

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**BIOQUÍMICA**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DA**  
**FARMACOPUNTURA EM RATOS OBESOS**

**MARIANA CHISTE PONTES**

**Porto Alegre**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**BIOQUÍMICA**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DA**  
**FARMACOPUNTURA EM RATOS OBESOS**

**MARIANA CHISTE PONTES**

**Orientadora: Profa. Dra. Janice Carneiro Coelho**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

**Porto Alegre**

**2015**

## CIP - Catalogação na Publicação

Chiste Pontes, Mariana  
EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DA  
FARMACOPUNTURA EM RATOS OBESOS / Mariana Chiste  
Pontes. -- 2015.  
72 f.

Orientador: Janice Carneiro Coelho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Avaliação Bioquímica. 2. Comportamento  
Alimentar. 3. Farmacopuntura. I. Carneiro Coelho,  
Janice, orient. II. Título.

Vós sois o sal da terra; e se o sal for insípido, com que se há de salgar? Para nada mais presta senão para se lançar fora, e ser pisado pelos homens. Mateus 5:13

No princípio era o Verbo, e o Verbo estava com Deus, e o Verbo era Deus. João 1:1

E, quanto fizerdes por palavras ou por obras, fazei tudo em nome do Senhor Jesus, dando por ele graças a Deus Pai. Colossenses 3:17

E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor, e não aos homens, Colossenses 3:23

Dedico a todos que me querem bem!

E a todos os demais também <3

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora que me ajudou a trilhar o caminho do doutorado e me auxiliou nos entraves que ocorreram ao longo desta estrada.

Aos colegas e amigos que me auxiliaram na execução do trabalho: Fernando, Cristina, Alexandre e Lilian. Também aos demais colegas do Lab 25.

À secretaria da pós-graduação, especialmente à Cléia e a toda equipe pela atenção e auxílio.

À Capes e Cnpq pelo apoio financeiro e bolsa de estudos.

À Deus pela força e por tudo e todo existir.

Ao meu marido Luis Felipe Bastos Pacheco e companheiro que me auxiliou direta e indiretamente ao longo destes anos.

Às minhas jóias preciosas: Pedro Chiste Bastos e Ana Luíza Chiste Bastos.

À minha família que me incentivou: especialmente à minha mãe Yara Chiste, meu avô Paulo Chiste, minha avó Cacilda Chiste (*in memorian*), meu irmão Daniel Chiste, meu pai Antônio Pontes e minha sogra Kátia Bastos (*in memorian*).

A todos: MUITO OBRIGADA!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUÇÃO.....	11
- Obesidade .....	11
- Modelo de Obesidade .....	14
- Acupuntura .....	15
- Farmacopuntura.....	18
- Técnicas de Acupuntura e Obesidade.....	18
- Farmacopuntura e Obesidade .....	22
- Avaliação bioquímica.....	23
- Avaliação comportamental.....	23
OBJETIVOS.....	25
Objetivo Geral.....	25
Objetivos específicos .....	25
CAPÍTULO 1 .....	26
CAPÍTULO 2 .....	36
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES.....	66
PERSPECTIVAS .....	67
REFERÊNCIAS .....	68

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH = hormônio adrenocorticotrófico

ARN = ácido ribonucleico

ARN = núcleo arqueado

CART = *amphetamine-regulated transcript*

CV = Conception Vessel Meridian

DIO = obesidade induzida pela dieta

EA = eletroacupuntura

HDP = Dieta Hiperpalatável

HIF = dietas com elevados níveis de gordura

Imc = índice de massa corporal

Kg = kilogramas

LDL = low-density lipoprotein

LI = Intestino Grosso

mRNA = ácido ribonucleico mensageiro

MTC = Medicina Tradicional Chinesa

NPY = Neuropeptídeo Y

OMS = Organização Mundial da Saúde

P = pulmão

PVN = núcleo paraventricular

R = Rim

SNC = Sistema Nervoso Central

SP = baço

st = estômago

## RESUMO

A obesidade e todas as alterações metabólicas relativas ao excesso de peso são tratadas como o mal do século. Desta forma, justifica-se os esforços para traçar estratégias de tratamento. A acupuntura é relatada como técnica milenar de terapia chinesa e é descrita como um método de tratamento da obesidade. Esta técnica da medicina tradicional chinesa vem sendo difundida no ocidente e sendo mais estudada a partir de métodos científicos. A farmacopuntura com o uso de veneno de abelhas, um dos tipos de acupuntura, se destaca pela ação mais prolongada em relação à acupuntura tradicional. Assim, o objetivo do presente estudo foi de analisar os efeitos bioquímicos e comportamentais do uso de técnicas de farmacopuntura em ratos Wistar obesos. Para tanto, foram utilizados 160 animais: 80 foram submetidos a uma dieta hipercalórica, sendo que os animais atingiram peso superior significativo em relação ao grupo controle, e 80 animais, receberam dieta padrão. Cada grupo foi separado em subgrupos contendo 10 animais cada. Os tratamentos consistiram na estimulação de acupontos descritos na medicina tradicional chinesa para o tratamento da obesidade. Os 4 pontos avaliados foram: Fenglong (st40), Liangmen (st21), Zusanli (st36), Tianshu (st25). O grupo controle consistiu na aplicação de acupuntura em local que não corresponde a um acuponto. Os parâmetros bioquímicos analisados foram: triglicerídeos, glicose e colesterol plasmáticos. As análises comportamentais utilizadas foram o teste de labirinto em cruz elevado e teste de comportamento alimentar. A partir do presente estudo foi possível constatar que os pontos, Liangmen (st21), Zusanli (st36), Tianshu (st25) apresentaram resultados satisfatórios ao serem utilizados para a perda de peso corporal, sendo que Liangmen (st21), Zusanli (st36), Tianshu (st25) exibiram resultados promissores na redução de colesterol, glicose e triglicerídeos plasmático. O ponto Liangmen (st21) foi considerado ansiolítico e os pontos Zusanli (st36), Tianshu (st25) foram considerados como redutores do comportamento apetitivo. A partir do presente estudo foi possível depreender que através do método de farmacopuntura com veneno de abelha nos pontos st36, st25 e st21 em ratos obesos foi observada redução de peso corporal e dos parâmetros bioquímicos avaliados e indicou ação ansiolítica.

**Palavras-chaves:** Avaliação Bioquímica. Comportamento Alimentar. Farmacopuntura.

## ABSTRACT

Obesity and all the metabolic changes related to excess weight are treated as the disease of the century. Thus, it is justified efforts to trace treatment strategies. Acupuncture is reported as a ancient technique of Chinese therapy and is described as an obesity treatment method. This technique of traditional Chinese medicine has been widespread in the West and being more studied from scientific methods. The farmacopuncture using bee venom, a type of acupuncture, that stands out for longer action in relation to traditional acupuncture. The objective of this study was to analyze the biochemical and behavioral effects of using farmacopuncture techniques in obese Wistar rats. For this purpose, 160 animals were used, of which 80 were subjected to a high calorie diet, and the animals achieved significantly greater weight than the control group, and 80 animals that received standard diet. Each treatment was separated into subgroups of 10 animals each. Treatments consisted in stimulating acupoints described in Chinese traditional medicine for the treatment of obesity. For this, 4 points will be evaluated: Fenglong (st40), Liangmen (st21), Zusanli (st36), Tianshu (st25). The control group consisted of the application of acupuncture in a place that does not match an acupoint. The biochemical parameters were analyzed: triglycerides, glucose and cholesterol plasmatic. Behavioral analysis used were plus maze test and testfeeding behavior. From the present study it was found that the points, Liangmen (st21), Zusanli (st36), Tianshu (st25) showed satisfactory results when used for weight loss, and Liangmen (st21) Zusanli (st36), Tianshu (st25) showed promising results in reducing cholesterol, glucose and plasma triglycerides and the Liangmen point (st21) was considered anxiolytic and that the Zusanlipoint (st36), Tianshu (st25) were deemed to reduce the appetitive behavior. In the present study it was possible to conclude that the farmacopuncture with bee venom in points st36, st25 and st21 in obese rats reduced the body weight and the biochemical parameters and presented anxiolytic action.

**Keywords:** Biochemical evaluation. Feeding behavior. Farmacopuncture.

## INTRODUÇÃO

### - Obesidade

Denomina-se obesidade uma enfermidade caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, associada a problemas de saúde (DESPRÉS, 2012). Atualmente cresce entre os especialistas o interesse pelo estudo da obesidade com objetivo de melhor entender os fatores e processos dessa alteração metabólica, propondo soluções a esse problema que atinge grande parcela da população mundial, sem restrições de classe social, sexo ou idade (SHEN et al, 2014).

Apesar de não ser um fenômeno recente, posto que se conhece a existência de indivíduos obesos desde a época paleolítica, a obesidade tem despertado maior atenção pelo fato de que, uma série de fatores sociais e culturais na sociedade industrializada têm contribuído para aumentar sua incidência (PREISS et al, 2013).

Ainda que a causa da obesidade seja predominantemente metabólica, pressupõe-se haver um padrão interligado de fatores psicológicos, fisiológicos, endócrinos, de aprendizagem condicionada e de caráter interpessoal, relacionados à ocorrência da mesma. Estudiosos acreditam que ela pode ser desencadeada por fatores tais como sedentarismo; alto consumo de alimentos industrializados, carboidratos, gorduras saturadas e açúcares, irregularidade nas refeições, dentre outros fatores (WANG et al, 2011). A obesidade é o resultado de diversas dessas interações, nas quais chamam a atenção os aspectos genéticos, ambientais e comportamentais. Assim, filhos com ambos os pais obesos apresentam alto risco de obesidade (FEAKINS, 2015).

Independente da importância dessas diversas causas, o ganho de peso está sempre associado a um aumento da ingestão alimentar e a uma redução do gasto energético correspondente a essa ingestão. O aumento da ingestão pode ser decorrente da

quantidade de alimentos ingeridos ou de modificações de sua qualidade, resultando numa ingesta calórica total aumentada. O gasto energético, por sua vez, pode estar associado a características genéticas ou ser dependente de uma série de fatores clínicos e endócrinos, incluindo doenças nas quais a obesidade é decorrente de distúrbios hormonais (GRECH & ALLMAN-FARINELLI, 2015).

Determina-se o peso corporal ideal considerando algumas variáveis, tais como: idade, sexo, estado reprodutivo, características do sistema esquelético e percentual de gordura corporal. Sob a perspectiva da manutenção da saúde, é importante que o peso seja controlado. O peso corporal é um parâmetro fundamental na avaliação, já que indica o estado geral de saúde e é utilizado como referência na análise clínica (DESPRÉS, 2012).

A ingestão de alimentos, a motilidade gastrointestinal, a absorção dos alimentos, o metabolismo energético, são fatores endógenos que controlam o peso corporal. Fatores exógenos tais como a palatabilidade, o cheiro dos alimentos e a interferência social influenciam o consumo de alimento (PREISS et al, 2013).

A forma mais amplamente recomendada para avaliação do peso corporal em adultos é o índice de massa corporal (IMC), recomendado inclusive pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004). Esse índice é calculado dividindo-se o peso do paciente em kilogramas (Kg) pela sua altura em metros elevada ao quadrado.

Um dos mais importantes fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis como hipertensão arterial, diabetes, câncer, doenças dos rins e do coração é a obesidade. Mais de 32% da população adulta brasileira possui algum grau de excesso de peso em todas as faixas etárias e níveis sociais (OMS, 2004; GRECH, ALLMAN-FARINELLI, 2015).

A obesidade atinge a saúde do indivíduo através de múltiplos órgãos, resultando em doenças específicas. Existem associações diretas do desenvolvimento da obesidade e da perda de equilíbrio da distribuição dos nutrientes, em especial, uma correlação com diabetes do tipo 2. Existem também correlações inesperadas entre a obesidade e o risco de câncer pulmonar (LUMENG & SALTIEL, 2011)

Embora as classes de maior renda sejam as mais atingidas pela obesidade, a doença vem aumentando também nas populações de renda menor. Alguns fatores como a globalização e urbanização social têm sido considerados responsáveis pelo agravamento da incidência da obesidade (JONES et al, 2015).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para avaliar a patogênese da doença, o que revelou uma estreita relação entre excesso de nutrientes e desarranjos nos mediadores celulares e moleculares da imunidade e inflamação, o que resultou no conceito de metainflamação. A resposta inflamatória desencadeada pela obesidade envolve muitos componentes da resposta inflamatória a patógenos clássicos e inclui: aumento na circulação sistêmica de citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda, o recrutamento de leucócitos para tecidos inflamados, ativação de leucócitos teciduais e geração de respostas reparadoras (LUMENG & SALTIEL, 2011).

O tratamento da obesidade envolve necessariamente a reeducação alimentar, o aumento da atividade física e, eventualmente, o uso de algumas medicações auxiliares. Dependendo da situação de cada paciente, pode estar indicado o tratamento comportamental envolvendo o psiquiatra. Nos casos de obesidade secundária a outras doenças, o tratamento deve inicialmente ser dirigido para a causa do distúrbio (DE ANGELIS, 2003).

A utilização de medicamentos como auxiliares no tratamento do paciente obeso deve ser realizada com cuidado, não sendo em geral o aspecto mais importante das

medidas empregadas. Cada medicamento específico, de acordo com sua composição farmacológica, apresenta efeitos colaterais, alguns deles bastante graves como arritmias cardíacas, surtos psicóticos e dependência química. Por essa razão, devem ser utilizados apenas em situações especiais, de acordo com o julgamento criterioso do médico assistente (LUNDBERG, 2005).

As consequências psicológicas também são severas, prejudicando a qualidade de vida e a aparência e, em alguns casos, podendo levar à depressão (LACEY et al, 2003). O tratamento para a restrição calórica é realizado em vários estágios. Inicialmente, é necessária a identificação do paciente obeso. A seguir, é feita a avaliação clínica dos fatores envolvidos (FEAKINS, 2015).

#### **- Modelo de Obesidade**

A obesidade é essencialmente o resultado do balanço energético positivo promovido por fatores ambientais, como por exemplo, o consumo em excesso de alimentos altamente calóricos e o sedentarismo (COX & CHURCH, 2011).

A implantação de um modelo de indução de obesidade através do uso de dietas hipercalóricas ou dietas hiperlipídicas tem sido muito utilizada em animais de laboratório para o estudo desta enfermidade (ROSINI et al, 2012). Cabe enfatizar a importância deste modelo em particular em pesquisas devido a sua grande semelhança com a gênese e com as respostas metabólicas decorrentes da obesidade em humanos (TSCHOP & HEIMAN, 2001).

A ingestão de dietas hipercalóricas e hiperpalatáveis está associada de forma direta com o desenvolvimento da obesidade e de suas comorbidades e foram estudadas anteriormente em roedores, como os da linhagem Wistar (BURNEIKO et al, 2006; DE MORAES et al, 2008).

Os ratos Wistar que foram submetidos a uma dieta hipercalórica e hiperlipídica durante três meses aumentaram aproximadamente 1,4 vezes a massa corporal quando comparados com animais-controle (GUERRA et al, 2007; DE MORAES et al, 2007).

Verificou-se também que o uso de modelos animais de obesidade que fazem uso da ingestão aumentada de calorias, tem associado também a elevação de triglicerídeos, glicose e colesterol, conforme descrito também em humanos com obesidade induzida por ingestão exacerbada de calorias (BURNEIKO et al, 2006; DE MORAES et al, 2008).

Em animais experimentais, a dieta do tipo *fastfood* promove elevação da gordura visceral, avaliada através da gordura retroperineal e epididimal, além de tendências a alterações no perfil lipídico e resistência à insulina. A manutenção da obesidade pode provocar elevação da pressão arterial (CESARETTI et al, 2006; DUARTE et al, 2006).

#### **- Acupuntura**

A acupuntura (AP) é a inserção de agulhas em localizações cutâneas específicas do corpo, conhecidos como pontos de acupuntura, para o tratamento ou prevenção de várias doenças. Embora esta técnica seja amplamente utilizada para o tratamento da dor e outras enfermidades, a base fisiológica deste tratamento ainda é desconhecida (LUNA et al, 2008).

A acupuntura tem sido usada desde o tempo em que as ferramentas primitivas foram produzidas e utilizadas. Algumas descobertas arqueológicas indicaram que pedras com pontas foram utilizadas como instrumentos terapêuticos e estas pedras em formato de agulhas correspondem aos primeiros instrumentos médicos em acupuntura (LITSCHER, 2010).

Dentro do século passado, o progresso científico e tecnológico revolucionou a medicina clínica experimental. O século XX foi certamente um período de inovação, sendo que, diversas práticas milenares, como é o caso da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), foram subjugadas. Apenas no fim deste século a acupuntura passou a ser vista com maior credibilidade, após novos estudos. Na década de noventa, algumas pesquisas começaram a desvendar os mecanismos bioquímicos e fisiológicos associados ao uso da acupuntura. Foi verificada a elevação da perfusão cerebral após o uso da acupuntura em pacientes saudáveis (LITSCHER, 2010).

Em 2008, a OMS relatou que não haviam provas para a eficácia da acupuntura, de algumas ervas medicinais e de alguns tipos de terapias manuais para determinadas patologias. Contudo, diversas pesquisas descrevem comprovada ação da acupuntura no alívio da dor pós-operatória, náuseas, vômitos em gestantes e pacientes submetidos a quimioterapia e dor dental, além de serem evidenciados poucos efeitos colaterais. Do mesmo modo, a acupuntura vem sendo utilizada para aliviar a ansiedade, transtornos do pânico e insônia (LITSCHER, 2010).

A característica principal da Medicina Chinesa é a avaliação do indivíduo como um todo. A partir deste conceito, o diagnóstico é realizado pela análise dos tecidos superficiais e sensoriais, que refletem o distúrbio de outros locais do organismo (WEN, 1985). Os procedimentos utilizados para o exame clínico (diagnose) são: inspeção; levantamento de queixas e sensação de odores apresentados pelo paciente, questionamento de dados, exame físico e do pulso (WEN, 1985).

Para a classificação das síndromes, utilizam-se oito critérios. Desta forma, o profissional categoriza a sintomatologia apresentada pelos pacientes em: externo (superficial) e interno (profundo); frio e calor; deficiência e excesso; yin (negativo) e yang (positivo) (WEN, 1985). A Medicina Chinesa incide o tratamento em todos os

níveis do paciente: mental e material. Assim, enfatiza-se a abordagem desta terapia considerando o indivíduo como um todo (MANN, 1994).

Na MTC, a força da vida ou Qi circula através do corpo pela vias de energia, denominadas de meridianos longitudinais. Os pontos da acupuntura são locais específicos no corpo que são conectados com a energia dos meridianos (LACEY et al, 2003). Quando o indivíduo encontra-se doente, o Qi encontra-se em desequilíbrio. Os excessos ou carências de Qi podem ser normalizados através do estímulo dos pontos corretos (LACEY et al, 2003).

Utilizando esta teoria, a obesidade e o excesso de apetite têm sido conceituados em três vias: o “calor” no estômago e no intestino, a deficiência de Qi no baço e no estômago, ou a deficiência geral do organismo (deficiência primária) de Qi (LACEY et al, 2003).

Caracterizado por JIA & ZHICHENG (1999) o calor no estomago e intestino se apresenta com os sintomas de apetite excessivo, sede de líquidos frios, irritabilidade, aversão ao calor, constipação, urina escura, língua vermelha com saburra amarela no centro, pulso escorregadio. A deficiência do Qi do baço e estomago é caracterizada por manifestações como anorexia, distensão abdominal, compleição branca lustrosa, lassitude, palpitação, letargia, relutância ao falar, diarreia, urina normal ou clara, língua pálida com marcas de dentes e revestimento branco e pegajoso, pulso lento forçado e profundo. A deficiência primária de Qi está associada à compleição pálida ou normal, alimentação reduzida, edema nos membros, respiração curta, vertigem, sudorese espontânea, sede sem desejo de beber líquidos, menstruação irregular, esterilidade feminina, impotência sexual nos homens, língua pálida com pouco revestimento e pulso fraco.

### **- Farmacopuntura**

Atualmente, a farmacopuntura, ou seja, a injeção de doses subclínicas de drogas em pontos de acupuntura tem sido empregada com resultados positivos na clínica. Alguns pesquisadores alegam que esta técnica aumenta o período de estímulo mecânico e produz efeitos semelhantes aos de doses convencionais (LUNA et al, 2008).

A injeção em acuponto específico trata-se de um dos métodos utilizados no tratamento com acupuntura. Esta técnica é uma opção para acupuntura pois requer um curto período na aplicação e usa material comum, como agulha hipodérmica. A aquapuntura ou punção de água é a injeção de soro fisiológico ou água destilada em pontos de acupuntura. O objetivo é o de proporcionar um estímulo mecânico prolongado no ponto de acupuntura. Outras substâncias podem também ser utilizadas para este fim, como glicose e vitaminas. Do mesmo modo, se utiliza também o sangue autólogo aplicado (hemopuntura) e o veneno de abelha (apipuntura) (LEE et al, 2005).

O uso da farmacopuntura com o veneno de abelha foi sugerido especialmente por promover uma reação inflamatória local, que induz a um estímulo mais prolongado de um ponto específico. A contra-indicação seria a questão da resposta inflamatória exacerbada, impossibilitando a sua implantação na prática clínica. Contudo, há técnicas que podem ser empregadas para a remoção de alérgenos, através da filtração em gel e da eletroforese em gel (LIM et al, 2008).

### **- Técnicas de Acupuntura e Obesidade**

Durante muitos anos, a acupuntura tem sido usada para tratar a obesidade na China e foi estudado em ensaios clínicos em todo o mundo. Ela fornece uma terapia alternativa segura e eficaz, ganhando maior aceitação em pacientes com obesidade

sendo apontada como um tratamento de escolha. Há atualmente o reconhecimento da sua eficácia inclusive pelos órgãos internacionais de saúde (SUI et al, 2012).

AMARILES et al (2006) relatam que o uso da medicina alternativa e complementar para a perda de peso corporal vem aumentando em pacientes com sobrepeso e obesos.

A acupuntura tem sido relatada como método de tratamento para perda de peso em pacientes obesos controlando a ingestão de alimentos, a motilidade intestinal, reduzindo níveis de estresse e ansiedade. Desta forma, vem sendo aplicada para tratamento da obesidade e anorexia, bem como outros distúrbios alimentares (SHIRAIISHI et al, 2003; LACEY et al, 2003). Entretanto, seus mecanismos ainda permanecem pouco conhecidos (TIAN et al, 2005).

TIAN et al (2006) relatam que a eletroacupuntura tem sido descrita como uma ferramenta terapêutica em pacientes com sobrepeso na prática clínica, do mesmo modo que reduziu o peso de ratos e camundongos induzidos à obesidade através de uma dieta específica.

Alguns estudos indicam que a estimulação pela acupuntura pode resultar em um efeito até mesmo em indivíduos com peso corporal normal. (KIM et al, 2001). Desta forma, é importante investigar quais os efeitos em indivíduos com peso normal para tentar elucidar os mecanismos fisiológicos envolvidos com a estimulação pela acupuntura.

Já MAZZONI et al (1999) contestam a afirmativa de que a acupuntura promove redução do peso corporal, descrevendo que esta intervenção não é indicada para o tratamento da obesidade. Em estudo piloto, realizaram triagem clínica controlada por placebo de forma aleatória, avaliando 40 pacientes obesos. Concluíram que a

acupuntura promoveu redução dos parâmetros bioquímicos avaliados, sem, contudo promover redução do peso corporal.

De acordo com LACEY et al (2003), diversos acupontos são utilizados para o tratamento da obesidade, sendo estes: Neiguan (P 6), Fenglong (st40), Liangmen (st21), Guanyuan (R4), Zusanli (st36), Tianshu (st25), Qunchi (LI 11), em que, P refere-se aos pontos do pulmão, st do estômago, R do rim e LI do intestino grosso.

Uma variedade de métodos pode ser utilizada para estimular os acupontos: utilização de agulhas ou acupuntura tradicional, emprego de agulhas e estímulo elétrico (eletroacupuntura), uso de agulhas de pressão, aplicação de fármacos (farmacopuntura), utilização de moxas e aplicação de fogo (moxabustão) e emprego de ventosas (LACEY et al, 2003).

Avaliando-se sob o ângulo da medicina tradicional, acredita-se que o trabalho com acupuntura altera os níveis de neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC) através da estimulação de nervos periféricos nos acupontos (LACEY et al, 2003).

A liberação de endorfinas, monoaminas e cortisol no SNC podem ser uma das vias relacionadas ao mecanismo fisiológico de ação da acupuntura (LACEY et al, 2003).

O estudo desenvolvido por KIM et al (2001) avaliou a relação da acupuntura auricular com a síntese do neuropeptídeo Y (NPY), um fator que induz o apetite e que encontra-se em quantidades elevadas no hipotálamo. Em condição de privação alimentar, o aumento da expressão do NPY foi detectada no núcleo arqueado (ARN) e no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, avaliado através do método de imunohistoquímica utilizando-se ratos como modelo experimental. O uso da acupuntura em ratos submetidos a privação alimentar promoveu uma redução dos níveis de NPY

tanto no ARN quanto no PVN. Em ratos alimentados, os níveis de NPY encontraram-se elevados nestas duas regiões hipotalâmicas. De acordo com os resultados obtidos, os autores indicaram que a acupuntura pode afetar a expressão do NPY nas áreas ARN e PVN do hipotálamo.

TIAN et al (2005) encontraram que dietas com elevados níveis de gordura (HIF) desenvolvem obesidade induzida pela dieta (DIO), com redução concomitante dos níveis hipotalâmicos de transcripto peptídico regulado por anfetamina e cocaína *amphetamine-regulated transcript* (CART), que apresenta efeito anorexígeno. A eletroacupuntura (EA) eleva a expressão de CART no núcleo arqueado de ratos obesos. EA causou redução do peso corporal e de ingestão de alimentos em ratos DIO e aumentou a expressão de CART no ARN. O ACTH plasmático foi elevado devido a restrição alimentar. Os resultados sugerem que EA pode regular para cima a expressão de CART aproximando-se aos níveis normais, resultando na inibição da ingestão de alimentos e diminuição do peso corporal em ratos DIO.

KIM et al (2006) avaliaram os efeitos da eletroacupuntura no acuponto st36 na ingestão de alimentos, peso corporal e nos níveis de leptina sérica em ratos, bem como corticosterona, epinefrina e norepinefrina. A EA resultou em redução da ingestão de alimentos, diminuição do peso corporal, com elevação dos níveis de leptina. Do mesmo modo, verificou-se que o efeito da EA não foi decorrente ao estresse da restrição alimentar.

GAO et al (2011) desenvolveram estudo comparando o efeito da eletroacupuntura e do uso da incorporação da sutura utilizando o catgut na redução do peso corporal. Para tanto, os animais foram tratados com os seguintes acupontos: Housanli (st36), Tianshu (st25), e Pishu (BL 20), bilateralmente, ao longo de 15 dias. Após a intervenção, o peso corporal nos grupos eletroacupuntura e catgut foram

significativamente menores do que aqueles no grupo controle. Ambos tratamentos, eletroacupuntura e catgut, reduziram o colesterol total e o nível de lipoproteína de baixa densidade no soro em comparação ao controle, contudo, não ocorrendo diferença nos níveis de triglicédeos. A eletroacupuntura e a incorporação de catgut podem regular distúrbios do metabolismo dos lipídios em ratos obesos através do aumento da expressão de mRNA nos tecidos adiposos, sendo indicados como método de tratamento.

SHEN et al (2009) relataram que a acupuntura auricular tem sido utilizada para redução do peso corporal e diversas teorias vem sendo relatadas em relação ao mecanismo de ação, como a estimulação do centro da saciedade no hipotálamo e redução da produção de neuropeptídeo Y. Do mesmo modo, os efeitos simpaticomiméticos podem ser responsáveis pela redução no peso corporal no uso da eletroacupuntura, aumentando temporariamente a taxa metabólica basal e diminuindo o apetite. Entretanto, cabe destacar que após o término da terapia os efeitos podem ser suspensos.

#### **- Farmacopuntura e Obesidade**

O uso da farmacopuntura como uma ferramenta terapêutica para o tratamento da obesidade pode apresentar grande indicação, contudo, ainda é pouco explorado e comprovado na literatura (LUNA et al, 2008; KWON et al, 2011). Verifica-se que há dois estudos com o uso da farmacopuntura com o uso de veneno de abelha no tratamento de obesidade, mas que contudo, foram realizados em humanos, associados a outros acupontos em estudos clínicos (KWON et al, 2011; LIM et al, 2008). Desta forma, verifica-se que ainda havia uma lacuna que pode estar sendo preenchida com o presente estudo.

### **- Avaliação bioquímica**

A obesidade em animais apresenta limitação na definição através de avaliação matemática, tal como utilizada em humanos. Emprega-se, então, análise do desequilíbrio fisiológico e avaliação do acúmulo de gordura corporal. A partir deste excesso de peso, verifica-se também uma elevação nos parâmetros bioquímicos do sangue, especialmente os que envolvem o metabolismo energético (GRECH & ALLMAN-FARINELLI, 2015).

Cabe enfatizar a relação observada com frequência da obesidade com a incidência de diabetes mellitus. Esta correlação é verificada e a diabetes ocorre tanto pela deficiência de insulina, quanto pela redução do número de receptores para insulina. Assim, os níveis de glicose no sangue do paciente obeso, na maior parte dos casos, encontram-se elevados (JONES et al, 2015).

Do mesmo modo, o colesterol e os triglicéridos no soro aumentam quando há muitos lipídeos nos tecidos, ou seja, quando o indivíduo é obeso (SHEN et al, 2014).

A acupuntura vem sendo uma estratégia importante para a redução destes aumentos plasmáticos de colesterol, triglicéridos e glicose (WANG et al, 2008; PAI et al, 2009), não tendo sido ainda avaliada a ação da farmacopuntura que se utiliza de veneno de abelha nestes parâmetros bioquímicos.

### **- Avaliação comportamental**

O controle da ingestão de alimentos é um dos comportamentos motivacionais mais complexos, visto que, é amplamente variável quanto ao ponto de ajuste, não há definição exata quanto às variáveis que o modulam e existem amplos circuitos neurais envolvidos (LENT, 2004). Dentre os comportamentos motivacionais cabe destacar a ingestão de alimentos. Inicialmente são observados comportamentos apetitivos, que

sinalizam para o indivíduo que ele está com fome e que deverá procurar alimentos. Os comportamentos consumatórios são característicos de cada espécie animal e são definidos como etapas de apreensão e consumo dos alimentos (LENT, 2004).

O teste de cruz elevado tem sido amplamente empregado para avaliação da ansiedade em animais (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Sabendo-se que animais mais ansiosos podem elevar o consumo de alimentos, este teste pode ser empregado como um parametro para avaliação do comportamento alimentar em ratos. Do mesmo modo, o uso do teste de comportamento alimentar vem sendo utilizado para analisar o comportamento apetitivo dos ratos (NOSCHANG, 2009).

Contudo, não há trabalhos que avaliem a questão comportamental em ratos que receberam acupuntura, nem mesmo, no caso de ratos obesos que são tratados com acupuntura. Assim, este estudo encontra-se amplamente justificado uma vez que irá elucidar questões relativas ao comportamento apetitivo e a ansiedade após o tratamento com acupuntura.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos bioquímicos e comportamentais da farmacopuntura dos acupontos do meridiano do estômago descritos pela MTC e ainda não avaliados pela medicina ocidental em um modelo de ratos Wistar obesos.

### **Objetivos específicos**

- Submeter ratos Wistar a uma dieta hipercalórica e observar se ocorre aumento de peso de modo que os mesmos possam ser utilizados para um modelo de obesidade.
- Submeter o modelo animal de obesidade à farmacopuntura com veneno de abelha nos pontos st36, st21, st25, st40 e avaliar o peso corporal e ingestão de alimentos comparando com ratos não obesos.
- Comparar o peso do tecido adiposo retroperineal e abdominal após o emprego da farmacopuntura em ratos Wistar obesos e não obesos.
- Avaliar parâmetros bioquímicos relativos à ingestão de alimentos: triglicerídeos, glicose e colesterol plasmáticos após o emprego da farmacopuntura em ratos Wistar obesos e não obesos.
- Analisar parâmetros comportamentais após a intervenção com farmacopuntura através dos testes de labirinto em cruz elevado e o teste de comportamento alimentar em ratos Wistar obesos e não obesos.

## **CAPÍTULO 1**

Artigo: **Behavioral and Biochemical Effects of Pharmacopuncture (ST 36 and ST 25) in obese rats**

Mariana Chiste Pontes, Lilian Cardoso Heck and Janice Carneiro Coelho

*BMC Complementary and Alternative Medicine, 15:297-305, 2015*

## RESEARCH ARTICLE

## Open Access



# Behavioral and biochemical effects of pharmacopuncture (ST 36 and ST 25) in obese rats

Mariana Chiste Pontes, Lilian Cardoso Heck and Janice Carneiro Coelho\*

## Abstract

**Background:** Acupuncture has been reported as a weight loss treatment for obese patients. The use of pharmacopuncture focusing on behavioral analyses has not yet been studied with the objective of treating obesity. Thus, this study aimed to assess the biochemical and behavioral effects of using pharmacopuncture techniques in obese Wistar rats.

**Methods:** The treatments consisted in applying pharmacopuncture at the Zusanli (ST 36) and Tianshu (ST 25) points.

**Results:** When treated with pharmacopuncture, groups HDP36 and HDP25 experienced a reduction in body weight compared to the controls, who were also fed a hypercaloric diet. In the alimentary behavior test, latency to feed did not differ between the groups. However, groups HDP36 and HDP25 consumed a smaller number of cereals bits, which suggests that inappetence was an effect of the treatment. No difference was found among the groups in the elevated plus maze test, which indicates no anxiety action of the points studied. Regarding post mortem perirenal and abdominal fat among the groups fed a hypercaloric diet, groups HDP36 and HDP25 had lower perirenal fat weight and HDP36 had lower abdominal fat weight compared to the other groups. Likewise, a reduction in cholesterol 10.1186/s12906-015-0829-7 and glucose levels was found in groups HDP36 and HDP25 compared to the other groups that were fed a hypercaloric diet, while triglycerides decreased in subgroup HDP25.

**Conclusions:** In conclusion, the present study showed the efficacy of pharmacopuncture in weight loss of obese rats, as well as changes in biochemical and behavioral parameters.

**Keywords:** Obesity, Alimentary behavior, Pharmacopuncture

## Background

Obesity and overweight are directly linked to the development of a series of chronic disease conditions. The estimated cost for treatment of this chronic disease in the USA is currently over 7 % of all health-care expenses [10].

Obesity prevalence widely varies among different races and ethnic groups, also being more common in women [31]. Similarly, socioeconomic level and schooling are risk factors of overweight and obesity [25].

Therefore, experts are increasingly interested in studying obesity in order to better understand the factors and processes of this metabolic disorder, proposing solutions to a problem that affects a large portion of the

population worldwide, regardless of social class, gender, or age [6].

The changes in lifestyle that lead to a slight weight loss can, in fact, be beneficial to health. The sustained weight loss of 3 to 5 % results in clinically significant reductions in triglycerides, glycemia, and glycated hemoglobin levels, as well as a lowered risk of developing type 2 diabetes [7].

Further weight losses entails a reduction in arterial blood pressure, improved lipid levels, and decreased need for drugs to control blood pressure, glycemia, and lipid levels [11].

The conventional therapy strategies against obesity do not result in appropriate weight control among every treated patient, therefore complementary therapies are also employed [1, 3].

Acupuncture is one of the oldest healing practices and is currently the fastest exponentially growing

\* Correspondence: janice.coelho@ufrgs.br  
Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil



complementary therapy recognized by the World Health Organization [3].

Pharmacopuncture is also known as acupoint injection or aquapuncture. That means pharmacological medication is injected to acupoints, a new therapy associating acupuncture and medication. New finds reported that pharmacopuncture could provide stronger clinical response than traditional acupuncture [27, 16].

The traditional acupuncture has been reported as a treatment method for weight loss for obese patients [30, 5]. Nevertheless, its mechanisms are still under study and there is no behavioral assessment of the action of pharmacopuncture in obese individuals [28, 3]. Some studies suggest that stimulation by acupuncture may have an effect even in individuals of normal weight [13]. Thus, it is important to investigate which effects occur in individuals of normal weight, in an attempt to clarify the mechanisms involved in stimulation through acupuncture.

Therefore, the present study aimed to assess the biochemical and behavioral effects of pharmacopuncture at acupoints Zusanli (ST 36) and Tianshu (ST 25), as described by the Traditional Chinese Medicine, in obese Wistar rats.

## Methods

Eighty (80) male Wistar rats, with an average weight of  $250 \pm 10$  g were used in the study. The animals came from a monogamous Wistar colony maintained using Polley heterogeneous breeding method under a controlled conventional sanitary standard at the Bioterium of the Department of Biochemistry of UFRGS.

The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication n°85- 2, revised 1985) were followed in all of the experiments and the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre approved the experimental protocol.

The breeders of that colony were kept in a standardized environment in polypropylene cages (414×344×168 mm) with stainless steel lids and a selected autoclaved pine shavings bed under a 12 h light/dark photoperiod (7 AM/7 PM) and controlled temperature (21 °C). The animals used in this study were kept under the same conditions with five animals per cage.

Water and food were provided *ad libitum* for three months prior to the experiment. The animals were split into two groups containing 40 specimens each: Group 1 (control), animals with a balanced diet; and Group 2 (obese), obese animals previously treated with a hypercaloric diet.

The animals in Group 1 were fed water and a balanced diet *ad libitum*. Those in Group 2 were fed a hypercaloric diet (Table 1) throughout the period of

**Table 1** High-calorie diet

Composition	1,000 g
Commercial feed	300
Condensed milk	340
Hydrolyzed soy protein	173
Sucrose	80
Vitamin complex	10
Mineral complex	30
DL-Methionine	3
Lysine	2.5
Soybean oil	60

the experiment. The animals were kept on this diet for 16 weeks (3 months), which led to a significant weight gain.

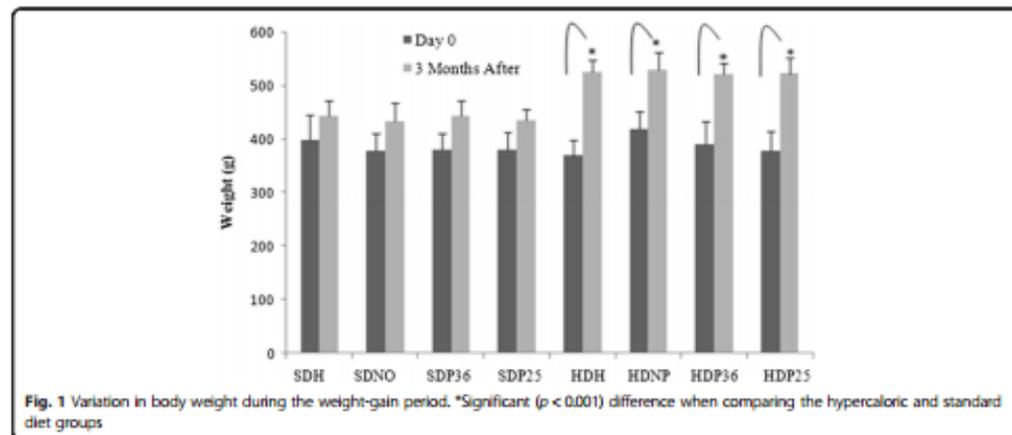
At first it was necessary to create an animal obesity model in Wistar rats. By using a hypercaloric diet, with excess lipids (vegetable oil) and glycerides (condensed milk), a significantly higher weight gain was possible in the animals fed this diet compared to the ones fed the control diet. Battú et al. [2] had already developed this type of model, which aims to increase animal body

weight, and the present results match the ones found by those authors.

The two experimental groups were split into subgroups containing ten animals each. They were split in: a group in which the animals received only manipulation, a group in which non-acupuncture points were used in the animals and two groups in which the previously mentioned acupuncture points for the treatment of obesity were utilized. The acupoints used were Zusanli (ST 36) and Tianshu (ST 25). The non-acupuncture point corresponding to a given acupoint was chosen based on its signal being less than half of the conductance measured for that acupoint, laterally to Zusanli.

In summary, the subgroups, with ten animals each, were as follows: SDH (standard diet/manipulation), SDNO (standard diet non-point), SDP36 (standard diet/point 36), SDP25 (standard diet/point 25), HDH (hypercaloric diet/manipulation), HDNP (hypercaloric diet/non-point), HDP36 (hypercaloric diet/point 36), and HDP25 (hypercaloric diet/point 25).

The intervention was performed once a day for 12 weeks, with the application of bee venom (Sigma-Aldrich®, 0.025 mg/kg) pharmacopuncture, in a concentration of 0.01 mg/0.05 ml. Each animal was administered approximately 0.05 ml, injected subcutaneously on side right of the body. The syringe utilized was 0.45×13, with a needle gauge of 26G× ½". Body weight was measured prior to and after treatment.



The behavioral parameters were assessed after the acupuncture intervention, using the elevated plus maze test to evaluate anxiety [4] and the alimentary behavior test to analyze motivation for food intake [24].

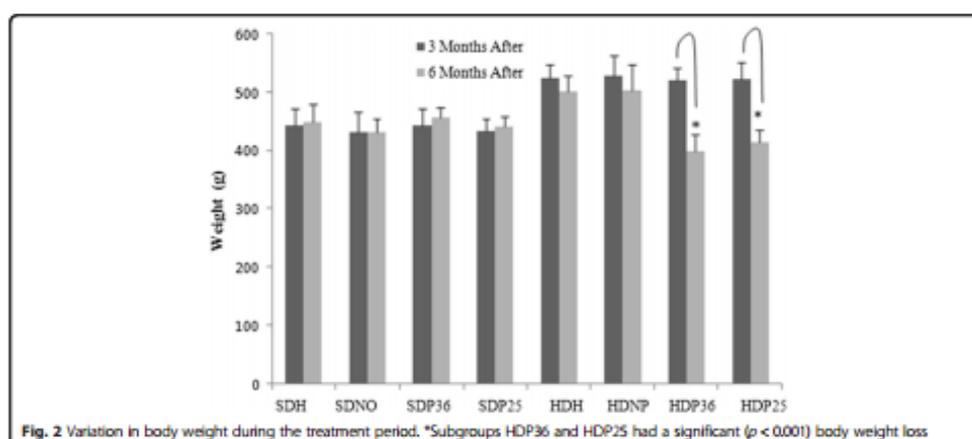
The elevated plus maze test consists in having the animal move about for five minutes in a cross-shaped device with two open-sided arms and two arms with side walls that provide apparent protection for the animal. This test does not require prior exposure of the animal to the device.

The alimentary behavior test is an analysis of the latency time for the animal to reach a bowl containing 16 units of Froot Loops® with eight different colors, of the latency time until the first bite to the food, and of the number of cereal bits consumed. The device consists of

a 50 cm corridor and the animal is placed for three minutes at the opposite end of the bowl with food. This test requires a five-day training period so that the animal can adapt to the device and the new food.

By the end of the pharmacopuncture intervention period, the animals were weighed and euthanized using the guillotine method. Blood and fat tissue samples were collected. Visceral fat (retroperitoneal and epididymal) was removed and weighed.

Triglycerides, glucose, and cholesterol were assessed using specific commercial kits from Labtest (Brazil) (Triglicérides Liquiform, Glicose PAP Liquiform, and Colesterol Liquiform, respectively) to determine the final reaction point in plasma after it was separated from the blood collected in EDTA tubes by centrifuging at



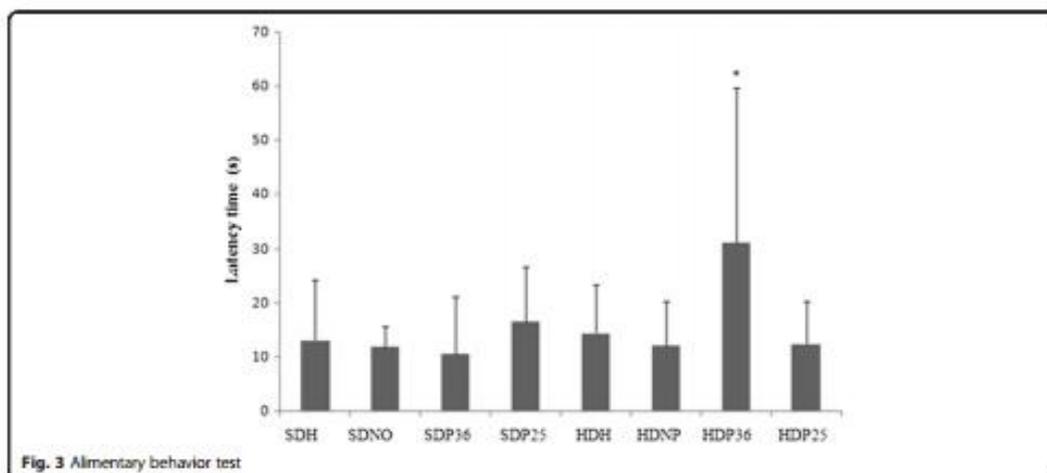


Fig. 3 Alimentary behavior test

2,000 rpm for ten minutes. Colorimetric enzymatic assays were used for all analyses, and performed according to the manufacturer's instructions. The readings were carried out in a UV-Vis spectrophotometer with 505 nm absorbance for triglycerides and glucose, and 500 nm for cholesterol.

The statistical analysis employed ANOVA for the body weight variation, body fat weight, and biochemical analyses, while the Kruskal-Wallis test was used for the behavioral analyses, with a 5 % level of significance.

### Results and discussion

There are several hurdles in the treatment of obesity; a disease that has been continuously growing in the mod-

ern world. Among those, it is worth mentioning the lack of adherence to the conventional treatment with diets and physical exercise, as well as the adverse effects of the pharmacological treatment. Acupuncture is a treatment that is being used as a complementary therapy for obesity [3] and is recognized by the WHO. Just the same, it has been shown that pharmacopuncture can be employed more quickly and conveniently than the original technique [23]. No reports were found in the literature on the contribution of bee venom pharmacopuncture for the treatment of obesity in rats. However, there is a study in humans using non related acupoints to this study [21, 22]. Therefore, discussing the results of the effects of pharmacopuncture in points ST 36 and ST 25 becomes crucial, based on the results of the present study.

ern world. Among those, it is worth mentioning the lack of adherence to the conventional treatment with diets and physical exercise, as well as the adverse effects of

### Obesity model

In the three months during which the animals were only fed the diet provided by us, a significant ( $p < 0.001$ )

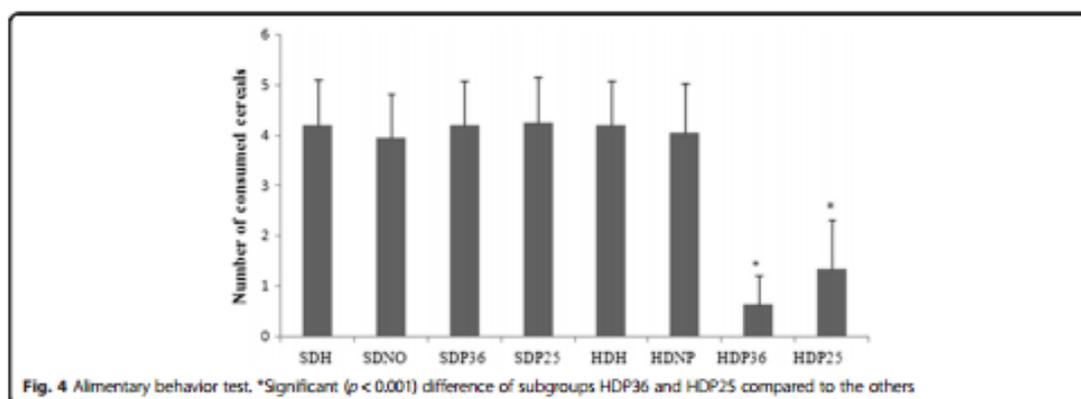
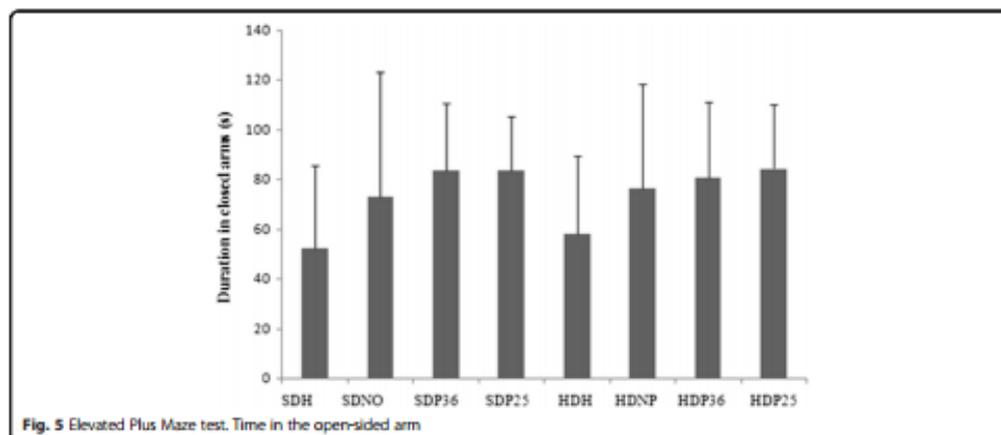


Fig. 4 Alimentary behavior test. \*Significant ( $p < 0.001$ ) difference of subgroups HDP36 and HDP25 compared to the others



weight gain was observed in those fed the hypercaloric diet, both in comparison with their initial weight and with the animals that were fed the standard commercial diet (Fig. 1). Both groups gained a significant amount of weight ( $p < 0.001$ ) over the course of treatment (14.3 % for the controls and 34.96 % for the experimental animals), and the experimental (obese) group weighed 19.60 % more than the controls ( $p < 0.001$ ) by the end of the treatment.

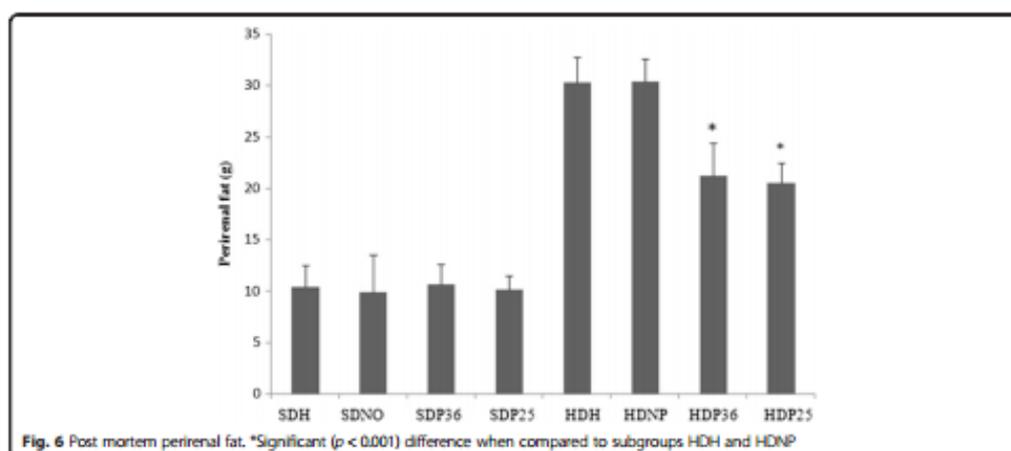
From the results obtained, we can see that the hyperpalatable and hypercaloric diet employed in the present study may be widely used as a model of simple obesity. It enabled a 30 to 40 % body weight gain compared to the control diet, as it has been described for other hypercaloric diets [9, 15].

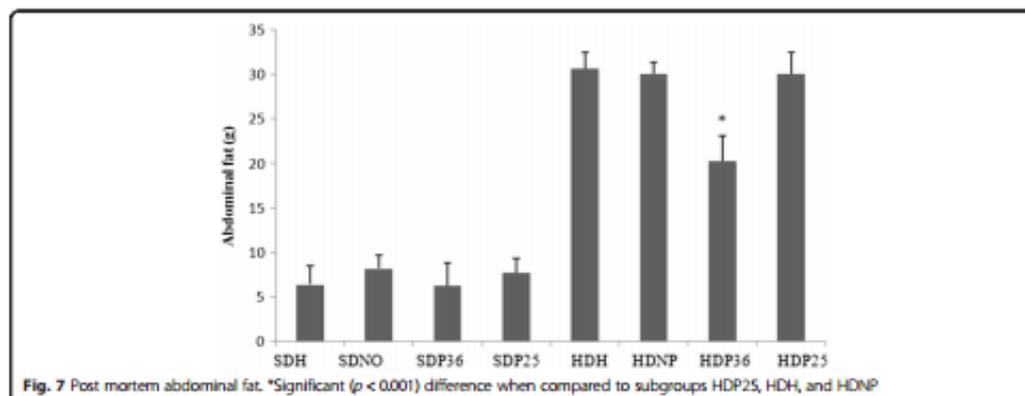
#### Variation in body weight

After the model was defined, pharmacopuncture was used in points ST 36 and ST 25, which had never been tested with pharmacopuncture before, only with acupuncture and electroacupuncture.

Next, the diet was maintained for all groups and acupuncture interventions were performed for three months. No significant difference was found in the groups fed the standard diet during the course of treatment. However, among the groups fed the hypercaloric diet, a significant ( $p < 0.001$ ) weight loss was observed in groups HDP36 and HDP25, which were treated with acupuncture (Fig. 2).

The positive outcomes of body weight loss from using pharmacopuncture found in the present study are in





**Fig. 7** Post mortem abdominal fat. \*Significant ( $p < 0.001$ ) difference when compared to subgroups HDP25, HDH, and HDNP

accordance with those obtained with the use of electroacupuncture and acupuncture in points ST 36 and ST 25 by several authors [17, 28, 29, 14, 32, 15, 20, 19, 8, 33, 12]. However, the method of injection in the acupoint had not been described yet for this type of disorder. Pharmacopuncture has shown to be a promising option, both in the experimental approach, given the easy management, and in the medical and veterinary clinical practice, once it requires shorter treatment time in the office.

We found that pharmacopuncture did not affect weight loss, biochemical or behavioral changes in the animals fed the standard diet, which suggests the need for a metabolic disorder so that a significant result is obtained by using the traditional Chinese medicine technique. According to Shiraishi et al. [26], the results in humans depend on the BMI. Nevertheless, this contrasts with the results by Kim et al. [13] and Kim et al. [14],

which report a reduction in body weight by using electroacupuncture even in non-obese individuals.

#### Behavioral assessment

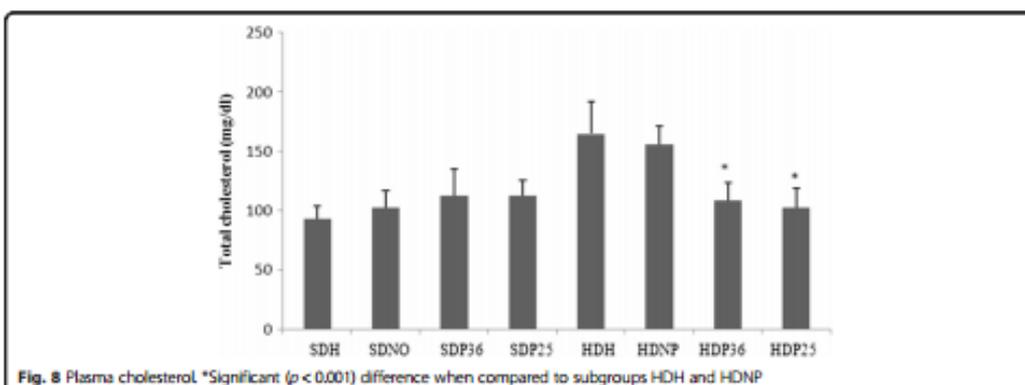
These results may target future studies on neurobehavioral analysis of using pharmacopuncture in points ST 36 and ST 25 in the treatment of diet-induced obesity in rats.

#### Alimentary behavior test

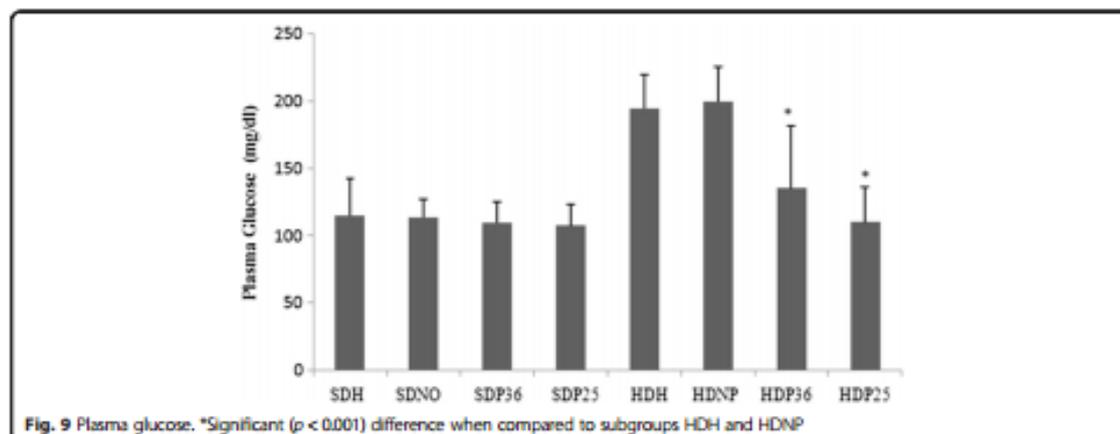
No significant difference was found between the groups studied in alimentary behavior regarding latency to feed (Fig. 3), i.e., both groups reached the food, on average, within the same timeframe. Nevertheless, the number of cereal bits consumed was significantly lower ( $p < 0.001$ ) in subgroups HDP36 and HDP25 compared to HDH and HDNP (Fig. 4).

Based on the data obtained, the points assessed impact the motivation for food consumption, according to the alimentary behavior test. Although latency to feed

did not differ between the groups, the group treated with pharmacopuncture consumed fewer cereal bits,



**Fig. 8** Plasma cholesterol. \*Significant ( $p < 0.001$ ) difference when compared to subgroups HDH and HDNP



which suggests the treatment resulted in lower appetitive behavior in the animals treated with the specific points.

#### Elevated plus maze

The elevated plus maze test did not show a significant difference among the groups analyzed (Fig. 5). The present study suggests that points ST 36 and ST 25 did not impact the animals' anxiety, as shown by the elevated plus maze test. Anxiety is mentioned as a factor that favors food intake [3], however, no significant difference in the elevated plus maze test was found that shows an effect of this component.

#### Visceral fat weight

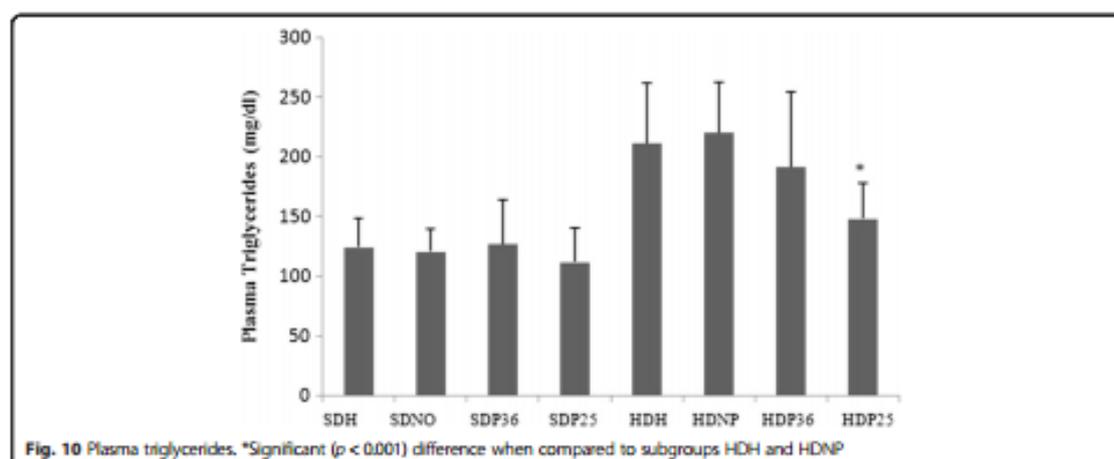
The subgroups fed the standard diet had significantly less ( $p < 0.001$ ) perirenal and abdominal fat compared to the subgroups that were fed the hypercaloric diet. Likewise, less perirenal fat ( $p < 0.001$ ) was found in

subgroups HDP36 and HDP25 compared to HDH and HDNP, which shows an effect of acupuncture in body weight accumulation (Fig. 6). At the same time, only subgroup HDP36 had significantly ( $p < 0.001$ ) lower abdominal fat weight compared to HDH and HDNP (Fig. 7).

A reduction in perirenal and abdominal fat was also observed. This also matches the experiments carried out with electroacupuncture in point ST 36 in rats [15]. The perirenal fat reduction data obtained in the present study are promising, since inner fat, which is harder to be reduced exclusively through dietary restriction [3], could be reduced using specific acupuncture points.

#### Biochemical analysis

Significant differences were found in the levels of glucose and plasma cholesterol when the four subgroups that were fed a hypercaloric diet were compared amongst



themselves. However, no significant difference was found when comparing the four subgroups that were fed standard diet. Subgroups HDH36 and HDH25 had significantly ( $p < 0.001$ ) lower glucose and cholesterol levels compared to the ones that were also fed the hypercaloric diet with no pharmacopuncture intervention (HDH and HDNP). The reduction in glucose and cholesterol levels in subgroups HDH36 and HDH25 was so significant that these animals did not significantly differ from the ones that were fed the standard diet (SDM, SDNP, SDP36, and SDP25) (Figs. 8 and 9).

Regarding triglycerides, only subgroup HDP25 had a significant ( $p < 0.001$ ) reduction in plasma levels compared to the other ones fed the hypercaloric diet (HDH, HDNP, and HDP6). No significant difference was found when subgroup HDP25 was compared with the ones fed the standard diet (SDM, SDNP, SDP36, and SDP25) (Fig. 10).

It was also observed that using pharmacopuncture in points ST 36 and ST 25 significantly lowered glucose and cholesterol levels, and that ST 25 decreased triglyceride levels when compared to the control group.

Yang et al. [32] also observed the same in the treatment with electroacupuncture in these same points in rats, Wang et al. [30] in Sprague–Dawley rats, and Lee et al. [18] in male Wistar rats. On the other hand, Tian et al. [29] did not find differences in plasma glucose and triglyceride levels of Sprague–Dawley rats when using electroacupuncture in point ST 36.

In conclusion, the results hereby presented from the use of pharmacopuncture in obese Wistar rats show that this technique may likely be recommended as a complement in the treatment of patients with high cholesterol, glucose, and triglyceride levels.

## Conclusions

The present study allows a conclusion that pharmacopuncture in points ST 36 and ST 25 yields favorable results in reducing body weight, visceral fat, and biochemical parameters such as cholesterol, triglycerides, and glucose in obese rats. Likewise, it decreases appetitive behavior as shown by the alimentary behavior test.

### Competing interests

The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publishing of this article. Research support played no role in study design; collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

### Authors' contributions

MP carried out the acupuncture, animal management, behavior test and biochemical analysis. LCH participated in animal management, behavior test and biochemical analysis. JCC participated in the design of the study, performed the statistical analysis and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgment

The authors thank CAPES and CNPq for the financial support provided.

Received: 14 November 2014 Accepted: 25 August 2015

Published online: 28 August 2015

## References

- Amariles P, Gonzalez LJ, Giraldo NA. Prevalence of self-treatment with complementary products and therapies for weight loss: a randomized, cross-sectional study in overweight and obese patients in Colombia. *Curr Ther Res.* 2006;67(1):66–78.
- Batú CE, Rieger D, Loureiro S, Furtado GV, Bock H, Saraiva-Pereira ML, et al. Alterations of PKB and Akt signaling pathways in the hippocampus and hypothalamus of Wistar rats treated with highly palatable food. *Nutr Neurosci.* 2012;15(1):10–7.
- Belivani M, Dimitroula C, Katsiki N, Apostolopoulou M, Cummings M, Hatzitolios AI. Acupuncture in the treatment of obesity: a narrative review of the literature. *Acupunct Med.* 2013;31(1):88–97.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(1):193–205.
- Cho SH, Lee JS, Thabane L, Lee J. Acupuncture for obesity: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes.* 2009;33:183–96.
- Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010. *JAMA.* 2012;307:491–7.
- Foster G, Borradaile K, Sanders M, Millman R, Zammit G, Newman AM, et al. A randomized study on the effect of weight loss on obstructive sleep apnea among obese patients with type 2 diabetes: the Sleep AHEAD study. *Arch Intern Med.* 2009;169:1619–26.
- Gao L, Kong XJ, Shi X. Effects of electroacupuncture and acupoint catgut-embedding on mRNA expression of lipid metabolism gene PPAR-gamma and related lipase of rats with simple obesity. *Zhongguo Zhen Jiu.* 2011;31(6):535–8.
- Hyland NP, Rybicka JM, Ho W, Pittman QJ, Macnaughton WK, Sharkey KA. Adaptation of intestinal secretomotor function and nutrient absorption in response to diet-induced obesity. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22:602–171.
- Jean R, Harvey JR, Ogden D. Obesity treatment in disadvantaged population groups: Where do we stand and what can we do? *Prevent Med.* in press, 2014.
- Jensen MD, Ryan DH. New obesity guidelines: promise and potential. *JAMA.* 2014;311:23–4.
- Ji B, Hu J, Ma S. Effects of electroacupuncture Zusanli (ST36) on food intake and expression of POMC and TRPV1 through afferents-medulla pathway in obese prone rats. *Peptides.* 2013;99:188–94.
- Kim E, Kim Y, Jang MH, Lim BV, Kim YJ, Chung JH, et al. Auricular acupuncture decreases neuropeptide Y expression in the hypothalamus of food-deprived Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett.* 2001;307(2):113–6.
- Kim SK, Lee G, Shin M, Han J, Moon HJ, Park JH, et al. The association of serum leptin with the reduction of food intake and body weight during electroacupuncture in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;83:145–9.
- Kong XJ, Gao L, Peng H, Shi X. Effects of electro-acupuncture on expression of obestatin in hypothalamus of rats with simple obesity. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2010;9(5):480–5.
- Kwon K, Kim S, Kim C. Pharmacopunctureology. 2nd ed. Seoul: Elsevier; 2011.
- Lacey JM, Tereshalovec AM, Foster GD. Acupuncture for the treatment of obesity: a review of the evidence. *Int J Obes (Lond).* 2003;27:419–27.
- Lee Y, Li T, Tseng C, Chen Y, Ho W, Lin J, et al. Electroacupuncture at the Zusanli (ST 36) acupoint induces a hypoglycemic effect by stimulating the cholinergic nerve in a rat model of streptozotocine-induced insulin-dependent diabetes mellitus. *Evid-Based Complement Alternat Med.* 2011;ID 650263:1–6.
- Li YK, Yin GZ. Observation on the effect of the catgut implantation treatment for obesity hypertriglyceridemia. *Zhongguo Zhen Jiu.* 2010;30(10):813–5.
- Liang F, Koya D. Acupuncture: Is it effective for treatment of insulin resistance? *Diabetes Obes Metabol.* 2010;12:555–69.
- Lim CS, Park WP, Jang SB. Clinical studies of sweet bee venom to the effect of abdominal fat accumulation. *J Pharmacopunct.* 2008;11(2):33–40.
- Lim CS, Park SK, Sun SH, Lee KH. Research on Korean Pharmacopuncture in South Korea since 2007. *J Pharmacopunct.* 2014;17(4):15–21.
- Luna SP, Angeli AL, Ferreira CL, Letry V, Scognamiglio-Szabó M. Comparison of pharmacopuncture, aquapuncture and acepromazine for sedation of horses. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008;5(3):267–72.

24. Noschang CG. *Caféina e estresse: influências sobre o comportamento e sobre parâmetros bioquímicos avaliando estresse oxidativo no sistema nervoso central*. Porto Alegre: Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em ciências biológicas: bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
25. Ogden CL, Lamb MM, Carroll MD, Flegal KM. Obesity and socioeconomic status in adults. United States 2005–2008. *NCHS Data Brief*. 2010;50:1–8.
26. Shiraishi T, Onoe M, Kojima TA, Kageyama T, Sawatsugawa S, Sakurai K, et al. Effects of bilateral auricular acupuncture stimulation on body weight in healthy volunteers and mildly obese patients. *Exp Biol Med*. 2003;228:1201–7.
27. Strudwick MW, Hinkis RC, Choy STB. Point injection as an alternative acupuncture technique—an exploratory study of responses in healthy subjects. *Acupunct Med*. 2007;25(4):166–74.
28. Tian DR, Li XD, Wang F, Niu DB, He QH, Li YS, et al. Up-regulation of the expression of cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide by electroacupuncture in the arcuate nucleus of diet-induced obese rats. *Neurosci Lett*. 2005;383(1–2):17–21.
29. Tian N, Wang F, Tian D, Zou Y, Wang SW, Guan LL, et al. Electroacupuncture suppresses expression of gastric ghrelin, and hypothalamic NPY in chronic food restricted rats. *Peptides*. 2006;27:2313–20.
30. Wang F, Tian D, Han J. Electroacupuncture in the treatment of obesity. *Neurochem Res*. 2008;33:2023–7.
31. Wang Y, Beydoun MA. The obesity epidemic in the United States — gender, age, 480 socioeconomic, racial/ethnic, and geographic characteristics: a systematic review and 481 meta-regression analysis. *Epidemiol Rev*. 2007;29:6–28.
32. Yang H, Li Y, Cheng L, He S. Effect of electroacupuncture and diet adjusting on insulin resistance in rats with nutrition obesity. *J Chin Integrat Med*. 2007;5(5):546–9.
33. Yu M, Xiao XD, Tang CL, Liu ZL, Hou YX, Gao J, et al. Effect of different intensities of electroacupuncture on expression of monocyte chemoattractant protein-1 and TNF-alpha in adipose tissue in obesity rats. *Zhen Ci Yan Jiu*. 2011;36(2):79–84.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## **CAPÍTULO 2**

**Artigo: Behavioral and biochemical effects of Pharmacopuncture (ST 21 and ST 40) in obese rats**

Mariana Chiste Pontes and Janice Carneiro Coelho

*A ser submetido para: BMC Complementary and Alternative Medicine*

**Behavioral and biochemical effects of Pharmacopuncture (ST 21 and ST 40) in obese rats**

Mariana Chiste Pontes, Janice Carneiro Coelho

Postgraduate Program, Biochemistry Department, Lysosomal Storage Diseases Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

**Correspondence to: Janice Carneiro Coelho, PhD**

Department of Biochemistry  
Federal University of Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo  
90035-003 – Porto Alegre – RS, Brazil  
e-mail: [janice.coelho@ufrgs.br](mailto:janice.coelho@ufrgs.br)  
phone: +55 51 33085550  
fax: + 55 51 33085535

## Resumo

A obesidade é considerada a doença do século e diversos métodos de tratamento vem sendo pesquisados. A medicina tradicional chinesa descreve diversos acupontos que podem ser utilizados no tratamento desta enfermidade. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar sob a ótica experimental da medicina ocidental, os efeitos bioquímicos e comportamentais da farmacopuntura (st 21 e st 40) em ratos Wistar obesos. O grupo HDP21, tratado com farmacopuntura, exibiu uma redução no peso corporal em comparação com os controles, que também foram alimentados com uma dieta hipercalórica. No teste de comportamento alimentar, a latência foi menor no grupo HDP40, e neste grupo, os animais consumiram maior número de cereais em comparação aos demais grupos obesos, o que sugere que a acupuntura elevou o apetite neste grupo. Já o grupo HDP21 exibiu menor tempo nos braços fechados quando comparado com os demais grupos, sugerindo uma redução na ansiedade. Em relação ao peso da gordura perirenal e abdominal *post mortem* dos grupos alimentados com uma dieta hipercalórica, o grupo HDP21 teve peso menor da gordura perirenal e da gordura abdominal em comparação com os demais. Da mesma forma, uma redução dos níveis de colesterol, triglicerídeos e de glicose foi observada no grupo HDP21 em comparação com os outros grupos que receberam a dieta hipercalórica. Em conclusão, o presente estudo demonstrou a eficácia do farmacopuntura utilizando-se do veneno de abelha em ST21 na perda de peso de ratos obesos, bem como redução nos parâmetros bioquímicos e diminuição da ansiedade.

Palavras-chave: obesidade, comportamento alimentar, farmacopuntura.

## **Introdução**

O comportamento humano do século XXI e a facilitação do consumo calórico resultaram na elevação do número de obesos em todo o mundo. Este fenômeno já vinha sendo um expoente em países desenvolvidos e, hoje em dia, cada vez mais, nos países em desenvolvimento (MORRISA et al, 2014).

A obesidade é considerada na atualidade uma grave epidemia e vem sendo alvo de diversas pesquisas médicas. A obesidade está associada à enfermidades, dentre as quais cabe destacar as doenças cardiovasculares, diabetes *melitus*, hiperlipidemia, tumores e infertilidade (MAESO et al, 2006). Os pacientes obesos apresentam resistência à insulina e à leptina, o que favorece ainda mais a manutenção da doença (MORRISA et al, 2014).

O tratamento para esta enfermidade trata-se de um desafio para a medicina, que ainda não dispõe de técnicas definitivas de cura e vem sendo utilizado um conjunto de métodos terapêuticos. Neste sentido, estão sendo avaliadas novas alternativas terapêuticas no tratamento da obesidade (CHO et al, 2009).

A acupuntura é uma técnica da Medicina Tradicional Chinesa, e que cada vez mais apresenta uma difusão para o mundo no tratamento de muitas doenças, dentre as quais se pode citar a obesidade (LACEY et al, 2003; KOWALSKI; BRUCE, 2014).

Dentre as técnicas de acupuntura, a farmacopuntura seria um dos métodos empregados e se utiliza da injeção nos acupontos de fármacos e substâncias. Na farmacopuntura ocorre um estímulo mais prolongado do acuponto, uma vez que a substância permanece um período no local, levando a reações orgânicas, antes de sua absorção (STRUDWICK et al, 2007).

Diversos acupontos são indicados para o tratamento da obesidade, incluindo os do meridiano do estômago: Fenglong (st 40) e Liangmen (st 21) (LACEY et al, 2003).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi o de avaliar os efeitos bioquímicos e comportamentais da farmacopuntura nos pontos st 40 e st21 em ratos Wistar submetidos a um modelo de obesidade previamente descrito por nosso grupo (Pontes et al, 2015).

## **Métodos**

Foram utilizados para cada ponto de acupuntura vinte ratos Wistar machos com peso médio de  $250 \pm 10$  g, além de 20 animais controle. Os animais foram obtidos de uma colônia Wistar monogâmica mantida usando método Poliey de reprodução heterogênea sob um padrão sanitário convencional controlado no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Os "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publicação nº85- 2, revisado 1985) foram seguidos em todos os experimentos e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Os animais dessa colônia foram mantidos em um ambiente padronizado em gaiolas de polipropileno (414X344X168 mm) com tampas de aço inoxidável e cama de maravalha autoclavada sob o fotoperíodo de 12 horas de claro / escuro (07:00 / 19:00) e temperatura controlada ( $21^{\circ}$  C). Os animais a serem utilizados neste estudo foram mantidos sob as mesmas condições, com cinco animais em cada gaiola.

Foram fornecidas água e comida *ad libitum* por três meses anteriores ao experimento. Os animais foram divididos em dois grupos contendo 20 animais cada: Grupo 1 (controle), animais com uma dieta equilibrada; e Grupo 2 (obesidade), animais obesos previamente tratados com uma dieta hipercalórica.

Os animais do grupo 1 foram alimentados com água e dieta equilibrada *ad libitum*. Os animais do Grupo 2 foram alimentados com uma dieta hipercalórica (Battu

et al, 2012; Tabela 1) durante todo o período experimental. A dieta foi fornecida por 16 semanas (3 meses), o que levou a um ganho de peso significativo.

**Table 1** Dieta de alta caloria a qual foram submetidos os ratos do grupo 2

<b>Composição</b>	<b>1 kg</b>
Ração Comercial	300
Leite Condensado	340
Proteína de Soja Hidrolisada	173
Açúcar	80
Complexo Vitamínico	10
Complexo Mineral	30
DL-Metionina	3
Lisina	2.5
Óleo de Soja	60

Os dois grupos experimentais foram divididos em quatro subgrupos que continham dez animais cada: no primeiro, foi utilizada manipulação, no segundo um ponto não-correlacionado e nos terceiros e quartos sub grupos foi utilizada a farmacopuntura nos acupontos (ST 21) e (ST 40).

Em resumo, os subgrupos, com dez animais cada, foram as seguintes: SDH (dieta padrão e manipulação), SDNO (dieta standard e não-ponto), SDP40 (dieta padrão e ponto 40), SDP21 (dieta padrão e ponto 21), HDH (dieta hipercalórica e manipulação), HDNP (dieta hipercalórica e não-ponto), HDP40 (dieta hipercalórica e ponto 40), e HDP21 (dieta hipercalórica e ponto 21).

O procedimento foi realizado uma vez por dia durante 12 semanas, com a farmacopuntura com a aplicação de veneno de abelha (Sigma-Aldrich, 0,025 mg/kg), numa concentração de 0,01 mg / 0,05 ml. Cada animal foi administrado cerca de 0,05 ml, injetados subcutaneamente no lado direito do corpo. A seringa utilizada foi de 0,45

x 13, com uma agulha de calibre 26G × de ½ ". O peso corporal foi medido antes e depois do tratamento.

Os parâmetros comportamentais foram avaliados após a intervenção com a acupuntura usando o teste de labirinto em cruz elevado para avaliação da ansiedade (Carobrez e Bertoglio, 2005) e o teste de comportamento alimentar para analisar a motivação para a ingestão de alimentos (Noschang, 2009).

O teste de labirinto em cruz elevado consiste em avaliar o movimento dos animais por cinco minutos sobre um aparato em forma de cruz com dois braços com lados abertos e dois braços com paredes laterais que fornecem proteção aparente para o animal. Este teste não requer exposição prévia do animal ao dispositivo.

O teste de comportamento alimentar é uma análise do tempo de latência para que o animal alcance um recipiente contendo 16 unidades de Froot Loops® com oito cores diferentes, sendo analisado o tempo de latência até a primeira dentada, e do número de cereais consumidos. O dispositivo consiste de um corredor de 50 cm em que o animal é colocado durante três minutos, na extremidade oposta da tigela com o alimento. Este teste requer a adaptação de cinco dias, de modo que o animal possa adaptar-se ao dispositivo e ao novo alimento.

No final do período de intervenção com a farmacopuntura, os animais foram pesados e eutanasiados utilizando o método de guilhotina. As amostras de sangue e tecido adiposo foram recolhidas. A gordura visceral (abdominal e perirenal) foi removida e pesada.

Foram avaliados os triglicerídeos, glicose e colesterol plasmáticos através de kits comerciais específicos da Labtest (Brasil) (triglicérides Liquiform, Glicose PAP Liquiform e Colesterol Liquiform, respectivamente) para determinar o ponto de reação final no plasma depois que ele foi separado do sangue colhido em tubos com EDTA por

centrifugação a 2.000 rpm durante dez minutos. Os ensaios enzimáticos colorimétricos foram os métodos utilizados para todas as análises, que foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas por espectrofotômetro de UV-Vis com absorvância de 505 nm para triglicerídeos e de glicose e de 500 nm para o colesterol.

A análise estatística utilizada foi a ANOVA para a variação de peso do corpo, o peso de gordura corporal, e análises bioquímicas, enquanto que o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a análise comportamental, com um nível de significância de 5%.

## **Resultados e Discussão**

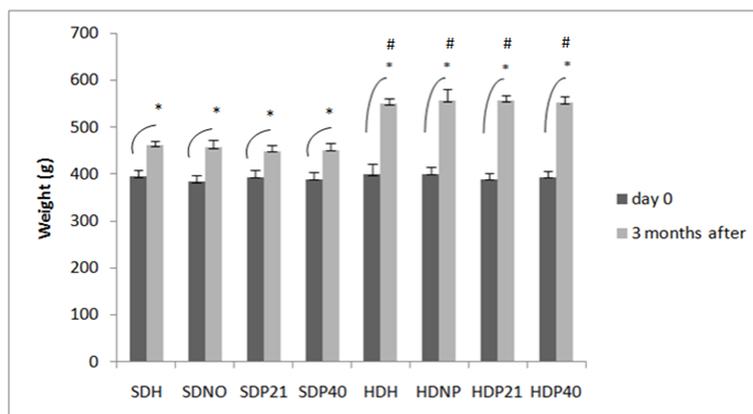
Os resultados do uso da farmacopuntura em ratos obesos vem sendo promissores, conforme demonstrados em Pontes et al (2015). Este é um tratamento que poderia ser desenvolvido inclusive em estudos em humanos, em decorrência de seus resultados positivos e da inexistência de uma terapia única efetiva contra a obesidade.

Alguns estudos demonstraram a eficácia da farmacopuntura de uma forma geral (Strudwick et al, 2007; Lim et al, 2007; Luna et al, 2008; Kwon et al, 2011) e ainda existem poucos estudos da sua aplicabilidade na obesidade (Pontes et al, 2015; Lim et al, 2008). A seguir, serão analisados e discutidos os resultados do efeito da farmacopuntura nos pontos st 21 e st 40, baseados nos dados obtidos no presente estudo.

## **Modelo de Obesidade**

O modelo de obesidade utilizado no presente estudo, conforme descrito por Battú et al (2012), apresentou resultados satisfatórios, uma vez que os grupos que receberam a dieta hipercalórica obtiveram ganho de peso significativamente maior

( $p < 0,001$ ) em comparação ao peso inicial. Do mesmo modo, após 3 meses de dieta, os animais submetidos à dieta hipercalórica obtiveram peso significativamente maior em comparação com os grupos que receberam a dieta padrão ( $p < 0,001$ ) durante o mesmo período (Figura 1).



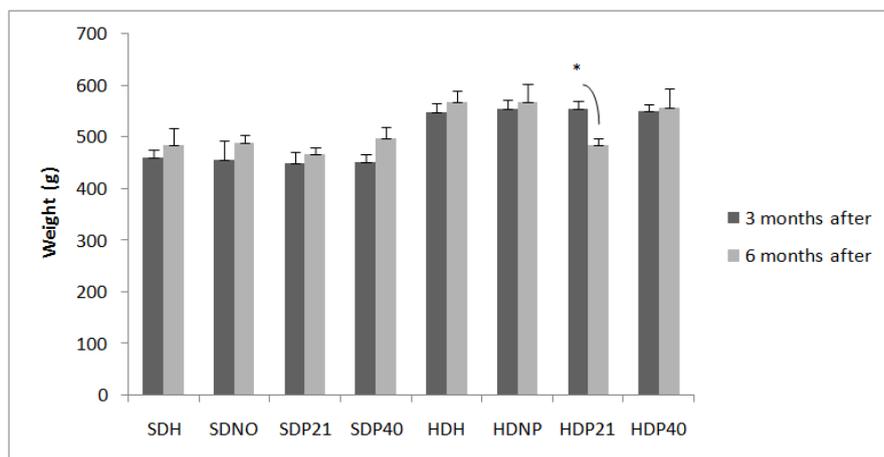
**Figura 1. Variação de peso corporal durante o período de ganho de peso** \* Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) quando se compara com o dia 0. # Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) quando os grupos que receberam dieta hipercalórica foram comparados com os grupos da dieta padrão.

Todos os grupos apresentaram um ganho de peso significativo ( $p < 0,001$ ) após 3 meses de tratamento, sendo um ganho de 16,38% para os controles e de 39,82% para os animais que receberam dieta hipercalórica (grupo obeso). O grupo de animais obesos tinham um peso 17,1% maior que o grupo controle no final do tratamento ( $p < 0,001$ ).

Os dados obtidos no presente estudo corroboram com estudos já desenvolvidos, como o de Zoth et al (2010) que obtiveram ganhos de peso maiores que o da dieta padrão utilizando dieta hipercalórica com maior concentração de gordura. Do mesmo modo, Tian et al (2005) relatam um ganho de 50% em 14 semanas usando dieta hipercalórica.

### Varição no peso corporal

Após 3 meses de tratamento com farmacupuntura (6 meses após o início da dieta), observamos que somente o subgrupo HDP21 exibiu uma redução significativa do peso corporal (Figura 2).



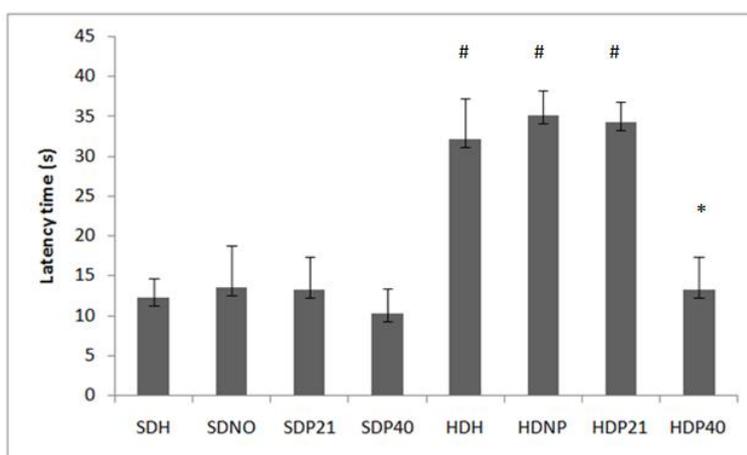
**Figura 2. Variação do peso corporal durante o período de tratamento** \*Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) quando comparado antes e após o tratamento no grupo HDP21

Diversos estudos indicam o uso da farmacopuntura (Lim et al, 2008; Lim et al, 2014; Pontes et al, 2015), da acupuntura e da eletroacupuntura (Cho et al, 2009, Belivani et al, 2013) para a redução do peso corporal. Contudo, nenhum dos estudos avaliou de forma isolada os pontos st40 e st21, utilizando-se da técnica da farmacopuntura em ratos obesos. Este é o único trabalho que avalia o efeito da farmacopuntura isoladamente nestes dois acupontos. Os resultados indicam que a farmacopuntura isolada no acuponto st21 foi capaz de diminuir o peso corporal deste grupo de animais.

## Avaliação Comportamental

### Testes de comportamento alimentar

O teste de comportamento alimentar avalia o comportamento apetitivo. Desta forma, uma latência menor ao encontro do alimento indica maior apetite alimentar (Noschang, 2009). Dos 4 grupos de animais submetidos a dieta hipercalórica, 3 deles, tiveram um tempo de latência significativamente maior ( $p < 0,001$ ) para chegar ao alimento em relação aos grupos que receberam a dieta padrão. O subgrupo HDP40 exibiu significativamente menor tempo de latência ( $p < 0,001$ ) para a chegada ao froot loops em relação aos demais grupos obesos, o que demonstra maior apetite e interesse ao alimento em relação aos demais grupos que receberam a dieta hipercalórica. A dieta hipercalórica por si só pode ter inibido o apetite dos grupos HDH, HDNP e HDP21. Não houve diferença significativa entre o grupo HDP40 e os grupos que receberam a dieta padrão (Figura 3).

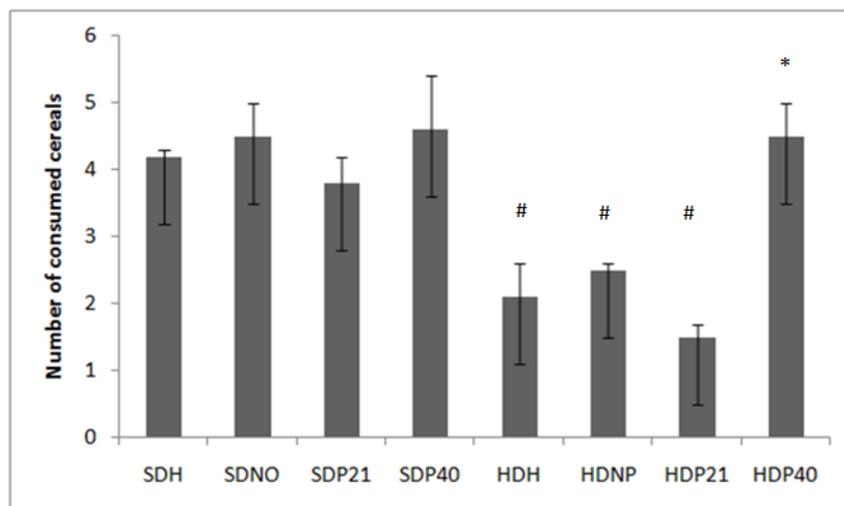


**Figura 3. Teste do comportamento alimentar.** \* Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) do grupo HDP40 quando comparado com os outros grupos obesos # Diferença significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado com os grupos que receberam a dieta padrão e com o grupo HDP40.

A aplicação da farmacupuntura no acuponto st40 para o tratamento da obesidade está sempre associada, em vários trabalhos, a outros acupontos (Pang et al, 2015; Liang

et al, 2012; Sun et al, 2012), o que impede uma comparação destes resultados com os do presente estudo. O uso do st40 de forma isolada em pacientes ou mesmo ratos obesos não foi avaliada ainda em outro estudo. Os resultados aqui obtidos parecem indicar que a farmacupuntura isolada no acuponto st40 favorece o apetite alimentar dos ratos obesos.

Em decorrência da oferta de uma dieta hiperpalatável, o consumo de froot loops pela maioria dos grupos de ratos obesos (Figura 4) foi reduzido e significativamente menor em relação aos grupos de animais que receberam a dieta normal ( $p < 0.001$ ). Contudo, o subgrupo HDP40 exibiu maior consumo de froot loops em relação aos demais que também receberam a dieta hiperpalatável ( $p < 0.001$ ), mostrando maior interesse a este tipo de alimento em relação aos demais. O subgrupo HDP40 também não diferiu dos subgrupos que receberam dieta padrão (Figura 4). A partir destes resultados, é possível depreender que o grupo HDP40 apresentou maior comportamento apetitivo que os demais grupos que estavam recebendo dieta hipercalórica. Estes dados foram opostos aos encontrados por outros autores que utilizaram o st40 em ratos obesos (Pang et al, 2015; Liang et al, 2012; Sun et al, 2012), Entretanto, estes autores não utilizaram o ponto st40 de forma isolada, como no presente estudo, o que pode ter mascarado o efeito do estímulo a este acuponto.

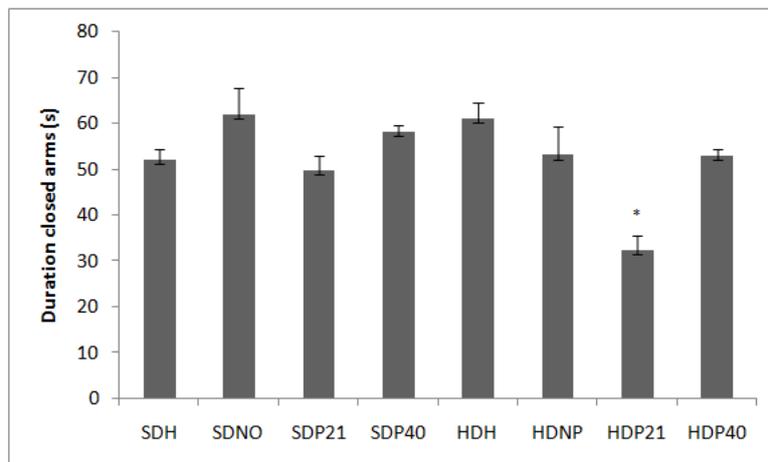


**Figura 4. Teste do comportamento alimentar** \*Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) do HDP40 quando comparado com outros grupos hipercalóricos. # Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) quando comparado com grupos que receberam a dieta padrão e ao grupo HDP40.

#### *Teste de Cruz Elevado*

O emprego do teste de cruz elevado avalia a ansiedade do animal (Carobrez and Bertoglio, 2005; Oliveira et al, 2015). Desta forma, pode-se verificar se há uma correlação entre a obesidade e a ansiedade, visto que, animais ansiosos parecem ter maior chance de desenvolver a obesidade.

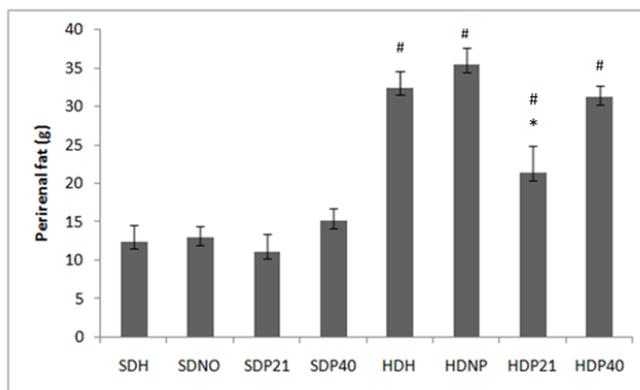
O subgrupo HDP21 apresentou menor tempo no braço fechado em relação aos demais subgrupos ( $p < 0.001$ ), o que indica uma ação ansiolítica da estimulação do ponto st21 (Figura 5). Também já foi descrito por Belivani et al (2013) e Pontes et al (2015) ação ansiolítica do uso da acupuntura em ratos obesos, mas em outros acupontos, sendo que o st21 ainda não tinha sido avaliado de forma isolada. Estes dados sugerem que o estímulo através da farmacopuntura com veneno de abelha no acuponto st21 pode promover ação ansiolítica podendo ter uma correlação com a perda de peso observada neste grupo no presente estudo.



**Figura 5. Teste de cruz elevado. Tempo no braço fechado.** \*Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) do grupo HDP21 quando comparado com os outros grupos.

### **Peso da gordura visceral**

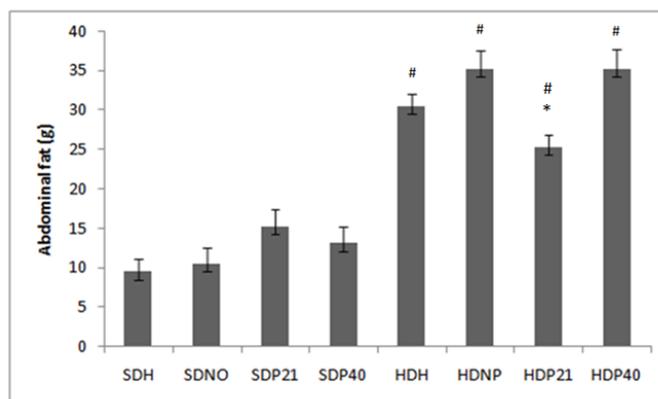
Após 3 meses de farmacopuntura e a realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e a gordura perirenal e abdominal pesada assim como o sangue foi retirado para as análises bioquímicas. Na pesagem da gordura visceral para observação do acúmulo de tecido adiposo, verificou-se que os grupos que receberam dieta hipercalórica exibiram significativamente maior acúmulo de gordura perireal ( $p < 0.001$ ) em relação aqueles que foram submetidos à dieta padrão (Figura 6). Do mesmo modo, o subgrupo HDP21 apresentou menor acúmulo desta gordura em relação aos demais subgrupos que também receberam dieta hipercalórica ( $p < 0.001$ ), corroborando os dados de redução de peso citado anteriormente (Figura 6).



**Figura 6. Gordura perirenal *post mortem*.** \*Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) do grupo HDP21 quando comparado com os outros grupos que receberam dieta hipercalórica. # Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) quando comparado com os outros grupos que receberam dieta padrão.

Há relatos da redução da gordura perireal após o uso da acupuntura (Wang et al, 2008; Kong et al, 2010; Pontes et al, 2015). Contudo, em nenhum trabalho foi avaliado o acuponto st21 de forma isolada, sendo este um resultado novo.

A quantidade de gordura abdominal também foi maior nos grupos que receberam dieta hipercalórica ( $p < 0.001$ ), em comparação com os subgrupos que receberam a dieta padrão. Contudo, o subgrupo HDP21 exibiu significativamente menores resultados em comparação com os demais grupos que também receberam a dieta hiperpalatável ( $p < 0.001$ ) (Figura 7).

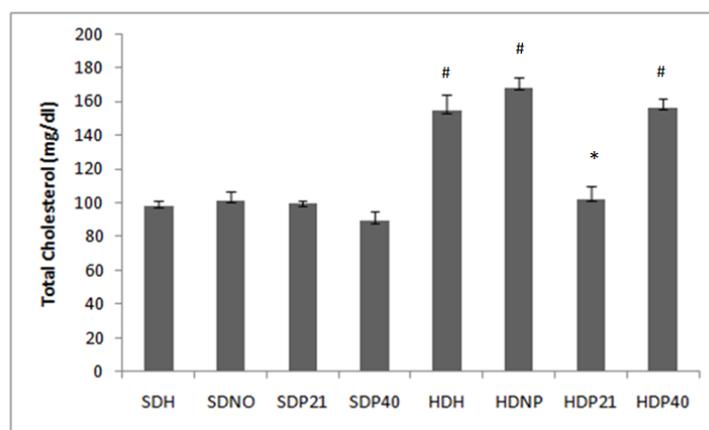


**Figura 7. Gordura abdominal *post mortem*.** \*Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) do grupo HDP21 quando comparado com os outros grupos que receberam dieta hipercalórica. # Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) quando comparado com os grupos que receberam dieta padrão.

O uso isolado da farmacupuntura no acuponto st21 não foi ainda avaliado em outros estudos. Contudo, os dados obtidos no presente trabalho corroboram com os resultados descritos por Kong et al (2010) e Wang et al (2008), em outros acupontos avaliados de forma isolada utilizando-se eletroacupuntura. Do mesmo modo, no presente estudo, os resultados indicaram que st40 não influenciou no peso da gordura perirenal e abdominal dos ratos analisados.

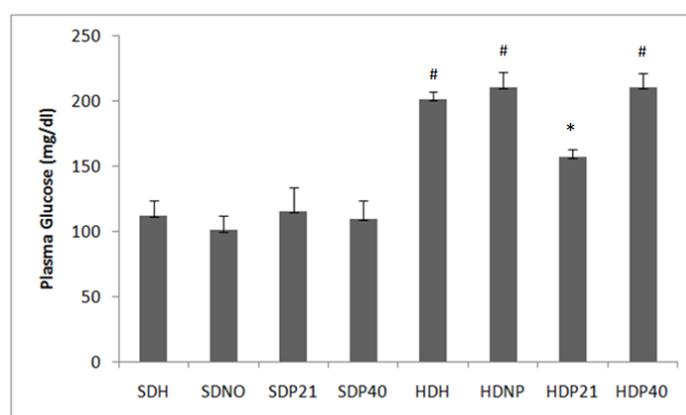
### Análises Bioquímicas

Após a realização da farmacupuntura, foi verificado que os grupos que receberam a dieta hipercalórica apresentaram maiores concentrações de colesterol plasmático em comparação aos grupos que receberam a dieta padrão. A exceção foi o grupo HDP21, que apresentou índices de colesterol menores que os demais grupos que receberam a dieta hipercalórica ( $p < 0.001$ ) e não diferiu dos níveis apresentados pelos grupos que receberam a dieta padrão (Figura 8).



**Figura 8. Colesterol Plasmático.** \*Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) do grupo HDP21 quando comparado com os outros grupos que receberam dieta hipercalórica. # Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) quando comparado com os grupos que receberam dieta padrão.

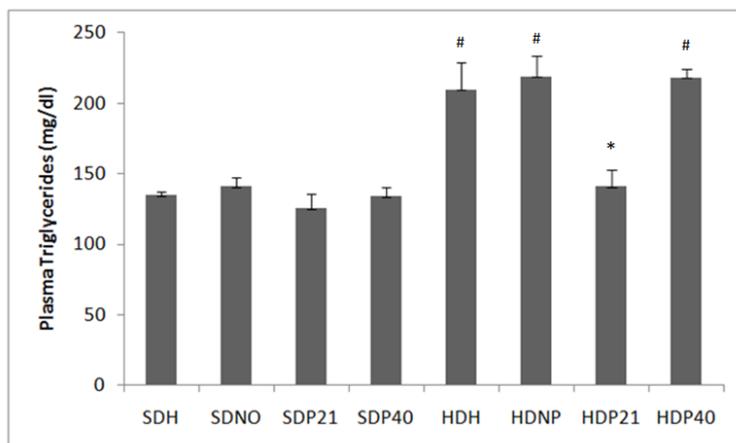
A glicose plasmática foi significativamente menor ( $p < 0.001$ ) nos subgrupos que receberam a dieta padrão e no grupo HDP21 em comparação aos demais grupos que receberam a dieta hipercalórica (Figura 9). Estes dados estão compatíveis também com a perda de peso corporal, que estão relacionados com a redução de níveis glicêmicos (Shen et al, 2014). Embora os pontos st21 e st40 não tenham sido estudados de forma isolada por outros autores, estudos com outros acupontos, como de El-Mekawy et al (2015), Pai et al (2009) e Pontes et al (2015), também exibiram redução da glicose plasmática.



**Figura 9. Glicose Plasmática** \*Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) do grupo HDP21 quando comparado com os outros grupos que receberam dieta hipercalórica #Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) quando comparado com os grupos que receberam dieta padrão.

Os níveis de triglicerídeos plasmáticos também foram significativamente menores ( $p < 0.001$ ) nos subgrupos que receberam a dieta padrão e no subgrupo HDP21 em comparação aos demais grupos que receberam a dieta hipercalórica (Figura 10). Não há estudos que avaliaram os níveis de triglicerídeos após acupuntura dos pontos st21 e st40 em ratos obesos. Contudo, outros estudos utilizando-se de eletroacupuntura em

outros acupontos exibiram resultados de redução dos triglicerídeos (Wang et al, 2008; Pontes et al, 2015).



**Figura 10. Triglicerídeos plasmático** \*Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) do grupo HDP21 quando comparado com os outros grupos que receberam dieta hipercalórica # Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) quando comparado com os grupos que receberam dieta padrão.

A dieta hipercalórica, portanto, interferiu nos índices de glicemia, colesterol e triglicerídeos plasmáticos. O modelo de obesidade apresentou resultados satisfatórios, uma vez que os animais que receberam a dieta hipercalórica exibiram estes parâmetros bioquímicos elevados, quando comparados com aqueles animais que receberam a dieta padrão. Estes resultados estão em conformidade com aqueles obtidos pelos modelos descritos por Rosini et al (2012), Burneiko et al (2006) e De Moraes et al (2008).

Neste trabalho verificou-se que a farmacupuntura no ponto st21 promoveu a redução do peso corporal e atividade ansiolítica nos animais estudados, o que pode ter auxiliado na redução dos parâmetros bioquímicos, como a glicose, colesterol e triglicerídeos plasmáticos. Como não houve redução do peso corporal para o grupo HDP40, do mesmo modo, as variáveis de colesterol, glicose e triglicerídeos plasmáticos não obtiveram alteração significativa em relação aos demais grupos que também

receberam a dieta hipercalórica, havendo inclusive neste grupo um efeito inverso, com a elevação do comportamento apetitivo.

### **Conclusões**

O presente estudo conclui que a farmacupuntura no ponto st21 apresentou resultados favoráveis na redução do peso corporal, gordura visceral e parâmetros bioquímicos como níveis de colesterol, glicose e triglicerídeos em ratos obesos. Do mesmo modo, diminuiu a ansiedade destes animais como mostrado pelo teste comportamental.

### **Conflito de interesses**

Os autores afirmam que não possuem conflito de interesses na publicação deste artigo. O apoio à pesquisa não desempenhou nenhum papel no projeto de estudo; coleta, análise e interpretação dos dados; na escrita do artigo; ou na decisão de enviar o artigo para publicação.

### **Contribuições dos autores**

MP fez a farmacupuntura, manejo dos animais, testes comportamentais e análises bioquímicas. JCC participou no design do estudo, realização dos testes estatísticos e coordenação do trabalho. Os autores leram e aprovaram o manuscrito.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

## Detalhes dos autores

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo, 90035-003 – Porto Alegre – RS, Brasil, e-mail JCC: [janice.coelho@ufrgs.br](mailto:janice.coelho@ufrgs.br); MCP: [riavet@yahoo.com.br](mailto:riavet@yahoo.com.br); phone: +55 51 33085550, fax: + 55 51 33085535.

## REFERÊNCIAS

- Battú CE, Rieger D, Loureiro S, Furtado GV, Bock H, Saraiva-Pereira ML, Pessoa-Pureur R, Gonçalves CA, Perry ML: Alterations of PI3K and Akt signaling pathways in the hippocampus and hypothalamus of Wistar rats treated with highly palatable food, **Nutr Neurosci.** 15(1):10-7, 2012.
- Belivani M, Dimitroula C, Katsiki N, Apostolopoulou M, Cummings M, Hatzitolios AI; Acupuncture in the treatment of obesity: a narrative review of the literature, **Acupunct Med**;31:88–97, 2013.
- Burneiko RC, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GM, Faine LA et al, Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem Toxicol.**;44(7):1167-72, 2006.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ: Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** (29): 1193–1205, 2005.
- Cho SH, Lee JS, Thabane L, Lee J. Acupuncture for obesity: a systematic review and meta-analysis. **Int J Obes.**;33:183–96, 2009.
- De Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol.**;29:8-12, 2008.
- El-Mekawy, HS; Eldeeb, AM; Ghareibb, HO, Effect of laser acupuncture combined with a diet-exercise intervention on metabolic syndrome in post-menopausal women, **J Adv Res. Sep**; 6(5): 757–763, 2015.
- Kong XJ, Gao L, Peng H, Shi X. Effects of electro-acupuncture on expression of obestatin in hypothalamus of rats with simple obesity. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.**;8(5):480–5, 2010.
- Kowalski GM, Bruce CR, The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents, **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 15;307(10):E859-71, 2014.
- Kwon K, Kim S, Kim C. **Pharmacopuncturology.** 2nd ed. Seoul: Elsevier; 2011.

Lacey, JM; Tershakovec, AM; Foster, GD, Acupuncture for the treatment of obesity: a review of the evidence, **International Journal of Obesity** 27,419–427, 2003.

Liang CM1, Hu H, Li YY., Acupuncture treatment of abdominal obesity patients by belt vessel (Daimai) regulating method, **Zhen Ci Yan Jiu**. Dec;37(6):493-6, 2012.

Lim CS, Park SK, Sun SH, Lee KH. Research on Korean Pharmacopuncture in South Korean since 2007. **J Pharmacopunct.**;17(4):15–21, 2014.

Lim CS, Park WP, Jang SB. Clinical studies of sweet bee venom to the effect of abdominal fat accumulation. **J Pharmacopunct.**;11(2):33–40, 2008.

Luna SP, Angeli AL, Ferreira CL, Lettry V, Scognamillo-Szabó M. Comparison of pharmacopuncture, aquapuncture and acepromazine for sedation of horses. **Evid Based Complement Alternat Med.**;5(3):267–72, 2008.

Maeso FM; Brito DB; Cabrera DLA. Leptin, estrogens and cancer. **Mini Rev Med Chem**; 6(8): 897-907, 2006.

Morrison, MJ; Beilharz JE; Maniama J; Reichelt AC; Westbrook RF; Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition, **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 10 December, 2014.

Noschang CG: **Cafeína e estresse: influências sobre o comportamento e sobre parâmetros bioquímicos avaliando estresse oxidativo no sistema nervoso central**, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em ciências biológicas: bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

Oliveira CD, Oliveira CM, de Macedo IC, Quevedo AS, Filho PR, Silva FR, Vercelino R, de Souza IC, Caumo W, Torres IL, **Hypercaloric diet modulates effects of chronic stress: a behavioral and biometric study on rats**. *Stress*. Sep;18(5):514-23, 2015.

Pai H, Tzeng C, Lee Y, Chang C, Lin J, Cheng J, Chang S, Increase in Plasma Glucose Lowering Action of Rosiglitazone by Electroacupuncture at Bilateral Zusanli Acupoints (ST.36) in Rats, **J Acupunct Meridian Stud**;2(2):147–151, 2009.

Pang T, Liu Z, Xu B. Clinical observation on obesity and hyperlipidemia of yang deficiency of spleen and kidney syndrome in female patients treated with warm acupuncture combined with auricularacupuncture **Zhongguo Zhen Jiu**. Jun;35(6):529-33, 2015.

Pontes, MC Heck LC, Coelho, JC, Behavioral and biochemical effects of pharmacopuncture (ST 36 and ST 25) in obese rats, **BMC Complementary and Alternative Medicine** (15):297, 2015.

Rosini, T.C.; Silva, A.S.R.; Moraes, C.; Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade, **Rev Assoc Med Bras**; 58(3):383-387, 2012.

Shen, W.; Wang, Y.; Lu, S.; Hong, H.; Fu, S.; He, S.; Li, Q.; Yue, J.; Xu, B.; Zhu, B.; Acupuncture promotes white adipose tissue browning by inducing UCP1 expression on DIO mice, **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14:501, 2014.

Strudwick MW, Hinks RC, Choy STB. Point injection as an alternative acupuncture technique—an exploratory study of responses in healthy subjects. **Acupunct Med.**;25(4):166–74, 2007.

Sun DY, Sun LH, Liang YL, Zhang SY, Xiao HL, Wu ZQ, Li WL, Li XH, Ma HL., Effect of electroacupuncture on lipid metabolism in male and female obesity rats, **Zhen Ci Yan Jiu.**, Jun;37(3):206-10, 2012.

Tian DR; Li XD; Wang F; Niu DB; He QH; Li, YS;Chang JK; Yang J; Han JS, Up-regulation of the expression of cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide by electroacupuncture in the arcuate nucleus of diet-induced obese rats, **Neuroscience letters**, 383 (1-2): 17-21, 2005.

Wang F, Tian, ED, Han, EJ, Electroacupuncture in the Treatment of Obesity, **Neurochem Res**, (33):2023–2027, 2008.

Zoth N, Weigt C, Laudénbach-Leschowski U, Diel P, Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity, **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, 2010.

## DISCUSSÃO

A obesidade, que resulta de excesso de ingestão crônica de energia em relação ao gasto energético (DESPRÉS, 2012), é um dos principais fatores de risco de saúde mundial e está associada a outros problemas de saúde, tais como diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer. Em indivíduos de alto risco, uma redução de 5-10% do peso corporal pode diminuir o risco de diabetes em 58%. Existem drogas e terapias anti-obesidade que têm sido limitadas pelo aparecimento de efeitos colaterais, incluindo alterações de humor, pensamentos suicidas e complicações gastrointestinais e cardiovasculares (PREISS et al, 2013)

Do mesmo modo, nem todos os pacientes tratados com a terapia conseguem alcançar o controle de peso adequado. Sendo assim, a obesidade tornou-se um desafio à medicina. A sua progressão é controlada pelas interações complexas entre os antecedentes genéticos, fatores ambientais, comportamentais e status socioeconômico. Em períodos de excesso de ingestão calórica, a energia é acumulada principalmente nos adipócitos de tecido adiposo branco, sob a forma de triacilgliceróis, que podem ser mobilizados quando necessário, liberando ácidos graxos na corrente sanguínea (WANG et al, 2011)

Desta forma, o uso da acupuntura como tratamento da obesidade é uma técnica muito promissora. O resultado da acupuntura no tratamento da obesidade pode ser verificado em diversos trabalhos, inclusive no presente estudo.

Um exemplo é uma revisão sistemática de meta-análise que incluiu 29 ensaios clínicos randomizados, sendo que, a acupuntura foi indicada ser mais eficaz do que o tratamento com medicação, tanto em termos de redução do peso corporal (média de redução = 1.90 kg; 95% CI: 1,66-2,13 kg) como no risco relativo do tratamento (risco relativo = 1,13; 1,04-1,22) (CHO et al, 2009).

Outra revisão sistemática de oito ensaios clínicos, incluindo 1017 participantes, que avaliaram a eficácia da acupuntura, revelou que a acupuntura foi um tratamento complementar de eleição para a obesidade simples, que é quando ocorre um desequilíbrio entre a ingestão de calorias e o gasto energético (LIN et al, 2009).

Em uma revisão sistemática mais recente da medicina chinesa e da acupuntura, um total de 44 ensaios clínicos randomizados foram examinados. De acordo com a análise agrupada, a modificação de estilo de vida e o uso de placebo foram menos eficazes do que o uso da acupuntura em termos de redução de peso e IMC. Comparado com drogas anti-obesidade (Orlistate e Sibutramina), a acupuntura exibiu resultados igualmente positivos, com um número reduzido de efeitos colaterais e recidivas (SUI et al, 2012).

Existem diversos estudos que comprovam a eficácia das diferentes técnicas de acupuntura, em pontos específicos, para o tratamento da obesidade. Verifica-se que o uso de eletroacupuntura se destaca em número em relação às demais técnicas (TIAN et al, 2005; TIAN et al, 2006; CABIOGLU et al, 2008; CABIOGLU & ERGENE, 2005, GAO et al, 2011; KIM et al, 2006; KONG et al, 2010, LEE et al, 2006; PAI et al, 2009). Há relatos com acupuntura tradicional auricular, laser e implantação de catgut (KIM et al, 2001; EL-MEKAWY et al, 2015; ABDI et al, 2012; GAO et al, 2011).

Entretanto, existem poucos estudos sobre o uso da farmacopuntura com veneno de abelha na obesidade, como aquele realizado na presente análise (KWON et al, 2011; LIM et al, 2008). Contudo, ainda não havia sido estudada a aplicação da farmacopuntura em ratos obesos utilizando-se o veneno de abelha.

Cabe enfatizar que a farmacopuntura apresenta ação potencializada, uma vez que se beneficia da ação cortante da acupuntura tradicional com agulhas (BONTA et al, 2002) adicionada à ação mais prolongada do produto inoculado (LUNA et al, 2008).

Os efeitos da farmacopuntura que utiliza o veneno de abelha potencializa o estímulo. A ação inflamatória em ponto específico permite uma ação prolongada do efeito do estímulo (LUNA et al, 2008). Por isto, escolheu-se a técnica de farmacopuntura utilizando-se o veneno de abelha para o desenvolvimento do presente estudo.

Para o estudo da obesidade, foi implantado um modelo de obesidade, no intuito de promover ganho de peso significativo do grupo obeso em relação ao controle. Utilizou-se para tanto, uma dieta hipercalórica e hiperpalatável, utilizando-se leite condensado e açúcar como principais fontes de glicerídeos e óleo como fonte de gordura, baseada em BATTÚ et al (2012). A partir desta dieta empregada foi possível a elevação do peso corporal do grupo que se alimentou com dieta hipercalórica significativamente maior em comparação aos que receberam a dieta padrão. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, como o de ROSINI et al (2012) e WHITE et al (2013). Nos estudos descritos na literatura com modelo de obesidade em ratos, observa-se o uso de sacarose e lipídeos em excesso. Nestas, também são usados ingredientes hiperpalatáveis, como: chocolate, bacon, salame, queijo, manteiga, óleo de soja, banha de porco, dentre outros (ROSINI et al, 2012). O uso da dieta hipercalórica apresentada no presente estudo também é hiperpalatável, devido ao uso do leite condensado como ingrediente. A dieta apresentada em nosso estudo favorece o consumo em relação a outras dietas hipercalóricas, que não são hiperpalatáveis, como descrito por WHITE et al (2013).

O modelo de obesidade utilizado em nosso trabalho foi eficaz, pois permitiu maior ganho de peso dos animais que receberam a dieta hipercalórica em relação aos animais que receberam a dieta padrão.

A partir do modelo de obesidade foi possível testar a eficácia do tratamento com a farmacopuntura. Neste estudo utilizamos os seguintes pontos de acupuntura: st21, st25, st36 e st40. Na literatura, diversos estudos utilizam o acuponto st36 em estudos de obesidade (KONG et al, 2010; CABIOGLU et al, 2008; WANG et al, 2008, PAI et al, 2009, KIM et al, 2006, SHEN et al, 2014), mas há poucos relatos com os demais pontos estudados neste trabalho (st21, st25 e st40).

Foi observado no presente estudo que a farmacopuntura utilizando-se o veneno de abelha nos pontos st36, st25 e st21 reduziu o peso corporal e a gordura abdominal e perirenal dos animais obesos. Na literatura, só existem estudos de eletroacupuntura em pontos semelhantes aos por nós utilizados. KONG et al (2010) destacam que com o uso da eletroacupuntura em ratos obesos nos pontos st36 e st25 foi observada a perda de peso e redução do peso da gordura abdominal, como aquela que observamos no presente estudo. Contudo, CABIOGLU et al (2008) realizaram estudo em pessoas obesas, usando eletroacupuntura com os pontos st36 e st25, dentre outros, com redução não significativa do peso corporal.

WANG et al (2008) utilizando eletroacupuntura no ponto st36 observaram resultados positivos na redução do peso corporal, redução de gordura, redução de glicose e colesterol plasmático, além de outros benefícios metabólicos.

TSENG et al (2015) destacam efeitos benéficos do uso do laser nos pontos st36, st40 e st25 para o tratamento da obesidade na clínica médica. LEE et al (2006) utilizou st25 dentre outros pontos para o tratamento da obesidade com sucesso na redução do peso corporal em humanos. Contudo, os ratos obesos tratados no estudo desenvolvido por SHEN et al (2014) com laserterapia nos acupontos st36 e st44 não reduziram o peso significativamente em relação ao grupo controle.

Observando-se os resultados apresentados na literatura, podemos concluir que ocorre uma redução de peso corporal e abdominal quando empregada a acupuntura principalmente no ponto st36, tanto em ratos quanto em humanos, mas não há relato quanto a farmacopuntura. Esta, quando comparada com os resultados apresentados pelos autores acima, parece ser mais eficaz tanto no ponto st36 quanto em outros pontos utilizados em nosso trabalho. Desta forma, a farmacopuntura torna-se um tratamento de eleição para o tratamento da obesidade em relação a acupuntura tradicional e a eletroacupuntura, muito estudada anteriormente.

Quanto aos parâmetros bioquímicos analisados no presente trabalho, observamos que houve uma redução de triglicerídeos, glicose e colesterol plasmático, nos ratos obesos submetidos a farmacopuntura empregada nos pontos st36, st25 e st21. Contudo, a farmacopuntura do ponto st40 não exibiu esta redução nos parâmetros bioquímicos, sendo que, os níveis do grupo obeso que não recebeu acupuntura ou recebeu apenas a manipulação se igualaram aos níveis do grupo que recebeu o estímulo no acuponto st40. Verifica-se que na literatura, os parâmetros bioquímicos foram analisados apenas em estudos em que se aplicou uma associação dos acupontos, conforme descrito a seguir, sendo que, o efeito de cada acuponto pode ser avaliado de forma individual apenas no presente estudo, exceto para o acuponto st36 (PAI et al, 2009).

EL-MEKAWY et al (2015), em um estudo em mulheres na menopausa obesas, utilizando a estimulação a laser nos pontos cv 4,cv 9,cv 12,st25,st36,sp 6 e st40 durante 12 semanas, observaram apenas uma redução significativa nos níveis de colesterol, sendo que os níveis de glicose e triglicerídios permaneceram inalterados.

Outro estudo (PAI et al, 2009) destacou que o uso da eletroacupuntura no st36 reduziu a glicose plasmática devido ao aumento da insulina plasmática.

SHEN et al (2014), observaram também que os níveis de colesterol e de triglicerídeos estavam significativamente elevados em ratos obesos após o consumo elevado de gordura na dieta, durante oito semanas. Contudo, após cinco semanas de tratamento com o uso de eletroacupuntura houve uma reversão completa e estes níveis voltaram ao normal. Estes dados sugerem, assim como em nosso estudo utilizando a farmacopuntura, que a electroacupuntura reduziu o teor de lipídios e colesterol em ratos obesos.

Há mecanismos possíveis pelos quais a acupuntura possa estar contribuindo na redução de peso em ratos obesos (EstEGHAMATI et al, 2015). Em primeiro lugar, é sugerido que a acupuntura pode regular neuropeptídeos relacionados com a obesidade, bem como adipocitoquinas no depósito de gordura. Em segundo lugar, a acupuntura pode estar envolvida na regulação do eixo córtex hipotálamo-pituitária-adrenal e eixo córtex simpático-adrenal. Em terceiro lugar, uma série de estudos têm observado uma redução nos triglicerídeos (CABIOGLU & ERGENE, 2005), no LDL (ABDI et al, 2012), e no colesterol total (CABIOGLU & ERGENE, 2005; ABDI et al, 2012) com acupuntura e, assim, mostrando que ela pode exercer efeitos hipolipemiantes. Em quarto lugar, uma vez que níveis elevados de bacteróides no intestino foram observado em pacientes obesos (ABDALLAH et al, 2011), um mecanismo da acupuntura na perda de peso pode envolver a redução destes bacteroides. Desta forma, estudos posteriores devem ser desenvolvidos no intuito de determinar os mecanismos fisiológicos envolvidos na perda de peso com a aplicação da acupuntura em indivíduos obesos.

Os efeitos comportamentais da aplicação da farmacopuntura foram explorados no presente estudo, mas não há relatos dos mesmos em trabalhos anteriores. Para análise dos efeitos comportamentais, diversos métodos de análise da ansiedade e do comportamento alimentar são empregados através de técnicas já consagradas no estudo

do comportamento de ratos. Desta forma, foram escolhidos os testes de cruz elevada, que avaliaram a ansiedade (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005), onde há correlação com o aumento do comportamento alimentar e o teste de comportamento alimentar propriamente dito (NOSCHANG, 2009).

CAMPOS et al (2013) destacam o mecanismo envolvido no teste de cruz elevada, que avalia a questão da ansiedade. Eles descreveram que em roedores, situações de conflito podem ser gerados por estados motivacionais opostos induzidos por situações de aproximação e prevenção. Por exemplo, comportamentos de aproximação podem ser observados em novos ambientes, o que reflete uma unidade exploratória geral incondicional, ou na procura de respostas que foram previamente condicionadas.

Verificou-se no presente estudo que, ao estimular-se o ponto st21, ocorreu um efeito ansiolítico, o que não foi observado nos demais acupontos utilizados. Desta forma, este efeito pode ter potencializado a ação da perda de peso nos animais do grupo HDP21.

Do mesmo modo, o teste de comportamento alimentar avalia a questão do apetite alimentar, avaliando o tempo de latência de chegada ao alimento e o número de *food loops* consumidos pelos animais de cada grupo (NOSCHANG, 2009). No presente estudo verificou-se que o estímulo ao acuponto st40 aumentou o apetite alimentar, uma vez que reduziu a latência de chegada ao alimento em comparação ao grupo controle obeso e aumentou o número de *food loops* consumidos, também comparado com o mesmo grupo. Este resultado condiz com a ausência de perda de peso no grupo obeso que recebeu a farmacopuntura no acuponto st40.

O grupo obeso que recebeu o estímulo no acuponto st36 aumentou o tempo de latência à chegada ao alimento e aqueles estimulados nos acupontos st36 e st25

reduziram o consumo de *front loops* em relação ao controle. Estes dados sugerem que ocorreu uma redução do comportamento apetitivo nestes grupos, que condizem com a perda de peso observada após o tratamento.

Não há estudos prévios que utilizam esta metodologia para avaliação da obesidade e também para verificar a ação da acupuntura no comportamento apetitivo. Apesar destes resultados serem promissores, é importante discutir e comparar a metodologia e a qualidade metodológica deste com os demais estudos revisados na literatura. Não haviam relatos em ratos obesos submetidos à farmacopuntura com veneno de abelha. Quase não existem análises com os pontos de forma isolada. Não há registro de avaliação comportamental.

Como perspectivas, é importante que sejam realizados estudos com tratamento a longo prazo com a mesma metodologia. Como se trata de uma análise que não há avaliação precedente, são necessários novos estudos, para que sirvam como fonte de comparação, utilizando a mesma metodologia de farmacopuntura com veneno de abelha e nos pontos escolhidos de forma isolada.

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que:

O modelo de obesidade aplicado permitiu que os ratos submetidos à dieta hipercalórica obtivessem um peso maior em comparação com os ratos não submetidos a esta dieta, mostrando que o modelo foi adequado para ser empregado em estudos de obesidade.

O emprego da farmacopuntura com veneno de abelha em ratos obesos apresentou redução do peso corporal, utilizando-se os pontos st36, st25 e st21, ao longo de 3 meses de tratamento.

O peso do tecido adiposo foi significativamente menor nos grupos obesos que receberam a farmacopuntura com veneno de abelha nos acupontos st36, st21 e st25, sendo que, nos acupontos st36, st21 e st25 observou-se redução do tecido adiposo perirenal e nos acupontos st36 e st21 redução do tecido adiposo abdominal.

A farmacopuntura reduziu os níveis de triglicérides, glicose e colesterol plasmático, quando empregada nos pontos st36, st25 e st21, contudo, não foi observada alteração no ponto st40 de ratos obesos.

O comportamento alimentar apetitivo está reduzido na aplicação da farmacopuntura utilizando-se os acupontos st36 e st25, contudo, está aumentado o acuponto st40 em ratos obesos.

Há uma atividade ansiolítica ao estimular, através do uso de farmacopuntura com veneno de abelha, o acuponto st21, uma vez que o estímulo deste ponto promoveu menor tempo no braço fechado no teste de cruz elevado em comparação com os demais grupos.

## **PERSPECTIVAS**

A partir do presente estudo é possível traçar as seguintes perspectivas:

Avaliar outros acupontos para a farmacopuntura no tratamento da obesidade, bem como, a associação de acupontos.

Analisar os marcadores da inflamação, que estão elevados na obesidade e que podem estar reduzidos nos ratos obesos tratados com farmacopuntura.

## REFERÊNCIAS

ABDALLAH, N, RAGAB SH, ABD ELBAKY A, SHOEIB AR, ALHOSARY Y, FEKRY D. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Arch Med Sci.**;7(3):501–7, 2011.

ABDI H, ZHAO B, DARBANDI M, GHAYOUR-MOBARHAN M, TAVALLAIE S, RAHSEPAR AA, et al. The effects of body acupuncture on obesity: anthropometric parameters, lipid profile, and inflammatory and immunologic markers. **ScientificWorldJournal.** ;2012:603539, 2012.

AMARILES, Pedro GONZALEZ, Laura I. GIRALDO, Nubia A., Prevalence of Self-Treatment with Complementary Products and Therapies for Weight Loss: A Randomized, Cross-Sectional study in Overweight and Obese Patients in Colombia, **Current Therapeutic Research**, 67(1):66-78, 2006.

BATTÚ CE, RIEGER D, LOUREIRO S, FURTADO GV, BOCK H, SARAIVA-PEREIRA ML, PESSOA-PUREUR R, GONÇALVES CA, PERRY ML: **Alterations of PI3K and Akt signaling pathways in the hippocampus and hypothalamus of Wistar rats treated with highly palatable food**, *Nutr Neurosci.*2012 **15**(1):10-7.

BONTA, IL, Acupuncture beyond the endorphin concept? **Medical Hypotheses** 58(3), 221 -224, 2002.

BURNEIKO RC, DINIZ YS, GALHARDI CM, RODRIGUES HG, EBALD GM, FAINE LA et al, Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem Toxicol.**;44(7):1167-72, 2006.

CABIOGLU, Mehmet T.; GÜNDOĞAN, Nimet; ERGENE, Neyhan, The Efficacy of Electroacupuncture Therapy for Weight Loss Changes Plasma Lipoprotein A, Apolipoprotein A and Apolipoprotein B Levels in Obese Women, **The American Journal of Chinese Medicine**, 36 (6), 1029–1039, 2008.

CABIOGLU M, ERGENE N. Electroacupuncture Therapy for Weight Loss Reduces Serum Total Cholesterol, Triglycerides, and LDL Cholesterol Levels in Obese Women. **The American Journal of Chinese Medicine.**;33(04):525–33, 2005.

CAMPOS, Alline C. et al . Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo , v. 35,supl. 2,p. S101-S111, 2013.

CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev.**;29:1193–205, 2005.

CESARETTI, M.L.R. e JUNIOR, O.K.; Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas, **Arq Bras Endocrinol Metab**, 50(2): 190-197, 2006 .

CHO SH, LEE JS, THABANE L, LEE J. Acupuncture for obesity: a systematic review and meta-analysis. **Int J Obes (Lond).**;33(2):183–96, 2009.

COX RD, CHURCH CD. Mouse models and the interpretation of human GWAS in type 2 diabetes and obesity. **Dis Model Mech.**;4(2):155-64, 2011.

DE ANGELIS, R.C. **Riscos e prevenção da obesidade**. Ed. Atheneu, 2003.

DE MORAES C, CAMARGO EA, ANTUNES E, DE NUCCI G, ZANESCO A. Reactivity of mesenteric and aortic rings from trained rats fed with high caloric diet. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**;147(3):788-92, 2007.

DE MORAES C, DAVEL AP, ROSSONI LV, ANTUNES E, ZANESCO A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol.**;29:8-12, 2008.

DESPRÉS JP. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. **Circulation.** 2012;126(10):1301–13, 2012.

DUARTE, A.C.G.O.; FONSECA, D.F.; MANZONI, M.S.J.; SOAVE, C.F.; SENE-FIORESE, M.; DAMASO, A.R.; CHEIK, N.C.; Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos, **Rev Nutr**, 19(3): 341-348, 2006.

EL-MEKAWY, HS; ELDEEB, AM; GHAREIBB, HO, Effect of laser acupuncture combined with a diet-exercise intervention on metabolic syndrome in post-menopausal women, **J Adv Res.** Sep; 6(5): 757–763, 2015.

ESTEGHAMATI A, MAZAHERI T; RAD MV; NOSHAD, S; Complementary and Alternative Medicine for the Treatment of Obesity: A Critical Review, **Int J Endocrinol Metab.** April; 13(2): e19678, 2015.

FEAKINS RM, Obesity and metabolic syndrome: pathological effects on the gastrointestinal tract. **Histopathology.**2015.

GAO L, KONG XJ, SHI X., Effects of electroacupuncture and acupoint catgut-embedding on mRNA expression of lipid metabolism gene PPAR-gamma and related lipase of rats with simple obesity, **Zhongguo Zhen Jiu.** 31(6):535-8, 2011.

GRECH A, ALLMAN-FARINELLI M, A systematic literature review of nutrition interventions in vending machines that encourage consumers to make healthier choices. **Obes Rev. Dec**;16(12):1030-41, 2015.

GUERRA RL, PRADO WL, CHEIK NC, VIANA FP, BOTERO JP, VENDRAMINI RC et al. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. **Lipids Health Dis.**;2;6-16, 2007.

JIA, L, ZHICHENG, L. **Clinical Experience in Acupuncture Treatment of Obesity.** *Journal of Tradicional Chinese Medicine* 19 (1): 48-51, 1999.

JONES A, LEMMA LC, ROBINSON E, CHRISTIANSEN P, NOLAN S, TUDUR-SMITH C, FIELD M. Inhibitory control training for appetitive behaviour change: a meta-analytic investigation of mechanisms of action and moderators of effectiveness. **Appetite.** Nov 16, 2015.

KIM, E.; KIM, Y.; JANG, M.H.; LIM, B.V.; KIM, Y.J.; CHUNG, J.H.; KIM, C.J.; Auricular acupuncture decreases neuropeptide Y expression in the hypothalamus of food-deprived Sprague-Dawley rats, **Neuroscience letters**, 307 (2): 113-116, 2001.

KIM, S.K.; LEE, G.; SHIN, M.; HAN, J.; MOON, H.J.; PARK, J.H.; KIM, K.J.; HA, J.; PARK, D.S.; MIN, B.; The association of serum leptin with the reduction of food intake and body weight during electroacupuncture in rats, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 83, 145–149, 2006.

KONG XJ, GAO L, PENG H, SHI X., Effects of electro-acupuncture on expression of obestatin in hypothalamus of rats with simple obesity, **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**. 8(5):480-5, 2010.

KWON K, KIM S, KIM C. **Pharmacopuncturology**. 2nd ed. Seoul: Elsevier; 2011.

LACEY, J.M.; TERSHAKOVEC, A.M.; FOSTER, G.D.; Acupuncture for the treatment of obesity: a review of the evidence, **Internacional Journal of Obesity**, 27: 419-27, 2003.

LEE JD, PARK HJ, CHAE Y, LIM S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med*;2: 79–84, 2005.

LEE MS, KIM JH, LIM H, SHIN B, Effects of abdominal electroacupuncture on parameters related to obesity in obese women: A pilot study, **Complementary Therapies in Clinical Practice**, 12, 97–100, 2006.

LENT, Roberto, **Cem bilhões de neurônios**, São Paulo, Editora Atheneu, 2004, 698p.

LIM CS, PARK WP, JANG SB. Clinical studies of sweet bee venom to the effect of abdominal fat accumulation. **J Pharmacopunct**;11(2):33–40, 2008.

LIN XM, LI B, DU YH, XIONG J, SUN P. Systematic evaluation of therapeutic effect of acupuncture for treatment of simple obesity, *Zhongguo Zhen Jiu*. 2009;29(10):856–60, 2009.

LITSCHER G. The application of bioengineering of acupuncture to the treatment of diabetes, insulin resistance and obesity. **Diabetes Obes Metab.**;12(7):553-4, 2010.

LUMENG, Carey N. & SALTIEL, Alan R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease, **J. Clin Invest.**;121(6):2111–2117, 2011.

LUNA SPL, ANGELI, AL; FERREIRA, CL; LETTRY, V.; SZABO, MS; Comparison of Pharmacopuncture, Aquapuncture and Acepromazine for Sedation of Horses, **eCAM**; 5(3)267–272, 2008.

LUNDBERG, G.D. (2005). How to prevent obesity in developed countries -- part 2. **Med. Gen. Med.**; 7(1): 57-63, 2005.

MANN, Felix, **Acupuntura: a arte chinesa de curar**, Editora Hemus, 1994, 208.p.

MAZZONI, R.; MANNUCCI, E.; RIZZELLO, S.M.; RICCA, V.; ROTELLA, C.M.; Failure of acupuncture in the treatment of obesity: a pilot study, **Eat Weight**, 4(4): 198-202, 1999.

NOSCHANG CG. **Cafeína e estresse**: influências sobre o comportamento e sobre parâmetros bioquímicos avaliando estresse oxidativo no sistema nervoso central. Porto Alegre: Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em ciências biológicas: bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). **Prevenindo e controlando a epidemia global**.Ed. Roca, 2004.

PAI H, TZENG C, LEE Y, CHANG C, LIN J, CHENG J, CHANG S, Increase in Plasma Glucose Lowering Action of Rosiglitazone by Electroacupuncture at Bilateral Zusanli Acupoints (st.36) in Rats, **J Acupunct Meridian stud**;2(2):147–151, 2009.

PREISS K, BRENNAN L, CLARKE D. A systematic review of variables associated with the relationship between obesity and depression. **Obes Rev**;14:906–18, 2013.

ROSINI, T.C.; SILVA, A.S.R.; MORAES, C.; Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade, **Rev Assoc Med Bras**; 58(3):383-387, 2012.

SHEN, EY, HSIEH CL, CHANG YH, LIN JG., Observation of sympathomimetic effect of ear acupuncture stimulation for body weight reduction., **Am J Chin Med.**;37(6):1023-30, 2009.

SHEN, W.; WANG, Y.; LU, S.; HONG, H.; FU, S.; HE, S.; LI, Q.; YUE, J.; XU, B.; ZHU, B.; Acupuncture promotes white adipose tissue browning by inducing UCP1 expression on DIO mice, **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14:501, 2014.

SHIRAIISHI, T.; ONOE, M.; KOJIMA, T.A.; KAGEYAMA, T.; SAWATSUGAWA, S.; SAKURAI, K.; YOSHIMATSU, H.; SAKATA, T.; Effects of bilateral auricular acupuncture stimulation on body weight in healthy volunteers and mildly obese patients, **Exp Biol Med**, 228: 1201-1207, 2003.

SUI Y, ZHAO HL, WONG VCW, BROWN N, LI XL, KWAN AKL, et al. A systematic review on use of Chinese medicine and acupuncture for treatment of obesity. **Obes Rev.**;13(5):409–30, 2012.

TIAN, D.R.; LI, X.D.; WANG, F.; NIU, D.B.; HE, Q.H.; LI, Y.S.;CHANG, J.K.; YANG, J.; HAN, J.S.; Up-regulation of the expression of cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide by electroacupuncture in the arcuate nucleus of diet-induced obese rats, **Neuroscience letters**, 383 (1-2): 17-21, 2005.

TIAN, N.; WANG, F.; TIAN, D.; ZOU, Y.; WANG, S.W.; GUAN, L.L.; SHI, Y.S.; CHANG, J.K.; YANG, J.; HAN, J.S.; Electroacupuncture suppresses expression of gastric ghrelin, and hypothalamic NPY in chronic food restricted rats, **Peptides** 27, 2313 – 2320, 2006.

TSCHOP M, HEIMAN ML. Rodent obesity models: an overview. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.**;109(6):307-19, 2001.

TSENG C, TSENG A, CHANG C, Effect of laser acupuncture on obesity: study protocol for a randomized controlled trial, **Trials**, 16:217, 2015.

WANG F, TIAN, ED, HAN, EJ, Electroacupuncture in the Treatment of Obesity, **Neurochem Res**, (33):2023–2027, 2008.

WANG YC, MCPHERSON K, MARSH T, GORTMAKER SL, BROWN M: Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. **Lancet**, 378(9793):815–825, 2011.

WEN, Tom Sintan; **Acupuntura clássica chinesa**, São Paulo, Editora Clássica Cultrix Ltda, 1985.

WHITE, P.A.S.; CERCATO, L.M.; ARAÚJO, J.M.D.; SOUZA, L.A.; SOARES, A.F.; BARBOSA, A.P.O.; NETO, J.M.R.; MARÇAL, A.C.; MACHADO, U.F.; CAMARGO, E.N.; SANTOS, M.R.V.; BRITO, L.C.; Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose, **Arq Bras Endocrinol Metab**;57/5, 2013.