



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA

BEATRIZ VASCONCELOS IBITURUNA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ASSOCIAÇÃO DA ACUPUNTURA MANUAL
COM A ADMINISTRAÇÃO DE UM PEPTÍDEO BIOINSPIRADO DA PEÇONHA
DE VESPA SOCIAL

BRASÍLIA, 2018

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Ciências da Saúde

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ASSOCIAÇÃO DA ACUPUNTURA MANUAL
COM A ADMINISTRAÇÃO DE UM PEPTÍDEO BIOINSPIRADO DA PEÇONHA
DE VESPA SOCIAL

Dissertação de Mestrado
submetida ao curso de Pós-graduação em
Ciências da Saúde da Faculdade de
Saúde da Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do título de
mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Renata Mortari

Brasília, DF

2018

Com gratidão à Maria Paula e Daniel Chrystal

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Ciências da Saúde

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ASSOCIAÇÃO DA ACUPUNTURA MANUAL
COM A ADMINISTRAÇÃO DE UM PEPTÍDEO BIOINSPIRADO DA PEÇONHA
DE VESPA SOCIAL

Dissertação de Mestrado
submetida ao curso de Pós-graduação em
Ciências da Saúde da Faculdade de
Saúde da Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do título de
mestre em Ciências da Saúde.

Dissertação aprovada em

02 / 03 / 2018

Banca Examinadora

Antônio Pedro de Mello Cruz

Universidade de Brasília – UnB

Jacqueline Coimbra Gonçalves Moser

Centro Universitário de Brasília -
UniCEUB

Victoria Monge-Fuentes

Universidade de Brasília – UnB

Uma longa viagem começa com um único passo.

Lao-Tsé

Cada descoberta nova da ciência é uma nova porta pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela.

Albert Einstein

Agradecimentos

Ao Criador pela bondade; à Vida pela oportunidade;

Aos meus avós maternos Douglas (*in memoriam*) e Maria do Céu pelo sempre incentivo às ciências e ao Paulo Dionísio (*in memoriam*) pela herança da sede do saber, aos meus avós paternos Vilma e Walter por poder cuidar deles como cuidaram de mim;

À Maria Paula Vasconcelos Taunay, minha mãe e primeira professora, leitora desta obra, exemplo de mulher, orientadora e conselheira do bem, pelo despertar do conhecimento;

Ao Walterson Ibituruna, meu pai e primeiro professor, pelos primeiros e grandes passos e pelo ensino do ritmo da vida;

Ao Raul de Taunay, padrasto e amigo de todas as horas, pelo conselho de sempre estudar e seguir o meu coração;

Ao Daniel Taunay, Paulo Ibituruna, Thaís Ibituruna e Raul Taunay, meus irmãos, com quem aprendo a compartilhar o amor, pelas conversas, apoio e amizade;

Ao Daniel Chrystal Richter, meu companheiro, melhor amigo, professor e leitor deste estudo, pelo ensino da paciência, da perseverança e da construção do amor em união; que o aprendizado seja sempre o lume de nossa próspera morada;

À prof^a Dr^a Márcia Mortari, orientadora dedicada e entusiasta das neurociências, pelo exemplo de mulher cientista e por acreditar na Medicina Tradicional Chinesa e suas associações;

À Lao-Tsé e Oliver Sacks, mestres atemporais, por suas contribuições inspiradoras;

À Ana Maria Alves, Rafael Almeida e Luciano Salomão, amigos que acompanharam de perto esta jornada, pelo apoio, ouvidos e conselhos;

Ao Dr. Aristein Woo, exemplo de médico e terapeuta, pela sua contribuição com os assuntos desta pesquisa que tangem a Acupuntura e as suas ligações com a Medicina Ocidental;

Ao Prof. Dr. Antônio Pedro, professor solícito e apoiador desta pesquisa, por contribuir com o planejamento dos Ensaios Comportamentais e por aceitar o convite de participar da banca examinadora;

À Jacqueline, colega de faculdade, e Victoria, colega de laboratório, que tão gentilmente aceitaram o convite de compor a banca de defesa, pelo carinho e participação;

À Andréia, Harry, Gabriel, Kamila, Priscilla, Leandro, Mateus, Lílian, Luana, Maria, Mariana, Letícia e Julia, colegas da Neurofarmaco com os quais muito aprendi, pela atenção e apoio;

Ao Danilo, Adolfo e Elias, técnicos brilhantes, pelo auxílio nas soluções, cálculos e observações;

À Ísis, estudante de Iniciação Científica e amiga, braço direito em todos os ensaios, pelas horas de contensão de camundongos, agulhas, pesagens e risadas;

À Juliana e Giovanna, estagiárias animadas e sempre bem-dispostas a auxiliar;

À Letícia, Flávio, Beli, Carol, Matheus, Sabrina e Henrique, pela participação e auxílio nos ensaios;

Ao Cleber Xavier, com seu olhar clínico e profissional, pelas fotos;

Aos meus alunos, pela atenção;

Aos camundongos, por existirem;

Aos futuros pesquisadores da Acupuntura no Ocidente;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

Ao PPGCS e à UnB e, pela oportunidade de realizar um sonho.

Resumo

De acordo com a *International Association for the Study of Pain*, 1994 (IASP), a dor é uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano real ou potencial, ou descrita em termos desse dano potencial”. Apesar dos analgésicos comercializados atualmente mostrarem grande potencial no tratamento das algias, nota-se que alguns destes levam à manifestação de efeitos colaterais. Assim, pesquisas de novas terapias que combatem as síndromes dolorosas objetivam minimizar os efeitos colaterais e/ou aumentar a eficácia do tratamento. O presente trabalho buscou analisar o desempenho do peptídeo Neuroval bioinspirado da peçonha da vespa social neotropical *Parachartergus fraternus*, concomitantemente ao uso da acupuntura manual. Trabalhos anteriores sugerem uma potente resposta antinociceptiva como consequência da injeção via i.c.v. do peptídeo em questão nos testes comportamentais de modelos nociceptivos. Foi usado o Neuroval desta vez associado à acupuntura manual com o objetivo de avaliar esta resposta antinociceptiva em um modelo de nocicepção, os animais (*Mus musculus* - Swiss) foram subdivididos nos seguintes grupos: veículo + acupuntura, veículo + ponto *sham*, diferentes doses do peptídeo + acupuntura e grupo *naive*. Para a realização de tal análise, os animais foram submetidos a dois distintos protocolos: o primeiro de duas semanas de duração e o segundo de uma semana e 5 dias de duração de tratamento. Concluído este período, foram desafiados nos testes comportamentais Retirada de Cauda, Placa Quente e Formalina. Esta pesquisa demonstra grande potencial antinociceptivo da associação das técnicas no modelo de nocicepção por indução química, não apresentando efeitos nos dois testes de nocicepção por indução térmica. Nota-se, ademais, que a acupuntura, por si só considerada, apresenta aumento do índice antinociceptivo neste mesmo modelo de indução química. A associação das referidas técnicas indica forte potencial antinociceptivo em roedores que são desafiados em testes por estimulação das vias ascendentes da dor através da indução química. A presente pesquisa concluiu, enfim, que há uma necessidade de aproximação científica e integrada entre ambas ciências (oriental e ocidental), uma vez que se encontram resultados positivos em relação ao uso da acupuntura na modulação da nocicepção. Considera-se a operacionalização das presentes técnicas para estudos posteriores.

Abstract

According to the International Association for the Study of Pain, 1994 (IASP), pain is an "unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential harm, or described in terms of that potential damage." Despite its great potential on treatment of algias, it is well known that the use of contemporary analgesics may lead to manifestations of side effects. Therefore, researches on new therapies that treat pain syndromes focus on minimizing side effects and / or increase treatment efficacy. The present work searched to analyze the Neuroval peptide's performance, bioinspired of the neotropical social wasp venom *Parachartergus fraternus*, concomitantly with the use of manual acupuncture. Based on previous studies developed at UnB Neuropharmacology Laboratory, a great antinociceptive response was observed as a consequence of i.c.v. administration of the mentioned peptide during the behavioral tests on nociceptive models. In order to evaluate the antinociceptive response of the peptide's association to acupuncture in a pain model, animals (*Mus musculus* - Swiss) were subdivided into the following groups: vehicle + acupuncture, vehicle + *sham* point, different doses of the peptide + acupuncture and naive group. For this analysis, the animals were previously submitted to two treatments protocols: two weeks or one week + 5 days treatment. After this period, they were challenged in the behavioral tests: Tail Flick, Hot Plate and Formalin. This research demonstrates a great antinociceptive potential of the referred techniques' association in the nociception model by chemical induction, showing no effects on the two thermal induction tests on nociception model. It is also noted that acupuncture, by itself, shows an increased antinociceptive index in this same chemical induced nociception model. The association of these techniques indicates a strong antinociceptive potential on rodents that are challenged in tests by stimulation of ascending pain's pathways through chemical induction. The present study concluded that there is a need of scientific and integrated approach between both sciences (oriental and western), since positive results were found in the present study that regard the use of acupuncture on nociception modulating. The operationalization of these techniques is considered for later studies.

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema explicativo da primeira cascata de sinalização de nocicepção	23
Figura 2 – Condução do estímulo nociceptivo	24
Figura 3 – Meridiano da Vesícula Biliar na Medicina Tradicional Chinesa	29
Figura 4 – <i>Vespa Parachartegus fraternus</i>	36
Figura 5 – Localização anatômica do acupontos VB 34	43
Figura 6 – Agulha de acupuntura utilizada	44
Figura 7 – Esquema do protocolo de tratamento do ensaio de nocicepção por indução térmica	44
Figura 8 – Analgesímetro digital Insight® utilizado na pesquisa	47
Figura 9 – Placa quente utilizada no estudo	48
Figura 10 – Esquema do protocolo de tratamento no ensaio de nocicepção por indução química	49
Figura 11 – Cronologia do ensaio de Formalina	50
Figura 12 – Administração da Formalina	51
Figura 13 – Visão do observador no ensaio de Formalina	52
Figura 14 – Ficha preenchida pelos observadores no ensaio de Formalina	53
Figura 15 – Gráfico contendo índice de nocicepção x grupos no ensaio de Retirada de Cauda	55
Figura 16 - Gráfico contendo índice de nocicepção x grupos no ensaio de Placa Quente	56

Figura 17 – Tempo de efeito das terapias x grupos no ensaio de Formalina na fase aguda 57

Figura 18 - Tempo de efeito das terapias x grupos no ensaio de Formalina na fase inflamatória 58

*Todas as imagens de capa de sessões do presente trabalho foram retiradas da capa de livros publicados pelo escritor e neurologista Oliver Sacks. Na respectiva ordem de aparição são:

- *Migrane*, 1970.

- *Awakenings*, 1973.

- *The Island of the Colorblind*, 1997.

- *Uncle Tungsten*, 2001.

- *An Anthropologist on Mars*, 1995.

- *Seeing Voices*, 1989.

- *Oliver Sacks Book Compilation*, 2016.

Lista de quadros

Quadro 1 – Grupo de animais desafiados no ensaio de nocicepção por estímulo térmico	45
Quadro 2 - Grupo de animais desafiados no ensaio de nocicepção por estímulo químico	49

Lista de abreviaturas e siglas

AI – Índice de Antinocicepção

AM – Acupuntura Manual

AUC – Área Sob a Curva

BVA – *Bee Venom Acupuncture*

DMSO – Dimetilsulfóxido

E36 – Acuponto do meridiano do Estômago de nº36

EA – Eletroacupuntura

fMRI – *Functional Magnetic Resonance Imaging*

GABA – Ácido Gama-aminobutírico

i.c.v. – Intra Cérebro Ventricular

IASP – *International Association for the Study of Pain*

IB – Instituto de Ciências Biológicas

LA – Latência de Antinocicepção

LC – *Locus Coeruleus*

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

MO – Medicina Ocidental

MTC – Medicina Tradicional Chinesa

NMDA – N-metil-D-asparatato

NMR – Núcleo Magno da Rafe

OMS – Organização Mundial da Saúde

P. fraternus – Parachartergus fraternus

PAG – *Periaqueductal grey*

Pet-scan – *Positron Emission Tomography*

RVM – *Rostral ventromedial medulla*

SNC – Sistema Nervoso Central

UnB – Universidade de Brasília

VB34 – Acuponto do meridiano da Vesícula Biliar de nº 34

VG20 – Acuponto do meridiano do Vaso Governador de nº 20

Sumário

Introdução	19
1. Dor e Nocicepção: Conceito	20
2. Mecanismos neurais da nocicepção	22
3. Terapias para dor	25
A) Alopátia	25
B) A Medicina Tradicional Chinesa e a acupuntura	27
4. Os peptídeos de vespa	32
A) O uso de toxinas de artrópodes na analgesia	32
B) A vespa <i>Parachartergus fraternus</i>	35
C) O peptídeo Neuroval	36
5. Justificativa	37
Objetivos	39
1. Geral	40
2. Específicos	40
Material e Métodos	41
1. Animais	42
2. Tratamento	42
A) Padronização da técnica de acupuntura manual	42
3. Ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução térmica	44
A) Execução dos ensaios de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução térmica	44
- Retirada de Cauda	44
- Placa Quente	45
B) Grupos Focais	46
C) Cronologia do ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução térmica	47

4. Ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução química (Formalina)	48
A) Execução do ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução química (Formalina)	48
B) Grupos Focais	49
C) Cronologia do Ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução química (Formalina)	50
5. Análise Estatística dos Bioensaios por indução térmica	53
Resultados	54
1. Ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução térmica	
A) Retirada de Cauda	55
B) Placa Quente	55
2. Ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução química (Formalina)	56
A) Fase Aguda	56
B) Fase Inflamatória	57
Discussão	59
Conclusão	68
Referências	70

Introdução



Introdução

1. Dor e Nocicepção: Conceito

A percepção da dor sempre foi objeto de estudo e de interesse no curso da história da humanidade. Nos primeiros relatos, a dor e as percepções dolorosas eram vistas como invasões de fluídos mágicos ou espíritos demoníacos possuidores e que seu tratamento se resumia em extrair aquele membro enfeitiçado ou realizar algum tipo de ritual com o objetivo de purificar aquela alma prejudicada pela dor (BONICA, 1990).

Na China Antiga (2600 a.C.), os conceitos da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) atribuíam à dor uma consequência natural ou um efeito das síndromes de excesso ou deficiência de certos fluídos no interior do organismo. A perda ou o desequilíbrio entre o *yin* e o *yang* também eram levados em consideração como critérios de diagnóstico da dor. Hoje, tais conceitos continuam sendo utilizados na prática da MTC ocidental (HECKER, 2010).

Hipócrates, já no século IV a.C., relatou a existência de quatro humores vitais: o sangue, a flegma, a bile amarela e a bile negra (BONICA, 1990). Considerado o pai da medicina, ele descreveu, a partir da teoria dos humores, que o desequilíbrio destes levava à percepção da dor. Estima-se que, por volta dos anos 300 a.C., os gregos Demócrito e Aristóteles se referiam à percepção de dor como a sensação de objetos que emitem espécies de átomos com ganchos pontiagudos que adentram o corpo através dos vasos e, assim, afetariam os pequenos átomos da alma, gerando dor.

De outro modo, Aristóteles, apesar de compartilhar da mesma ideia a respeito do tema, ainda acrescentava que “o coração sendo o trono dos sentidos, as áreas do corpo ricas em sangue seriam mais sensíveis às impressões emanadas de objetos”. No século II a.C. o médico Galeno sugeria que os sentidos eram controlados por nervos macios, suscetíveis à impactos por objetos. E que o cérebro, centro de comando dos sentidos, da imaginação e do raciocínio, por sua vez, seria ainda mais macio a ponto de ser extremamente suscetível à irritações intensas. A diferença do pensamento do médico romano é que a dor física estaria relacionada à estimulação intensa dos órgãos dos sentidos. Possivelmente a expressão “nervos de aço” tenha surgido a partir do conceito de dor de Galeno (LENT, 2010).

A partir do século XVI, durante a Renascença italiana, o cientista e artista Leonardo da Vinci trouxe ao conhecimento da humanidade alguns conceitos melhor atualizados a respeito da fisiologia humana. Um deles foi sobre a localização da dor. Da Vinci dizia que o centro da dor estava localizado no terceiro ventrículo do cérebro e que os nervos poderiam ser considerados estruturas tubulares que transmitiam as sensações ao cérebro e, também, que a dor estava intrinsecamente relacionada ao tato (BONICA, 1990).

Ao final do século XIX Friedrich Kiesow descobriu pontos sensíveis ao toque, mas não à dor. Com o auxílio de alfinetes, Kiesow descobriu pontos no interior da cavidade bucal que não eram sensíveis à dor, mas sim ao tato. Tais pontos predominantemente localizados na mucosa interna das bochechas, na parte posterior da língua e na metade inferior da úvula demonstraram que a ausência de nociceptores e a presença de mecanoreceptores de fibras A β são suficientes para demonstrar fisiologicamente que a dor se diferencia fisiologicamente do tato (LENT, 2010). O histologista alemão englobou a dor às terminações nervosas livres. Estudiosos posteriores, como Max Von Frey (1900), começaram, então, a associar a dor a receptores específicos presentes na pele.

Atualmente reconhece-se a dor como um fenômeno multidimensional, que envolve aspectos físico-sensoriais e aspectos emocionais, mesmo quando existe a incapacidade de se comunicar verbalmente tal experiência. Segundo a International Association for the Study of Pain (IASP, 1994) a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a danos reais ou potenciais em tecidos, ou assim percebida como dano”.

Hoje, a dor pode ser classificada de acordo com a sua natureza, ou seja, como esta foi originada, ou com o seu tempo de permanência. De acordo com a sua natureza, existem três principais tipos de dor: a nociceptiva, gerada diretamente pelos nociceptores, a neuropática, provocada por uma lesão ou uma doença no sistema nervoso e a dor psicológica que tem origem emocional, podendo ser muito incapacitante e de difícil tratamento e diagnóstico (IASP, 1994).

A depender do tempo de persistência, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A primeira é considerada a partir do momento em que as lesões teciduais têm função de alarme e como seu mecanismo de funcionamento e diagnóstico são de mais fácil compreensão, o seu tratamento costuma ser mais

eficaz (TEIXEIRA e PIMENTA, 1994). A dor crônica, por sua vez, é aquela que persiste além do tempo pré-determinado para a remissão daquela lesão. Quando crônica a dor deixa de ter a função vital de aviso e dá origem a novas alterações fisiológicas, como distúrbios no sono, apetite e aspectos comportamentais. Portanto seu diagnóstico e tratamento são mais complexos quando comparados à dor aguda. Vale ressaltar que a dor crônica é um dos mais onerosos problemas de saúde pública do mundo (BONICA, 1990; MENEZES, 2010; WOO et al., 2017).

Sabe-se também que o fenômeno da dor pode ser percebido de formas diferentes. Etnia, sexo e crença são exemplos de fatores que podem influenciar a percepção dolorosa (PALMEIRA et al., 2011).

É de suma importância para a compreensão do presente estudo diferenciar os conceitos de dor e nocicepção. A dor é um complexo de sensações físicas e psicológicas e tem sido atribuída a uma percepção humana (IASP, 1994). Devido ao componente emocional que abrange a dor, acordou-se utilizar o termo nocicepção para a captação do estímulo pelos nociceptores e para o seu processamento em centros encefálicos, em especial na experimentação animal (JONES, 1992). Sendo assim, a partir deste ponto, quando o presente estudo estiver se referindo à percepção da dor pelos animais de experimentação usar-se-á o termo nocicepção.

2. Mecanismos neurais da nocicepção

Acompanhadas da busca pelo conceito que melhor defina a dor, as teorias que buscam explicar os mecanismos neurais da percepção da nocicepção vêm sendo descritas e estudadas ao longo dos últimos séculos. Pode-se dizer que existem três teorias principais para a fisiopatologia da nocicepção. Estas são a teoria da especificidade, da intensidade e da afetividade (PORTNOI, 1999).

A primeira postulava a existência de carreadores de mensagens de dor presentes na pele. Consequentemente, a nocicepção era sujeita ao funcionamento de uma maquinaria sensorial própria. Acreditava-se, assim, que existia uma relação entre a percepção nociva sentida e a intensidade do estímulo provocado (HORN e MUNAFÒ, 1997). A segunda teoria, da intensidade, propunha que os estímulos seriam capazes de provocar nocicepção, uma vez que

atingissem um limiar de intensidade suficiente para produzir uma ação pelos neurotransmissores. Esta teoria sugeria uma ligação com a intensidade do estímulo, mas não com a especialização ou especificidade deste (BONICA, 1990). De outro lado, a teoria da afetividade compreendia um distanciamento do aspecto fisiológico. Deste modo, ela sugeria que a nocicepção não tinha apenas um aspecto sensorial, mas também um caráter afetivo capaz de influenciar outros eventos sensoriais comandados pelo sistema nervoso (MELZACK e WALL, 1991).

A partir de um estímulo nocivo, ou potencialmente nocivo, ocorre uma cascata de eventos que levam à percepção da intensidade e localização da nocicepção. Com base nos detalhes da Figura 1, pode-se observar os principais eventos para essa percepção, que geralmente se inicia a partir de um estímulo. Após a ativação de um potencial de ação, o estímulo navega pela medula espinhal através de três possíveis tipos de fibra: as A β , mielinizadas e de grande diâmetro, responsáveis por conduzir o estímulo de tato de forma rápida; as fibras A δ , também mielinizadas, porém de diâmetro reduzido, conduzindo o estímulo doloroso em velocidade intermediária e, por fim, as fibras C, não mielinizadas e também de diâmetro reduzido, responsáveis por conduzir em velocidade lenta o estímulo nociceptivo (MELZACK e WALL, 1965; FEIN, 2011).

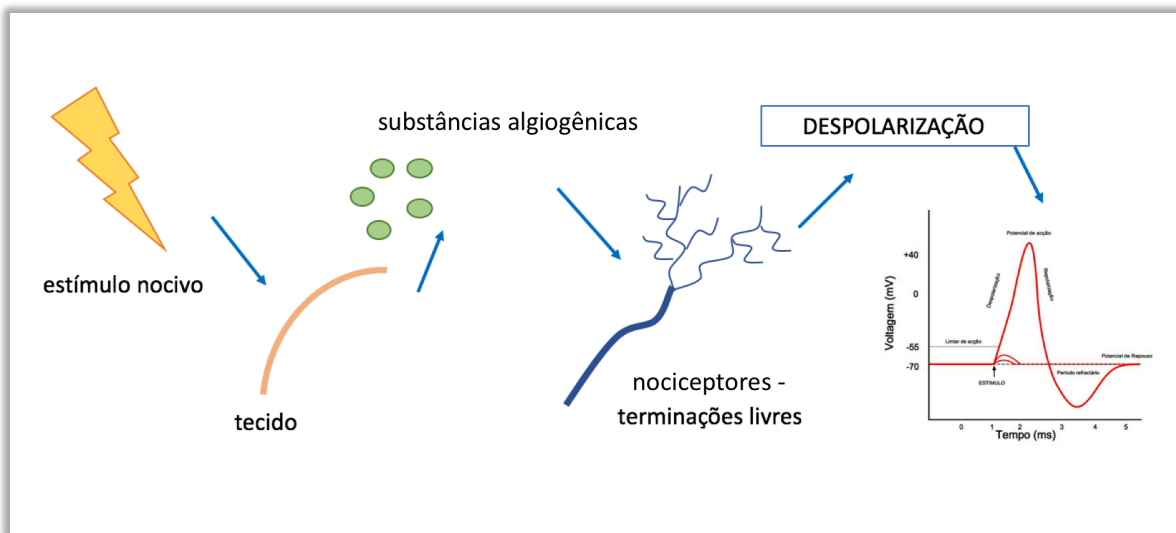


Figura 1: Esquema explicativo da primeira cascata de sinalização da nocicepção: um estímulo nocivo estimula a região afetada a produzir substâncias algio gênicas (como prostaglandinas, acetilcolina, substância P, etc.) que, por sua vez, ativam os nociceptores presentes nas terminações livres de fibras nervosas. Assim, a membrana desta fibra despolariza desencadeando um potencial de ação que transporta a sensação nociceptiva até a medula espinhal (MOURÃO e ABRAMOV, 2011).

Para que haja a transmissão deste estímulo até a medula espinhal, as fibras nervosas conduzem os estímulos nociceptivos atravessando a raiz posterior do corno dorsal da própria medula, chegando assim aos feixes ascendentes. Após a condução do estímulo até o corno dorsal da medula espinhal ocorre a liberação de glutamato e substância P, disparando, assim, a sinapse com o neurônio de segunda ordem (BENNET, 2000). Na sequência, parte destes impulsos passa pela substância gelatinosa da medula, local onde pode vir a ser modulado. Por consequência ocorre a passagem do estímulo das fibras sensoriais para os neurônios ascendentes da medula espinhal (Figura 2). Após a sinapse com o neurônio de segunda ordem, este neurônio decursa a medula e tem a opção de seguir pelo feixe neoespinotalâmico ou paleoespinotalâmico, ambos com destino ao tálamo, estrutura cerebral responsável por conduzir o impulso ao córtex sensorial e límbico, local onde são examinadas e processadas as informações nociceptivas (MARQUEZ, 2004; PENG *et al.*, 2017).

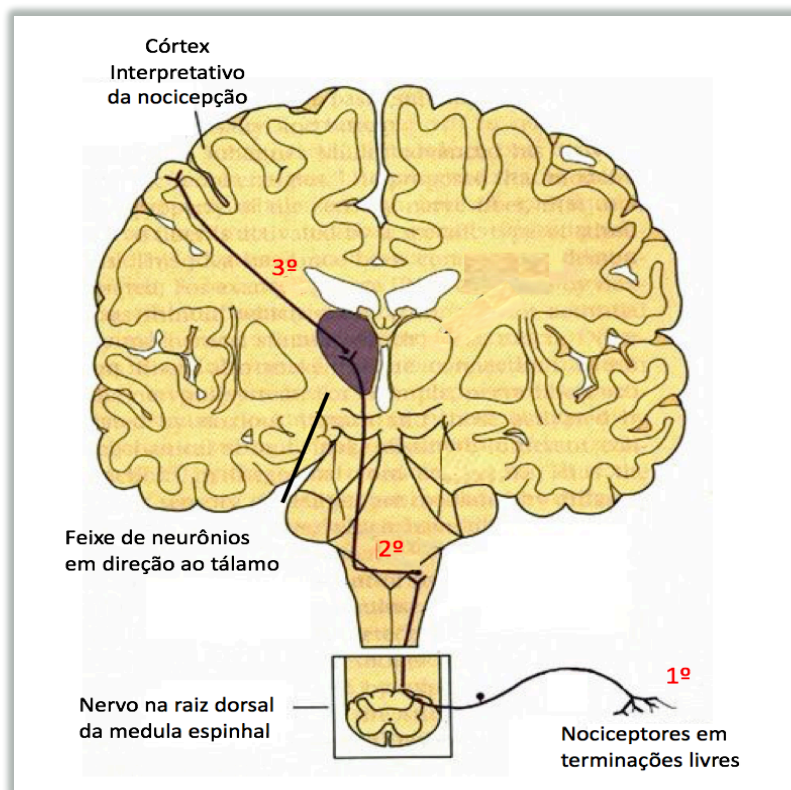


Figura 2: Ilustração representando o caminho da condução do estímulo nociceptivo. Primeiramente, o nociceptor detecta o estímulo nocivo. Um nervo espinhal ou cranial em seu gânglio dorsal realiza a primeira sinapse com o neurônio de 2ª ordem. Neurônios de 2ª e 3ª ordens também realizam suas sinapses já na via central. E, por fim, o estímulo é percebido pela área somestésica cortical responsável pela interpretação da nociceção (Adaptado de Lent, 2010)

A modulação da dor é possível de ser realizada pelas vias descendentes ou ascendentes. Esta última pode ser explicada com base na Teoria da Comporta (MELZACK e WALL, 1956; MOURÃO e ABRAMOV, 2011). Pois, se a forte ativação de fibras de tato estimularia o interneurônio inibitório presente na medula espinhal bloqueando a transmissão da nocicepção, em seguida o neurônio de segunda ordem também seria inativado e assim por diante (LENT, 2010). A modulação da dor através da via descendente se origina no tronco cerebral e em estruturas como o hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe (NMR), substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), estruturas que desempenham papel importante na integração da transmissão de potenciais (VANEGAS e SCHAIBLE, 2004). As vias serotoninérgicas, noradrenérgicas, dopaminérgicas, opioidérgicas e canabinoideérgicas compreendem as maiores estruturas envolvidas no mecanismo de modulação da dor pela via descendente (MILLAN, 2002; WOO *et al.*, 2017).

Vale ressaltar que a modulação da via descendente tem a possibilidade de facilitar ou de inibir a transmissão nociceptiva. Existem células nas adjacências do Sistema Nervoso Central, conhecidas como células “liga” (*on*) e células “desliga” (*off*), que facilitam ou inibem a condução do impulso nervoso nociceptivo, respectivamente essa propriedade é descrita quando a PAG é estimulada. Em condições de nocicepção persistente, ou seja, no caso de ser alterada a neuroplasticidade do sistema, pode ocorrer a susceptibilidade à superestimulação do impulso nervoso, gerando respostas persistentes de dor (PORRECA *et al.*, 2002).

3. Terapias para o controle da dor

A) Alopátia

Os fármacos mais utilizados no tratamento e combate à nocicepção são agonistas opióides, anti-inflamatórios não estereoidais (AINEs) e antidepressivos (estes últimos geralmente utilizados nas terapias contra a dor crônica) (FLORES *et al.*, 2012). Os analgésicos demonstram grande potencial no tratamento de algumas algias. Contudo, o uso de alguns deles, como os opióides, podem desencadear uma série de efeitos colaterais não esperados. Com isto, nota-se

que este fator limitante dos analgésicos vem estimulando cada vez mais estudos voltados às novas perspectivas no tratamento de síndromes dolorosas (LEAL *et al.*, 2010).

Data-se que, desde 3400 a.C., o uso do ópio, substância derivada a Papoula (*Papaver somniferum*), vem sendo utilizada amplamente pela humanidade. Com conotação recreativa e terapêutica, sumérios a descreviam como “a planta da alegria” por gerar euforia naqueles que a consumiam. Foi somente em 460 a.C. que o ópio começou a ser utilizado como fármaco analgésico pelas mãos do célebre Hipócrates, pai da medicina. Textos de Galeno também relatam o seu potencial analgésico (MARTINS *et al.*, 2012).

A morfina, substância altamente utilizadas em centros de saúde, é derivada do ópio. A substância, que recebe este nome em homenagem ao deus grego Morfeu (deus dos sonhos e das formas personificadas), é um composto orgânico alcaloide (DUARTE, 2005). A partir da descoberta da morfina, uma série de derivados sintéticos foram estudados e produzidos a fim de aprimorar o seu efeito analgésico. Vale citar a Meperidina, primeiro fármaco opióide inteiramente sintético que tem como alvo a depressão do SNC. Hoje a Meperidina é amplamente utilizada para o alívio de dor de intensidade média ou alta, geralmente em pacientes em casos terminais (DUARTE, 2005).

Hoje, após séculos de casos de utilização de morfina, sabe-se que esta pode gerar tolerância, dependência e promover efeitos colaterais indesejados como depressão respiratória, náuseas, vômito e constipação intestinal (DUARTE, 2005). A Ziconotida (nome comercial Prialt®), bloqueador de canais de cálcio voltagem dependentes ainda não comercializado no Brasil, tem sido descrita e prescrita como alternativa à morfina para o tratamento de dores agudas e crônicas por não causar tolerância e dependência (FEDOSOV *et al.*, 2011).

B) A Medicina Tradicional Chinesa e a acupuntura

Mesmo sendo uma técnica milenar, foi somente partir dos anos 1970 que a acupuntura se tornou uma prática de fato aceita e usual pela Medicina Ocidental (MO). Para a população dos Estados Unidos, por exemplo, a visita do presidente Nixon à China, em 1972, possibilitou maiores intercâmbios culturais entre os países tornando, somente assim, mais conhecida a acupuntura no ocidente (NIH, 1998; GOLDMAN *et al.*, 2010).

Dados têm demonstrado que a maioria das pessoas que se trataram com acupuntura nos Estados Unidos buscam esse tipo de terapia para condições crônicas e não para tratamento de doenças graves que coloquem suas vidas em risco. Assim, vem crescendo o número de pessoas que se voltam para medicina “complementar” ou “alternativa”, pois se encontram, de alguma maneira, insatisfeitas com a abordagem da Medicina Ocidental (MO) baseada em medicamentos ou porque a única opção de tratamento indicada muitas vezes é a cirurgia. Na Europa o conhecimento desta modalidade de tratamento apresenta taxas mais elevadas, um percentual entre 12 a 19% da população já se submeteu a algum tipo de tratamento envolvendo a acupuntura (FILSHIE e WHITE, 2002).

No Brasil, o grande potencial clínico terapêutico da técnica motivou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a realizar uma lista de enfermidades que podem ser tratadas por acupuntura levando a técnica a ser reconhecida, na atualidade, como uma especialidade médica (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001).

Ao contrário do que se observa entre o senso comum, o termo “acupuntura” não é devidamente empregado e tem sido colocado erroneamente como sinônimo de um conjunto de técnicas e estudos que tem por nome verdadeiro MTC (FILSHIE e WHITE, 2002). Quando analisada semanticamente, a palavra “acupuntura”, de origem ocidental e não oriental, ao contrário do que se pensa, retoma a ideia de “punção por agulha” (FILSHIE e WHITE, 2002).

Basicamente a acupuntura é uma terapia única porque usa agulhas muito finas para provocar “traumatismos” intrusivos mínimos, ou lesões, nos tecidos, estimulando muitos mecanismos de sobrevivência do corpo. A inserção da agulha de acupuntura e as lesões assim induzidas ativam os mecanismos de auto cura, os quais incluem restauração da homeostase, facilitação dos mecanismos de reparo (como reação anti-inflamatória e regeneração tecidual) e modulação da nocicepção. Depois de se retirarem as agulhas as lesões induzidas continuam a estimular o corpo até a total recuperação. A cicatrização dessas lesões normalmente dura dois dias, embora alguns pacientes sintam a estimulação da lesão por até uma semana (FILSHIE e WHITE, 2002).

Para uma melhor compreensão a respeito da técnica de acupuntura é importante elucidar o conceito de meridianos e de acupontos, base empírica da anatomia e da fisiologia da MTC.

Através da observação do funcionamento do organismo, os chineses, há milhares de anos vivendo grande escassez de alimento e abrigo, perceberam que comumente quem padecia de uma mesma patologia ou sensação desagradável descrevia o mesmo trajeto percorrido por este sinal. Hoje, a MTC denomina esta sensação de *De Qi*. O *De Qi* percebido tendia a percorrer pequenos trajetos e, uma vez que acabavam, formavam pequenos pontos de concentração desta sensação. Desta maneira, os pontos de acupuntura, ou acupontos, foram descritos juntamente com a linha que os une. Recebendo, assim, o nome de meridianos de energia. (GONGWANG, 2005).

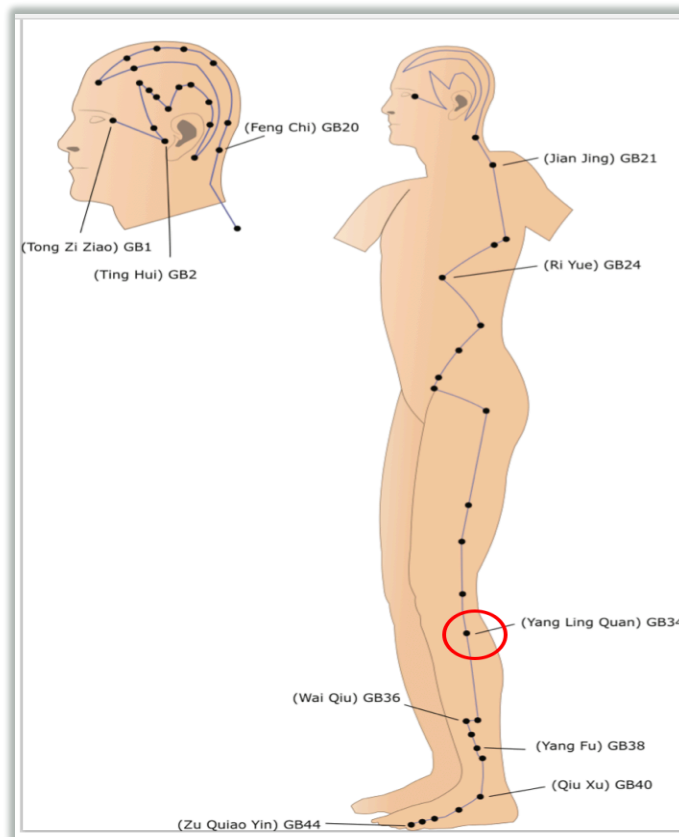


Figura 3: Meridiano da Vesícula Biliar e em detalhe o ponto GB 34 (em português VB 34) acupontos equivalente ao selecionado para esta pesquisa.

Existem mais de 361 acupontos descritos na literatura e a eficácia do tratamento depende diretamente da acurácia na localização anatômica destes. O exame anatômico desses acupontos demonstra que a maioria está associada de alguma maneira a estruturas do Sistema Nervoso Periférico (SNP), como nervos e grandes vasos sanguíneos (FILSHIE e WHITE, 2002; SPADACIO E BARROS, 2008). Na presente pesquisa foi utilizado o ponto VB 34, localizado no

meridiano da Vesícula Biliar (Figura 3). A escolha deste ponto deu-se pelo fato de que é um ponto tradicionalmente utilizado pela MTC no tratamento de patologias ligadas a problemas motores, por desempenhar um efeito protetor nos neurônios dopaminérgicos e por ser amplamente utilizado no tratamento de cialgias, câimbras e dor (TIAN *et al.*, 2016).

A medicina neuromuscular chama alguns desses pontos de pontos-gatilho, pontos-motor ou dermopontos. Estudos têm relatado que mais de 70% dos acupontos clássicos de meridianos correspondem aos pontos-gatilho mais usados. Independentemente dos termos empregados, todos esses pontos se caracterizam pela capacidade de se tornar doloridos ou sensíveis ou de criar outros desconfortos físicos como resultado de nervos sensibilizados. É extremamente importante compreender que, embora mais de 70% dos acupontos clássicos compartilhem as mesmas características dos pontos-gatilho, acupontos e pontos-gatilho não são a mesma coisa (MA *et al.*, 2006).

Para que um local seja caracterizado e confirmado como acuponto, este deve seguir dez critérios básicos: o tamanho do tronco nervoso, a profundidade do nervo, se há penetração da fáscia profunda, a passagem de forames ósseos, se está localizado em inserções neuromusculares, se existem vasos sanguíneos concomitantes, como é a composição da fibra nervosa, se há pontos de bifurcação, se as estruturas ligamentosas são sensíveis e se estão localizados em linhas de suturas no crânio (FILSHIE e WHITE, 2002).

Existem dois tipos de acupontos que não estão situados em meridianos de acupuntura. Estes podem ser pontos *Ashi* ou acupontos extra. Os pontos *Ashi* surgem de forma imprevisível em relação aos sintomas individuais. Os acupontos extras não estão em nenhum dos meridianos mas têm localizações fixas no corpo (MA *et al.*, 2006; ZHAO, 2008).

Ainda a respeito dos acupontos e da eficácia do tratamento vale ressaltar a importância da habilidade com que a inserção da agulha deve ser realizada pelo terapeuta. Esta habilidade é treinada durante os cursos de especialização, entretanto, observa-se que a prática frequente revela os grandes nomes da acupuntura. Para que a agulha seja inserida corretamente faz-se necessário que penetre a pele de modo a evitar as fibras nociceptivas $A\delta$ e chegue com mais facilidade ao tecido subcutâneo e ao músculo. Ao ser inserida, a agulha fina

penetra o músculo, que sob circunstâncias normais não está encurtado, e, portanto, produz o mínimo de dor ou lesão (MA *et al.*, 2006; VECTORE, 2005).

Bonghan Kim, médico cirurgião norte coreano, desenvolveu estudos com o objetivo de elucidar os mecanismos fisiológicos da acupuntura por meio de uma perspectiva mais ocidental, no início na década de 1960. Com o propósito de comprovar a existência dos meridianos de energia, ou canais de energia, Bonghan conduziu uma série de estudos entre 1960 e 1965 que inicialmente consistiam em injetar isótopos radioativos em tecidos de coelhos. Em seguida os tecidos foram registrados através de microautoradiografia e, posteriormente, analisados. Os resultados demonstraram que a substância radioativa percorreu o trajeto de um grupo de microtúbulos (de aproximadamente 30 microns) que, posteriormente foram agrupados e denominados de Sistema de Bonghan. Apesar desta grandiosa descoberta, Dr. Kim e sua equipe falharam em descrever, de maneira condizente com método científico ocidental, a metodologia pela qual os meridianos, ou microtúbulos, foram examinados, fazendo desta uma teoria não reproduzível aberta à margem de dúvidas (SOH, 2009).

A hipótese melhor desenvolvida a respeito da acupuntura e o seu mecanismo está voltada para a sua ação de analgesia e bloqueio de receptores nociceptivos (responsáveis por sinalizar qualquer injúria aos tecidos via fibras A δ ou C). Sugere-se, também, que os opioides endógenos podem ser responsáveis pelo mecanismo de controle da dor, sendo assim sua ação um acesso ao SNC (FILSHIE e WHITE, 2002). Experimentos realizados em 1991 (PROMERANZ, 1990 *apud* FILSHIE e WHITE, 2002) demonstraram que os efeitos opioides estimulados pela acupuntura podem ser revertidos pela Naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opióides), sugerindo, assim, que a acupuntura libera opioides endógenos ao longo de seu mecanismo de funcionamento. Sabe-se, porém, que dores que não envolvem estímulos nociceptivos, como a neurogênica, parecem não ser suscetíveis ao tratamento por acupuntura (FILSHIE e WHITE, 2002; PARK, 2005).

Tobaldini e colaboradores (2014) sugeriram um novo mecanismo para a explicação da analgesia provocada pela acupuntura. O experimento utilizou ratos Wistar que foram submetidos a uma única sessão de acupuntura prévia ao teste comportamental da formalina. Os resultados sugerem que a técnica de AM (sendo

o ponto E36 o elegido para o estudo) promove a inativação do trato espinotalâmico através da modulação da via ascendente da dor.

Estudos anteriores sugerem que a AM, por se tratar de uma técnica que ativa receptores opioides do sistema endógeno, também teria essa capacidade modulatória (SHAO *et al.*, 2015)

Apesar de se observar uma favorável e próspera união entre a MO e a medicina oriental, parece existir um distanciamento dos médicos ocidentais com relação à MTC. Acredita-se que a origem disto esteja ligada às diferenças culturais de ambas as medicinas. Por exemplo, o termo yin-yang, expressão relacionada ao diagnóstico feito pela análise do pulso, dos cinco elementos e da circulação de *qi* (energia vital), sob a ótica da MO tem sofrido uma distorção de seu real conceito e assumido um significado mais holístico do que realmente se trata (FILSHIE e WHITE, 2002). O conceito de *Qi* traduz-se ao português como energia vital, entretanto, esta definição pode também ser utilizada como fluxo de energia ou, melhor dizendo, calor. Considera-se que o *qi* flua pelos meridianos e que seus excessos e deficiências possam gerar dor, mal estar ou alguma hiper ou hipoatividade de alguma víscera.

Estudos a respeito da acupuntura como tratamento para a dor também tiveram início por volta do ano de 1970, quando se observou uma integração entre as sociedades orientais e ocidentais. Um estudo realizado em 1972 que consistia na transmissão do líquido cefalorraquidiano (LCR), pelo Grupo de Pesquisa e Anestesia por Acupuntura, demonstrou a possibilidade de transmissão de tratamento de acupuntura de um animal para outro. Através da transferência do LCR de um coelho previamente tratado por acupuntura para outro que não havia sido submetido a tratamento algum pode-se observar que o efeito da antinocicepção por acupuntura acompanhou a transferência descrita. Ou seja, ambos os animais foram beneficiados com as substâncias liberadas pelo tratamento com acupuntura (MENEZES, 2010). Esta foi a primeira evidência científica que sugeria o mecanismo neuroquímico como mediador da antinocicepção por acupuntura. Tal estudo estimulou outros grupos de pesquisa a desenvolverem novas práticas afim de investigar melhor a função dos neurotransmissores na mediação da antinocicepção por acupuntura.

Atualmente os mecanismos da acupuntura já se encontram muito mais esclarecidos se comparados ao milenar histórico da técnica chinesa. Ainda assim, a busca por novas hipóteses de mecanismos fisiológicos da acupuntura que de fato elucidem a sua real ação e resposta ainda se mostra importante e necessária.

4. Os peptídeos de vespa

A) O uso de toxinas de artrópodes na analgesia

Uma vez que a dor constitui um evento complexo e um grave problema de saúde pública, em especial as dores crônicas, a finalidade da presente pesquisa foi a avaliação da união de duas terapias, farmacológica e da medicina tradicional oriental. Nesse sentido, pretendeu-se abordar o uso de um novo peptídeo bioinspirado da peçonha da vespa social e suas novas fronteiras na pesquisa e no tratamento de diversas patologias, concomitantemente com o uso da acupuntura. Apesar de existir um vasto universo de compostos neuroativos de peçonhas animais que atuam como ativadores ou moduladores em neurotransmissores e canais iônicos, existem poucas toxinas relatadas como sendo tratamentos para a dor. A evolução das relações entre as presas e os predadores tornou tais compostos altamente potentes e seletivos para alvos específicos do sistema nervoso. Dentro de um panorama mais contemporâneo, vários fármacos foram desenvolvidos a partir de peçonha de animais. Como exemplo podem-se citar o Captopril®, fármaco bioinspirado a partir de um composto da peçonha da jararaca brasileira (*Bothrops jararaca*) que combate a hipertensão; e o exenatide, vendido com o nome de Byetta®, que é usado no tratamento da diabetes do tipo 2, obtido da saliva de uma espécie de lagarto venenoso (LIBES, 2009).

Em destaque para o presente trabalho, um grupo de toxinas presentes em moluscos marinhos gastrópodes (*Conus sp*) tem desempenhado um papel importante no controle da nocicepção. Estas, conotoxinas, compõem um grupo de pequenos oligopeptídeos que atuam, em sua maioria, no bloqueio de canais iônicos, influenciando a propagação do impulso nervoso. Seis novos fármacos estão passando pelos testes em fase clínica e mais de 20 estão nos testes não-clínicos, sendo a maioria neuroativos, analgésicos e antiepiléticos (FEDOSOV *et*

al., 2011). O Prialt®, fármaco que tem por princípio ativo o peptídeo Ziconotide isolado do molusco *Conus magnus*, é um peptídeo que atua bloqueando os canais de cálcio voltagem-dependentes e desencadeando uma interrupção na transmissão das informações nociceptivas (FEDOSOV *et al.*, 2011).

Os canais iônicos são alvos abundantes desses compostos isolados de peçonha. Sabe-se que as disfunções dos canais iônicos levam a diversas canalopatias e o uso dos compostos neuroativos de peçonha podem auxiliar na descoberta de um novo tratamento ou no estudo da etiologia das doenças neurológicas. Além disso, o fato destes compostos atuarem em receptores para os neurotransmissores, como glutamato e acetilcolina, leva a crer que, com esta terapia é possível reestabelecer a homeostase do SNC, já que são substâncias abundantes em todo o encéfalo (KOOL, 2016).

Vale ressaltar que a despeito da grande importância bioquímica e farmacológica que o estudo das peçonhas de vespas possui, até o presente momento, são escassos os estudos realizados no sentido de se purificar e verificar os efeitos dos compostos neuroativos presentes na peçonha de vespas sociais (MORTARI e CUNHA, 2013; SILVA *et al.*, 2015). Considera-se que o tema possui um grande espectro de conteúdo a ser pesquisado, especialmente no Brasil, dada a sua abundante fauna além das imensas possibilidades de pesquisa relacionada a sua biodiversidade natural.

A classe Insecta é a mais diversificada e presente de todo o planeta. Para fins deste trabalho, focaremos na ordem Hymenoptera que possuem dois pares de asas membranosas. Exemplos desta ordem são as abelhas, vespas e formigas. As fêmeas da maioria destas espécies possuem o ovipositor que constitui o conjunto ferrão/ glândula de peçonha (figura 4) (MEBS, 2001).

As peçonhas destes insetos representam uma valiosa fonte de compostos, sendo que os peptídeos são as substâncias em maior concentração na peçonha destes insetos. Além destas substâncias, ainda existem as poliaminas e aminas biogênicas como a serotonina, catecolaminas e histamina. Tem sido descrito, que esses últimos compostos são responsáveis pela indução de dor, inflamação local, inchaço e rubor consequentes da picada e, por isso, são consideradas defesas do animal. A classe de peptídeos neurotóxicos, que auxiliam na paralisia de presas

são de grande interesse farmacológico devido à sua alta especificidade em alvos do Sistema Nervoso.

Há mais de 5.000 anos as técnicas da MTC vem utilizando a peçonha de abelhas para fins terapêuticos no combate a inflamações e síndromes dolorosas. Ainda que muito estudados, os mecanismos antinociceptivos da peçonha de abelha ainda não foram completamente elucidados (DOO et al., 2010; ERRINGTON-EVANS, 2011). No entanto, sabe-se que a peçonha de abelha associada ao tratamento por AM é capaz de diminuir a produção de substâncias envolvidas no processo de nocicepção. Além disso, de acordo com os princípios da MTC, a acupuntura por si tem forte potencial analgésico (FANG, 2009; HECKER *et al.*, 2010).

Dentro do âmbito das neuropatologias degenerativas existem também relatos clínicos e experimentais do uso da peçonha de abelha no controle da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson. No entanto, os efeitos neuroprotetores de tal peçonha ainda não foram totalmente elucidados. Um estudo conduzido por Doo e colaboradores (2010) sugeriu que a peçonha bruta de abelha associada à acupuntura (BVA) tem efeitos neuroprotetores substanciais quando usada como tratamento a um modelo de doença de Parkinson induzida em camundongos (KIM, 2014; CHAE, 2009).

Paralelamente ao referido trabalho, o presente estudo aspirou acrescentar a modalidade da AM e seus métodos mais recentes no controle da transmissão nociceptiva. Ambas modalidades de inquérito procurou-se compor as bases da presente pesquisa cuja intenção foi avaliar a atividade do peptídeo antinociceptivo bioinspirado na peçonha da vespa social, Neuroval, associado ao tratamento por acupuntura em modelos de nocicepção aguda e inflamatória.

B) A vespa *Parachartergus fraternus*

As vespas da espécie *Parachartergus fraternus* (Figura 4) são endêmicas do bioma cerrado e fazem parte da subfamília Polistinae que se encontra dentro da família Vespidae (MATEUS, 2005).

Apesar de hoje atualmente ainda existir pouco conhecimento dos compostos presentes na peçonha da *P. fraternus*, encontrou-se uma grande variedade de compostos de baixa massa molecular, principalmente peptídeos, descobertos através de procedimentos cromatográficos realizados por Gonçalves

(2013). Em 2012, Mortari e colaboradores avaliaram de forma inédita os efeitos tóxicos da peçonha bruta.

Devido um comportamento exclusivo desta espécie, frente às outras vespas sociais, sugere-se que os compostos bioativos presentes nesta peçonha tenham capacidade de inibir o SNC de suas presas com o objetivo de promover sua paralisia irreversível. Em geral, esta característica é descrita somente no comportamento de vespas solitárias (GALANTE, 2013). Portanto, a capacidade de acessar o SNC de maneira irreversível leva pesquisadores a investigarem os compostos envolvidos na peçonha da *P. fraternus* com potencial neuroprotetor e neuroativo.



Figura 4: Exemplar de *Parachartergus fraternus*. Detalhe em vermelho evidenciado a estrutura do ovipositor. Foto com lupa no aumento 6x (Adaptado de Gonçalves, 2013).

C) O peptídeo Neuroval

O peptídeo Neuroval trata-se de um composto sintético bioinspirado de um mastoparano da vespa *P. fraternus*. O mastoparano Agelaia-MP (protótipo do Neuroval) foi descrito por Gonçalves, em 2013, como substância capaz de ativar receptores ligados à proteína G. Sugeriu-se um que, ao ser injetado diretamente no SNC o mastoparano descrito é capaz de ativar os receptores metabotrópicos ligados ao sistema opióide endógeno, levando a percepção de um presente efeito antinociceptivo. Neste estudo, conduzido no Laboratório de Neurofarmacologia da UnB, observaram-se diferentes respostas frente aos ensaios nociceptivos por indução térmica. No caso do teste de Placa Quente

observou-se que a atividade antinociceptiva foi mais evidente. Enquanto que no ensaio de Retirada de Cauda a resposta foi mais discreta, provavelmente devido ao fato de que esta resposta tem como moduladores receptores na medula espinhal e não no SNC. Outra possibilidade de mecanismo de ação deste mastoparano sugerida pelo grupo, frente à atividade positiva percebida no ensaio de Placa Quente, é a de que este peptídeo estaria atuando no bloqueio da via ascendente da dor, impedindo a transmissão do impulso ao tálamo e causando inibição pré-sináptica (Para revisão ver MIZOGUCHI et al., 2012; GONÇALVES, 2013).

O peptídeo Neuroval foi sintetizado pelas empresas AminoTech P&D® e FastBio® após a definição da sequência desejada. Sua sequência não pode ser revelada por ainda se encontrar em processo de requerimento de patente.

5. Justificativa

Entende-se que a sociedade vive hoje um tempo de fragmentação de saberes. Dividido em disciplinas que padronizam conhecimentos gerais, o mundo se apresenta disseminando estudos fraturados, na contemporaneidade. Nesse sentido, vive-se uma ciência moderna herdada e transmitida por um processo histórico de acumulação que se apresenta, igualmente, em nichos isolados de conhecimento, que comportam certas tendências, notadamente, "negativas", que se tornam inconvenientes na medida em que: "O desenvolvimento disciplinar das ciências não traz unicamente as vantagens da divisão do trabalho (isto é, a contribuição das partes especializadas para a coerência de um todo organizador), mas também os inconvenientes da superespecialização: enclausuramento ou fragmentação do saber" (MORIN, 2005).

O afastamento das disciplinas e, conseqüentemente, das diferentes formas de abordagem das ciências, tem levado a sociedade a defrontar-se com os limites do conhecimento, isto é, um problema do ilimitado do problema do conhecimento (IDEM, IBIDEM, p.77). Os pesquisadores ensinam e aprendem que, por meio da aventura humana do conhecimento, é possível conduzir os indivíduos a interrogarem-se mais a cada descoberta de um novo conhecimento.

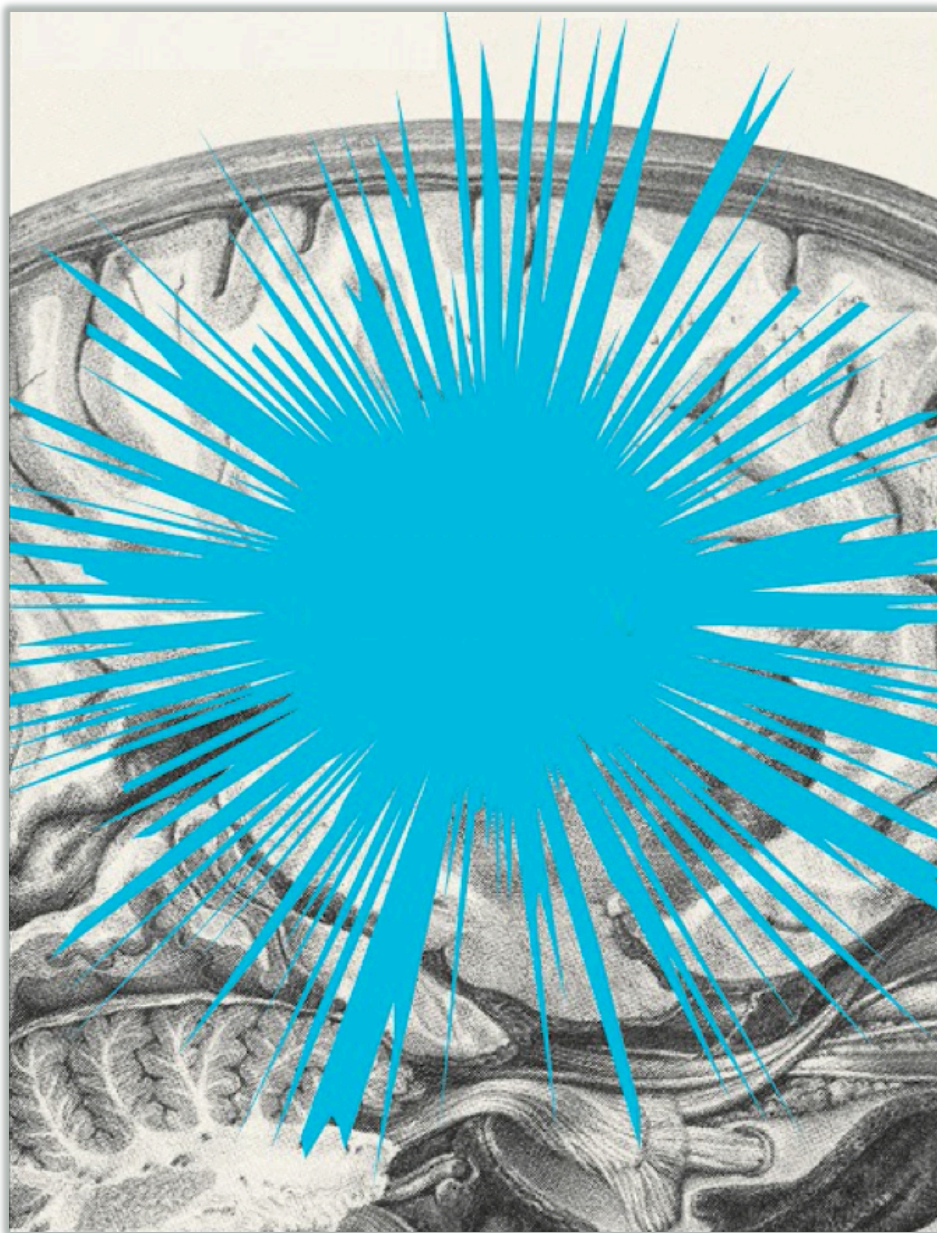
A aventura do conhecimento, no campo ocidental, é concebida como uma forma de compreensão do desenvolvimento tecnológico. Assim, a ciência ocidental é o resultado da melhor hipótese produzida pela tecnologia. De outro modo, no caso da ciência oriental, cujos conhecimentos milenares advêm desde a descoberta da pólvora e da bússola atestam uma atividade científica puramente observacional que sobrevive até os dias de hoje.

Tal separação fez com que o pensamento ocidental se tornasse o motor fundamental para o conhecimento científico que se desenvolveu e tornou-se universal. Entretanto, neste estudo propõe-se uma aproximação entre essas duas formas de ciência, enquanto diferentes concepções, por acreditar-se que essa universalidade científica pode ativar processos cognitivos simples como a dedução, a indução, a análise e uma conclusão benéfica ao objeto da pesquisa.

Na experimentação ocidental é de fundamental importância o uso de modelos experimentais para a descoberta de novos fármacos, principalmente os analgésicos, uma vez que só podem ser comercializados após uma série de estudo clínicos e não-clínicos (SILVA *et al.*, 2013).

No intuito de potencializar o tratamento das algias e de se aproveitar o conhecimento herdado das ciências milenares do oriente e as modernas intervenções do ocidente, percebe-se a necessidade de se associar técnicas de ambas as ciências em prol de um tratamento que propicie, de fato, a melhora significativa da percepção da dor. Assim, acredita-se que existem possibilidades de associação entre a pesquisa em ciência ocidental e oriental com fins de tratamento da dor - um problema que atinge todas as civilizações, num grau maior ou menor.

Objetivos



Objetivos

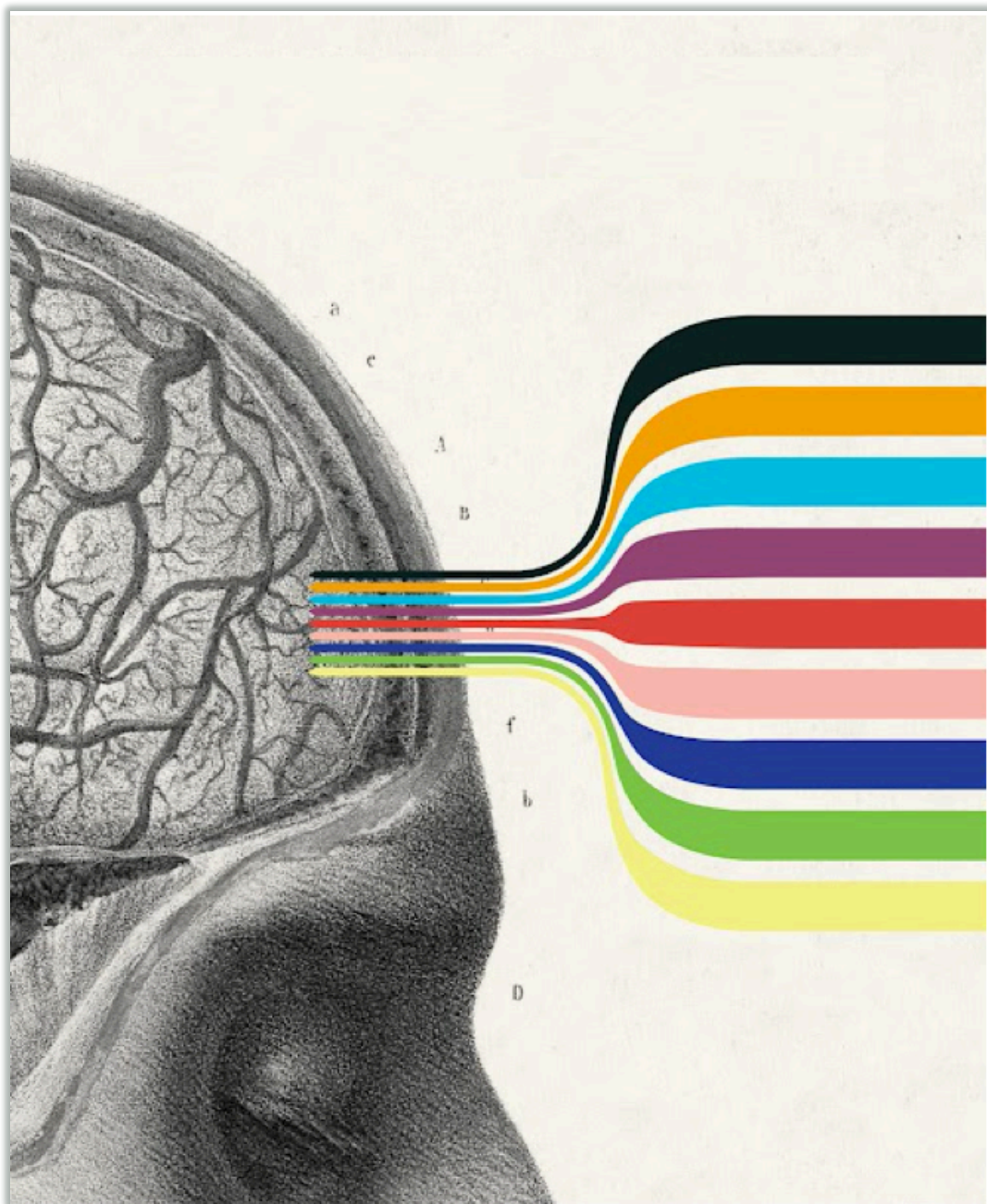
1. Objetivo geral

Avaliar respostas da administração do peptídeo NeuroVal bioinspirado de um peptídeo mastoparano isolado da vespa social *Parachartergus fraternus* associada à acupuntura em modelos de estímulos nociceptivos.

2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antinociceptivo do tratamento com AM em um modelo animal (camundongos) de indução nociceptiva por estímulo térmico (Retirada de Cauda e Placa Quente).
- Avaliar o efeito antinociceptivo do tratamento com AM em um modelo animal (camundongos) de indução nociceptiva por estímulo químico (Formalina).
- Avaliar o efeito antinociceptivo da associação da AM com o peptídeo analgésico Neuroval em um modelo animal (camundongos) de indução nociceptiva por estímulo térmico (Retirada de Cauda e Placa Quente).
- Avaliar o efeito antinociceptivo da associação da AM com o peptídeo analgésico Neuroval em um modelo animal (camundongos) de indução nociceptiva por estímulo químico (Formalina).

Material e Métodos



Material e Métodos

1. Animais

Para tal estudo foram obtidos camundongos *Swiss* machos (com peso de 20 a 25g), no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (IB), da Universidade de Brasília (UnB). Os animais foram alojados conforme os seguintes parâmetros: dois camundongos por gaiola, foram mantidos em biotério de manutenção com ciclos de claro/escuro de 12 horas cada, à temperatura de 25° C e umidade a 55% constantemente controladas e com oferta de água e alimentação *ad libitum*.

Todos os procedimentos com animais foram executados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008) e realizados somente mediante aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UnB, projeto de número 81/2017 aprovado, em anexo). Além disso, foi obtida a Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético (Processo nº 010476/2013-0) com a finalidade de pesquisa científica.

2. Tratamento

A) Padronização da técnica de acupuntura manual

Com o objetivo de conter os animais para que se pudesse executar a aplicação da técnica de AM sem que houvesse a necessidade de analgesia, foram inicialmente projetados e desenhados contêntores que fossem condizentes com a estrutura anatômica dos animais de experimentação (camundongos). Com esta finalidade, foram realizados sete protótipos até o desenvolvimento do aparato dentro das medidas ideais. Uma vez elaborados, os contêntores foram diariamente utilizados nas sessões de acupuntura. E para a realização da acupuntura manual, os animais foram gentilmente acomodados nos contêntores inéditos para que se pudessem inserir as agulhas com precisão no ponto escolhido para o estudo.

De acordo com os conceitos da MTC, no meridiano da Vesícula Biliar está localizado o ponto de interesse para executar a AM com finalidade antinociceptiva. Este ponto recebe o nome *yanglingquan* ou, de forma abreviada

em português, VB34 (ponto do meridiano da vesícula biliar de nº34). Este encontra-se na depressão anteroinferior da cabeça da fíbula.

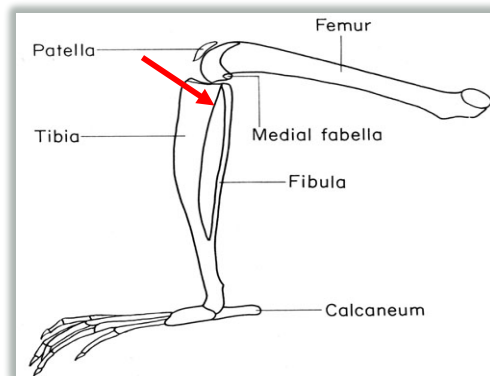


Figura 5: Acuponto VB 34 (*yanglingquan*) localizado na depressão anteroinferior da cabeça da fíbula (Adaptado de Hecker *et al.*, 2010).

Para realização do tratamento foram feitas aplicações bilaterais de agulhas de acupuntura Dongbang® de aço inoxidável (de dimensões 0.18 mm x 8 mm) nos acupontos. As agulhas foram inseridas com uma inclinação de 45° a uma profundidade de 3 mm, sempre em direção a parte caudal do animal e, em seguida, estimuladas por 15 segundos com o intuito de tonificar aquele ponto. A estimulação das agulhas na técnica de AM se dá através da rotação descontínua da agulha no sentido horário. Após 25 minutos de terapia, as agulhas foram retiradas manualmente e os animais retirados dos contêntores e realocados em suas gaiolas.



Figura 6: Agulhas de acupuntura de aço inoxidável da marca Dongbang® (dimensões 0.18 mm x 8 mm).

3. Ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução térmica

A) Execução dos ensaios de avaliação nocicepção em modelos de indução térmica (retirada de cauda e placa quente)

- Retirada de Cauda

O teste de Retirada de Cauda consiste em posicionar a cauda do animal sobre um filamento de nicromo aquecido através da passagem de corrente elétrica. O objetivo do ensaio é avaliar a quantidade de tempo que o animal leva para elevar a sua cauda. A taxa de elevação é de 9°C por segundo e a calibragem do aparelho foi de 2,5 a 3,5 segundos. Vale ressaltar que o desligamento se dá automaticamente após 6 segundos a fim de evitar danos aos tecidos do camundongo em experimentação (BANNON e MALMBERG, 2007).

Foram realizadas medições em triplicata. Ao final do teste foi excluído o menor valor e calculada a média dos dois maiores resultados.



Figura 7: Analgesímetro digital Insight® utilizado no ensaio de Retirada de Cauda. O animal é colocado sobre a placa metálica e tem sua cauda gentilmente alocada sobre um filamento de cobre a ser aquecido.

- Placa Quente

Neste teste, a avaliação do efeito antinociceptivo é pela quantificação do intervalo de comportamentos de escape do aparelho, ou seja, o pulo do animal, e também as lambidas das patas traseiras após o início do desafio. Para este fim, o animal é colocado em uma base de acrílico sobre uma placa de alumínio aquecida a $55,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$. A fim de evitar prejuízos teciduais, o animal é retirado do aparelho após um período de 30 segundos, caso este não apresente resposta ao estímulo em questão (BANNON e MALMBERG, 2007).

Foram realizadas medições em triplicata. Ao final do teste foi excluído o menor valor e calculada a média dos dois maiores resultados.

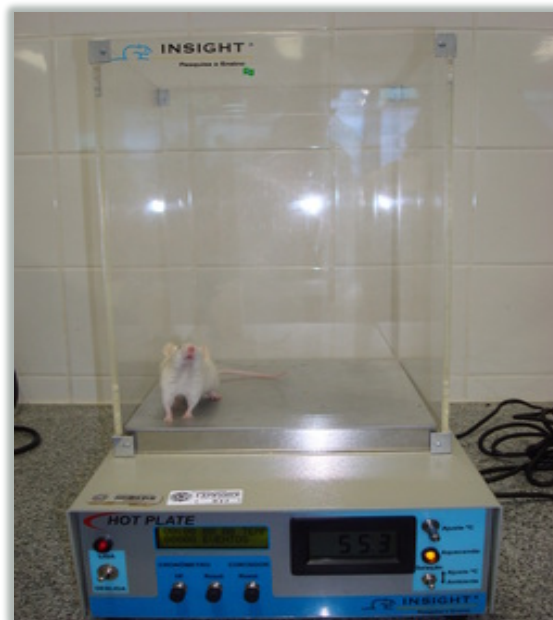


Figura 8: Animal desafiado no ensaio de Placa Quente. Neste, observam-se o pulo do animal e as lambidas das patas traseiras como sinais de nocicepção.

B) Grupos Focais

Os animais desafiados nos ensaios de nocicepção induzida por estimulação térmica foram divididos nos seguintes grupos:

Quadro 1: Grupos de animais que foram submetidos aos ensaios de nocicepção induzida por estímulo térmico.

Nome	Descrição
Controle <i>naive</i>	O grupo <i>naive</i> é constituído por animais que não passaram por nenhuma forma de manipulação ou tratamento, nem mesmo a utilização do contensor. No dia dos testes, esse grupo foi avaliado seguindo o mesmo protocolo de avaliação nociceptiva dos outros grupos. (n=8)
Controle veículo + acupuntura <i>sham</i>	Foi previamente preparado o veículo a ser administrado no não-acuponto <i>sham</i> . Este era composto por solução salina associada a DMSO a 20%. Para tanto, com o auxílio de uma seringa de insulina foram administrados 40 µL do veículo no não-acuponto localizado na junção da base da cauda com o corpo do animal por via intradérmica. Em seguida, foi inserida a agulha de acupuntura no mesmo local. Estimulada por 15 segundos, foi deixada no animal imóvel ao longo dos 25 minutos de terapia. (n=8)
Controle veículo + acupuntura	Foi previamente preparado o veículo a ser administrado nos acupontos. Este era composto por solução salina associada a DMSO a 20%. Para tanto, com o auxílio de uma seringa de insulina foram administrados 20 µL do veículo no acuponto de forma bilateral via intradérmica. Em seguida foram inseridas as agulhas de acupuntura nos mesmos acupontos também bilateralmente. Estimuladas por 15 segundos, foram deixadas no animal imóvel ao longo dos 25 minutos de terapia. (n=8)
Teste peptídeo dose 1 + acupuntura	Foi previamente preparada a solução com o peptídeo Neuroval a ser administrada nos acupontos. Para a sua melhor solubilização, este foi diluído em uma solução que continha 20% de DMSO em solução salina. Foi preparada uma solução de 0,08 mM/animal. Para tanto, com o auxílio de uma seringa de insulina foram administrados 20 µL desta solução no acuponto de forma bilateral. Em seguida foram inseridas as agulhas de acupuntura

	nos mesmos acupontos também bilateralmente. Estimuladas por 15 segundos, foram deixadas no animal imóvel ao longo dos 25 minutos de terapia. (n=8)
Teste peptídeo dose 2 + acupuntura	Foi previamente preparada a solução com o peptídeo Neuroval ser administrada nos acupontos. Para a sua melhor solubilização, este foi diluído em uma solução que continha 20% de DMSO em solução salina. Foi preparada uma solução de 0,45 mM/animal. Para tanto, com o auxílio de uma seringa de insulina foram administrados 20 µL desta solução no acuponto de forma bilateral. Em seguida foram inseridas as agulhas de acupuntura nos mesmos acupontos também bilateralmente. Estimuladas por 15 segundos, foram deixadas no animal imóvel ao longo dos 25 minutos de terapia. (n=8)
Teste peptídeo dose 3 + acupuntura	Foi previamente preparada a solução com o peptídeo Neuroval ser administrada nos acupontos. Para a sua melhor solubilização, este foi diluído em uma solução que continha 20% de DMSO em solução salina. Foi preparada uma solução de 0,82 mM/animal. Para tanto, com o auxílio de uma seringa de insulina foram administrados 20 µL desta solução no acuponto de forma bilateral. Em seguida foram inseridas as agulhas de acupuntura nos mesmos acupontos também bilateralmente. Estimuladas por 15 segundos, foram deixadas no animal imóvel ao longo dos 25 minutos de terapia. (n=8)

C) Cronologia do ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução térmica

Uma vez realizado o tratamento proposto para o dia, a terapia foi repetida a cada três dias. Ao final de duas semanas de terapia, o animal foi desafiado nos ensaios de avaliação nociceptiva por indução térmica.

Os animais de experimentação foram submetidos à uma resposta basal anterior ao tratamento a fim de que cada um fosse o seu próprio controle.

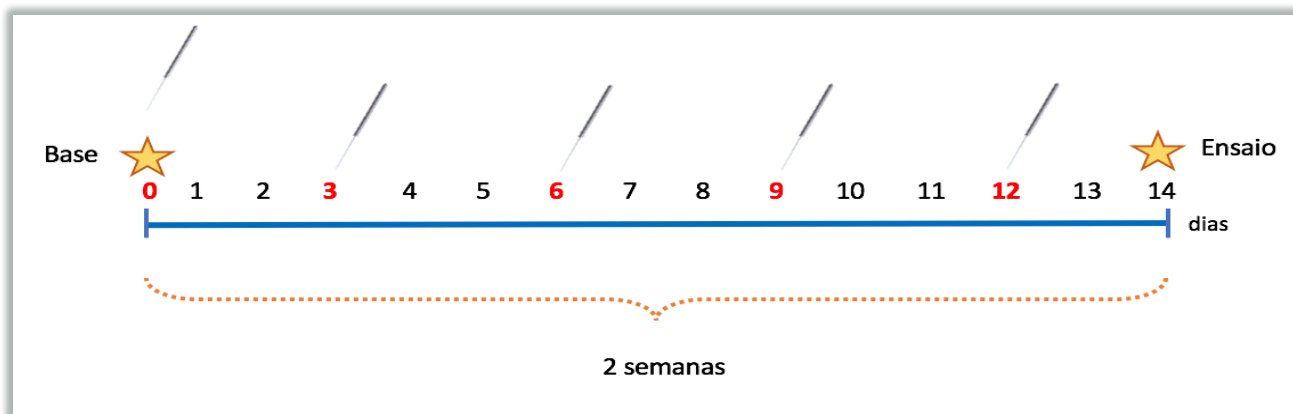


Figura 9: Esquema explicativo do protocolo de tratamento prévio ao desafio dos animais aos testes comportamentais de nocicepção em modelos de indução térmica. As estrelas indicam os dias de testes. As agulhas indicam os dias nos quais os animais receberam seus devidos tratamentos dentro desta cronologia.

Todos os animais, incluindo os que não foram tratados com acupuntura, foram submetidos à mesma forma de manipulação com a finalidade de impedir diferenças entre as respostas mediadas pela manipulação e contensão do animal, salvo exceção do grupo *naïve*.

4. Ensaio de avaliação de antinocicepção por estimulação química (Formalina)

A) Execução do ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por estimulação química (formalina)

O teste da Formalina é um ensaio comportamental que tem por objetivo avaliar a resposta antinociceptiva da substância ou tratamento estudado. Através da administração da Formalina (formalina a 2,5%) na pata traseira do animal, observa-se a execução de comportamentos nociceptivos devido à estimulação nociceptiva do tecido (SILVA *et al.*, 2013; YOON, 2009; BANNON e MALMBERG, 2007).

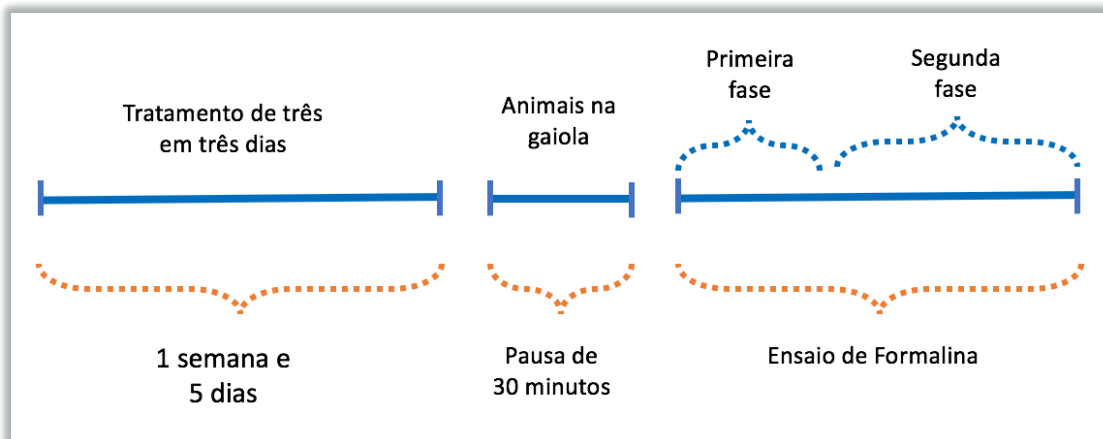


Figura 10: Cronologia da organização do ensaio de formalina: fez-se o tratamento proposto para cada grupo de animal ao longo de uma semana e cinco dias. No derradeiro dia de tratamento, ao finalizar, o animal aguardava por 30 minutos na sua respectiva gaiola. Ao final deste intervalo, foi administrada a formalina a 2,5% via intraplantar. Imediatamente após a administração o animal foi colocado em uma caixa de acrílico e, com o auxílio de espelhos (vide figura 15), dois observadores percebiam os sinais de nocicepção na fase aguda (primeiros 10 minutos) e na fase inflamatória (20 minutos finais).

Após a realização do tratamento proposto, o animal foi mantido por 30 minutos em suas caixas para que recebesse, na sequência, a formalina via plantar.



Figura 11: Administração intraplantar de formalina a 2,5% com o auxílio de uma seringa 30 minutos após o tratamento proposto e imediatamente antes do ensaio propriamente dito. (Foto: Cleber Xavier)

Os comportamentos associados à nocicepção avaliados foram: o tempo que o animal balança vigorosamente a pata puncionada, o lambar a pata, o levantar ou morder a pata manipulada. Em seguida, o ensaio, que tem duração de 30 minutos, se subdivide em dois momentos. Os primeiros 10 minutos são chamados de primeira fase ou fase de nocicepção aguda e os 20 minutos restantes são chamados de fase crônica ou inflamatória. A primeira fase tem início a partir do momento em que o animal recebe a injeção de formalina e a segunda ocorre imediatamente após a primeira. Para realizá-lo, dois observadores se colocam em posições favoráveis à observação com visão de 360° do animal em teste, com o auxílio de espelhos.

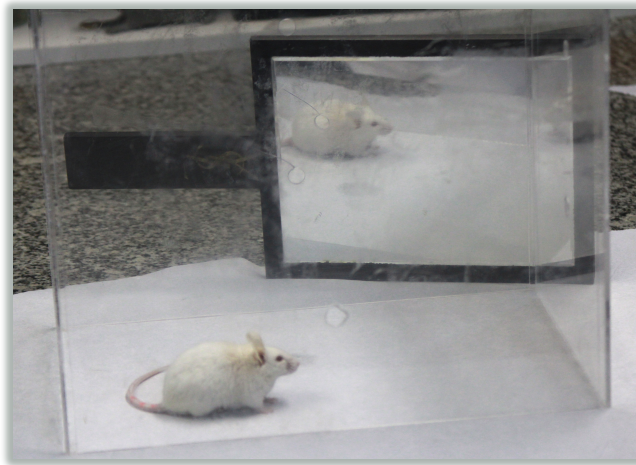


Figura 12: Animal sendo observado ao longo do ensaio de Formalina. O animal foi colocado em uma cuba de acrílico e, com o auxílio de espelhos, sendo observado ao longo dos 30 minutos propostos pelo teste. (Foto: Cleber Xavier)

Cada observador anotou em uma ficha a duração dos eventos e quantidades destes ao longo das duas fases. O ensaio foi conduzido de maneira duplo cega (SILVA *et al.*, 2013).

..... 10'20'			
ANIMAL	FASE AGUDA		FASE CRÔNICA		OBSERVAÇÕES
	Nº de eventos	Tempo	Nº de eventos	Tempo	

Figura 13: Ficha preenchida por cada observador individualmente durante o ensaio de Formalina. Tal ficha reporta o número do animal, o número de eventos anotados e o tempo total de cada uma das fases do ensaio de Formalina (fase aguda, 10 minutos, e fase inflamatória, 20 minutos).

B) Grupos Focais

Os animais desafiados nos ensaios de avaliação antinociceptiva por estimulação química (Formalina) foram divididos nos seguintes grupos:

Quadro 2: Grupos de animais que foram submetidos aos ensaios de nocicepção por indução química.

Nome	Descrição
Controle formalina	Este grupo consiste em animais que não passaram por nenhuma forma de manipulação ou tratamento, nem mesmo a utilização do contensor, salvo exceção da injeção de formalina intraplantar no momento do ensaio. (n=8)
Controle veículo + acupuntura	O grupo controle veículo + acupuntura seguiu o mesmo protocolo descrito no item “ensaio de nocicepção em modelos de indução térmica”. (n=8)

Teste acupuntura	Nos animais participantes deste grupo foram inseridas as agulhas de acupuntura nos mesmos acupontos descritos anteriormente também de forma bilateral. Estimuladas por 15 segundos, foram deixadas no animal imóvel ao longo dos 25 minutos de terapia. Em seguida foram retiradas as agulhas e os animais voltaram às suas respectivas gaiolas. (n=8)
Teste peptídeo dose 1 + acupuntura	O grupo teste peptídeo dose 1 + acupuntura seguiu o mesmo protocolo descrito no item “ensaio de nocicepção em modelos de indução térmica”, fazendo-se, porém, a administração de 3,26 mM do peptídeo por animal. (n=8)
Teste peptídeo dose 2 + acupuntura	Da mesma maneira o grupo teste peptídeo dose 2 + acupuntura seguiu o mesmo protocolo do mesmo item mencionado anteriormente, utilizando, contudo, 6,52 mM do peptídeo em questão por animal. (n=8)

C) Cronologia do ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por estimulação química (formalina)

Conforme descrito no subitem “a” do item 2, o tratamento também foi realizado a cada três dias. Imediatamente após uma semana e 5 dias de terapia crônica, porém, o animal foi desafiado no ensaio após a injeção de formalina.

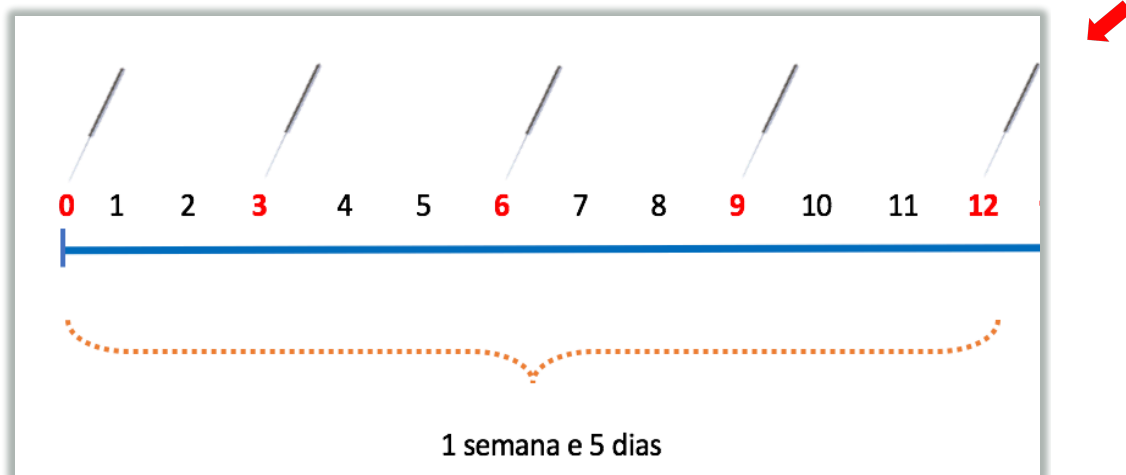


Figura 14: Esquema explicativo do protocolo de tratamento prévio ao desafio dos animais aos testes comportamentais de nocicepção em modelos de indução química. As agulhas indicam os dias nos quais os animais receberam seus devidos tratamentos dentro desta cronologia. Ao final de 1 semana e 5 dias (seta indicada em vermelho) os animais foram desafiados no ensaio proposto.

5. Análise estatística dos bioensaios por indução térmica

Para efeitos de normalização de todas as latências das respostas motoras nociceptivas (LA - latências de antinocicepção) foi calculado o Índice de antinocicepção (AI) somente dos ensaios de avaliação antinociceptiva de nocicepção por indução térmica através da seguinte fórmula:

$$IA = \frac{(LA \text{ do teste}) - (\text{latência média basal})}{\text{Tempo limite} - (\text{latência média basal})}$$

Os resultados foram apresentados em médias \pm E.P.M. dos valores de IA.

Os resultados de todos os ensaios com distribuição normal foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, com $p < 0.05$, seguido do teste de Tukey como pós-teste.

Resultados

1. Ensaio de avaliação antinociceptiva em nociceção por indução térmica

A) Retirada de Cauda (*tail-flick*)

Os grupos tratados não apresentaram resposta após o tratamento apenas com acupuntura e com a associação do tratamento com o peptídeo Neuroval e a AM. A análise de variância (ANOVA de uma via) não revelou diferenças significativas [$F_{(5,49)} = 2.403$; $p=0.0508$].

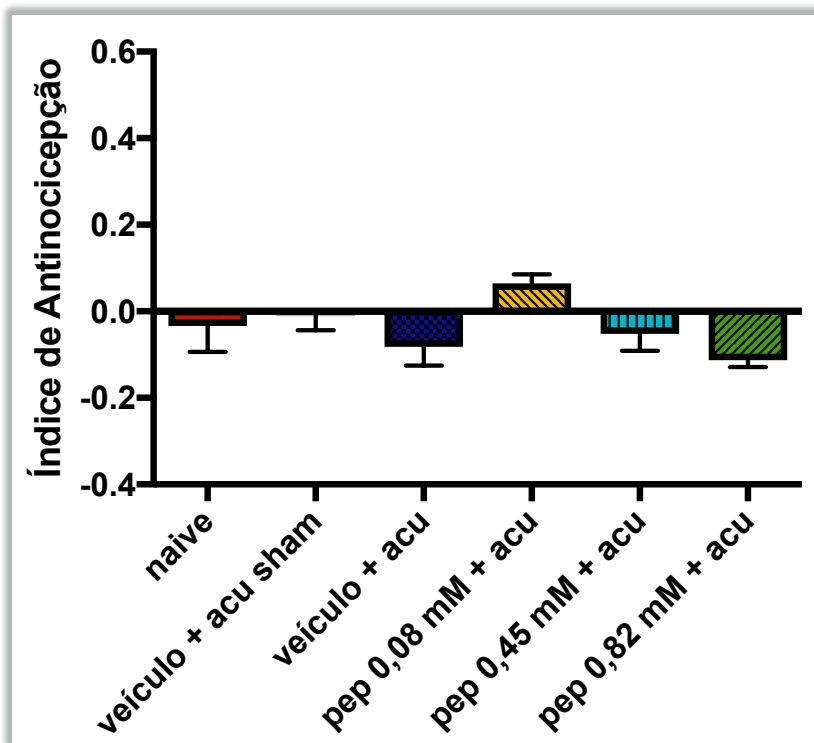


Figura 15: Índice de antinociceção do ensaio de Retirada de Cauda (*tail flick*) após duas semanas de tratamento com acupuntura ou acupuntura associada com o Neuroval. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de uma via.

B) Placa Quente (*Hot-plate*)

No teste de avaliação do efeito antinociceptivo após o desafio de estímulo térmico na placa quente, os grupos não apresentaram resposta antinociceptiva após o tratamento apenas com acupuntura e com a associação do tratamento

com o peptídeo Neuroval e a AM. A análise de variância (ANOVA de uma via) não revelou diferenças significativas [$F_{(5, 49)} = 0,6202$; $p=0,6850$].

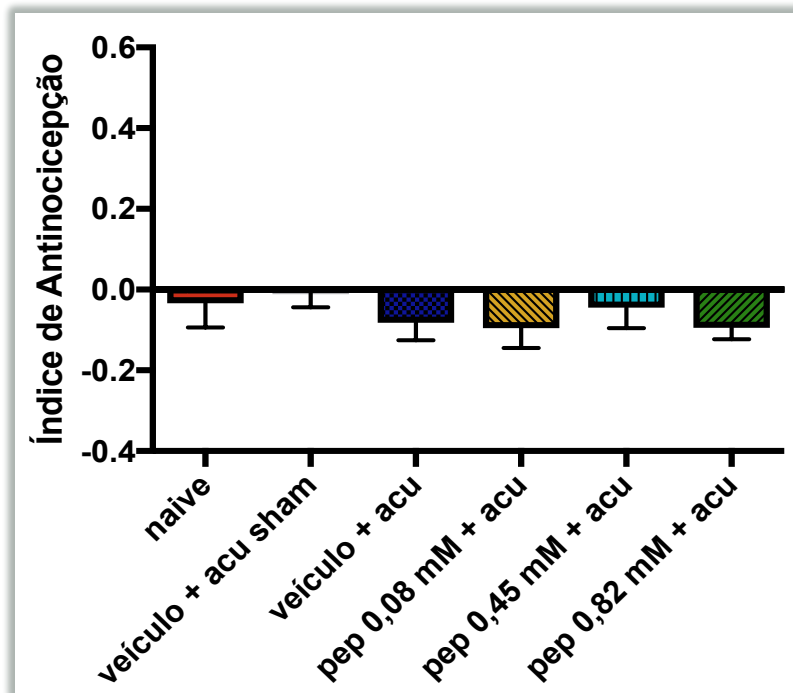


Figura 16: Índice de antinocicepção do ensaio de Placa quente (*Hot plate*) após duas semanas de tratamento com acupuntura ou acupuntura associada com o Neuroval. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de uma via.

2. Ensaio de avaliação antinociceptiva em nocicepção por indução química (Formalina)

A) Fase aguda

Os animais que receberam o tratamento com acupuntura, principalmente os que a associaram ao peptídeo em suas duas doses, tiveram uma diminuição na execução de comportamentos nociceptivos [$F_{(4, 35)} = 12,46$; $p<0,0001$]. Enquanto que os animais que receberam somente formalina tiveram um potente efeito nociceptivo. O pós-teste de Tukey revelou diferenças entre o grupo controle formalina e os grupos tratados com: acupuntura ($p<0,01$), acupuntura + veículo ($p<0,01$), pep 3,26 mM + acupuntura ($p<0,0001$) e pep 6,52 mM + acupuntura ($p<0,0001$).

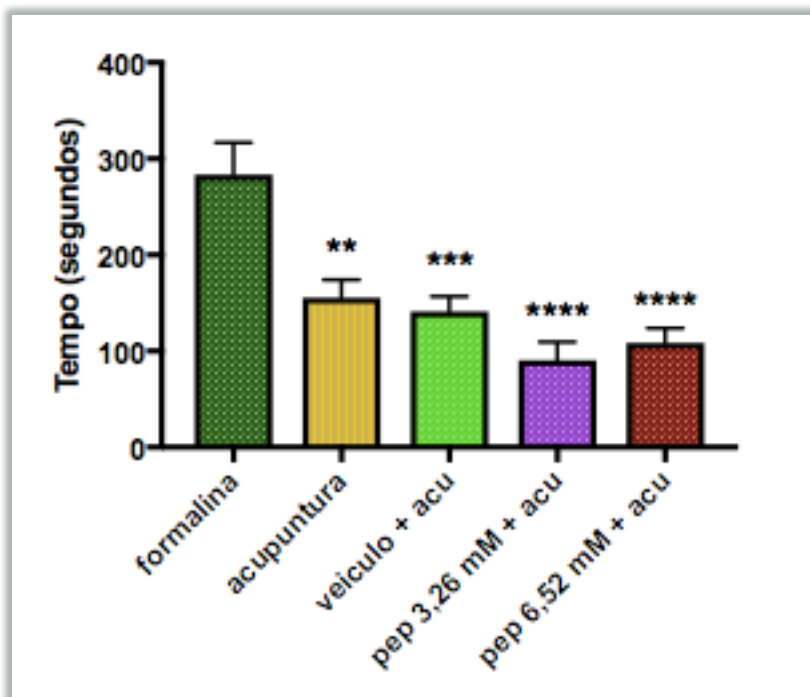


Figura 17: Efeito da acupuntura e da associação da acupuntura e do peptídeo Neuroval no tempo de execução de comportamentos nociceptivos da fase aguda do teste de indução nociceptiva por estímulo químico - formalina. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA seguido pelo teste de Tukey. * Diferenças significativas em relação à grupo de formalina. **** = $p < 0.0001$; ** = $p < 0.01$; * = $p < 0.05$.

B) Fase inflamatória

Os animais que receberam somente acupuntura tiveram uma grande diminuição da nocicepção na fase inflamatória quando comparados aos animais que receberam outros estímulos. Os animais que receberam acupuntura associada à maior dose do peptídeo também tiveram uma diminuição da nocicepção na fase inflamatória.

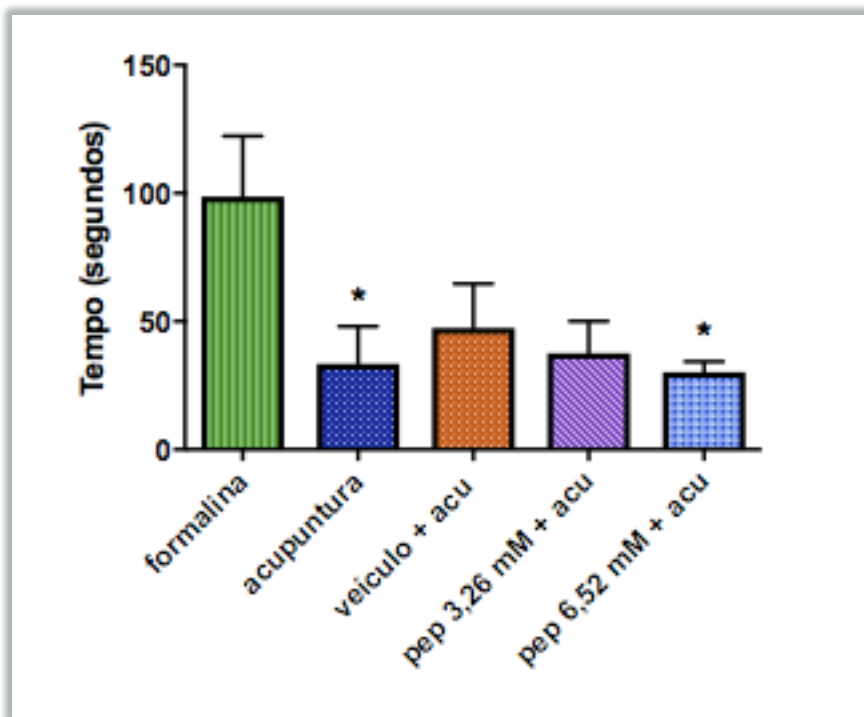


Figura 18: Efeito da acupuntura e da associação da acupuntura e do peptídeo Neuorval no tempo de execução de comportamentos nociceptivos da fase inflamatória do teste de indução nociceptiva por estímulo químico – formalina. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA seguido pelo teste de Tukey * Diferenças significativas em relação à formalina.* = $p < 0.05$.

Discussão



Discussão

Como mecanismo de defesa e de captura de presa, alguns animais desenvolveram um conjunto de compostos bioativos que, ao longo da evolução de cada espécie, gerou compostos potencializados e mais eficazes. Devido a este fato, a peçonha destes animais tem sido amplamente estudada, pois revela a presença de moléculas bioativas inéditas e inovadoras (PIMENTA e LIMA, 2005). Uma vez observado o comportamento dos animais peçonhentos, assim como a ação de suas toxinas quando em contato com sua presa, pesquisadores iniciaram uma leva de estudos voltados para a elucidação desses mecanismos. Além disso, com o intuito de desenvolver novos fármacos e ferramentas terapêuticas, a comunidade científica se viu frente a uma boa oportunidade de compreensão de várias patologias humanas como a hipertensão e a ansiedade, haja visto que o entendimento do mecanismo de ação de tais toxinas leva o pesquisador a melhor compreender o funcionamento do próprio organismo em estudo (XU *et al.*, 2006; MORTARI *et al.*, 2007).

Poucos trabalhos descrevem o efeito de antinociceptivo de compostos isolados de peçonha de vespas. Dentre eles, pode-se citar o composto isolado da vespa *Agelaia pallipes pallipes* que apresentou efeito antinociceptivo e antiinflamatório em camundongos quando injetado por via periférica (BAPTISTA-SAIDEMBERG, 2011). Em 2007, Mortari e colaboradores isolaram um composto da vespa *Polybia occidentalis* capaz de promover uma potente antinocicepção quando injetado em ratos via intracérebroventricular (i.c.v.).

Os dados apresentados por Gonçalves (2013) demonstraram um efeito antinociceptivo de um mastoparano, que futuramente viria a ser o composto protótipo para o desenvolvimento do peptídeo sintético Neuroval, O mastoparano quando administrado via i.c.v. em camundongos e desafiados no ensaio de Placa Quente apresentou um efeito antinociceptivo dose-dependente. Demonstrou-se, também, que sua maior dose levou a um efeito antinociceptivo por até três dias após a sua administração.

No que diz respeito ao mastoparano isolado por Gonçalves em 2013, o mecanismo de ação pelo qual tal peptídeo age resta ainda desconhecido. Acreditava-se, porém, que o peptídeo agisse bloqueando a via ascendente da dor, bloqueando a transmissão do impulso diretamente no tálamo e, por isso,

agisse diretamente nos neurônios de segunda ordem gerando, assim, uma inibição pré-sináptica e, conseqüentemente, a inibição da liberação de neurotransmissores (MIZOGUCHI *et al.*, 2012).

Neste sentido, foi desenvolvido o Neuroval a partir do mastoparano Agelaia-MP, o qual apresentou atividade antinociceptiva uma vez administrado via i.c.v. Algumas modificações foram realizadas a fim de minimizar os efeitos adversos indesejados e potencializar o seu efeito antinociceptivo. Para tanto, foi realizada uma pesquisa, utilizando-se camundongos fêmeas, para avaliar seu mecanismo de ação, os efeitos adversos apresentados e seu potencial antinociceptivo. O peptídeo Neuroval, de sequência inédita, sempre administrado via i.c.v., apresentou grande potencial antinociceptivo nos testes de Placa Quente e Retirada de Cauda (GONÇALVES, 2017).

Sugere-se que seu mecanismo de ação antinociceptiva se dá pelo bloqueio do potencial de ação sugerindo uma alteração em canais de sódio voltagem-dependente. Além disso, demonstrou uma possível atuação em receptores opioides, uma vez que seu efeito antinociceptivo cessou ao administrar-se o cloridrato de naloxona e a toxina pertussis. A administração do Neuroval alterou a expressão basal de proteínas c-Fos em regiões de processamento nociceptivo, no NMR e no *Locus Coeruleus* (LC) (GONÇALVES, 2017), sugerindo que o peptídeo promoveu uma modificação gênica ao detectar a expressão de tal proteína. Estudos demonstraram que a proteína c-fos é expressada em neurônios pós-sinápticos do corno dorsal da medula espinhal após um estímulo nocivo ou como consequência da despolarização de neurônios que ocorre durante o estresse, a epilepsia e diversos outros fenômenos fisiológicos (KIM *et al.*, 2008)

Epidemiologicamente, a dor é queixa principal de um terço de toda a população mundial, fazendo deste sinal um caso grave de problema de saúde (ASHBURN e STAATS, 1999). Em se tratando da aproximação terapêutica no combate à dor, encontra-se um grande desafio pelos profissionais da área da saúde. Pois as formas convencionais de tratamento existentes hoje são limitadas e, quando eficazes, apresentam uma série de efeitos colaterais indesejados. Assim, a comunidade científica busca incessantemente novas estratégias de tratamento capazes de suprir as carências das atuais modalidades terapêuticas (STUCKY *et al.*, 2001; WOO *et al.*, 2017).

Vale lembrar que, no mecanismo de nocicepção, diversos neurotransmissores estão envolvidos em uma série de etapas do processo de transmissão do estímulo nociceptivo (MILLAN, 2002). O início da nocicepção se dá através de um estímulo inicial, podendo este ser de natureza mecânica, térmica, elétrica ou química. Este estímulo é detectado por receptores específicos situados na pele ou nas vísceras, os chamados nociceptores. Uma vez que os nociceptores detectam o estímulo, este é traduzido em potenciais de ação dependentes de sódio. Assim, o potencial de ação irá propagar do final do nervo aferente primário até o corno dorsal da medula espinhal através de fibras mielinizadas, amielinizadas e pouco mielinizadas (para revisão ver MILLAN, 1999).

Mais especificamente, uma vez que o potencial de ação chega aos terminais dos neurônios aferentes da medula, ocorre a ativação dos canais de cálcio voltagem dependentes e o influxo de cálcio para o interior da célula. Assim, liberam-se neurotransmissores como a substância P, glutamato, dentre outros (BENNETT, 2000). Tais substâncias excitam neurônios sensoriais secundários da medula espinhal. Este feixe de neurônios projeta seus respectivos axônios para centros do cérebro como a formação reticular, o tálamo e o córtex cervical (para revisão ver JULIUS e BASBAUM, 2001; MOURÃO e ABRAMOV, 2011; PENG *et al.*, 2017).

Devido ao mecanismo complexo da transmissão da sensação dolorosa, as estratégias de tratamento farmacológico têm sido numerosas. Os antagonistas para canal de cálcio, canais de sódio voltagem dependentes, receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), agonistas GABAérgicos (Ácido Gama-aminobutírico), colinérgicos, adrenérgicos e de receptores de opióides têm sido utilizados com a finalidade de bloquear as vias da dor (MILLAN, 1999; WOO *et al.*, 2017).

Neste trabalho, a nocicepção foi avaliada através de dois ensaios de estímulos diferentes. No primeiro ensaio, por estímulo nociceptivo através de um modelo de indução térmica, avaliou-se a percepção da nocicepção através de elevadas temperaturas que tinham por finalidade ativar as vias ascendentes da dor via medula espinhal (através do ensaio de retirada de cauda), assim como vias centrais (através do ensaio de placa quente). No segundo ensaio, por estímulo de nocicepção através de um modelo de indução química (ensaio de

formalina), avaliou-se a resposta nociceptiva frente à estimulação química a partir da administração de formalina a 2,5%.

Questionamentos a respeito da eficácia do tratamento com acupuntura no combate à nocicepção vêm sendo propostos há muitos anos. Atualmente, é vasto o número de trabalhos que buscam responder com propriedade esta dúvida. Ainda assim, ressalta-se que alguns trabalhos de avaliação meta analítica como os de Ezzo e colaboradores (2000) e Rosted e colaboradores (2001) sugerem a inabilidade da acupuntura em tratamentos contra a dor. Alguns fatores que limitam a credibilidade dos estudos da acupuntura, como ausência de estudo randomizado ou duplo cego, levam a argumentos que contradizem a reprodutibilidade da técnica empregada. Por outro lado, estudos realizados com animais entre 2002 e 2006 descreveram que o agulhamento seguido de estimulação dos acupontos mostram um efeito antinociceptivo (para revisão ver CHEN e MA, 2003; CECCHERELLI *et al.*, 2001).

Nota-se, também, que em 2006 Hsieh e colaboradores realizaram um estudo utilizando exames de imagem - Ressonância Magnética funcional (fMRI) e Imagem por Emissão de Póstron (Pet-scan) -, demonstrando que a acupuntura tem capacidade de ativar estruturas ligadas às vias descendentes da nocicepção, como os núcleos hipotalâmicos e estruturas do tronco cerebral. Possui também potencial de diminuir a ativação de estruturas do sistema límbico e do completo amigdalóide.

Existem algumas teorias para o estudo do mecanismo de ação da acupuntura no organismo. A mais antiga delas descreve a ativação da via opioidérgica (CECCHERELLI *et al.*, 2001). Em 2004, Ma reforçou essa hipótese ao descrever a ativação de receptores opioidérgicos em diferentes núcleos supra espinhais envolvidos no sistema analgésico endógeno. Mais recentemente, Almeida e colegas demonstraram que a via nociceptiva do nervo trigêmeo pode sofrer forte influência da acupuntura, dada a sua capacidade de ativação da via opioidérgica (2008). Sabe-se, além disso, que outras vias com participação de diversas outras substâncias também estão envolvidas no processo de antinocicepção endógena (MILLAN, 2002).

Como o objetivo de avaliar a associação de uma técnica da MTC com um novo composto antinociceptivo, uniu-se a administração do peptídeo sintético e

bioinspirado Neuroval à aplicação da acupuntura no ponto VB 34 de forma bilateral e manual.

Ainda que muitos anos tenham se passado da origem da MTC, ainda hoje se utiliza o ponto VB34 com a mesma finalidade de tratar síndromes dolorosas como artrite, inflamação de nervos e cialgias. De acordo com a prática clínica realizada nos tempos atuais, o ponto VB34 é amplamente utilizado em boa parte das sessões de acupuntura em humanos que têm por queixa principal as dores agudas e crônicas ligadas a nervos, músculos e tendões (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001; VECTORE, 2005; PANTANO, 2011).

A imobilização de roedores para a realização de manipulações é altamente complexa. E por se tratar de um protocolo que sugere potencial antinociceptivo, o uso de anestésicos, ainda que locais, poderia gerar um grande viés à presente pesquisa (ADACHI *et al.*, 2018).

Diante de tal complexidade, foi criado um protocolo – como técnica inédita na UnB – para a realização da AM em camundongos. Dentro deste objetivo, viu-se a necessidade de criar um aparato de contenção específico para estes animais, camundongos que tenham peso entre 20 e 40 gramas. Neste sentido, foi projetado e desenvolvido um contensor em material acrílico contendo orifícios para possibilitar a respiração do animal e, ao mesmo tempo, que possibilitasse o acesso aos membros nos quais se encontram o acuponto escolhido para a pesquisa (VB34). Uma série de tentativas foram realizadas para que se chegasse a um modelo final vitorioso e totalmente capaz de manter o animal praticamente estático ao longo dos 25 minutos de terapia propostos. Vale comunicar que o laboratório pretende viabilizar o processo de patenteamento do aparato de contenção desenvolvido, pois trata-se de equipamento com grande potencial de uso por grupos interessados no tema.

Os resultados desta pesquisa, portanto, demonstraram baixa propriedade antinociceptiva diante de estímulos nociceptivos de natureza térmica, tal como o ensaio de Placa Quente e Retirada de Cauda.

Apesar dos ensaios de avaliação antinociceptiva por indução térmica Retirada de Cauda e Placa Quente serem amplamente utilizados no estudo de modelos de nocicepção induzida, foi escassa a quantidade de trabalhos encontrada que associam o seu uso aplicado para a avaliação a acupuntura como medida antinociceptiva. Boa parte dos estudos com modelos nociceptivos

sugerem que o índice antinociceptivo apresentado diante de tais testes é elevado. Ainda assim, quando se tratou da administração do peptídeo Neuroval associado a acupuntura manual não houve atividade antinociceptiva percebida. Devido a escassez de estudos que associem tal técnica a este tipo de ensaio não foi possível encontrar uma base de dados comparativos para discussão. Acredita-se, entretanto, que não foi observada atividade antinociceptiva devido ao grande intervalo de tempo entre o derradeiro dia de tratamento e o desafio do animal ao ensaio propriamente dito, pois tratou-se de dois dias inteiros. Sugere-se um protocolo de dor crônica para melhor percepção do potencial antinociceptivo da associação das técnicas elucidada no presente trabalho.

Em prol de diluir corretamente o sintético Neuroval, foi necessário acrescentar à solução 20% de DMSO. Devido à diminuição do potencial antinociceptivo em relação à sua administração via i.c.v. nos ensaios de nocicepção por estímulo térmico (GONÇALVES, 2017), acredita-se que o DMSO possa ter sido tóxico, quando administrado via intradérmica.

Por outro lado, a associação das técnicas demonstrou forte potencial antinociceptivo frente aos estímulos nociceptivos de natureza química, principalmente quando observados os eventos que denotam comportamento nociceptivo na fase subsequente ao estímulo, ou seja, fase aguda (ensaio de Formalina).

Acredita-se que a diminuição do tempo do protocolo de tratamento (o animal foi desafiado no ensaio 30 minutos após o tratamento proposto) aumentou a atividade antinociceptiva dos grupos de uma maneira geral.

Estudos anteriores utilizando roedores também demonstraram que a AM, aplicada no ponto VG20, contudo, por si só promoveu uma resposta antinociceptiva maior na fase aguda do que na fase inflamatória (FRANCO, 2013). Realizado o tratamento prévio por AM ao longo de 15 dias consecutivos, os animais foram desafiados no ensaio de formalina de maneira semelhante à descrita no presente trabalho. Os resultados de Franco (2013) sugerem que a AM foi capaz de induzir antinocicepção somente na fase aguda do teste descrito.

Yoon e colaboradores (2009) realizaram o ensaio de formalina em camundongos pré tratados com BVA no ponto E36. Seus resultados demonstraram, ao contrário de Franco (2013), atividade antinociceptiva principalmente na fase tardia, ou inflamatória, do ensaio de formalina.

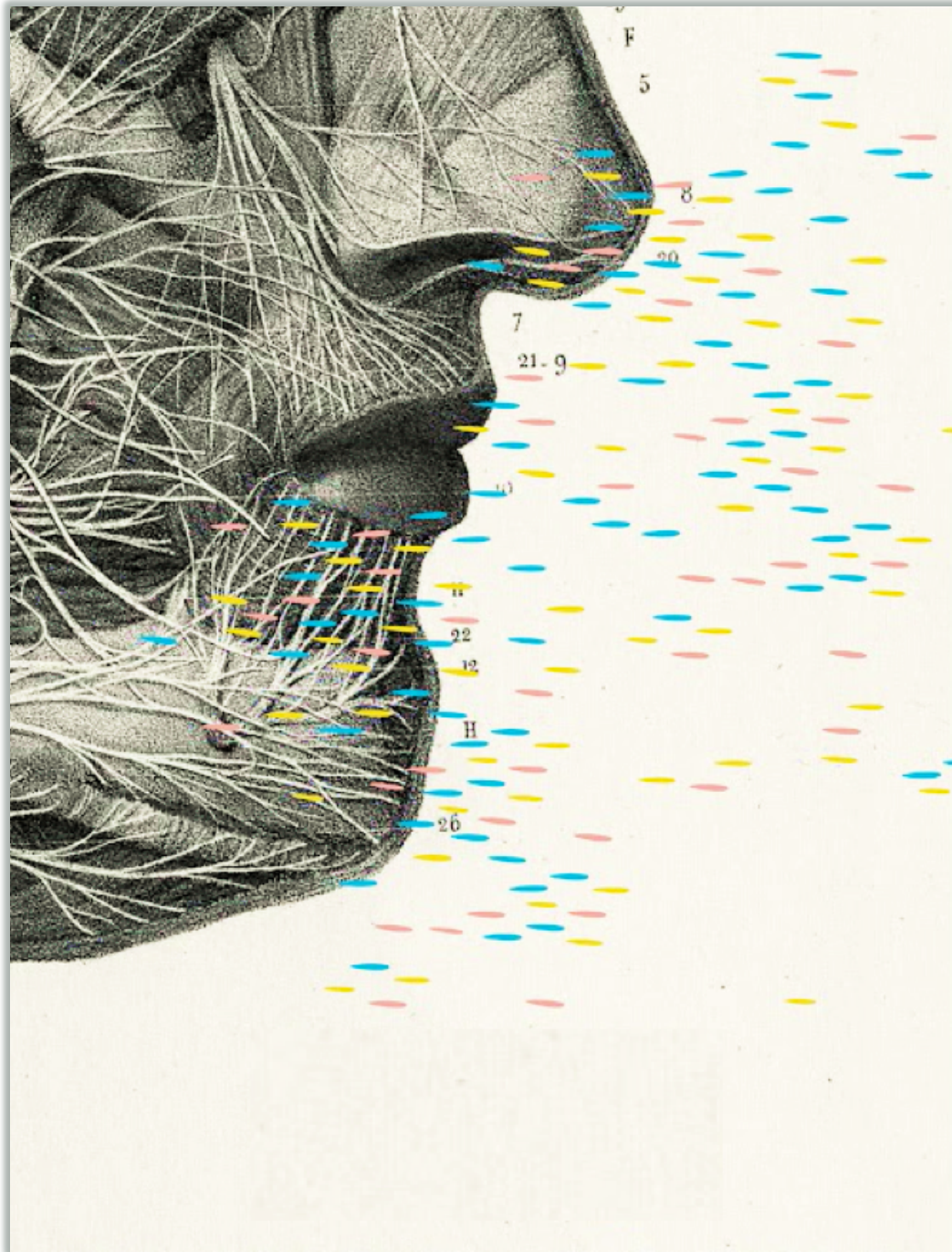
Em 2014 Tobaldini e colaboradores descreveram atividade antinociceptiva em camundongos tratados com AM por uma semana (acuponto E36) e, imediatamente após o tratamento recebiam uma injeção de formalina via orofacial. Ao contrário do teste de formalina descrito no presente trabalho, o descrito por Tobaldini e colaboradores consistia em avaliar eventos nociceptivos ligados à percepção nociva na região orofacial. Seus resultados demonstraram um comportamento antinociceptivo substancial em ambas as fases.

Como descrito anteriormente, o ensaio de Formalina é subdividido em duas fases. A primeira ocorre durante os primeiros 10 minutos após a administração da formalina e é denominada de neurogênica ou aguda. Nesta fase, o estímulo nociceptivo se dá através da ativação das fibras C, descritas anteriormente, devido à estimulação química direta de nociceptores. A fase seguinte, denominada neuropática, inflamatória ou crônica, ocorre nos derradeiros 20 minutos de teste e tem por mecanismo o processo inflamatório nos tecidos periféricos e a promoção de alterações funcionais no corno dorsal da medula espinal, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios (TOBALDINI et al., 2014).

Ante todos os resultados alcançados, sugere-se, portanto, que a inibição do estímulo nociceptivo por indução química, descrita no presente trabalho, teve maior potencial antinociceptivo devido a múltiplos fatores e, desta forma, demonstrou maior potencial antinociceptivo na fase aguda do que na fase inflamatória do ensaio de formalina.

Devido a duração do protocolo de tratamento ter sido inicialmente de 14 dias, houve um intervalo de tempo (48 horas) entre o derradeiro dia de tratamento e a submissão do animal ao ensaio propriamente dito. Assim, acredita-se que a cronicidade do tratamento aplicado não foi eficaz no que diz respeito à atividade antinociceptiva. Objetivando uma maior eficácia da antinociceção, sugere-se que a diminuição do tempo do protocolo de tratamento aumentou a atividade antinociceptiva dos grupos de uma maneira geral. Durante o ensaio de avaliação da nociceção por indução química o animal passou a ser desafiado no ensaio 30 minutos após o tratamento proposto. Percebeu-se, desta arte, que o protocolo proposto de associação das técnicas antinociceptivas é mais eficaz quando aplicado imediatamente antes do desafio do animal ao estímulo nociceptivo.

Conclusão



Conclusão

1. Ensaio de nociceção em modelos de indução térmica

- Sugere-se que o intervalo de tempo entre o último dia de tratamento e o desafio do animal ao ensaio por indução térmica tenha inabilitado a atividade antinociceptiva.
- Acredita-se que, devido à falta de resposta antinociceptiva nos ensaios por indução térmica, o DMSO possa ter sido tóxico quando administrado por via intradérmica.

2. Avaliação dos tratamentos em ensaios de nociceção em modelos de indução química (Formalina)

- Acredita-se que a diminuição do tempo do protocolo de tratamento (o animal foi desafiado no ensaio 30 minutos após o tratamento proposto) aumentou a atividade antinociceptiva dos grupos de uma maneira geral.
- Na fase aguda do ensaio de Formalina, o grupo tratado somente com acupuntura e o grupo tratado com acupuntura em associação ao veículo demonstraram grande potencial antinociceptivo quando comparados ao grupo que recebeu somente formalina.
- Na fase aguda do ensaio de Formalina, os grupos tratados com acupuntura em associação às duas doses do peptídeo demonstraram grande potencial antinociceptivo quando comparados ao grupo que recebeu somente formalina.

Referências



Referências

- ADACHI, L.N.S.; VERCELINO, R.; OLIVEIRA, C.; SCARABELOT, V.L.; SOUZA, A.; MEDEIROS, L.F.; CIOATO, S.G.; CAUMO, W.; TORRES, I.L.S. Isoflurane and the analgesic effect of acupuncture and eletroacupuncture in an animal model of neuropathic pain. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, Vol 389, 2018.
- BAIK, K.Y.; LEE, J.; LEE, B.; JOHNG, H.; NAM, T.J.; SUNG, B.; CHO, S. SOH, K. Acupuncture Meridian and Intravascular Bonghan duct. Key Engineering Materials Vols. 277-279, 2005.
- BANNON, A.W., MALMBERG, A.B. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. **Curr. Protoc. Neurosci.** 41, 8.9:8.9.1e8.9.16, 2007.
- BENNETT, G. J. Does a neuroimmune interaction contribute to the genesis of painful peripheral neuropathies? Proc. Nalt. Acad. **Sci**, USA, 1999.
- BONICA, J. J. Definitions and taxonomy of pain. The Management of **Pain**, Vol I, 2ª ed, Philadelphia, 1990.
- CASTRO, F.S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Soul, Mind and Brain in Pre-history and Early Human Civilizations. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, Porto Alegre, Vol. 23, No 1, 2010.
- CECCHERELLI, F.; GAGLIARDI, G. Comparison between superficial and deep acupuncture in the treatment of shoulder myofascial pain: a randomized and controlled study. **Acupunct Electrother Res**, Vol 26, 2001.
- CHAE, Y.; LEE, H.; KIM, H.; KIM, C.; CHANG, D.; KIM, K.; PARK, H. Parsing Brain Activity Associated with Acupuncture Treatment in Parkinson's Diseases. **Movement Disorders**, Vol. 24, No 12, 2009.

- CHEN, X.; GELLER, E.B.; ADLER, M.W. Electrical Stimulation at Traditional Acupuncture Sites in Periphery Produces Brain Opioid-Receptor-Mediated Antinociception in Rats. **The Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Printed in U.S.A., Vol. 277, No 2, 1996.
- DOO, A. R.; KIM, S. T.; KIM, S. N.; MOON, W.; YIN, C. S.; CHAE, Y.; PARK, H. J. Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. **Neurological Research**, Vol 39, 2010.
- DUARTE, D. F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Vol 55, 2005.
- ERRINGTON-EVANS, N. Acupuncture for Anxiety. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, Vol 0, 2011.
- EZZO, J.; BERGMAN, B.; HADHAZY, V.A.; JADAD, A.R., LAO, L., SINGH, B.B. Is acupuncture effective for treatment of chronic pain? A systematic review. **Pain**, Vol 86, 2000.
- FANG, J.; JIN, Z.; WANG, Y.; LI, K.; KONG, J.; NIXON, E.E.; ZENG, Y.; REN, Y.; TONG, H.; WANG, Y.; WANG, P.; HUI, K.K. The Salient Characteristics of the Central Effects of Acupuncture Needling: Limbic-Paralimbic-Neocortical Network Modulation. **Human Brain Mapping**, Vol 30, 2009.
- FEDOSOV, A. E.; MOSHKOVSKII, S. A.; KUZNETSOVA, K. G.; OLIVEIRA, B. M. Conotoxins: From the biodiversity of gastropods to new drugs. **Biomedical Chemistry**, Vol 6, 2012.
- FEIN, A. Nociceptores: as células que sentem dor. PETROV, P.; FRANCISCHI, J.N.; FERREIRA, S.H. tradutores. Ribeirão Preto – SP: **Dor On Line**, 2011.

FILSHIE, J.; WHITE, A. Medical acupuncture: A Western scientific approach. São Paulo, Ed. Roca, 2002.

FLORES, M. P.; CASTRO, A. P. C. R.; NASCIMENTO, J. S. Analgésicos Tópicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Vol 62, 2012.

FRANCO, C.A. Acupuntura Manual no Baihui (VG20) melhora o aprendizado e a memória em camundongos. 2013. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina.

GALANTE, P.R. Identificação e avaliação do efeito antinociceptivo da Protonectina natural e modificada da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

GOLDMAN, N.; CHEN, M.; FUJITA, T.; XU, Q.; PENG, W.; LIU, W.; JENSEN, T.K.; PEI, Y.; WANG, F.; HAN, X.; CHEN, J.; SCHNERMANN, J.; TAKANO, T.; BEKAR, L.; TIEU, K.; NEDERGAARD, M. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nature Neuroscience**, Vol 13, No 7, 2010.

GONÇALVES, J.C. Identificação e efeitos antinociceptivos de um mastoparano isolado da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

_____. Caracterização da atividade antinociceptiva do peptídeo Neuroval, desenvolvido a partir do mastoparano agelaia-mp I. 2017. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Brasília, Universidade de Brasília.

HECKER, H.U.; STEVELING, A.; E. PEUKER; KASTNER, J.; LIEBCHEN, K. Atlas Colorido de Acupuntura: pontos sistêmicos, pontos auriculares,

pontos-gatilho. Tradução por Ursula Vielkind, PhD, Dundas, Ontario, Canadá. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 330 p. 2ª edição, 2010.

HORN, S.; MUNAFÒ, M. Theories of Pain. **Pain: theory, research and intervention**. Open University, Buckingham, 1997.

INSTITUTO DE MEDICINA MOLECULAR. O que é dor? Disponível em <http://www.dor.biochemistry-imm.org/cat.php?catid=3> acesso em outubro de 2015.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN, Washington. Disponível em <http://www.iasp-pain.org/> acesso em outubro de 2015.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, Vol 413, 2001.

KIM, H.J.; JEON, B.S. Is acupuncture efficacious therapy in Parkinson's disease? **Journal of the Neurological Sciences**, Vol 341, 2014.

KIM, K.; LEE, S.H.; HA, K.J.; CHOI, Y.; KIM, N. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). **Molecular Endocrinology**, Vol 22, 2008.

LEE, J.; PARK, H.; CHAE, Y.; LIM, S. An Overview of Bee Venom Acupuncture in the Treatment of Arthritis. **eCAM**, Vol 2(1), 2005.

LENT, R. Cem Bilhões de Neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociência. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

LIBES, S.M. Introduction to Marine Biogeochemistry. USA, 2ª ed. 2009.

MA, Y.; MA, M.; CHO, Z.H. Biomedical acupuncture for pain management: an integrative approach. São Paulo, Ed. Roca, 2006.

MATEUS, S. Análise dos comportamentos envolvidos na organização social e no processo de enxameio de *Parachartergus fraternus* (Hymenoptera, Polistinae, Epiponini). 2005. 160f. Tese (Doutorado em Ciências). Ribeirão Preto, SP. 2005.

MARQUEZ, J. O. Bases de anatomia e fisiopatologia. **Dor: diagnóstico e tratamento**, Vol 1. Ed Ambito, 2004.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain Mechanisms: A New Theory. **Science**, New Series, Vol 150, No 3699, 1965.

_____. The Challenge of Pain. 2nd ed, Penguin Books, London, 1991.

MEBS, D. Toxicity in animals: Trends in evolution? *Nature*, nº 39, 2001.

MENEZES, C.R.O.; MOREIRA, A.C.P.; BRANDÃO, W.B. Base neurofisiológica para compreensão da dor crônica através da acupuntura. **Revista Dor**, Vol 11(2), 2010.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, Vol 57(1), 1999.

_____. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, Vol 66, 2002.

MIZOGUCHI, H.; WATANABE, C.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. New vistas in opioid control of pain, 2011.

MORÉ, A.O.O. Efeito da acupuntura no modelo de dor pós-operatória em camundongos: investigação do sistema adenosinérgico utilizando a farmacopuntura. 2012. Dissertação (Mestrado em Neurociência) - Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina.

MORIN, E. Ciência com Consciência. Rio de Janeiro, Bertrand Brasil, 8ª edição, 2005.

MORTARI, M. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes, Ribeirão Preto. 2007. Tese (Doutorado em Psicobiologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP.

MOURÃO, C.A.; ABRAMOV, D.M. Fisiologia Essencial. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2011.

NIH Consensus Conference, JAMA. **Acupuncture**, Vol 280, Nº 17, 1998.

PALMEIRA, C.C.A.; ASHMAWI, H.A.; OLIVEIRA, J.O.O.; POSSO, I.P.; PRESLEY, R.W. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, Vol 10, 1990.

PANTANO, M. Bases Científicas da Acupuntura. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo.

PARK, H.; CHAE, Y.; JANG, J.; SHIM, I.; LEE, H.; LIM, S. The effect of acupuncture on anxiety and neuropeptide Y expression in the basolateral amygdala of maternally separated rats. **Neuroscience Letters**, Vol 377, 2005.

PENG, K.; STEELE, S.C.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Brodmann area 10: Collating, integrating and high level processing of nociceptive and pain. **Progress in Neurobiology**, Vol 94, 2017.

- PORTNOI, A.G. Dor, Stress e Copying: Grupos Operativos em Doentes com Síndrome de Fibromialgia. 1999. Tese (Doutorado) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends in Neuroscience**, Vol 25, 2002.
- PRESLEY, R.W.; MENÉTREY, D.; LEVINE, J.D.; BASBAUM, A.I. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, Vol 10, 1990.
- RIBEIRO JUNIOR, C. Levantamento das espécies de vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae) em eucaliptocultura, 2008. 72 p. Dissertação Mestrado em Comportamento Animal Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- ROSTED, P.; GRIFFITHS, P.; BACON, P.; GRAVILL, N. Is there an effect of acupuncture on the resting EEG? **Complement Ther Med**, Vol 9, 2002.
- SACKS, O. Book Compilation, disponível em http://veerle.duoh.com/design/article/oliver_sacks_book_covers Acesso em janeiro de 2018.
- SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R.; BECHARA, G.H. Acupuncture: Scientific basis and applications. **Ciência Rural**, Vol 31, No 6, 2001.
- SHAO, X.; SHEN, Z.; SUN, J.; FANG, F.; FANG, J.; WU, Y.; FANG, J. Strong Manual Acupuncture Stimulation of *Huantiao* (GB 30) Reduces Pain-Induced Anxiety and p-ERK in the Anterior Cingulate Cortex in a Rat Model of Neuropathic Pain. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Vol 2015, 2015.

- SILVA, J.C.; SARAIVA, S.R.G.L.; JÚNIOR, R.G.O.; ALMEIDA, J.R.G. Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products: a review. **Revista Brasileira de Farmácia**, Vol 94(1), 2013.
- SOH, K.S. Bonghan Circulatory System as an Extension of Acupuncture Meridians. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, 2009.
- SPADACIO, C.; BARROS, N.F. Use of complementary and alternative medicine by cancer patients: systematic review. **Revista Saúde Pública**, Vol 42(1), 2008.
- STUCKY, C. L.; GOLD, M. S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. **PNAS**, Vol 98(21), 2001.
- TIAN, T.; SUN, Y.; WU, H.; PEI, J.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, L.; LI, B.; WANG, L.; SHI, J.; HU, J.; FAN, C. Acupuncture promotes mTOR-independent autophagic clearance of aggregation-prone proteins in mouse brain. **Scientific Reports**, 2016.
- TEIXEIRA, M. J.; PIMENTA, C. A. M. Dor: Conceitos Gerais. Ed Limay, São Paulo, 1994.
- TOBALDINI, G.; AISENGART, B.; LIMA, M.M.S.; TAMBELI, C.H.; FISCHER, L. Ascending Nociceptive Control Contributes to the Antinociceptive Effect of Acupuncture in a Rat Model of Acute Pain. **The Journal of Pain**, Vol 15, No 4, 2014.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitator? **Brain Res**, Vol 46, 2004.
- VECTORE, C. Psychology and acupuncture: The first approaches. **Psicologia, Ciência e Profissão**, Vol 25(2), 2005.

WAGNER, C. A case of trephining for general paresis. **American Journal of Insanity**, Vol 47, 1890.

WOO, C.; SCHMIDT, L.; KRISHNAN, A.; JEPMA, M.; ROY, M.; LINDQUIST, M.A.; ATLAS, L.Y.; WAGER, T.D. Quantifying cerebral contributions to pain beyond nociception. **Nature Communications**, 2017.

YOON, S. ROH, D.; KWON, Y.; KIM, H.; SEO, H.; HAN, H.; LEE, H.; BEITZ, A.J.; LEE, J. Acupoint Stimulation With Diluted Bee Venom (Apipuncture) Potentiates the Analgesic effect of Intrathecal Clonidine in the Rodent Formalin Test and in a Neuropathic Pain Model. **The Journal of Pain**, Vol 10, No 3, 2009.

ZHAO, Z. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in Neurobiology**, Vol 85, 2008.



Brasília, 09 de agosto de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA ACUPUNTURA MANUAL À ADMINISTRAÇÃO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS", Protocolo n.º 81/2017, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (104 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 22/8/2017 a 1º/12/2018.



Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.