

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MONOGRAFIA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA ANALGESIA COM ACUPUNTURA PELA  
ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA C-Fos:  
ESTUDO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR AGUDA EM RATOS

ANDRÉ TEVES AQUINO GONÇALVES DE FREITAS

BOTUCATU – SP  
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MONOGRAFIA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA ANALGESIA COM ACUPUNTURA PELA  
ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA C-Fos:  
ESTUDO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR AGUDA EM RATOS

ANDRÉ TEVES AQUINO GONÇALVES DE FREITAS

Projeto de Monografia a ser  
apresentado ao Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista –  
UNESP, desenvolvido sob a  
orientação do Prof. Dr. Julio De  
Faveri.

BOTUCATU – SP  
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Freitas, André Teves Aquino Gonçalves.

Avaliação da eficácia da analgesia com acupuntura pela análise imuno-histoquímica da expressão de proteína C-Fos: estudo em modelo experimental de dor aguda em ratos / André Teves Aquino Gonçalves de Freitas. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Julio De Faveri

Coorientador: Maria Doris Bedoya Henao

Capes: 40105008

1. Analgesia. 2. Dor – Tratamento. 3. Acupuntura. 4. Proteínas. 5. Rato – Estudos experimentais. 6. Imunohistoquímica.

Palavras-chave: Acupuntura; Analgesia; C-Fos; Dor.

BOTUCATU – SP  
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROF. DR. JULIO DE FAVERI  
PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA DORIS BEDOYA HENAO  
PROF. DR. SERGIO PEREIRA

Projeto de Monografia a ser  
apresentado ao Instituto de  
Biociências de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista –  
UNESP, para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP  
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia aos meus pais e irmãs, por me permitirem crescer e descobrir minha vida profissional longe de casa, por me apoiarem a cada decisão e serem os líderes da maior torcida que alguém pode ter na vida.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à minha orientadora, professora, mestre, Maria Doris Bedoya Henao, por acreditar no meu trabalho, me abrir tantas portas, ser sempre tão paciente e companheira. Agradeço de coração por confiar a mim um dos trabalhos mais importantes de sua carreira.

Ao professor Julio De Faveri por ceder seu laboratório, me aceitar como orientado e me guiar por este trabalho.

Ao meu supervisor, professor e amigo, Sergio Pereira, por estar sempre presente e disposto a me ajudar, sendo meu porto seguro durante todo este trabalho.

Á todos os meus amigos, que me apoiaram durante esses quatro anos de curso, me ajudando a definir caminhos, traçar metas, sonhar cada vez mais alto, tendo ao meu lado as pessoas mais especiais pra me manter no eixo.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Dor</i> .....	3
2.2 <i>Acupuntura e Dor</i> .....	4
2.3 <i>Anelgesia preemptiva</i> .....	4
2.4 <i>Acupuntura</i> .....	6
2.4.1. <i>Mecanismo de ação da acupuntura</i> .....	8
2.5 <i>Dor e eletroacupuntura</i> .....	10
2.5.1 <i>Mecanismos de ação da eletroacupuntura</i> .....	11
2.6 <i>Analgesia e pontos de acupuntura</i> .....	13
2.7 <i>Acupuntura e opióides</i> .....	13
2.8 <i>Monoaminas e acupuntura</i> .....	15
2.9 <i>Os proto-oncogenes</i> .....	17
2.10 <i>Mecanismos de ação no envolvimento do sistema nervoso autônomo</i> .....	18
2.11 <i>Formas de reduzir o c-Fos induzida pelo estresse</i> .....	18
2.12 <i>C-FOS e acupuntura</i> .....	20
<b>3. MATERIAIS E METODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 <i>Os Animais</i> .....	21
3.2 <i>Material</i> .....	21
3.3 <i>Delinemeto experimental</i> .....	23
3.4. <i>Eletroacupuntura (EA)</i> .....	24
3.5 <i>Procedimento anestésico</i> .....	25
3.6 <i>Estímulo algico ou doloroso provocado por cirurgia na planta do pé esquerdo</i> .....	25
3.7 <i>Imunohistoquímica para c-Fos</i> .....	26
3.8 <i>Contagem de células</i> .....	28
3.9 <i>Análise Estatística</i> .....	29
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>

<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>44</b>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Lista de Tabelas

Tabela 1 Contagem de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$ - Grupo Controle.....	30
Tabela 2 Contagem de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$ - Grupo de Acupuntura Manual Pré-Operatório .....	30
Tabela 3 Contagem de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$ - Grupo de Eletroacupuntura Pré-Operatório .....	30
Tabela 4 Contagem de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$ - Grupo de Acupuntura Manual Pós-Operatório .....	31
Tabela 5 Contagem de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$ - Grupo de Eletroacupuntura Pós-Operatório .....	31
Tabela 6 Análise de variância da contagem do número de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$ no cérebro.....	31
Tabela 7 Média e desvio padrão da contagem do número de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$ no cérebro.....	31
Tabela 8 Análise comparativa entre os grupos pré e pós-operatório de Acupuntura Manual .....	32
Tabela 9 Análise comparativa entre os grupos pré e pós-operatório de Eletroacupuntura .....	32
Tabela 10 Análise comparativa entre os diferentes tratamentos dentro do grupo pré-operatório.....	32
Tabela 11 Análise comparativa entre os diferentes tratamentos dentro do grupo pós-operatório .....	32
Tabela 12 Análise comparativa entre o grupo Controle e os grupos de tratamento .....	32

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÍENCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Lista de anexos

Anexo 1 Comitê de ética .....	44
Anexo 2 Protocolo de perfusão .....	45
Anexo 3 Protocolo de imuno-histoquímica .....	47

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

RESUMO

O comportamento e a experiência da dor são caracterizados pelo estado de alerta e ansiedade e desaparecem assim que se inicia o processo de cura. Baseado nesta área, o presente estudo objetivou quantificar a expressão de c-fos em segmentos do cérebro de ratos *em modelo experimental previamente* estabelecido, no qual estabelece-se estímulo cirúrgico na superfície plantar da pata posterior do animal (analgésia?), utilizando anestesia com thiopental de sódio e práticas de acupuntura pré e pós operatórias. Os animais foram estimulados com injeções intraperitoneais de solução (ClNa) 0.2% (2ml), e divididos em três grupos: controle, pré-operatório e pós-operatório. Cada um dos tratamentos foi subdividido em acupuntura manual (AM) e eletroacupuntura (EA). Os animais foram distribuídos de forma aleatória em cada grupo. A expressão de c-fos foi quantificada utilizando imunohistoquímica para todas as situações. Os resultados mostraram uma grande eficácia de todos os tratamentos em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), corroborando assim dados da literatura sobre assim o potencial analgésico da acupuntura. Não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, embora tenha sido observado tendência da EA ser mais eficiente do que a AM.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ABSTRACT

The behavior and experience of pain are characterized by alertness and anxiety, which disappear soon after the healing process begins. Based on this area, the present study aimed to quantify the expression of c-fos in segments of the brain of rats after surgical stimulation in one rear hind paw (analgesia), using anesthesia with sodium thiopental and practices of acupuncture pre and post operative. The animals were stimulated with intraperitoneal injections of solution (NaCl) 0.2% (2ml), and divided into three groups, control, preoperative and postoperative. Each treatment was divided in manual acupuncture (AM) and electroacupuncture (EA). The animals were randomly distributed in each group.

The c-fos expression was quantitated using immunohistochemistry for all situations. The results showed a great efficiency of all treatment compared to the control group ( $p < 0.001$ ), thus reinforcing data in the literature on the potential of acupuncture analgesia. There were no statistical differences among the different treatments, although there was a trend of EA being more efficient than AM.

## 1. INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita nestes termos. É uma manifestação subjetiva e complexa que envolve aspectos físicos, psíquicos e culturais. Dentre outras classificações, pode ser aguda e crônica, com mecanismos distintos. (HENAIO, 2005)

O comportamento e a experiência consciente da dor, caracterizados pelo alerta e pela ansiedade, desaparece assim que a cura se processa. Os estados crônicos de dor são mais deletérios ao indivíduo e frequentemente provocam profunda depressão psíquica, sendo errado sua consideração não como simples continuação da dor aguda, pois se trata de um quadro patológico, pois, não tem utilidade biológica evidente. Embora utilizem o mesmo sistema ativado pela dor aguda, a dor crônica tem característica desorganizadora, de modo que para a sobrevivência, existem importantes valores nos processos fisiológicos que possam limitar a percepção dolorosa. (MENEZES, 2002)

Segundo Henao (2005), o adequado controle da dor, tem assumido grande magnitude, constituindo-se em alvo de atenção mundial aos que se preocupam com a qualidade da assistência ao paciente e, num sentido mais amplo, com a preservação dos direitos humanos. Neste sentido, têm sido publicadas normas e sugestões de condutas a serem seguidas pelos profissionais de saúde no que tange ao adequado controle das dores agudas e crônicas.

O ato cirúrgico é sucedido, invariavelmente, pelo estabelecimento de um quadro doloroso, variável em intensidade, magnitude e no modo como é referido ou identificado. A dor pós operatória é um tipo de dor aguda que tem etiologia bem definida, a saber, o ato operatório, supõe-se portanto que seja autolimitada no tempo, devendo reduzir ou cessar com a progressiva cicatrização da ferida cirúrgica. Por tratar-se de um tipo de dor na maioria das vezes previsível, deveria ser potencialmente evitável, sendo necessário, para tanto, que se antecipasse estas possibilidades e conduzissem estratégias, farmacológicas ou não, durante o período pré-operatório, intra-operatório e pós-operatório.

Dentro deste contexto, a dor foi elevada à categoria do quinto sinal vital, devendo ser avaliada sistematicamente e registrada desde a admissão até a alta hospitalar do paciente, conjuntamente com a frequência cardíaca, pressão arterial, frequência respiratória e temperatura corpórea. A avaliação da dor é, portanto, parte integrante do adequado tratamento do paciente, devendo ser realizada de modo sistemático e rotineiro pelos profissionais de saúde (ANDRADE, 2003). Para o controle dessa dor, deve ser utilizada uma abordagem multimodal, que inclua técnicas farmacológicas e não-farmacológicas, promovendo o relaxamento e a redução do estímulo doloroso pós-operatório. (CHAVES, 2003; CASTRO et al., 1999)

Dentre as técnicas não farmacológicas, de reconhecidos resultados, encontram-se a acupuntura e a estimulação elétrica transcutânea, que ativam o sistema sensitivo-discriminativo estimulando o sistema supressor de dor. (CASTRO, 1999)

Uma das dificuldades para a aceitação da acupuntura como técnica eficaz de tratamento de dor, e no caso em especial, a dor pós-operatória, está em se comprovar cientificamente seu efeito. A identificação da expressão da proteína c-fos na medula espinal e no sistema nervoso central (SNC) de animais em estados álgicos pela imuno-histoquímica, proporcionou um método seguro de avaliação da eficácia da acupuntura, seja em momento pré e/ou pós-operatório. O fundamento de sua utilização é que a aferência dolorosa excessiva pode repercutir sobre o genoma celular, acarretando importantes alterações da transcrição gênica e da síntese protéica. Os genes que podem ter a sua expressão rapidamente alterada pela atividade neuronal são conhecidos como genes de expressão precoce ou imediata. Os eventos estruturais que ocorrem no sistema nervoso em decorrência de um estímulo álgico relacionam-se, em grande parte, à ativação destes genes, que são conhecidos como proto-oncogenes. Estes proto-oncogenes foram descritos e nomeados e dentre eles encontram-se o c-fos e o c- jun (MEDEIROS, 2001).

Portanto, pode-se quantificar experimentalmente a expressão c-fos causada pela dor aguda e o comportamento desta proteína após a realização de acupuntura no período pré e pós-operatório. Deste modo, o objetivo deste trabalho é verificar, através da quantificação da expressão de proteína c-fos, a ação analgésica da acupuntura manual e da eletroacupuntura pré e pós intervenção cirúrgica.

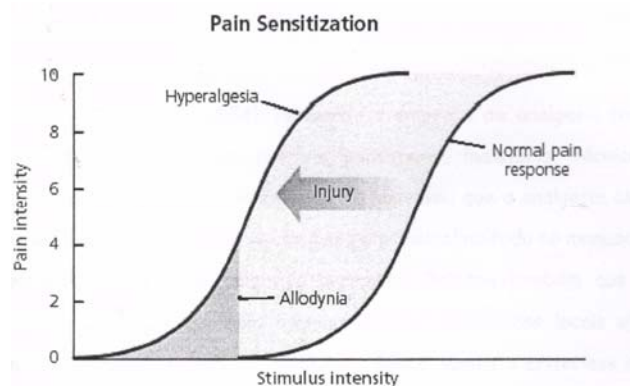
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Dor

A dor tem sido chamada de epidemia silenciosa dos dias atuais. Ela representa um desafio aos sistemas de saúde e estima-se que mais de \$ 90 bilhões de dólares são gastos anualmente em cuidados de saúde diretos e indiretos para minorar a dor. O custo da dor em termos de sofrimento humano e miséria é igualmente enorme. Dores prolongadas drenam a energia vital do indivíduo, prejudicando sua qualidade de vida. A vida com dor normalmente se deteriora em uma situação de obcecação e procura obstinada para o alívio. Assim, como forma de atuar nessa “epidemia silenciosa”, várias técnicas de combate e alívio da dor tem surgido (WALL & JONES, 1991).

Até recentemente (CASTRO et. al, 1999) a dor era tratada clinicamente com agentes antiinflamatórios não esteróides e opiáceos sem se ter qualquer noção a respeito dos mecanismos de ação destes dois grupos de drogas. A fisioterapia empregava os meios de consolidar seu papel relevante no tratamento da dor em todo o mundo, através de várias técnicas como ultrassom, e congelamento. A anestesiologia, empregava os bloqueios nervosos temporários com os anestésicos locais, e outras substâncias. A cirurgia, entre várias outras armas de que dispunha, empregava neurotomias e rizotomias que, muitas vezes, traziam também, como resultados paralelos, complicações altamente funestas, representadas pela gênese de novas síndromes dolorosas, freqüentemente muito mais graves das que estavam sendo objeto deste tratamento.

Imediatamente a sensação desagradável que pode advir da dor, experiências dolorosas podem se imprimir de forma indelével no sistema nervoso (Figura 1) amplificando a resposta a estímulos dolorosos subseqüentes (hiperalgsia) e proporcionar situações em que estímulos não dolorosos sejam experimentados como dor (GOTTSCHALK & SMITH, 2001).



**Figura 1.** (Adaptado de GOTTSCHALK & SMITH, 2001.) O estímulo doloroso pode sensibilizar a resposta do sistema nervoso a um estímulo subsequente.

A dor acompanha praticamente todos os procedimentos cirúrgicos, mas é tratada inadequadamente em mais da metade dos pacientes (CARR et al., 1992).

A busca pelo controle da dor, de forma segura, econômica e livre de efeitos colaterais cresce a todo instante, visando o adequado tratamento ao paciente e uma rápida recuperação.

## 2.2 Acupuntura e Dor

Wall & Melzack (1965) realizaram pesquisas científicas, na década de 60, que culminaram com a “Teoria do Controle do Portão”, confirmando-se finalmente a existência de um sistema de modulação dos impulsos nociceptivos ao nível do corno posterior da medula espinhal. Estabeleceu-se definitivamente que, os nervos conduzem, por intermédio das fibras A-beta, impulsos modulares importantes ao sistema nervoso central. Assim, começou-se a investigar o papel da “Teoria do Portão” na gênese da analgesia pela acupuntura.

Atualmente, uma parte considerável da neurofisiopatologia do processo algico é conhecida, e proporciona uma base consistente para a sua compreensão e para novas propostas terapêuticas farmacológicas e diversas técnicas não farmacológicas.

## 2.3 Anelgesia preemptiva

Dentre os estudos sobre dor ainda inconclusivos encontra-se o conceito de analgesia preemptiva, que, de acordo com a conceituação clássica (MC QUAY, 1992),



prevê a administração de agentes anestésicos e fármacos analgésicos previamente a incisão cirúrgica. CRILE (1913), embasado em observações clínicas, propôs o emprego de bloqueios anestésicos regionais, em associação à anestesia geral, com objetivo de reduzir a nocicepção ocorrida durante o período intra-operatório e a formação de “cicatrizes” dolorosas ocasionadas por alterações no sistema nervoso central durante a cirurgia, sendo o primeiro a propor que “a lesão que ocasiona a dor está no cérebro”, e não apenas na ferida cirúrgica. WOOLF (1983) fez ressurgir este conceito com uma série de estudos em animais, observando haver evidências da existência de um componente central da dor que decorre de lesão tecidual periférica. O primeiro estudo sobre analgesia preemptiva foi publicado por Woolf e Wall (1986). Esses autores empregaram no rato, um modelo de hiperexcitabilidade produzido por estímulo elétrico de fibras C, registrando a resposta de alguns neurônios e constatando que a qualidade de morfina administrada por via sistêmica necessária para prevenir a hiperexcitabilidade foi inferior à demanda para se reverter este estado após o seu estabelecimento. Seguiram diversos trabalhos experimentais que adicionaram evidências expressivas ao fato de que algumas técnicas analgésicas, quando aplicadas previamente à agressão tecidual, mostravam-se mais efetivas em reduzir o fenômeno da sensibilização central, comparativamente à aplicação posteriormente à lesão (CODERRE et al., 1993).

Desta maneira, podemos dizer que a analgesia preemptiva é um conceito clínico em desenvolvimento, que significa a introdução de um procedimento analgésico antes do início do estímulo doloroso, com o objetivo de prevenir a sensibilização do sistema nervoso aos estímulos subsequentes que poderiam amplificar a dor. Os procedimentos cirúrgicos são os mais interessantes de serem estudados com vista à analgesia preemptiva, devido ao fato de que a hora certa do início do estímulo doloroso pode ser conhecida. Dessa forma, as estratégias de analgesia preemptiva se baseiam na intervenção em um ou mais sítios ao longo da via de condução da dor, tais como infiltração e bloqueios com anestésicos locais, bloqueio epidural e subaracnóide, uso de analgésicos intravenosos e drogas antiinflamatórias (TVERSKOY et al., 1990; BUGEDO et al., 1990; KEHLET & DAHL, 1993; AINDA et al., 1999). Quando doses adequadas de drogas analgésicas (tais como opióides intravenosos, infiltração anestésica local, bloqueio nervoso, bloqueio subaracnóide e bloqueio epidural) são administradas antes da cirurgia a pacientes selecionados, os benefícios podem ser observados até um ano após o procedimento cirúrgico.

Dessa forma, o regime analgésico preemptivo mais eficiente é composto por aqueles capazes de limitar a sensibilização do sistema nervoso durante todo o período cirúrgico (GOTTSCHALK & SMITH, 2001).

Os procedimentos cirúrgicos propiciam o ambiente de estudo ideal para que se obtenha um cenário no qual são observados tanto estímulos intra-operatórios dolorosos (incisão) neurais periféricos (primário/visceral aferente) quanto centrais (espinhal). Alguns estudos têm demonstrado que a amputação no homem e em ratos, utilizando o modelo animal de dor fantasma, com anestesia regional antes da cirurgia pode reduzir a dor pós-operatória e o consumo de analgésico mesmo após a duração da ação/efeito dos agentes administrados de forma pré-operatória (KATZ J. & MELZACK, 1990; KATZ et al., 1991).

Os resultados desses trabalhos indicam que a administração preemptiva de opióides e ou anestésicos locais reduzem a dor pós-operatória, a hiperalgesia e o consumo de morfina além do período de ação dos agentes preemptivos empregados. Estes resultados sustentam a idéia de que as incisões cirúrgicas induzem um estado prolongado de sensibilização neural, isto é, uma memória dolorosa somato-sensorial, que irá contribuir para o aumento da dor após a cirurgia.

#### 2.4 Acupuntura

Sussamn (1973), descreveu a acupuntura como uma forma terapêutica oriental de profilaxia e tratamento das doenças, dolorosas ou não. Teve origem no extremo oriente mais precisamente na China, há aproximadamente 5.000 anos. Daquele país disseminou-se pela Ásia, sendo largamente empregada no Japão, Coréia, Vietnã, Sirilanka e outros países do extremo oriente. Apesar de ser tão antiga, a acupuntura era totalmente desconhecida no mundo ocidental até a segunda metade do século XVII.

Niboyet Jeh et al. (1973), descreveram que em 1671 o Rei Luis XVI da França incentivou a pesquisa com uma equipe de observação científica, composta de vários missionários jesuítas, entre os quais se encontrava um medico: o Dr. Harveiu. Durante sua permanencia na China, tiveram numerosas oportunidades de presenciar, com grande surpresa, o emprego exclusivo de agulhas sem medicamentos em diversas partes do corpo humano, desse modo, os chineses curavam rapidamente vários tipos de dor aguda e crônica, bem como vários outros tipos de doenças. Essa técnica era

denominada pelos chineses de Tai Chien Tseng (espetar com agulhas de ouro), ou Chen Chin (Chen - agulha, Chin - fogo – Moxabustão), intimamente associado as técnicas de acupuntura pelos tradicionalistas, consistia no uso de moxa que reúne pequenas porções de partes secas de plantas, *Artemisia vulgaris*. Até então não existia nas línguas ocidentais, uma palavra ou um termo para aquele tipo de tratamento presenciado na China. Através desta missão científica francesa criaram então o termo acupuntura, formado por duas palavras latinas: acus - agulha + puntura - punção, perfuração (pongere [lat] = perfurar, furar). Voltando a França, o Dr Harvieu, escreveu e publicou o primeiro livro citado pelos autores franceses sobre o tema, denominado “Segredos sobre a Medicina Chinesa”.

Imbeloni (1984) revisando o emprego de analgesia pós-operatória com uso de drogas por via parenteral, inalatória, técnicas regionais, acupuntura e narcóticos extradural observou que a analgesia com narcóticos por via parenteral permanece como o principal método no manuseio da dor pós-operatória da maioria dos pacientes. Relatou também que a analgesia extradural e bloqueio intercostal com anestésicos locais, não ofereciam uma completa solução do problema, mas o aumento criterioso de seu emprego, poderia torná-los ainda mais benéficos. Por fim, concluiu que a utilização de narcóticos por via extradural, eletroestimulação e acupuntura pareciam promissores no controle da dor pós-operatória, em 1984, quando nem ao menos se cogitavam o uso da analgesia preemptiva e suas qualidades.

Diversos trabalhos têm evidenciado o efeito da acupuntura no tratamento da dor crônica, alguns desses estudos, feitos com pacientes humanos evidenciaram efeitos terapêuticos por até 3 anos após o primeiro tratamento, tendo sido identificado que 42% dos pacientes relataram ter tido uma melhora imediata dos sintomas dolorosos logo após a acupuntura (CARLSSON & SJOLUND, 1994), sendo que os melhores resultados foram conseguidos com o tratamento das dores do tipo nociceptiva. Embora diversos métodos de estímulo possam ser utilizados para indução de analgesia com acupuntura, métodos simples como a digitopuntura ou acupressão podem também induzir a diminuição do estresse e dos BIS (Índice bispectral), proporcionando um relaxamento e uma sensação de bem estar nos indivíduos submetidos à mesma (FASSOULAKI et al., 2003). Outros estudos similares também evidenciaram com o uso do BIS e de eletroencefalografia uma similaridade entre a anestesia geral e a sedação induzida pela acupuntura (LITSCHER, 2004).

#### 2.4.1. Mecanismo de ação da acupuntura

SAHAKU-IN, AJ (1995) a agressão à pele ativa os receptores sensoriais das fibras aferentes finas A delta e C.

As fibras nervosas são classificadas por seu diâmetro e de acordo com sua origem cutânea ou muscular. As fibras grossas e mielinizadas A delta (pele) e as tipo II (músculo) transportam o impulso tátil e proprioceptivo, respectivamente. As fibras A delta (pele) ou as do tipo II e III (músculo) são mais finas e também mielizadas, transportando o impulso algico. As fibras C (pele) e tipo IV (músculo) são as mais finas e amielinizadas e também transportam o estímulo algico. As do tipo II, III, IV e C também transportam outras mensagens não algicas.

As fibras aferentes entram no SNC, pelo corno dorsal da medula, fazem sinapse, cruzam a linha média (maioria) e daí ascendem pelo trato espinotalâmico (TET) até o tálamo, onde fazem sinapse com o terceiro neurônio, o qual transmite para o córtex ativando o quarto neurônio.

Uma agulha inserida num ponto de acupuntura gera estímulos que atuam sobre os receptores sensoriais localizados nas terminações nervosas das fibras A-beta, A-delta e C da pele, e nos músculos (fibras I, II, III e IV).

Acredita-se que neurônios tipo II sejam responsáveis pela sensação de dormência do “deqi” e que os do tipo III sejam pela sensação de peso. Se houver dolorimento, o que é raro, este será transmitido pelos neurônios do tipo IV, não mielinizados. Se a inervação cutânea é ativada, então as fibras A delta são as fibras aferentes da condução.

A célula 5 faz sinapse na medula com a célula 6 do tronco espinotalâmico antero-lateral cujas fibras seguem para três centros: medula espinhal, o mesencéfalo e o complexo hipófise-hipotálamo.

**1<sup>o</sup> Centro: Medula.** Na medula, a célula 6 envia um ramo curto para a célula 7 que é endorfínica. Essa célula libera ou encefalina ou dimorfina. As endorfinas da medula espinhal provocam inibição pré sináptica da célula I, bloqueando a transmissão da sensação de dor de I para 2 e também uma inibição pós sináptica da célula 7 sobre a célula 2. A célula 7 pode ser ativada por atividade descendente da

célula II via trato dorso lateral, como foi anteriormente explicado pelo sistema de analgesia onde o núcleo magno da rafe, uma vez estimulado, por descendência faz bloqueio da dor ao nível medular. Esta inibição pré sináptica (célula 7 para célula I) provavelmente resulta numa redução da liberação do transmissor álgico. Não se sabe qual é este transmissor, podendo ser o glutamato, a substância P ou o ATP (adenosina trifosfato). As evidências não são conclusivas, contudo sabe-se que as endorfinas reduzem a substância P .

Os peptídeos presentes nos terminais da célula I são: colecistocinina (CCK), a somatostatina, a neurotensina, a bombesina, o peptídeo gene-relacionado à colcistonina, a angiotensina, a substância P e o peptídeo intestinal vasoativo, a colecistocinina foi a única dessas substâncias cujo papel na Acupuntura foi demonstrado, atuando sempre como a naloxona para bloquear a analgesia mediada pela endorfina.

**2<sup>o</sup> Centro: Mesencéfalo.** A célula 6 também envia projeções para o mesencéfalo ascendendo na medula via trato antero lateral. Ao nível do mesencéfalo, ele excita células da substância cinzenta periaquedutal (periaqueductal Grey -PAG), células 8 e 9 que liberam encefalinas para desinibir a célula 10. Essa, por sua vez, estando excitada , ativa o núcleo magno da rafe (célula II ), que envia impulsos pelo trato dorsolateral para liberar monoaminas-serotonina e nor-epinefrina, em sua sinapse com as células da medula espinhal. A célula 2 sofre inibição pós-sináptica e a célula 7 é excitada, que por sua vez vai reforçar e realizar novamente uma inibição pré-sináptica na célula I. Qualquer uma dessas duas vias monoamínicas podem bloquear o impulso álgico. Além desse mecanismo de bloqueio da dor pelo núcleo magno da rafe, o qual libera serotonina na medula, é possível que os núcleos adjacentes paragigantocelulares reticulares liberem nocepinefrina na medula, via trato dorso lateral. A nocepinefrina se liga a um receptor alfa, na medula, para bloquear a transmissão da dor. Alguns pesquisadores acreditam que a serotonina e a nocepinefrina atuem sinergicamente neste caso. Existem evidência de que o peptídeo neurotensina possa ser o transmissor excitatório entre as células 10 e 11. A relação entre estes efeitos monoamínicos descendentes e analgesia acupuntural ainda não é clara. O papel do sistema monoamínico na analgesia acupuntural necessita ser melhor pesquisado.

**3<sup>o</sup> Centro: Hipotálamo Hipofisário.** A célula 6 envia projeções para

o eixo hipotálamo hipofisário. Compreende-se menos ainda a ação da célula 6 sobre as células 12 e 13 – complexo hipotálamo-hipofisário. É possível que a célula 12 localizada no núcleo arcuatus do hipotálamo ative a rafe, via beta-endorfina, enquanto que a célula 13, também, no hipotálamo, provoque a liberação de beta-endorfina. Há uma certa concordância quanto:

- à elevação da beta endorfina no LCR e no sangue, provocada pela analgesia acupuntural.
- ao fato de as lesões hipofisárias suprimirem o efeito analgésico da Acupuntura.

Não se tem conclusão quanto á maneira em que a beta-endorfina hipofisária alcança o cérebro para provocar analgesia. A quantidade que alcança a circulação sanguínea é pequena para atravessar a barreira hemato-encefálica em quantidade suficiente para provocar analgesia.

O sistema porta hipofisário pode transportar hormônios em sentido retrógrado diretamente para o encéfalo.

Ambas provêm de um precursor comum: a beta hipotropina. O ACTH alcança o córtex ad-renal, onde o cortisol é liberado para a circulação sangüínea, o que explica o efeito antiinflamatório da Acupuntura na artrite e seu efeito broncodilatador na asma. A quantidade de cortisol liberada na Acupuntura é discreta e finamente regulada, assim evitando os efeitos colaterais de corticoterapia exógena.

Concluindo sobre esse terceiro centro hipotálamo hipofisário, a hipófise libera beta-endorfina no sangue e no líquido cefalorraquidiano para provocar analgesia à distância (por exemplo, através do mesencéfalo).

O hipotálamo envia longos axônios até o mesencéfalo e, via beta-endorfina, ativa o sistema analgésico descendente.

## 2.5 Dor e eletroacupuntura

Sahaku-In (1995), refere que a eletroacupuntura de baixa frequência e alta intensidade ativa os três centros, empregando todos os mecanismos endorfinicos e

sendo antagonizada pela naloxona.

A eletroacupuntura de alta frequência e baixa intensidade ativa dois centros: a medula e o mesencéfalo, desviando-se das sinapses endorfinicas. Essa analgesia não é bloqueada pela naloxona, mas é sensível à ação das monoaminas. Além disso tem um efeito segmentar forte que não é antagonizado pela naloxona. Esse efeito segmentar é explicado pela eliminação de transmissores não endorfinicos pela célula 7, como por exemplo o ácido aminogamamolecutírico (gamma aminobutyric – GABA).

### 2.5.1 Mecanismos de ação da eletroacupuntura

A idéia de aplicar uma corrente elétrica sobre as agulhas colocadas nos pontos cutâneos foi emitida e praticada em 1816 pelo Dr SARLANDIERE, antigo médico da Armada Napoleônica, que deu a essa técnica o nome de Eletroacupuntura. A corrente elétrica empregada provinha de uma máquina eletrostática manual do tipo RAMSDEN, modificada por VAN MARUM. O doente, previamente acupunturizado, era isolado eletricamente e as agulhas de Acupuntura, com as cabeças em anel, ficavam em comunicação com um dos condutores da máquina por fio de ouro. Quando a máquina era colocada em movimento, deixava o doente sob tensão elétrica.

A objeção que se faz até hoje à eletroacupuntura é que, ainda que o paciente sinta um choque a cada descarga elétrica mais ou menos forte, ela se dá em direção à terra, não penetrando no corpo do paciente. A ação elétrica limita-se à superfície da epiderme, não atingindo as extremidades distais das agulhas e conseqüentemente sendo incapaz de ter uma ação em profundidade.

Existem estudos da eletroacupuntura falando da frequência de 4 Hz, que induziu expressão mais intensa em relação aos animais não estimulados, nos núcleos parabraquial e cuneiforme, na PAG, na habênula lateral, núcleo arqueado, núcleo ventromedial do hipotálamo e no núcleo dorsal da rafe, enquanto que a frequência de 100 Hz induziu expressão mais intensa, que nos animais não estimulados, no núcleo pretectal, e no locus coeruleus. Os trabalhos de LEE & ANA BEITZ (1993) são referência no mapeamento das estruturas envolvidas na acupuntura.

Em animais acordados a estimulação pela EA nas frequências de 2 ou 100 Hz no ponto 36E desencadeia intensa indução de c-Fos em diversas áreas do SNC,

mostrando um padrão diferencial de expressão entre estas duas frequências (GUO et al., 1996a). A estimulação com frequência de 2 Hz na habênula, no núcleo paraventricular, dorsomedial, ventromedial e supramamilar do hipotálamo, nas partes medial e dorsal do núcleo pontino e o núcleo trato solitário apresentaram expressão mais intensa na frequência de 2Hz (GUO et al., 1996). Algumas regiões, reconhecidamente envolvidas nos efeitos analgésicos da acupuntura, como PAG e o núcleo da rafe não apresentaram diferenças entre as duas frequências. Estes autores utilizaram como controles animais apenas imobilizados (grupo naive) e animais estimulados com agulhas no ponto 36E sem eletroacupuntura (grupo acupuntura manual) e obtiveram uma expressão muito baixa ou ausente neste grupo (GUO et al., 1996). O trabalho não descreve qualquer habituação ou outro procedimento que pudesse atenuar a expressão de c-Fos, que seria esperada em decorrência da imobilização *per se*.

Pan & Castro Lopes (1994 e 1996) compararam a expressão de c-Fos induzida pela eletroacupuntura no ponto 36E com aquelas induzidas por imobilização e por estímulo nocivo. Neste trabalho, a estimulação nociceptiva e a eletroacupuntura induziram padrões semelhantes de expressão de c-Fos no hipotálamo e na hipófise.

Além deste grupo de pesquisa, muitos outros pesquisadores estudaram a expressão de c-Fos induzida pela acupuntura em diferentes regiões encefálicas: bulbo rostral (JI et al., 1992), área preoptica (WU et al., 1999) núcleo de rafe (HE et al., 1992; MA et al., 1992), tronco encefálico (DAÍ et al., 1992), ou sob diferentes condições experimentais: animais ovariectomizados (HU et al., 1993) e isquemia (YING e CHEN, 1994). Infelizmente estes trabalhos foram publicados em revistas de pouca circulação mundiais e apresentam problemas no desenho experimental.

Como já foi citada anteriormente, a necessidade da utilização de anestésicos ou de imobilização para a inserção e permanência das agulhas de acupuntura em animais de laboratório é um fator limitante no estudo da atividade encefálica induzida pela acupuntura. Tanto os anestésicos. (TAKASAMA et al., 1995; HAGIHIRA Et al., 1997) quanto a imobilização (CULLINAN et al., 1995) por si já induzem expressão de c-Fos. Também devemos considerar que os anestésicos não são geralmente utilizados nos tratamentos na acupuntura médica e veterinária, o que distanciaria ainda mais a condição experimental daquela presente nos tratamentos comumente utilizados na terapêutica.



## 2.6 Analgesia e pontos de acupuntura

Diversos pontos de acupuntura têm sido preconizados para analgesia através de técnicas de eletro estimulação, acupuntura manual, acupressão, etc. Em um estudo realizado por FANTI et al., 2003, no homem para verificar os efeitos sedativos da acupuntura no procedimento de colonoscopia, os mesmos utilizaram os seguintes pontos: E36 (estômago 36), IG4 (intestino grosso 4), BP6 (baço-pâncreas 6) e BP9 e o ponto auricular Shenmen, bilateralmente e estimulados com uma frequência de 100 Hz. Estes autores concluíram que a acupuntura pode diminuir a demanda de drogas sedativas durante a colonoscopia através da redução do desconforto e da ansiedade dos pacientes bem como reduzindo os efeitos colaterais da sedação farmacológica (midazolam 0,02 mg/kg I.V. 15 minutos antes do procedimento) administrada a todos os grupos (controle e acupuntura). Em um estudo para evidenciar os efeitos serotoninérgicos da analgesia pela acupuntura, CHANG et al., 2004, utilizando o ponto E36 e aplicando sobre o mesmo diversos tipos de frequências de eletro estimulação tais como 2, 10 e 100 Hz, observaram em todos os animais uma resposta analgésica, sendo que a 100 Hz puderam constatar um maior efeito serotonérgico. CHIU et al., 2003, estudando o efeito analgésico da acupuntura em ratos utilizou os pontos IG4 e E36 para observar os sinais no sistema nervoso central decorrentes dos estímulos periféricos realizados nesses acupontos.

## 2.7 Acupuntura e opióides

É bem conhecida a situação em que a estimulação de nervos periféricos nos músculos, os quais enviam mensagens ao cérebro para liberação de endorfinas (peptídeos semelhante a morfina no cérebro), causa o bloqueio de transmissão das mensagens dolorosas.

A relação sinérgica da analgesia preemptiva com o uso de drogas opiáceas vem sendo constatada em diversos trabalhos (VANNESS & GITTINS, 1994; CANDIDO et al., 2002), sendo a mesma mais eficiente em alguns casos que outras drogas de classes farmacológicas diferentes, tais como os anestésicos locais.

Dessa forma, por ser também a acupuntura dependente dos efeitos dos opióides internos para mediar sua ação analgésica e terapêutica, tais como a beta-endorfina (XIE et al., 2001), a mesma poderia se encaixar como uma das ferramentas

para proporcionar a uma analgesia preemptiva, se executada antes dos procedimentos dolorosos, entenda-se cirúrgicos. Até em sua forma mais grosseira os opióides tem sido utilizados como analgesia preemptiva, no caso a morfina pura administrada de forma subcutânea, com bons resultados em comparação com o grupo controle (MACHIDA et al., 2004).

Outras linhas de convergência entre a acupuntura, analgesia e os opióides endógenos são:

- o naloxone pode bloquear os efeitos analgésicos da acupuntura;
- seis antagonistas opióides podem bloquear a analgesia induzida pela acupuntura;
- anticorpos anti-endorfinas podem bloquear os efeitos analgésicos da acupuntura;
- a endorfina aumenta no fluido cérebro espinhal e entra no cérebro após a analgesia com acupuntura;
- presença de um efeito cruzado pela circulação extra corpórea entre animais quando da analgesia induzida pela acupuntura;
- a redução das endorfinas na região da hipófise bloqueia o efeito analgésico da acupuntura;
- há um aumento no RNA mensageiro de pró-enkefalina com a analgesia por acupuntura;
- a proteína gênica c-Fos aumenta nas áreas endorfinicas do cérebro;
- lesões da região periaquedutal cinzenta bloqueia os efeitos da analgesia por acupuntura.

(HAN et al., 1980; SUN et al., 1982; POMERANZ & NGUYEN, 1987; CHAKRABARTI et al., 1988; BRUNTON, 1996; ULETT et al., 1998).

As experiências que abriram o campo da analgesia por acupuntura à pesquisa científica foram as que empregaram os antagonistas opióides como naloxona e

naltrexona. A capacidade da naloxona de antagonizar essa analgesia foi confirmada pela maioria dos pesquisadores, no entanto alguns não o fizeram. É possível que a resposta resida no fato de que o antagonismo se manifesta mais intensamente quando a droga antagonista é administrada antes da inibição analgésica. Depois que o efeito já esteja instalado, não se consegue reverter o efeito analgésico da acupuntura. Deduz-se daí que a naloxona inicia o processo da analgesia mas não é responsável por sua manutenção.

É possível que esta incapacidade se deva a sua fraca afinidade pelos receptores Kappa, resultando numa dificuldade em reverter a analgesia acupuntural moderada pela morfina. Os outros dois receptores parecem ser mais importantes: um e delta receptores. A morfina e beta-endorfina estimulam receptores um, enquanto que a encefalina estimula o receptor tipo delta. A naloxona bloqueia apenas o receptor um, de forma eficiente. Assim, parece que a acupuntura de baixa frequência e a acupuntura manual devem liberar beta-endorfina e ter seus efeitos bloqueados pela naloxona, enquanto que a de alta frequência libera metaencefalina, não tendo seus efeitos bloqueados. Alguns autores discordam desses dados e afirmam que a estimulação de alta frequência atua através de mecanismos serotoninérgicos.

Outra explicação para esse fenômeno foi fornecida por Waltens e Maeyer, que sugeriu que as endorfinas subsequentes empregam outros neurotransmissores. Eles propuseram um efeito modulatório das endorfinas sobre sinapses que empregam outros neurotransmissores. Todos esses dados demonstram que a naloxona antagoniza a analgesia por acupuntura, sendo que os resultados negativos se devem à administração tardia dessa droga.

O emprego da naloxona como prova da hipótese do mecanismo endorfinico da acupuntura abriu campo para a analgesia por acupuntura e não deve ser considerado como única prova. Várias outras experiências confirmam a hipótese do mecanismo endorfinico da analgesia por acupuntura.

## 2.8 Monoaminas e acupuntura

Chang et al., 2004, mostraram que a serotonina apresenta um importante papel como neurotransmissor envolvido na produção da analgesia por

acupuntura e que o núcleo magno da rafe era um sítio importante na modulação da dor através da sensação de Acupuntura.

Segundo CHIU et al., evidências mostram que a serotonina modera alguns efeitos analgésicos da acupuntura, como a demonstração de sua presença no líquido quando da aplicação da mesma. A serotonina parece ter um papel mediador mais importante na eletroacupuntura de alta frequência do que na de baixa. A via inibitória descendente do impulso da dor que se inicia no núcleo magno da rafe e vai até o corno dorsal da medula possui dois neurônios, um serotoninérgico e outro encefalínico. A eletroacupuntura de alta frequência ativa essa via. Já a de baixa frequência e a acupuntura de estimulação manual podem atuar, pelo menos parcialmente, através da estimulação de uma via alternativa de inibição algica, que tem uma ligação importante com neurônios contendo beta-endorfina e localizados na substância cinzenta periaquedutal, no mesencéfalo.

O núcleo magno da rafe, no tronco encefálico, contém a maioria das células serotoninérgicas do encéfalo. A lesão dessas células, ou de seus axônios, no trato dorsolateral, impedirá a analgesia por acupuntura se a serotonina estiver envolvida. Foram observados mais precisamente que lesões nesse nível e do bulbo medial reduzem a analgesia por acupuntura.

O bloqueio da síntese de serotonina pela PCPA (poclorofenilatamina) bloqueia a analgesia por acupuntura em coelhos e camundongos, além de bloquear a analgesia por estimulação neural segmentar em ratos. O mesmo foi observado com o uso de cinaserina que bloqueia os receptores serotoninérgicos. Em todos esses testes de hipótese serotoninérgica para o mecanismo de ação da analgesia por acupuntura, as drogas foram usadas por via sistêmica. Ao realizar estudos com microinjeções locais observaram resultados que sugeriam uma maior importância das projeções da rafe que partem para o cérebro anterior (sistema serotoninérgico ascendente) do que o sistema serotoninérgico inibitório descendente, via trato dorso lateral.

Pesquisas a respeito das monoaminas têm enfatizado a importância do sinergismo entre serotonina e adrenalina no bloqueio da analgesia por Acupuntura. Os efeitos da via norepinefrina ascendente sobre a analgesia por Acupuntura são de

natureza inibitória e não excitatória.

Concluindo, podemos dizer que as monoaminas, serotoninas e norepinefrinas têm seu papel na analgesia por acupuntura. As projeções serotoninérgicas, que vão da rafe para centros mais altos podem fazer uma mediação da analgesia por acupuntura. Já as projeções descendentes para a medula espinhal (via trato dorsolateral) podem atuar em sinergismo com os efeitos norepinefrínicos descendentes para bloquear a transmissão do impulso algico ao nível medular.

As funções das monoaminas necessitam ser mais pesquisadas, principalmente esse possível sinergismo entre serotonina e noradrenalina.

## 2.9 Os proto-oncogenes

Em animais de laboratório, o mapeamento da atividade celular pode ser feito através da marcação da expressão de genes de resposta imediata (IEGs). Os genes de resposta imediata são genes conhecidos como proto-oncogenes, e possuem a característica de serem induzidos rapidamente e de maneira transitória, o que permite serem utilizados como marcadores da atividade neuronal.

Morgan e Curran (2000), descrevem a interação de ligantes extracelulares com seus receptores na membrana plasmática que desencadeiam um fluxo de informações no citoplasma através de numerosas vias de transdução do sinal. Historicamente, este fluxo de informações é sempre levado a alterações na função celular através de mudanças nas atividades das proteínas já presentes na célula.

Entretanto, hoje estas são cascatas de sinalização celular que não terminam no citoplasma, mas se estendem até o núcleo onde são capazes de produzir mudanças na expressão gênica. Este mecanismo permite que a célula se adapte a mudanças do meio extracelular através de trocas nos níveis ou nos padrões de expressão gênica.

Morgan (1991), define os oncogenes como qualquer elemento genético que pode causar transformação celular, e os proto-oncogenes são os genes normais das células de onde são derivados os oncogenes. Os oncogenes foram primeiramente descritos como elementos de transformação presente em alguns retrovírus. Desta forma, os oncogenes virais foram designados v-onc e seus homólogos

os proto-oncogenes da seguinte forma c-onc. Os proto-oncogenes podem ser ativados e se tornarem oncogenes através de muitos mecanismos utilizados pelos retrovírus como a mutação, o rearranjo ou a amplificação gênica. Neste caso, o prefixo c- não é utilizado, porque não existe um homólogo viral.

Muitos proto-oncogenes codificam proteínas que executam funções na via de transdução do sinal como fatores de crescimento extracelular, receptores de membranas, proteínas cinases de membrana ou citoplasmáticas e proteínas ligadas a guanosina trifosfato (GTP) e a fatores de transcrição. Desta forma, os proto-oncogenes podem ser convenientemente classificados de acordo com suas funções na via de transdução do sinal. Apesar destes proto-oncogenes de indução rápida, como o c-Fos, terem sido primariamente estudados no contexto da mitogênese e da transformação celular, existem evidências de que eles possuam poucas influências na proliferação celular (CURRAN E MORGAN, 1985; GREENBERG et al., 1985). De fato, eles podem ser ativados pela despolarização de neurônios (MORGAN E CURRAN, 1986), células que não fazem mitoses muito facilmente. Além disso, estes proto-oncogenes utilizam vias de transdução de sinal envolvidas em muitos processos biológicos e podem ser usados de forma ubíqua como segundos mensageiros convencionais (CURRAN E MORGAN, 1987; MORGAN E CURRAN, 1988).

## 2.10 Mecanismos de ação no envolvimento do sistema nervoso autônomo

Liao (1985) comprovou por estudos termográficos que, juntamente com o alívio da dor, há um grande aumento da temperatura tecidual ao nível da região dolorosa. Posteriormente, Liao & Ana (1994), realizaram estudos termográficos em pacientes portadores de síndromes dolorosas, antes e 15 minutos após uma sessão de acupuntura, comprovando, através da termografia pós-acupuntura, acentuada vasodilatação no local da dor. Podemos afirmar que essas descobertas indicam o sistema nervoso autônomo como envolvido nos mecanismos da analgésica acupuntura – fenômeno que está sendo atualmente objeto de estudos (MEDEIROS, M. A. 2001).

## 2.11 Formas de reduzir o c-Fos induzida pelo estresse

Algumas manipulações fisiológicas e farmacológicas podem alterar a expressão de c-Fos induzida pelo estresse. A repetição de um mesmo estímulo é capaz de reduzir a expressão de c-Fos que é normalmente induzida com uma apresentação

única desse mesmo estímulo (PAPA et al., 1993; MELIA et al., 1994). Esta redução tem sido sugerida como sendo um processo adaptativo, que permitiria a gênese de respostas maiores e qualitativamente distintas face apenas a estímulos novos.

A novidade é um potente indutor de c-Fos, por exemplo, a mera exposição de ratos a uma arena não conhecida induz atividade em diversas estruturas encefálicas, como a formação reticular, o núcleo caudado, putame, o hipocampo e o córtex sensorial (PAPA et al., 1993). A exposição diária à mesma arena se traduz em uma redução significativa dessa expressão induzida pela arena. O interessante é que a redução da expressão de c-Fos a um estímulo não interfere na indução causada por um estímulo diferente, como por exemplo a habituação a arena já conhecida não interfere com a expressão de c-Fos associada a um novo odor ou nova característica da arena. Este fenômeno de habituação à novidade, tem sido usado como uma estratégia visando permitir o estudo de diversos estímulos. Nos estudos com Fos, para reduzir ou eliminar os efeitos das novidades inespecíficas, os animais devem ser manipulados diariamente (ZHU E HEBERT, 1996; CAMPEAU et al., 1997; CANTERAS E GOTO, 1999). Esta estratégia faz com que os níveis de c-Fos dos animais manipulados retorne a níveis basais, semelhantes a animais não estimulados.

Da mesma forma que estímulos menos intensos, a imobilização repetida é capaz de reduzir a expressão de c-Fos em diversas estruturas encefálicas (MELIA et al., 1994). Assim como a resposta aguda de estresse, a habituação é específica para cada estressor e é particular de cada estrutura encefálica (PAPA et al., 1993). Desta forma, as imobilizações repetidas podem reduzir a expressão que pode ser induzida por outros estímulos diferentes constituindo assim, um instrumento para a avaliação da expressão de c-Fos induzida pela acupuntura em animais imobilizados.

Por outro lado, a utilização de drogas pode alterar a expressão de c-Fos. A dexametasona (um glicocorticoide sintético) pode inibir a expressão de RNA de c-Fos induzida pelo estresse de imobilização no núcleo paraventricular do hipotálamo (IMAKI et al., 1995a). A utilização de benzodiazepínicos produz efeitos opostos ao fator liberador de hormônios coriotróficos (CRF), podendo ativar diversas estruturas encefálicas. Além dos seus efeitos ansiolíticos, estas drogas podem suprimir a expressão do RNAm de CRF, no núcleo paraventricular do hipotálamo bem como suprimir a ativação do eixo HPA em resposta ao estresse (IMAKI et al., 1995b). O Diazepam, um

benzodiazepinico, é capaz de inibir a expressão de c-Fos induzida pelo estresse de imobilização no córtex cerebral e no hipocampo de ratos (BOZAS et al., 1997). Além disso, ativações neuronais induzidas por diferentes formas de estresse apresentam sensibilidades distintas à administração de ansiolíticos (BOZAS et al., 1997).

Outro grupo de substâncias que podem interferir na expressão de c-Fos induzida pelo estresse são os antidepressivos. A administração crônica de terapia eletroconvulsiva acarreta a redução na indução de RNAm de c-Fos pelo estresse de imobilização no córtex pré-frontal de ratos (MORINOBU et al., 1995). O mesmo ocorre com a administração crônica de drogas antidepressivas como a tranicipromina, imipramina, decipramina e sertralina. O antagonismo na indução da expressão de c-Fos pode ser usado para uma classificação funcional do antidepressivo (DUCAN et al., 1993; DUCAN et al., 1996). Desta forma, a avaliação do efeito de drogas ansiolíticas, bloqueadoras do eixo HPA, ou antidepressivas, poderia reduzir ou mesmo suprimir a participação do estresse na expressão de c-Fos induzida pela EA.

## 2.12 C-FOS e acupuntura

A imunohistoquímica para c-Fos têm sido utilizada no mapeamento das estruturas envolvidas nos efeitos da acupuntura. Lee & Beitz (1992) mostraram que a eletroacupuntura (EA) no ponto 36E reduz a expressão de c-Fos no corno dorsal de ratos induzida por estimulação nociva. Os mesmos autores, utilizando animais anestesiados com halotano, demonstraram que a EA no ponto 36E induz expressão de c-Fos mais intensa que a EA no não ponto, no corno dorsal do segmento L2 da medula espinhal, núcleo parabraquial medial, substância negra, núcleos pálido e dorsal da rafe, locus coeruleus, núcleo pretectal posterior e PAG. Além disso, a utilização de diferentes frequências de estimulação (4 ou 100Hz) induz padrões de expressão de c-Fos (LEE & BEITZ, 1993).

## 3. MATERIAIS E METODOS

O treinamento para perfusão e cirurgia foram realizados pela orientadora do projeto no Laboratório Experimental da Disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da UNESP Campus de Botucatu - SP.



O Projeto piloto e a coleta de dados desta pesquisa foram feitos em parceria com o Departamento de Neurofisiologia da Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

Os experimentos foram realizados dentro dos preceitos éticos que regem a experimentação com o uso de animais (“COMITTEE FOR RESEARCH AND ETHICAL ISSUES OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN”, 1983). O projeto foi aprovado pela comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu.

### 3.1 Os Animais

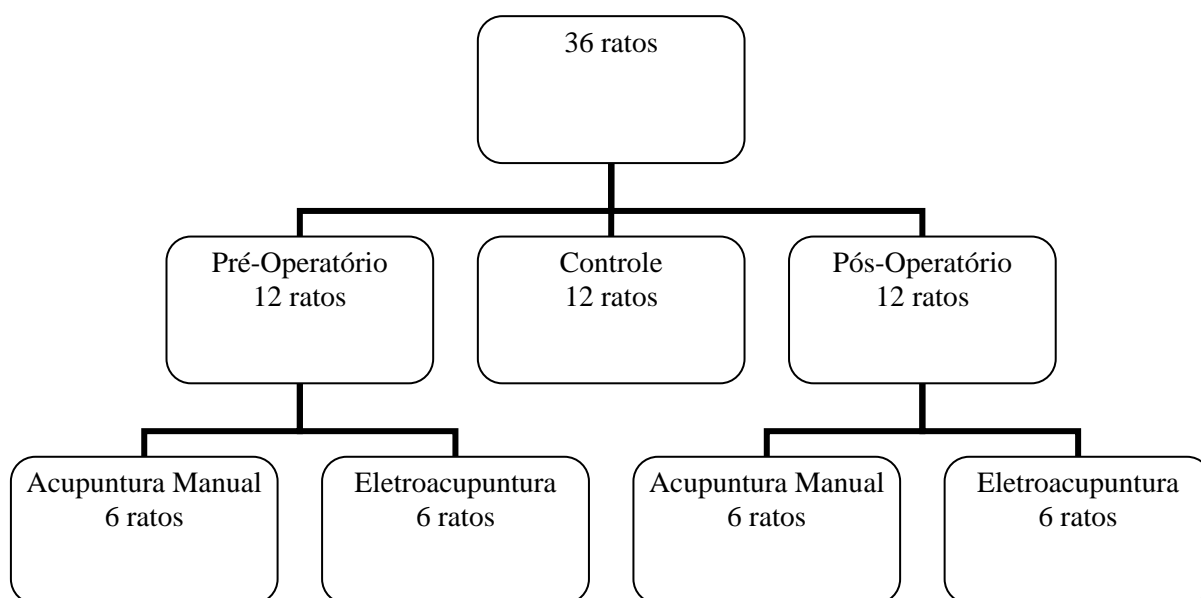
- Foram utilizados 42 ratos albinos machos adultos provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da UNESP Campus de Botucatu, pesando entre 200-300g. Os animais foram mantidos em número de quatro animais por compartimento, para evitar estresse por superpopulação, sob temperatura ambiente e iluminação controladas, com comida e água a vontade. Destes, seis foram utilizados para padronização da técnica de imuno-histoquímica para marcação de c-fos um mês antes de iniciar o experimento definitivo. O restante dos animais (36) foram utilizados no experimento definitivo.

### 3.2 Material

- Substâncias químicas para perfusão, anticorpos primários e secundários para imunohistoquímica e anestésico (thiopental sódico cristalina).
- Equipamentos
  - bomba de perfusão
  - capela
  - criostato
  - freezer
  - aparelho de barbear elétrico (Philips)
  - eletro-estimulador
- Equipamento de material cirúrgico para pequena cirurgia

- Kelly pequeno
- bisturi lâmina 15
- tesoura
- hausted
- pinças hemostática e dente de rato
- mononylon 4/10
- cotonete
- algodão
- gase
- micropore
- luvas cirúrgicas e de jardineiro (segurar o rato)
- Material de Acupuntura

### 3.3 Delineamento experimental



**Figura 2 Delineamento experimental**

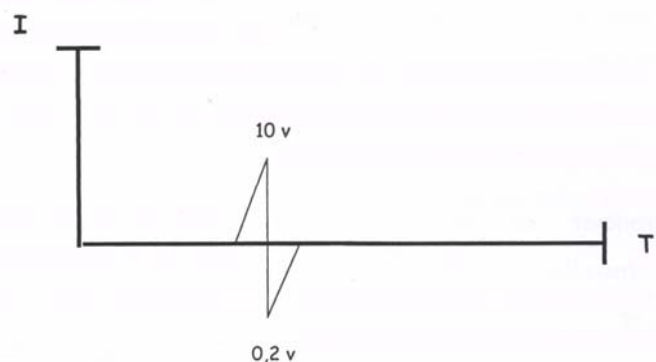
Os 36 animais utilizados no projeto foram divididos em 5 grupos:

- **Controle (12):** os animais foram submetidos a anestesia thiopental sódico e após vinte minutos (20´) foi feita a cirurgia na pata esquerda, esperando sessenta minutos (60´) para o sacrifício e perfusão.
- **Acupuntura Manual Pré Operatória (6):** os animais foram submetidos à anestesia com thiopental sódico e realizado acupuntura manual (agulhas de aço, 0,25mm de diâmetro) nos pontos Estômago 36 (E36), Rim 1 (R1) e Bexiga 67 (B67), bilateralmente. Após vinte minutos (20´) foi retirado as agulhas e realizado a cirurgia na pata esquerda. Após sessenta minutos (60´), os animais foram sacrificados e foi feita a perfusão.
- **Acupuntura Manual Pós Operatória (6):** os animais foram submetidos a anestesia thiopental sódico e após vinte minutos (20´) foi feita a cirurgia na pata esquerda. Em seguida foi realizada acupuntura manual nos pontos E36, R1 e B67 bilateralmente. Após vinte minutos (20´) foi retirado as agulhas e realizado a cirurgia na pata esquerda. Após sessenta minutos (60´), os animais foram sacrificados e foi feita a perfusão.

- **Eletroacupuntura Pré Operatória (6):** após os animais serem anestesiados, foram colocados agulhas de acupuntura nos pontos E36, R1 e B67 e ligados os eletrodos do eletroestimulador nos respectivos pontos, aplicando um estímulo elétrico de 100 Hz durante vinte minutos (20'), seguido de cirurgia na pata esquerda. Após sessenta minutos (60'), os animais foram sacrificados e foi feita a perfusão.
- **Eletroacupuntura Pós Operatória (6):** os animais foram submetidos a anestesia thiopental sódico e após vinte minutos (20') foi feita a cirurgia na pata esquerda. Em seguida foram colocados agulhas de acupuntura nos pontos E36, R1 e B67 e ligados os eletrodos do eletroestimulador nos respectivos pontos, aplicando um estímulo elétrico de 100 Hz. Após vinte minutos (20') foi retirado as agulhas e realizado a cirurgia na pata esquerda. Após sessenta minutos (60'), os animais foram sacrificados e foi feita a perfusão.

### 3.4. Eletroacupuntura (EA)

Após os três pontos de Acupuntura E36, R1 e B67 serem bilateralmente localizados, introduziram-se as agulhas de aço, com 5mm de profundidade nos pontos. Cada agulha foi estimulada independentemente por uma corrente elétrica de onda farádica, bipolar e assimétrica, na frequência de 100 Hz por minuto, usando o aparelho marca Sikuro (nacional), com 8 saídas independentes, sendo quatro saídas de cada lado (BASBAUM & FIELDS, 1978; JI et al., 1993; LEE & BEITZ, 1993; WALSH, 2001; BASTOS, 1993). A intensidade foi aumentada gradativamente a cada cinco minutos, a onda utilizada com o eletroestimulador foi em formato de serra (Figura 3), tendo também como parâmetro a contração muscular. A intensidade da estimulação foi calibrada pelo osciloscópio digital marca Minipa, variando de 0,2v, 0,5v, 1,0v, 2,8v, 4,5v, sendo a corrente mais alta de 10v (MEDEIROS, 2003)



**Figura 3** Corrente elétrica que foi usada no estímulo com eletroestimulador

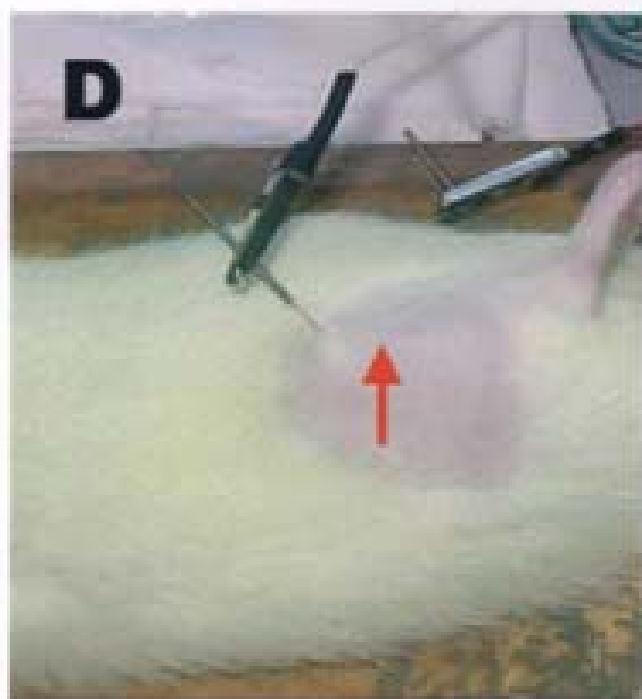
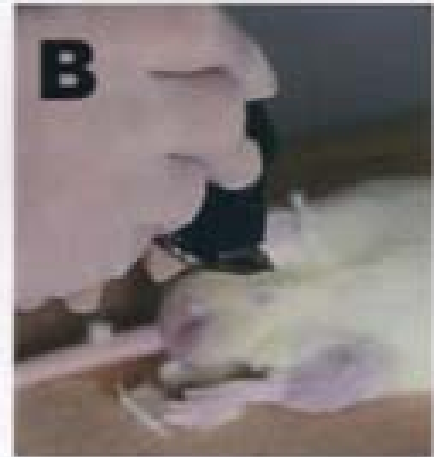
### 3.5 Procedimento anestésico

Baseando-se no estudo de TAKAJAMA 1994, fez-se uso do thiopental sódico (Cristalia) 45 mg/kg de peso. A maioria começou a perder seus reflexos motores aos 10' caindo na sua caixa de compartimento, quando isto não aconteceu foi aplicado mais anestésico. Na ausência de resposta o animal foi descartado.

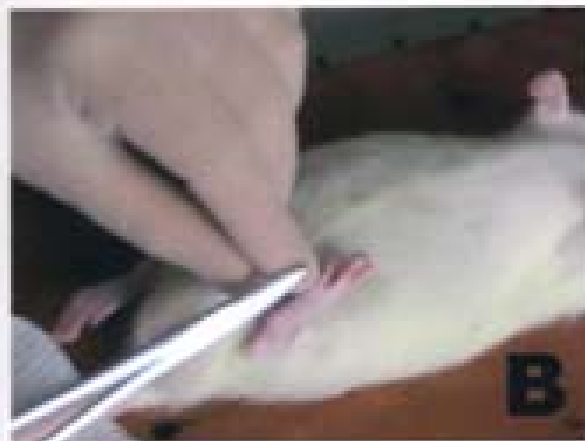
Ao cair no seu compartimento cada animal foi retirado cuidadosamente e colocado na placa de madeira em decúbito dorsal; logo após testou-se o nível de anestesia com estímulo doloroso através de uma pinça de dente de rato apertando-lhe o seguimento proximal da cauda, na ausência de reação proceguiu-se o experimento.

### 3.6 Estímulo álgico ou doloroso provocado por cirurgia na planta da pata esquerda

O estímulo doloroso consistiu em se fazer um corte longitudinal de aproximadamente um centímetro de comprimento na planta da pata esquerda do rato com uso de um bisturi, iniciando-se no calcanhar em direção aos pododátilos; a seguida dissecou-se os tecidos superficiais e profundos como a fascias e os músculos plantares tendo como auxilio uma pinça hemostática e de hausted. Após este procedimento, fez-se a hemostasia com cotonete, pressionando o local da cirurgia. A seguir, procedeu-se o fechamento dos planos profundos e superficiais aproximando com mononylon 4/0 (Technofio), e um apósito de gase mais micropore sobre a ferida (PAVAN 2003).



**Figura 4** Fotografias ilustrando os procedimentos realizados de preparo, localização e inserção de agulhas. Em (A) material utilizado para prearo da cirurgia, AM e EA, em (B) tricotomia nos membros posteriores, em (C) AM no ponto E36, em (D) EA no ponto E36 e em (E) B67 (ting).



**Figura 5** Fotografias ilustrando os procedimentos realizados durante o experimento. Em (A) EA, em (B) procedimento cirúrgico na planta da pata do rato, em (C) ratos em recuperação, em (D) perfusão e em (E) lâminas prontas para a leitura da expressão c-fos nos segmentos medulares (corno dorsal)

### 3.7 Imunohistoquímica para c-Fos

Após a perfusão transcardíaca que ocorre entre 60 e ou 80 minutos do estímulo acupuntural os animais tiveram seus encéfalos removidos, pós-fixados em solução fixadora por 1 hora e imersos por uma noite numa solução de sacarose a 30% em KPBS (salina tamponada com fosfato e potássio) 0,05M a 4°C. No dia seguinte os encéfalos foram seccionados por meio de um criostato (IEC) em cortes coronais de 32µm de espessura. Um em casa seis cortes foi coletado em KBPS e submetido a imunohistoquímica para c-Fos.

A imunorreatividade para c-Fos (células Fos-ir) foi detectada utilizando a técnica convencional da avidina-biotina-imunoperoxidase utilizando o anticorpo contra um fragmento sintético N-terminal da proteína Fos humana (Ab-5 Oncogene Science). Os cortes soltos em banho (free-floating) foram inicialmente pré-tratados com 0,3% de peróxido de hidrogênio por 10 minutos e com 1% de boridrito de sódio por 7 minutos. Os cortes foram, então, tratados com 1% soro normal de cabra e 0,3% de triton x-100 por duas horas e incubados com anticorpo primário (feito em coelho) na diluição de 1:3000 em KPBS e azida de sódio a temperatura ambiente por 24 horas. No passo seguinte, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado na diluição de 1:200 (anti-coelho feito em cabra - Vector), 0,5% de soro normal de cabra e 0,3% de triton x-100 por 90 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram tratados com ABC (complexo avidina-biotina, Vector 1:100), por 90 minutos e o produto foi intensificado com diaminobenzidina (método da glicose oxidase). Durante todo o processamento, os cortes foram submetidos à agitação, assim como à, no mínimo, três lavagens de 10 minutos em KPBS entre cada passo descrito. Os cortes foram finalmente montados em lâminas gelatinadas, secos, desidratados e cobertos com lamínula. Os cortes adjacentes àqueles utilizados para a marcação de c-Fos foram corados com cresil violeta para identificação anatômica das áreas encefálicas. (MEDEIROS, M.A. ,2001)

### 3.8 Contagem de células

A nomenclatura e os limites das estruturas cerebrais foi definida de acordo com o atlas estereotáxico de cérebro de rato de (Swanson, 1992). As células Fos-ir em 41 áreas encefálicas foram contadas utilizando um microscópio. Os limites das áreas



encefálicas foram identificados usando cortes adjacentes corados com cresil violeta. Para cada núcleo ou subnúcleo encefálico foi desenvolvida uma área de contagem com contornos baseados no tamanho e na forma da cada região (Kollack-Walker et al. , 1997). O número de células Fos-ir dentro de cada região foi contado bilateralmente (quando possível) em seis cortes consecutivos por animal e a média da contagem desses cortes foi expressa como número da células Fos-ir $10^4 \mu\text{m}^2$  por região. Não empregou-se métodos estereológicos neste estudo porque reconheceu-se que as contagens feitas desta maneira geram potenciais vieses (LI E SAWCHENKOF 1998). Em estudos usando imunocitoquímica, há incertezas quanto a penetração do anticorpo por toda a espessura do corte e dificuldades na definição precisa dos limites de alguns núcleos (LI E SAWCHENKO, 1998). Além disso, o interesse reside apenas em fazer comparações relativas da intensidade de indução de Fos em função dos tratamentos. (MEDEIROS, M.A. ,2001)

Para cada animal, as células Fos-ir foram anotadas e contadas em dois cortes adjacentes de 6 níveis do eixo rostrocaudal. Para cada grupo experimental, as contagens foram divididas pelo número de cortes para indicar a média de células contadas por corte para cada segmento.

### 3.9 Análise Estatística

Foram calculados média, mediana e desvio padrão em cada um dos grupos experimentais. Para verificar o efeito de operação e de tratamento foi efetuada Análise de Variância (Curi, 1998) com teste de Comparação Múltipla de Tukey-Kramer (Teste T) para a comparação entre os diferentes tratamentos e entre os tratamentos e o grupo controle.

As estatísticas calculadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  ( $p$  é a probabilidade de erroneamente concluir pela significância).

#### 4. RESULTADOS

As tabelas de 1 a 5 apresentam o resultado da contagem do número de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$  no cérebro de cada um dos ratos utilizados durante o experimento.

**Tabela 1 Contagem de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$  - Grupo Controle**

ANIMAL	Células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$
R1	105,92
R2	112,92
R3	73,54
R4	106,55
R5	95,63
R6	87,06
R7	69,03
R8	99,63
R9	101,99
R10	85,84
R11	99,27
Média	94,31

**Tabela 2 Contagem de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$  - Grupo de Acupuntura Manual Pré-Operatório**

ANIMAL	Células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$
R1	69,35
R2	34,27
R3	44,69
R4	43,85
R5	41,18
R6	54,29
Média	47,93

**Tabela 3 Contagem de células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$  - Grupo de Eletroacupuntura Pré-Operatório**

ANIMAL	Células Fos-ir/ $10^4\mu\text{m}^2$
R1	46,62
R2	47,4
R3	45,29
R4	39,2
R5	46,65
R6	32,72
Média	42,98

**Tabela 4 Contagem de células Fos-ir/10<sup>4</sup>µm<sup>2</sup> - Grupo de Acupuntura Manual Pós-Operatório**

ANIMAL	Células Fos-ir/ 10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup>
R1	40,93
R2	42,8
R3	52,03
R4	48,51
R5	47,03
Média	46,26

**Tabela 5 Contagem de células Fos-ir/10<sup>4</sup>µm<sup>2</sup> - Grupo de Eletroacupuntura Pós-Operatório**

ANIMAL	Células Fos-ir/ 10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup>
R1	53,02
R2	38,72
R3	40,62
R4	30,65
R5	34,46
Média	39,49

A tabela a seguir mostra a análise estatística da contagem do número de células Fos-ir/ 10<sup>4</sup>µm<sup>2</sup> no cérebro.

**Tabela 6 Análise de variância da contagem do número de células Fos-ir/10<sup>4</sup>µm<sup>2</sup> no cérebro.**

Grupo	Número de indivíduos	Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média	Mediana	Mínimo	Máximo	Intervalo de Confiança 95%	
								De	A
CONTROLE	11	94.307	13.926	4.199	99.270	69.030	112.92	84.952	103.66
PRÉ AM	6	47.938	12.317	5,028	44,270	34.270	69.350	35.010	60.867
PRÉ EA	6	42.980	5.851	2.388	45.955	32.720	47.400	36.839	49.121
PÓS AM	5	46.260	4.453	1.992	47.030	40.930	52.030	40.731	51.789
PÓS EA	5	39.494	8.491	3.797	38.720	30.650	53.020	28.953	50.035

Os resultados obtidos na análise estatística da contagem do número de células Fos-ir/ 10<sup>4</sup>µm<sup>2</sup> no cérebro estão apresentados na tabela abaixo.

**Tabela 7 Média e desvio padrão da contagem do número de células Fos-ir/10<sup>4</sup>µm<sup>2</sup> no cérebro.**

	Controle	Pre AM	Pre EA	Pos AM	Pos EA
C-fos	94,31 ± 13,9 <sup>b*</sup>	47,94 ± 12,32 <sup>a</sup>	42,98 ± 5,85 <sup>a</sup>	46,26 ± 4,45 <sup>a</sup>	39,49 ± 8,49 <sup>a</sup>

\*Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais

As tabelas 8 e 9 apresentam os resultados da análise comparativa entre os grupos de mesmo tratamento (AM ou EA) em diferentes momentos, pré e pós-operatório.

**Tabela 8 Análise comparativa entre os grupos pré e pós-operatório de Acupuntura Manual**

Comparação	Diferença significativa	q	Valor de p
Pré AM vs Pós AM	1.678	0.3646	P>0.05

**Tabela 9 Análise comparativa entre os grupos pré e pós-operatório de Eletroacupuntura**

Comparação	Diferença significativa	q	Valor de p
Pré EA vs Pós EA	3.486	0.7572	P>0.05

Da mesma forma, os resultados obtidos a partir da comparação entre os diferentes tratamentos dentro do mesmo grupo (AM e EA pré-operatório e AM e EA pós-operatório) não mostram diferença significativa, como mostram as tabelas 10 e 11.

**Tabela 10 Análise comparativa entre os diferentes tratamentos dentro do grupo pré-operatório**

Comparação	Diferença significativa	q	Valor de p
Pré AM vs Pré EA	4.958	1.130	P>0.05

**Tabela 11 Análise comparativa entre os diferentes tratamentos dentro do grupo pós-operatório**

Comparação	Diferença significativa	q	Valor de p
Pós AM vs Pós EA	6.766	1.407	P>0.05

Já na comparação entre o grupo controle e os diferentes grupos de tratamento, os resultados mostram diferença estatística entre todos os tratamentos em relação ao controle, conforme tabela 12.

**Tabela 12 Análise comparativa entre o grupo Controle e os grupos de tratamento**

Comparação	Diferença significativa	q	Valor de p
Controle vs Pré AM	46.369	12.017	P<0.001
Controle vs Pré EA	51.327	13.303	P<0.001
Controle vs Pós AM	48.047	11.717	P<0.001
Controle vs Pós EA	54.813	13.367	P<0.001

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo com relação à média e desvio padrão de células Fos-ir, considerando-se a somatória entre os diversos subgrupos experimentais, revelaram que não houve diferença estatística entre os grupos pré e pós-operatório ( $p > 0,05$ ), tanto no tratamento com Acupuntura Manual (AM) quanto com Eletroacupuntura (EA). Isso indica que os animais submetidos aos estímulos dolorosos pré e pós-operatórios foram levados a uma situação semelhante de estresse e conseqüentemente, à uma manifestação semelhante da expressão de c-fos nas células do encéfalo.

Quando comparamos os grupos de mesmo período (pré ou pós-operatório) e diferentes tratamentos (AM e EA), embora as análises não tenham apresentado diferença significativa ( $p > 0,05$ ), podemos observar pelos resultados (Tabelas 2 a 5) tendência de maior eficácia da eletroacupuntura no tratamento da dor, resultados estes que corroboram os dados da literatura. INOUE et al (2012), mostraram que a eletroacupuntura é eficaz no tratamento de dores e sintomas nos quais a acupuntura manual sempre foi ineficaz. Por outro lado, HENAO (2005) encontrou maior expressão de c-fos nos animais submetidos a eletroacupuntura do que no grupo de acupuntura manual, sugerindo que o tratamento fosse mais estressante para os animais,

ROCHA (2004) e ANDRADE (2003) também observaram a ausência de diferença significativa entre analgesia pré e pós-operatória.

A comparação entre o grupo controle e os diferentes grupos de tratamentos (Tabela 12) mostrou grande diferença significativa, com  $p < 0,001$  para cada uma das comparações, comprovando a eficácia dos quatro grupos de tratamento em relação ao controle. Observamos então que, independente da forma de tratamento, a acupuntura e eletroacupuntura foram capazes de provocar a analgesia, aumento o limiar de dor dos animais, com possível aumento da liberação de opióides e monoaminas.

É interessante pensar, para futuras pesquisas, na combinação entre acupuntura pré e pós operatória no mesmo animal, visando potencializar o efeito analgésico.

## 6. CONCLUSÃO

A análise estatística mostrou grande significância entre o grupo controle e os demais grupos na expressão de proteína c-Fos, sugerindo assim a eficiência da ação analgésica da acupuntura manual e da eletroacupuntura no pré e no pós-operatório.

Os diferentes grupos de tratamento não apresentaram diferença significativa, de forma que o modo ou momento de aplicação não interferiram nos resultados obtidos.

Sendo um procedimento de baixo risco, deve ser tentado no pré e pós-operatório de pacientes para observação dos resultados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AINDA, S., BABA, H., YAMAKURA, T., TAGA, K., FUKUDA, S., SHIMOJI, K. **The effectiveness of preemptive analgesia varies according to the type of surgery: a randomized, double-blind study.** *Anesth Analg.*, v. 89, p. 711-6, 1999.
2. BASBAUM, A.I., FIELDS, H.L. **Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis.** *Ann. Neurol.*, v.4, p.451-62, 1978.
3. BRUNTON, L.L. **Agents affecting gastrointestinal water flux and motility. Emesis and antiemetics, bile acids and pancreatic enzymes.** In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W., GILMAN, A.G. *The pharmacological basis of therapeutics.* 8. ed. New York: Pergamion Press. Cap. 38, p. 917-36, 1996.
4. BUGEDO, G.J., CARCAMO, C.R., MERTENS, R.A., DAGNINO, J.A., MUNOZ, H.R. **Preoperative percutaneous ilioinguinal and iliohypogastric nerve block with 0,5% bupivacaine for post-herniorrhaphy pain management in adults.** *Reg. Anesth.*, v. 15., p. 130-3, 1990.
5. CAMPEUS, S.; FALLS, W. A.; CULLINAN, W. E.; HELMREICH, D. L.; DAVIS, M. e WATSON, S. J. **Elicitation and reduction of fear: behavioural and neuroendocrine indices and brain induction of the immediated-early gene c-Fos.** *Neuroscience*, 78: 1087-1104, 1997
6. CANDIDO, KD., WINNIE, A..P., GHALEB, AH., FATTOUH, M.W, FRANCO, C.D. **Buprenorphine added to the local anesthetic for axillary brachial plexus block prolongs postoperative analgesia.** *Reg. Anesth. Pain. Med.*, v.27(2), p.162- 7, 2002.
7. CANTERAS, N. S. e GOTO, M. **Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator.** *NeuroReport*, 10: 413-418, 1999.
8. CARLSSON, C.P., SJOLUND, B.H. **AP and subtypes of chronic pain:**

**assessment of long term results.** Clin. J. Pain. Dec., v.1 0(4), p.290-295, 1994.

9. CARR, D.B., JACOX, A.K., CHAPMAN, C.R., FERRELL, B., FIELDS, H.L., HEIDRICH, G. **Clinical practice guidelines for acute pain management: operative of medical procedures and trauma.** Washington, D.C.: Agency for Health Care Policy and Research, 1992; DHHS publicatiol1. 11.0. 95-0034.
10. CASTRO, A.B. **Tratamento da dor no Brasil: Evolução Histórica da Dor.** Curitiba (PR): Editora Maio; 1999.
11. CHAKRABAR11, S., GANGUL Y, A.. POPDAR. M.K. **Central dopaminergic-cholinergic interaction in electroacupuncture induced analgesia.** Biog. Amines., v.5, p.I-5, 1988.
12. CHANG, F.C., TSAI, H.Y., YU, M.C., YI. P.L., LIN, J.G. **The central serotonergic system mediates the analgesic effect ofelectroAP on zusanli (ST36) acupoints.** J. Biom. Sc., v.11(2), p.179-185, 2004.
13. CHIU, J.H., CHUNG, M.S., CHENG, H.C., YEH, T.C., HSIEH, J.C., CHANG, C.Y., KUO, W.Y., CHENG, H. **Different central manifestations in response to electroacupuncture at analgesic and nonanalgesic acupoints in rats: a manganese-enhanced functional mag.netic resonance imaging study.** Can. J. Vet. Res., v.67(2), p.94-1 01,2003.
14. CHO, Z. H.; CHUNG, S. C.; JONES, J.P.; PARK, J.B.; PARK, H. J.; LEE, H. J.; WONG, E.K. e MIN, B.I. **New finding of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 2670-2673, 1998.
15. CODERRE, T. J.; KATZ, J.; VACCARINO, A. L.; MELZACK, R. **Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence.** Pain, v. 53, p. 259-85, 1993.
16. CRILE, G. W. **Phylogenetic association in relation to certain medical problems.** Bostom Med. Surg. J., v. 163, p. 893-904, 1910.
17. CRILE, G.W. **The kinetic theory of shock and its prevention through anoci-**



**association.** Lancet, v. 185, p. 7-16, 1913.

18. CURI PR. **Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas.** Botucatu, Ed. Tipomic, 2ª ed., 1998, 263p.
19. DRAEHMPAEHL, D., ZOHMANN, A. **Acupuntura no cão e no gato: princípios básicos e prática científica.** São Paulo: Roca, 1997. 245p.
20. FANTI, L., GEMMA, M., PASSARETTI, S., GUSLANDI, M., TESTONI, P.A., CASATI, A., TORRI, G. **Electroacupuncture analgesia for colonoscopy. A prospective, randomized, placebo controlled study.** Am. J. Gastroenterol., v. 98(2), p.312-6, 2003.
21. FASSOULAKI, A., PARASKEVA, A., PATRS, K., POURGEIZI, T., KOSTOPANAGIOTOU, G. **Pressure applied on the extra 1 acupuncture point reduces bispectral index values and stress in volunteers.** Anesth. Analg., v.96(3), p.885-90,2003.
22. FILHO, L. M. **Acupuntura electronica.** Terceira parte, p.113 e p.135-138.
23. FUNG, K.P., CHOW OKW, S.O.S. **Attenuation of exercise-induced asthma by acupuncture.** Lancet, v. 2, p.1419-22, 1986.
24. GAW, A.C., CHANG, L.W., SHAW, L.C. **Efficacy of acupuncture on osteoarthritic pain: a controlled, double blind study.** N. Engl. J. Med., v. 293, p. 375-8, 1975.
25. GOTTSCHALK, A., S:MITH, D. S. **New concepts in acute pain therapy: preemptive analgesia.** Am. Fam. Physician., v.63, p. 1979-84,1985-6, 2001.
26. GREENBERG, M.E.; GREENE, L. A. e ZIFF, E. B. **Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogenes transcription in PC12 cells.** J. Biol. Chem., 260: 14101-14110, 1985
27. HAN, J.S., TANG, J., REN, M.F., ZHOU, Z.F., FAN, S.G., QIU, X.C. **Central neurotransmitters and acupuncture analgesia.** Am. J. Chin. Med., v.8. p. 331-48. 1980.

28. HENAO, M.D., **Analgesia preemptiva com acupuntura. Análise imuno-histoquímica da expressão c-fos na medula espinhal de ratos**, Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Botucatu, 2005.
29. HSIEH, J.; Tu, C.; CHEN, F.; CHEN, M.; YEH, T.; CHENG,H.; WU, Y.; LIU, R e HO, L. **Activation of the hypothalamus characterizes the acupuncture stimulation at the analgesic point in human: a positron emission tomography study**. Neurosci. Lett., 307:105-108, 2001.
30. HWANG, Y.C. **Acupuncture Atlas**. Probl. Vet. Med., v.4, p.16-33, 1992.
31. IMAKI, T.; SHIBASAKI, T.; HOTTA, M. e DEMURA, H. **Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-Fos mRNA expression in brains region related to stress responses: comparison with pattern of c-Fos mRNA induction after stress**. Brain Res., 616: 114-125, 1995a.
32. IMAKI, T.; WANG, X.-Q.; SHIBASAKI, T.; S, H.; CHIKADA, N.; TAKAHASHI, C.; NARUSE, M. e DEMURA, H. **Chlordiazepoxide attenuates stress-induced activation of neurons, corticotropin-releasing factor (CRF) gene transcription and CRF biosynthesis in the paraventricular nucleus (PVN)**. Mol. Brain Res., 32: 261-270., 1995b.
33. IMBELONI, L. E. **Manuseio da dor pós-operatória. I Post operative pain management**. Rev. Bras. Anesthesiol., v.34(1 ), p.83-90, 1984.
34. INOUE, M., Nakajima, M., Hojo, T., KITAKOJI, H., ITOI, M. **Spinal nerve root electroacupuncture for symptomatic treatment of lumbar spinal canal stenosis unresponsive to standard acupuncture: a prospective case series**. BMJ Journals, 2012.
35. JI, R.R., WANG, X.M., HAN, J.S. **Introduction of C-Fos-like protein in the rat spinal cord following electroacupuncture stimulation**. Sheng Li Hsueh Pao., v.44(4), p.394-400, 1992.
36. KATZ, J. **Pain begets pain: predictors of long-term phantom limb pain and post-thomcotomy pai**. Pain Forum., v.6, p.140-144, 1997.

37. KATZ, J., MELZACK, R. **Pain Memories" in phantom limbs: review and clinical observations.** Pain., v.43, p.319-336, 1990.
38. KATZ, J., VACCARINO A.L., CODERRE, T.J., MELZACK, R. **Injury prior to neurectomy alters the pattern of autotomy in mts.** Anesthesiology., v.75, p.876-883, 1991.
39. KATZ. J.. JACKSON. M.. KAVANAGH. B.P.. SANDLER, AN. **Acute pain afterthomcic surgery predicts long-term post-thomcotomy pain.** Clin. J. Pain., v.12, p.50-5, 1996.
40. KEHLET. H., DAHL. J.B. **The value of "multimodal" or"balanced analgesia" in postoperative pain treatment.** Anesth. Analg. V.77, p.1048-56, 1993.
41. LEE, J.H., BEITZ, A.J. **The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia.** Pain., v.52(1), p.11-28, 1993.
42. LIAO, S. J.; LEE, M. H. M.; NG L. K. Y.; **Thermography as aid to the studies of acuuncture and chronic pain.** In: Sung J.; Lião M.; Athew H. M. and Lee and Lorenz K. Y Ng. Principles and pratice of contemporary Acupuncture. New York: Marcel DEKKER, Inc (Ed) 1994: 110-118.
43. LITSCHER, G. **Effects of acupressure, manual acupuncture and laserneedle acupuncture on EEG bispectral index and spectral edge ftequency in healthy volunteers.** Eur. J. Anaesthesiol.. v.21(1). p.13-9. 2004.
44. LYNOS & PETRUCCELLI, 1987; **Tratado de Medicina Chinesa**, 1993.
45. MACHIDA, M., IMAMURA, Y., USUL T., ASAI, T. **Effects of preemptive analgesia using continuous subcutaneous morphine for postoperative pain in scoliosis surgery: a randomized study.** J. Pediatr. Orthop., v.24(5), p.576-80, 2004.
46. MARTINS, E.I, GARCIA, E.G. **Pontos de acupuntura guia ilustrada de referencia**, 2003.
47. MAYER, D.J. PRINCE, D.D. & RAFII, A. **Antagonism of acupuncture**

- hypalgesia in man by the narcotic antagonist naloxone.** Brain Research, 1977; 121: 368-372.
48. McQUAY, H. J. **Pre-emptive analgesia.** Br. J. Anaesth., v. 69, p. 1-3, 1992.
  49. MEDEIROS, M. A., **Mapeamento através da expressão de c-Fos das estruturas encefálicas envolvidas na acupuntura analgésica (ponto Zusanli) em animais imobilizados,** Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina – Unifesp, 2001.
  50. MELIA, K. R.; RYABININ, A. E.; SCHROEDER, R.; BLOOM, F. E e WILSON, M. C. **Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restrain stress.** J. Neurosci., 14: 5929-5938, 1994.
  51. MELZACK, R.; WALL, PD. **Pain mechanisms: a new teory.** Science, v. 150, 1965.
  52. MORGAN, J.I. E CURRAN, T. E. **Calcium as a modular of the immediated early gene cascade in neurons.** Cell Calcium, 9: 303-311, 1988.
  53. MORGAN, J.I. E CURRAN, T. E. **Proto-oncogenes.** Site da the Americam college of Neurophychopharmacology, 2000.
  54. MORGAN, J.I. E CURRAN, T. E. **The role of ion flux in the control of c-fos expression.** Nature, 322:552-555, 1986.
  55. MORGAN, J.I. **Proto-oncogene expresión in the nervous system. In: Discussion in neuroscience,** FESN. Amsterdam, Elsevier 1991.
  56. NIBOYET, JET. **Lánesthesie par Acupuncture.** Paris: Maisoneuve, 1973.
  57. PAPA, M.; PELLICANO, M. P.; WELZL, H. E SADILE, A. G. **Distributed changes in c-Fos and c-Jun immunoreactivity in the rat brain associated with arousal and habituation to novelty.** Brain Res. Bull., 32: 509-515, 1993.
  58. POMERANZ, B, CHIN, D. **Naxolone blocks acupuncture analgesia and causes hyperalgesia: Endhorphin is implicated.** Life sci 1976; 19: 1757-1762.
  59. POMERANZ, B. **The scientific basis of acupuncture.** In: STUX, G. &

POMERANZ, B. (eds.): *Acupuncture*, Berlin: Springer-Verlag, 1987.

60. POMERANZ, B., NGUYEN, P. **Intrathecal diazepam suppresses nociceptive reflexes and potentiates electroacupuncture effects in pentobarbital-anesthetized rats.** *Neurosci. Lett.*, v.77, p.316-2(), 1987.
61. ROCHA APC. **Analgesia preemptiva, ela existe? Uma revisão sistemática com metanálise.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Botucatu. 2004.
62. SAHAKU-IN AJ. **As Bases Científicas da Acupuntura.** Edições Rio de Janeiro, 1995.
63. SALOMONS, T., OSTERMAN, J.E., GAGLIESE, L., KÀTZ, J. **Pain flashbacks in posttraumatic stress disorder.** *Clinical Journal of Pain* (in press).
64. SHANGAI **College of Traditional Chinese medicine** 1985; ROSS, 1994.
65. SOUTER, A1., FREDMAN, B., WHITE, P.F. **Controversies in the perioperative use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** *Anesth. Analg.*, v. 79, p.1178-90, 1994.
66. SUN, E.A., SNAPE, W.J., COIMN, S. RENNY, A. **The role of opioid receptors and cholinergic neurons in the gastrocolonic response.** *Gastroent.*, v.82, p.689-93, 1982.
67. SUSSAMNN, D. J. **Que é a Acupuntura?.** 3 edição. Rio de Janeiro: Editora Record 1973.
68. TADDIO, A., KATZ, 1., n.ERSICH, A.L., KOREN, G. **Effect of neonatal circumcision on pain response during subsequent routine vaccination.** *Lancet.*, v.349, p.599-603, 1997.
69. TADDIO, A., SHAH, V., Gn..BERT-MACLEOD, C., KATZ, J. **Conditioning and hyperalgesia in newborn infants exposed to repeated heel lances.** *J.A.M.A.*, v.288, p.857-861, 2002.
70. TAKESHIGE, C.; KOBORI, M.; HISHIDA, T.; HISAMITSU, T. e FANG, J.

- Descending pain inhibitory system involved in nonacupunctura point-stimulation produced analgesia.** Brain Res. Bull., 28: 379-391, 1992a.
71. **TAKESHIGE, C.; SATO, T. e KOMUGI, H. Role of periaqueductal central gray in acupuncture analgesia.** Acupunct. Electrother. Res., 5: 323-337, 1980.
72. **TAKESHIGE, C.; SATO, T.; MERA, T., HISAMITSU, T. e FANG, J. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia.** Brain Res. Bull., 29: 617-634, 1992b.
73. **TAKESHIGE, C.; Tsuchiya, M., Guo, S. e Sato, T. Dopaminergic transmission in the hypothalamic arcuate nucleus to produce acupuncture analgesia in correlation with pituitary gland.** Brain research Bulletin, 26: 113-122, 1991.
74. **TVERSKOY, M., COZACOV, C., AYACHE, M., BRADLEY, E.L., KISSIN, I. Postoperative pain after inguinal hemiorrhaphy with different types of anesthesia.** Anesth. Analg., v.70, p.29-35, 1990.
75. **TVERSKOY, M., OZ, Y., ISAKSON, A, FINGER J., BRADLEY, E.L.. KISSIN, I. Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia.** Anesth. Analg., v.78, p.205-9, 1994.
76. **ULETT, G.. HAN, S., HAN. J.S. Electroacupuncture: mechanisms and clinical application.** BioL Psych.. v. 44. p.129-38, 1998.
77. **VANNESS, S.A., GITTINS, M.E. Comparison of intra-articular morphine and bupivacaine following knee arthroscopy.** Orthop. Rev., v.23(9). p. 743- 7. 1994.
78. **WALL, P.D., JONES, M. Defeating pain: the war against a silent epidemic.** Perseus Books,1991.
79. **WALSH, D. Estimulação nervosa elétrica transcutânea.** In: HOPWOOD, V., LOVESEY, M., MOKONE, S. Acupuntura e técnicas relacionadas à fisioterapia. Barueri: Manole, 2001. v.1, cap. 9, p.119-27.
80. **WOOLF, C.J. Evidence for a central component of postinjury pain hypersensitivity.** Nature, v. 308, p. 686-8, 1983.

81. WOOLF, C.J.; WALL, PD. **Morphine-sensitive and morphine-insensitive actions of C-fibre input on the rat spinal cord.** Neurosci. Lett. V. 64, p. 221-5, 1986.
82. WU, G.-C.; ZHU, J. e XIONG, J.; PAN, H.-B.; CHEN, Y.-C. I.; TSAI, G.; ROSEN, B. R. e KOWNG. K. K. **Central nervous pathways for acupuncture stimulation: localization of processing with functional MR imaging of the brain Preliminary experience.** Neuroradiology, 212: 131-141, 1999.
83. XIE, H., OTT, E. A., HARKINS, J. D., TOBIN, T., COLAHAN. P. T., JOHNSON, M. **Influence of electro-AP on pain threshold in horses and its mode of action.** J. Eq. Vet. Sc., v.21(12), p.591-600, 2001.
84. YAMAMURA Y, LAREDO Filhos I, Ishida A, FERREIRA Neto N, GUIMARAES, C. M. **Tratamento das gonalgias crônicas pela acupuntura.** Folha méd. 1993; 107, 177, 183.
85. YAMAMURA Y. **Acupuntura Tradicional. A Arte de Inserir.** São Paulo (SP): Editora Roca; 1993.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1 Comitê de ética

**unesp**  **Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04-99

 **CEEA**  
  
**Comissão de Ética em Experimentação Animal**

---

# CERTIFICADO

*CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 443, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da eficácia da analgesia preemptiva com acupuntura através de análise imunohistoquímica da expressão C-Fos no pré e pós operatórios em ratos", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Lino Lemonica, com a colaboração de Maria Dóris Bedoya Henão, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.*

*Projeto de pesquisa aprovado em 24/11/2004*

  
**Profª Drª Norma Sueli P. Modolo**  
Presidente da CEEA

  
**Alberto Santos Capelluppi**  
Secretário da CEEA



## Anexo 2 Protocolo de perfusão

Soluções tamponadas para fazer a perfusão.

1. Salina tamponada a 0,9% PBS

2. PFA 4% em PBS gelada 4°C

3. Sacarose a 30% em PBS – após 24 horas cortar em criostato 35

- guardar alguns cortes em antifrezer
  - sol antifrezer (crioprotector)
  - p. 1 litro
  - 500 ml de PBS
  - 1.59 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 5.47 g NaHPO<sub>4</sub>
  - 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Medir PH 7.2 a 7.4
  - acrescentar 300 g de sacarose
  - Deixar dissolver bem
  - Acrescentar 300 ml de etileno glicol.
  - Misturar sem voltar com todo o conteúdo para proveta, caso não tenha completado 1 litro, acrescentar H<sub>2</sub>O destilada até 1 l.
  - Conservar em geladeira (por muito tempo).
    1. retirar os cortes do antifrezer, que será conservado em freezer.
    2. lavar 3x 10´em KPBS a 0,05 molar (ph 7.2)
    3. transferir para a placa contendo 50 ml de solução de peróxido de hidrogênio  
40 ml de H<sub>2</sub>O destilada  
400 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vol)  
lavar os cortes nesta solução por 10´
    4. lavar 3 x 10´em KPBS a 0,005
      - inespecífico: 30 ml de KPBS 0,05
      - 90 ml de triton puro 100 x(0,3%)
      - soro normal de cabra a 1% 300 ml
- } 30 ml total
- incubar por 2 horas nesta solução

5. lavar 3 x 10' em KPBS a 0,05 m
  6. anticorpo primário
    - 4 µg de azida de sódio
    - 10 ml de ac c-Fos (ab-S)
    - dissolvido em 30 ml de KPBS
- } 30 ml no total (KPBS)

**2º dia**

Lavar 2 x 5' KPBS  
 + lavar 3 x 10' KPBS

7. Ac. Secundário
  - Ac. Secundário antioelho biotilado 1:2000 – 150 ml
  - Soro normal de caba 1% - 300 ml
  - Triton x de 10 ml.
  - Incubar nesta solução por 90' em temperatura ambiente
  - Lavar 3 x 10' em KPBS

} 30 ml de (KPBS) 0,05 m
8. 10' antes do término dos 90' preparar ret ABC
  - 30 ml de NaPBS a 0,1m
  - 0,69 g de Nacl
  - 90 ml de triton puro
  - acidionar 5 gotas do A e 5 gotas de B e incubar por 90'.
  - Lavar 2 x 10' em KPBS
  - Lavar 2 x 10' em tampão acetato de sódio 0,1 m (PH 6.0)

} 30 ml da sol
9. DAB

Todos estes materiais devem ser aliquotados com antecedência e mantidos no freezer a -20°C

### Anexo 3 Protocolo de imuno-histoquímica

#### Imuno-histoquímica - Protocolo c-Fos

Antifreezer: após organizar os cortes de medula na redinha, lavar em KPBS 0,05 M – 3x – 10 e colocar no misturador;

2. Pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – depende se houve uma boa perfusão.

10´ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 0,3%  $\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ ml de H}_2\text{O d} \\ 300 \text{ ml de H}_2\text{O}_2 \text{ a } 30\% \end{array} \right.$

3. Lavar 3 x 5´ em KPBS.

4. Pré-tratamento: 2 horas RT

1% de soro normal de cabra  $\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ ml de KBPS} \\ 300 \text{ ml de soro de cabra} \\ 90 \text{ ml de triton} \end{array} \right.$   
0,3 % de triton x 106

5. Lavar 1 x 10´ em KPBS

6. Incubação – 20 – 22 horas

anticorpo anti CFos (AB -5)

feito em coelho 1: 1000,00

em KPBS em ázida de sódio

3 ul de anti-c fos

30 ml de KPBS

4 mg de ázida

7. Lavar: 6 a 8 x de 5´ - KPBS

8. 2 dario: 120´

Anticorpo secundário biotilado coelho feito em cabra 1:206 1 :400

Soro normal de cabra 0,5% (GOAF)

Triton 0,03%

## KBBS

75 ml de AC coleho biotenilado feito em cabra

150 ul de sn cabra

10 ul de triton 100x            2 horas

30 ml de KPBS

9. Lavar 3 x 10' em KPBS

10. ABC

30 ml } 0,69 g de Nacl (1.30 incubar 1 hora)  
          } 150 ml de triton (300 ul) 10 gotas A + 5 gotas A  
          } 30 ml de PBS (60 ml) 10 gotas A, 5 gotas B e agitar

Preparar 30' antes.

11. Lavar 3x em KPBS.

12. Lavar 23 x tampão acetato 0,1 ml ph 6,0.

13. DAB

60 mg de B – D – glucose

12 mg de cloreto de amônio

0,45 mg de glicopse oxidase

15 mg DAB

60 mg B-D glucose

12 mg cloreto de amonia

0,45 mg glicose oxidase

15 mg DAB

14. Lavar em tampão acetato – 0,1 (glicose oxidase (por último) e depois em KPBS

Já aliqotadas em apendorfs separados para 30 ml desta solução 15 ml de KPBS a 0,05 em 30 ml de KPMS. Tirar 1 ml e colocar nos apendorfs de B- de glicose, cloreto de amonia e DAB. Voltar para o restante de KPBS o BD glicose e amonia o DAB.