

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MARIA GABRIELA MAZIERO CAPELLO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CROTALFINA INJETADA NOS ACUPONTOS
ZUSANLI (E36) E *KUNLUN* (B60) COMBINADO COM ELETROACUPUNTURA NA
DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM RATOS**

ALFENAS/MG

2024

MARIA GABRIELA MAZIERO CAPELLO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CROTALFINA INJETADA NOS ACUPONTOS
ZUSANLI (E36) E KUNLUN (B60) COMBINADO COM ELETROACUPUNTURA NA
DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM RATOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Profa. Dra. Josie Resende Torres da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva.

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Capello, Maria Gabriela Maziero.

Avaliação do efeito da crotalina injetada nos acupontos Zusanli (E36) e Kunlun (B60) combinado com eletroacupuntura na dor neuropática induzida por paclitaxel em ratos / Maria Gabriela Maziero Capello. - Alfenas, MG, 2024.

64 f. : il. -

Orientador(a): Josie Resende Torres da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Dor Neuropática. 2. Eletroacupuntura. 3. Crotalina. 4. Farmacopuntura. 5. Paclitaxel. I. Silva, Josie Resende Torres da , orient. II. Título.

MARIA GABRIELA MAZIERO CAPELLO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CROTALFINA INJETADA NOS ACUPONTOS
ZUSANLI (E36) E KUNLUN (B60) COMBINADO COM ELETROACUPUNTURA NA
DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM RATOS**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 15 de fevereiro de 2024

Prof^a Dr.^a Josie Resende Torres da Silva

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Prof. Dr. João Eduardo de Araújo

Instituição: Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Instituição: Universidade de São Paulo (FMRP-USP)



Documento assinado eletronicamente por **Josie Resende Torres da Silva**, Professor do Magistério Superior, em 15/02/2024, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1182753** e o código CRC **30A345FB**.

AGRADECIMENTOS

Lembramos que toda caminhada requer esforços para alcançar os objetivos desejados, mas não atingimos nossas metas sozinhos. Minha eterna gratidão a todos que estiveram ao meu lado e colaboraram para que o resultado fosse o melhor possível.

Tenho, primeiramente, que agradecer a Deus pelo dom da vida e que me fortalece em cada desafio diário. Aos meus pais, Renata e José Alexandre, meus pilares de vida, meus maiores exemplos e que, com todo amor, não pouparam esforços para tornar isso possível. Também a minha irmã e maior parceira, Maria Júlia, que esteve sempre me apoiando com muito zelo. Carrego, comigo, a certeza de que nunca estarei só, pois sempre a terei ao meu lado. Ao meu companheiro, João Augusto, por todo amor, cumplicidade e por estar sempre ao meu lado.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Josie Resende Torres da Silva, não só para meu crescimento profissional, mas também por transmitir ética, dedicação e amor por aquilo que se faz. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva, pela partilha de conhecimento, suporte, incentivos e dedicação. Não menos importante, aos alunos do LANNED, Maria Beatriz, Cissa e Gabrielly, que me ajudaram a desenvolver este trabalho com muito carinho. Em especial, a mestrande Laura, por todo apoio, pelo companheirismo, amizade e por cada momento compartilhado. Agradeço aos membros do LEDs do Instituto Butantan, em especial Dra Gisele, Dra Morena e Ana, por toda partilha de conhecimento e apoio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A dor neuropática (DN) pode ser causada pelo efeito adverso da quimioterapia com o uso de paclitaxel (PAC). Neste contexto, abrangendo estratégias no manejo da DN, estudos demonstram que a crotalina (CRO) é um peptídeo sintético que induz potente e duradouro efeito antinociceptivo dependente da liberação de opioides endógenos, em diferentes modelos de dor. Estratégias farmacológicas e não farmacológicas são utilizadas para o manejo da DN. Sendo assim, a farmacopuntura é uma técnica que utiliza a administração de fármacos ou toxinas animais concomitante em acupontos. Estudos pré-clínicos apresentam efeito antinociceptivo na eletroacupuntura (EA) do acuponto *Zusanli* (E36) e *Kunlun* (B60) para efeito analgésico. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito antinociceptivo da farmacopuntura com CRO associado ou não ao tratamento por EA em diferentes frequências na DN induzida por PAC. Foram utilizados ratos *Wistar* e os animais receberam injeções intraperitoneal de PAC em dias alternados totalizando quatro administrações (Exemplificando: dias 0, 2, 4 e 6). Os grupos foram divididos em três: preventivo (Gpreemp), durante (Gind) e tratamento (Gtrat) da DN por PAC e tratados com administração local de CRO nos acupontos E36 e B60. Em seguida, receberam o tratamento com EA nas frequências de 2 Hz ou 2/15Hz por 30 minutos. A avaliação comportamental com Vonfrey (limiar mecânico), teste de acetona (alodinia ao frio) e campo aberto foi realizada em todos os grupos. Além disso, para avaliar a expressão dos marcadores de astrócitos (GFAP) foi utilizado o ensaio de *Western Blotting* em amostras específicas do grupo tratamento. Foi demonstrado que a EA 2/15Hz e 2Hz nos acupontos *Zusanli* e *Kunlun* promoveu um aumento no limiar mecânico e diminuição na alodinia ao frio dos animais no grupo tratamento, durante e preventivo. Além disso, os grupos que receberam como tratamento à farmacopuntura com CRO também obtiveram resultados no aumento do limiar mecânico e diminuição da alodinia ao frio. Os dados evidenciam que a combinação da EA 2Hz ou 2/15Hz associada à farmacopuntura com CRO foi capaz de reduzir a alodinia mecânica e ao frio em ambos os grupos experimentais (preventivo, durante e tratamento da dor) quando comparado aos seus controles, indicando um efeito antinociceptivo. Nos animais do grupo tratamento submetidos ao PAC foi possível observar que houve aumento na expressão do marcador de astrócitos e

a realização da EA 2Hz associada à farmacopuntura com CRO foi capaz de diminuir a expressão dos marcadores de astrócitos nestes animais. Sendo assim, combinação de farmacopuntura de CRO e EA 2Hz ou 2/15Hz produziram efeito antinociceptivo nos grupos preventivo, indução e durante em modelo animal de DN induzida por PAC.

Palavras-chave: Dor Neuropática, Eletroacupuntura, Crotalfina, Farmacopuntura, Paclitaxel.

ABSTRACT

Neuropathic pain (NP) can be caused by the adverse effect of chemotherapy using paclitaxel (PAC). In this context, covering strategies for the management of NP, studies have shown that crotalphine (CRO) is a synthetic peptide that induces a potent and long-lasting antinociceptive effect dependent on the release of endogenous opioids in different pain models. Thus, pharmacopuncture is a technique that uses the administration of drugs or animal toxins concomitantly in acupoints. Preclinical studies show an antinociceptive effect of electroacupuncture (EA) of the Zusanli (E36) and Kunlun (B60) acupoints for analgesic effects. Therefore, this study aimed to investigate the antinociceptive effect of pharmacopuncture with CRO associated or not with EA treatment at different frequencies in PAC-induced NP. The animals received intraperitoneal injections of PAC every other day, totaling four administrations (for example: days 0, 2, 4 and 6). The groups were divided into three: preemptive (Gpreemp), during (Gind) and treatment (Gtrat) of PAC-induced NP and treated with local administration of CRO at acupoints E36 and B60. They were then treated with EA at frequencies of 2 Hz or 2/15Hz for 30 minutes. Behavioral assessment with Vonfrey (mechanical threshold), acetone test (cold allodynia) and open field was carried out in all groups. In addition, the Western Blotting assay was used to evaluate the expression of astrocyte (GFAP) markers in specific samples from the treatment group. It was shown that EA 2/15Hz and 2Hz on the Zusanli and Kunlun acupoints promoted an increase in the mechanical threshold and a decrease in cold allodynia in the animals in the treatment, during and preemptive groups. In addition, the groups that received pharmacopuncture with CRO as treatment also obtained results in increased mechanical threshold and decreased cold allodynia. The data show that the combination of 2Hz or 2/15Hz EA associated with pharmacopuncture with CRO was able to reduce mechanical and cold allodynia in both experimental groups (preemptive, during and pain treatment) when compared to their controls, indicating an antinociceptive effect. In the animals in the treatment group that underwent PAC, it was possible to observe an increase in astrocyte marker expression and the use of 2Hz EA associated with pharmacopuncture with CRO was able to reduce the expression of astrocyte markers in these animals. Therefore, the combination of CRO pharmacopuncture and 2Hz or 2/15Hz EA produced an antinociceptive effect in the preventive, induction and during groups in an animal model of PAC-induced NP.

Keywords: Neuropathic Pain; Electroacupuncture; Crotalphine; Pharmacopuncture; Paclitaxel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental do Gpreemp.....	30
Figura 2 - Delineamento experimental do Gind.	31
Figura 3 - Delineamento experimental do Gtrat.	32
Figura 4 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalfina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) no limiar mecânico dos animais pertencentes ao Grupo Prevenção.	34
Figura 5 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalfina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) na alodinia ao frio dos animais pertencentes ao Grupo Prevenção.	35
Figura 6 - Teste de Campo Aberto dos animais do Grupo Prevenção.	36
Figura 7 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalfina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) no limiar mecânico dos animais pertencentes ao Grupo Indução.	37
Figura 8 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalfina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) na alodinia ao frio dos animais pertencentes ao Grupo Indução.	38
Figura 9 - Teste do Campo Aberto realizado com o Grupo Indução.	40
Figura 10 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalfina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) no limiar mecânico dos animais pertencentes ao Grupo Tratamento.	41
Figura 11 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalfina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) na alodinia ao frio dos animais pertencentes ao Grupo Tratamento.	42
Figura 12 - Teste de Campo Aberto dos animais do Grupo Tratamento.	44
Figura 13 - Resultados do Western Blotting para avaliar expressão da proteína GFAP e IBA no segmento lombar dos animais.	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos Experimentais.....	28
--------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CRO	Crotalina
DN	Dor Neuropática
EA	Eletroacupuntura
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GIND	Grupo Indução
GLU	Glutamato
GPREEMP	Grupo Preventivo
GRDs	Gânglios da Raiz Dorsal
GTRAT	Grupo Tratamento
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Hz	Hertz
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IBA1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IL- 1 β	Interleucina -1 Beta
IL-6	Interleucina - 6
LANNED	Laboratório de Neurociência, Neuromodulação e Estudo da Dor
LPS	Lipopolissacarídeo
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmHg	Milimetro de mercúrio
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloreto de sódio
NPIQ	Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia
OF	<i>Open Field</i>
PAC	Paclitaxel
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS-T	Tampão tris salina – tween 20 a 10%

TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRPA1 Receptor de potencial Transitório Anquirina 1
TRPV1 Receptor Potencial Transiente Vanilóide tipo 1
UNIFAL-MG Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL.....	15
1.2	CROTALFINA	17
1.3	FARMACOPUNTURA E ELETROACUPUNTURA	19
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	23
4.2	MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA INDUZIDA POR PACLITAXEL.....	23
4.3	TESTE DO LIMIAR MECÂNICO - <i>VON FREY</i>	24
4.4	TESTE DE CAMPO ABERTO	24
4.5	TESTE DE ALODINIA AO FRIO COM ACETONA.....	25
4.6	<i>WESTERN BLOTTING</i>	25
4.7	DROGAS E REAGENTES.....	26
4.8	ELETROACUPUNTURA	26
4.9	FARMACOPUNTURA E CRO	27
4.10	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	27
4.10.1	Protocolo Experimental	29
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS	33
5.1	ABORDAGEM DO PRÉ-TRATAMENTO NO MANEJO DA INDUÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA POR PACLITAXEL	33
5.2	A ELETROACUPUNTURA ALTERA A INDUÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL.....	36
5.2	A ELETROACUPUNTURA REDUZIU SIGNIFICATIVAMENTE A DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL	40
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO I	64

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um desafio de saúde pública global e, além disso, é uma das principais causas de mortes no mundo (QIU *et al.*, 2021; SIEGEL *et al.*, 2023). A quimioterapia é um dos tratamentos mais comuns para o câncer e dentre os quimioterápicos mais utilizados, temos o paclitaxel (PAC), embora seja um tratamento eficaz, a quimioterapia causa uma série de efeitos adversos. Os efeitos colaterais mais prevalentes do seu uso são alopecia, náuseas e vômitos, anemia, reações de hipersensibilidade, artralgia, mialgia e dor neuropática periférica (HASHEMI *et al.*, 2023; ZHU *et al.*, 2019).

Em conformidade com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), a dor é definida como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (DESANTANA *et al.*, 2020). Ela apresenta dimensão subjetiva, sendo singular a cada indivíduo, pois apresenta interferência das experiências, memórias e emoções vivenciadas, compreendendo domínios importantes da experiência humana como os aspectos sensoriais, afetivos, cognitivos, comportamentais e socioculturais (RODRIGUES, 2020). A dor fisiológica tem como finalidade sinalizar o mecanismo de defesa do corpo para proteção diante de um estímulo nocivo, com o propósito de evitar maiores danos teciduais (OLIVEIRA, 2016).

Sabe-se que a sensação dolorosa está aliada à ativação de receptores, por meio de fibras aferentes primárias, denominadas fibras A δ e C, sendo caracterizadas como rápida e lenta, respectivamente, devido ao seu diâmetro, presença ou ausência de mielina e velocidade de condução. A ativação ocorre quando há estímulo nocivo periféricamente e engloba eventos sensoriais, que são necessários para a detecção do estímulo até a produção da resposta. Para a percepção da dor, três estágios são essenciais: o primeiro estágio é composto pela transdução do estímulo nociceptivo em potencial de ação, seguida pela transmissão deste estímulo da periferia ao corno dorsal, localizado na medula espinhal através do sistema nervoso periférico (SNP). Por fim, este estímulo é transmitido para centro superiores no sistema nervoso central (SNC) onde a dor é processada e percebida (YAM *et al.*, 2018).

A manifestação dolorosa pode ser classificada em dor aguda ou crônica dependendo de seu tempo de duração, localização e etiologia. A primeira é forma de alerta do organismo a uma agressão de natureza distinta (mecânica, química ou

térmica), enquanto a segunda provoca desequilíbrios orgânicos, diminuindo gradativamente as capacidades funcionais dos indivíduos (CORGOZINHO *et al.*, 2020). Pode afetar várias regiões do corpo de um indivíduo e ser de inúmeras origens, abrangendo câncer, fibromialgia, dor neuropática, dor pós-cirúrgica persistente, artrite, dor na infância e adolescência, dor de cabeça e enxaqueca, dor orofacial, dor visceral, dor musculoesquelética e dor pélvica (YAM *et al.*, 2018).

Foi fundamentado pelo *Global Burden of Disease Study 2017* que a alta prevalência da dor e doenças relacionadas à dor é a principal causa de incapacidade e afeta a qualidade de vida dos indivíduos em todo o mundo (GBD, 2018). A dor crônica afeta mais de dois terços da população do Brasil (CARVALHO *et al.*, 2018).

De modo geral, ela é responsável por grande parte da demanda aos serviços de saúde e compreende como fenômeno multidimensional, envolvendo processos psicossociais e fisiopatológicos. Desta forma, apresenta um grande impacto econômico para a saúde pública do país, pois a sobrecarga econômica associada à persistência da dor, que inclui a utilização de cuidados de saúde, impacto na produtividade, absenteísmo e presenteísmo, é relativamente maior do que a maioria das outras condições de saúde (ROCHA *et al.*, 2021; SHAYGAN *et al.*, 2022).

O manejo ideal da dor deve ser individualizado, integrado, multimodal, interdisciplinar e baseado em evidências. Desta forma, os componentes primários do cuidado podem incluir gerenciamento farmacológico, apoio psicológico e a atividade física para promover e manter a capacidade funcional. Além desses componentes, modalidades de saúde complementares e integrativas, educação do paciente e outros tratamentos podem fazer parte do tratamento da dor (SKELLY *et al.*, 2021).

1.1 DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

A dor pode ser classificada como de origem nociceptiva, neuropática ou nociplástica (ORHURHU *et al.*, 2021). A dor neuropática (DN) é um problema clínico desafiador, pois os pacientes que sofrem desse tipo de dor relatam pior dor e incapacidade do que aqueles com dor crônica não neuropática (FLATTERS *et al.*, 2017). Temos como causas frequentes da DN os danos ao sistema nervoso, trauma, câncer, diabetes, infecção por vírus, doença autoimune ou quimioterapia (COLLOCA *et al.*, 2017).

O PAC, comercializado como Taxol, é amplamente utilizado no tratamento de cânceres comuns, como câncer de mama, ovário e pulmão. Embora altamente eficaz no bloqueio da progressão tumoral, a neuropatia periférica é um efeito adverso presente em 60-70% dos pacientes em quimioterapia (STAFF *et al.*, 2020).

A Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia pode limitar as dosagens e escolhas de medicamentos e, em casos graves, leva à interrupção do tratamento, além de afetar a qualidade de vida do indivíduo. Com anuência às diretrizes de prática clínica da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) publicadas em 2014 e 2020, não existem agentes altamente recomendados para a prevenção ou tratamento da neuropatia periférica induzida por quimioterapia. (LOPRINZI *et al.*, 2020).

É importante considerar que os taxanos causam eventos inflamatórios mais graves. As células gliais no corno dorsal da medula espinhal desempenham papéis críticos na manutenção da dor crônica. Ou seja, astrócitos e micróglia são ativados em região de medula espinhal em modelo experimental de animais com dor neuropática periférica induzida por paclitaxel e estão envolvidos em mecanismos de dor (LI *et al.*, 2019).

A ativação dessas células promove alterações morfológicas e síntese e liberação de substâncias algogênicas que contribuem para a gênese e manutenção da DN (CLARK; OLD; MALCANGIO, 2013). A ativação das células da glia resultam em aumento da síntese de fatores inflamatórios, sendo a interleucina 1- β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e óxido nítrico, responsáveis por atuar sobre receptores presentes nos neurônios (MILLIGAN; WATKINS, 2009).

Os processos fisiopatológicos induzidos pelo PAC incluem inflamação, estresse oxidativo, perda de fibras nervosas, alterações da função mitocondrial e excitabilidade dos neurônios periféricos. Foram identificados que vários tipos de células no SNC e SNP são acometidos pelo tratamento com PAC em modelos experimentais, incluindo neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD), células de Schwann, células gliais satélites, micróglia e astrócitos espinhais, podendo contribuir para a progressão da doença (FLATTERS *et al.*, 2017; STAFF *et al.*, 2020).

O aumento na ativação dos astrócitos promove alterações como hipertrofia e aumento da produção do marcador de astrócitos denominado proteína ácida fibrilar glial (GFAP), simultaneamente ocorre aumento na produção de substâncias pró-inflamatórias, como citocinas (MCGINNIS; JI, 2023; WATKINS; MAIER, 2003).

A DN por PAC impacta negativamente na qualidade de vida, englobando

esferas psicossociais e fisiopatológicos do indivíduo. O reconhecimento desse mecanismo na modulação da dor pode proporcionar novas abordagens de tratamento. No entanto, como dito anteriormente, não existe um protocolo de tratamento padrão para a prevenção, mitigação ou condução da DN por quimioterápico. Assim, o desenvolvimento de uma abordagem para o manejo ideal da dor é necessário e pode envolver estratégias farmacológicas e não farmacológicas (ROCHA *et al.*, 2021; SHAYGAN *et al.*, 2022; SIMÃO *et al.*, 2015). Portanto, estudos de reposicionamento de drogas e estratégias não farmacológicas são um meio promissor para o manejo da DN (PARK *et al.*, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2021).

Abrangendo as estratégias não farmacológicas, os tratamentos integrativos como a eletroacupuntura, estão sendo amplamente utilizados para o manejo desafiador da dor neuropática e uma meta-análise demonstrou que a eletroacupuntura é segura e eficaz no tratamento da neuropatia de diversas etiologias (DIMITROVA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019).

1.2 FARMACOPUNTURA E ELETROACUPUNTURA

Ao longo das últimas décadas, a acupuntura surgiu como técnica terapêutica comum na medicina ocidental como opção de tratamento e alívio da dor. A acupuntura é realizada através da inserção de agulhas no corpo em pontos específicos comumente conhecidos de acupontos, que foram estabelecidos pela medicina tradicional chinesa (PARK *et al.*, 2008). Os acupontos são regiões da pele que apresentam grande concentração de terminações nervosas e sensoriais, além de estar em relação íntima com nervos, vasos sanguíneos, tendões, periosteos e cápsulas articulares. (LI *et al.*, 2005; VICKERS *et al.*, 2002)

Um considerável número de evidências experimentais obtidas em animais e seres humanos fornecem muitas hipóteses sobre os mecanismos neurais dos efeitos da acupuntura, em especial o analgésico (HAN, 2004). O estímulo mecânico fomentado pela agulha proporciona a liberação de mediadores químicos e inflamatórios, citocinas, neuropeptídeos, neurotrofinas e quimiocinas, integrando o processo de analgesia pela acupuntura (MCDONALD *et al.*, 2015). Wu *et al.* (2014) sugeriram que há também o envolvimento de canais iônicos compreendidos na recepção do estímulo mecânico como os canais de receptores de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1).

A estimulação dos pontos de acupuntura para o tratamento de dor, principalmente dores crônicas, engloba estimulação manual, elétrica e injeção de fármacos (KELLY; WILLIS, 2019; YOON *et al.*, 2012). A farmacopuntura consiste na administração de fármacos ou toxinas animais, em doses reduzidas, nos pontos específicos de acupuntura, assim, estimula mecanicamente os pontos de acupuntura concomitantemente a um efeito farmacológico (LEE *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2018).

Estudos pré-clínicos, apresentaram maior eficácia de alguns acupontos na DN, dentre eles está o E36 (*Zusanli*), localizado posteriormente na articulação do joelho e 1,5 mm lateral ao tubérculo anterior da tíbia. A estimulação manual deste ponto promove efeito antinociceptivo e significativamente relevante em modelos animais de dor aguda e crônica (KIM *et al.*, 2018). O acuponto B60 (*Kunlun*) está localizado no nível da articulação do tornozelo e entre a ponta do maléolo externo e o calcâneo (LI *et al.*, 2019).

A estimulação das agulhas de acupuntura com um aparelho de eletroestimulação de alta ou baixa frequência é conhecido como eletroacupuntura (EA). O envolvimento de estruturas corticais na analgesia induzida por EA também foi relatado na literatura (SILVA *et al.*, 2012). Estudos demonstram que através da EA há a liberação de substâncias endógenas, como beta-endorfina, dinorfina, encefalina, substância P e serotonina (TIAN *et al.*, 2022). Em relação a EA de baixa frequência (2 Hz) pode produzir um aumento da liberação de encefalina (HAN 2003, 2004).

Resultados sugerem que os três tipos de receptores opióides (*mu*, *delta* e *kappa*) na medula espinal do animal desempenham papéis importantes e significativos na mediação da analgesia induzida por EA de 2/15 Hz (CHEN; HAN, 1992).

No entanto, outros mediadores também podem estar envolvidos na antinocicepção induzida por EA como a serotonina (5HT), noradrenalina (NA), glutamato (GLU) e ácido gama-amino butírico (SILVA *et al.*, 2012).

Tendo em vista as diversas opções de tratamento, é necessário lembrar que a DN, assim como outros estímulos dolorosos é impulsionada à integração central através de fibras aferentes primárias (C e A δ). Em contrapartida, a EA se mostra capaz de acionar fibras A β , acarretando um efeito analgésico por envolver componentes sensoriais, emocionais e cognitivos da dor (HAN *et al.*, 2003).

Dados prévios presentes na literatura evidenciam o efeito antinociceptivo da realização preventiva da EA em diferentes modelos animais de dor (KISSIN, 2000; LIU *et al.*, 2019; SILVA; SILVA; PRADO, 2016). Estudos demonstram o papel entre

microglia e neurônios sensoriais no processamento e manutenção da dor. As citocinas pró-inflamatórias microgliais e os neurotransmissores emitidos pelos neurônios nociceptivos promovem a sensibilização à dor e adicionalmente participam da comunicação entre a microglia e os neurônios sensoriais. Além disso, recentes avanços na investigação da EA demonstraram que sua utilização inibiu a ativação da microglia e melhorou a neuroinflamação (LIU *et al.*, 2019).

Diante do exposto, torna-se necessário investigar a relação entre os efeitos antinociceptivos da administração prévia da CRO nos acupontos, *Zusanli* (E36) e *Kunlun* (B60), associada com tratamento por EA de diferentes frequências (2 Hz e 2/15 Hz) de maneira preventiva, durante e tratamento da DN induzida por PAC em ratos Wistar.

1.3 CROTALFINA

A Crotalina (CRO) é um potente e novo peptídeo com efeito antinociceptivo de duração prolongada mediado pela ativação de receptores opióides κ e/ou δ . O peptídeo sintético tem sua sequência baseada no peptídeo analgésico encontrado no veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus* com 14 aminoácidos (EFSPENCQGESQPC) apresentando uma ponte dissulfeto e um ácido piroglutâmico, sendo capaz de promover um efeito antinociceptivo em modelos de dor aguda e crônica (GUTIERREZ *et al.*, 2008; KONNO *et al.*, 2008).

Apesar de ser mediado por receptores opióides, o tratamento prolongado com a CRO não induz efeitos colaterais, como a hipersensibilidade tardia, tolerância periférica ou estabelece sintomas de abstinência após a suspensão do uso (FREITAS *et al.*, 2021; MACHADO *et al.*, 2014). Ainda, a CRO, não interfere com a viabilidade celular de neurônios do GRD (GUTIERREZ *et al.*, 2008) ou de linhagem de neurônios SH-SY5Y e não interfere com o ganho de peso de roedores (GIARDINI *et al.*, 2021).

A CRO promove antinocicepção ativando os receptores canabinóides do tipo 2 (CB2), que, conseqüentemente, induzem a liberação de peptídeos endógenos, particularmente a dinorfina A, um agonista endógeno dos receptores opióides *kappa*. Estudos recentes, identificaram que esse peptídeo ativa e dessensibiliza parcialmente os canais iônicos do receptor de pontencial transitório de anquirina 1 (TRPA1) em concentrações sub nanomolares e esse efeito é crítico para a analgesia e controle da

hiperalgesia inflamatória pelo peptídeo (BRESSAN *et al.*, 2016; GIARDINI *et al.*, 2021).

Pesquisas anteriores, demonstraram também que em modelos experimentais de dor aguda e crônica, quando administrada em baixas doses por via oral, intraplantar ou intravenosa a CRO promove um potente efeito analgésico. Após uma única dose via oral, apresenta um efeito prolongado, de 2 a 3 dias, em modelos de câncer ósseo ou de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático e de até 5 dias, através de administração intraplantar, quando utilizada em modelo inflamatório de hiperalgesia induzida por carragenina ou prostaglandina E₂ (GUTIERREZ *et al.*, 2008; KONNO *et al.*, 2008).

Estudos adicionais avaliaram que a CRO modula diferentes funções de macrófagos residentes ou estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), evidenciaram que o peptídeo foi capaz de inibir significativamente a fagocitose, a liberação de H₂O₂ e a produção de óxido nítrico por estas células. Além disso, estimula a eliminação de IL-1 β e modula a secreção de IL-6, aumentando sua secreção em macrófagos residentes e inibindo em macrófagos inflamatórios. Ainda, a CRO inibe a secreção de TNF- α , independentemente do estado de ativação dos macrófagos. Desta forma, além do seu efeito analgésico, a ação regulatória da CRO para as ações do sistema imune pode contribuir também para uma ação anti-inflamatória (VELHOTE, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a DN por Quimioterápico é responsável por uma grande parte da demanda aos serviços de saúde e constitui-se um fenômeno multidimensional, que envolve processos psicossociais, comportamentais e fisiopatológicos (MAJITHIA *et al.*, 2016). Considerando que ela afeta a qualidade de vida do indivíduo, são usadas estratégias farmacológicas e não farmacológicas para o manejo da DN. Ainda, estudos demonstram que a farmacopuntura e EA apresentam uma eficácia no alívio da dor neuropática a CRO apresenta prolongado efeito antinociceptivo em modelos de dor, ambos envolvendo ativação de receptores opióides. Torna-se necessário investigar modelos experimentais de DN induzida por PAC e associação de diferentes possibilidades terapêuticas, a fim de beneficiar tratamentos alternativos futuros, onde a dor poderia ser um fator limitante, justificando assim o presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo da farmacopuntura simultaneamente com ou sem a utilização da CRO, combinado com a EA na prevenção, no desenvolvimento e após a indução da dor de origem neuropática pelo quimioterápico PAC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o tratamento de farmacopuntura com CRO nos acupontos (E36 e B60) combinado com a EA de baixa frequência (2Hz ou 2/15Hz), é capaz de prevenir a instalação da DN induzida por PAC.

- Avaliar o efeito antinociceptivo, no tratamento de farmacopuntura com CRO nos acupontos (E36 e B60) combinado com a EA em diferentes frequências (2 Hz ou 2/15 Hz), no desenvolvimento e após a indução da DN por PAC;

- Avaliar o envolvimento do tratamento em prevenir alterações centrais resultantes do processo crônico, através da diminuição da expressão de astrócitos e das células da glia por ensaio de *Western Blotting*;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 8 ratos Wistar por grupo, machos, com peso inicialmente 200 gramas provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurociência, Neuromodulação e Estudo da Dor (LANNED), em sala apropriada, com isolamento acústico, sob condições de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro/escuro (12:12 h) controlados, com livre acesso à ração e água até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL. Projeto Aprovado pelo Comitê de Ética da UNIFAL registrado sob o número 0038/2022 (ANEXO I).

4.2 MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

Os animais foram induzidos ao modelo de dor neuropática periférica através de múltiplas injeções de PAC de acordo com protocolos relatados anteriormente (BOYETTE-DAVIS *et al.*, 2011; POLOMANO *et al.*, 2001; ZHANG, *et al.*, 2016). Resumidamente, 6 mg/ml de PAC foi diluído com solução salina estéril a 0,9% para 1 mg/ml e administrado em uma dosagem de 2 mg/kg intraperitonealmente (i.p.) em dias alternados para um total de quatro injeções (Exemplificando: dias 0, 2, 4 e 6). Estudos prévios, mostraram que animais tratados com PAC apresentaram uma diminuição significativa no limiar de retirada mecânica mais pronunciada no 14^o dia. Os animais controle receberam um volume equivalente de veículo de solução salina para atingir uma concentração semelhante aos animais tratados com Taxol (BOYETTE-DAVIS *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2019; POLOMANO *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2016).

4.3 TESTE DO LIMIAR MECÂNICO - VON FREY

Para avaliar o limiar mecânico, foi utilizado o teste de filamentos de *Von Frey*. Os animais foram colocados em uma sala silenciosa, em caixas de acrílico, sobre uma tela de arame permitindo acesso à pata desses animais, 30 minutos antes da estimulação, para ambientação ao local. Os animais foram individualmente colocados em caixas acrílicas, medindo 23x20x18 cm, dispostas sobre uma mesa com assoalho de grade de aço não maleável com 5 mm² de espaço entre as malhas.

Por entre as malhas de assoalho, foi aplicada a ponta da haste de estimulação no centro plantar das patas traseiras do rato, até que o animal exiba a resposta de retirada da pata estimulada. O método em si, consiste em uma sequência algorítmica de 8 filamentos de nylon com variações progressivas de pressão. A gramatura se deu a partir de 2,0g. Desta forma, foi aplicado um estímulo de pressão leve e constante na região central da pata direita, até que houvesse uma retirada ou *flinch* da pata traseira. Se o animal apresentou resposta positiva a determinada gramatura, o filamento anterior de menor gramatura foi testado; e se apresentou uma resposta negativa, o filamento de maior força foi testado, e então, foi repetido até que o limiar fosse determinado. O estímulo foi realizado 5 vezes consecutivas. O limiar foi determinado usando o paradigma de teste *up-down*, e o limiar de retirada da pata de 50% foi calculado pelo teste não paramétrico de Dixon (CHAPLAN, 2004).

4.4 TESTE DE CAMPO ABERTO

O Teste de Campo Aberto ou *Open Field* (OF) foi utilizado para avaliar deslocamento espontâneo. É realizado através de um dispositivo circular e no presente estudo foi registrado o número total de quadrantes que os animais atravessaram com as quatro patas durante 5 minutos de exposição à arena de campo aberto (WALSH; CUMMINS, 1976).

O comportamento demonstrado pelo animal depende de sua interação com diversos fatores, que são eles: a estimulação através da remoção do animal de seu ambiente familiar; estimulação envolvida na transferência do animal para o campo aberto; exposição ao ambiente de teste, consistindo do próprio campo aberto e seus arredores; e experiências prévias à situação de teste. Quando o animal já foi previamente exposto ao teste, ele pode sofrer habituação e aprendizagem de resposta

ao ambiente do OF (WALSH; CUMMINS, 1976).

4.5 TESTE DE ALODINIA AO FRIO COM ACETONA

Conforme descrito por Flatters e Bennett (2004), a alodinia ao frio foi avaliada, com algumas modificações. Os animais foram ambientalizados em caixas acrílicas individuais (9x9x8cm) em uma plataforma elevada de assoalho aramado, proporcionando acesso à superfície ventral das patas, em seguida 20 µL de acetona foi sutilmente aplicada na superfície ventral da pata posterior direita. A resposta comportamental foi avaliada durante 30s e registrada em escores: 0 – nenhuma resposta; 1 – rápida retirada ou movimento brusco da pata; 2 – retirada prolongada ou agitação repetida da pata; 3 – agitação repetida seguida de lambida da pata. A aplicação de acetona foi repetida por três vezes, apresentando intervalos de cinco minutos, e a soma dos escores foram utilizadas para as análises estatísticas (CORDOVA *et al.*, 2011).

4.6 WESTERN BLOTTING

Após a realização dos testes comportamentais e do tratamento, os animais sofreram eutanásia por dose excessiva de isoflurano inalado sob pressão de vapor saturado (aproximadamente 31% a 760mmHg) a temperatura da sala de 20° C, em seguida o corno dorsal do segmento lombar localizados entre L4-L6 foram coletados. Para realização da extração de proteína, as amostras foram homogeneizadas em um volume de 50 µL com RIPA buffer (R0278, Sigma-Aldrich, EUA) com coquetel inibidor de protease e fosfatase (1:300, Sigma- Aldrich, EUA) e congeladas.

Após a coleta de todas as amostras, as amostras foram centrifugadas através de centrifugação que foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As alíquotas de proteínas foram fervidas em tampão Laemmli e em seguida, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8 e 12 %), em aparelho para minigel (Mini-Protean, Biorad, Brasil). Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad). As membranas foram bloqueadas por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente em TBS-T (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, e 0,1 % Tween 20) contendo 5

% de BSA ou em TBS-T contendo 5 % de agente de bloqueio (RPN2125, GE Healthing care, UK), depois lavadas 3 vezes de 5 minutos com 10mL de TBS-T. Em seguida foram incubadas em TBS-T 5 % de BSA ou em TBS-T contendo 5 % de agente de bloqueio com anticorpos anti-TRPV1 (PA1-29421, 1:500, Termofisher, EUA), anti-IBA-1 (Ab178847, 1:1000, Abcam, EUA,) e anti-GFAP (D1F4Q, 1:1000, Cell Signaling, EUA), overnight a 4 °C. Posteriormente, as membranas foram lavadas por 5 minutos e 3 repetições com 10 mL de TBS-T e então incubadas por 1 hora e 30 minutos com anti-IgG do animal produtor do respectivo anticorpo primário conjugado a peroxidase (1:5000, Abcam, EUA). As bandas foram visualizadas utilizando solução ECL (Pierce) em fotodocumentador com sistema de captura digital de imagem (UVITEC Cambridge). A densidade óptica das bandas foi determinada pelo programa UVITEC Cambridge. A quantidade de proteína de membrana foi normalizada pela incubação da membrana com anticorpo para GAPDH (1:5000, Ab8245, Abcam, EUA) ou beta-actina (1:5000, A5316, Sigma Aldrich, EUA).

4.7 DROGAS E REAGENTES

- Veículo Salina- NaCl- a 0,9%.
- Isoflurano 0,5% (Cristália).
- Crotalina (CRO, Proteimax, Brasil), foi fornecida pelo Laboratório de Dor e Sinalização (LEDS) do Instituto Butantan e obtida por meio de síntese peptídica em fase sólida, através de estratégia Fmoc. A CRO foi diluída em água destilada e administrada no acuponto E36 e B60.
 - Paclitaxel (PAC, 6 mg/ml diluído com solução salina estéril a 0,9% para 1 mg/ml). Foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPI's) para manipulação e aplicação da PAC.

4.8 ELETROACUPUNTURA

Com os animais levemente anestesiados por vaporização de isoflurano (0,5%). O ponto de acupuntura E36, foi localizado posteriormente na articulação do joelho e 1,5 mm lateral à extremidade distal do tubérculo anterior da tibia (KIM *et al.*, 2018). O acuponto B60 foi localizado no nível da articulação do tornozelo e entre a ponta do maléolo externo e o calcâneo (LI *et al.*, 2019). Foi realizada aplicação bilateral (LI *et*

al., 2019) com agulhas de acupuntura (DBC, de 0,18 mm de espessura e 8mm de comprimento). Para a execução da eletroestimulação foi utilizado o aparelho EL 608 (NKL) com corrente contínua, frequência de 2 Hz (grupos EA 2 Hz) e 2/15Hz (grupos EA 2/15 Hz), com largura de pulso de 500 μ s, duração 30 minutos, e intensidade ajustável a cada animal, no limiar de contração muscular (entre 0,5 a 1,5mA). Animais falso-estimulados (grupos EA *Sham*) foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto que o aparelho de EA foi mantido desligado durante os 30 minutos de falsa estimulação (SILVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

4.9 FARMACOPUNTURA E CRO

Com os animais levemente anestesiados com vaporização de isoflurano (0,5%), a CRO foi administrada de forma subcutânea e na concentração de 0.6ng/ponto, diluída em salina estéril (ZAMBELLI *et al.*, 2014), utilizando seringa de insulina de 1ml, bilateralmente na pata traseira do animal nos acupontos E36 e B60. Nos grupos controle foi administrada solução de salina 5mm abaixo do acuponto (VIEIRA *et al.*, 2018).

4. 10 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em grupos 33 grupos de 8 animais. Sendo grupo experimental de dor: preventivo, indução (durante) e após (tratamento) indução de neuropatia por PAC. Abaixo, temos a divisão dentro de cada grupo experimental

Quadro 1 - Grupos Experimentais

(continua)

GRUPOS	TRATAMENTOS
GPreemp1	(SALINA ^{14d} + SALINA + EA SHAM)
GPreemp2	(SALINA ^{14d} + SALINA + EA 2/15Hz)
GPreemp3	(SALINA ^{14d} + SALINA + EA 2Hz)
GPreemp4	(SALINA ^{14d} + CRO + EA 2/15Hz)
GPreemp5	(SALINA ^{14d} + CRO + EA 2Hz)
GPreemp6	PAC ^{14d} + (SALINA + EA SHAM)
GPreemp7	PAC ^{14d} + (SALINA + EA 2/15Hz)
GPreemp8	PAC ^{14d} + (SALINA + EA 2Hz)
GPreemp9	PAC ^{14d} + (CRO + EA SHAM)
GPreemp10	PAC ^{14d} + (CRO + EA 2/15Hz)
GPreemp11	PAC ^{14d} + (CRO + EA 2Hz)
GInd1	SALINA + (SALINA + EA SHAM) ^{14d}
GInd2	SALINA + (SALINA + EA 2/15Hz) ^{14d}
GInd3	SALINA + (SALINA + EA 2Hz) ^{14d}
GInd4	SALINA + (CRO + EA 2/15Hz) ^{14d}
GInd5	SALINA + (CRO + EA 2Hz) ^{14d}
GInd6	PAC + (SALINA + EA SHAM) ^{14d}
GInd7	PAC + (CRO + EA SHAM) ^{14d}
GInd8	PAC + (SALINA + EA 2/15Hz) ^{14d}
GInd9	PAC + (SALINA + EA 2Hz) ^{14d}
GInd10	PAC + (CRO + EA 2/15Hz) ^{14d}
GInd11	PAC + (CRO + EA SHAM) ^{14d}
GTrat1	SALINA ^{14d} + (SALINA + EA SHAM)
GTrat2	SALINA ^{14d} + (SALINA + EA 2/15Hz)
GTrat3	SALINA ^{14d} + (SALINA + EA 2Hz)

Quadro 2 - Grupos Experimentais

(conclusão)

GRUPOS	TRATAMENTOS
GTrat4	SALINA ^{14d} + (CRO + EA 2/15Hz)
GTrat5	SALINA ^{14d} + (CRO + EA 2Hz)
GTrat6	PAC ^{14d} + (SALINA + EA SHAM)
GTrat7	PAC ^{14d} + (SALINA + EA 2/15Hz)
GTrat8	PAC ^{14d} + (SALINA + EA 2Hz)
GTrat9	PAC ^{14d} + (CRO + EA SHAM)
GTrat10	PAC ^{14d} + (CRO + EA 2/15Hz)
GTrat11	PAC ^{14d} + (CRO + EA 2Hz)

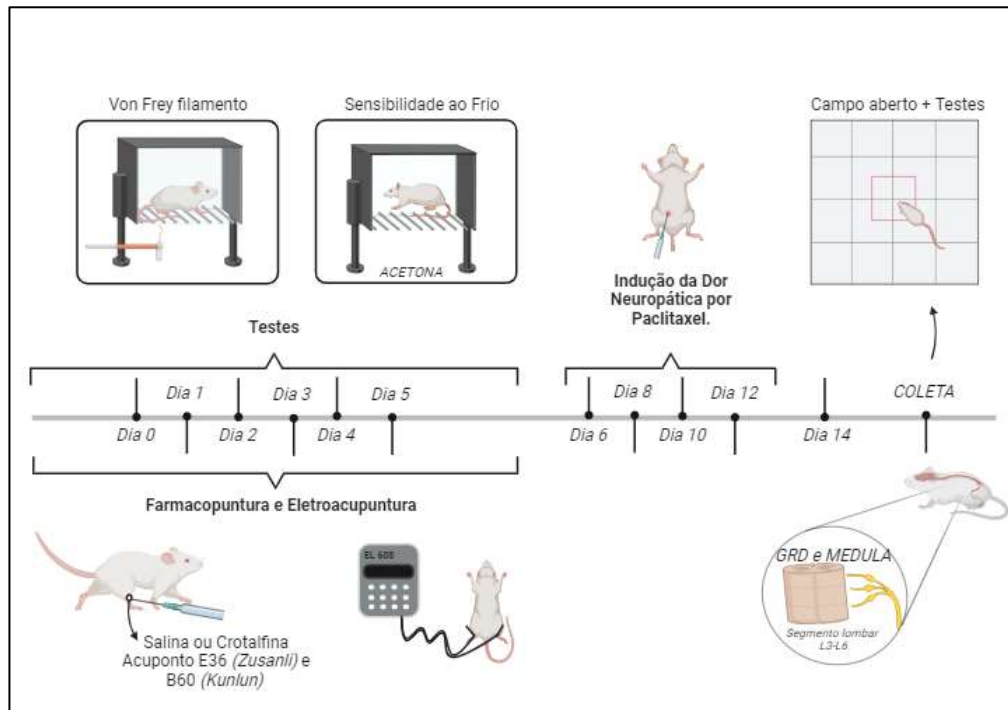
Fonte: Autora (2024).

Legenda: Grupo Preventivo: Gpreemp; Grupo Indução: Gind; Grupo Tratamento: Grat; EA: Eletroacupuntura; PAC: Paclitaxel; CRO: Crotálfina; Hz: Hertz; EA *sham*: Aparelho desligado; 14d: 14 dias.

4.10.1 Protocolo Experimental

Os animais tiveram as medidas basais do limiar mecânico e alodinia ao frio avaliadas previamente à indução da dor neuropática por quimioterápico e foram divididos em grupos, conforme demonstrado na Tabela 1. Em seguida, o Grupo Prevenção (Gpreemp) (Figura 1) realizou a farmacopuntura e a eletroacupuntura nos dias 1, 3, 5 e foi avaliado o limiar mecânico, sensibilidade ao frio (0, 2, 4 e 6), posteriormente, foi administrado o PAC nos dias 6, 8, 10, 12 e, por fim, no 14º dia foi feito os testes e o teste do Campo Aberto, e os animais tiveram a medula espinhal retirada para o ensaio de *Western Blotting*.

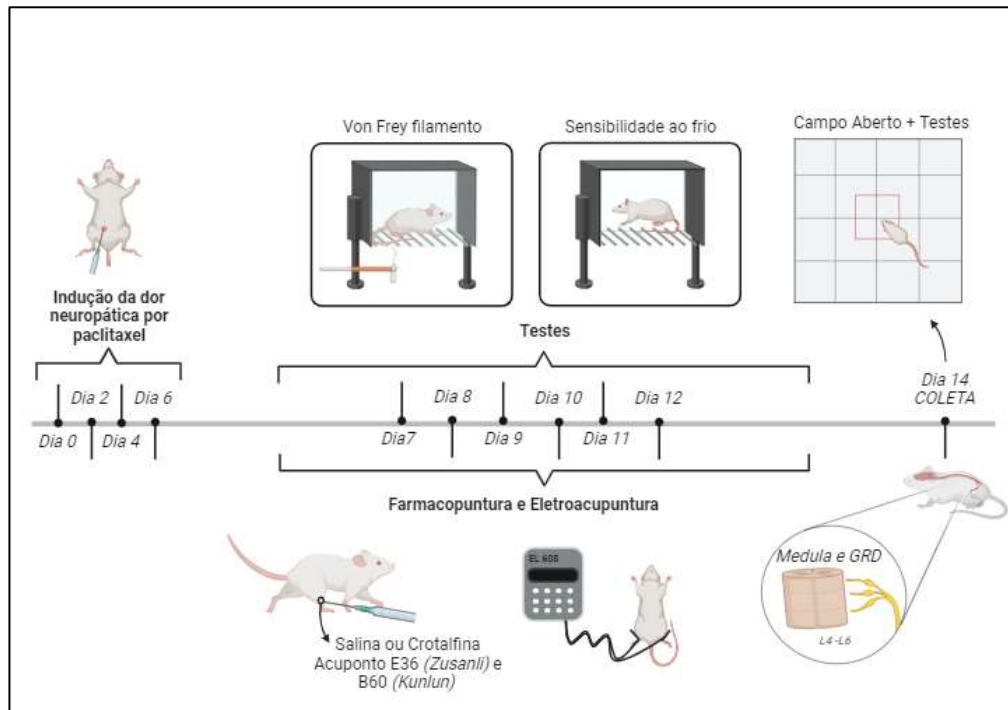
Figura 1 - Delineamento experimental do Gpreemp.



Fonte: Autora (2024).

O Grupo Indução (Gind) (Figura 2) recebeu a injeção de PAC nos dias 0, 2, 4 e 6 e as medidas de limiar mecânico e sensibilidade ao frio foram avaliadas nos dias 0, 7, 9, 11 e 14. O tratamento de farmacopuntura e eletroacupuntura foi realizado intercalado aos testes, nos dias 8, 10 e 12. No 14º dia da indução da dor foi novamente avaliada as sensibilidades térmicas e mecânicas, além disso também foi realizado o teste do campo aberto e por fim, foi realizada a coleta para o ensaio de *Western Blotting*.

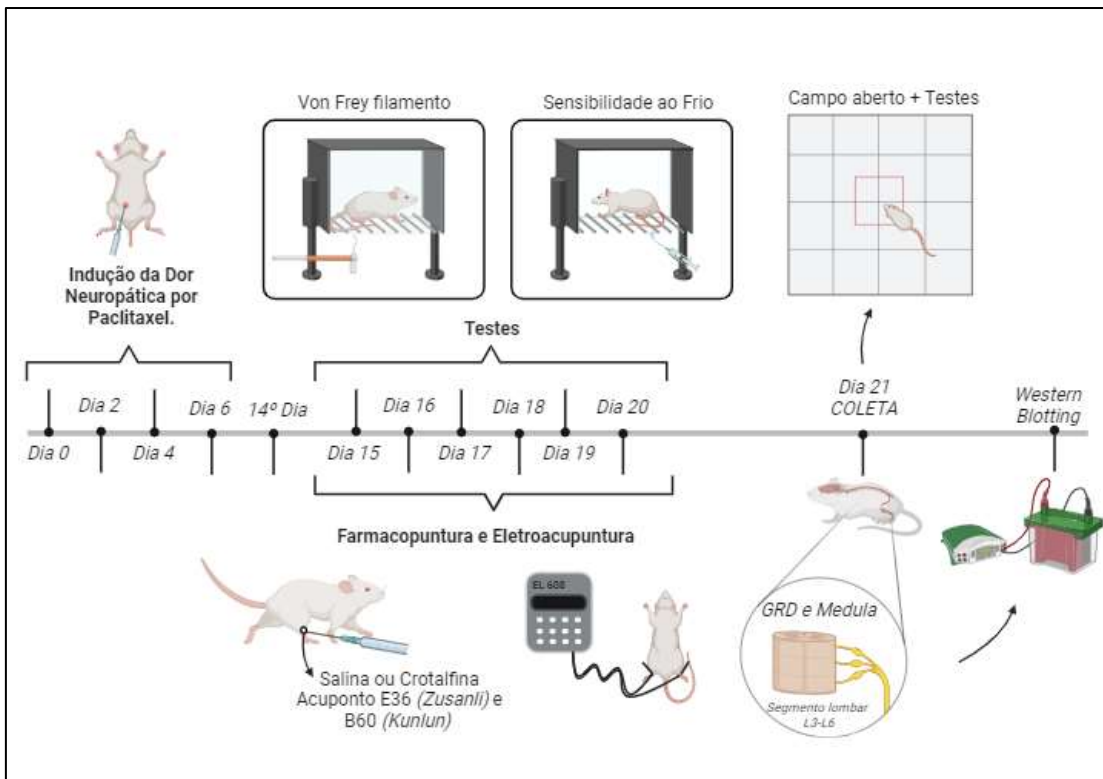
Figura 2 - Delineamento experimental do Gind.



Fonte: Autora (2024).

Já no Grupo Tratamento (Gtrat) (Figura 3) foi administrado PAC nos dias 0, 2, 4 e 6 e no 15º dia foi realizado os testes de limiar mecânico e sensibilidade ao frio, em seguida, o tratamento dos animais com farmacopuntura e eletroacupuntura, seguindo nos dias 16, 18, 20, intercalado nos dias 0, 15, 17, 19 e 21 com a realização dos testes e campo aberto. Em conclusão, no 22º dia foi realizado a coleta da medula espinal para a realização do ensaio de *Western Blotting*.

Figura 3 - Delineamento experimental do Gtrat.



Fonte: Autora (2024).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como a média \pm EPM. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais, foi utilizada a análise de variância de duas vias (*Two-Way ANOVA*), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram consideradas estatisticamente significativos os valores com $P < 0,05$. Os dados obtidos pelo campo aberto foi utilizado a análise de variância (*One-Way ANOVA*) com o teste de múltiplas comparações *Tukey*. Já, para o tratamento estatístico dos dados obtidos pelos ensaios moleculares foi utilizado a análise de variância (*One-Way ANOVA*). As análises estatísticas e elaboração de figuras foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 8.

5 RESULTADOS

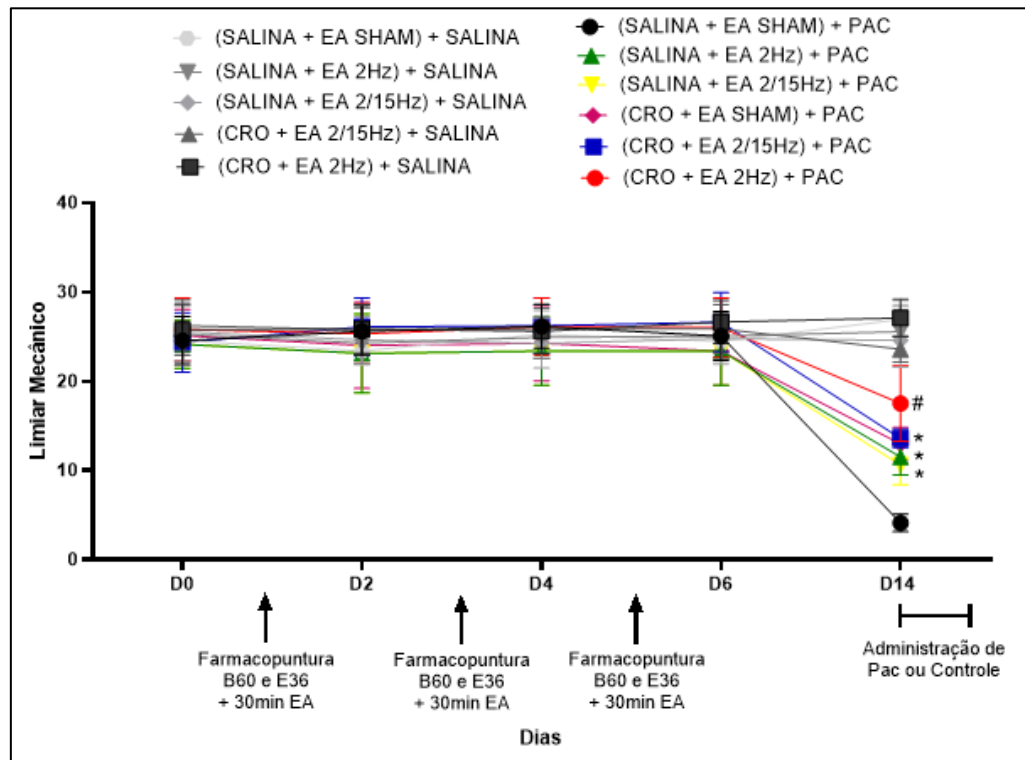
5.1 ABORDAGEM DO PRÉ-TRATAMENTO NO MANEJO DA INDUÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA POR PACLITAXEL

Primeiramente, foi estabelecido o modelo de indução de dor induzida por PAC de acordo com protocolos evidenciados anteriormente (BOYETTE-DAVIS *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2019; POLOMANO *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2016).

Não se observou alteração significativa do limiar mecânico em animais que foram realizadas administrações de salina, falso estimulados (EA *sham*) e animais que tiveram administração de Salina na farmacopuntura.

Os animais foram submetidos à farmacopuntura e eletroacupuntura conforme o protocolo descrito e os resultados são apresentados na Figura 4. Após a intervenção no GPreemp nos dias 0, 2 e 4, observou-se que os animais submetidos à farmacopuntura exibiam um aumento no limiar mecânico, indicando uma menor sensibilidade à dor mecânica. Esta alteração foi significativa com os animais mostrando um limiar mecânico quase duas vezes superior ao grupo controle (Salina + EA *sham* + Salina). Foi possível analisar um aumento no limiar mecânico mais acentuado no grupo que obteve como tratamento EA 2Hz ou 2/15Hz combinado a farmacopuntura de CRO.

Figura 4 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) no limiar mecânico dos animais pertencentes ao Grupo Prevenção.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: Dados obtidos nos grupos que receberam PAC ou Salina, através do teste de Von Frey do Limiar mecânico da pata. Sendo realizada as medidas nos dias 0, 2, 4, 6 e 14 (D0, D2, D4, D6 e D14, respectivamente), com a realização preventiva do tratamento. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida basal (D0), # $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (Salina + Salina + EA sham).

A análise estatística mostrou que as curvas da Figura 4 diferiam significativamente em relação ao tratamento ($F_{10,495} = 20,63$; $p < 0,001$), tempo ($F_{4,495} = 108,6$; $p < 0,001$) e havia uma interação significativa entre tratamento e tempo ($F_{40,495} = 12,52$; $p < 0,001$).

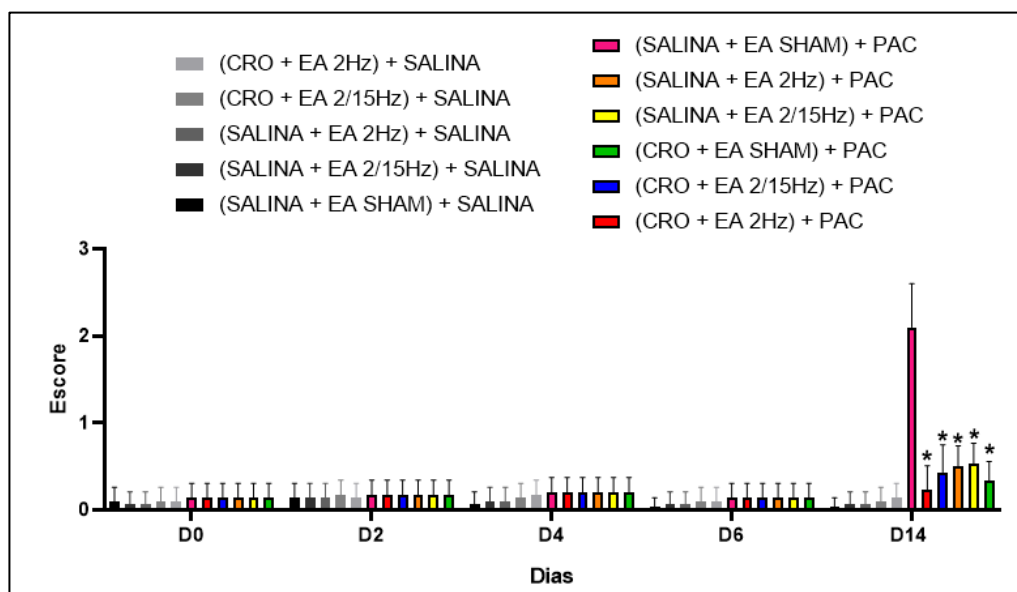
Quanto à sensibilidade ao frio (Figura 5), nos dias 0, 2, 4 e 6 não houve diferença significativa entre os grupos. O teste *post hoc* de múltiplas comparações de Bonferroni evidenciou que os grupos que realizaram o pré-tratamento, sendo farmacopuntura e/ou EA, apresentaram uma diminuição da sensibilidade ($p < 0,001$) ao frio no dia 14º dia quando comparados ao grupo controle. Em ambos os testes, foi possível analisar que não houve diferença estatística entre os grupos que tiveram

administração de Salina como controle da indução da DN.

As curvas da Figura 5 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{10,495} = 25,26$ $p < 0,001$) e tempo ($F_{4,495} = 51,21$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{40,495} = 19,05$; $p < 0,001$).

Não se observou alteração significativa da alodinia ao frio em animais que foram realizadas administrações de salina, falso estimulados (EA *sham*) e animais que tiveram administração de Salina na farmacopuntura.

Figura 5 – Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) na alodinia ao frio dos animais pertencentes ao Grupo Prevenção.

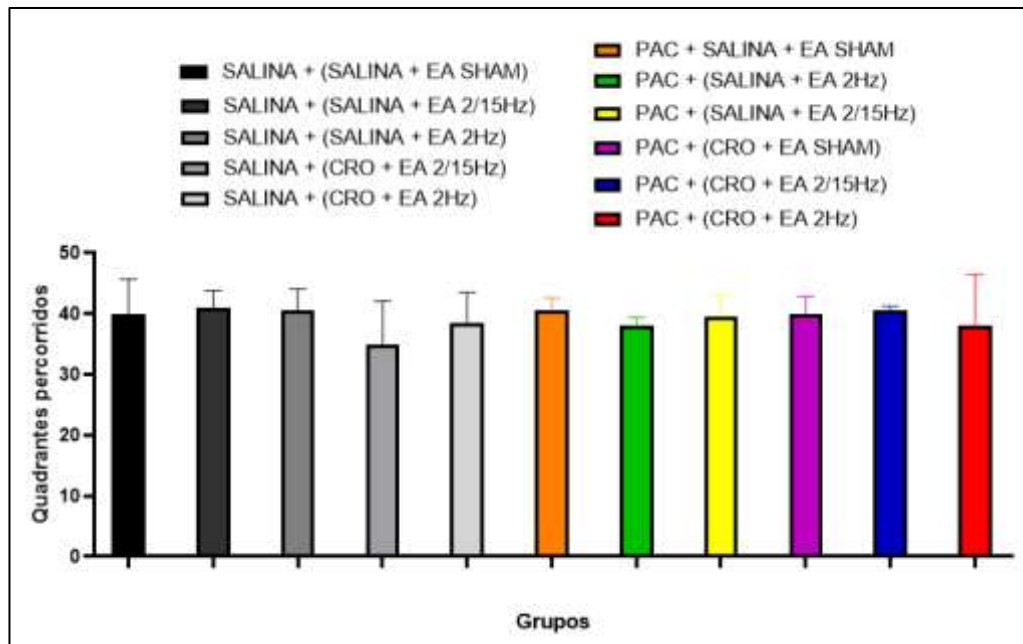


Fonte: A autora (2024).

Legenda: Dados obtidos pelo teste de Acetona para avaliação do limiar de alodinia ao frio nos grupos que receberam PAC ou Salina (controle), pré-tratados com farmacopuntura de CRO ou Salina, e EA 2Hz, 2/15Hz ou *Sham* EA. Sendo realizada as medidas basais no 1º dia, (representado por D0), instalação da dor avaliada no 14º dia (representado por D14), e demais medidas realizadas pré-tratamento nos dias 2, 4 e 6 (D2, D4, D6, respectivamente). Os dados representam a média \pm e.p.m. de 8 animais por grupo. (*) $p < 0,05$ por comparação com as medidas do Grupo Controle (EA *sham* + Farmacopuntura de Salina + Salina).

No teste do campo aberto, realizado no 14º dia, os animais não diferiram estatisticamente comparados com o grupo controle (Salina, Salina e EA *sham*) nos dados obtidos através do deslocamento espontâneo, ou seja, no número de quadrantes ultrapassados (Figura 6).

Figura 6 - Teste de Campo Aberto dos animais do Grupo Prevenção.



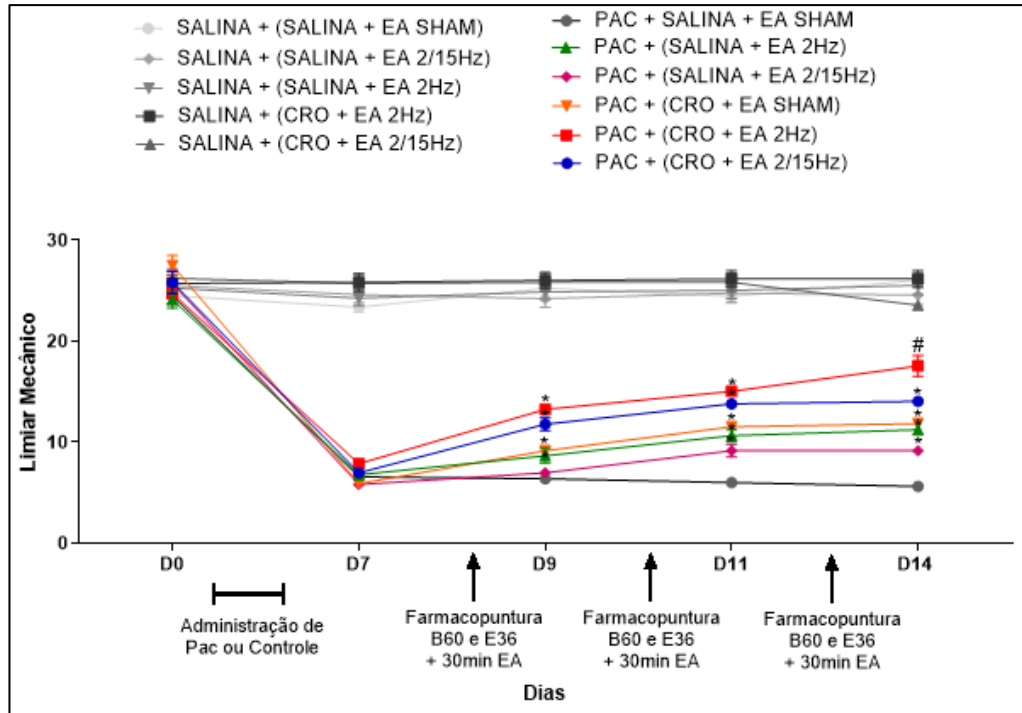
Fonte: A autora (2024).

Legenda: Dados obtidos pelo teste de Campo Aberto, sendo realizado no 14º dia de experimento. Os dados representam a média ± e.p.m. de 2 animais por grupo. $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (Salina + Salina + EA sham).

5.2 A ELETROACUPUNTURA ALTERA A INDUÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

No experimento com o grupo GInd (Figura 6 e 7), após a indução de neuropatia por PAC nos dias 0, 2, 4 e 6, observou-se que os animais exibiam uma diminuição significativa no limiar mecânico e um aumento na sensibilidade ao frio no dia 7, comparado aos valores basais (D0). Não se observou alteração significativa no limiar mecânico e alodinia ao frio em animais que foram realizadas administrações de salina, falso estimulados (EA sham) e animais que tiveram administração de Salina na farmacopuntura.

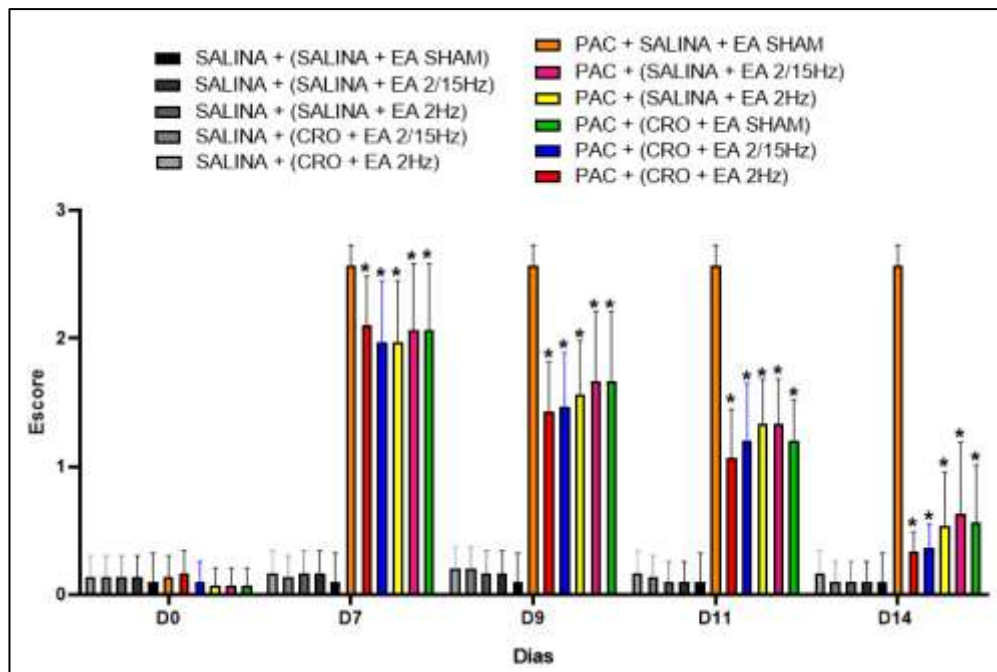
Figura 7 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) no limiar mecânico dos animais pertencentes ao Grupo Indução.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: Dados obtidos pelo teste de Von Frey do Limiar mecânico da pata nos grupos que receberam PAC ou Salina (controle). Sendo realizada as medidas nos dias 0, 7, 9, 11 e 14 (D0, D7, D9, D11 e D14, respectivamente), alternada aos dias de tratamento do Grupo Indução. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida basal (D0), # $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (Salina + Salina + EA sham).

Figura 8 – Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) na alodinia ao frio dos animais pertencentes ao Grupo Indução.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: Dados obtidos pelo teste de Acetona para avaliação do limiar de alodinia ao frio nos grupos que receberam PAC ou Salina (controle), tratados com farmacopuntura de CRO ou Salina, e EA 2Hz, 2/15Hz ou *Sham* EA. Sendo realizada as medidas basais no 1º dia, (representado por D0), instalação da dor avaliada no 14º dia (representado por D14), e demais medidas realizadas alternadas ao tratamento foram realizadas nos dias 7, 9, 11 e 14 (D7, D9, D11 e D14, respectivamente). Os dados representam a média \pm e.p.m. de 8 animais por grupo. (*) $p < 0,05$ por comparação com as medidas do Grupo Controle (EA *sham* e Farmacopuntura de Salina).

Após o tratamento com farmacopuntura e EA (2Hz e 2/15Hz) nos dias 8, 10 e 12, houve uma melhora notável nas sensibilidades térmicas e mecânicas. No dia 9, o limiar mecânico melhorou em relação ao dia 7, enquanto a sensibilidade ao frio diminuiu. No dia 11, após o segundo tratamento, o limiar mecânico melhorou estatisticamente, em relação ao dia 7, e a sensibilidade ao frio reduziu em relação ao dia 7.

No 14º dia, foi possível analisar que os grupos que realizaram farmacopuntura CRO combinado com EA 2Hz e o que realizou farmacopuntura com CRO combinado com EA 2/15Hz apresentaram o limiar mecânico se aproximando aos níveis basais comparados aos demais grupos e não houve diferença estatística entre eles. Foi observado também, que o grupo que realizou farmacopuntura de CRO e EA *sham*

(aparelho desligado) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo que realizou farmacopuntura de CRO combinada com EA 2/15Hz.

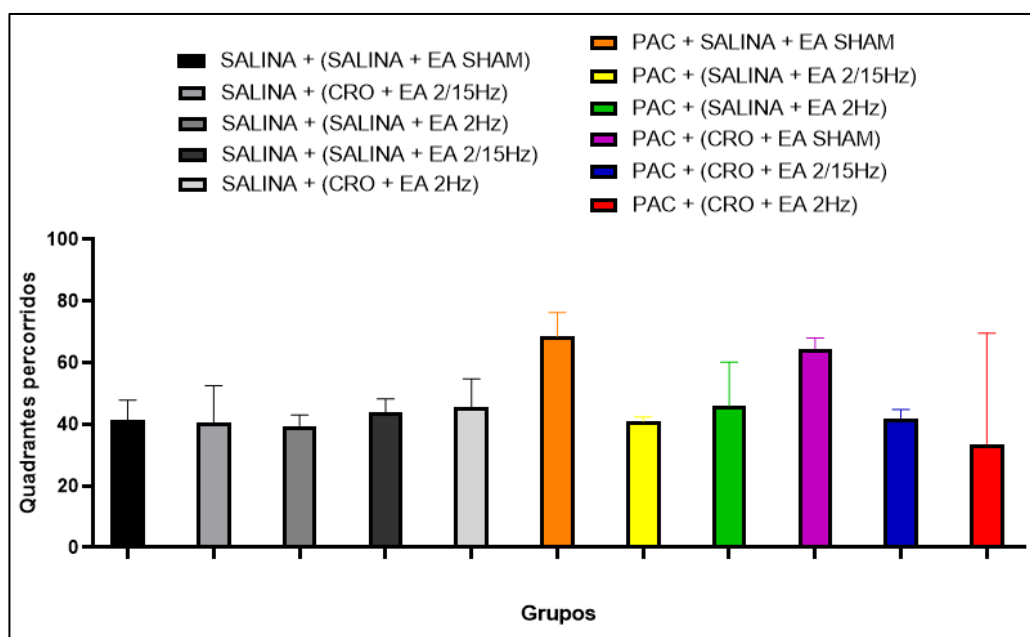
Portanto, após a administração da CRO nos dias 8, 10 e 12, os testes comportamentais realizados no 14^o dia mostraram que o limiar mecânico e a sensibilidade ao frio se aproximaram do nível basal as sensibilidades térmicas e mecânicas mostraram uma melhoria adicional.

Com relação ao tratamento, a análise de variância mostrou uma diferença significativa no limiar mecânico (Figura 7) entre os animais que receberam farmacopuntura e eletroacupuntura comparados com os que não receberam o tratamento após a indução da neuropatia por PAC ($F_{4,495} = 343,1$; $p < 0,001$). Relativamente ao dia de teste, também houve uma diferença estatisticamente significativa ao longo dos dias 7, 9 e 11 ($F_{10,495} = 416,2$; $p < 0,001$), refletindo a progressivo aumento do limiar mecânico após cada sessão de tratamento. Além disso, houve uma interação significativa entre tratamento e tempo ($F_{10,495} = 29,70$; $p < 0,001$), indicando que a eficácia do tratamento variou ao longo do período experimental.

As curvas da Figura 8 foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{4,495} = 244,9$ $p < 0,001$) e tempo ($F_{10,495} = 243,6$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{10,495} = 25,42$; $p < 0,001$).

A locomoção no teste do campo aberto não apresentou diferença estatística quando comparada entre os grupos (Figura 9).

Figura 9 - Teste do Campo Aberto realizado com o Grupo Indução.



Fonte: A autora (2024).

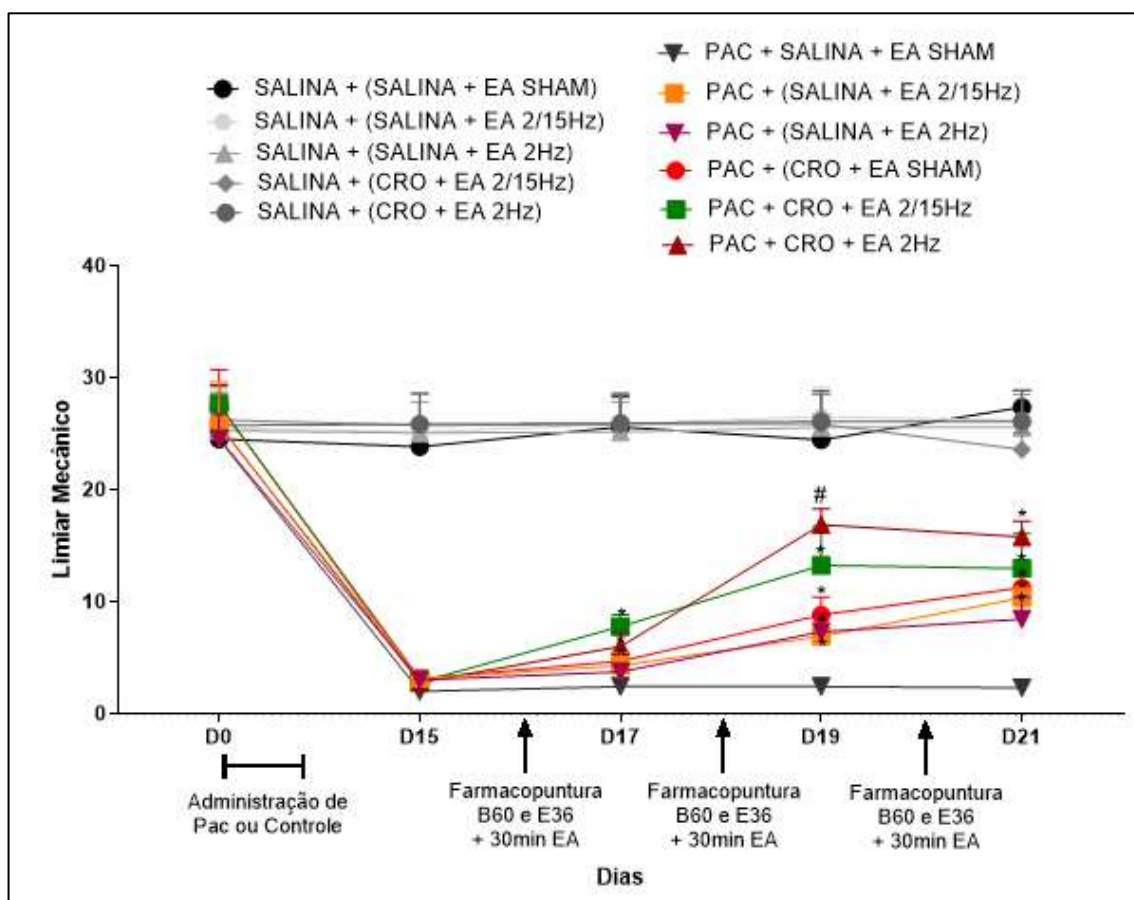
Legenda: Dados obtidos pelo teste de Campo Aberto, sendo realizado no 14º dia de experimento. Os dados representam a média ± e.p.m. de 2 animais por grupo. $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (Salina + Salina + EA sham).

5.2 A ELETROACUPUNTURA REDUZIU SIGNIFICATIVAMENTE A DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL

Não se observou alteração significativa do limiar mecânico em animais que foram realizadas administrações de salina, falso estimulados (EA sham) e animais que tiveram administração de Salina na farmacopuntura.

Após o estabelecimento do modelo de indução de dor induzida por PAC de acordo com protocolos relatados anteriormente (BOYETTE-DAVIS *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2019; POLOMANO *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2016), as medidas basais dos animais foram avaliadas antes de qualquer intervenção, em seguida foram realizadas quatro administrações de PAC em dias alternados e após a indução de neuropatia no grupo GTrat, foi evidenciado uma diminuição significativa no limiar mecânico e um aumento na sensibilidade ao frio no 15º dia (Indicado por D15 na Figura 10 e Figura 11), em comparação com as medidas basais (realizado em D0) e animais do grupo controle. Esses resultados são condizentes com estudos anteriores, indicando o estabelecimento da DN induzida por PAC em ratos.

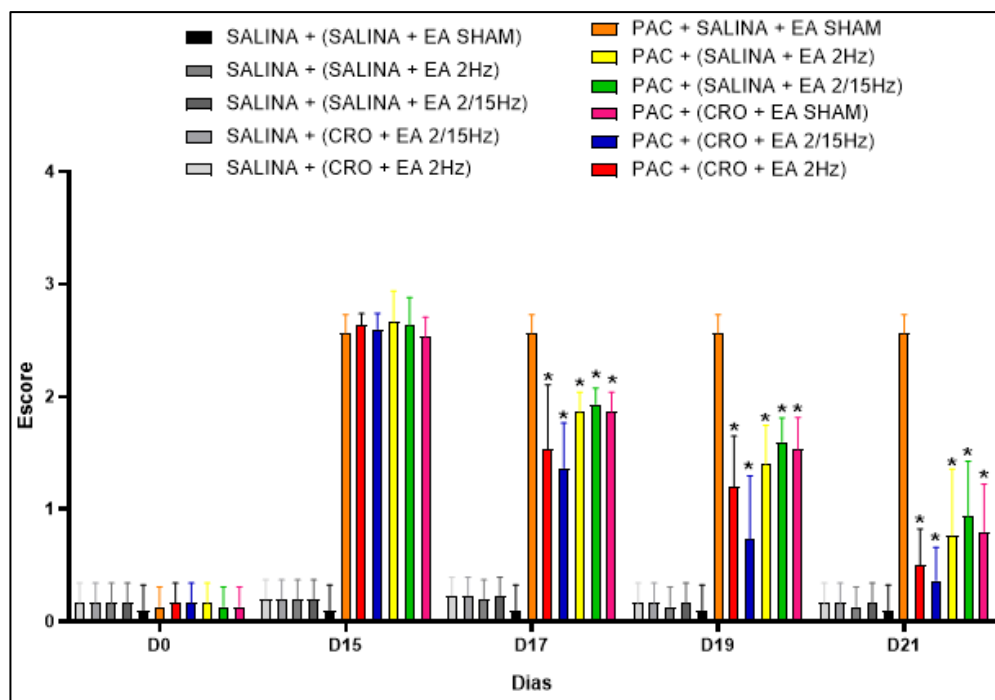
Figura 10 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) no limiar mecânico dos animais pertencentes ao Grupo Tratamento.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: Dados obtidos pelo teste de Von Frey do Limiar mecânico da pata nos grupos que receberam PAC ou Salina (controle). Sendo realizada as medidas nos dias 0, 15, 17, 19 e 21 (D0, D15, D17, D19 e D21, respectivamente), alternada aos dias de tratamento. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida basal (D0) # $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (Salina + Salina + EA sham).

Figura 11 - Efeitos da administração de Farmacopuntura de Crotalina associada à Eletroacupuntura de baixa frequência (2Hz e 2/15Hz) na alodinia ao frio dos animais pertencentes ao Grupo Tratamento.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: Dados obtidos pelo teste de Acetona para avaliação do limiar de alodinia ao frio nos grupos que receberam PAC ou Salina (controle), tratados com farmacopuntura de CRO ou Salina, e EA 2Hz, 2/15Hz ou Sham EA. Sendo realizada as medidas basais no 1º dia, (representado por D0), instalação da dor avaliada no 15º dia (representado por D15), e demais medidas realizadas alternadas ao tratamento foram realizadas nos dias 17, 19 e 21 (D17, D19 e D21, respectivamente). Os dados representam a média \pm e.p.m. de 8 animais por grupo. (*) $p < 0,05$ por comparação com o as medidas do Grupo Controle (EA sham, Farmacopuntura de Salina e Salina).

A próxima etapa consistiu em realizar a farmacopuntura de CRO nos acupontos B60 e E36, bilateramente nas patas traseiras dos animais e aplicar EA de 2Hz ou 2/15Hz. Desta forma, o tratamento começou dois dias após a instalação da dor e, sendo assim, foi realizado nos dias 16, 17 e 19.

Após a introdução do tratamento com farmacopuntura e eletroacupuntura nos dias 16, 17 e 19, observou-se entre os grupos uma melhora progressiva nas medidas: No dia 16, após o primeiro tratamento, o limiar mecânico mostrou um aumento em comparação ao 15º dia e a sensibilidade ao frio diminuiu.

No dia 17, após o segundo tratamento, o limiar mecânico aumentou em comparação ao 16º dia, enquanto a sensibilidade ao frio diminuiu. No dia 19, após o

terceiro tratamento, as medidas de limiar mecânico e sensibilidade ao frio estavam se mantendo.

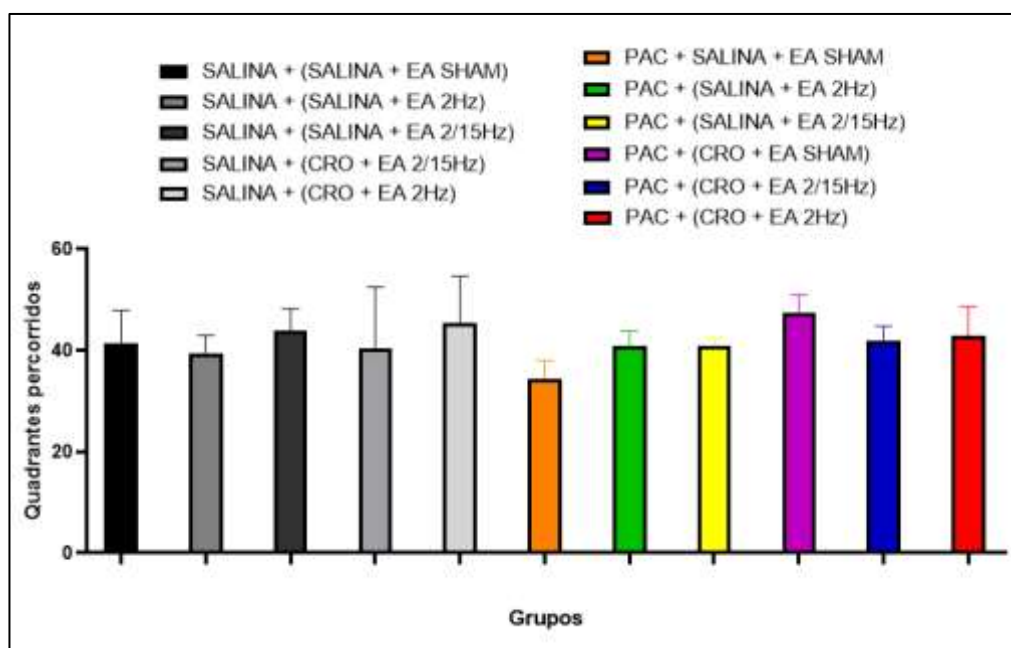
Sendo assim, em relação aos dados apresentados (Figura 8) do limiar mecânico dos animais aferidos através do *Von frey* filamento, o teste *Two-Way* ANOVA mostrou que houve diferenças significativas em relação ao tempo ($F_{4,495}=541,5$, $p<0,0001$), em relação aos tratamentos ($F_{10,495}=634,2$, $p<0,0001$) e na interação tempo x tratamento ($F_{40,495}=51,28$, $p<0,0001$). O teste *post hoc* de múltiplas comparações de Bonferroni evidenciou que, após 15 dias da primeira administração de PAC houve uma diminuição do limiar mecânico ($p<0,001$) dos animais.

Em referência ao teste de acetona foi evidenciado diferença estatística entre as medidas do 15º dia e após os tratamentos realizados, em relação ao tempo ($F_{4,495}=435,9$, $p<0,0001$), em relação aos tratamentos ($F_{10,495}=376,1$, $p<0,0001$) e na interação tempo x tratamento ($F_{40,495}=44,88$, $p<0,0001$).

Desta forma, houve uma diferença significativa entre as medidas do 15º dia e as medidas pós-tratamento, sugerindo que a eficácia do tratamento foi mais pronunciada com cada sessão subsequente.

Os resultados indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos em relação ao teste de Campo Aberto em relação à variável locomoção ($p<0,05$) (Figura 12).

Figura 12 - Teste de Campo Aberto dos animais do Grupo Tratamento.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: Dados obtidos pelo teste de Campo Aberto, sendo realizado no 14^o dia de experimento. Os dados representam a média ± e.p.m. de 2 animais por grupo. $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (Salina + Salina + EA sham).

O presente trabalho buscou investigar a expressão de GFAP e IBA (antígeno de microglia ionizada) em amostras específicas do Grupo Tratamento dos segmentos lombares dos ratos por meio da técnica de *Western Blotting*.

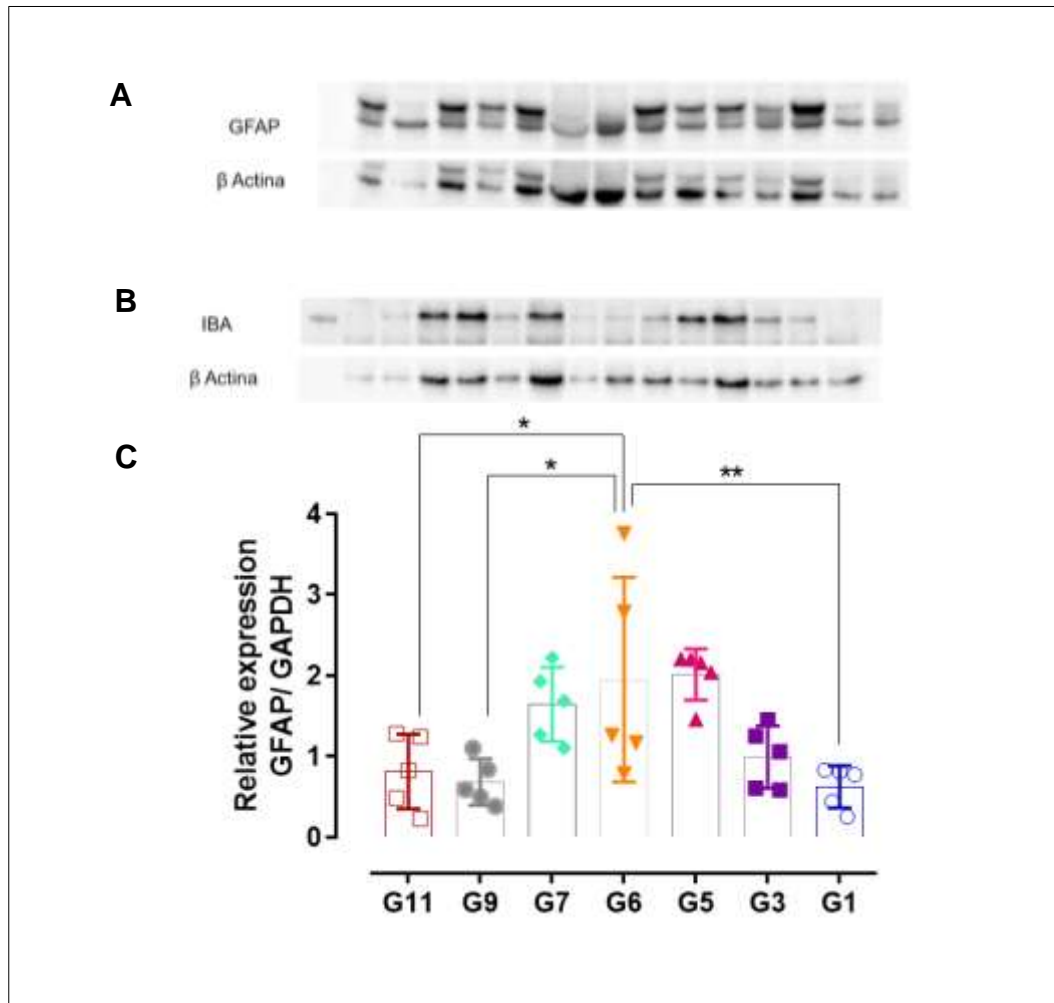
Através do *Western Blotting* foi possível detectar marcadores de astrócitos (GFAP) na medula espinhal (Figura 13 A). No caso da micróglia (IBA) (Figura 13 B), a obtenção de sinais específicos mostrou-se inconsistente, o que pode ser indicativo de questões relacionadas à especificidade dos anticorpos ou a possíveis interferências provenientes do ambiente experimental. A falta de consistência nos resultados pode ser atribuída a diversas fontes potenciais de variação, desde diferenças nas condições de preparação das amostras até a sensibilidade dos reagentes utilizados. A repetição dos ensaios permitirá uma análise mais robusta e a obtenção de resultados mais confiáveis.

Através de análises realizadas em amostras específicas do Grupo Tratamento, foi possível observar que os níveis de proteína de GFAP na medula espinhal foram significativamente aumentados no grupo PAC (G6) em comparação com aqueles do controle (G11 e G9) ($P < 0,05$, $P < 0,01$), esses resultados sugerem uma ativação de

astrócitos após a administração de PAC (Figura 13 C).

Além disso, o tratamento realizado com EA 2Hz e farmacopuntura de CRO (G1) diminuiu acentuadamente a expressão proteica de GFAP ($P < 0,05$) na medula espinhal em comparação com o grupo PAC com EA simulada e administração de salina no acuponto, indicando uma evidente ação inibitória da EA 2Hz combinada com a farmacopuntura de CRO na ativação de astrócitos induzida por PAC. Em contraste, o tratamento simulado com EA sham, farmacopuntura de salina e salina (G11) não mostrou qualquer efeito na expressão proteica elevada de GFAP (Figura 13 C).

Figura 13 - Resultados do *Western Blotting* para avaliar expressão da proteína GFAP e IBA no segmento lombar dos animais.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: Dados obtidos pelo ensaio de *Western Blotting* para avaliação de expressão da proteína GFAP e IBA. Sendo os grupos G1 (PAC, CRO e EA 2Hz); G3 (PAC, Salina e EA 2Hz); G5 (PAC, CRO e EA sham); G6 (PAC, Salina e EA sham); G7 (Salina, CRO e EA 2Hz); G9 (Salina, Salina e EA 2Hz) e G11 (Salina, Salina e EA sham). Sendo realizada a retirada de tecido do segmento lombar (L4-L6) no 22º dia do experimento. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 6 animais por grupo e $p < 0,05$ por comparação com o as medidas do Grupo Controle (EA sham, Farmacopuntura de Salina e Salina). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo PAC (G6); ** $p < 0,05$ em comparação com o grupo PAC (G6); Bandas de *Western blotting* no topo indicam a proteína alvo cortada e as faixas inferiores indicam os controles internos cortados (β -actina).

6 DISCUSSÃO

Os recentes avanços na compreensão da neuropatia induzida por PAC proporcionaram uma visão mais clara das possíveis intervenções terapêuticas. No presente estudo, foi realizado um modelo experimental em ratos de DN induzida por PAC e observado os efeitos da farmacopuntura de CRO combinada com a eletroacupuntura com enfoque nas mudanças comportamentais e fisiológicas associadas ao tratamento, prevenção e durante o estabelecimento da DN.

Em nossos dados, evidenciamos que após a indução da neuropatia pelo PAC, houve uma diminuição notável no limiar mecânico e aumento na sensibilidade ao frio dos animais. Estes resultados corroboram com os estudos anteriores que demonstraram que o PAC pode induzir sintomas neuropáticos em animais (SMITH *et al.*, 2019).

Estudos relatam que a terapia com PAC frequentemente induz neurotoxicidade periférica, sendo um dos problemas clínicos mais comuns e, conseqüentemente, podendo gerar à descontinuação do tratamento. Foi relatado que sintomas neuropáticos induzidos por PAC ocorreram em pacientes tratados de acordo com a intensidade da dose e se manifestaram clinicamente como dormência, formigamento, dor em queimação, hipersensibilidade ao frio e alodinia mecânica (KALVALA *et al.*, 2022; SANKARANARAYANAN *et al.*, 2023). Em alguns casos, os sintomas podem durar até 3 anos após interrupção da terapia, entretanto em outros podem durar a vida toda (KALVALA *et al.*, 2022).

Pesquisas prévias experimentais e clínicas demonstraram que a EA pode ser utilizada como uma terapia eficaz no tratamento da DN induzida por PAC (HAN *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2020).

Para a execução da EA e da farmacopuntura foi realizado a anestesia dos animais com anestésico inalatório isoflurano. O isoflurano é o modelo utilizado para avaliar os efeitos da estimulação pela EA (KUNG *et al.*, 2011).

O isoflurano é um agente anestésico geral inalatório halogenado, volátil, e que promove indução e recuperação rápida do paciente por causa do baixo coeficiente de solubilidade sangue/gás. É potente depressor do SNC, que também promove grau de analgesia leve dependente da dose administrada (BERNARD *et al.*, 1990). Dados da literatura demonstram de forma contundente que a utilização de anestésico inalatório

(0,5 a 1,0%) é uma escolha favorável como alternativa de estresse mínimo em relação à manipulação animal e ações neurais, ou seja, não modifica as respostas do animal à EA (KUNG *et al*, 2011).

Os resultados obtidos indicam não haver diferenças estatísticas entre os limiares de resposta dos animais nos testes antes e após a administração da anestesia inalatória, o que nos leva a sugerir que o aumento do limiar mecânico e diminuição da alodinia ao frio induzido pela EA ocorreu sem a interferência do fator estresse e do anestésico inalatório.

A EA têm sido amplamente estudada para o manejo de dores crônicas, visto que há uma precisão sobre as frequências e os parâmetros de pulsos elétricos (HAN, 2011; ZENG *et al*, 2016). Dados presente na literatura indicam que a EA pode aliviar os sinais comportamentais do aumento da sensibilidade mecânica e térmica associada à DN crônica e que seu efeito depende de parâmetros como frequência, acupontos e intervalo dos tratamentos (JIANG *et al*, 2018; ZENG *et al.*, 2016). Neste estudo identificamos a EA nos acupontos E36 e B60 tanto na frequência de 2Hz quanto na frequência de 2/15Hz.

Desta forma, demonstramos que a EA de 2Hz e 2/15Hz induziram efeitos antinociceptivos, através do aumento do limiar mecânico e diminuição da alodinia ao frio, na DN por PAC nos acupontos B60 e E36. Estudos anteriores sobre acupuntura e eletroacupuntura sugeriram que esses tratamentos podem modular os sistemas de neurotransmissores e as vias inflamatórias para promover alívio da dor (ZHANG *et al.*, 2018).

A estimulação nos acupontos através da EA promove o processamento de informações nociceptivas periféricas, sendo assim seu resultado pode estar associado a diversas vias ascendentes da sensação dolorosa, dispostas nos substratos neurais límbicos e do tronco encefálico (LIN; KOTHA; CHEN, 2022).

Resultados obtidos por Dong *et al.* (2016) e Li *et al.* (2005) ressaltaram que os acupontos *Zusanli* e *Kunlun* são capazes reduzir a hiperalgesia mecânica e alodinia em modelos experimentais.

De forma complementar, estudos demonstram que a ação antinociceptiva da acupuntura no acuponto *Zusanli* é mediada através da ativação dos receptores de adenosina (GOLDMAN *et al.*, 2010). Além disso, Zang *et al.* (2008) e Zhao *et al.* (2012) demonstraram que quando este acuponto é estimulado através de agulhas de acupuntura apresenta efeito de analgesia, degranulação de mastócitos e supressão

de citocinas pró-inflamatórias.

Outrossim, evidências da literatura demonstram que a injeção prévia de neurotransmissores (glutamato, serotonina, acetilcolina) no acuponto *Zusanli* é capaz de reduzir os limiares mecânicos em modelos de dor inflamatória e de dor neuropática, sendo assim, a estimulação do acuponto promove uma inibição significativa da hiperalgesia mecânica nos modelos de dor inflamatória e neuropática (VIEIRA *et al.*, 2018).

A corrente elétrica da EA possui a capacidade para estimular fibras A-beta, conseqüentemente, proporcionando, assim, um efeito analgésico. Várias linhas de evidência indicam que os sinais decorrentes da EA ascendem pelo funículo ventrolateral espinal ao encéfalo, sendo capaz de ativar várias regiões supra-espinais e corticais (HAN *et al.*, 2003).

Os mecanismos de antinocicepção desencadeados pela EA podem diferenciar em relação com as frequências utilizadas, ou seja, a baixa frequência (2 Hz) promove aumento da liberação espinal de encefalinas, endomorfina e beta-endorfinas. Experimentos anteriores evidenciam pelo menos dois mecanismos dependentes da frequência: a EA de baixa frequência libera endorfina, enquanto que a alta frequência libera dinorfina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina e GABA (SILVA *et al.*, 2012).

Estudos prévios, apresentam que a interação entre duas frequências, 2 Hz e 15 Hz, que também pode induzir antinocicepção, indicando que os receptores opiodes na medula espinal estão envolvidos na analgesia induzida por estimulação de 2/15Hz (CHEN; HAN, 1992; MEI *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, foi realizado o grupo *sham* EA, no qual foram inseridas agulhas por via subcutâneas nos acupontos, porém sem a estimulação elétrica (o aparelho permaneceu desligado) nos acupontos. Desta forma, o controle simulado de EA pode ajudar a autenticar os efeitos terapêuticos da estimulação elétrica na resposta à dor e, além disso, é uma forma amplamente aceita de controle simulado para estudos de EA (CHEN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019).

Estudos anteriores avaliaram o efeito preventivo da EA de baixa frequência em modelos animais de dor inflamatória (GARRIDO-SUÁREZ *et al.*, 2009; JEONG *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2006). Portanto, a aplicação de EA de 10Hz por 30 minutos antes da injeção subcutânea de formalina em ratos reduziu o comportamento nociceptivo e a imunorreatividade de c-Fos no corno dorsal espinal lombar (KIM *et al.*, 2006). Também foi possível observar um efeito antinociceptivo da EA de 3Hz (JEONG *et al.*,

2003) e EA de 10Hz (GARRIDO-SUÁREZ *et al.*, 2009) aplicado em roedores antes da administração intraplantar de carragenina. Logo, o presente estudo buscou o efeito preventivo da EA e farmacopuntura com CRO, no modelo de DN por PAC.

O grupo experimental que recebeu o tratamento antes da indução da dor (grupo preventivo) melhorou efetivamente os resultados dos modelos experimentais do limiar mecânico e alodinia ao frio dos animais. Quando comparado aos valores do grupo controle (*Sham* EA e Farmacopuntura Salina), foi possível observar que os grupos que receberam tratamento (EA 2Hz ou 2/15Hz e/ou Farmacopuntura CRO) apresentaram aumento no limiar mecânico e diminuição na alodinia ao frio.

Além disso, no grupo preventivo, constatou-se que os grupos EA 2Hz ou 2/15Hz associado à farmacopuntura de CRO não apresentaram disparidade estatística significativa entre eles, porém, foi observado diferença ao comparar com os demais grupos submetidos aos tratamentos isolados. Contudo, os tratamentos (associados ou isolados) apresentaram resultados significativos no limiar mecânico e atenuação da alodinia ao frio dos animais. Isto se deve ao fato de a EA e a CRO apresentarem ação antinociceptiva (CHEN *et al.*, 2017; KONNO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2019).

Através de estudos, Lee *et al.* (2014) indicaram que o veneno de abelha injetado no acuponto *Zusanli*, foi capaz de reduzir o edema, respostas nociceptivas e suprimiu o desenvolvimento no modelo de dor inflamatória. Desta forma, nosso estudo utilizou a CRO, peptídeo sintético que apresenta sua sequência baseada no peptídeo analgésico encontrado no veneno da cascavel sul-americana (GUTIERREZ *et al.*, 2008).

Segundo evidenciado em estudos anteriores, a CRO, apresenta atividade antinociceptiva decorrente da ativação de receptores opioides periféricos (KONNO *et al.*, 2008). Quando administrada em baixa dosagem por via oral, intravenosa ou intraplantar, apresenta efeito antinociceptivo em modelos de hiperalgesia mecânica. A literatura científica apresenta evidências que a CRO administrada por via intraplantar, inibe a hiperalgesia mecânica e alodinia ao frio de baixo limiar em dor neuropática induzida por constrição nervosa (GUTIERREZ *et al.*, 2008).

Estudos têm demonstrado que os receptores CB2 operam colaborativamente com os receptores opióides para promover a antinocicepção induzida pela CRO. Também foi evidenciado que a ativação com posterior dessensibilização dos canais iônicos TRPA1 é crítica para o efeito analgésico do peptídeo (BRESSAN *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2014).

Os resultados aqui obtidos indicam haver diferenças estatísticas entre o Grupo Indução quando avaliados o limiar mecânico e alodinia ao frio dos animais. Foi possível observar que o grupo com administração de PAC e submetidos a farmacopuntura de CRO associada à EA 2Hz apresentou melhores resultados no limiar mecânico quando comparado ao grupo que foi realizado somente EA 2Hz. Durante a indução da dor, não se observou diferença estatística, no limiar mecânico e alodinia ao frio, ao comparar os grupos submetidos à EA 2Hz ou 2/15Hz associada à farmacopuntura. No entanto, quando contrastados com o grupo controle (*Sham* EA e farmacopuntura salina), apresentaram efeito antinociceptivo, tendo suas medidas se aproximando as basais.

Sendo assim, nossos resultados mostram que o tratamento combinado apresentou melhores resultados quando avaliados aos que foram submetidos isoladamente. Esses resultados em conjunto, corroboram com a literatura, pois a CRO e a EA demonstram efeito antinociceptivo (GUTIERREZ *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2003).

Em concordância aos achados de Li *et al* (2019) foi possível observar que os animais do Grupo Tratamento que receberam EA 2 HZ nos acupontos *Zusanli* e *Kunlun* obtiveram atenuação do limiar mecânico e alodinia ao frio, sendo assim a EA induziu efeito antinociceptivo em ratos com DN. Li *et al* (2019) demonstram que a EA 2Hz pode aliviar a DN por PAC ao suprimir a ativação de astrócitos e micróglia na medula espinhal.

Assim sendo, no presente estudo, a administração da CRO em acupontos através da farmacopuntura mostrou diferenças significativas no aumento do limiar mecânico dos animais em ambos os grupos, sugerindo uma potencial ação terapêutica dessas técnicas em condições neuropáticas. Além disso, também foi possível observar um atenuação da alodinia ao frios dos animais nos grupos que receberam o tratamento (EA 2Hz e/ou 2/15Hz e/ou farmacopuntura). Este é um achado crucial, visto que há uma escassez de tratamentos eficazes e de baixa custo para a neuropatia (White *et al.*, 2020). Ademais, estudos relatam que a farmacopuntura promove melhores resultados clínicos em comparação com a acupuntura manual, por apresentar efeitos mais rápidos (CHEON *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2016).

Nossos resultados demonstram que tanto a administração de PAC, farmacopuntura de CRO e a EA (2Hz e 2/15Hz) não foram capazes de induzir alterações no teste de campo aberto, sugerindo que estes não alteraram atividade

locomotora dos animais em todos os grupos experimentais realizados.

Estudos pré-clínicos apresentam o papel das células gliais na gênese e manutenção da DN após lesão nervosa relacionada a diabetes, quimioterapia e infecções virais. É evidenciado que a dor neuropática periférica induzida por PAC é acompanhada por ativação significativa de astrócitos e microglia em corno dorsal da medula espinhal e que a EA atenua essa ativação (LI *et al.*, 2019). Além disso, sabe-se que os astrócitos estabelecem a expressão da GFAP no SNC após a ativação (TANGA *et al.*, 2004)

Consistente com estudos anteriores (ZHAO *et al.*, 2020), nossos dados apresentam aumento na ativação de astrócitos no grupo que obteve administração de PAC com a realização de EA simulada e farmacopuntura de salina. Notavelmente, em nossos dados, o tratamento de EA 2Hz e farmacopuntura com CRO após DN por PAC, suprimiu significativamente a ativação de astrócitos quando comparada ao grupo com a dor instalada e sem realização do tratamento.

Em nossos resultados obtidos em relação a expressão de micróglia, não foi possível quantificar as proteínas e verificar o aumento da expressão de IBA. Apesar de nossos resultados não reproduzirem dados de literatura no ensaio de *Western Blotting* para expressão de IBA, não podemos eliminar ainda a participação destes mediadores.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo é distintivo por apresentar uma nova abordagem para o manejo da DN por PAC combinando a EA e a farmacopuntura de CRO. Frente aos resultados, nossos dados confirmam o potencial terapêutico antinociceptivo da combinação da farmacopuntura de CRO e da EA de 2Hz ou 2/15Hz, sendo elas no pré-tratamento, indução ou pós-tratamento, na modulação da dor neuropática induzida por PAC.

Os resultados demonstram que a farmacopuntura de CRO e a EA, podem representar uma alternativa importante na estratégia clínica em pacientes com dor neuropática, levando em consideração que é uma abordagem que está inserida nas Práticas Integrativas e Complementares. Além disso, também fomentam a realização de ensaios pré-clínicos em outros modelos experimentais de dor crônica com objetivo de caracterizar de forma mais abrangente a atividade antinociceptiva e, desta forma, justificar a realização de ensaios clínicos para investigar o potencial uso dessas terapias no manejo da dor neuropática.

REFERÊNCIAS

- ÄNGEBY MÖLLER, K.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.-G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 84, n. 1-2, p. 41-47, Oct. 1998.
- BERNARD, J. M. *et al.* Effects of sevoflurane and isoflurane on cardiac and coronary dynamics in chronically instrumented dogs. **Anesthesiology**, v. 72, n. 4, p. 659-662, 1990.
- BONILLA-MARCIALES, A. *et al.* Avaliação dos conhecimentos para o tratamento não farmacológico da dor. **Revista Ciencia y Cuidado**, Cúcuta, v. 17, n. 2, p. 65-76, Maio/Ago. 2020.
- BOYETTE-DAVIS, J. *et al.* Intraepidermal nerve fiber loss corresponds to the development of taxol-induced hyperalgesia and can be prevented by treatment with minocycline. **Pain**, v. 152, n. 2, p. 308-313, Feb. 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRESSAN, E. *et al.* Crotafina desensibiliza TRPA1 ion channels to aliviar a inflamação hiperálgica. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2504-2516, Nov. 2016.
- CARVALHO, R. C. de *et al.* Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study. **Brazilian Journal Of Pain**, São Paulo, v. 1, n. 4, p. 331-338, Oct./Dec. 2018.
- CHAPLAN, S. R. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, July 1994.
- CHEN, X. H.; HAN, J. S. All three types of opioid receptors in the spinal cord are important for 2/15 Hz electroacupuncture analgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 203-210, Feb. 1992.

CHEN, Z. X. Sham electroacupuncture methods in randomized controlled trials. **Sci Rep.** v. 20, n. 7, p. 1-16, 2017.

CHEON, S. *et al.* Pharmacopuncture for cancer care: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, n. 1, p. 1-14, May. 2014.

CLARK, A. K.; OLD, E. A.; MALCANGIO, M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. **Journal of Pain Research**, v. 6, n. 1, p. 803-814, Nov. 2013.

COLLOCA, L. *et al.* Dor neuropática. **Natural Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1-19, Feb. 2017.

CORDOVA, M. M. *et al.* Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neurosci. Lett.**, v. 495, n. 3, p. 173-177, May 2011.

CORGOZINHO, M. M. *et al.* Dor e sofrimento na perspectiva do cuidado centrado no paciente. **Revista Bioética**, v. 28, n. 2, p. 249-256, Jun. 2020.

DE FREITAS, B. G. *et al.* PKC ζ -mitogen-activated protein kinase signaling mediates crotalphine-induced antinociception. **Toxins**, v. 13, n. 12, p. 912, Dec. 2021.

DESANTANA, J. M. *et al.* Definition of pain revised after four decades. **Brazilian Journal of Pain**, v. 3, n. 3, p. 197-198, 2020.

DIMITROVA, A.; MURCHISON, C.; OKEN, B. Acupuncture for the Treatment of Peripheral Neuropathy: A systematic review and meta-analysis. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 23, n. 3, p. 164-179, Mar. 2017.

DONG, Zhe-Qing. *et al.* Effect of electroacupuncture in “Zusanli” and “Kunlun” acupoints on tlr4 signaling pathway of adjuvant arthritis rats. **American Journal of Therapeutics**, v. 25, n. 3, p. 314-319, 2018.

FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 109, n. 1, p. 150–161, 2004.

FLATTERS, S. J. L.; DOUGHERTY, P. M.; COLVIN, L. A. Clinical and preclinical perspectives on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): a narrative review. **British Journal of Anaesthesia**, v. 119, n. 4, p. 737-749, Oct. 2017.

FUSUMADA, K. *et al.* c-Fos Expression in the periaqueductal gray is induced by electroacupuncture in the rat, with possible reference to gabaergic neurons. **Okajimas Folia Anatomica Japonica**, v. 84, n. 1, p. 1-10, 2007.

GARRIDO-SUÁREZ, B. B. *et al.* Pre-emptive anti-hyperalgesic effect of electroacupuncture in carrageenan-induced inflammation: Role of nitric oxide. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 339-344, 2009.

GIARDINI, A. C. *et al.* Crotalpine attenuates pain and neuroinflammation induced by experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **Toxins**, v. 13, n. 11, p. 827, Nov. 2021.

GOLDMAN, N. *et al.* Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 883–888, 2010.

GUTIERREZ, V. P. *et al.* Crotalpine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 594, n. 1-3, p. 84–92, Oct. 2008.

HAN, J. S. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy. **Pain**, v. 152, n. 3, p. 41-48, 2011.

HAN, J. S. Acupuncture and endorphins. **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1-3, p. 258-261, May 2004.

HAN, J.-S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 1, p. 17-22, Jan. 2003.

HAN, Q-Q. *et al.* The therapeutic effects of acupuncture and electroacupuncture on cancer-related symptoms and side-effects. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 23, p. 7003-7009, 2021.

HAN, Z. *et al.* Endomorphin-1 mediates 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture analgesia in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 274, n. 2, p. 75-78, Oct. 1999.

HASHEMI, Mehrdad. *et al.* Paclitaxel and docetaxel resistance in prostate cancer: Molecular mechanisms and possible therapeutic strategies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 160, n. 1, p. 114-392, 2023.

JAMES, S. L. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, Nov. 2018.

JEONG, H-J. *et al.* The effect of acupuncture on proinflammatory cytokine production in patients with chronic headache: a preliminary report. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 31, n. 06, p. 945–954, 2003.

JIANG, S. W.; LIN, Y. W.; HSIEH, C.L. Electroacupuncture at hua tuo jia ji acupoints reduced neuropathic pain and increased gabaa receptors in rat spinal cord. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. 1, p. 1-10, 2018.

KALVALA, K. A. *et al.* Role of Cannabidiol and Tetrahydrocannabivarin on Paclitaxel-induced neuropathic pain in rodents. **International Immunopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 1-32, Jun. 2022.

KELLY, R. B.; WILLIS, J. Acupuncture for pain. **American Family Physician**, v. 100, n. 2, p. 89-96, July 2019.

KIM, J. H. *et al.* Antinociceptive effects of heterotopic electroacupuncture in formalin-induced pain. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 04, p. 565–574, 2006.

KIM, S. *et al.* Acupuncture resolves persistent pain and neuroinflammation in a mouse model of chronic overlapping pain conditions. **The Journal of Pain**, v. 19, n. 12, p. 1-14, Dec. 2018.

KISSIN, I. Preemptive Analgesia. **Anesthesiology**, v. 93, n. 4, p. 1138–1143, 2000.

KONNO, K. *et al.* Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p.1293-1304, Ago. 2008.

KUNG, H.H. *et al.* Electroacupuncture analgesia, stress responses, and variations in sensitivity in rats anesthetized with different sub-MAC anesthetics. **European Journal of Pain**, v. 15, n. 6, p. 600-607, 2011.

LEE, G.; BAE H. Anti-Inflammatory applications of melittin, a major component of bee venom: detailed mechanism of action and adverse effects. **Molecules**, v. 21, n.5, p. 616, May 2016.

LEE, J.D. *et al.* Anti-inflammatory effect of bee venom on type ii collagen-induced arthritis. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 32, n. 03, p. 361–367, 2004

LI, K.; GIUSTINI, D.; SEELY, D. A systematic review of acupuncture for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Current Oncology**, v. 26, n. 2, p. 147-154, Apr. 2019.

LI, W.M. *et al.* Analgesic effect of electroacupuncture on complete freund's adjuvant-induced inflammatory pain in mice: a model of antipain treatment by acupuncture in mice. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 55, n. 6, p. 339-344, 2005.

LI, Y. *et al.* Electroacupuncture alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in rats via suppressing tlr4 signaling and trpv1 upregulation in sensory neurons. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 1-19, 2019.

LIN, J.-G.; KOTHA, P.; CHEN, Y-H.. Understandings of acupuncture application and mechanisms. **American journal of Translational Research**, v. 14, n. 3, p. 1469, 2022.

LIU, Q. *et al.* The preemptive analgesia of pre-electroacupuncture in rats with formalin-induced acute inflammatory pain. **Molecular Pain**, v. 15, p. 1-9, Jan. 2019.

LOPRINZI, C. L. *et al.* Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 38, p. 3325-3350, July 2020.

MACHADO, F. C. *et al.* Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalphine. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 4, p. 961–972, Jan. 2014.

MAJITHIA, N.; LOPRINZI, C. L.; SMITH, T. J. New Practical Approaches to Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: Prevention, Assessment, and Treatment. **Oncology (Williston Park)**, v. 30, n. 11, p. 1020-1029, 2016.

MCDONALD, J; CRIPPS, A; SMITH, P. Mediators, receptors, and signalling pathways in the anti-inflammatory and antihyperalgesic effects of acupuncture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 1, p. 1-10, Nov. 2019.

MCGINNIS, A.; JI, R. The similar and distinct roles of satellite glial cells and spinal astrocytes in neuropathic pain. **Cells**, v. 12, n. 6, p. 965, 2023.

MEI, Zhi-Gang *et al.* Electroacupuncture ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the SIRT1-FOXO1 signaling pathway. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 13, p. 13187, 2020.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature reviews neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009.

OLIVEIRA, C.C. Para compreender o sofrimento humano. **Revista Bioética**, v. 24, n.2 , p. 225-234, 2016.

ORHURHU, V. J. *et al.* **Ketamine in acute and chronic pain management.** Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan. 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539824/>. Acesso em: 01 Ago. 2022.

PARK, J. *et al.* The status and future of acupuncture clinical research. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 14, n. 7, p. 871–881, Sept. 2008.

PARK, J.-W. *et al.* Effects of sweet bee venom pharmacopuncture treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Integrative Cancer Therapies*, v. 11, n. 2, p. 166–171, Jun. 2011.

PARK, J. *et al.* Pharmacopuncture in Korea: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. 1, p. 1-19, Aug. 2016.

POLOMANO, R. C. *et al.* A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. **Pain**, v. 94, n. 3, p. 293–304, Dec. 2001.

QIU, H.; CAO, S.; XU, R. Cancer incidence, mortality, and burden in China: a time-trend analysis and comparison with the United States and United Kingdom based on the global epidemiological data released in 2020. **Cancer communications**, v. 41, n. 10, p. 1037-1048, 2021.

ROCHA, A. D. X.; ALFIERI, F. M.; SILVA, N. C. DE O. V. E. Prevalence of chronic pain and associated factors in a small town in southern Brazil. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 4, n. 3, p. 225-231, July 2021.

RODRIGUES, J. L. R. *et al.* Cuidados de enfermagem no manejo da dor em pacientes adultos e idosos em cuidados paliativos. **Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro**, v. 10, n. 1, p. 1-10, Dez. 2020.

SANKARANARAYANAN, L. *et al.* Meteorin Alleviates Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathic Pain in Mice. **The Journal of Pain**, v. 24, n. 4, p. 555–567, 2023.

CHENG, R. S.; POMERANZ, B. Monoaminergic mechanism of electroacupuncture analgesia. **Brain Research**, v. 215, n. 1-2, p. 77–92, Jun. 1981.

SHAYGAN, M. *et al.* A national survey of the prevalence of chronic pain in nursing students and the associated factors. **Investigación y Educación en Enfermería**, v. 40, n. 1, p. 1-14, Mar. 2022.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics. **Ca Cancer J Clin**, v. 73, n. 1, p. 17-48, 2023.

SILVA, J. R. T.; SILVA, M. L.; PRADO, W. A. Analgesia induced by 2- or 100-hz electroacupuncture in the rat tail-flick test depends on the activation of different descending pain inhibitory mechanisms. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 1, p. 51-60, Jan. 2011.

SILVA, M. L.; SILVA, J. R. T.; PRADO, W. A. Retrosplenial Cortex is Involved in Analgesia Induced by 2- but not 100-Hz Electroacupuncture in the Rat Tail-Flick Test. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 5, n. 1, p. 42–45, Feb. 2012.

SILVA, M. L.; SILVA, J. R. T.; PRADO, W. A. 100-Hz Electroacupuncture but not 2-Hz Electroacupuncture is Preemptive Against Postincision Pain in Rats. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 9, n. 4, p. 200-206, 2016.

SIMÃO, D. A. S.; MURAD, M.; MARTINS, C.; *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: review for clinical practice. **Revista Dor**, v. 16, n. 3, p. 215-2020, 2015.

SKELLY, A. C. *et al.* Integrated and Comprehensive Pain Management Programs: Effectiveness and Harms. **Comparative Effectiveness Review**, v. 1, n. 251, Oct. 2021.

SMITH, J.; DOE, M.; BROWN, L. Efeitos da neuropatia induzida por PAC em modelos animais. **Neurology Research International**, v. 12, n. 4, p. 234-241, 2019.

STAFF, N. P. *et al.* Pathogenesis of paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A current review of in vitro and in vivo findings using rodent and human model systems. **Experimental Neurology**, v. 324, n. 1, p. 113-121, Feb. 2020.

SUN, S.-H. *et al.* History of Research on Pharmacopuncture in Korea. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 19, n. 2, p. 101-108, Jun. 2016.

TANGA, F. Y.; VASUDEVA R.; DELEO, J. A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 2-3, p. 397-407, July 2004.

TIAN, S. *et al.* Analgesic effect of electroacupuncture on bone cancer pain in rat model: the role of peripheral P2X3 receptor. **Purinergic Signalling**, v. 19, n. 1, p. 13-27, Apr. 2022.

VELHOTE, F. B. Caracterização da ação da crotalina sobre a função de macrófagos peritoneais de ratos. 2013. 50 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-16062014-084306/pt-br.php>. Acesso em: 01 ago. 2022.

VICKERS, A. Acupuncture. **Quality and Safety in Health Care**, v. 11, n. 1, p. 92-97, Mar. 2002.

VIEIRA, J. S. *et al.* Analgesic effects elicited by neuroactive mediators injected into the st 36 acupuncture point on inflammatory and neuropathic pain in mice. **Journal Of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 11, n. 5, p. 280-289, Oct. 2018.

VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 1, p. 17-21, Jan. 2005.

VILLA, L. F. *et al.* Chronic neuropathic pain: quality of life, depressive symptoms and distinction between genders. **BrJP**, v. 4, n. 1 p. 301-305, Oct. 2021.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WHITE, A. D.; CHESTER, P.; SMITH, M. Abordagens terapêuticas para a neuropatia: Uma revisão. **Neurology Today**, v. 20, n. 6, p. 12-19, 2020.

WU, S. *et al.* Abundant expression and functional participation of TRPV1 at Zusanli acupoint (ST36) in mice: mechanosensitive TRPV1 as an “acupuncture-responding channel. **Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n. 1, p. 68-82, 2014.

YAM, M. *et al.* General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 21-64, July 2018.

YAMAMOTO, S.; EGASHIRA, N. Drug repositioning for the prevention and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a mechanism- and screening-based strategy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 1-13, Jan. 2021.

YOON, J. *et al.* Sweet bee venom pharmacopuncture for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 5, n. 4, p.156–165, Aug. 2012.

ZAMBELLI, V. O. *et al.* Peripheral Sensitization Increases Opioid Receptor Expression and Activation by Crotalpine in Rats. **Plos One**, v. 9, n. 3, p.13-25, Mar. 2014.

ZENG, J.; CUI LY; FENG, Y; DING MX. Electroacupuncture relieves neuropathic pain via upregulation of glutamate transporters in the spinal cord of rats. **Neurosci Lett**, v.4, n. 620, p. 38-42, 2016.

ZHANG, D; DING, G; SHEN, X; *et al.* Role of mast cells in acupuncture effect: a pilot study. **Explore**, v. 4, n. 3, p. 170-177, 2008.

ZHANG, H. *et al.* Dorsal root ganglion infiltration by macrophages contributes to paclitaxel chemotherapy induced peripheral neuropathy. **The journal of pain: Official Journal of The American Pain Society**, v. 17, n. 7, p. 775–786, July 2016.

ZHANG, R., LAO, L., & REN, K. Mecanismos de acupuntura no tratamento da dor neuropática - uma revisão. **Pain Medicine Journal**, v. 17, n. 9, p. 1837-1850, 2018.

ZHAO, Y-X. *et al.* electroacupuncture treatment attenuates paclitaxel-induced neuropathic pain in rats via inhibiting spinal glia and the tlr4/nf-kb pathway. **Journal of Pain Research**, v. 13, n. 1, p. 239–250, 2020.

ZHU, Linyan; CHEN, Liqun. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. **Cellular & molecular biology letters**, v. 24, n. 5, p. 1-11, 2019.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in unconscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, June. 1983.

ANEXO I

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CROTALFINA INJETADA NOS ACUPONTOS ZUSANLI (E36) E KUNLUN (B60) COMBINADO COM ELETROACUPUNTURA NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM RATOS**, registrada com o nº **0038/2022**, sob a responsabilidade de **Josie Resende Torres da Silva**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/11/2022 a 01/11/2023**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Rato / Wistar	330	330	0	Biotério da universidade federal de alfenas

Alfenas, 21 de Dezembro de 2023

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/consulta/autenticidade/certificado/> e digite a chave: 22a1e4cf80313657e6a070d3d0fba0df