodiazepines and the potential trophic effect of antidepressants on dentate gyrus cells in mood disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, v. 17, p. 1923-1933, 2014.
- BOUHASSIRA et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380-387, 2008.
- BOUHASSIRA, D.; ATTAL, N. Translational neuropathic pain research: a clinical perspective. **Neuroscience**, v. 3, p. 27-35, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

- BRAZ, J.M. et al. Os precursores do neurónio GABAérgico integram-se na medula espinal adulta e reduzem a dor neuropática induzida por lesões. **Neurônio**, v. 74, p. 663-675, 2012.
- CÂMARA, C. C. Oral gabapentin treatment accentuates nerve and peripheral inflammatory responses following experimental nerve constriction in Wistar rats. **Neurosci Lett.**, v. 27n. 556, p. 93-8. 2013.
- CAO, Y. et al. Mecanismos do efeito da acupuntura na doença de Alzheimer em pesquisas de origem animal. **Curr Top Med Chem.**, v. 16, p.574-578, 2016.
- CARDOSO, F. C.; LEWIS, R. J. Canais de sódio e dor: de toxinas a terapias. **Br J Pharmacol**, v. 75, n. 12, p. 2138-2157, 2017
- CHA, M.H. et al. Antiallodynic effects of acupuncture in neuropathic rats. **Yonsei Med J**, v. 47, p. 359 –366, 2010.
- CHALMERS, I. *et al.* How to increase value and reduce waste when research priorities are set. **Lancet**, v. 383, p. 156–165, 2014.
- CHAN, Y. Y. et al. The benefit of combined acupuncture and antidepressant medication for depression: A systematic review and meta-analysis. **J Affect Disord.**, v. 176, p. 106-17, 2015.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.
- CHEN H. et al. Efeito de “Harmonização Baço-Estômago”: a inserção de agulha na Resistência à Insulina e expressão de insulina receptor Substrato-1, -2, e transportador de glicose-4 na Resistência à Insulina Os ratos Tipo 2 diabetes. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 42, n.3, p.197-201, 2017.
- CHEN, G. et al. Células estromais intratecais da medula óssea inibem a dor neuropática via secreção de TGF-beta. **J Clin Invest.**, v. 125, p. 3226-3240, 2015.
- CIDRAL-FILHO, F. J. et al, 2011. Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuroscience**, v. 193, p. 370 –376. 2011.
- COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nat Rev Dis Primers**, v. 16, n. 3, 2017.
- CRUCRU, G. et al. Diretrizes do EFNS sobre terapia de neuroestimulação para dor neuropática. **Eur J Neurol.**, v. 14, p. 952-970, 2007.

CZÉH, B.; FUCHS, E. WIBORG, O. SIMON, M. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293-310, 2016.

DA SILVA, M. D. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da acupuntura no acuponto spleen 6 (SP6) em camundongos: análise dos seus mecanismos neurobiológicos**. 2013. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DELLAROZA M. S. G. et al., Associação de dor crônica com uso de serviços de saúde em idosos residentes em São Paulo. **Rev Saúde Pública**, v. 47, n. 5, p. 914-22, 2013.

DE HEER, E. W. et al. The Association of Depression and Anxiety with Pain: A Study from NESDA. **PLoS One**, v.9, n. 10, 2014.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149-58, 2000.

DENG, Y. et al. Clinical practice guidelines for the management of neuropathic pain: a systematic review. **BMC Anesthesiol.**, v., 16 n. 12, 2016

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.20, p. 441-462, 1980.

DOBSON, J. L.; MCMILLAN, J.; LI, L. Benefícios da intervenção do exercício na redução da dor neuropática. **Neurociências da Célula da Frente**, v. 8, p. 102, 2014.

DOLAN, R.J. Emotion, cognition, and behavior. **Science**, v. 298, n. 5596, p. 1191-4, 2002.

DONG, B. et al. A eficácia da acupuntura para o tratamento da depressão Insônia-relada em comparação com um grupo controle: uma revisão sistemática e meta-análise. **Biomed Res Int.** , 9614810. Epub 2017.

DONG, B. et al. A eficácia da acupuntura para o tratamento da depressão Insônia-relada em comparação com um grupo controle: uma revisão sistemática e meta-análise. **Biomed Res Int.**, v. 2017, p. 9614810, 2017

DONG, B. et al. Acupuntura no tratamento de sintomas psicológicos relacionados ao câncer. **Integrar Câncer Ther.** , v. 13, n. 5, p. 371-85, 2017.

- DORFER, L. et al. A medical report from the stone age? **Lancet**, v.354, n.9183, p.1023-1025, 1999.
- DOS SANTOS, J. G. Jr. Et al. Antidepressive-like effects of electroacupuncture in rats. *Physiol Behav.*, v. 93, p. 155-159, 2008.
- DOS SANTOS, J.G. Jr. et al. Antidepressive-like effects of electroacupuncture in rats. **Physiol Behav.** v. 93, p. 155-159, 2008.
- DOWELL, D.; HAEGERICH, T. M.; CHOU, R. **CDC Guideline for Prescription of Opioids for Chronic Pain** - Estados Unidos, 2016.
- DRAKE R, V. A., ADAM MITCHELL A. **Gray's Anatomy for Students**. New York: Churchill Livingstone, 2004.
- DUERDEN E. G., et al. Decreased sensitivity to thermal stimuli in adolescents with autism spectrum disorder: relation to symptomatology and cognitive ability. **J Pain**, v. 16, p. 463–471, 2015.
- DUMAN, R.S.; MONTEGGIA, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry*, v. 59, p. 1116-1127, 2006.
- DWORKIN R. H. et al. Manejo intervencionista da dor neuropática: recomendações de NeuPSIG. **Pain**, v. 154, p. 2249–2261, 2013.
- DWORKIN, R. H. et al. Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. **Mayo Clin Proc**, v. 85, n. 3, p. S3-S14, 2010.
- ECCLESTON, C. et al. Terapias psicológicas (fornecidas pela internet) para o manejo da dor crônica em adultos. **Banco de Dados Cochrane Syst Rev.**, v. 2, p. CD010152, 2014.
- EMERY E.C.; LUIZ, A. P.; WOOD, J. N. Nav1.7 e outros canais de sódio dependentes de voltagem como alvos de drogas para o alívio da dor. **Ther Targets.**, v. 20, p.975-983, 2016.
- ENGLAND, J. D.; ASBURY, A. K. Peripheral neuropathy. **Lancet**, v. 26, n. 363, p. 2151-61, 2004.
- FINNERUP, N. B. et al. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain**, v. 157, p. 1599–1606, 2016.

- FINNERUP, N. B. et al. Farmacoterapia para dor neuropática em adultos: uma revisão sistemática e meta-análise. **Lancet Neurol.**, v.14, p. 162–173, 2015.
- FLATTERS, S. J. L.; BENNET, G. J. Ethosuxime reverses placlitaxel- and vincristine- induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v.109, p.150-161, 2004.
- FLEMING, P. Atlas de transposição de anatomia equina. Em SHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária – Da arte antiga à medicina moderna**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2006. Cap. 31, p. 383-423.
- FORNASSARI, D. Farmacologia da dor: foco nos opioides. **Casos Clin Miner ósseo Metab.**, v. 11, p. 165-168, 2014.
- FORNASSARI, D. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. **Pain Ther.**, v. 6, n. 1, p. 25–33, 2017.
- FREEMANN, R. Not all neuropathy in diabetes is of diabetic etiology: differential diagnosis of diabetic neuropathy. **Curr Diab Rep.**, v. 9, p. 423–431, 2009.
- GERRITS, M. M. J. G. et al. Pain, not chronic disease, is associated with the recurrence of depressive and anxiety disorders. **Psiquiatria BMC**, v. 14, p.187, 2014.
- GIDAL, B.E. New and emerging treatment options for neuropathic pain. **Am J Manag Care**, v. 12, p. 269-78, 2006.
- GOLDMAN, N. et al. Adenosine A1 receptors mediate local antinociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**, v. 13, p. 883-888, 2010.
- GONGWANG, L. **Tratado contemporâneo de acupuntura e moxibustão**. Editora CEIMEC. 2005.
- GORE et al. M. Carga de doença na neuropatia periférica diabética dolorosa. **J Pain**, v. 7, p. 892 – 900, 2006.
- GOYATÁ, S. L. et al. Effects from acupuncture in treating anxiety: integrative review. **Chin J Integr Med**. 2018.
- GUO, Y. et al. Effect of Acupuncture Intervention on c-jun N-terminal Kinase Signaling in the Hippocampus in Rats with Forced Swimming Stress]. **Zhen Ci Yan Jiu**. 2016 Feb;41(1):18-23.

GUREJE et al. Persistent pain and well-being: a World Health Organization Study in Primary Care. **Pain**, v. 135, p.82-91, 2008.

HADDAD N. E.; PALESH, O. Acupuntura no tratamento de sintomas psicológicos relacionados ao câncer. **Integrar Câncer Ther.**, v. 5, p. 371-85, 2014.

HADDAD, N. E.; PALESH, O. Progress of animal research on electro-acupuncture treatment for depression(Δ). **Chin Med Sci J.**, v. 1, p. 43-7, 2014.

HANEWICKEL, R.; IKRAM, M. A.; VAN DOORN, P. A. **Handbook of Clinical Neurology**. 2016. v. 138, p. 263-282.

HUMMING, W. Estudo dos efeitos da pregabalina em diferentes modelos de dor orofacial. 2014. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

IOANNIDIS, J. P. Why most published research findings are false. **PLoS Med.**, v. 2, p.124, 2005.

ITO, Y. et al. Japanese SUNCT patient responsive to gabapentin. **Rinsho Shinkeigaku**, v. 51, n. 4, p. 275-8, 2011.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Artmed: Porto Alegre, p.95, 2002.

JACKSON, K.C. 2nd. Pharmacotherapy for neuropathic pain. **Pain practice**, v. 6, p. 27-33, 2006.

JACKSON, K.C. 2nd. **Pharmacotherapy for neuropathic pain**. Pain practice, v. 6, p. 27-33, 2006.

JIANG X. R. et al. Efeito da eletroacupuntura no eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HPO) em ratos com depressão na menopausa . **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 42, n.1, p. 45-9, 2017.

JIANG, H. et al. Mechanisms Underlying the Antidepressant Response of Acupuncture via PKA/CREB Signaling Pathway. **Neural Plast.** v. 2017, p. 4135164, 2016.

KAI-YU, H. et al. A systematic review and meta-analysis of acupuncture for improving learning and memory ability in animals. **BMC Complement Altern Med.**, v. 16, p. 297, 2016.

Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M. **Principles of Neural Science**. 4th Ed. New York: McGraw-Hill, 1991.

KAZLAUCKAS, V. et al. Behavioral and cognitive profile of mice with high and low exploratory phenotypes. **Behav Brain Res.**, v. 162, n. 2, p. 272-278, 2005.

KEPLER et al. Expressão e relação da quimiocina pró-inflamatória RANTES / CCL5 e da citocina IL-1 β em discos intervertebrais humanos dolorosos. **Coluna vertebral**, v. 38, n. 11, p. 873-880, 2013.

KIERNAN, J. A. **BARR'S The Human Nervous System: An anatomical viewpoint**. London: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

KIM, C. et al. Association between visit-to-visit glucose variability and cognitive function in aged type 2 diabetic patients: a cross-sectional study. **PLoS One**. 2015; 10 doi: 10.1371/journal.pone.0132118.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-63, set. 1992.

KINDLER et al., Risk factors predicting the development of widespread pain from chronic back or neck pain. **J Pain**, v. 11, p. 1320-1328, 2010.

KLUDING, P. M. et al. O efeito do exercício sobre os sintomas neuropáticos, função nervosa e inervação cutânea em pessoas com neuropatia periférica diabética. **J Diabetes Compl.**, v. 26, p. 424-429, 2012.

KLUSAKOVA, I.; DUBOVY, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. **Ann Anat**, v. 191, n. 3, p. 248-59, jun. 2009.

KRAYCHETE, D. C. et al. Proinflammatory Cytokines in Patients with Neuropathic Pain Treated with Tramadol. **Rev Bras Anesthesiol.**, v. 59, n. 3, p.297-303, 2009.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Pro-inflammatory cytokines and pain. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n. 3, 2006.

KREMER, M.; SALVAT, E.; MULLER, A.; YALCIN, I.; BARROT, M. Antidepressivos e gabapentinóides na dor neuropática: percepções mecanicistas. **Neurociência**, v. 338, p. 183–206, 2016.

KUJIPERS et al. Uma revisão sistemática sobre a eficácia de intervenções farmacológicas para dor lombar crônica não específica. *Eur Spine J.*, v. 20, n. 1, p. 40-50, 2011.

LABIANCA, R. et al. Efeitos adversos associados ao tratamento não opióide e opióide em pacientes com dor crônica. *Clin Drug Investig*, v.32, n. 1, p. 53-63, 2012.

LAI et al. Efeitos da acupuntura no HT7 sobre o metabolismo da glicose em um modelo de rato da doença de Alzheimer: um estudo de 18F-FDG-PET. *Acupuntura Med.*, v. 34, p. 215–222, 2016.

LANDMARK, C.J. Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Med Sci Monit*, v. 13, p. 1-7, 2007.

LANDMARK, C.J. Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy. *CNS Drugs*, v. 22, p. 27-47, 2008.

LARSEN, M.H. et al. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J. Psychiatr. Res.*, v. 44, p. 808-816, 2010.

LAO, L. et al. Electro-acupuncture attenuates behavioral hyperalgesia and selectively reduces spinal Fos protein expression in rats with persistent inflammation. *J Pain*, v.2, n, 2, p.111, 2001.

LE, J.J. et al. Electroacupuncture regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis and enhance hippocampal serotonin system in a rat model of depression. *Neurosci Lett.*, v. 615, p. 66-71, 2016.

LEITE-ALMEIDA, H.; PINTO-RIBEIRO, F.; ALMEIDA A. Animal Models for the Study of Comorbid Pain and Psychiatric Disorders. *Pain in Psychiatric Disorders, Mod Trends Pharmacopsychiatry.*, v. 30, p. 1-21, 2015.

LEONARDI, C.; VELLUCCI, R.; MAMMUCARI, M.; FANELLI, G. Dependência de risco de opiáceos no tratamento da dor crônica na atenção primária: o questionário de risco de adição. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, v. 19, p. 4898-4905, 2015.

LEUNG M. C. et al. Mecanismos subjacentes ao efeito da acupuntura na melhoria cognitiva: uma revisão sistemática de estudos em animais. **J Neuroimmune Pharmacol.**, v. 9, p. 492-507, 2014.

LI, L. et al. Effect of lumbar 5 ventral root transection on pain behaviors: a novel rat model for neuropathic pain without axotomy of primary sensory neurons. **Exp Neurol**, v. 175, n. 1, p. 23-34, 2002.

LI, S. M.; Darella, M. L.; Pereira, O. A. **Acupuntura e medicina tradicional chinesa. Instituto de Ensino e Pesquisa em Medicina Tradicional Chinesa IPE**, Florianópolis. 2004.

LI, W. et al. Electroacupuncture relieves depression-like symptoms in rats exposed to chronic unpredictable mild stress by activating ERK signaling pathway. **Neurosci Lett.**, v. 6, n. 642, p. 43-50, 2017.

LIU, C. Z.; LEI, B. Effect of acupuncture intervention on learning-memory ability and cerebral superoxide dismutase activity and malonaldehyde concentration in chronic fatigue syndrome rats. **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 38, p. 478–481, 2013.

LIU, J.X.; ZHAO, Q. Effect of acupuncture on intestinal motion and sero-enzyme activity in perioperation. **Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi**, v. 11, n. 3, p. 156-167, 1991.

LOMBARD, M. C. et al. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, v. 6, n. 2, p. 163-74, abr. 1979.

LU, J. et al. O efeito regulador de Xiaoyao San em receptores de glucocorticoid sob a condição de stress crônico. **Célula Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 64, n. 6, p. 103-109, 2018.

MACIOCIA, Giovanni. **Os Fundamentos da Medicina Chinesa: Um Texto Abrangente para Acupunturistas e Fitoterapeutas**. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2007.

McCLUGGAGE, D. Acupuntura em pacientes aviários. Em SHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária – Da arte antiga à medicina moderna**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2006. Cap. 31, p. 299-325.

MACPERSON, H. et al. Standards for reporting interventions in controlled trials of acupuncture: the recommendations. **J Altern Complement Med.**, v. 8, n. 1, p. 85-9, 2002.

McEWEN, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiol Rev.**, v. 87, p. 873–904, 2007.

- MALBERG, A. B.; BASBAUM, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, p. 215-222, 1998.
- MALBERG, J. E. et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci.**, v. 20, n. 24, p. 9104-10, 2000.
- MALBERG, J. E.; BLENDY, J. A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 26, n. 12, p. 631-8, 2005.
- MALETIC, V. et al. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int J Clin Pract.*, v. 61, n. 12, p. 2030-2040, 2007.
- MANNI, L. et al. Changes in cognition induced by social isolation in the mouse are restored by electro-acupuncture. **Physiol Behav.**, v. 98, n. 5, p. 537-42, 2009.
- MATHEWS, A. Why worry? The cognitive function of anxiety. **Behav Res Ther.**, v. 28, p. 455-568, 1990.
- MEANS-CHRISTENSEN, A. J. et al. Relationships among pain, anxiety, and depression in primary care. **Depress Anxiety**, v. 25, p. 593-600, 2008.
- MENG, F. F.; FENG, Y. A pilot study of acupuncture at pain acupoints for cervical cancer pain. **Medicine (Baltimore)**, v. 97, n. 52, p. 13736, 2018.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, p. 355-474, 2002.
- MO, Y. P. et al. Progress of animal research on electro-acupuncture treatment for depression (Δ). **Chin Med Sci J.**, v. 29, n. 1, p. 43-7, 2014.
- MOORE, R. A.; MCQUAY, H. J. Prevalência de eventos adversos com opioides na dor crônica não maligna: revisão sistemática de ensaios randomizados de opioides orais. **Artrite Res Ther.** v. 7, p. 1046-1051, 2005.
- MOULIN, D. et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain: revised consensus statement from the Canadian Pain Society. **Pain Res Manag.**, v. 19, n. 6, p. 328-35, 2014.
- NAVARRO, X.; VIVO, M.; VALERO-CABRE, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Prog Neurobiol**, v. 82, p. 163-201, 2007.
- NESTER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NIH Consensus Statement. n.15, p.1-34, 1997

NIMNUAM, C.; HOTOPF, H.; WESSELY, S. Sintomas medicamente inexplicáveis: um estudo epidemiológico em sete especialidades. **J Psychosom Res.**, v. 51, n. 1, p. 361-7, 2001.

NOBLE, M. et al. Manejo de opióides a longo prazo para dor crônica não oncológica. Base de dados **Cochrane Syst Rev.** 2010.

OHAYON, M. M.; SCHATZBERG, A. F. **Using chronic pain to predict depressive morbidity in the general population.** **Arch Psychiatry**, v. 60, n. 1, p. 39-47, 2003.

ONDREJKOVICOVA, A. et al. Why acupuncture in pain treatment? **Neuro Endocrinol Lett.**, v. 37, n. 3, p. 163-168, 2016.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v. 120, p. 3779-3787, 2010.

PADILLA-COREANO, N. et al. Direct ventral hippocampal– prefrontal input is required for anxiety-related neural activity and behavior. **Neuron.**, v. 89, p. 857-866, 2016.

PARAGUANÁ, T. T. B. et al. As tarefas integrativas da saúde. **Rev Enferm UERJ**, v. 17, n. 1, p. 75-80, 2009.

PARKER, J. P., PM. **The patient`s sourcebook on peripheral neuropathy.** San Diego: ICON Group International, Inc., 2002.

PAVLOV, I.P. **Conditioned reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex** . Oxford Univ. Press, London, 1927.

PELTIER, A.; GOUTMAN, S. A.; CALLAGHAN, B. C. Neuropatia diabética dolorosa. **BMJ**, v. 348, p. 1799, 2014.

PEZET, S.; MCMAHON, S. B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. **Annu Rev Neurosci.**, v. 29, p. 507-38, 2006.

PILKINGTON, K. Acupuncture therapy for psychiatric illness. **Int Rev Neurobiol.**, v. 111, p. 197-216, 2013.

PORSOLT, R. D. et al. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature.**, v. 266, p. 730-732. 1977.

POSSO, I. P.; PALMEIRA, C. C. A.; VIEIRA, E. B. M. Epidemiologia da dor neuropática. **Rev. dor**, v. 17, n. 1, p. 11-14, 2016.

REI, J. B.; SCHAUERHAMER, M. B.; BELLOWS, B.K. Uma revisão da utilidade clínica da duloxetina no tratamento da dor neuropática periférica diabética. **Ther Clin Risk Manag.**,v. 11, p. 1163–1175, 2015.

RIDDER, S. et al. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. **J. Neurosci.** v. 29, n. 26, p. 6243-6250, 2005.

SADOSKY, A. *et al.* Carga da doença associada à neuropatia periférica diabética dolorosa entre adultos que procuram tratamento nos EUA: resultados de uma revisão retrospectiva de prontuários e de um estudo transversal. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 6, p. 79 – 92, 2013.

SAITO, T.; KAI, I.; TAKIZAWA, A. Effects of a program to prevent social isolation on loneliness, depression, and subjective well-being of older adults: a randomized trial among older migrants in Japan. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 55, p. 539-547, 2012.

SALES, A. J. *et al.* Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. **Br J Pharmacol.**, v. 164, n. 6, p. 1711-1721, 2011.

SALIMZADE, A.; HOSSEINI-SHARIFABAD, A.; RABBANI, M. Comparative effects of chronic administrations of gabapentin, pregabalin and baclofen on rat memory using object recognition test. **Res Pharm Sci.**, v. 12, n. 3, p. 204-210, 2017.

SAREEN, J. et al. The relationship between anxiety disorders and physical disorders in the U.S. National Comorbidity Survey. **Depress Anxiety**, v. 21, p. 193–202, 2005.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.**, v. 7, n. 4, p. 524-33, 1955.

SCHLEICHER, E.; WIELAND, O. Evaluation of the Bradford method for protein determination in body fluids. **J Clin Chem Clin Biochem.**, v. 16, n. 9, p. 533-4, 1978.

SCHMIDT, D. R.; DANTAS, R. A. MARZIALE, M. H. Ansiedade e depressão entre profissionais de enfermagem que atuam em unidades cirúrgicas. **Rev Esc Enferm USP**, v. 45, n. 2,p. 487-93, 2011.

- SCHNYER, R. N. Commentary on the Cochrane Review of acupuncture for depression. *Explore*, v. 7, p. 193-197, 2011.
- SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIER, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. ***Pain***, v.43, p. 205-218, 1990.
- SHE, Y. et al. Possible antidepressant effects and mechanism of electroacupuncture in behaviors and hippocampal synaptic plasticity in a depression rat model. *Brain Res.* 2015 Dec 10;1629:291-7. doi: 10.1016/j.brainres.2015.10.033. Epub 2015 Oct 23.
- SHEN, L. L. et al. Electroacupuncture inhibits chronification of the acute pain of knee osteoarthritis: study protocol for a randomized controlled trial. ***Trials***, v. 16, p. 131, 2015.
- SHI, R.X. et al. Effect of Acupuncture Stimulation of Different Acupoint Groups on Levels of Stress Hormones and Serum Brain-derived Neurotrophic Factor in Depression Rats. ***Zhen Ci Yan Jiu.***, v. 40, n. 6, p. 444-8, 2015.
- SILVA, A. L. P. O tratamento da ansiedade por intermédio da acupuntura: um estudo de caso. *Psicol Ciênc Prof*, n. 30, v. 1, p. 199-211, 2010.
- SIMONS, L. E. Fear of pain in children and adolescents with neuropathic pain and CRPS. ***Pain***, v. 157, n. 1, p. 90-97, 2016.
- SMITH, C. A. et al. Acupuncture for depression. ***Rev Bras Enferm.***, v. 69, n. 3, p. 602-9, 2018.
- SNIEZEK, D. P. SIDDIQUI, I. J. Acupuntura para tratamento de ansiedade e depressão em mulheres: uma revisão clínica sistemática. ***Med Acupuntura***, v. 25, n. 3, p. 164-72, 2013.
- SORKIN et al. Tumour necrosis factor alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. ***Neuroscience***, v.81, p. 255-262, 1997.
- SORKIN, L. S.; YAKSH, T. L. Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. ***Neurotherapeutics***, v. 6, n. 4, p. 609-19, 2009.
- STAHL, S. M. et al. As diversas ações terapêuticas da pregabalina: é um mecanismo único responsável por diversas atividades farmacológicas? ***Trends Pharmacol Sci.***, v. 34 : 332-339, 2013.
- STAVROS, K.; SIMPSON, D. M. Understanding the etiology and management of HIV-associated peripheral neuropathy. ***Curr HIV/AIDS Rep.***, v. 11, :p. 195–201, 2014.

- STÉRU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, n.3, p.367-70, 1985.
- STUX, G; HAMMERSCHLAG, R. **Acupuntura clínica, bases científicas**. São Paulo: Manole; 2005.
- SUDOH, Y.; CAHOON, E. E.; GERNER, P.; WANG, G. K. Antidepressivos tricíclicos como anestésicos locais de ação prolongada. **Pain**, v. 103, p. 49–55, 2003.
- SUI, M. et al. Mechanism of electroacupuncture on "Zusanli (ST 36)" for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Zhongguo Zhen Jiu.**, v., 36, n. 5, p. 512-6, 2016.
- SUI, M. et al. Mechanism of electroacupuncture on "Zusanli (ST 36)" for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Zhongguo Zhen Jiu.** v. 6, n. 5, p. 512-6, 2016.
- TABO, E. et al. Behavioral manifestations of neuropathic pain and mechanical allodynia, and changes in spinal dorsal horn neurons, following L4-L6 dorsal root constriction in rats. **Pain**, v. 80, n. 3, p. 503-20, 1999.
- TABOSA, A. et al. effect of the acupoints ST-36 (Zusanli) and SP-6 (Sanyinjiao) on intestinal mioelectric activity of Wistar rats. **Brazilian Journal of Biology Research**, v.. 35, n. 6, p. 731-739, 2002.
- TAKAGI, K. et al. Effect of Manual Acupuncture Stimulation at "Bai-Hui" (GV 20) or "Yintang" (Ex-HN3) on Depressed Rats. **J Acupunct Meridian Stud.**, v. 10, n. 1, p. 26-32, 2017.
- TANAHASHI, N. et al. Effect of acupuncture stimulation on rats with depression induced by water-immersion stress. **Neurosci Lett.**, v. 8, n. 618, p. 99-103, 2016.
- THANKUR, S. et al. Acute and chronic pain associated with leprosy. **Pain**, v. 156, p. 998–1002, 2015.
- TORRANCE, N.; SMITH, B. H.; BENNETT, M. I.; LEE, A. J. A epidemiologia da dor crônica de origem predominantemente neuropática. Resultados de um levantamento populacional geral. **J Pain**, v. 7, p. 281–289, 2006.
- VALLAT, J. M.; MAGY, L. **Neuropathies Périphériques: généralités**. EMC. Neurologie, v. 2, p. 175-81, 2005.

VAN DE GRAAFF, K. **Van De Graaff Human Anatomy**. 6. ed. Toronto: McGraw-Hill Science, 2001.

VAN HECKE, O. et al. Dor neuropática na população em geral: uma revisão sistemática de estudos epidemiológicos. **Pain**, v. 155, p. 654-662, 2014.

VIEIRA, J. S. et al. Analgesic Effects Elicited by Neuroactive Mediators Injected into the ST 36 Acupuncture Point on Inflammatory and Neuropathic Pain in Mice. **J Acupunct Meridian Stud.**, v. 5, p. 280-289, 2018.

WAGNER, R.; MYERS, R. R. Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. **Neuroreport**, v. 7, p. 2897-2901, 1996.

WALL, P. D. et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. **Pain**, v. 7, n. 2, p. 103-11, 1979.

WANG, B. et al. Meta-analysis of plasma homocysteine content and cognitive function in elderly patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. **Int J Clin Exp Med.**, v. 7, p. 5118-5123, 2014.

WANG, J. Y. et al. Electroacupuncture Reduces the Effects of Acute Noxious Stimulation on the Electrical Activity of Pain-Related Neurons in the Hippocampus of Control and Neuropathic Pain Rats. **Neural Plast.**, p. 6521026, 2016.

WANG, L. et al. LILACS-Efeitos da eletroacupuntura na plasticidade sináptica na área CA3 do hipocampo de ratos com depressão crônica do estresse. **Zhongguo Zhen Jiu.**, v. 37, n. 2, p. 162-168, 2017.

WATKINS et al. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Res**, v. 654, p. 15-26, 1994.

WEN, T. S. **Acupuntura clássica chinesa**. Editora Cultrix. 1985.

WHITE, A.; CUMMINGS, M.; FILSHIE, J. **Introdução à Acupuntura Médica Ocidental**. São Paulo, Roca, 2013: 1 – 268.

WHO. **World Health Statistics**, 2013. Site: <http://aim.bmj.com/> on March 29, 2015 [acesso em 27 dez 2018]. Published by group.bmj.com. Disponível em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2013_Full.pdf

WIFFEN, P. J. **Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults. (Review)**. 2017, The Cochrane Collaboration, 129p.

WITT, C. M. et al. **Am J Epidemiol**, Vol. 164, p.487. 2006.

XIAO, W. et al. Effect of Manual Acupuncture Intervention on Levels of 5-HTT, 5-HT_{1A}R, NE α ₂R of Brain Tissues in Rats with Post-stroke Depression. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 41, n. 6, p. 528-34, 2016.

XU, G. F.; LI, M. Effect of electroacupunchire on HO-1, Bcl-2 and bax proteii expression rats with vascular dementia. **Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine**. v. 33, p. 1510–512, 2006.

XU, M. M. et al. Effect of Electroacupuncture Intervention on Behavior Changes and Levels of Hippocampal Transforming Growth Factor beta 3 and Basic Fibroblast Growth Factor Proteins in DepressionRats. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 41, n. 2, p. 138-43, 2016.

XU, Y et al. Effect of electroacupuncture on ethology and cytokines of hippocampus in rats with dysmnesy. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 32, p. 88–92, 2007.

YAN, L. P. et al. Effect of Electroacupuncture of "Weizhong" (BL 40) and "Huantiao" (GB 30) on cAMP-PKA-CREB Signaling of Spinal Cord in Rats with Neuropathic Pain. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 43, n. 12, p. 788-92, 2018.

YAN, Y. X. et al. Effect of Electroacupuncture Intervention on Expression of Pain Sensory and Affective Processing-related μ -opioid Receptor, etc. in the Amygdala in Chronic Neuropathy Pain Rats. **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 41, n. 1, p. 3-10, 2016.

YEARWOOD, T. L. et al. Programação de largura de pulso na estimulação da medula espinhal: um estudo clínico. **Médico da dor.**, v. 13, p.321-335, 2010.

YIN, C. S. et al. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Res Vet Sci**, v. 84, p. 159-165, 2008.

YOSHIZUMI, M. Gabapentin inhibits γ -amino butyric acid release in the locus coeruleus but not in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury in rats. **Anesthesiology**, v. 116, n. 6, p. 1347-53, 2012.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underly acupuncture analgesia. **Progress in Neurobiology**, v.85, p.355-375, 2008.

ZHOU, W.; BENHARASH, P. Effects and Mechanisms of Acupuncture Based on the Principle of Meridians. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 7, n. 4, p. 190-193. 2014.

ZILKA, M.J. Nedling adenosine receptors for pain relief. **Nat Neurosci**, v.13, p. 783-784, 2010.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

9. ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3911-0200. E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 038/2017

Título: Efeito da acupuntura na dor neuropática induzida pela ligadura parcial do nervo ciático em camundongos.

Data da aprovação: 21/08/2017

Período de vigência do projeto: 21/08/2019

Pesquisadores(a): Morgana Duarte da Silva

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (55) 99931-9242

E-mail: morganasilva@unipampa.edu.br

CEUA

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos Swiss
Nº de animais	96
Peso/Idade	30 - 40 g / 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria.

Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA