

Cirene Aparecida Franco

**ACUPUNTURA MANUAL NO *BAIHUI* (VG20) MELHORA O
APRENDIZADO E A MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências.
Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto
Soares dos Santos

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Franco, Cirene Aparecida
Acupuntura manual no Baihui (VG20) melhora o
aprendizado e a memória em camundongos / Cirene Aparecida
Franco ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos -
Florianópolis, SC, 2013.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

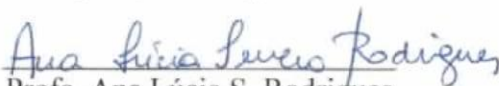
1. Neurociências. 2. Memória. 3. Acupuntura. 4. Testes
de comportamento. 5. Camundongos. I. Santos, Adair Roberto
Soares dos. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

CIRENE APARECIDA FRANCO

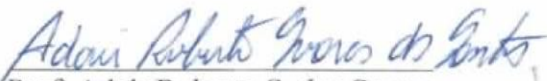
**“ACUPUNTURA MANUAL NO BAIHUI (VG20)
MELHORA O APRENDIZADO E A MEMÓRIA EM
CAMUNDONGOS”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 02 de agosto de 2013.


Prof.a Ana Lúcia S. Rodrigues
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Adair Roberto S. dos Santos
Orientador - UFSC


Dra. Danieta Dal Secco Abbud
Membro - UFSC


Profa. Patrícia Pereira
Membro da Banca Externo


Prof. Rodrigo Bairy Leal
Membro - UFSC

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que me apoiaram nessa jornada e, sem citar nomes, cada um sabe o quanto foi importante para que eu pudesse alcançar este resultado final. Aqui ficam o meu carinho e a minha gratidão.

RESUMO

Por muitos anos, a memória tem fascinado os filósofos, psicólogos e neurocientistas. No entanto, não está totalmente claro se é possível obter melhora da memória. Sabe-se que a acupuntura é uma terapia bem aceita no mundo e que suas intervenções milenares e contemporâneas exercem grande influência sobre doenças neurológicas. Estudos descritos na literatura mostram que a acupuntura no acuponto *Baihui* (VG20) diminuiu os danos causados por acidente vascular cerebral ou isquemia cerebral, além de exercer efeitos positivos na reabilitação neurofuncional e tratar condições como cefaléias, tonturas e ansiedade tanto em humanos quanto em modelos animais. Sendo assim, o presente estudo procurou investigar se a acupuntura manual (AM) no *Baihui* (VG20) seria capaz de melhorar o aprendizado e a memória em camundongos. Os animais foram tratados com AM por um período mínimo de 15 dias e submetidos a testes de comportamento para avaliação da memória, da ansiedade, da depressão e da dor. O tratamento com AM neste acuponto promoveu significativa melhora da memória de curta e de longa duração, tanto no teste de reconhecimento de objetos quanto da esquiwa inibitória, quando comparado aos grupos controle e sham. Além disto, a AM no *Baihui* (VG20) aumentou de forma significativa as escolhas corretas no sexto, sétimo e oitavo dias no labirinto radial de oito braços e reduziu o total de erros no sétimo e no oitavo dias quando comparada aos grupos controle e sham. Por outro lado, a AM no *Baihui* (VG20) não apresentou atividade ansiolítica quando analisada no teste da caixa claro/escuro e no labirinto em cruz elevado. No entanto, promoveu significativa atividade antidepressiva no teste da suspensão da cauda quando comparada aos grupos controle e sham. No teste da formalina, a AM mostrou um efeito antinociceptivo relacionado com a dor neurogênica, mas não com a dor inflamatória. Assim, os dados do presente estudo demonstram que a estimulação do acuponto *Baihui* (VG20) pela AM induz melhora da aprendizagem e da memória, além de ter importante atividade antidepressiva em camundongos.

Palavras-chave: Acupuntura manual. Memória. Depressão. Ansiedade. Camundongos.

ABSTRACT

For many years, memory has fascinated the philosophers, psychologists, and neurobiologists. However, it is not clear whether it is possible to obtain improved memory. It is known that acupuncture therapy is well-accepted in the world and its ancient and contemporary interventions exert a strong influence on brain-related pathologies. Previous studies show that acupuncture at acupoint *Baihui* (GV20) decreased the damage caused by stroke or cerebral ischemia as well as positive effects on neurofunctional rehabilitation and treat conditions such as headaches, dizziness and anxiety in both humans and in animal models. Thus, this study aimed to investigate whether manual acupuncture (MA) in *Baihui* (VG20) could improve learning and memory in mice. The animals were treated with MA for a minimum of 15 days and subjected to behavioral tests for evaluation of memory, anxiety, depression and pain. Treatment with MA in *Baihui* (VG20) caused a significant improvement in short and long-term memory in both the test object recognition as inhibitory avoidance when compared with the control and sham groups. In addition, the MA in *Baihui* (VG20) significantly increased the correct choices in the sixth, seventh and eighth days in eight-arm radial maze and reduced the total errors in the seventh and eighth days compared with the control and sham groups. On the other hand, the MA in *Baihui* (VG20) showed no anxiolytic activity when analyzed in the test box light/dark and elevated plus maze. However, it was able to promote significant antidepressant activity in the tail suspension test compared with the control and sham groups. In the formalin test, MA showed an antinociceptive effect associated with neurogenic pain, but not in inflammatory pain. Thus, the data from this study demonstrate that stimulation of the acupoint *Baihui* (VG20) by manual acupuncture induces improvement of learning and memory as well as having important antidepressant activity in mice.

Key words: Manual acupuncture. Memory. Depression. Anxiety. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do hipocampo.....	21
Figura 2 - Principais regiões do sistema de memória.....	22
Figura 3 - Vias de entrada e saída da formação hipocampal.....	23
Figura 4 - Representação dos meridianos de acupuntura.....	27
Figura 5 - Representação do meridiano Vaso Governador.....	28
Figura 6 - Estruturas envolvidas no estímulo da AM.....	30
Figura 7 - Vias neurais de impulsos aferentes.....	31
Figura 8 - Localização do acuponto VG20.....	42
Figura 9 - Localização do acuponto VG20 em camundongo.....	43
Figura 10 - Efeitos da AM no VG20 no reconhecimento de objetos	54
Figura 11 - Efeitos da AM no VG20 na tarefa de esquiva inibitória	55
Figura 12 - Efeitos da AM no VG20 no labirinto radial de oito braços.	56
Figura 13 - Efeito da AM no VG20 no teste da caixa claro/escuro.....	57
Figura 14 - Efeitos da AM no VG20 no labirinto em cruz elevado.....	58
Figura 15 - Efeitos da AM no VG20 no teste de suspensão da cauda.....	59
Figura 16 - Efeitos da AM no VG20 no teste da formalina	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Acupuntura manual
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ANOVA	Análise estatística de uma variância
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca ²⁺	Cálcio
CA1	Corno de Amon 1
CA3	Corno de Amon 3
CAMKII	Cálcio-Calmodulina cinase II
CCK-8	Colecistocinina8
CEUA	Comitê de ética para o uso de animais
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc
CRP	Proteína reativa C
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EA	Eletroacupuntura
EPM	Erro padrão da média
ERK	Cinase ativada por estímulos extracelulares
FGF-2	Fator-2 de crescimento de fibroblastos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDNF	fator neurotrófico derivado de células gliais
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IR	Índice de reconhecimento
LTM	Memória de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
n	Número de animais por grupo experimental
NMDA	N-metil D-Aspartato
MTC	Medicina tradicional chinesa
NGF	Fator de crescimento neural
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização mundial da saúde
P43	Proteína imunossupressora/mitogênica linfocitária
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase C
RO	Tarefa de reconhecimento de objetos novos
SNC	Sistema nervoso central
STM	Memória de curta duração
TF	Tempo gasto explorando o objeto familiar

TN Tempo gasto explorando o objeto novo
TNF- α Fator de necrose tumoral alfa
UFSC Universidade Federal de Santa Catarina
VG Meridiano Vaso Governador
VG20 Acuponto 20 do meridiano Vaso Governador - *Baihui*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 MEMÓRIA.....	17
1.1.1 Classificação das memórias.....	18
1.1.2 Mecanismos neurais, celulares e moleculares envolvidos na consolidação das memórias.....	21
1.2 ACUPUNTURA.....	25
1.2.1 Meridianos de acupuntura.....	27
1.2.2 Pontos de acupuntura.....	29
1.2.3 Mecanismos neurais envolvidos na acupuntura.....	30
1.2.4 Efeitos terapêuticos da acupuntura.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 ANIMAIS.....	41
4.2 TRATAMENTO COM ACUPUNTURA MANUAL.....	41
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	44
4.3.1 Tarefa de reconhecimento de objetos novos.....	44
4.3.2 Tarefa de esquiva inibitória.....	45
4.3.3 Teste do labirinto radial de oito braços.....	46
4.3.4 Teste da caixa claro/escuro.....	47
4.3.5 Teste do labirinto em cruz elevado.....	48
4.3.6 Teste de suspensão da cauda.....	50
4.3.7 Nocicepção induzida por formalina.....	51
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1 EFEITOS DA AM NO RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	53
5.2 EFEITOS DA AM NA ESQUIVA INIBITÓRIA.....	54
5.3 EFEITOS DA AM NO LABIRINTO RADIAL.....	56
5.4 EFEITOS DA AM NO TESTE DA CAIXA CLARO/ESCURO.....	57
5.5 EFEITOS DA AM NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	58
5.6 EFEITOS DA AM NO TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA.....	59
5.7 EFEITOS DA AM NO TESTE DA FORMALINA.....	60
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

Aprendizagem e memória são essenciais para os seres humanos. Praticamente todas as nossas atividades diárias como a conversa, o pensamento, a resolução de problemas e a realização de trabalho contam com as informações que adquirimos e armazenamos sobre o nosso ambiente. Sem memória, vamos perder nossa identidade sobre quem somos e o que somos. A aprendizagem e a memória não são processos específicos que ocorrem em um local particular do encéfalo, mas são estados funcionais que requerem a participação de numerosas estruturas nervosas e a correta ativação temporal entre elas (Pardo et al., 2010). Portanto, a aprendizagem depende do estado motivacional e emocional do indivíduo que vai aprender, do grau de atenção, dos seus conhecimentos e habilidades anteriores, de seus receptores sensoriais e do estado de seus músculos, no caso da aprendizagem motora (Pardo et al., 2010). A aprendizagem é a aquisição de novas informações ou conhecimentos, enquanto que a memória é a aquisição, a formação, a retenção e a evocação da informação aprendida (Izquierdo, 2002).

Por muitos anos, a memória tem fascinado os filósofos, psicólogos e neurocientistas. No entanto, muitas questões permanecem sem respostas. Por exemplo, por que as pessoas podem lembrar certos fatos por muito tempo, mas outros episódios por apenas alguns minutos? Por que as pessoas se lembram de algumas partes da informação, mas não de outras? As pessoas podem melhorar suas memórias?

Estudos empíricos da memória no século XIX já estabeleciam fatos fundamentais sobre a avaliação da aprendizagem e as funções do esquecimento, através do fenômeno da amnésia retrógrada, com a perda de acesso às memórias formadas antes dos eventos que causaram a lesão cerebral (para revisão ver Nadel e Hardt, 2011). A idéia de que a memória leva tempo para consolidar depois da aprendizagem foi mencionada pela primeira vez por Müller e Pilzecker em 1900. Através de estudos pioneiros com seres humanos, foi descoberto que a memória da informação recentemente aprendida era interrompida pelo aprendizado de outras pequenas informações dadas logo após o aprendizado inicial. Assim, sugere-se que os processos subjacentes a novas memórias persistem primeiro em um estado frágil e depois consolidam ao longo do tempo (McGaugh, 2000; para revisão ver Nadel e Hardt, 2011). A hipótese da consolidação ainda orienta as pesquisas

que investigam o envolvimento dos sistemas neurais e os processos celulares que permitem a memória duradoura (Glickman, 1961; McGaugh, 1966; McGaugh e Herz, 1972; Weingartner e Parker, 1984; Polster et al., 1991; Dudai, 1996; Lechner et al., 1999; McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2006; Nadel e Hardt, 2011). A consolidação da memória envolve uma complexa rede de sistemas cerebrais e eventos moleculares, os quais podem estar envolvidos em muitos tipos de memória em animais e humanos (Izquierdo et al., 2006).

Diferentes cadeias de eventos moleculares que envolvem os receptores de glutamato, a proteína cinase dependente de cálcio e de calmodulina (CaMKII), a proteína cinase A (PKA), a proteína cinase C (PKC) e a cinase ativada por estímulos extracelulares (ERK1/2) são necessárias para a formação da memória de longo prazo (LTM) na região CA1 do hipocampo, da amígdala basolateral, do córtex entorrinal, do córtex parietal e do córtex cingulado (Izquierdo et al., 2006). Também baseado nos eventos moleculares e celulares desencadeados pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e das evidências de que essas mudanças estruturais provavelmente estão envolvidas no armazenamento da memória, sugere-se que o BDNF participa da consolidação da LTM no hipocampo (Medina et al., 2008). O BDNF aumenta o número de espinhas dendríticas dos neurônios piramidais da região CA1 através de um mecanismo ERK dependente. Também o BDNF modifica a estrutura dos dendritos nas proximidades, aumentando assim o número de sinapses excitatórias CA3-CA1 em culturas do hipocampo (Medina et al., 2008).

1.1.1 Classificação das Memórias

As memórias dos humanos e dos animais provêm das experiências vividas e ocorrem de muitas formas, cada uma delas envolvendo sistemas neurais distintos e alterações celulares que levam tempo para emergir e que então persistem. A noção de que existem múltiplas formas de memória foi expressa ainda em 1890, quando distinguiram entre a memória primária e a memória secundária (para revisão ver Nadel e Hardt, 2011). Atualmente as memórias são classificadas de acordo com o seu conteúdo (declarativa ou explícita, de procedimento ou implícita), de acordo com a sua duração [memória de curta duração (STM) e de longa duração (LTM)] e de acordo com a sua natureza: consolidada (STM, LTM) em oposição à passageira, momento

a momento, como acontece na memória de trabalho (Izquierdo et al., 1999; Nadel e Hardt, 2011).

A memória de trabalho e os outros tipos de memória (STM e LTM) participam de fenômenos completamente diferentes. A memória de trabalho é principalmente dependente da atividade elétrica das células do córtex pré-frontal, que estão ligadas a outras regiões encefálicas. Ela persiste somente enquanto esta atividade elétrica é mantida, ou seja, ela é basicamente um sistema *on-line*. A STM e a LTM são, ao invés disso, sistemas cujo papel principal é o de preservar memórias *off-line* para uso quando necessário (Izquierdo et al., 1999).

O termo memória de trabalho foi mencionado pela primeira vez na literatura animal e está ligado de forma proeminente com os conceitos de Honig e o subsequente trabalho de Olton (Honig, 1978; Olton et al., 1979). Honig fez uma distinção entre a memória de referência e a memória de trabalho, a qual fixa a informação relevante apenas para a realização da tarefa atual, momentânea (Honig, 1978). O grupo de Olton, utilizando o labirinto radial, estudou o substrato anatômico da memória de trabalho e da memória de referência, descobrindo que as lesões do sistema hipocampal prejudicam a memória de trabalho, mas não a memória de referência (Olton et al., 1979).

A memória de trabalho é a de menor tempo, pois dura de segundos até 3 minutos. Ela serve para gerenciar a realidade e determinar o contexto em que os diversos fatos, acontecimentos e as informações ocorrem e se eles devem ser arquivados (Izquierdo, 2002). Psicologicamente, a memória de trabalho está associada com a capacidade de lembrança e processamento das informações de curto prazo para se obter de decisões ou para solucionar problemas. Ela representa um conjunto mais elaborado de estruturas hipotéticas e de processos que se concentram mais na manipulação do conteúdo da memória do que na sua manutenção por um determinado período. A base anatômica da memória de trabalho tem sido intensamente estudada nos últimos anos tanto em humanos quanto em animais (Nadel e Hardt, 2011). Assim, observou-se que várias regiões cerebrais estão envolvidas, como as regiões do córtex pré-frontal, córtex parietal, tálamo, região temporal medial e cerebelo (Izquierdo, 2002).

A memória de referência representa o conhecimento de aspectos de uma tarefa que permanecem constantes entre os ensaios. Originalmente, o termo foi introduzido para distinguir dois tipos de conhecimentos que o rato pode manter em uma tarefa no labirinto radial: o conhecimento sobre quais dos braços do labirinto que sempre contem uma recompensa alimentar em cada ensaio (memória de referência) e

memória para os braços que já foram visitados em busca de alimento no ensaio atual (memória de trabalho) (Olton et al., 1979). A memória de referência, ao contrário da memória de trabalho, está sujeita à consolidação da memória, isto é, a estabilização progressiva ao longo do tempo, que requer a transcrição de RNA e a síntese de proteínas, ocorrendo alterações morfológicas de longa duração nas sinapses dos neurônios que participam da representação da memória (Nadel e Hardt, 2011).

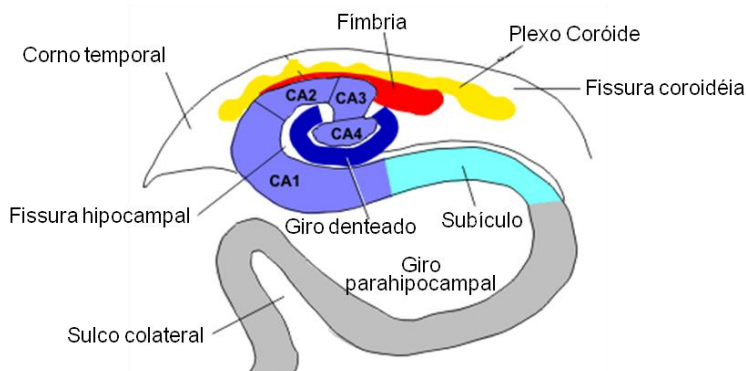
Embora lançada e até hoje utilizada principalmente para descrever o comportamento e os requisitos para tarefas espaciais (principalmente do labirinto radial e do labirinto aquático de Morris), a memória de referência representa uma definição operacional que não pode ser exclusivamente ligada a um paradigma específico experimental (Shapiro e Caramanos, 1990). Basicamente a memória de referência assemelha-se à memória semântica e não à memória episódica, isto é, ao conhecimento comum em episódios em vez do específico para um único evento determinado (Olton et al., 1979).

Como qualquer outra forma de memória de longo prazo, a memória de referência representa o ponto de extremidade de uma série de processos que, começando com a transdução sensorial, a atenção e a codificação, resultam em mudanças de comportamento de longa duração, a partir da qual a existência da memória é inferida. Conseqüentemente, as intervenções farmacológicas em qualquer ponto desta série de processos podem afetar o desempenho nos testes de memória (Nadel e Hardt, 2011). Estudos iniciais sobre a memória de referência no labirinto radial sugerem que o hipocampo é necessário para a memória de trabalho, mas não para a memória de referência (Olton et al., 1979). Ele mantém a informação de quais braços do labirinto foram visitados em cada ensaio, mas não mantém a informação de quais braços continham os alimentos. Assim, a aquisição inicial da memória de referência depende do hipocampo, mas a retenção de longo prazo da memória de referência depende de estruturas corticais (Shapiro e Caramanos, 1990).

As memórias de procedimentos ou implícitas são memórias de habilidades motoras ou sensoriais, adquiridas de uma forma inconsciente, exigem muita repetição e dependem das vias perceptivas e reflexas (Izquierdo, 2002). As memórias declarativas ou explícitas não são imediatamente estabelecidas e este processo leva de 3 a 6 horas e envolve uma seqüência de processos moleculares específicos na área CA1 do hipocampo e em suas ligações (Figura 1). A memória de curta duração (STM) tem o papel de conservar as informações enquanto seu

armazenamento definitivo não for feito. A memória de longa duração (LTM) leva tempo para ser consolidada e pode durar meses ou anos. O conjunto desses processos e o seu resultado final são denominados de consolidação (Izquierdo, 2002). O termo STM é usado para designar a memória que se desenvolve dentro de alguns segundos ou minutos e dura por várias horas enquanto que o termo LTM é usado para designar as memórias com duração mínima de 24 h.

Figura 1 - Anatomia do hipocampo.



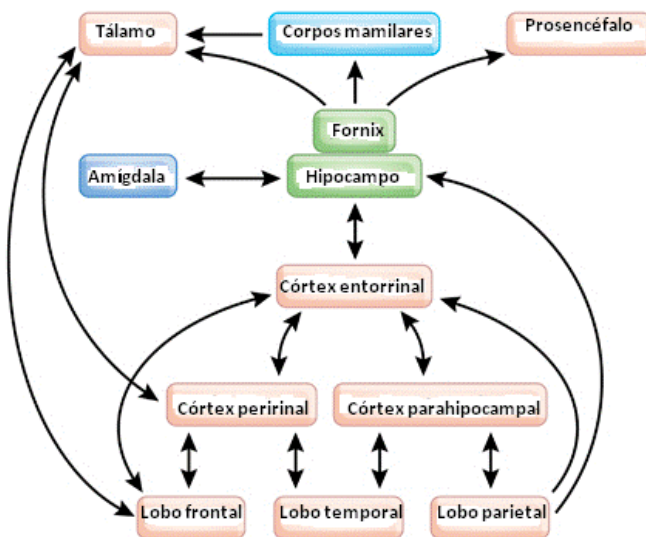
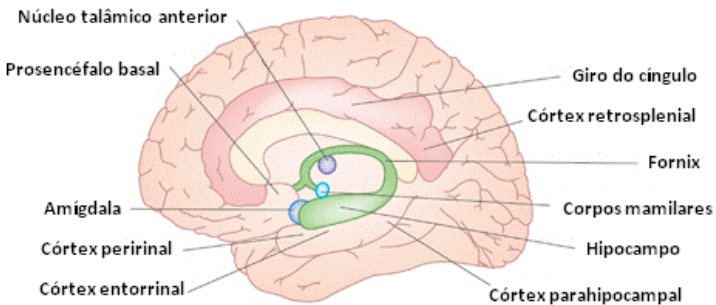
Fonte: adaptada de John R. Hesselink,
<http://spinwarp.ucsd.edu/neuroweb/Text/br-800epi.htm>

1.1.2 Mecanismos Neurais, Celulares e Moleculares Envolvidos na Consolidação das Memórias

Ainda não se sabe como caracterizar estas formas de memórias com todos os detalhes, quais os sistemas neurais que estão envolvidos, quais os processos celulares e moleculares constituem a consolidação da memória (Nadel e Hardt, 2011). Porém os estudos demonstram que os mecanismos da memória de trabalho, da STM e da LTM são essencialmente distintos e sugerem ligações entre a memória de trabalho e a LTM no córtex pré-frontal, e entre a memória de trabalho e a STM no CA1, no córtex parietal e no córtex entorrinal ao nível dos receptores de glutamato (Izquierdo et al., 1999, 2007). As memórias de trabalho, a STM e a LTM são reguladas por subsistemas separados no encéfalo. Elas estão envolvidas com vários mecanismos moleculares em nível de

receptores, alguns dos quais podem estar interligados (Izquierdo et al., 1999; Nadel e Hardt, 2011). No entanto, todos os tipos de memória dependem da atividade integrada de diversos locais do encéfalo (Figura 2) e recebem inervação dos grandes sistemas moduladores como o da dopamina, o da noradrenalina, o da serotonina e o da acetilcolina (Izquierdo, 2002; Nadel e Hardt, 2011).

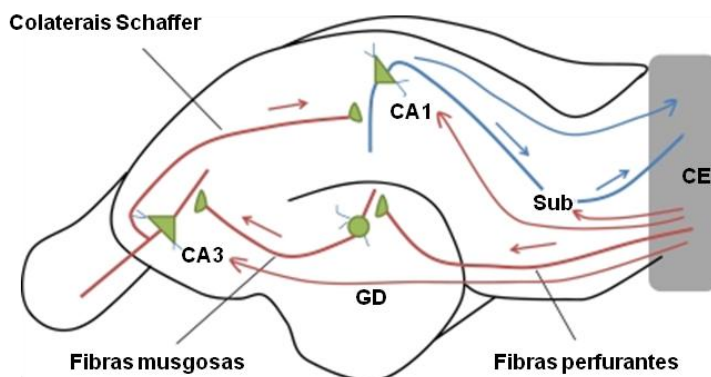
Figura 2 - Ligações uni e bidirecionais entre as principais regiões do sistema de memória no lobo temporal medial.



Fonte: adaptada de Nadel e Hardt, 2011.

O hipocampo é uma das áreas mais importantes do encéfalo associada ao aprendizado e à memória em mamíferos. A região CA1 emite fibras excitatórias que fazem sinapses com as células do córtex entorrinal. Este, por sua vez, emite axônios ao giro denteado, projetando para a região CA3, cujos axônios fazem sinapses excitatórias com as células piramidais da região CA1 (Figura 3). Este circuito interno do hipocampo é funcionalmente ativo e capaz de evidenciar a plasticidade, pelo menos sob a forma de potenciação de longa duração (Izquierdo, 2002; Zhang e Zhu, 2011).

Figura 3 - Vias de entrada e saída da formação hipocampal.



Fonte: adaptada de Zhang e Zhu, 2011.

CE=córtex entorrinal, GD=giro denteado, Sub=subículo.

O mecanismo de consolidação da memória necessita da ativação dos receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA e metabotrópicos na região CA1 do hipocampo, na região basolateral da amígdala, no córtex medial e no córtex entorrinal (Izquierdo et al., 2006; Izquierdo e Medina, 1997). Depois ocorre uma sequência de eventos moleculares, os quais apresentam dois picos de ativação no hipocampo, seguidos de várias vias de sinalização e fatores de transcrição, com a expressão de genes e a síntese de proteínas (Izquierdo e Medina, 1997; Bernabeu et al., 1997; Izquierdo et al., 2006; Klann e Sweatt, 2008; Alberini, 2008).

Nos primeiros minutos da aquisição da memória, o aumento do Ca^{2+} citoplasmático vai ativar a CAMKII, desencadeando uma cascata de reações. Os receptores AMPA são fosforilados, aumentando a sua sensibilidade e condutância resultando em um aumento na ligação de AMPA na região CA1, possibilitando assim a manutenção da potenciação de longa duração (LTP) ou de memórias (Cammarota et al., 1996, 2000, 2002). Verificou-se que a atividade do receptor AMPA permanece elevada em CA1 por horas após um treino na esQUIVA inibitória (Cammarota et al., 1996, 1998).

Verificou-se também que a CAMKII medeia a fosforilação de uma grande quantidade de proteínas na plasticidade sináptica, incluindo os receptores AMPA e NMDA e o fator de transcrição constitutivo CREB entre outros, agindo em sítios diferentes aos da PKA (Cammarota et al., 1998, 2000; Izquierdo e Medina, 1997; Soderling, 2000; Izquierdo et al., 2006, 2008). A ação da PKA é dependente da sua ligação com a adenosina monofosfato cíclico (AMPC), sendo mediadora da fosforilação de CREB, cuja ativação é crucial para a manutenção da LTP e da LTM (Bernabeu et al., 1997; Izquierdo e Medina, 1997).

O aumento do cálcio intracelular irá ativar também várias isoformas da PKC (Boniniet al., 2005), ocorrendo a fosforilação do substrato pré-sináptico associado à proteína 43 (P43) que está envolvida na mobilização do glutamato das vesículas sinápticas na membrana pré-sináptica, fundamental para a formação da memória e para a geração de LTP (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo et al., 2006).

Em torno de 12 horas após a aquisição da memória, o fator neurotrófico BDNF é fundamental na região CA1 do hipocampo para a consolidação das memórias que persistiram poucas horas antes. Mesmo com a injeção de inibidores da síntese protéica em CA1, a liberação endógena e local de BDNF ou sua administração exógena em CA1, permite que essas memórias persistam por várias semanas, enquanto que sem o BDNF a persistência é de no máximo dois dias (Bekinschtein et al., 2007, 2008). Na verdade o BDNF aumenta o número de espinhas dendríticas dos neurônios piramidais CA1 de forma dependente da ERK. Em culturas de hipocampo o BDNF também modifica a estrutura dos dendritos, aumenta o número de sinapses excitatórias CA3-CA1 e regula a ramificação axonal e o refinamento das sinapses (Medina et al., 2008).

Existem dados identificando uma associação entre comprometimentos da memória e marcadores da inflamação sistêmica. Estudos têm mostrado que níveis elevados de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são encontrados em pacientes com transtorno cognitivo

leve em comparação com controles normais (Alvarez et al., 2007; Bermejo et al., 2008). Variáveis biológicas inter-relacionadas, que afetam tanto a inflamação sistêmica quanto a cognição, têm sido avaliadas (IL-1 β , IL-6, CRP e TNF- α), com a crescente evidência de que um pequeno aumento da inflamação sistêmica está associado à diminuição da função cognitiva, especialmente na velocidade do processamento (Trollor et al., 2011).

Por outro lado, investigações na área da biologia do envelhecimento apontam que os radicais livres além de estarem envolvidos com a patogênese de muitas doenças, estão envolvidos com o declínio do desenvolvimento cognitivo, em particular o aprendizado e a memória (Liu et al., 2003). Sabe-se que a população de idosos tem sofrido um aumento substancial em praticamente todos os países do mundo. No caso do Brasil, em 2002 a população de idosos (pessoas com idade igual ou superior a 60 anos) era da ordem de 15 milhões de habitantes (Camarano, 2002). Em 2011, o Brasil apresentou um contingente de aproximadamente 21 milhões de idosos; em 2025 esse número passará para 32 milhões, quando o Brasil ocupará o sexto lugar no mundo em população idosa, e em 2050 o percentual de idosos será igual ou superior ao de crianças de 0 a 14 anos (Brasil, 2011).

Na prática clínica verifica-se que muitos são os agentes que podem prejudicar a memória durante a codificação e a consolidação. No entanto, o arsenal para melhorar a memória em potencial é bastante modesto. Além disso, o efeito parece ser limitado para reforçar novas memórias durante a codificação e o período inicial da consolidação celular, que pode durar de alguns minutos a horas após o aprendizado (Shema et al., 2011). Assim, para se obter uma vida longa e com qualidade e diante do reconhecimento dos benefícios que a acupuntura possui no tratamento de várias doenças, torna-se viável a busca por novas técnicas na tentativa de melhorar a memória.

1.2 ACUPUNTURA

A acupuntura é a única abordagem terapêutica que trata as doenças por meio da punção de certos pontos do corpo humano com diferentes tipos de agulhas e de manipulação (Xia et al., 2010). Teve a sua origem na China há muitos séculos atrás e logo se expandiu para o Japão, Coreia e para as demais regiões da Ásia (Xia et al., 2010). Ela é amplamente utilizada nos sistemas de saúde desses países e é oficialmente reconhecida pelos governos e bem recebida pelo público

em geral (Xia et al., 2010). Foi introduzida na Europa no início do século XVII e tem sido praticada em todo o mundo, especialmente depois da década de 70, porém o ceticismo sobre a sua eficácia ainda existe em países onde a medicina ocidental moderna é a base dos cuidados da saúde, principalmente naqueles onde a acupuntura ainda não é amplamente praticada (Xia et al., 2010).

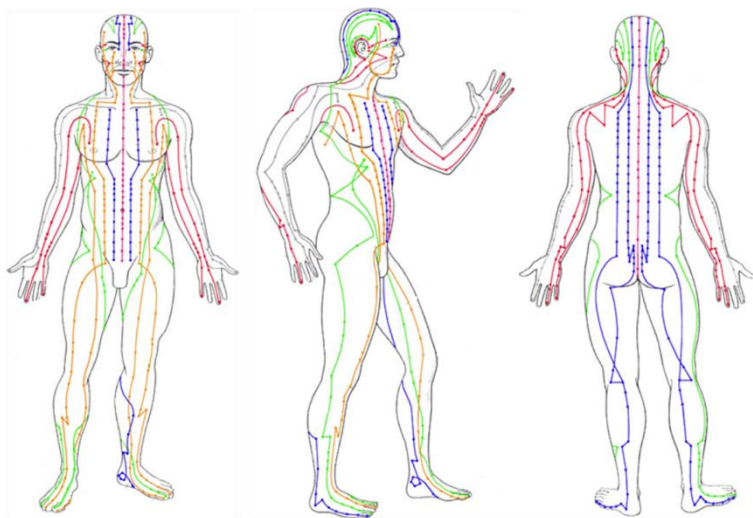
A riqueza das experiências acumuladas na prática da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), ao longo dos seus 2500 anos de desenvolvimento, tem comprovado a grande variedade de doenças que podem ser tratadas efetivamente com este método de tratamento (Xia et al., 2010). Em reconhecimento ao crescente interesse mundial pelo assunto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) realizou um simpósio sobre acupuntura em junho de 1979, em Pequim, na China (Xia et al., 2010). Praticantes da acupuntura de diferentes países foram convidados a identificar os desequilíbrios fisiológicos, os quais poderiam ser beneficiados com esta terapia. Desde então muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de investigar os mecanismos neurofisiológicos da acupuntura, procurando responder principalmente como a acupuntura funciona e também fornecer evidências para comprovar a sua eficácia (Xia et al., 2010).

Acupuntura significa literalmente a punção com uma agulha (WHO, 2002). No entanto o termo "acupuntura" é usado em um sentido mais amplo, incluindo o agulhamento tradicional no corpo, a moxabustão, a eletroacupuntura, o laser acupuntura, a acupuntura em microssistemas (como auricular, rosto, mãos e no couro cabeludo) e a acupressão (aplicação de pressão em locais selecionados) (WHO, 2002). Segundo a literatura chinesa antiga (The Suwen of Neijing), no início da sociedade primitiva, a agulha de acupuntura usada para tratar doenças era de pedra (Xia et al., 2010). Com o desenvolvimento das forças produtivas apareceram as agulhas de osso e de bambu (Xia et al., 2010). No entanto, após a invenção das técnicas de fundição do metal e de suas ferramentas, as pessoas começaram a usar agulhas feitas de bronze, de ferro, de ouro e de prata (Xia et al., 2010). Atualmente, as agulhas de aço inoxidável são amplamente adotadas para o tratamento (Xia et al., 2010). Essas agulhas finas e afiadas são inseridas em pontos específicos do corpo, conhecidos como acupontos, com estimulação mecânica, elétrica ou outro tipo de estimulação física (WHO, 2002).

1.2.1 Meridianos de Acupuntura

Para a MTC, os meridianos e os acupontos são dois conceitos importantes. Os meridianos, de uma forma geral, são denominados de "Jing e Luo". De acordo com a literatura, os meridianos são vias que transportam o *Qi* (energia) e o sangue, regulam o *yin* e o *yang* (duas forças fundamentais opostas de onde parte toda a fisiopatogenia energética do organismo humano), conectam os órgãos (*zang*) com as vísceras (*fu*) e associam o exterior com o interior, bem como a parte superior com a parte inferior do corpo humano (Figura 4) (Cheng, 1990; Zhang, 1990; Qiu e Chen, 1992; Zhu, 1998; Zhao e Li, 2002; Li, 2003).

Figura 4. Representação dos meridianos principais de acupuntura.



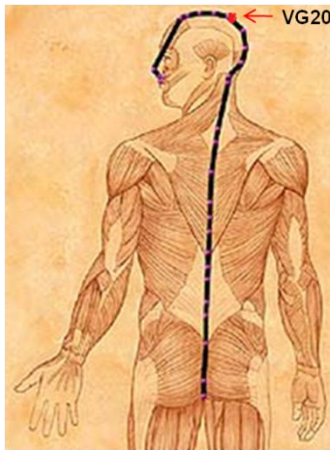
Fonte: adaptada de <http://www.medicinaoriental.com.br>.

Os meridianos harmonizam as atividades do corpo humano e fazem a integração com o meio formando uma entidade completa. São divididos em meridianos e colaterais. Os meridianos são os troncos principais que correm tanto longitudinalmente quanto do interior para o exterior do corpo, ao passo que os colaterais são como redes que se entrecruzam no corpo, mais finos e menores do que os meridianos

(Cheng 1990; Zhang 1990; Qiu e Chen 1992). Com base na teoria morfogênética, o sistema meridiano originou-se de uma rede de centros de organização. No contexto do desenvolvimento embrionário e da evolução das espécies, é provável que a origem evolutiva do sistema meridiano precedesse todos os outros sistemas fisiológicos, incluindo o sistema nervoso, o sistema circulatório e o sistema imunológico (Shang, 2001). Seu código genético pode ter servido como um modelo a partir do qual os novos sistemas evoluíram. Consequentemente ele sobrepõe e interage com os outros sistemas, mas não é apenas uma parte do sistema nervoso, do sistema imunológico ou do sistema circulatório (Shang, 2001).

O meridiano Vaso Governador (VG, Figura 5) é uma convergência dos três meridianos *yang* da mão e do pé. Por isso ele também é chamado de mar dos meridianos *yang*. Este meridiano inicia a partir do cóccix, ascendendo pelo interior da coluna vertebral e entra no encéfalo, controlando e administrando o *yang* externamente e comunicando internamente com o *Qi* dos órgãos. Assim, ele pode ser usado para equilibrar o *yin* e normalizar o *yang*, regular o *Qi* e o sangue, promover o fluxo suave do *Qi* dos meridianos e estimular as funções motoras. Ele pode ser usado para o tratamento de todos os tipos de doenças cerebrais e espinhais (Wen-dong et al., 2005).

Figura 5 - Representação do meridiano VG e do acuponto *Baihui* (VG20).



1.2.2 Pontos de Acupuntura

Os acupontos são os locais do corpo usados para as terapias da acupuntura; são a base estrutural e funcional para um tratamento de acupuntura eficaz e são os locais por onde os órgãos e as vísceras transportam o *Qi* para a superfície do corpo através dos meridianos (Qiu e Chen, 1992; Li, 2003). A nomenclatura e a localização da maioria desses acupontos foram estabelecidas na MTC desde a antiguidade. Só em 1958, logo após a aplicação da acupuntura para anestesia em cirurgias de tireoidectomia na China, os professores do Departamento de Anatomia e Histologia da Universidade de Xangai decidiram estudá-los. De 1958 a 1960 eles dissecaram 324 acupontos de 12 meridianos em oito cadáveres adultos para explorar a relação entre os meridianos, os pontos de acupuntura e os nervos. Eles descobriram que todos os pontos estavam localizados sobre estruturas nervosas, sendo esta a primeira evidência de que os meridianos possuem uma relação direta com os nervos periféricos (Xia et al., 2010).

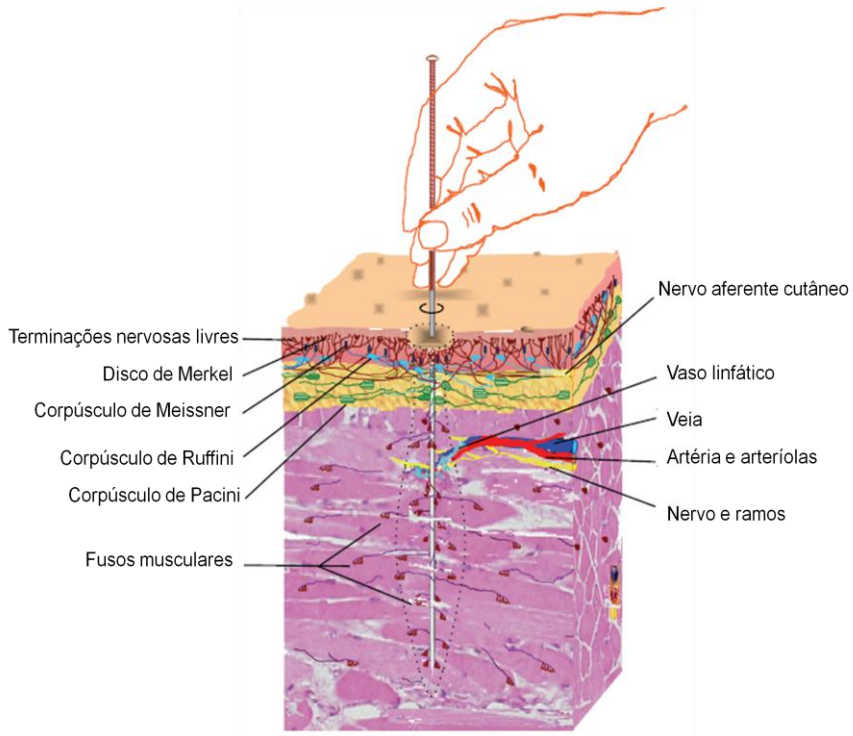
Na perspectiva da neurociência, pode-se considerar como ponto de acupuntura um local tanto receptor quanto efector de sinais. No entanto, ainda existem muitas dúvidas a respeito da sua natureza. Os acupontos possuem algumas estruturas especiais em comparação com os não-acupontos? Se sim, quais são os tecidos/células que formam essas estruturas especiais do acuponto? Qual é o componente(s) que é estimulado pelo agulhamento nos acupontos? Que estrutura medeia os sinais aferentes e eferentes da acupuntura para induzir os efeitos biológicos? Todas estas perguntas são essenciais para esclarecer a teoria dos meridianos na MTC. Embora estas questões não estejam totalmente elucidadas, têm-se dados sugerindo que a base estrutural dos acupontos está intimamente relacionada com a distribuição espacial dos nervos periféricos em torno dos vasos, músculos, tendões e outras estruturas, com os sinais sendo transmitidos para o encéfalo para processamento (Zhou e Huang, 2010).

Estudos microscópicos nos pontos de acupuntura revelaram as suas bases morfológicas, seus mecanismos de sensação e de efeito da acupuntura. Apesar dos acupontos só compreenderem estruturas conhecidas como nervos, vasos linfáticos, músculos e tendões, existem ainda especificidades relativas das características histológicas dos pontos de acupuntura (figura 6) quando comparados com os não-acupontos (Nakazo, 1987; Zhang et al., 2012).

Histologicamente verificam-se vários tipos de terminações nervosas livres, receptores, corpúsculos de Ruffini, corpúsculos de

Meissner, corpúsculos de Krause, corpúsculos lamelares e fusos musculares ao redor dos acupontos (Wang et al., 1985; Zhang et al., 2012).

Figura 6 - Representação de estruturas envolvidas no estímulo manual da acupuntura.

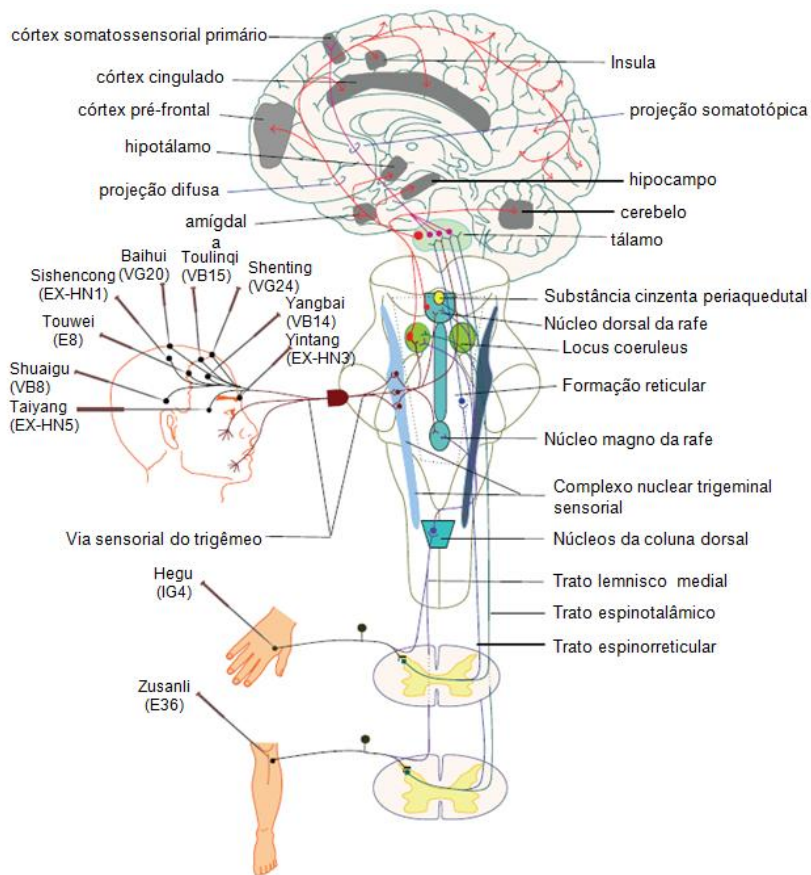


Fonte: Figura adaptada de Zhang et al., 2012.

1.2.3 Mecanismos Neurais Envolvidos na Acupuntura

Muitos dados sugerem que a sinalização da acupuntura (figura 7) é transmitida principalmente pelos nervos sensoriais somáticos, com fibras aferentes dos nervos simpáticos envolvidas na atividade de alguns pontos de acupuntura (Li, 2003; Zhang et al., 2012).

Figura 7 - Múltiplas vias neurais transmitindo impulsos aferentes de diferentes acupontos.



Fonte: Figura adaptada de Zhang et al., 2012.

As fibras nervosas são mielinizadas dos tipos I, II (fibras grossas) e III (fibras finas), predominando o tipo II (Lu et al., 1979, 1983, 1986; Zhang et al., 2012). No sistema nervoso central (SNC), a medula espinal, o tronco cerebral, o hipotálamo, o tálamo e o córtex cerebral integram os sinais aferentes da acupuntura, formando saídas de regulação através das vias aferentes (Huge et al., 2000). Muitos estudos demonstram que o impulso induzido pela acupuntura é transmitido para

os interneurônios na medula espinal e, em seguida, para o centro nervoso superior pelo funículo lateral ventral da medula espinal (para revisão ver Huge et al., 2000; Zhang et al., 2012). Além disso, existe uma forte relação entre os pontos dos meridianos e as vísceras em termos de conexão nervosa (Zhang et al., 2012).

Os mecanismos básicos da interação entre os pontos dos meridianos e as vísceras estão relacionados com as inervações segmentares e a convergência dos nervos somáticos e autonômicos dos mesmos segmentos espinais. Existem centenas de teorias sobre os meridianos e os acupontos, mas não há qualquer teoria com evidências convincentes para demonstrar as suas estruturas físicas. Com base no conhecimento da neurociência atual, acredita-se que a função dos assim chamados meridianos e acupontos são altamente dependentes da atividade do sistema nervoso (Zhou e Huang, 2010).

1.2.4 Efeitos Terapêuticos da Acupuntura

As pessoas questionam se a acupuntura tem um efeito terapêutico real, ou se ela funciona apenas através do efeito placebo, do poder da sugestão, ou do entusiasmo com que os pacientes desejam uma cura. Há, portanto, necessidade de estudos científicos que avaliem a eficácia da acupuntura em condições clínicas controladas. Ao contrário da avaliação de um novo medicamento, ensaios clínicos controlados de acupuntura são extremamente difíceis de realizar. O efeito terapêutico da acupuntura depende muito da competência do acupunturista, da sua capacidade e habilidade em selecionar e localizar os pontos de acupuntura e em manipular as agulhas. Isso pode explicar em parte as disparidades ou incoerências nos resultados apresentados por diferentes autores, mesmo quando os estudos são realizados com as mesmas bases metodológicas (Xia et al., 2010). Devido ao sucesso de procedimentos cirúrgicos realizados sob a analgesia através da acupuntura, o tratamento da dor com acupuntura tem sido extensivamente estudado (Xia et al., 2010). Além disso, estudos clínicos de acupuntura em outras doenças neurológicas, como a epilepsia, a isquemia cerebral, distúrbios neuroimunes e distúrbios reprodutivos também estão sendo realizados com êxito (Xia et al., 2010).

Estudos em humanos e animais mostram que a acupuntura produz muitos efeitos benéficos através do sistema nervoso central, no entanto os substratos neurais da ação da acupuntura não são completamente claros. Estudos de ressonância magnética demonstraram

que o sistema límbico desempenha um papel importante para os efeitos da acupuntura (Fang et al., 2009). Esta pesquisa mostrou que a acupuntura produz inibição do sistema límbico-paralímbico-neocortical. As regiões inibidas foram vistas no córtex pré-frontal medial (pólo frontal, cíngulo pregenual), no lobo temporal (amígdala, hipocampo e parahipocampo) e no córtex medial posterior (precuneus, cíngulo posterior) (Fang et al., 2009). Já o córtex sensorio-motor (córtex somatossensorial, córtex motor suplementar), o tálamo e as estruturas paralímbicas como a ínsula e o córtex cíngulo anterior mostraram ativação (Fang et al., 2009).

Pesquisas sobre a acupuntura, especialmente as investigações mecanicistas sobre analgesia com acupuntura, resultaram em muitas informações. Elas mostraram que os sinais gerados pela acupuntura manual ou pela eletroacupuntura (EA) eram capazes de influenciar a liberação, a síntese, a recaptação e a degradação dos neurotransmissores e moduladores centrais, incluindo monoaminas (por exemplo, a serotonina, noradrenalina e dopamina), acetilcolina, aminoácidos, substância P, prostaglandina, colecistocinina₈ (CCK-8), somatostatina e os fatores neurotróficos (Wen et al., 2010). Em geral, a acupuntura aumenta a atividade dos peptídeos opióides endógenos, além de serotonina, dopamina, acetilcolina e aminoácidos inibidores, tais como o ácido γ -aminobutírico (GABA), a glicina e a taurina, enquanto que atenua a atividade da noradrenalina e de aminoácidos excitatórios incluindo o glutamato e o ácido aspártico (Wen et al., 2010). No entanto, os efeitos da acupuntura sobre os neurotransmissores e moduladores centrais são dependentes do estado do organismo e das condições da acupuntura (por exemplo, parâmetros de estimulação e acupontos), e variam de região para região no sistema nervoso central (Wen et al., 2010). Embora estes dados tenham sido obtidos a partir de grande parte dos estudos sobre analgesia com acupuntura, é razoável presumir que a acupuntura é capaz de modular funções do encéfalo através da regulação de neurotransmissores e moduladores centrais, porque todos os neurotransmissores e moduladores influenciados pela acupuntura participam direta ou indiretamente na regulação neural em muitos aspectos (Wen et al., 2010).

Outros estudos demonstraram que a acupuntura pode regular os fatores neurotróficos no sistema nervoso central. Existem evidências de que a eletroacupuntura pode aumentar a expressão do fator neurotrófico BDNF no córtex, no hipocampo e em outras regiões encefálicas, protegendo o encéfalo de lesões de isquemia e hipóxia (Wen et al., 2010). Além disso, presume-se também que o fator neurotrófico

derivado de células gliais (GDNF) está envolvido nos efeitos produzidos pela acupuntura (Wen et al., 2010). Pesquisas mostraram que a eletroacupuntura pode regular a expressão de BDNF e de seus receptores na medula espinal, produzindo um efeito terapêutico sobre lesões nessa região. Utilizando a técnica de imunohistoquímica para determinar os efeitos da eletroacupuntura sobre os níveis do BDNF, do fator de crescimento dos nervos (NGF), e do fator-2 de crescimento de fibroblastos (FGF-2), observou-se que a eletroacupuntura pode promover o aumento da expressão desses fatores neurotróficos na medula espinal quando lesionada (Wen et al., 2010). Essas evidências apontam que a acupuntura pode aumentar a atividade de fatores neurotróficos no sistema nervoso central na maioria das condições (Wen et al., 2010). Portanto, acredita-se que a acupuntura pode regular múltiplas funções cerebrais através da regulação de neurotransmissores e moduladores, o que pode ser a base para o efeito terapêutico da acupuntura em certos distúrbios neurológicos (Wen et al., 2010).

Sabe-se que o hipocampo é uma das duas grandes estruturas do sistema límbico envolvidas no movimento, na motivação e na memória. O hipocampo pode contribuir para o aumento da ansiedade e, indiretamente, influenciar o humor e a cognição através de conexões com a amígdala e o córtex pré-frontal (Liu e Yu, 2010). Sabe-se também que disfunções no hipocampo contribuem diretamente para os déficits cognitivos. Com base nestas observações, muitos estudos sobre o mecanismo de ação da acupuntura focaram o seu efeito no hipocampo (Liu e Yu, 2010). Estudos sugerem que a acupuntura pode ter efeito sobre distúrbios como depressão, possivelmente pela modulação da expressão do neuropeptídeo Y (NPY) no hipocampo (Liu e Yu, 2010). Outros estudos demonstraram que a acupuntura pode estimular a proliferação celular no giro denteado do hipocampo durante o tratamento de doenças relacionadas com a depressão (Liu e Yu, 2010). A eletroacupuntura realizada no ponto *Baihui* (VG20) foi capaz de restabelecer a proliferação de células progenitoras do hipocampo quando reduzidas pelo modelo de depressão induzida por estresse crônico em ratos (Liu e Yu, 2010). Assim, os dados mencionados anteriormente sugerem que o uso da acupuntura ou acupuntura combinada com outra terapia pode ser tão eficaz quanto outro tipo de tratamento normalmente usado na medicina ocidental, tal como psicoterapia e drogas, para aliviar os sintomas da depressão (Liu e Yu, 2010).

Diferente de outros tratamentos que passaram por diversas fases de estudos pré-clínicos até serem praticados em humanos, a acupuntura

segiu o caminho inverso, sendo primeiro utilizada no homem por milhares de anos para depois ser estudada em animais (MacPherson et al., 2007). O resultado foi uma enorme compilação de dados empíricos sobre como utilizar os pontos de acupuntura e uma destas aplicações que auxiliaram a trazer a acupuntura para o ocidente foi sua utilização no tratamento dos transtornos emocionais, os quais têm influência direta sobre os vários tipos de memórias e sobre o comportamento, tanto em animais como em humanos (MacPherson et al., 2007).

Pesquisas antigas e contemporâneas relatam que a acupuntura tem um efeito considerável sobre o estado psicológico e do comportamento. Evidências de estudos experimentais e clínicos sugerem que a acupuntura exerce uma forte influência na liberação de opióides endógenos no encéfalo, como endorfinas, encefalinas e dinorfinas. Além disso, o sistema opióide endógeno está envolvido em diversas funções mentais como a aprendizagem e a memória (Sher, 1998). De acordo com estudos de neuroimagem, a acupuntura também tem demonstrado ser eficaz através da modulação da frequência da estimulação neuronal, com base na teoria da modulação da frequência da função encefálica (Chen et al., 2011).

Jing e colaboradores (2008), usando fatias do hipocampo de ratos com diabetes mellitus e/ou isquemia cerebral, investigaram o efeito da acupuntura manual sobre a potenciação de longa duração (LTP) na área CA1. Os ratos foram tratados com acupuntura manual em vários pontos, depois foram avaliadas as respostas para a LTP na região CA1 após a estimulação de alta frequência (100 Hz, 100 pulsos) nos colaterais de Schaffer. Os resultados indicaram que a acupuntura pode promover a recuperação do declínio da amplitude e da taxa de inclinação induzidos pelo diabetes mellitus e pela isquemia cerebral, contribuindo para a melhora da capacidade de memória em ratos através do controle da plasticidade sináptica neuronal no hipocampo (Jing et al., 2008). Também tem sido demonstrado que a acupuntura em determinados acupontos melhorou a capacidade de aprendizagem e de memória em modelo da Doença de Alzheimer em ratos (Miao, 2009). Outro estudo mostrou que a acupuntura nos pontos *Tanzhong* (CV17), *Zhongwan* (CV12), *Qihai* (CV6), *Zusanli* (ST36) and *Xuehai* (SP10) melhorou a aprendizagem e a memória em modelo de demência em ratos, exercendo um efeito protetor sobre o comprometimento cognitivo (Yu, 2005).

Neste sentido, observa-se que nos últimos anos houve um interesse crescente dos neurocientistas pela acupuntura, os quais estão direcionando suas pesquisas para a elucidação dos prováveis

mecanismos de ação (Kaptchuk, 2002; Manni et al., 2010; Han, 2011), as áreas do encéfalo envolvidas (Biella et al., 2001; Uchida et al., 2003; Dhond et al., 2007; Fang et al., 2009; Xia et al., 2010; Shen et al., 2011) além de entender a dinâmica temporal dos efeitos imediatos e/ou retardados da acupuntura (Chen et al., 2006; Dhond et al., 2008; Xia et al., 2010; Menezes et al., 2010; Qin et al., 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Nós somos aquilo que lembramos. A memória é uma intrigante faculdade mental que permite registrar, armazenar e manipular as informações obtidas através de experiências vividas. Geralmente esta nos remete ao passado, pois tudo que faz parte da memória já ocorreu, porém a memória também compõe o nosso presente, pois é com esta capacidade que interagimos com o mundo e com os outros. Infelizmente muitos são os agentes que podem prejudicar o aprendizado e a memória. No entanto, o arsenal para melhorar a memória em potencial ainda é bastante modesto (Izquierdo, 2002).

É conhecido que durante o ciclo da vida o déficit cognitivo interfere negativamente em todas as fases e que na sociedade atual existem diversos fatores que afetam os processos de aprendizagem e memória, entre eles o estado emocional do indivíduo (Schwabe et al., 2011). Todo mundo está familiarizado com o estresse e experimenta-o de diferentes formas e graus todos os dias, podendo gerar sintomas de ansiedade e de depressão.

A perda da memória é um dos problemas mais frustrantes para as pessoas. Portanto, com um aumento da expectativa de vida e visando uma vida mais ativa e saudável, um plano de ações deve ser estabelecido para enfrentar os déficits cognitivos, inclusive terapias preventivas para preservar e melhorar a memória. Assim, soluções mais eficazes e viáveis para a saúde pública precisam ser oferecidas e a acupuntura pode ser uma parte fundamental da solução.

Diante destas informações, a proposta deste trabalho torna-se interessante e inovadora uma vez que o nosso objetivo é verificar os possíveis benefícios da acupuntura na melhora da aprendizagem e da memória. Além disso, os dados obtidos podem fornecer subsídios para os benefícios da acupuntura nos distúrbios da memória.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os possíveis efeitos da AM no acuponto *Baihui* (VG20) na melhora da aprendizagem e da memória em camundongos, como também em alguns comportamentos do tipo ansiolítico, antidepressivo e antinociceptivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar os possíveis efeitos da AM no acuponto *Baihui* (VG20) na memória de reconhecimento de objetos.

2. Verificar os possíveis efeitos da AM no acuponto *Baihui* (VG20) sobre as memórias de curta e de longa duração em camundongos na tarefa de esquiva inibitória.

3. Verificar os possíveis efeitos da AM no acuponto *Baihui* (VG20) na melhora da memória espacial em camundongos através do labirinto radial de oito braços.

4. Verificar os possíveis efeitos tipo ansiogênicos ou ansiolíticos da AM no acuponto *Baihui* (VG20) através do labirinto em cruz elevado e do teste da caixa claro/escuro.

5. Verificar o possível efeito antidepressivo da AM no acuponto *Baihui* (VG20) através do teste de suspensão da cauda.

6. Verificar os possíveis efeitos antinociceptivos da AM no acuponto *Baihui* (VG20) através do teste de formalina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados 155 camundongos Swiss fêmeas de aproximadamente dois meses de idade, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB/UFSC, em microisoladores com circulação de ar, em gaiolas de 12x30x18 cm (6 animais por gaiola), com temperatura mantida a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo 12 h claro/12 h escuro (claro a partir das 6:00 h), com livre acesso a água e comida. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados ao laboratório por um período mínimo de 1h, e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação em animais conscientes (Zimmermann, 1983; Brasil, 2008).

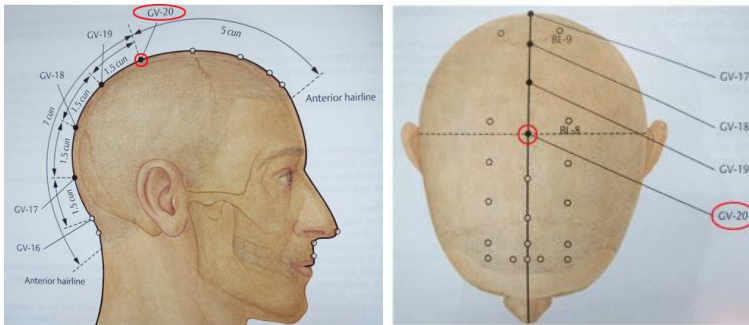
Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob registro PP00475. Os animais foram distribuídos em três grupos ($n = 8-13$): Controle, Sham-acupuntura e Acupuntura. O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos.

4.2 TRATAMENTO COM ACUPUNTURA MANUAL

A acupuntura foi aplicada no acuponto *Baihui* (VG20) e em um não-acuponto entre a raiz da cauda e o corpo do animal, com estímulos manuais, por um período de 15 dias consecutivos, exceto para o teste do labirinto radial de oito braços, cujo tratamento somou um total de 19 sessões. O *Baihui* (VG20) é um ponto sobre o meridiano denominado Vaso Governador, e está localizado no ponto mais alto da cabeça, onde todos os meridianos *yang* se encontram (Ju et al., 2009; Hwang et al., 2011). Este acuponto exerce várias funções sobre o sistema nervoso central e os seus principais efeitos terapêuticos estão no alívio das cefaléias, nas sequelas de acidente vascular cerebral, nas tonturas, na

ansiedade e na insônia (Zhao et al., 2007; Ju et al., 2009; Satoh, 2009). Além disso, ele regula as funções cardiovasculares e neurovegetativas (Gao et al., 2012). Em um estudo sobre a localização do VG20 (figura 8) em humanos, através de ressonância magnética, foi demonstrado que ele está localizado no sulco pré-central do lobo frontal (Shen et al., 2010).

Figura 8 - Localização do acuponto VG20.

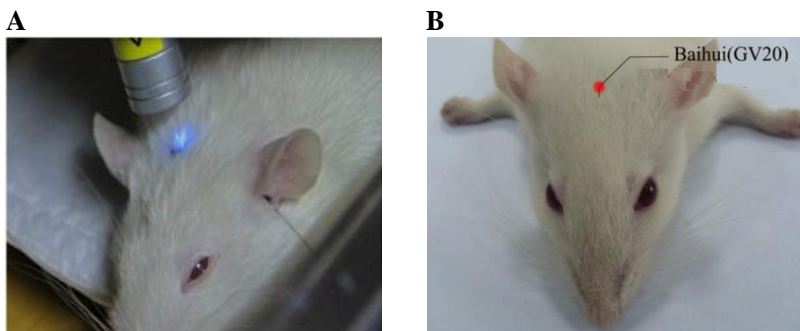


Fonte: Figura adaptada de Kinumedicina, 2013.

O método para determinar os pontos de acupuntura em camundongos é o método transposicional, que localiza esses pontos através da transformação dos pontos da acupuntura humana para a anatomia animal (Yin et al., 2008). No camundongo (figura 9) o VG20 está localizado na cabeça, no plano sagital mediano entre os dois músculos temporais (o equivalente ao músculo epicrânio do humano), na intersecção de uma linha que liga os ápices dos ouvidos direito e esquerdo (Hwang et al., 2011). Assim, o não-acuponto escolhido, localizado na junção entre a cauda e a nádega, é considerado como o ponto de controle mais adequado para evitar possíveis efeitos da acupuntura (Hwang et al., 2011).

A estimulação do acuponto *Baihui* (VG-20) foi realizada através de uma agulha de acupuntura (0.18 x 8 mm) de aço inoxidável, inserida com uma discreta inclinação angular de aproximadamente 30°, voltada para a parte caudal do animal, até uma profundidade de 3 mm (cutânea e muscular).

Figura 9 - Localização do acuponto VG20 em camundongo.



Fonte: figura A adaptada de Gao et al., 2012; figura B adaptada de Liu et al., 2013.

Para o procedimento de inserção da agulha o animal foi gentilmente segurado pela sua parte dorsal. Após a inserção, a agulha foi manipulada e rodada (180°) a uma velocidade de duas rotações por segundo durante 15 segundos, em seguida os animais ficaram com as agulhas inseridas por mais 10 minutos (Cidral-Filho et al., 2011; da Silva et al., 2011; Hwang et al., 2011), sem qualquer tipo de contenção, em um cercado de acrílico de 100 x 30 cm. Durante este período os animais foram observados para verificar a permanência da agulha no acuponto. O animal retirava a agulha numa média de três vezes por sessão, sendo imediatamente recolocada e estimulada como descrito anteriormente. A estimulação do ponto sham (na junção entre a cauda e a nádega do animal) seguiu a mesma metodologia, sendo que a agulha foi inserida voltada para a parte cranial. O grupo controle também passou pelo mesmo procedimento, sem a inserção de agulha. Decorridos o período de tratamento com a acupuntura e com a sham-acupuntura, os animais foram analisados nos modelos experimentais de memória, ansiedade, depressão e dor descritos a seguir.

4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.3.1 Tarefa de reconhecimento de objetos novos

Este paradigma de aprendizagem e de memória, inicialmente descrito por Ennaceur e Delacour (1988), baseia-se nas habilidades exploratórias naturais dos roedores expostos a um novo ambiente. A diferença na exploração entre um objeto visto anteriormente, chamado aqui de objeto familiar, e um objeto novo é tomada como um índice de desempenho da memória. Este comportamento pode ser facilmente quantificado e utilizado para estudar uma simples memória de reconhecimento, bem como memórias mais complexas do tipo espacial, temporal e episódica em roedores (Dere et al., 2007).

Os treinos e os testes na tarefa de reconhecimento de objetos foram realizados numa arena circular de campo aberto de 50 cm de diâmetro, feita de plástico de cloreto de polivinila, como descrito anteriormente (Ennaceur e Delacour, 1988; Mello-Carpes e Izquierdo, 2012). Foram utilizados 36 camundongos e o primeiro procedimento consistiu na habituação dos animais na caixa de testes. Antes do treino, cada animal foi colocado no aparato durante quinze minutos por dia para exploração livre por quatro dias consecutivos. No quinto dia, considerado o dia do treino, após a 15ª sessão de acupuntura, dois objetos similares (A e A') foram colocados no aparato e os animais ficaram explorando-os livremente durante cinco minutos (fase de apresentação dos objetos). Os objetos eram feitos de cerâmica vidrada (formato de porquinho). A exploração foi definida como cheirar ou tocar os objetos com o focinho e/ou as patas dianteiras. Contudo, não foi considerado comportamento exploratório quando o animal permaneceu sentado ou andando em torno dos objetos.

As sessões de testes foram realizadas três horas e vinte e quatro horas após o treinamento, onde um dos objetos foi substituído (fase de reconhecimento dos objetos). Para avaliar a memória de curta duração (STM), após três horas do treino, um dos objetos foi aleatoriamente trocado por um novo objeto (B), de vidro e em formato de um pequeno castiçal. Os camundongos foram reintroduzidos no aparato por um período adicional de cinco minutos. Vinte e quatro horas após o treino, para avaliar a memória de longa duração (LTM), o objeto B foi trocado por outro novo objeto (C), também de vidro e em formato de uma pequena bola, e mais uma vez os animais foram reintroduzidos no aparato por mais cinco minutos. Para evitar estímulos olfativos persistentes e preferências, os

objetos e a arena foram higienizados com etanol 20% depois de testar cada animal.

O tempo que o animal explorou cada um dos objetos foi registrado para as análises pertinentes à proposta do estudo. Um índice de preferência, a razão entre a quantidade de tempo gasto na exploração de qualquer um dos objetos (na sessão de treino) ou do objeto novo (sessão de teste) sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos, foi utilizado como uma medida de memória de reconhecimento (Murai et al., 2007). Assim, a proporção do tempo total que o animal gastou investigando o objeto novo é o “índice de reconhecimento” expresso pela equação:

$$IR = TN / (TN + TF)$$

IR = índice de reconhecimento

TN = tempo gasto explorando o objeto novo

TF = tempo gasto explorando o objeto familiar

4.3.2 Tarefa de esquiva inibitória

A esquiva inibitória em roedores é um modelo preferido para estudos da memória. Os animais aprendem que ao descer da plataforma e pisar na grade vão levar um choque nas patas. Nas exposições subsequentes para os testes, eles permanecem mais tempo na plataforma segura antes de, eventualmente, descer. Normalmente, um treino é o suficiente para estabelecer uma memória de longa duração destas tarefas (Izquierdo et al., 2006).

Uma das razões para a sua popularidade é a rapidez do procedimento de treinamento: uma rápida associação é feita entre um movimento (descer) e um estímulo aversivo (um choque nas patas). A associação ocorre em segundos. Assim, numa tarefa de esquiva inibitória o início da consolidação da memória pode ser determinado com precisão (Izquierdo et al., 2006).

No hipocampo, nas primeiras 6 horas após o treinamento, ocorre uma cadeia de eventos bioquímicos que são necessários para o processamento da memória. No momento do treino e por um curto período de tempo depois, a amígdala e o septo medial contribuem para o processamento da memória pela introdução da informação emocional.

Mais tarde, o córtex entorrinal e o córtex parietal posterior envolvem-se e tornam-se necessários para a formação da memória e para a recuperação de longo prazo (Izquierdo e Medina, 1997).

Como descrito anteriormente (Quevedo et al., 1999), a esQUIVA inibitória é uma caixa de acrílico de 50 × 25 × 25 cm, cujo piso consiste de barras de aço inoxidável em paralelo (1 mm de diâmetro) com espaços entre elas de 1 cm. Uma plataforma de 7 cm de largura x 2,5 cm de altura é colocada no chão da caixa do lado oposto da parede esquerda. O animal é colocado na plataforma e a sua latência para descer na grade com as quatro patas é medida com um dispositivo automático.

Para este experimento foram utilizados 36 camundongos. Na sessão de treino, após a 15ª sessão de acupuntura, imediatamente após o animal descer na grade, ele recebeu um choque nas patas por dois segundos (Izquierdo et al., 1992, 1997; Jerusalinsky et al., 1992; Roesler et al., 1998), com uma intensidade de 0,4 mA (Roesler et al., 1998).

Nas sessões de testes nenhum choque nas patas foi administrado e a latência de descida (máximo de 180 segundos) foi usada como uma medida de retenção da memória (Izquierdo et al., 1992, 1997; Jerusalinsky et al., 1992; Roesler et al., 1998; Izquierdo et al., 2006).

O animal recebeu uma única sessão de treino e duas sessões de testes. Uma sessão foi realizada três horas após o treino para avaliar a memória de curta duração (STM). Vinte e quatro horas depois do treino foi realizada outra sessão de teste para avaliar a retenção da memória de longa duração (LTM).

4.3.3 Teste do labirinto radial de oito braços

Várias tarefas de aprendizagem estão disponíveis para testar as habilidades de orientação espacial em camundongos. O teste mais utilizado é o labirinto aquático de Morris, que foi desenvolvido originalmente para ratos. No entanto, verificou-se que os camundongos são animais que vivem em habitats secos, de modo que uma tarefa aquática pode ser menos adequada para eles, devido ao estresse que ela possa induzir (Crusio e Schwegler, 2005).

Tal como acontece com muitas tarefas comportamentais, o labirinto radial também foi originalmente desenvolvido para ser usado com ratos. Estudos mais recentes têm tentado adaptar este aparato para camundongos, que são geralmente mais ansiosos e mais sensíveis ao estresse do que os ratos. Para evitar a ansiedade induzida pela altitude, o

labirinto é colocado sobre o chão da sala de testes e os braços são fechados. A plataforma central mede 22 centímetros de diâmetro, os braços têm 25 cm de comprimento, 6 cm de largura e 6 cm de altura. Pistas visuais são colocadas no labirinto e fora dele para ajudar na orientação espacial (Crusio e Schwegler, 2005).

A partir do dia antes do pré-treino até o final dos experimentos, os animais foram mantidos numa dieta de restrição alimentar, onde recebiam ração por duas horas diárias, logo após os experimentos, com água disponível livremente. No pré-treino, após dez sessões de acupuntura, os camundongos foram colocados no aparato por cinco minutos por dia para se adaptarem, sem conter alimentos nos braços, durante dois dias. A partir do terceiro dia as habilidades de aprendizagem e memória foram avaliadas de acordo com o método descrito previamente por Olton e Samuelson (1976).

Diariamente, após a 12^a sessão de acupuntura, os camundongos foram submetidos a sessões regulares de testes por oito dias consecutivos e as sessões de acupuntura foram mantidas sempre antes dos testes. Em cada teste os animais tinham cinco minutos para visitar todos os oito braços e comer os reforços alimentares (bolinhas de chocolate) que foram colocados sempre nos mesmos braços (1, 2, 5 e 6). Para iniciar cada ensaio, o animal foi colocado na plataforma central, com uma orientação aleatória, deixando-o entrar em qualquer um dos braços. O desempenho do animal em cada ensaio foi avaliado através de dois parâmetros: o número de escolhas corretas nos primeiros quatro braços e o número de erros, que foi definido como a escolha de braços já visitados (Ward et al., 1999; Mizuno et al., 2000; Egashira et al., 2004; Watanabe et al., 2013). Para evitar estímulos olfativos persistentes e preferências, o aparato foi higienizado com etanol 20% depois de testar cada animal.

4.3.4 Teste da caixa claro/escuro

O teste claro/escuro é baseado na aversão natural dos roedores a áreas muito iluminadas e no comportamento exploratório espontâneo desses animais em resposta a fatores moderados de estresse, isto é, ambiente novo e luminoso (Crawley e Goodwin, 1980). Uma situação de conflito natural ocorre quando um animal é exposto a um ambiente desconhecido ou a objetos novos. O conflito é entre a tendência para explorar e a tendência inicial de evitar o desconhecido (Bourin e

Hascoët, 2003). A atividade exploratória é o resultado combinado dessas tendências em situações novas.

Assim, o teste claro/escuro é usado como um índice da atividade ansiolítica, que avalia o comportamento do animal numa caixa com dois compartimentos. O compartimento claro e grande é iluminado e o compartimento preto e pequeno é escuro. Um aumento nas transições sem um aumento na locomoção espontânea é considerado como um reflexo da atividade ansiolítica (Belzung et al., 1987). A melhor medida é a percentagem de tempo gasto e o comportamento exploratório em cada compartimento (Hascoët e Bourin, 1998). Este modelo tem a vantagem de ser rápido e de fácil execução, sem o treino prévio dos animais, sem privação de alimento e de água e são usados estímulos naturais (Bourin e Hascoët, 2003).

A caixa claro/escuro (45 x 27 x 27 cm) consiste de duas câmaras ligadas por uma abertura (7,5 x 7,5 cm) localizada ao nível do chão no centro da parede de divisória. A câmara pequena (18 x 27 cm) foi pintada de preto e coberta com tampa de vidro acrílico e a câmara maior (27 x 27 cm) foi pintada de branco. Uma iluminação mais forte foi fornecida por uma lâmpada de 60 watts localizada a 40 cm acima do centro da câmara branca.

Os camundongos usados para este experimento foram os mesmos 36 que passaram pelo teste de RO, portanto o teste da caixa claro/escuro foi realizado um dia após a última sessão de acupuntura. Os animais foram colocados no centro da câmara branca de costas para a abertura e exploraram o aparato durante cinco minutos. Um observador distante cerca de 1 m da caixa registrou o comportamento dos animais nesse intervalo de tempo. Após, os camundongos foram retirados da caixa pela base das suas caudas e voltaram à sua gaiola de origem. A caixa foi higienizada com uma solução de etanol a 20% entre os testes.

Os comportamentos observados foram: a latência para entrar na câmara escura, o número de vezes que o animal passou de uma câmara para outra, o tempo em que o animal gastou no lado escuro da caixa e o tempo que o animal gastou no lado claro da caixa.

4.3.5 Teste do labirinto em cruz elevado

Trata-se de um teste de comportamento animal que surgiu com os estudos sobre a exploração e o medo, realizados por Montgomery em 1958. Esse autor levantou a hipótese de que a estimulação provocada pela novidade (na forma de um ambiente desconhecido) produzia

reações conflituosas de medo e curiosidade, evidenciadas como tendências de esquiva e aproximação, respectivamente (Montgomery, 1958). No labirinto em forma de Y, utilizado originalmente por Montgomery, observava-se uma menor frequência de entradas no braço aberto (sem paredes) em comparação com o braço fechado (cercado por paredes altas) (Pellow et al., 1985).

A versão atualmente utilizada do labirinto em cruz elevado para ratos foi inicialmente proposta por Handley e Mithani, em 1984, e posteriormente validada por Pellow e colaboradores em 1985. Em 1987, Lister publicou um estudo demonstrando que o labirinto em cruz elevado também podia ser utilizado como um modelo de ansiedade em camundongos. Ele consiste de dois braços abertos (30×5 cm) e dois braços fechados ($30 \times 5 \times 15$ cm) dispostos de tal modo que os dois braços abertos ficam um em frente ao outro. Os braços são ligados por uma plataforma central (5×5 cm). O aparato tem a forma de uma cruz e é elevado a uma altura de 40 cm acima do chão.

O animal é exposto a um ambiente com dois braços abertos e dois braços fechados, com braços do mesmo tipo opostos entre si. As sessões são padronizadas pelo tempo de observação de cinco minutos e verifica-se a exploração dos animais nos braços do labirinto. Ao longo da sessão, os animais diminuem progressivamente sua atividade geral, principalmente o número de entradas nos braços abertos, passando cada vez mais tempo nos braços fechados. No total, entretanto, a observação do número médio de entradas e do tempo de permanência em cada tipo de braço nos cinco minutos de sessão (índices tradicionalmente utilizados para este modelo) mostra uma acentuada preferência pela exploração dos braços fechados, evidenciada por um maior número de entradas e um maior tempo de permanência neles. Esta preferência é aumentada em animais que receberam agentes ansiogênicos e diminuiu em animais que receberam agentes ansiolíticos (Walf e Frye, 2007).

Foram utilizados 27 animais para realização deste experimento. No dia do teste, após a 15ª sessão de acupuntura, cada camundongo foi gentilmente colocado na extremidade distal de um dos braços abertos do aparato com o focinho voltado para a plataforma central (Orzelska et al., 2013), sendo permitido explorar o local por cinco minutos. Então foi registrado o tempo que o animal levou para se mover a partir do braço aberto para um dos braços fechados (latência de transferência), o tempo gasto nos braços abertos e o tempo gasto nos braços fechados. O critério de entrada do animal nos braços foi cruzar com todas as quatro patas uma linha imaginária que separa os braços do espaço central (Itoh et al., 1990; Hlinak e Krejci, 2002; Biala e Kruk, 2008; Orzelska et al., 2013).

Para evitar estímulos olfativos, os braços foram higienizados com etanol 20% depois de testar cada animal.

4.3.6 Teste de suspensão da cauda

Desde a sua introdução em 1985, o teste de suspensão da cauda tornou-se um dos modelos mais utilizados para avaliar a atividade antidepressiva em camundongos (Cryan et al., 2005). A quantidade de dados gerados nas duas décadas seguintes mostrou que o estresse inevitável de suspender um camundongo pela cauda pode dar informações valiosas sobre a capacidade dos animais para lidar com uma situação estressante. Além disso, e talvez o mais importante para o desenvolvimento de medicamentos antidepressivos, os estudos com o teste de suspensão da cauda podem ser úteis no futuro desenrolar das vias moleculares, genéticas e neuroquímicas envolvidas na ação depressiva e antidepressiva (Cryan et al., 2005).

O teste de suspensão da cauda é baseado na observação de que os roedores, após movimentos iniciais na tentativa de escapar, desenvolvem uma postura imóvel quando colocados numa situação estressante inescapável (Thierry et al., 1986).

Os animais tratados com antidepressivos antes do teste tentam escapar por um período de tempo mais longo do que os tratados com veículo. O teste é geralmente bastante rápido, com uma duração de seis minutos, e o tempo que passam imóveis é registrado manualmente ou através de um dispositivo automático. Tratamentos antidepressivos agudos diminuem esses índices de imobilidade (Cryan et al., 2005). A vantagem deste teste é a sua capacidade para detectar um amplo espectro de antidepressivos, independentemente do seu mecanismo de ação, além de ser barato, com um método fácil e simples de execução.

Participaram deste experimento os mesmos 27 animais que já haviam passado pelo teste do labirinto em cruz elevado. Portanto, um dia após a 15ª sessão de acupuntura, cada camundongo foi suspenso pela cauda (2 cm da extremidade) com uma fita adesiva por um período de seis minutos, sendo colocado a uma altura de 60 cm acima do chão. A latência do primeiro momento de imobilidade após a agitação inicial e o tempo total de imobilidade foram quantificados para posterior avaliação.

4.3.7 Nociceção induzida por formalina

O teste de formalina em camundongos é um modelo válido e confiável de nociceção e é sensível para diversas classes de fármacos analgésicos (Hunnskaar e Hole, 1987).

A resposta à formalina apresenta uma fase precoce e uma fase tardia, permitindo avaliar dois tipos distintos de nociceção. A fase inicial, também chamada de fase neurogênica, é causada predominantemente pela ativação das fibras C (nociceptivas) devido à estimulação química direta de nociceptores (Tjolsen et al., 1992). A fase tardia, conhecida como fase inflamatória, é dependente da combinação de uma reação inflamatória nos tecidos periféricos e de alterações funcionais no corno dorsal da medula espinal, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios (Hunnskaar e Hole, 1987; Tjolsen et al., 1992).

Participaram deste experimento 28 animais. Para coleta dos dados, após a 15ª sessão de acupuntura, os camundongos receberam uma injeção de 20 μL de formalina 2,5% (em salina estéril) via intraplantar na região ventral da pata posterior direita. Foi observado o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada em intervalos de 0-5 minutos (fase neurogênica) e de 15-30 minutos (fase inflamatória) após a injeção de formalina.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

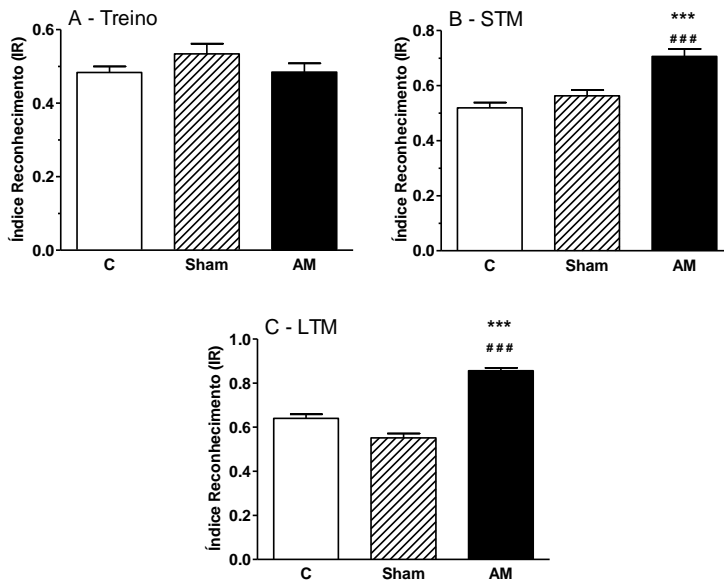
Os resultados foram analisados através do programa Graph Pad Prism versão 5.01 (2005, San Diego, CA, USA). Os dados apresentados para os testes de reconhecimento de objetos, labirinto radial de oito braços, labirinto em cruz elevado, caixa claro/escuro, suspensão da calda e formalina possuem uma distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro–Wilk ($P > 0,05$). Desta forma, os resultados foram expressos como média + erro padrão da média e foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguidos pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os dados obtidos no teste de esQUIVA inibitória, por serem não paramétricos conforme o teste de Shapiro–Wilk ($P < 0,05$), foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e avaliados através da análise Kruskal–Wallis seguida pelo teste de Dunn's. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 EFEITOS DA AM NA TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS NOVOS

Os resultados apresentados na figura 10A demonstram que o tratamento com AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias não afetou o índice de reconhecimento de objetos ($F_{2,33}=1,526$; $p=0,232$) durante o treino quando comparado aos grupos controle e sham. No entanto, os dados apresentados nas figuras 10B e 10C demonstram que o tratamento com AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias promoveu significativo aumento do índice de reconhecimento de objetos quando analisado na memória de curta duração, 3h após o treino ($F_{2,33}=18,95$; $p=0.0001$), e na memória de longa duração, 24h após o treino ($F_{2,33}=85,00$; $p=0.0001$), comparado aos grupos controle e sham. Isto sugere que a AM no *Baihui* (VG20) promoveu um aumento da retenção da memória de RO de curta e de longa duração em camundongos.

Figura 10 - Efeito da AM no VG20 na memória de reconhecimento de objetos.



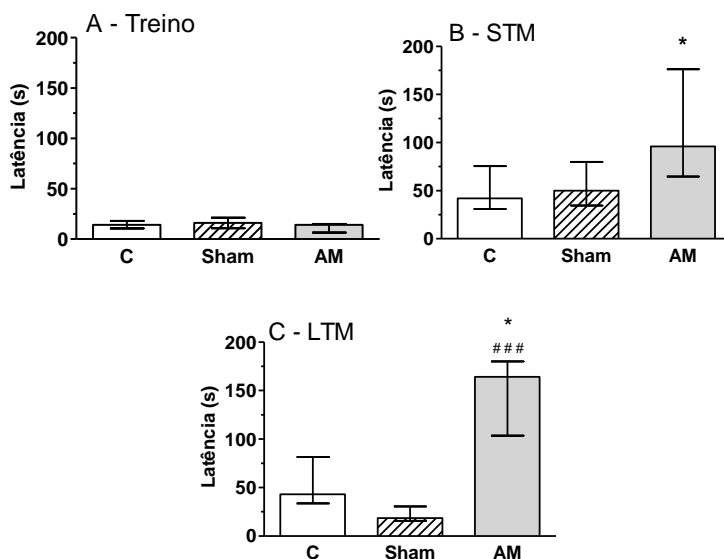
Os dados representam o índice de reconhecimento de objetos, obtido pelos camundongos tratados e pelo controle. (A) sessão de treino; (B) STM (3 h após treino); (C) LTM (24 h após treino). Os resultados representam a média de 10 a 13 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). *** $P < 0,001$ representa a diferença em relação ao grupo controle (C) e ### $P < 0,001$ representa a diferença em relação ao grupo sham. One-way ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls.

5.2 EFEITOS DA AM NA MEMÓRIA DE CURTA E DE LONGA DURAÇÃO NA ESQUIVA INIBITÓRIA

Os dados apresentados na figura 11A demonstram que a AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias não afetou a latência de decida na esQUIVA inibitória durante a sessão de teste [$H(3)$, $N36=3,125$; $p=0.209$] quando comparado aos grupos controle e sham. Por outro lado, os dados apresentados na figura 11B demonstram que o tratamento com AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias promoveu significativo aumento na latência de decida na esQUIVA inibitória quando analisado na memória de curta duração, 3h após o teste [$H(3)$, $N32=8,288$; $p=0.015$], comparado

ao grupo controle, mas não quando comparado ao grupo sham. No entanto, os dados apresentados na figura 11C demonstram que o tratamento com AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias promoveu significativo aumento na latência de decida na esQUIVA inibitória quando analisado na memória de longa duração, 24h após o treino [$H(3)$, $N32=16,50$; $p=0.0003$], comparado aos grupos controle e sham. Estes resultados sugerem que a AM no *Baihui* (VG20) promoveu um aumento da retenção da memória aversiva de curta e de longa duração em camundongos

Figura 11 - Efeitos da AM no VG20 na STM e LTM de camundongos avaliados na tarefa de esQUIVA inibitória.

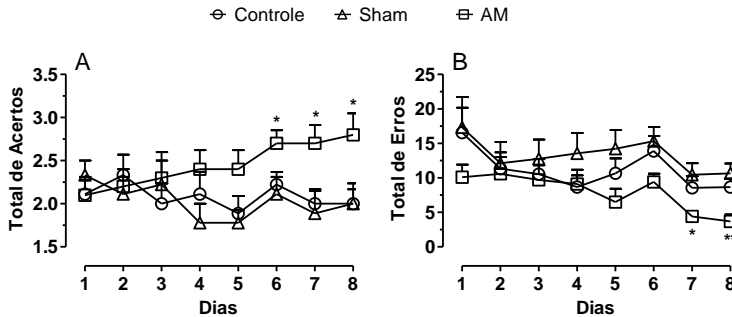


Os dados representam a mediana de 9 a 13 animais e as linhas verticais representam os intervalos interquartis das latências para descer na grade no treino (A), na memória de curta duração (B) e de longa duração (C). * $p<0,05$ representa a diferença em relação ao grupo controle (C); ### $P<0,001$ representa a diferença em relação ao grupo sham. Análise não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunn's.

5.3 EFEITOS DA AM NO LABIRINTO RADIAL DE OITO BRAÇOS

No teste da memória espacial, com relação à memória de referência (aprender a localizar os braços onde sempre havia comida), os dados apresentados na figura 12 demonstram que a AM no *Baihui* (VG20) durante 19 dias promoveu uma melhora significativa na memória quando analisada no labirinto radial de oito braços. A figura 12A mostra que a AM no *Baihui* (VG20) aumentou de forma significativa as escolhas corretas no sexto ($F_{2,25}=3,599$; $p=0,0423$), sétimo ($F_{2,25}=4,238$; $p=0,0260$) e oitavo dias ($F_{2,25}=4,433$; $p=0,0225$) quando comparada aos grupos controle e sham. Além disso, os dados apresentados na figura 12B demonstram que o tratamento com AM no *Baihui* (VG20) promoveu significativa diminuição do total dos erros no sétimo ($F_{2,25}=5,014$; $p=0,0148$) e no oitavo ($F_{2,25}=8,968$; $p=0,0012$) dias quando comparado com os grupos controle e sham. Isto sugere que a AM no *Baihui* (VG20) foi capaz de melhorar a memória espacial em camundongos

Figura 12 - Efeitos da AM no VG20 na memória espacial de camundongos analisados no teste do labirinto radial de oito braços.

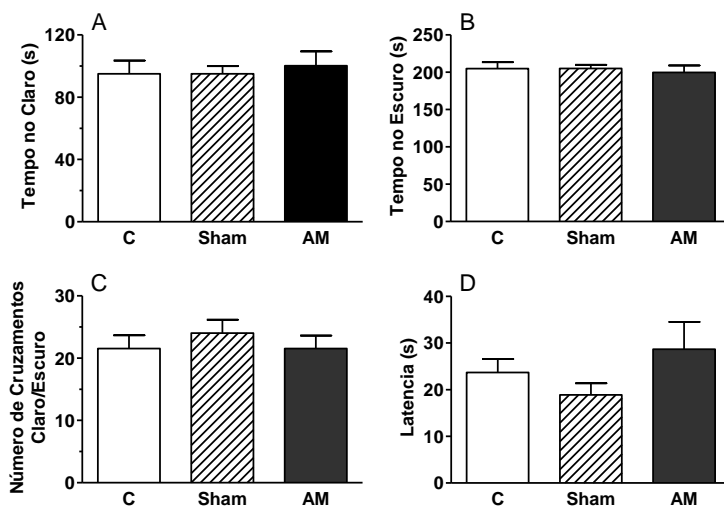


Os dados representam o total de acertos (A) e o total de erros (B) no teste do labirinto radial de oito braços. Os resultados mostram a média de 9 a 10 animais e as curvas indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam a diferença em relação aos grupos controle (C) e sham. One-way ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls.

5.4 EFEITOS DA AM NO TESTE DA CAIXA CLARO/ESCURO

Os resultados da atividade do tipo ansiolítica avaliados pelo teste da caixa claro/escuro estão representados na figura 13 (A-D), mostrando que a AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias não alterou de forma significativa o tempo de permanência no lado claro ($F_{2,33}=0,1387$; $p=0,8710$), o tempo de permanência no lado escuro ($F_{2,33}=0,1387$; $p=0,8710$), o número de cruzamentos do lado claro para o escuro ($F_{2,33}=0,3962$; $p=0,6760$) e a latência para o primeiro cruzamento do lado claro para o escuro ($F_{2,33}=1,250$; $p=0,299$) da caixa claro/escuro durante a sessão de teste quando comparada aos grupos controle e sham.

Figura 13 - Efeitos da AM no VG20 na ansiedade de camundongos analisados no teste da caixa claro/escuro.

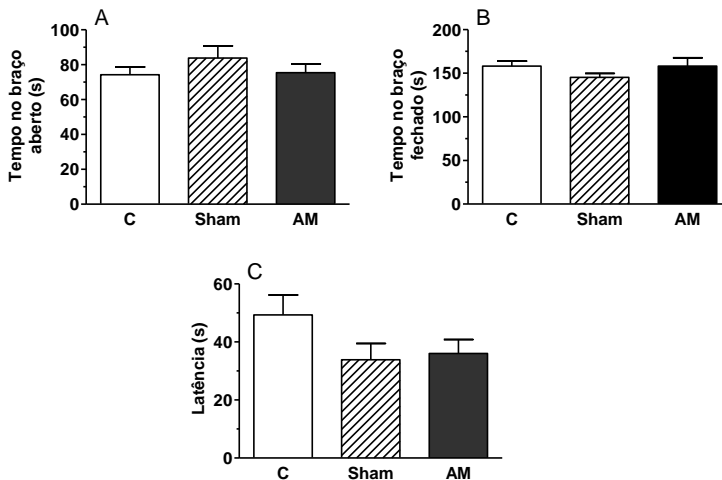


Os dados representam o tempo de permanência na área clara (A), o tempo de permanência na área escura (B), o número de cruzamentos do lado claro para o escuro da caixa claro/escuro (C) e a latência para do primeiro cruzamento do lado claro para o escuro (D) no teste da caixa claro/escuro. Os resultados representam a média de 10 a 13 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.).

5.5 EFEITOS DA AM NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Os resultados apresentados na figura 14 (A-C) demonstram que a AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias não alterou de forma significativa o tempo de permanência no braço aberto ($F_{2,24}=0,8308$; $p=0,4479$), o tempo de permanência no braço fechado ($F_{2,24}=1,000$; $p=0,3828$) e a latência para a entrada no braço fechado ($F_{2,24}=2,051$; $p=0,1505$) do labirinto em cruz elevado durante a sessão de teste quando comparada aos grupos controle e sham.

Figura 14 - Efeitos da AM no VG20 na ansiedade de camundongos analisados no labirinto em cruz elevado.

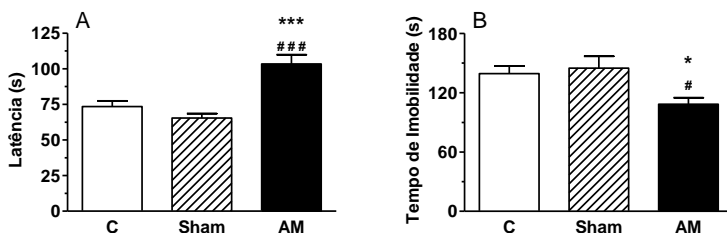


Os dados representam o tempo de permanência nos braços abertos (A), o tempo de permanência nos braços fechados (B) e a latência que o animal levou inicialmente para se mover do braço aberto para um dos braços fechados (C) no labirinto em cruz elevado. Os resultados representam a média de 8 a 10 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). One-way ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls.

5.6 EFEITOS DA AM NO TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA

Os resultados da possível atividade do tipo antidepressiva avaliados pelo teste de suspensão da cauda estão mostrados na figura 15. O tratamento dos animais com a AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias promoveu significativo aumento da latência para o início da resposta de imobilidade ($F_{2,24}=15,68$; $p<0,0001$) durante a sessão do teste de suspensão da cauda quando comparado aos grupos controle e sham (figura 15A). Além disso, os dados apresentados na figura 15B mostram que a AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias também promoveu significativa redução do tempo de imobilidade ($F_{2,24}=5,339$; $p=0,0121$) durante a sessão do teste de suspensão da cauda quando comparada aos grupos controle e sham. Estes dados sugerem que a AM no *Baihui* (VG20) tem um efeito antidepressivo em camundongos.

Figura 15. Efeitos da AM no VG20 no comportamento antidepressivo de camundongos analisados no teste de suspensão da cauda.

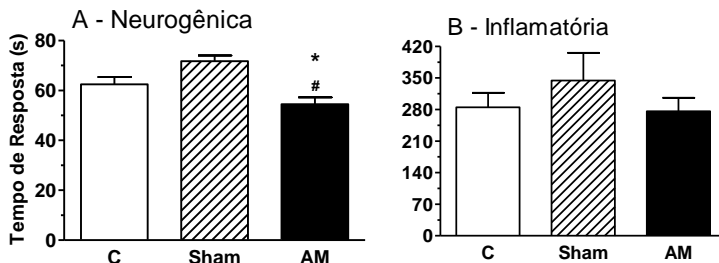


Os dados mostram o tempo da latência para o início da resposta de imobilidade (A) e o tempo de imobilidade (B) no teste de suspensão da cauda. Os resultados representam a média de 8 a 10 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * $P<0,05$ e *** $P<0,001$ representam a diferença em relação ao grupo controle (C); # $P<0,05$ e ### $P<0,001$ representam a diferença em relação ao grupo sham. One-way ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls.

5.7 EFEITOS DA AM NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

Os resultados dos possíveis efeitos antinociceptivos avaliados pelo teste da formalina estão mostrados na figura 16. O tratamento dos animais com a AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias promoveu uma redução no comportamento nociceptivo ($F_{2,23}=10,63$; $p=0,0005$) na fase inicial do teste de nocicepção induzida por formalina quando comparado aos grupos controle e sham (figura 16A). Por outro lado, os dados apresentados na figura 16B mostram que o efeito nociceptivo na segunda fase do teste não foi significativo entre os grupos ($F_{2,25}=0,750$; $p=0,4824$). Estes dados sugerem que a AM no *Baihui* (VG20) foi capaz de produzir propriedades antinociceptivas parciais somente na dor neurogênica em camundongos.

Figura 16 - Efeitos da AM no *Baihui* (VG20) na nocicepção de camundongos analisados no teste de nocicepção induzida por formalina.



Os dados representam o tempo de resposta na primeira fase (A) e o tempo de resposta na segunda fase (B) no teste de nocicepção induzida por formalina. Os resultados representam a média de 8 a 10 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * $P<0,05$ representa a diferença em relação ao grupo controle (C); # $P<0,05$ representa a diferença em relação ao grupo sham. One-way ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls.

6. DISCUSSÃO

Na maioria dos estudos sobre os efeitos da acupuntura em animais conscientes, é necessário manter o animal contido ou anestesiado para a inserção da agulha. No nosso tratamento, para evitar o estresse induzido pela contenção, os camundongos foram cuidadosamente manuseados para a inserção da agulha e, em seguida, os animais foram colocados livremente em uma área de 100 cm x 30 cm, com a agulha ainda inserida. Além disso, para evitar estresse adicional, decidimos trabalhar com apenas um ponto. Assim, todos os animais, tanto os que foram estimulados com a agulha de acupuntura quanto o grupo controle foram igualmente submetidos ao mesmo tipo de manuseio a fim de eliminar possíveis interferências nos resultados.

A medicina oriental classifica os aspectos da lesão cerebral em diferentes síndromes ou padrões de acordo com seus sintomas clínicos. O encéfalo é considerado um caso especial na fisiologia chinesa e conhecido como um dos órgãos "extraordinários". De acordo com a teoria da MTC, a essência do rim produz a medula que forma o encéfalo como o "mar da medula". O encéfalo desempenha funções do pensamento e da memória e é considerado como o mais limpo órgão dentro do corpo. Se ele for prejudicado por algum tipo de trauma, o resto do corpo torna-se mais susceptível às doenças (Xia et al., 2010).

O *Baihui* (VG20) é considerado um dos pontos de acupuntura mais importantes do Vaso Governador, o qual faz conexão com o encéfalo, e também de todo o sistema de meridianos (Shen et al., 2010). Ele é vascularizado por uma rede formada pelas artérias e veias temporais superficiais e pelas artérias e veias occipitais de ambos os lados e é inervado pelo ramo do nervo occipital maior (Shen et al., 2010). Muitos dos seus efeitos sobre as doenças cerebrais já foram estudados. Em 1996 um grupo de pesquisadores demonstrou que a oclusão bilateral das artérias carótidas comum produz significativo aumento dos níveis de óxido nítrico e de endotelina no encéfalo de ratos (para revisão ver Liu e Zhu, 2011). Além disto, os mesmos autores demonstraram que a eletroacupuntura em pontos do meridiano Vaso Governador (VG20 e VG14) foi capaz de restabelecer o aumento dos níveis de óxido nítrico e de endotelina no encéfalo e no sangue dos ratos que sofreram oclusão bilateral das artérias carótidas comum (para revisão ver Liu e Zhu, 2011). Assim, demonstraram que a eletroacupuntura nesse meridiano tem efeito protetor sobre o dano neural induzido por isquemia cerebral em ratos (para revisão ver Liu e

Zhu, 2011). Além disso, em 2005, outra pesquisa demonstrou que a eletroacupuntura nos acupontos *Baihui* (VG20) e *Fengfu* (VG16), ao longo do meridiano Vaso Governador, foi capaz de reduzir a convulsão (epilepsia) produzida pela micro-injeção de penicilina no hipocampo de ratos através da regulação da concentração do transportador do aminoácido taurina, aumentando assim a sua liberação (para revisão ver Liu e Zhu, 2011).

Neste sentido, é proposto que o acuponto *Baihui* (VG20) tenha um efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, promovendo a liberação de neurotransmissores ou neuromoduladores no encéfalo e na medula espinal. Estas alterações neuroquímicas podem estimular as habilidades naturais de cura do corpo e promover o bem-estar físico e emocional (Shen et al., 2010). Com base no que se conhece a respeito da modulação da memória, é possível afirmar que vários estudos convergem, apoiando o ponto de vista de que a memória relacionada a eventos emocionais é modulada por um sistema regulador endógeno mediado pelos hormônios de estresse e pela amígdala cerebral (Quevedo et al., 2003).

Pesquisas demonstraram também que a acupuntura tem uma influência direta sobre a neuroplasticidade e a neurogênese (Wingate, 2012). O encéfalo tem a capacidade de criar novas conexões neurais e até mesmo novas células do sistema nervoso. Até recentemente pensava-se que qualquer perda de neurônios devido à lesão ou ao envelhecimento era permanente em adultos. Sabe-se agora que as células-tronco neurais ainda estão ativas em certas partes do encéfalo adulto, no giro dentado do hipocampo e na zona subventricular, e que a neurogênese é possível em todos os principais tipos de células neurais: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Wingate, 2012). Um recente estudo mostrou que a acupuntura induz a diferenciação celular e dos neuroblastos no hipocampo, fornecendo evidências de que ela pode ser utilizada como uma terapia de estimulação da neurogênese (Wingate, 2012). Também foi demonstrado que a acupuntura tem efeito na sinalização do AMPc, importante na proliferação, na diferenciação e sobrevivência de células precursoras neuronais, bem como na regulação do fator neurotrófico que interfere no crescimento, diferenciação e sobrevivência dos neurônios (Wingate, 2012).

Ademais, foi demonstrado que a eletroacupuntura no VG20 e no VG16 reduziu o nível do comprometimento neurológico e aumentou a expressão do gene 15 relacionado com a plasticidade (CPG15) no hipocampo de ratos com isquemia e reperfusão cerebral e melhorou a neuroplasticidade de células cerebrais comprometidas (Xiaomin et al.,

2011). Também foi descrito que a estimulação dos acupontos VG20 e VG14 aumentou o reparo neuronal após a lesão isquêmica, ativou o sistema imunológico e reduziu a morte celular tanto no local quanto próximo à lesão (Yang et al., 2012). Neste sentido, os neurônios recém-produtos no SNC adulto aumentam a plasticidade neuronal, a qual é importante tanto para a aprendizagem e a memória (Ming e Song, 2005), quanto para a recuperação da neurodegeneração observada durante o envelhecimento normal (Zhang e Jin, 2012).

Todas essas evidências científicas servem de suporte para os nossos resultados alcançados com a estimulação manual do acuponto *Baihui* (VG20). No entanto este foi o primeiro estudo a demonstrar, através de vários modelos comportamentais, que AM no ponto *Baihui* (VG20) induziu acentuada melhora no aprendizado e na memória de camundongos e que também apresentou um efeito antidepressivo. Na tarefa de RO o grupo tratado com acupuntura mostrou um aumento significativo no tempo gasto explorando o objeto novo em relação ao tempo gasto explorando o objeto familiar, tanto na STM quanto na LTM. Estes dados sugerem que a AM promoveu níveis mais elevados de retenção da memória nestes animais em comparação com o grupo controle e sham.

Além disso, nós demonstramos que o tratamento com AM no *Baihui* (VG20) aumentou a latência de descida na esquiiva inibitória durante a sessão de teste de retenção da memória de longo prazo, mas não na de curto prazo em comparação com o grupo controle. Estes resultados demonstram que o grupo controle reteve a memória do estímulo agressivo, mas o grupo tratado com acupuntura obteve uma significância maior. Estes dados sugerem que a AM no *Baihui* (VG20) também melhora a memória de longo prazo em camundongos na tarefa da esquiiva inibitória. Este é um paradigma clássico para avaliar a memória em roedores e tem um forte componente aversivo, o qual possibilita detectar mudança na memória espacial hipocampo-dependente. Assim, o hipocampo torna-se uma estrutura de interesse para novos estudos abordando os efeitos da acupuntura nas funções cognitivas. Além disso, nossos dados demonstram que os camundongos tratados com acupuntura exibem um desempenho melhor da memória espacial no labirinto radial de oito braços através do aumento do número de escolhas corretas no sexto, sétimo e oitavo dias e significativamente menor quantidade de erros no sétimo e no oitavo dias de testes. Estes achados sugerem que a AM no *Baihui* (VG20) desempenha um papel potencial na memória espacial em camundongos.

Diante das evidências científicas de que o estado emocional pode afetar os processos de aprendizagem e memória (Schwabe et al., 2011), fomos investigar também quais seriam os efeitos da AM no *Baihui* (VG20) na ansiedade e na depressão dos camundongos. Verificando o provável efeito da AM no *Baihui* (VG20) na atividade ansiolítica dos camundongos, não encontramos diferenças significativas entre os grupos analisados. Os resultados avaliados pelo teste da caixa claro/escuro mostraram que a AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias não alterou de forma significativa o tempo de permanência no lado claro, o tempo de permanência no lado escuro, o número de cruzamentos do lado claro para o escuro nem a latência para o primeiro cruzamento do lado claro para o lado escuro durante a sessão de teste quando comparada com os grupos controle e sham. Os resultados avaliados pelo teste do labirinto em cruz elevado demonstraram que a AM no *Baihui* (VG20) durante 15 dias não alterou de forma significativa o tempo de permanência no braço aberto, o tempo de permanência no braço fechado nem a latência para a entrada no braço fechado durante a sessão de teste quando comparada com os grupos controle e sham. Estes resultados divergem de uma das funções clássicas atribuídas ao acuponto *Baihui* (VG20) que é considerado ansiolítico (Zhao et al., 2007).

No entanto, analisando o provável efeito da AM no *Baihui* (VG20) na atividade antidepressiva dos camundongos através do teste de suspensão da cauda, verificamos que o tempo de imobilidade, principal parâmetro para avaliar a atividade antidepressiva em potencial, foi menor nos camundongos tratados com acupuntura em comparação com os outros grupos. Ademais, a latência para imobilidade também mostrou um aumento significativo. Estes dados sugerem que a AM no *Baihui* (VG20) tem um efeito tipo antidepressivo em camundongos. Estudos já mostraram que existe uma relação positiva entre a imobilidade reduzida no teste de suspensão da cauda e um aumento da neurogênese no hipocampo (Xu Z et al., 2009; Leconte et al., 2011). Como dito anteriormente, o *Baihui* (VG20) é onde todos os meridianos *yang* se encontram, promovendo equilíbrio emocional e, consequentemente, contribuindo para a aprendizagem e a memória.

Finalmente, os nossos dados também indicam que a AM no *Baihui* (VG20) foi capaz de produzir propriedades antinociceptivas parciais somente na dor neurogênica no teste da formalina, haja vista que os animais do grupo acupuntura apresentaram uma redução significativa no tempo de resposta (lambidas e mordidas) na primeira fase em comparação com o grupo controle, mas não na segunda fase

(dor inflamatória). Isto sugere que a AM no *Baihui* (VG20) teve um efeito antinociceptivo relacionado com a dor neurogênica, mas não com a dor inflamatória.

A seleção do acuponto *Baihui* (VG20) foi baseada nas funções dos pontos de acupuntura registradas na literatura antiga e também em investigações recentes da neurociência. Assim, existem muitos outros acupontos que podem ser relacionados com a melhora da aprendizagem e da memória como o VG26, C7, B23, R1, CS6, etc., por isso outros experimentos utilizando estes e outros acupontos devem ser realizados visando investigar mais profundamente os benefícios da acupuntura no aprendizado e memória. Tal sugestão é importante porque a acupuntura é uma modalidade terapêutica considerada segura, com reduzidos efeitos colaterais e uma ótima relação custo-benefício, que pode ser facilmente inserida nos programas de reabilitação e prevenção. Por outro lado, estudos futuros também deverão ser realizados para elucidação dos possíveis mecanismos neurofisiológicos responsáveis pelo efeito benéfico da acupuntura manual na melhora da memória e da depressão.

7. CONCLUSÃO

Os nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que a AM no *Baihui* (VG20) melhorou significativamente a capacidade do aprendizado e da memória em camundongos. Além disto, a AM no *Baihui* (VG20) apresentou um efeito tipo antidepressivo e reduziu a nocicepção neurogênica, porém não alterou a ansiedade dos animais e a dor de origem inflamatória. Assim, os resultados do presente estudo sugerem que a estimulação no *Baihui* (VG20) pela acupuntura manual pode ser usada como uma abordagem alternativa na melhora da aprendizagem e da memória e como antidepressiva.

REFERÊNCIAS

- ALBERINI, C.M. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: Revisiting the skepticism. **Neurobiol Learn Mem.**, 89:293-311. 2008.
- ALDRIGE, W.N. *et al.* Brain damage due to trimethyltin compounds. **Lancet.**, 8248:692–693. 1981.
- ALVAREZ, A. *et al.* Serum TNF- α levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. **Neurobiol Aging.**, 28:533-536. 2007.
- ARLOTTA, P.; MAGAVI, S.S.; MACKLIS, J.D. Induction of adult neurogenesis: molecular manipulation of neural precursors in situ. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 991:229–36. 2003.
- BAILEY, J.A.; LAHIRI, D.K. A novel effect of rivastigmine on pre-synaptic proteins and neuronal viability in a neurodegeneration model of fetal rat primary cortical cultures and its implication in Alzheimer's disease. **J. Neurochem.**, 112843–853. 2010.
- BARNEA, A.; NOTTEBOHM, F. Patterns of food storing by black-capped chickadees suggest a mnemonic hypothesis. **Anim Behav.**, 49:1161–1176. 1995.
- BEKINSCHTEIN, P. *et al.* Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis and BDNF dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, 53:261-77. 2007.
- BEKINSCHTEIN, P. *et al.* BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105:2711-6. 2008.
- BELZUNG, C. *et al.* Anxiogenic effects of methyl-h-carboline-carboxylate in a light/dark choice situation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 28, 29–33. 1987.
- BERMEJO, P. *et al.* Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Immunol Lett.**, 117:198–202. 2008.

BERNABEU, R. *et al.* Involvement of hippocampal AMPc/AMPC-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94:7041-6. 1997.

BEVINS, R.A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nature Protocols**, 1:1306-1311. 2006.

BIALA, G.; KRUK, M. Cannabinoid receptor ligands suppress memory-related effects of nicotine in the elevated plus maze test in mice. **Behavioural brain research**, 192(2), 198-202. 2008.

BIELLA, G. *et al.* Acupuncture produces central activations in pain regions. **Neuroimage**, 14:60-66. 2001.

BONINI, J.S. *et al.* Inhibition of PKC in basolateral amygdala and posterior parietal cortex impairs consolidation of inhibitory avoidance memory. **Pharmacol Biochem Behav.**, 80:63-7. 2005.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European journal of pharmacology**, 463(1), 55-65. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde/FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/icit/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2018&sid=85>. Publicado em: 03/10/2011.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

BROWN, A.W. *et al.* The behavioural and neuropathologic sequelae of intoxication by trimethyltin compound in the rat. **Am. J. Pathol.**, 97:59-81. 1979.

BRUCCOLERI, A.; BROWN, H.; HARRY, G.J. Cellular localization and temporal elevation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, and transforming growth factor-beta 1 mRNA in hippocampal injury response induced by trimethyltin. **J Neurochem.**, 71:1577–1587. 1998.

CAMARANO, A. A. Envelhecimento da População Brasileira: Uma Contribuição Demográfica. In: Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 58-71. 2002.

CAMERON, H.A.; MCEWEN, B.S.; GOULD, E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. **J Neurosci.**, 15:4687–4692. 1995.

CAMMAROTA, M. *et al.* Reversible changes in hippocampal 3[H]-AMPA binding following inhibitory avoidance training in the rat. **Neurobiol Learn Mem.**, 66:85-8. 1996.

CAMMAROTA, M. *et al.* Learningspecific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. **Eur J Neurosci.**, 10:2669-76. 1998.

CAMMAROTA, M. *et al.* Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Mol Brain Res.**, 76:36-46. 2000.

CAMMAROTA, M. *et al.* Participation of CaMKII in neuronal plasticity and memory formation. **Cell Mol Neurobiol.**, 22:259-67. 2002.

CECCARIGLIA, S. *et al.* Cathepsin D plays a crucial role in the trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration process. **Neuroscience**, 174:160-70. 2011.

CHANG, L.W.; DYER, R.S. A time course study of trimethyltin induced neuropathology in rats. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.**, 5: 443–459. 1983.

CHANG, L.W.; DYER, R.S. Early effects of trimethyltin on the dentate gyrus basket cells: a morphological study. **J Toxicol Environ Health**, 16:641–653. 1985.

CHEN, A.C. *et al.* Mode and site of acupuncture modulation in the human brain: 3D (124-ch) EEG power spectrum mapping and source imaging. **Neuroimage**, 29:1080–1091. 2006.

CHEN, M.J. *et al.* Beneficial Effects of Electrostimulation Contingencies on Sustained Attention and Electrocortical Activity. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 17:311–26. 2011.

CHENG, X.N. Chinese Acupuncture and Moxibustion. (Revised Edn). **Foreign Language Press**, pp 2–10. 1990.

CIDRAL-FILHO, F. J. *et al.* Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuroscience**, 193:370–376. 2011.

COSTALL, B. *et al.* The effect of the 5-HT₃ receptor antagonist, RS 42358-197, in animal models of anxiety. **Eur. J. Pharmacol.**, 234:91–99. 1993.

CRAWLEY, J.N.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 13:167–170. 1980.

CRUSIO, W. E.; SCHWEGLER, H. Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. **Behav Brain Funct**, 1(3). 2005.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 29:571–625. 2005.

DA SILVA, M.D. *et al.* Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. **Evid Based Complement Alternat Med.**, 1:217946. 2011.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, 31:673-704. 2007.

DHOND, R.P.; KETTNER, N.; NAPADOW, V. Neuroimaging acupuncture effects in the human brain. **J Altern Complement Med.**, 13:603–616. 2007.

DHOND, R.P. *et al.* Acupuncture modulates resting state connectivity in default and sensorimotor brain networks. **Pain**, 136:407–418. 2008.

DU, L.N. *et al.* Naloxone and electroacupuncture (EA) improve the immune function of traumatized rats. **Sheng Li Xue Bao**, 50:636–42. 1998.

DUDAI, Y. Consolidation: fragility on the road to the engram. **Neuron**, 17:367-370. 1996.

DYER. R.S. *et al.* The trimethyltin syndrome in rats. **Neurobehav Toxicol Teratol**, 4:127–133. 1982.

EARLEY, B.; BURKE, M.; LEONARD, B.E. Behavioural, biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat. **Neurochem. Int.**, 21:351–366. 1992.

EGASHIRA, N. *et al.* V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. **Neuroscience letters**, 356:195-198. 2004.

EMMEL, V.G. Avaliação do Efeito Antinociceptivo Causado pelo Estímulo do Acuponto BL60 (Kunlun) em Camundongos. Florianópolis: **Universidade Federal de Santa Catarina**. 2008.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioural Brain Research**, 31:47-59. 1988.

FANG, J. *et al.* The salient characteristics of the central effects of acupuncture needling: Limbic-paralimbic-neocortical network modulation. **Human brain mapping**, 30:1196-1206. 2009.

FIEDOROWICZ, A. *et al.* Dentate granule neuron apoptosis and glia activation in murine hippocampus induced by trimethyltin exposure. **Brain Res.**, 912:116–127. 2001.

FECHTER, L.D.; LIU, Y. Elevation of intracellular calcium levels in spiral ganglion cells by trimethyltin. **Hear Res.**, 91:101–119. 1995.

FLOREA, A.M. *et al.* Modulation of intracellular calcium homeostasis by trimethyltin chloride in human tumour cells: neuroblastoma SY5Y and cervix adenocarcinoma HeLa S3. **Toxicology**, 216:1–8. 2005a.

FLOREA, A.M.; YAMOAH, E.N.; DOPP, E. Intracellular calcium disturbances induced by arsenic and its methylated derivatives in relation to genomic damage and apoptosis induction. **Environ Health Perspect**, 113:659–664. 2005b.

GAO, X.Y. *et al.* Sino-European Transcontinental Basic and Clinical High-Tech Acupuncture Studies—Part 3: Violet Laser Stimulation in Anesthetized Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012. 2012.

GARCIA-VERDUGO, J.M. *et al.* Postnatal neurogenesis in the olfactory bulbs of a lizard. A tritiated thymidine autoradiographic study. **Neurosci Lett.**, 98:247–252. 1989.

GELOSO, M.C.; CORVINO, V.; MICHETTI, F. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. **Neurochem.**, 58: 729-738. 2011.

GLICKMAN, S.E. Perseverative neural processes and consolidation of the memory trace. **Psychol. Bull.**, 58:218-233. 1961.

GOULD, E. *et al.* Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nat Neurosci.**, 2:260–265. 1999.

GOLDMAN, S.A.; NOTTEBOHM, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proc Natl Acad Sci USA**, 80:2390–2394. 1983.

- HAN, J.S. Acupuncture: Neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends Neurosci.**, 26:17–22. 2003.
- HAN, J.S. Acupuncture and endorphins. **Neurosci Lett.**, 361:258–261. 2004.
- HAN, J.S. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy. **Pain**, 152:S41-S48. 2011.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of ‘fear’-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, 327:1-5. 1984.
- HASCOËT, M.; BOURIN, M. A new approach to the light/dark procedure in mice. *Pharmacol.* **Biochem. Behav.**, 60:645– 653. 1998.
- HLINAK, Z.; KREJCI, I. Oxiracetam prevented the scopolamine but not the diazepam induced memory deficits in mice. **Behavioural brain research**, 133:395-399. 2002.
- HONIG, W.K. Studies of working memory in the pigeon. **Cognitive processes in animal behavior**, 211-248. 1978.
- HUANG, C.L. *et al.* Acupuncture stimulation of ST36 (Zusanli) attenuates acute renal but not hepatic injury in lipopolysaccharide-stimulated rats. **Anesth Analg.**, 104:646-54. 2007.
- HUGE, J.H.T. *et al.* The primary afferent of acupuncture function. **Progress of Animal Medicine**, 21:31- 34 (in Chinese with English abstract). 2000.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30:103-114. 1987.
- HWANG, H.S. *et al.* Electroacupuncture Delays Hypertension Development through Enhancing NO/NOS Activity in Spontaneously Hypertensive Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011. 2011.

HWANG, I.K. *et al.* Comparing the effects of acupuncture and electroacupuncture at Zusanli and *Baihui* on cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat hippocampus. **The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science**, 72:279-284. 2010.

IMAI, H. *et al.* Type II glucocorticoid receptors are involved in neuronal death and astrocyte activation induced by trimethyltin in the rat hippocampus. **Exp Neurol.**, 171:22–28. 2001.

ISHIDA, N. *et al.* Trimethyltin syndrome as a hippocampal degeneration model: temporal changes and neurochemical features of seizure susceptibility and learning impairment. **Neuroscience**, 81:1183–1191. 1997.

ISHIKAWA, K. *et al.* Hippocampal degeneration inducing impairment of learning in rats: model of dementia? **Behav. Brain Res.**, 83: 39–44. 1997.

ITO, J.; NABESHIMA, T.; KAMEYAMA, T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. **Psychopharmacology**, 101:27-33. 1990.

IWA, M. *et al.* Electroacupuncture at ST-36 accelerates colonic motility and transit in freely moving conscious rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, 290:G285–G292. 2006.

IZQUIERDO, I. *et al.* Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, hippocampus and medial septum of rats. **Behav. Neural Biol.**, 58:16–25. 1992.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem.**, 68:285-316. 1997.

IZQUIERDO, I. *et al.* Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. **Eur. J. Neurosci.**, 9:786–793. 1997.

IZQUIERDO, I. *et al.* Separate mechanisms for short-and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, 103:1-11. 1999.

IZQUIERDO I. Memória. Porto Alegre, **Ed. Artmed**. 2002.

IZQUIERDO, I. *et al.* Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, 29:496-505. 2006.

IZQUIERDO, I. *et al.* The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **An Acad Bras Cienc.**, 80:115-27. 2008.

JERUSALINSKY, D. *et al.* Amnesia by posttraining infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav. Neural Biol.*, 58:76–80. 1992.

JING, X.H. *et al.* Effect of acupuncture on long-term potentiation of hippocampal CA 1 area in diabetic rats with concurrent cerebral ischemia. **Zhen Ci Yan Jiu**,33:397-401. 2008.

JU, Y.L.; CHI, X.; LIU, J.X. Forty cases of insomnia treated by suspended moxibustion at *Baihui* (GV 20). **Journal of Traditional Chinese Medicine**, 29:95-96. 2009.

KAPTCHUK, T.J. Acupuncture: Theory, efficacy, and practice. **Ann Intern Med.**, 136:374–383. 2002.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, 386:493–495. 1997.

KLANN, E.; SWEATT, J.D. Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. **Neurobiol Learn Mem.**, 89:247-59. 2008.

KOCZYK, D.; ODERFELD-NOWAK, B. Long-term microglial and astroglial activation in the hippocampus of trimethyltin-intoxicated rat: stimulation of NGF and TrkA immunoreactivities in astroglia but not in microglia. **Int J Dev Neurosci.**, 18:591–606. 2000.

KONDO, M.; TAKEI, Y.; HIROKAWA, N. Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. **Neuron**, 73:743–757. 2012.

KUMAR, A.M.; WEN, X.L. Acupuncture treatment for osteoarthritic pain and inflammation of the knee. **Altern Ther Health Med.**, 8:128-128. 2002.

LECHNER, H.A.; SQUIRE, L.R.; BYRNE, J.H. 100 years of consolidation - remembering Müller and Pilzecker. **Learning & Memory**, 6:77-87. 1999.

LECONTE, C. *et al.* Comparison of the effects of erythropoietin and its carbamylated derivative on behavior and hippocampal neurogenesis in mice. **Neuropharmacology**, 60:354–64. 2011.

LI, Q. *et al.* Involvement of taurine in penicillin-induced epilepsy and anti-convulsion of acupuncture: a preliminary report. **Acupunct Electrother Res.**, 30:1-14. 2005.

LI, Z.R. Experimental acupuncture science. **Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine**, v. 327, p. 146. 2003.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, 92:180-185. 1987.

LIU, C.; ZHU, P. Laser Function Medicine and Its Applications. 202 pg. 刘承宜, & 朱平. 激光功能医学及其应用. 2011. Disponível em <http://beta.asoundstrategy.com/sitemaster/userUploads/site502/LaserFunctionMedicineanditsApplications.pdf>

LIU, H. *et al.* Using MicroPET Imaging in Quantitative Verification of the Acupuncture Effect in Ischemia Stroke Treatment. **Scientific reports**, v. 3. 2013.

LIU, Q.; YU, J. Beneficial Effect of Acupuncture on Depression. In *Acupuncture Therapy for Neurological Diseases*. **Springer Berlin Heidelberg**, pp. 437-459. 2010.

LIU, R. *et al.* Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. **PNAS**, 100:8526-8531. 2003.

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90:2074-2077. 1993.

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**, 264:1145-1148. 1994.

LU, G.W.; LIANG, R.Z.; XIE, J.Q. Analysis of peripheral afferent fibers on effect of acupuncture analgesia at Zusanli point. **Science in China**, 22:495-503 (in Chinese with English abstract). 1979.

LU, G.W. Characteristics of afferent fibre innervation on acupuncture point Zusanli. **Am J Physiol**, 245: R606-R612. 1983.

LU, G.W.; LIANG, R.Z.; WANG, Y.N. Analysis of peripheral afferent fibers on sensation of acupuncture at acupuncture points. **Research for acupuncture and analgesia**, Science Press:340-347. 1986.

MACPHERSON, H. *et al.* Acupuncture Research. Philadelphia, **Editora Churchill Livingstone**. 2007.

MANNI, L. *et al.* Neurotrophins and acupuncture. **Autonomic Neuroscience**, 157:9-17. 2010.

MARKAKIS, E.A.; GAGE, F.H. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. **J Comp Neurol.**, 406:449-460. 1999.

MELLO-CARPES, P.B.; IZQUIERDO, I. The Nucleus of the Solitary Tract → Nucleus Paragigantocellularis → Locus Coeruleus → CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of learning and memory**, 100:56-63. 2012.

MENEZES, C.R.O.; MOREIRA, A.C.P.; DE BULHÕES BRANDÃO, W. Base neurofisiológica para compreensão da dor crônica através da Acupuntura. **Rev. Dor**, 11:161-8. 2010.

MCCANN, M.J. *et al.* Differential activation of microglia and astrocytes following trimethyltin-induced neurodegeneration. **Neuroscience**, 72:273–281. 1996.

MCGAUGH, J.L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, 153:1351-1358. 1966.

MCGAUGH, J.L.; HERZ, M.J. Memory Consolidation. San Francisco, **Albion Publishing Company**. 1972.

MCGAUGH, J.L. Memory - a Century of Consolidation. **Science**, 287: 248-251. 2000.

MEDINA, J.H. *et al.* Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behavioural brain research**, 192:61-69. 2008.

MIAO, T. *et al.* Effect of auricular acupuncture on the memory and the expression of ChAT and GFAP in model rats with Alzheimer's disease. **Zhongguo Zhen Jiu**, 29:827–832. 2009.

MING, G.L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annu Rev Neurosci.**, 28: 223–250. 2005.

MIZUNO, M. *et al.* Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. **The Journal of Neuroscience**, 20:7116-7121. 2000.

MOON, P.D. *et al.* Use of electroacupuncture at ST36 to inhibit anaphylactic and inflammatory reaction in mice. **Neuroimmunomodulation**, 14:24–31. 2007.

MORRIS, R.G. NMDA receptors and memory encoding. **Neuropharmacology**. 2013.

MURAI, T. *et al.* Characteristics of object location memory in mice: behavioral and pharmacological studies. **Physiology & Behavior**, 90:116–24. 2007.

NADEL, L.; HARDT, O. Update on Memory Systems and Processes. **Neuropsychopharmacology Reviews**, 36:251–273. 2011.

- NAKAZO, W. Morphological studies on acupoints and non-acupoints. Assembled abstracts of original articles of the 1st world meeting of the **world association of the acupuncture society**, p 110. 1987.
- NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A.J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nature Rev. Neurosci.**, 3:748-755. 2002.
- NELSON, T.J. *et al.* Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. **European Journal of Pharmacology**, 585:76-87. 2008.
- NISHIMURA, T. *et al.* Changes in the GABA-ergic system induced by trimethyltin application in the rat. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, 97:1-6. 2001.
- ODERFELD-NOWAK, B.; ZAREMBA, M. GM1 ganglioside potentiates trimethyltin-induced expression of interleukin-1 beta and the nerve growth factor in reactive astrocytes in the rat hippocampus: an immunocytochemical study. **Neurochem Res.**, 23:443-453. 1998.
- OGITA, K. *et al.* Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. **Journal of Neuroscience Research**, 82:609-621. 2005.
- OLTON, D.S.; SAMUELSON, D.S. Remembrance of places past: spatial memory in rats. **J. Exp. Psychol., Anim. Behav. Process** 2: 97-116. 1976.
- OLTON, D.S.; BECKER, J.T.; HANDELMAN, G.E. Hippocampus, space and memory. **Behav Brain Sci.**, 2:313-322. 1979.
- ORZELSKA, J. *et al.* Effects of NOS inhibitors on the benzodiazepines-induced memory impairment of mice in the modified elevated plus-maze task. **Behavioural brain research**, 244:100-106. 2013.
- PARDO, G.E. *et al.* Aprendizaje, Memoria y Neuroplasticidad. **I Congreso Mundial de Neuroeducación ASEDH – CEREBRUM** Lima, Perú. 2010.

PARENT, J.M. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. **Neuroscientist**, 9:261–72. 2003.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, 14:149-167. 1985.

PIACENTINI, R. *et al.* Dysregulation of intracellular calcium homeostasis is responsible for neuronal death in an experimental model of selective hippocampal degeneration induced by trimethyltin. **J Neurochem.**, 105:2109–2121. 2008.

PIOVESAN, F. *et al.* Acetyl-l-carnitine restores choline acetyltransferase activity in the hippocampus of rats with partial unilateral fimbria-fornix transection. **Int. J. Dev. Neurosci.**, 13:13–19. 1995.

POLSTER, M.R.; NADEL, L.; SCHACTER, D.L. Cognitive neuroscience analyses of memory. **J. Neurosci.**, 3:95-116. 1991.

QIN, W. *et al.* The temporal-spatial encoding of acupuncture effects in the brain. **Mol Pain**, 11:19. 2011.

QIU, P.R.; CHEN, H.P. New edited Chinese acupuncture and moxibustion. The Press of **Shanghai Science and Technique**, Shanghai. pp1019 - 1024. 1992.

QUEVEDO, J. *et al.* Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: Protection from amnesia by pretraining but not pre- exposure to the task apparatus. **Learn Mem.**, 6:600–607. 1999.

QUEVEDO, J. *et al.* Consolidação da memória e estresse pós-traumático Memory consolidation and posttraumatic stress disorder. **Rev bras psiquiatria**, 25:25-30. 2003.

ROESLER, R. *et al.* Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: Protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. **Neurobiol. Learn. Mem.**, 69: 87–91. 1998.

SATOH, H. Acute effects of acupuncture treatment with *Baihui* (GV20) on human arterial stiffness and wave reflection. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, 2:130-134. 2009.

SCHWABE, L. *et al.* Stress effects on memory: an update and integration. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 36:1740-1749. 2012.

SHANG, C. The past, present, and future of meridian system research. In: **Clinical Acupuncture**. Springer Berlin Heidelberg, p. 69-82. 2001.

SHAPIRO, M.L.; CARAMANOS, Z. NMDA antagonist MK-801 impairs acquisition but not performance of spatial working and reference memory. **Psychobiology**, 18:231-243. 1990.

SHEMA, R. *et al.* Enhancement of Consolidated Long-Term Memory by Overexpression of Protein Kinase Mz in the Neocortex. **Science**, 331:1207-1210. 2011.

SHEN, E.Y. *et al.* Locating the acupoint *Baihui* (GV20) beneath the cerebral cortex with MRI reconstructed 3D neuroimages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011. 2011

SHER, L. The role of the endogenous opioid system in the effects of acupuncture on mood, behavior, learning, and memory. **Medical Hypotheses**, 50:475-478. 1998.

SHIMIZU, E. *et al.* NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. **Science**, 290:1170-1174. 2000.

SHORS, T. *et al.* Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. **Nature**, 410:372-376. 2001.

SODERLING, T.R.; DERKACH, V.A. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. **Trends Neurosci.**, 23:75-80. 2000.

STUX, G.; HAMMERSCHALG, R. *Acupuntura Clínica - Bases Científicas*. São Paulo: **Manole**. 2005.

THIERRY, B. *et al.* The tail suspension test: ethical considerations. **Psychopharmacology**, 90:284–285. 1986.

TJØLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51:5-17. 1992.

TROLLOR, J.N. *et al.* The association between systemic inflammation and cognitive performance in the elderly: the Sydney Memory and Ageing Study. **American Aging Association**, 34:1295-1308. 2011.

TSUTSUMI, S. *et al.* Circulating corticosterone alters the rate of neuropathological and behavioral changes induced by trimethyltin in rats. **Exp Neurol.**, 173:86–94. 2002.

UCHIDA, Y. *et al.* Electroacupuncture induces the expression of Fos in rat dorsal horn via capsaicin-insensitive afferents. **Brain Res.**, 978:136–140. 2003.

WALF, A.A.; FRYE, C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature protocols**, 2:322-328. 2007.

WALSH, T.J.; MILLER, D.B.; DYER, R.S. Trimethyltin, a selective limbic system neurotoxicant, impairs radial-arm maze performance. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.**, 4:177–183. 1982.

WANG, J.Q.; MAO, L.; HAN, J.S. Comparison of the antinociceptive effects induced by electroacupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation in the rat. **Int J Neurosci**, 65:117–129. 1992.

WANG, K.; YAO, S.; XIAN, Y. A study in the receptive field of acupoints and the relationship between characteristics of needle sensation and groups of afferent bifres. **Sci Sin**, 28: 863- 971. 1985.

WARD, M.T.; STOELZEL, C.R.; MARKUS, E.J. Hippocampal dysfunction during aging II: Deficits on the radial-arm maze☆. **Neurobiology of aging**, 20:373-380. 1999.

WATANABE, T. *et al.* Facilitation of memory impairment and cholinergic disturbance in a mouse model of Alzheimer's disease by mild ischemic burden. **Neuroscience letters**, 536, 74-79. 2013.

- WEINGARTNER, H.; PARKER, E.S. Memory Consolidation: Psychobiology of cognition. **Routledge**. 1984.
- WEN, G. *et al.* Effect of acupuncture on neurotransmitters/modulators. In *Acupuncture Therapy for Neurological Diseases*. **Springer Berlin Heidelberg**, pp. 120-142. 2010.
- WEN-DONG, Z. *et al.* Clinical study on treatment of post-apoplectic limb spasm by puncturing acupoints of Governor Vessel. **Journal of Acupuncture and Tuina Science**, 3:26-29. 2005.
- WILSON, W.E. *et al.* Trimethyltin-induced alterations in brain amino acids, amines and amine metabolites: relationship to hyperammonemia. **Neurotoxicology**, 7:63-74. 1986.
- WINGATE, D.S. The Use of acupuncture in the Treatment of Acquired Brain Injury. Disponível em <http://parkwayacupuncture.com/wp-content/uploads/2011/11/Brain-Injury-Acupuncture-Article1.pdf>. 2012.
- WOODRUFF, M.L.; BAISDEN, R.H. Trimethyltin neurotoxicity in the rat as an analogous model of Alzheimer's disease. **Toxin-Induced Models of Neurological Disorders**, pp 319-335. 1994.
- WHO - World Health Organisation Staff. Acupuncture: Review and analysis of reports on controlled clinical trials. **World Health Organization**. 2002.
- XIA, Y.; WU, G. Acupuncture therapy for neurological diseases: a neurobiological view. **Springer Verlag**. 2010.
- XIAOMIN, T.; ZHENYU, Q.; ZONGBAO, H. Effects of Electroacupuncture Bai Hui, Feng Fu on CPG15 Expression of Hippocampus in Rats with Cerebral Ischemic Reperfusion. **Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease**. 2011.
- XU, N. *et al.* Effects of electroacupuncture at du meridian on contents of nitric oxide and endothelin in rats with acute cerebral ischemia. **Zhen Ci Yan Jiu**, 21:18-21 (in Chinese). 1996.

XU, Z. *et al.* Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. **Eur Neuropsychopharmacol**, 19:868–75. 2009.

YANG, Z.X. *et al.* Research advances in treatment of cerebral ischemic injury by acupuncture of conception and governor vessels to promote nerve regeneration. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, 10:19-24. 2012.

YIN, C.S. *et al.* A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research in veterinary science**, 84:159-165. 2008.

YU, J. *et al.* Acupuncture improved cognitive impairment caused by multi-infarct dementia in rats. **Physiology & Behavior**, 86:434-41. 2005.

ZHANG, E.Q. Chinese acupuncture and moxibustion in a practical English-Chinese library of traditional Chinese medicine. Publishing house of **Shanghai university of traditional Chinese medicine**, Shanghai. Introduction and Chapter 1. pp 2-56. 1990.

ZHANG, X.; JIN, G. Neurogenesis in Adult Hippocampus, Neural Stem Cells and Therapy, Dr. Tao Sun (Ed.), ISBN: 978-953-307-958-5, InTech, DOI: 10.5772/29983. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/neural-stem-cells-and-therapy/neurogenesis-in-adult-hippocampus>. 2012.

ZHANG, X.M.; ZHU, J. Kainic acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. **Current neuropharmacology**, 9:388-388. 2011.

ZHANG, Z.J.; WANG, X.M.; MCALONAN, G.M. Neural acupuncture unit: a new concept for interpreting effects and mechanisms of acupuncture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. 2012.

ZHAO, J.S.; LI, Z.G. Chinese Acupuncture and Moxibustion. Publishing House of **Shanghai University of Traditional Chinese Medicine**, Shanghai, China. 2002.

ZHAO, N.X. *et al.* Influence of moxibustion of *baihui* (GV 20) on hemodynamics of common carotid artery in healthy subjects. **Zhen ci yan jiu - Acupuncture research**, 32:252-254. 2007.

ZHOU, F.; HUANG, D. "Neuroanatomic basis of acupuncture points." *Acupuncture Therapy for Neurological Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, pp 32-80. 2010.

ZHU, B. *Scientific Foundations of Acupuncture and Moxibustion*. Qingdao Press. **Qingdao**. (in Chinese with English abstract). 1998.

ZIJLSTRA, F.J. *et al.* Antiinflammatory actions of acupuncture. **Mediators Inflamm.**, 12:59-69. 2003.