



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

PORFÍRIO CEZAR PASSOS ACIOLI

**EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO DECORRENTES DA
TORÇÃO/DESTORÇÃO DO TESTÍCULO EM RATOS**

**FORTALEZA
2014**

PORFÍRIO CEZAR PASSOS ACIOLI

**EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO DECORRENTES DA
TORÇÃO/DESTORÇÃO DO TESTÍCULO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho
Guimarães

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco das
Chagas Medeiros

**FORTALEZA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A164e Acioli, Porfirio Cezar Passos.
Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo e a inflamação decorrentes da torção/destorção do testículo em ratos / Porfirio Cezar Passos Acioli. – 2014.
67 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2014.
Orientação: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros.
1. Torção do Cordão Espermático. 2. Isquemia. 3. Traumatismo por Reperusão. 4. Eletroacupuntura. 5. Ratos

PORFÍRIO CEZAR PASSOS ACIOLI

**EFETOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO DECORRENTES DA
TORÇÃO/DESTORÇÃO DO TESTÍCULO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Cirurgia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará (UFC)
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Cirurgia.

Aprovada em ___ / ___ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Antonio Wilson Vasconcelos
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães
Universidade Federal do Ceará (UFC) (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães, pelo incentivo, ensinamentos, acolhimento, confiança e paciência, tornando, assim, possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros, meu co-orientador, pelo incentivo para realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, da Universidade Federal do Ceará pelo apoio aos que buscam aprofundar seus conhecimentos científicos.

Ao Prof. Dr. Roberto Wagner Bezerra de Araujo, Professor Associado II do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará pelo apoio técnico e avaliação histopatológica dos tecidos coletados no experimento.

À discente Andréa de Oliveira Albuquerque, do Curso de Enfermagem da Universidade Federal do Ceará e bolsista de iniciação científica do CNPq, pela valiosa contribuição na organização e controle dos tempos de duração das várias fases do experimento e pela tabulação dos dados coletados.

Ao discente Isaac Beviláqua de Albuquerque Guimarães, aluno do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia pela ajuda na imobilização, posicionamento e cuidado dos animais durante o experimento.

À Prof^a. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu do Laboratório de Patologia Celular e Molecular da UFC, à Dra. Ana Paula Nunes Negreiros, responsável pelo Laboratório de Patologia Bucal da UFC, ao Sr. Alceu Machado Sousa, técnico em Histologia e Biologia Molecular da UFC e à estudante Antônia de Fátima Soares Moreira, bolsista de iniciação científica, pela inestimável ajuda na preparação das laminas histopatológicas.

Aos Sr. Francisco Evanir Gonçalves de Lima, técnico da Unidade de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará e Bento Francisco de Oliveira, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade e contribuição.

Às Sras. Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Fontenele, do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela eficiência, atenção e dedicação sempre dispensadas aos alunos da pós-graduação.

A todos os colegas da pós-graduação pelo estímulo e por compartilharem comigo essa jornada de anseios e expectativas para a realização deste projeto de pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução deste trabalho.

"O temor do SENHOR é o princípio do conhecimento; os loucos desprezam a sabedoria e a instrução."

Provérbios.1:7

RESUMO

EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO DECORRENTES DA TORÇÃO/DESTORÇÃO DO TESTÍCULO EM RATOS. PORFÍRIO CEZAR PASSOS ACIOLI. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação (*Stricto Sensu*) em Cirurgia. Universidade Federal Ceará. Professor: Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

Os efeitos da Acupuntura (Ac) e da Eletroacupuntura (EAc) foram avaliados utilizando um modelo experimental de isquemia/reperfusão (I/R) do testículo em rato. Na Medicina Tradicional Chinesa, essas formas de terapias são utilizadas na promoção do equilíbrio orgânico, mediante estímulo de vias nervosas produtoras de neurotransmissores específicos, resultando em uma resposta anti-inflamatória, analgésica e reguladora autonômica. No experimento, 30 ratos Wistar machos, peso médio 279,6 g (230-300g) foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos. Todos os ratos receberam anestesia intraperitoneal (Cetamina 90mg/Kg+Xilazina 10 mg/Kg), no início do experimento, antes da destorção e ao término do experimento. O grupo G1 foi submetido à torção do testículo (TT), duas voltas completas (720°) com imediata destorção (sham). Os demais grupos (G2IR, G3Ac, G4EAc2 e G5EAc10) foram submetidos à TT durante 3 horas, seguido de destorção e reperfusão durante 4 horas. Cinco minutos antes da destorção procedeu-se à aplicação da Ac (G3Ac) ou EAc (G4EAc2, G5EAc10), sob anestesia por 5 minutos. Findo esse tempo realizou-se à destorção do testículo e permitiu-se a reperfusão por 4 horas. Ao término foram coletadas amostras de sangue arterial e de tecido (testículo direito). Parâmetros avaliados incluíram determinação de Glutathione (GSH) reduzida, Malonaldeído (MDA), Mieloperoxidase (MPO) e histopatologia do testículo. A EAc (2 e 10Hz) promoveu aumento significativo nas concentrações de GSH no plasma e no testículo dos ratos dos grupos G4-G5, comparados ao controle G1. A Ac não alterou significativamente as concentrações de GSH no grupo G3 comparado ao G1. Houve aumento significativo do MDA tecidual nos grupos G4-G5 e do MDA plasmático em todos os grupos, comparados ao G1. A EAc (2Hz e 10Hz) diminuiu significativamente a atividade da MPO no testículo dos ratos submetidos à torção do testículo (grupos G4-G5), comparados ao controle G1. Não foram observadas diferenças significantes na atividade da MPO comparando-se os grupos G4-G5 ao grupo G1. Conclui-se que a aplicação de EAc de 2/10Hz promove proteção local e sistêmica sobre o estresse oxidativo e diminuição da resposta inflamatória em ratos saudáveis submetidos a torção/destorção do testículo.

Descritores: Torção do Cordão Espermatóico. Isquemia. Traumatismo por Reperfusão. Eletroacupuntura. Ratos.

ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECTS OF ACUPUNCTURE AND ELECTROACUPUNCTURE ON OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION DUE TO TESTIS TORSION/DETORSION IN RATS. Master's degree. Post-graduation Program (*Stricto Sensu*) in Surgery. Federal University of Ceará. Professor: Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

The effects of acupuncture (Ac) and Electroacupuncture (EAc) were evaluated using an experimental rat model of ischemia/reperfusion (IR) of the testis. In Traditional Chinese Medicine, these forms of therapies are used in the promotion of organic equilibrium, through stimulation of specific neurotransmitters producing nerve pathways, resulting in an analgesic and anti-inflammatory autonomic regulatory response. In the study, 30 male Wistar rats, 279.6g average weight (230-300 g) were randomly divided into five groups. All rats received intraperitoneal anesthesia (Ketamine 10 90mgKgXilazina mgKg), at the beginning of the experiment, before the detorsion and at the end of the experiment. G1 group was submitted to torsion of the testicle (TT), two complete turns (720°) with immediate detorsion (sham). The other groups (G2IR, G3Ac, G4EAc2 and G5EAc10) were submitted to TT during 3 hours, followed by detorsion and reperfusion during 4 hours. Five minutes before the detorsion Ac (G3Ac) or EAc (G4EAc2, G5EAc10) was applied, under anesthesia, for 5 minutes. Next the testis was detorsioned and reperfused for 4 hours. At the end blood samples the right testicle were collected. Evaluated parameters included determination of reduced Glutathione (GSH), Malonaldehyde (MDA), Myeloperoxidase (MPO) and histopathology of the testicle. EAc (2 and 10 Hz) promoted significant increase in concentrations of GSH in plasma and in the rat testis of G4-G5, compared to the control G1. Ac did not alter significantly the concentrations of GSH in the G3 group compared to the G1. There was significant increase of MDA in tissue in groups G4-G5 and plasma MDA in all groups, compared to the G1. EAc (2 Hz and 10 Hz) significantly decreased the activity of MPO in the testis of rats subjected to TT (G4-G5), compared to the control G1. No significant differences were observed in the activity of MPO comparing groups G4-G5 to group G1. It is concluded that EAc stimulation (2 and 10 Hz) attenuates oxidative stress and inflammatory response in rats subjected to testicular torsion/detorsion.

Keywords: Spermatic cord torsion. Ischemia. Reperfusion injury. Electroacupuncture. Rats.

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 Distribuição dos grupos e procedimentos realizados em 30 ratos... 25

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** Distribuição dos grupos, especificando os tratamentos realizados ... 26
- Figura 02** Fotografia (rato 5, grupo 2) identificando os pontos de referencia (linha mamilar) e a posição dos acupontos GULAI no rato 29
- Figura 03** Eletroestimulador modelo NKL 600 Portátil (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil), usado nos experimentos..... 30
- Figura 04** Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de GSH tecidual (Média \pm DP). em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo. 37
- Figura 05** Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de GSH plamático (Média \pm DP) em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo..... 38
- Figura 06** Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de MDA tecidual (Média \pm DP). em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo..... 39
- Figura 07** Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de MDA plasmático (Média \pm DP) em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo..... 40
- Figura 08** Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre a atividade da MPO (Média \pm DP) em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo..... 41
- Figura 09**Aspectos histológicos do testiculo (Grupo 1, Rato nº 5).....42
- Figura 10** Aspectos histológicos do testiculo (Grupo 2, Rato nº 11)..... 43
- Figura 11** Aspectos histológicos do testiculo. (Grupo 3, Rato nº 18)43
- Figura 12** Aspectos histológicos do testiculo (Grupo 4, Rato nº 20) 44
- Figura 13** Aspectos histológicos do testiculo (Grupo 5, Rato nº 28)..... 44
- Figura 14** Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre a camada de células germinativas (Média \pm DP) em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo..... 45
- Figura 15** Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre a presença de edema intersticial (Média

\pm DP) em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo..... 46

Figura 16 Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre a presença de hemorragia intersticial (Média \pm DP) em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo..... 46

Figura 17 Curva padrão para cálculo da concentração de glutathiona (GSH) no plasma..... 63

Figura 18 Curva padrão para cálculo da concentração de glutathiona (GSH) no tecido (testículo)..... 63

Figura 19 Curva padrão para cálculo da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido (testículo)..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Peso médio dos ratos utilizados no estudo.....	36
Tabela 2 Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de GSH no testículo ($\mu\text{mol/g}$) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo	37
Tabela 3 Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de GSH plasma ($\mu\text{mol/ml}$) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.....	38
Tabela 4 Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de MDA no testículo ($\mu\text{mol MDA/g}$) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.	39
Tabela 5 Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de MDA no plasma ($\mu\text{mol MDA/ml}$) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.....	40
Tabela 6 Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre aividade da MPO no testículo (uMPO/g) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.....	41
Tabela 7 Pesos individuais dos ratos (Apêndice B)	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Acupuntura
°C	Graus centígrados
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DP	Desvio Padrão
EAc	Eletroacupuntura
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G1	Grupo controle (Sham)
G2	Grupo Isquemia/Reperusão
G3Ac	Grupo acupuntura
GEAc2	Grupo eletroacupuntura 2 Hertz
GEAc10	Grupo eletroacupuntura 10 Hertz
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSSG	Glutathiona oxidada
Hz	Hertz
ipD	Intraperitoneal
I/R	Isquemia/Reperusão
mA	Miliampére
MDA	Malondialdeído
ml	Mililitro
µmol/L	Micro mol por litro
µmol/g	Micro mol por grama
MPO	Mieloperoxidase
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
LPO	Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
RL	Radical livre
r.p.m.	Rotações por minuto
T/D	Torção/Destorção
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	23
3 MÉTODO	24
3.1 Aspecto éticos	24
3.2 Amostra	24
3.2.1 Ambiente de experimentação.....	24
3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	25
3.3 Desenho do experimento.....	25
3.4 Procedimentos.....	26
3.4.1 Determinação dos pesos dos animais.....	26
3.4.2 Ato anestésico.....	26
3.4.3 Ato cirúrgico.....	27
3.5 Aplicação da Acupuntura/Eletroacupuntura	28
3.6 Procedimento Laboratorial	30
3.6.1 Parâmetros bioquímicos avaliados no sangue e testículo.....	31
3.6.2 Parâmetros histológicos avaliados no sangue e testículo.....	31
3.7 Técnica Laboratorial.....	31
3.7.1 Avaliação da peroxidação lipídica.....	31
3.7.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH).....	32
3.7.3 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	34
3.8 Metodologia Estatística	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Perdas de animais.....	36
4.2 Pesos dos ratos.....	36
4.3 Efeitos da isquemia/reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em ratos Wistar sadios submetidos à torção/destorção do testículo	37

4.3.1 Efeitos sobre as concentrações de GSH no testículo.....	37
4.3.2 Efeitos sobre as concentrações de GSH no plasma.....	38
4.3.3 Efeitos sobre as concentrações de MDA no testículo ...	39
4.3.4 Efeitos sobre as concentrações de MDA no plasma	40
4.4 Efeitos da isquemia/reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a inflamação em ratos Wistar sadios submetidos à torção/destorção do testículo	41
4.4.1 Efeitos sobre atividade da MPO no testículo ...	41
4.4 Efeitos da isquemia/reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o tecido em ratos Wistar sadios submetidos à torção/destorção do testículo.....	42
4.5.1 Nos túbulos seminíferos.....	42
4.5.1 No interstício	45
5 DISCUSSÃO.....	47
6 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
APÊNDICES.....	58
APÊNDICE A Curvas-padrão de GSH e MPO	58
APÊNDICE B Peso dos ratos.....	59
APÊNDICE C Dados Brutos - Concentrações de GSH e MDA no plasma e no tecido (testículo)	60
APÊNDICE D Dados Brutos - Atividade da MPO no testículo	61
APÊNDICE E Dados Brutos - Avaliação histológica do testículo (Grupos G1-G2)	62
APÊNDICE F Dados Brutos - Avaliação histológica do testículo (Grupos G3-G4)	63
APÊNDICE G Dados Brutos - Avaliação histológica do testículo (Grupos G5)..	64
ANEXOS	65
ANEXO 1 Declaração do Comitê de Ética em Pesquisas Animais (CEPA)	68

1 INTRODUÇÃO

Torção testicular é uma emergência urológica freqüente que afeta recém-nascidos, crianças e adolescentes (AKGUR et al., 1993). O diagnóstico precoce e o pronto tratamento são cruciais para a preservação da espermatogênese e conseqüentemente da fertilidade. Akcora et al. (2007) demonstraram que essas alterações são secundárias à lesão de isquemia/reperfusão (IR) que se instala após a destorção do testículo. Dois fatores são fundamentais para o sucesso do tratamento da torção do cordão espermático: a duração do período de isquemia e o grau de torção (WRIGHT, 1977).

Os testículos dos mamíferos e, especialmente as células germinativas, podem sofrer graves lesões, muitas vezes irreversíveis, quando expostos à ação dos agentes oxidantes produzidos no organismo, no curso dos processos vitais ou nas situações de estresse (CHANCE; SIES; BOVERS, 1979). A manutenção do fluxo sanguíneo é particularmente crítica no testículo. Os túbulos seminíferos, em condições normais, exibem concentrações muito baixas de oxigênio, o que explica sua maior sensibilidade à hipóxia (AHMED et al., 2000). Acredita-se que esta particular sensibilidade do testículo possa estar relacionada ao seu suprimento sanguíneo do tipo terminal e à presença de uma carapaça inelástica constituída pela túnica albugínea que limitaria sua expansão compensatória na vigência do edema traumático (REGADERA; NISTAL; PANIAGUA, 1985).

Tal como ocorre em outros órgãos ou tecidos submetidos aos efeitos da isquemia/reperfusão, a lesão tissular provocada pela torção do cordão espermático tem dois componentes: a lesão de isquemia e a lesão de reperfusão. (AKGÜR; KILINC; AKTUG, 1993). A primeira (lesão isquêmica) é decorrente da obstrução do fluxo de sangue oxigenado destinado ao testículo. A lesão de reperfusão se instala após a correção cirúrgica da torção (BLANK et al., 1993; AKGÜR; KILINC; AKTUG, 1993). Assim, se for possível melhorar o fluxo sanguíneo antes da instalação de lesão isquêmica, reduzindo a produção de radicais livres, será possível atenuar os efeitos da reperfusão.

A acupuntura (Ac) é uma modalidade terapêutica originária da China, onde é praticada há milênios. Segundo Hong (2005), não se pode estabelecer uma data precisa para o aparecimento da acupuntura, porque as suas origens perdem-se no tempo. O primeiro texto médico que descreveu a Ac resultou de um diálogo entre o

Imperador Amarelo e seu ministro, *Qi Bai*, versando sobre medicina. A obra clássica, intitulada Tratado de Medicina Interna do Imperador Amarelo (Nei Jing), foi escrita, provavelmente, entre os anos 475 e 221 a.C., e serviu de base para o desenvolvimento da Medicina Tradicional Chinesa (MTC). O livro é dividido em 2 volumes: o primeiro é composto das técnicas de exame físico e os fundamentos da MTC, enquanto o segundo contém o diagnóstico e tratamento (HONG, 2005).

No continente europeu, a Ac tornou-se conhecida em meados do século XVII graças aos trabalhos de padres jesuítas (HONG, 2005). Posteriormente, esse conhecimento chegou na América, com a publicação do livro "*The Principles and Practice of Medicine*", escrito por William Osler, um respeitado médico e professor da Universidade de Oxford (BALDRY, 2008). No Brasil, embora praticada informalmente há muitos anos, somente foi reconhecida como especialidade médica, pelo Conselho Federal de Medicina em 1995, conforme a resolução normativa nº 1455 e pela Associação Médica Brasileira (AMB), em 1998 (HONG, 2005).

A acupuntura é uma forma de terapia que busca a cura das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas finas, maleáveis, descartáveis, de aço inoxidável, em pontos específicos, denominados acupontos. A inserção e a manipulação da agulha de acupuntura produz três efeitos básicos: local (periférico), segmentar e suprasegmentar (FILSHIE; WHITE, 2002). Em nível periférico, o estímulo da agulha ao penetrar na pele e músculo ativa receptores aferentes (mecanoreceptores III), desencadeando a despolarização da membrana celular de fibras finas A delta (A_δ) (KAWAKITA; FUNAKOSHI, 1982) e, em menor proporção, as fibras C (mecanoreceptor IV), deflagrando um potencial de ação e provocando a liberação de várias substâncias pró-inflamatórias (peptídeo geneticamente relacionado à calcitonina (CGRP); substância P; bradicinina; interleucinas; TNF; e óxido nítrico, que desencadeiam vasodilatação local, objetivando reparar o dano tecidual (TSUCHIYA et al, 2007). A propagação desse potencial de ação ao longo da fibra A_δ alcança o corno posterior medular (lâmina I de Rexed) (KUMAZAWA; PERL, 1978) e a substância gelatinosa (Lâmina II de Rexed) inibindo a passagem do estímulo nociceptivo da fibra C, pela ação de interneurônios, com a liberação de neurotransmissores inibitórios, como a encefalina (HASHIMOTO; AIKAMA, 1993), conhecido como o efeito segmentar da acupuntura.

Os estímulos aferentes produzidos pela introdução das agulhas chegam ao corno posterior da medula espinhal conduzidos por fibras somáticas, estabelecendo

sinapses com neurônios motores homolaterais e/ou contralaterais para formar o arco reflexo somatossomático; com neurônios pré-ganglionares simpáticos para formar o arco reflexo somatovisceral; e com neurônios do trato próprioespinal, que estabelecem no nível medular associações de segmentos superiores com os inferiores, conectando os plexos braquial, lombar e sacral (NAKANO; YAMAMURA, 2010).

O terceiro nível da ação da acupuntura é o suprasegmentar; os estímulos projetados da medula espinal para as áreas encefálicas modulam o funcionamento de várias estruturas, como a formação reticular, através dos tratos espinotalâmico e paleoespinotalâmico, que vão interagir com a modulação do sistema nervoso autônomo, no nível hipotalâmico (NAKANO; YAMAMURA, 2010).

A eletroacupuntura (EAc) utiliza agulhas previamente inseridas em pontos específicos, conectadas a um gerador de corrente elétrica capaz de produzir correntes com intensidades que variam entre 0,5 e 50 mA e voltagem de até 20 V, suficientes para vencer a resistência da agulha de acupuntura e despolarizar a fibra nervosa. Valores de amplitude de pulso maiores do que 0,5 ms não são usados, pois produzem recrutamento de fibras C, inadequadas para produção dos efeitos benéficos da EAc (WOOLF, 1983). Utilizam-se ondas quadradas bifásicas, que favorecem a utilização de correntes de menor intensidade para atingir-se o limiar de disparo do receptor, evitando complicações indesejáveis, tais como a eletrólise e necrose tecidual (FILSHIER et al, 2002). As respostas obtidas dependem da frequência utilizada. Diferentes tipos de neurotransmissores são liberados, dependendo da frequência de corrente elétrica transmitida ao ponto de Ac (CHEN e HAN, 1992). Lin et al. (2002) demonstraram que a EAc de 2 Hz acelera a liberação de peptídeos opiáceos endógenos (EOPs) produzidos pelas glândulas suprarrenais. Frequências maiores (15 Hz) produzem efeitos hipoglicemiantes (LIN et al., 2004). Chen e Han (1992) demonstraram que a utilização consecutiva de baixas (2 Hz) e altas (100 Hz) frequências durante 3 segundos leva a uma liberação simultânea de três tipos de peptídeos opiáceos: encefalinas, endorfinas e dinorfinas. Cakmak et al. (2008) estudaram os efeitos da acupuntura abdominal sobre o fluxo sanguíneo da artéria testicular em humanos e concluíram que a simples inserção de agulhas (acupuntura) no acuponto Gulai (E-29), localizado aproximadamente 8,8cm abaixo da cicatriz umbilical e 4,4 cm lateral à linha média do abdome, ou a aplicação do estímulo elétrico - eletroacupuntura (2 Hz, tipo "burst" - trens de pulsos) não

induziram mudanças significativas no fluxo sanguíneo. Por outro lado, a aplicação da EAc, no mesmo acuponto, utilizando uma frequência de 10 Hz, pulsos simples, produziu um aumento significativo do fluxo sanguíneo da artéria espermática. Esse resultado parece ser específico do acuponto E-29, pois a utilização de outro acuponto próximo, denominado Tianshu (E-25), não alterou o fluxo sanguíneo (CAKMAK et al., 2008).

Stener-Victorin, Fujisawa e Kurosawa (2006), estudaram os efeitos da EAc sobre o fluxo sanguíneo ovariano em ratas. Para estimulação elétrica foi aplicada uma onda quadrada de 0,5-ms de duração, na forma de "burst" (trens de pulsos), com uma intensidade de 10 mA, durante 30 segundos, em agulhas inseridas nos músculos abdominais ao nível da 12^a costela, 2 cm a partir da linha mediana. Os pesquisadores relataram efeitos positivos da estimulação elétrica sobre o fluxo sanguíneo ovariano. Entretanto, quando o estímulo elétrico foi aplicado em agulhas inseridas no membro pélvico das ratas ocorreu diminuição do fluxo sanguíneo ovariano.

Os acupontos, ou pontos de acupuntura, estão localizados na pele e distribuídos por todo o corpo, não ultrapassam mais que alguns milímetros quadrados e representam o meio de comunicação da pele com os órgãos internos. São dotados de peculiaridades e características bioelétricas próprias. Dependendo do grau dessas variações bioelétricas (impedância, polaridade), podem chegar a tornar-se dolorosos ou mesmo passar a apresentar manifestações funcionais ou orgânicas como consequência do estado energético dos órgãos internos (YAMAMURA, 2001). Segundo cita Yamamura (2001), estudos realizados por dois pesquisadores, Nakatani (1956) e Reichmanis (1979), demonstraram que ocorrem alterações de condutibilidade, diminuição da resistência elétrica e de potencial elétrico da pele em determinados pontos, variando de acordo com a influência exercida por fatores externos (temperatura ambiental, fatores atmosféricos, estações do ano, ciclo circadiano) e internos (alterações orgânicas, fadiga, emoções).

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas há uma produção constante de espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas genericamente como radicais livres (RL), acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de antioxidantes, mantendo a integridade estrutural e funcional das biomoléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). Nos mamíferos, no tecido oxigenado, o oxigênio sofre redução tetravalente, com a aceitação de quatro

elétrons, resultando na formação de água, radicais superóxido ($O_2\bullet$) hidroperoxila ($H_2O\bullet$) e hidroxila ($OH\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Compete aos sistemas protetores do organismo a desativação dos radicais livres (RL), sendo essa capacidade fundamental para assegurar a reversibilidade das lesões e a prevenção da morte celular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

Sob condições fisiológicas, o balanço entre os agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a redução das defesas antioxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Só restam aos organismos vivos três alternativas: adaptação, por aumento da atividade dos sistemas antioxidantes; dano tecidual, por agressão aos lipídios, carboidratos ou proteínas; morte celular, por necrose ou apoptose (DRÖGE, 2002).

A Glutathiona é o tiol de baixo peso molecular (0,5-10 mMol/L) mais abundante nas células animais. A grande maioria (85-90%) do GSH celular está presente no citosol enquanto que os 10% restantes se distribuem entre as organelas, incluindo a mitocôndria, matriz nuclear e peroxissomos (HUANG et al., 2001). Por outro lado, as concentrações plasmáticas de GSH são relativamente baixas (2-20 μ Mol/L) (JONES, 2002). A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (DENEKE; FANBURG, 1989). A oxidação da glutathiona a transforma em GSSG (glutathiona oxidada), produto tóxico para o meio intracelular. Os sistemas de proteção são, mais uma vez ativados e a GSSG é reduzida, retornando ao seu estado inicial (GSH) por ação enzimática da glutathiona redutase. A relação ideal GSH/GSSG (100:1) é mantida através desse mecanismo (MEISTER, 1989). As concentrações de GSH celulares são consideravelmente reduzidas em resposta ao estresse oxidativo e muitas condições patológicas (HUANG et al., 2001). Concentrações adequadas de GSH são necessárias para a proliferação celular, incluindo os linfócitos e enterócitos (AW, 2003), além de desempenhar um importante papel na espermatogênese e maturação do espermatozóide (SIES, 1999).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos RL sobre os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) das membranas celulares, levando à destruição de sua

estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). A LPO tem início quando RL dotados de elétrons desemparelhados promovem a remoção de um átomo de hidrogênio de um grupamento metileno (-CH₂-), produzindo um novo radical (-CH•-). Sob condições aeróbicas, esse radical centrado no carbono combina-se com o oxigênio (O₂) formando radicais peroxila (ROO•). Esses radicais peroxila podem extrair um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídio, estabelecendo assim a propagação da reação. O novo radical, ao reagir com o oxigênio, origina novo radical peroxila, permitindo que a reação da peroxidação lipídica se torne contínua, pela repetição dos ciclos oxidativos (LLESUY, 2002).

À medida que as reações em cadeia se processam, proteínas de transporte ou enzimas de membrana podem ser inativadas ou pode ocorrer aumento da permeabilidade da bicamada lipídica da membrana, alterando a homeostase. Finalmente, na etapa de conclusão, ocorre a formação de um intermediário instável (tetróxido), a partir dos radicais peroxila (mecanismo de Russell), que sofre decomposição, originando oxigênio singleto (¹O₂) e grupos carbonila excitados, entre outros produtos (LLESUY, 2002).

Para aferir-se a LPO pode ser utilizado o método de TBARS, que determina a concentração de um composto intermediário da lipoperoxidação, o malondialdeído (MDA). O teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA) é um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica (CHIRICO, 1994). Dosagens de glutathiona reduzida (GSH) e/ou da razão glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) são utilizados na avaliação do estresse oxidativo.

Os mecanismos fisiológicos que explicam os efeitos da acupuntura nos sistemas antioxidantes ainda não foram satisfatoriamente esclarecidos, embora estudos pontuais esclareçam alguns fatos. Dai et al. (2008) estudaram os efeitos da acupuntura em ratas com insuficiência ovariana e concluíram que a estimulação do acupuncto E-36 reduz a peroxidação lipídica. Siu, Lo e Leung (2005) demonstraram que a EAc aumenta a expressão de tioredoxina nos cérebros isquêmicos de ratos, minimizando as alterações oxidativas dos grupos tiol das proteínas adjacentes à lesão. Liu et al. (2006) demonstraram efeitos positivos da Ac na redução do estresse oxidativo em cérebros de ratos com infartos múltiplos, onde foram observados um aumento importante da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px).

Sob condições fisiológicas, a taxa de consumo de GSH é determinada pela intensidade de sua utilização nos processos de detoxificação. A exposição aos agentes oxidantes oriundos do meio exterior ou a presença de toxinas reativas aos tióis pode aumentar significativamente o consumo de GSH, resultando em queda temporária dos níveis de GSH intracelular; entretanto, como a capacidade de recuperação das reservas de GSH está presente na maioria das células, a concentração do tripeptídeo intracelular é rapidamente recuperada, pela maior síntese e pela redução do GSSG, pelo mecanismo já descrito acima. Surpreendentemente, a maioria das células tolera, sem efeitos adversos, redução de até 90% dos níveis normais de GSH (HALL, 1999).

O que acontece quando um animal submetido à torção testicular (720°) é submetido ao tratamento acupuntural antes da destorção? Será que a eletroacupuntura abdominal pode atenuar o estresse oxidativo? São esses os questionamentos que motivaram a presente pesquisa, considerando que estudos anteriores já comprovaram os efeitos atenuantes da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo no fígado e os rins (SILVA et al, 2011), na pele (LIMA et al., 2012) e nos ovários (SANTOS et al., 2013), espera-se que essa proteção também ocorra no testículo de ratos submetidos à torção/destorção do testículo.

Não foram encontrados na literatura médica registros avaliando os efeitos da eletroacupuntura sobre as concentrações de GSH e MDA no testículo isquêmico e no plasma de ratos submetidos à I/R do testículo, conferindo ineditismo e relevância ao objetivo deste estudo.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura abdominal sobre o estresse oxidativo e a inflamação em ratos submetidos à torção/destorção do testículo.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

Trata-se de um estudo prospectivo, controlado e comparativo, entre diferentes grupos de ratos machos da raça Wistar submetidos à torção/destorção do testículo. A manipulação laboratorial dos animais foi baseada nas Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990), na Lei Federal nº6.638 de 08 de maio de 1979 e nas disposições sobre a criação e o uso de animais para atividades de ensino e pesquisa, preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1999). A execução do projeto foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA / UFC), em 24 de maio de 2012, protocolo nº 18/2012 (ANEXO A).

3.2 Amostra

3.2.1 Ambiente de experimentação

Utilizaram-se ratos albinos, adultos, machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia Mammalia*) procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), observando-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Ração comercial para ratos foi ofertada *ad libitum* até 12 horas antes do experimento. Água potável foi oferecida até o início do experimento.

A higienização das gaiolas e o exame dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável e pelo pesquisador, respectivamente. Os ratos foram previamente aclimatados por um período de 7 dias antes da realização dos experimentos.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente refrigerado, sob anestesia (Cetamina 90mg + Xilazina 10mg), no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos neste estudo ratos machos, com idade variando de 70 a 90 dias e peso entre 230 e 300 gramas (peso médio 279,6 g), de bom aspecto geral, ativos e sem evidência de doença à inspeção. Foi excluído do estudo um rato que morreu durante o período do experimento.

3.3 Desenho do experimento

Foram utilizados 30 ratos machos, sadios, distribuídos aleatoriamente em 5 grupos. O Quadro 1, apresentado abaixo, descreve as etapas e os procedimentos do experimento.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos e procedimentos realizados em 30 ratos

Grupos	Procedimento 1	Procedimento 2 (Tipo de Estimulação)	Procedimento 3
G1 - Sham	Torção /destorção	Nenhuma	Coleta após 7:0 h
G2 - T/D	Torção / Isquemia - 4h	Nenhuma	Destorção/Reperusão - 3h + coleta
G3 - T/D+Ac	Torção / Isquemia - 4h	Acupuntura, 5 min	Destorção/Reperusão - 3h + coleta
G4 - T/D+EAc 2 Hz	Torção / Isquemia - 4h	EAc 2 Hz, 5 min	Destorção/Reperusão - 3h + coleta
G5 - T/D+EAc 10 Hz	Torção / Isquemia - 4h	EAc 10 Hz, 5 min	Destorção/Reperusão - 3h + coleta

A Figura 1, a seguir, mostra a distribuição dos grupos, o número de ratos em cada grupo e especifica os tratamentos realizados:

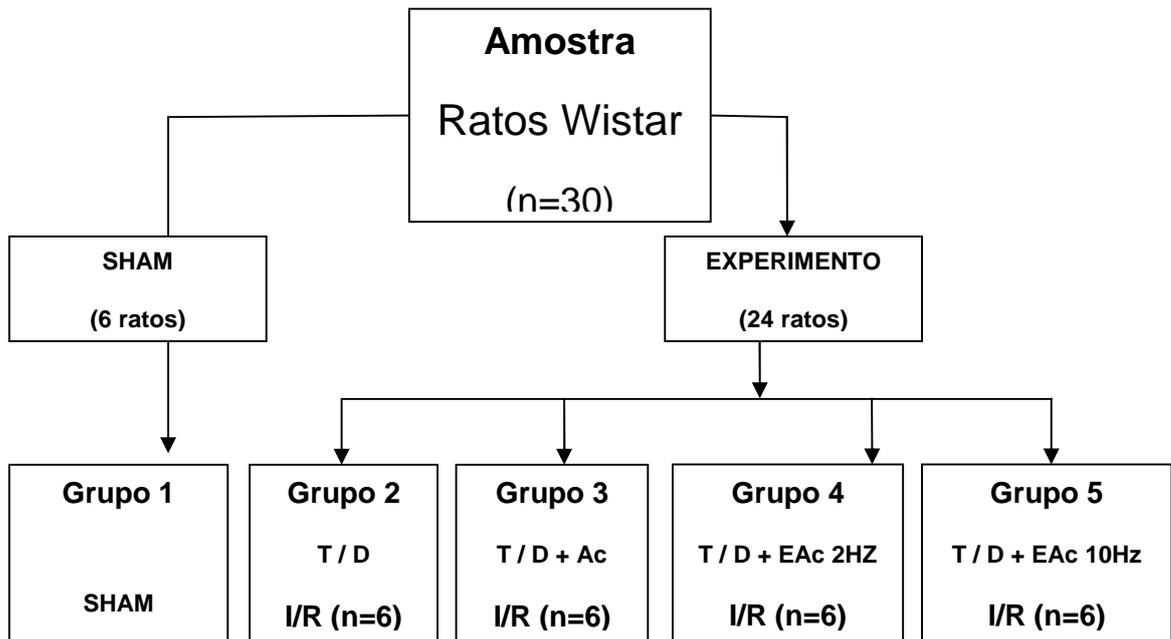


FIGURA 1- Distribuição dos grupos, especificando os tratamentos realizados

3.4 Procedimentos

3.4.1 Determinação dos pesos dos animais

Os ratos foram pesados no início do experimento. Todas as pesagens foram realizadas através de balança eletrônica de precisão (Filizola® modelo MF 3/1, Campo Grande, MT, Brasil).

3.4.2 Ato anestésico

Os ratos foram anestesiados no período da manhã, por via intraperitoneal, utilizando-se a mistura homogênea de cloridrato de Cetamina e Xilazina, nas doses de 90mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. A profundidade anestésica foi avaliada por parâmetros clínicos, tais como as frequências respiratória e cardíaca, a ocorrência de arritmias, movimentos das narinas ou outros grupos musculares.

Cada animal foi anestesiado 3 vezes: antes da torção, antes da destorção e antes da coleta. Os ratos do grupo 1 foram anestesiados antes da torção, após 4,0 h e após 7,0h, para a coleta de material. Obtido o nível anestésico adequado, o animal

era colocado na mesa operatória, em decúbito dorsal para a realização dos procedimentos.

3.4.3 Ato cirúrgico

A isquemia foi obtida por torção do cordão espermático direito, duas voltas completas (720°), em torno de seu eixo, no sentido horário. Para evitar-se a destorção espontânea, o testículo direito foi fixado ao mesórquio, utilizando-se a técnica preconizada por Ryan et al. (1988), evitando-se assim a sutura transparenquimal.

Tendo em vista a uniformidade dos diversos procedimentos cirúrgicos, e visando permitir a sua futura utilização por outros pesquisadores, foi utilizado o protocolo descrito por Guimarães (2005):

- a) indução da anestesia e colocação do animal em decúbito dorsal, com as patas dianteiras e traseiras fixadas à prancha por tiras de esparadrapo;
- b) epilação do escroto por tricotomia e tração manual dos pelos, quando necessário;
- c) antissepsia do escroto e região inguinal com solução de polivinilpirrolidona-iodo;
- d) exploração cirúrgica por acesso direto através de uma incisão longitudinal no escroto direito (2 a 3 cm de comprimento); liberação e divulsão delicada das fibras do músculo dartos com exposição do testículo e epidídimo;
- e) exteriorização do testículo direito por leve expressão, evitando-se a tração por instrumental cirúrgico; algumas vezes o testículo encontrava-se no canal inguinal e era empurrado para baixo por compressão na região inguinal até sua completa exteriorização;
- f) isquemia do testículo direito por torção de 720° graus no sentido horário (duas voltas completas do cordão espermático, em torno do seu eixo transversal), seguida de fixação da gônada ao mesórquio, com fio de nylon 4-0, para evitar-se a destorção espontânea. Nos ratos do grupo 1 (sham), imediatamente após completar-se a torção do cordão espermático foi realizada a destorção, seguida da colocação de um fio de sutura (nylon 4-0)

- no mesórcio, de modo semelhante ao procedimento já descrito acima sem, contudo, realizar sua ligadura;
- g) fechamento do escroto em um só plano com pontos separados, utilizando fio de nylon monofilamentar 2-0).
 - h) retorno do animal à gaiola;
 - i) decorridas três horas, o animal foi novamente submetido à anestesia; após remoção das suturas do escroto e da sutura de fixação colocada no mesórcio, foi efetuada a destorção do cordão espermático; a gônada foi recolocada na cavidade escrotal, seguindo-se a sutura do escroto num só plano (suturas separadas), utilizando fio de nylon monofilamentar 5-0;
 - j) nos animais do Grupo 1, após 7:0 h do início do experimento, e nos animais dos demais grupos, ao término da reperusão, sob anestesia, procedeu-se a remoção da gônada direita, seguindo-se a coleta de uma amostra de sangue arterial (2,0 ml) por punção da aorta abdominal, abaixo da saída das artérias renais, sob visão direta, com agulha calibre 21 G, utilizando-se a laparotomia mediana como via de acesso;
 - k) após a coleta do sangue os ratos foram mortos por deslocamento cervical, ainda sob os efeitos da anestesia.

3.5 Aplicação da acupuntura/eletroacupuntura

Após indução da anestesia, imediatamente antes da destorção todos animais dos grupos 4-5 foram submetidos à EA abdominal utilizando-se 2Hz (grupos 4) e 10 Hz (grupos 5) durante 5 minutos. Os ratos do grupo 3 foram submetidos à Acupuntura manual, durante 5 minutos. Foram utilizadas agulhas de acupuntura de 0,25mm de diâmetro/15mm de comprimento (modelo DCB 108, fabricadas na Coréia do Sul e distribuídas no Brasil por Dong Bang Produtos de Acupuntura -EPP, São Caetano do Sul – SP). As agulhas foram inseridas bilateralmente nos pontos E-29 (Gulai), numa profundidade suficiente para atingir o tecido muscular, mantidas por 5 minutos e posteriormente removidas. O tempo de estimulação e a seleção do acuponto E-29 foram baseados no trabalho de Cakmak et al. (2008).

No rato, o acuponto E-25 se localiza lateral à cicatriz umbilical, no ponto mediano entre o umbigo e a linha mamilar. O acuponto RM-3 está localizado no ponto situado abaixo da cicatriz umbilical, na linha que conecta o umbigo ao

tubérculo pubiano (YIN et al., 2008). No humano, o acuponto E-29 (Gulai) se situa na mesma altura do RM-3, no ponto mediano entre o umbigo e a linha mamilar (MARTINS; GARCIA, 2003). Assim, baseando-se no sistema proposto por Yin et al. (2008), considerando que o acuponto E-29 se situa na mesma linha do E-25 e ao lado do RM-3 (Zhongji), pode-se localizar o acuponto descrito acima, considerando que o primeiro (E-29) está localizado, no rato, na mesma altura do ponto RM-3, no ponto mediano entre a linha média e a linha mamilar, próximo ao tubérculo pubiano (Figura 2).



FIGURA 2 - Fotografia (rato 5, grupo 2) identificando os pontos de referencia (linha mamilar) e a posição dos acupontos GULAI no rato.

Nos animais submetidos a eletroacupuntura, foram acoplados às agulhas previamente inseridas no acuponto E-29 com eletrodos ligados a um eletroestimulador modelo NKL 608 portátil (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil) e ajustado para produzir uma estimulação máxima de 1 mA, com frequências de 2 Hz (Grupo 4) e 10 Hz (grupo 5), pulsos quadrados, com trens de pulsos (*burst*) e duração de 5 minutos (Figura 3).



Figura 3 - Eletroestimulador modelo NKL 600 Portátil (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil), usados nos experimentos

3.6 Procedimento laboratorial

Os tubos de ensaio contendo o sangue arterial heparinizado (3,0 ml) foram colocados em centrífuga refrigerada Jouan modelo MR23i (França) e centrifugados a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos, mantendo-se a temperatura interna em 10° C. O plasma obtido foi dividido em alíquotas e imediatamente armazenado a -70° C. Após a coleta, os testículos foram pesados separadamente e lavados com soro fisiológico gelado (4° C) para remoção dos resquícios de sangue. Os testículos foram divididos em duas metades. Uma das metades foi dividida em dois fragmentos, sendo um deles imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido a cerca de 190 graus centígrados negativos, e fragmentados utilizando-se grau e pistilo de porcelana. O material obtido foi colocado em tubos de ensaio e armazenado a 70 graus centígrados negativos, até sua utilização. O segundo fragmento foi reservado para determinação da atividade da mieloperoxidase. A outra metade do testículo foi mergulhada em formol neutro por 24 h e posteriormente transferidos para solução de álcool 70%. A coloração foi feita pela Hematoxilina-Eosina.

3.6.1 Parâmetros bioquímicos avaliados no sangue e testículo

Os efeitos da EAc sobre o estresse oxidativo foram avaliados através das dosagens teciduais (testículo) e séricas de TBARS e Glutathiona. A dosagem das concentrações teciduais da MPO (mieloperoxidase), considerada um marcador de estresse oxidativo (PEDRO et al., 2003) foi incluída na avaliação.

3.6.2 Parâmetros histológicos avaliados no testículo

Foram realizadas análises morfométricas qualitativas em microscopia ótica. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

Túbulos seminíferos: Presença/ausência de degeneração de espermatozoides, espermátides e da camada de células germinativas; Presença/ausência de ruptura de túbulos.

Interstício: presença/ausência de proliferação de células de Leidig, edema intersticial ou hemorragia.

As lâminas histológicas foram fotografadas para registro e analisadas por patologista experiente sem prévio conhecimento dos grupos estudados. Após a realização dos exames histológicos e emissão dos laudos as lâminas foram numeradas sequencialmente.

No estudo de microscopia ótica foi utilizado um microscópio Pentaocular Olympus BX 41, Tóquio, Japão. Para obtenção das microfotografias, utilizou-se um microscópio equipamento Zeiss SCOPE A 1 AXIO, acoplado a uma câmera AxioCamICc 3. As imagens foram capturadas com o Software Axio Vision ReL 4.8.

3.7 Técnica laboratorial

3.7.1 Avaliação da peroxidação lipídica

A técnica tem por objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA) formado na peroxidação lipídica. Procede-se a extração deste composto usando um solvente orgânico (n-butanol), determinando-se a concentração de MDA que são expressas como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Para a quantificação do teor de TBARS no tecido e plasma utilizou-se o teste de Uchiyama e Mihara (1978), onde a concentração de TBARS é expressa em $\mu\text{mol MDA/g}$ (malonaldeído/g) de tecido ou $\mu\text{mol MDA/ml}$ plasma.

O MDA é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico originando um composto de cor rosa.

Reagentes:

Cloreto de potássio: 1,15%

Ácido tiobarbitúrico: 0,6%

Ácido fosfórico: 1%

N-butanol

Procedimento:

As amostras teciduais (testículo) a serem analisados foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C imediatamente após a coleta e lavagem com soro fisiológico gelado (4°C) para remover quaisquer vestígios de sangue. Após pesagem, a amostra de tecido foi homogeneizada em KCl gelado 1,15%, resultando em uma solução ácida com concentração a 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5 ml de cada amostra e acrescentou-se 1,0 ml da solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 1%). A mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo seguido da adição de 4,0 ml de N-butanol. Após dois minutos de agitação a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. A absorbância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida em espectrofotômetro Beckman DU-640 (Fullerton, Califórnia) a 520 nm e 535 nm.

A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão.

3.7.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH)

A determinação dos grupos SH foi realizada pelo Método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrozenzóico) (DTNB – reagente

de Ellman) com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412nm em espectrofotômetro (Beckman DU-640, Fullerton, Califórnia).

Drogas e reagentes:

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Ácido tricloroacético (ATC,50%)

Tampão TRIS 0,4 M pH 8,9

5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico (DTNB) 0,5M)

Metanol

Glutathiona (GSH, 1 mg/ml).

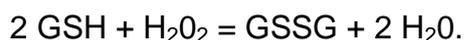
Preparação dos reagentes:

Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

EDTA Na₂ 0,2M PM 372,2 (% ,211g + H₂O *qsp* 70.0 ml)

EDTA Na₂ 0,02M (30 ml de EDTA Na₂ 0,2M + H₂O *qsp* 300 ml)

Reação



Procedimento:

Uma amostra de tecido (0,5g) é homogeneizada em 5 ml de EDTA 0,02M gelado com bastão de vidro e posteriormente filtrada em lã de vidro. Retiram-se 4,0 ml do homogenato e mistura-se com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético 50%. O tubo é agitado e centrifugado a 3000 g por 15 minutos. Retiram-se 2,0 ml do sobrenadante e acrescenta-se 4 ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 M; agita-se a mistura para homogeneização. Em seguida, lêem-se as absorbâncias no espectrofotômetro à 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH foi obtida comparando-se o valor da

absorbância com uma tabela padrão de GSH, previamente preparada (APENDICE A).

3.7.3 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Publicações realizadas por Bradley, Thiru e Pober (1995), descreveram o uso de uma enzima específica encontrada nos grânulos intracelulares dos neutrófilos, a mieloperoxidase (MPO). Essa enzima pode ser utilizada, portanto, como marcador para o conteúdo de neutrófilos dos tecidos.

O acúmulo de neutrófilos no tecido foi medido pelo método de dosagem de mieloperoxidase. Após coleta, a amostra foi acondicionada em *eppendorf* com *buffer* gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M, pH 4,7). O tecido foi pesado e em seguida homogeneizado em Polytron® PT 3100 a 13000 rpm. No *pellet* foi feito lise hipotônica com solução de NaCl 0,2% e após 30s adição de NaCl 1,6% com glicose 5%. Após centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido em buffer NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonia e rehomegeneizado. Após centrifugação a 13000 rpm, 5 ml do sobrenadante foram utilizados para a dosagem em placas de 96 wells diluído em 45 ml de NaPO₄ 0,08 M. A atividade da mieloperoxidase no sobrenadante foi dosada usando tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM e H₂O₂ (0,5 mM) e lida no leitor de placas de 96 wells à 450 nm. Obtêm-se a concentração final de MPO comparando-se o valor da absorbância com uma tabela padrão de MPO, preparada previamente (APÊNDICE 1). As concentrações de MPO foram expressas em unidade / mg de tecido.

3.8 Metodologia estatística

Para todas as variáveis, realizou-se uma análise descritiva dos dados onde foram determinadas as curvas de normalidade aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e calculados a média amostral e o desvio padrão da média. O peso dos ratos foi analisado como variável quantitativa contínua e exposto como média ± desvio padrão.

Os resultados encontrados durante a análise morfológica foram considerados variáveis qualitativas nominais dicotômicas (presença ou ausência de necrose testicular e presença ou ausência de atrofia testicular). Os graus de lesão histológica foram convertidos em valores numéricos, de acordo com a intensidade da lesão: + (1), ++ (2) e +++ (3), antes da análise estatística.

A comparação entre os grupos experimento e controle (sham) foi feita pelo teste de Dunnett (ANOVA). Os cálculos foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A., www.graphpad.com). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Perdas de animais

Durante a pesquisa houve o óbito de um rato durante o ato anestésico, por provável depressão respiratória, pertencente ao grupo experimental G5EAc10. O animal foi excluído do estudo e substituído por outro rato, seguindo o método de seleção de animais adotado nesta pesquisa. Nenhum outro rato apresentou complicações ou morreu durante o período de observação trans ou pós-cirúrgico.

4.2 Pesos dos ratos

4.2.1 Pesos individuais dos ratos

Os pesos individuais dos ratos no início do experimento estão apresentados no Apêndice B (Dados brutos). A Tabela 1 contém os valores (pesos médios) obtidos na pesagem dos animais de cada grupo.

TABELA 1 - Peso médio dos ratos utilizados no estudo

Grupos	n	Peso médio (X±DP) ^a
G1 - Simulado (SHAM)	6	262,00±12,00
G2 - Torção/Destorção (I/R)	6	259,00±14,00
G3Ac - T/D +Acupuntura	6	283,00±12,00
G4EAc2 - T/D + Eletroacupuntura 2 Hz	6	273,00±18,00
G4EAc10 - T/D + Eletroacupuntura 10 Hz	6	241,00±15,00

FONTE: O Autor (2014)

NOTA: n= número de ratos de cada grupo
= média ± desvio padrão

^a Ausência de diferenças significantes entre os grupos experimento e controle (sham). Teste de Dunnett (ANOVA)

4.3 Efeitos da isquemia/reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em ratos Wistar sadios submetidos à torção/destorção do testículo

4.3.1 Efeitos sobre as concentrações de GSH no testículo

A EAc (2 e 10Hz) promoveu aumento significativo nas concentrações de GSH no testículo dos ratos submetidos à torção do testículo (grupos G4-G5), comparados ao controle G1. A Ac não alterou significativamente as concentrações de GSH no grupo G3 comparado ao G1. A torção seguida por destorção imediata do testículo não produziu alterações nas concentrações de GSH tecidual no grupo G2 comparado ao G1 (Tabela 2, Figura 4).

TABELA 2 - Efeitos da Isquemia/Reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 10 Hz) sobre as concentrações de GSH no testículo ($\mu\text{mol/g}$) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

GRUPOS (n=6)				
G1 - Controle	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+EAc 2 Hz	G5 - T/D+EAc 10 Hz
32,4 \pm 2,33	33,7 \pm 5,98	45,5 \pm 10,2	53,8 \pm 17,6*	69,7 \pm 12,4***

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: Dunnett (ANOVA)

Valores expressos como Média \pm DP

* $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1)

*** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

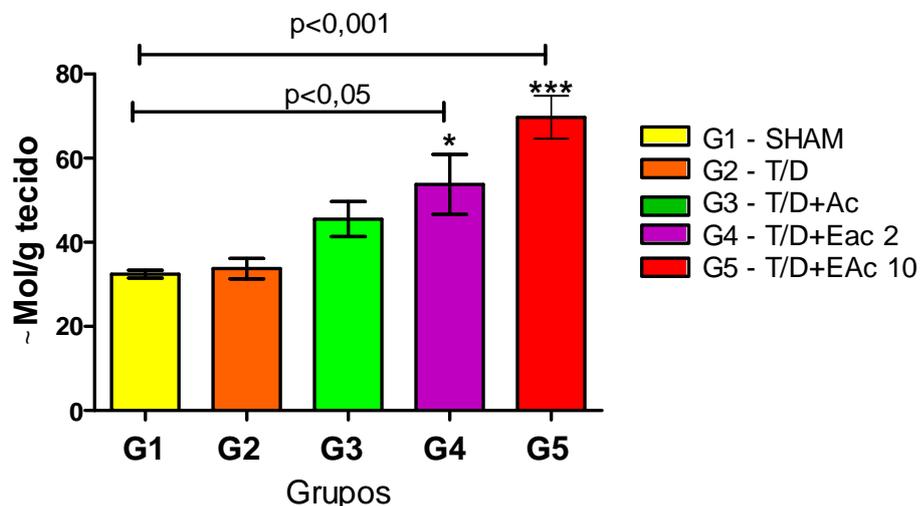


FIGURA 4 - Efeitos da Isquemia/Reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de GSH tecidual (Média \pm DP). em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: Dunnett (ANOVA)

* $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1)

*** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

4.3.2 Efeitos sobre as concentrações de GSH no plasma

A EAc (2 e 10 Hz) promoveu aumento significativo das concentrações de GSH no plasma dos ratos submetidos à torção do testículo (grupos G4-G5), comparados ao controle G1. A Ac não alterou significativamente as concentrações de GSH plasmático no grupo G3 comparado ao G1. A torção seguida por destorção imediata do testículo não produziu alterações nas concentrações de GSH plasmático no grupo G2 comparado ao G1 (Tabela 3, Figura 5).

TABELA 3 - Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 10 Hz) sobre as concentrações de GSH no plasma ($\mu\text{mol/ml}$) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

GRUPOS (n=6)				
G1 - Controle	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+EAc 2 Hz	G5- T/D+EAc 10 Hz
24,1 \pm 0,42	24,6 \pm 2,93	24,7 \pm 1,78	82,4 \pm 5,95***	34,6 \pm 3,22***

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: Dunnett (ANOVA)

Valores expressos como Média \pm DP

*** p <0,001 - comparado ao controle (G1)

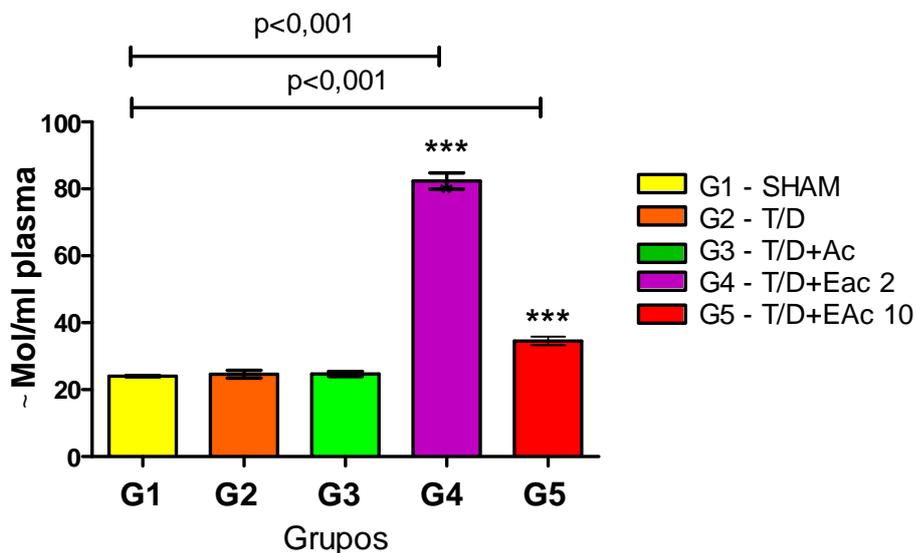


FIGURA 5 - Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de GSH plasmático (Média \pm DP), em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: Dunnett (ANOVA) *** p <0,001 - comparado ao controle (G1)

4.3. 3 Efeitos sobre as concentrações de MDA no testículo

A EAc (2Hz e 10Hz) promoveu aumento significativo nas concentrações de MDA tecidual nos ratos submetidos à torção do testículo (grupos G4-G5), comparados ao controle G1. A Ac não alterou significativamente as concentrações de MDA nos grupo G3 comparado ao G1. A torção seguida por destorção imediata do testículo não produziu alterações nas concentrações de MDA tecidual no grupo G2 comparado ao G1 (Tabela 4, Figura 6).

TABELA 4 - Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 10 Hz) sobre as concentrações de MDA no testículo ($\mu\text{mol MDA/g}$) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

GRUPOS (n=6)				
G1 - Controle	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+EAc 2 Hz	G5- T/D+EAc 10 Hz
0,113 \pm 0,068	0,132 \pm 0,062	0,218 \pm 0,106	0,295 \pm 0,028**	0,378 \pm 0,112***

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: Dunnett (ANOVA)

Valores expressos como Média \pm DP

** $p < 0,01$ - comparado ao controle (G1)

*** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

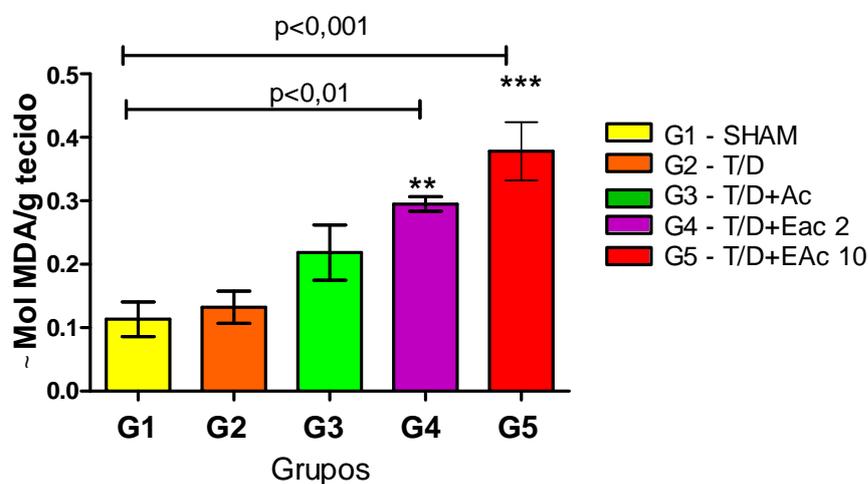


FIGURA 6 - Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de MDA tecidual (Média \pm DP). em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: Dunnett (ANOVA)

** $p < 0,01$ - comparado ao controle (G1)

*** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

4.3.4 Efeitos sobre as concentrações de MDA no plasma

A Isquemia/Reperusão, a Ac e a EAc (2Hz e 10Hz) promoveram aumento significativo nas concentrações de MDA no plasma dos ratos submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1. (Tabela 5, figura 7).

TABELA 5 - Efeitos da Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 10 Hz) sobre as concentrações de MDA no plasma ($\mu\text{mol MDA/ml}$) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

GRUPOS (n=6)				
G1 - Controle	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+EAc 2 Hz	G5 - T/D+EAc 10 Hz
0,092 \pm 0,069	0,310 \pm 0,133***	0,365 \pm 0,040***	0,385 \pm 0,078***	0,395 \pm 0,087***

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: Dunnett (ANOVA)

Valores expressos como Média \pm DP

*** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

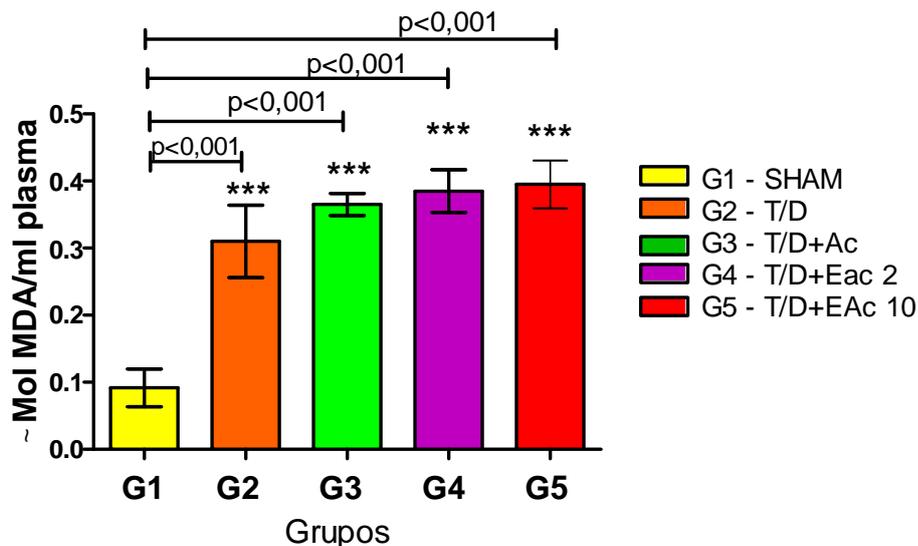


FIGURA 7 - Efeitos Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre as concentrações de MDA plasmático (Média \pm DP). em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: Dunnett (ANOVA) *** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

4.4 Efeitos da isquemia/reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a inflamação em ratos Wistar sadios submetidos à torção do testículo

4.4.1 Efeitos sobre a atividade da MPO no testículo

A EAc (2Hz e 10Hz) diminuiu significativamente a atividade da MPO no testículo dos ratos submetidos à torção do testículo (grupos G4-G5), comparados ao controle G1. A Ac não alterou significativamente a atividade da MPO no grupo G3 comparado ao G1 (tabela X2, figura X2). A torção seguida por destorção imediata do testículo não produziu alterações da atividade da MPO no grupo G2 comparado ao G1 (Tabela 6, Figura 8).

TABELA 6 - Efeitos da Isquemia/Reperfusão, da accupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 10 Hz) sobre a atividade da MPO no testículo (uMPO/g) em ratos sadios submetidos à torção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

GRUPOS (n=6)				
G1 - Controle	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+EAc 2 Hz	G5 - T/D+EAc 10 Hz
6,74±0,86	6,47±1,08	4,61±2,20	2,46±2,61***	0,38±0,27***

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: Dunnett (ANOVA)

Valores expressos como Média ± DP

*** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

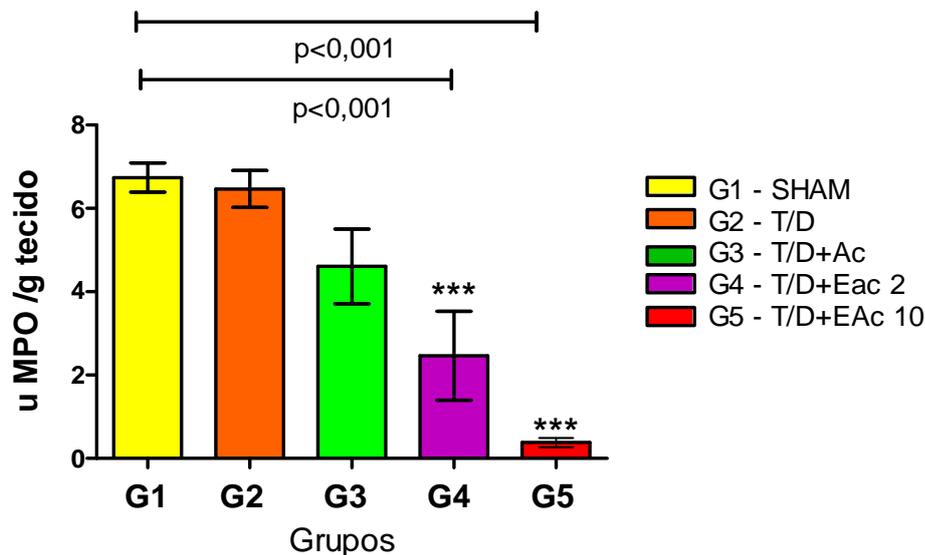


FIGURA 8 - Efeitos Isquemia/Reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre a atividade da MPO (Média ± DP). em ratos sadios submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

FONTE: O Autor (2014)

Teste: Dunnett (ANOVA) *** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

4.5 Efeitos da isquemia/reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o tecido (testículo) em ratos Wistar saudáveis submetidos à torção do testículo

4.5.1 - Nos túbulos seminíferos

Em todos os grupos analisados, as alterações presentes nos túbulos seminíferos foram discretas do ponto de vista histológico. A ruptura dos túbulos seminíferos foi identificada em menos de 50% dos campos histológicos examinados. Observou-se, ao exame histológico das lâminas, uma ausência de degeneração de espermatozoides e espermátides. Por outro lado, a degeneração da camada de células germinativas foi encontrada em todos os grupos, contudo sem diferenças significativas quando comparados ao grupo G1. As figuras a seguir (Figuras 9-13), são microfotografias de lâminas representativas de cada grupo estudado. O gráfico (Figura 14), ilustra a degeneração das células germinativas, utilizando barras para representar cada grupo, onde se torna evidente a ausência de diferenças significativas entre os grupos.

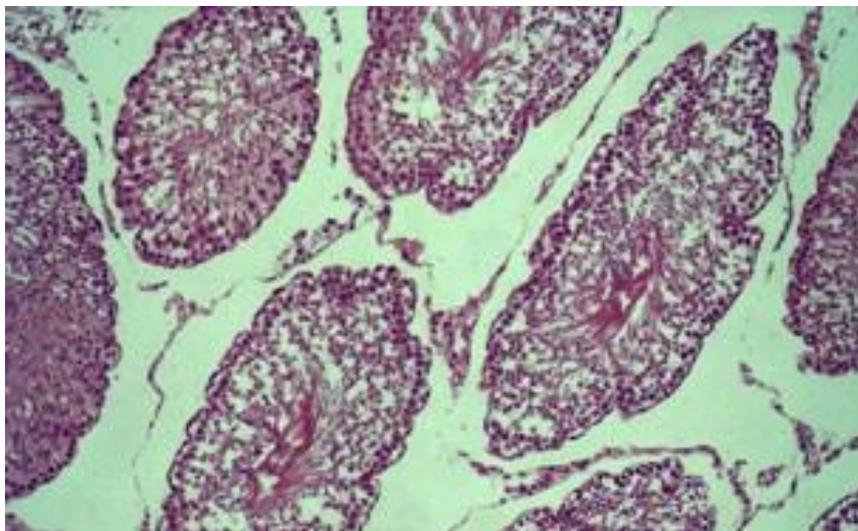


FIGURA 9 - Ausência de alterações histopatológicas. Estruturas preservadas (Grupo 1, Rato nº 5) (HE 200X),
FONTE: O Autor (2014)

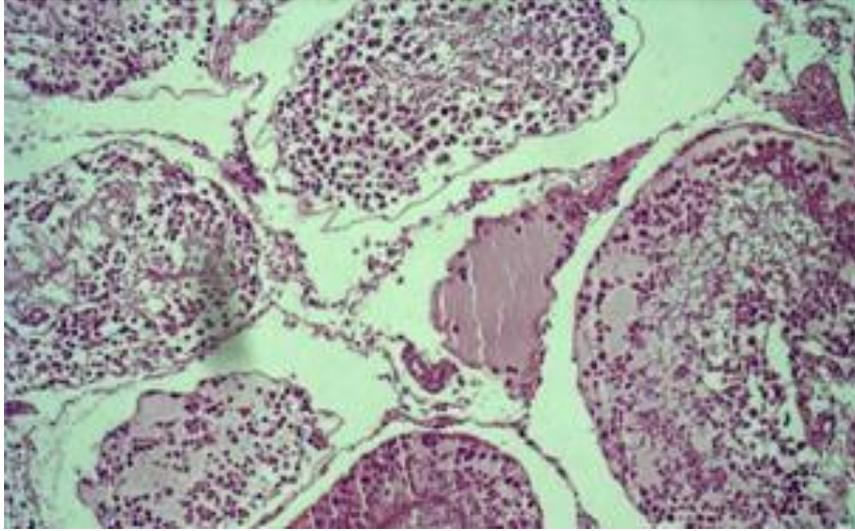


FIGURA 10 - Aspecto histológico dos testículos. Acentuado edema intersticial, ausência de congestão vascular.
(Grupo 2, Rato nº 11) (HE 200X),
FONTE: O Autor (2014)

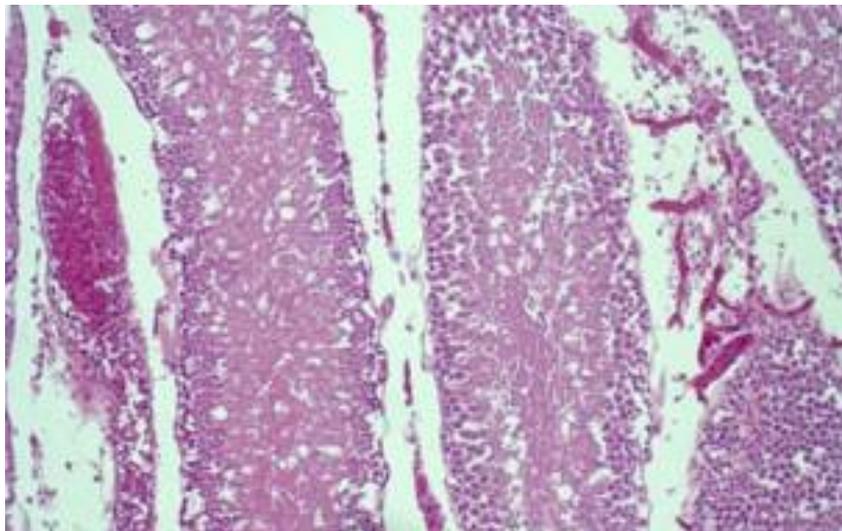


FIGURA 11 - Congestão nos vasos do interstício, edema nos túbulos, espermatogênese preservada
(Grupo 3, Rato nº 18) (HE 200X),
FONTE: O Autor (2014)

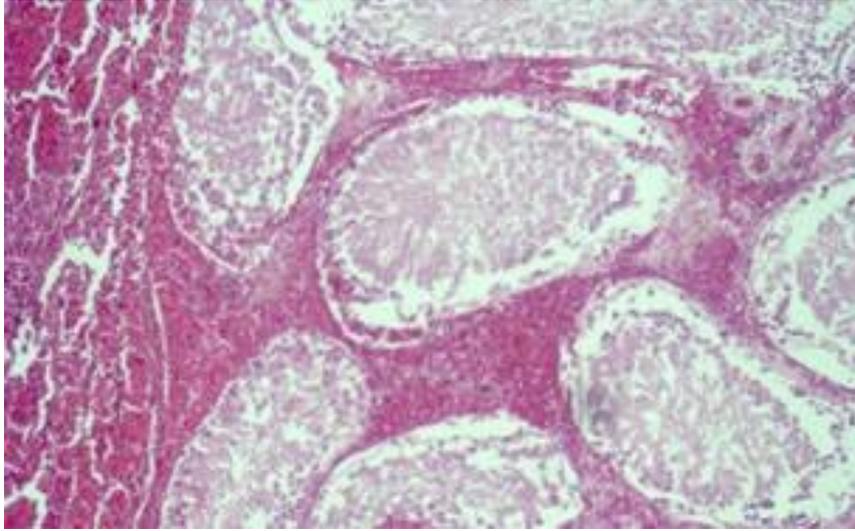


FIGURA 12 - Hemorragia, aparentemente se originando na periferia do testículo. O sangue comprime os túbulos. (Grupo 4, Rato nº 20) (HE 200X),
FONTE: O Autor (2014)

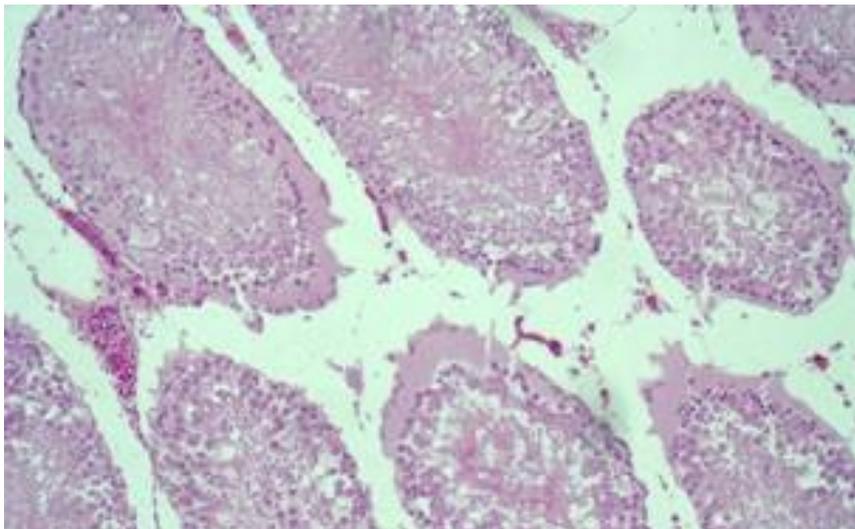


FIGURA 13 - Espaço intertubular alargado, possivelmente por edema; hemorragia e congestão; túbulos com áreas de necrose de coagulação. Espermatogênese parcialmente presente (Grupo 5, Rato nº 28) (HE 200X),
FONTE: O Autor (2014)

O gráfico abaixo (Fig. 14) ilustra a degeneração das células germinativas, utilizando barras para identificar cada grupo. É evidente a ausência de diferenças significantes entre os grupos.

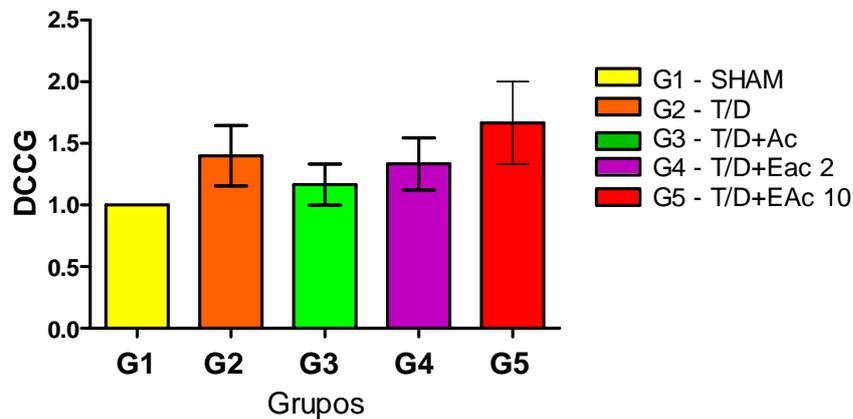


FIGURA 14 - Efeitos Isquemia/Reperusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre a camada de células germinativas (Média \pm DP). em ratos sadios submetidos à torção do testículo/destorção (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

FONTE: O Autor (2014)

Teste: Dunnett (ANOVA): sem diferenças significantes.

4.3.2 - No intestício

No exame do interstício constatou-se a existência de proliferação das células de Leydig em apenas dois ratos do grupo G2. O edema intersticial (Fig. 15) somente ocorreu em um animal do grupo G1 mas foi identificado nos testículos dos demais animais (G2-G5), em graus variáveis, desde o valor mínimo (+) até o máximo (+++), sem diferenças significantes. A hemorragia (Fig. 16) também ocorreu no interstício de todos os animais, sendo mais intensa no grupo tratado com EAc1 10Hz, mas sem diferenças significantes entre os grupos G2-G5 e o controle G1.

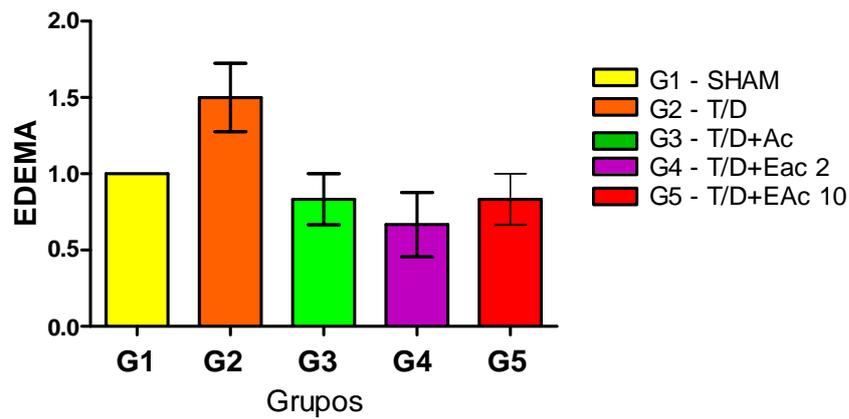


FIGURA 15 - Efeitos da Isquemia/Reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre a presença de edema intersticial (Média ± DP) em ratos saudáveis submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

FONTE: O Autor (2014)

Teste: Dunnett (ANOVA): sem diferenças significantes

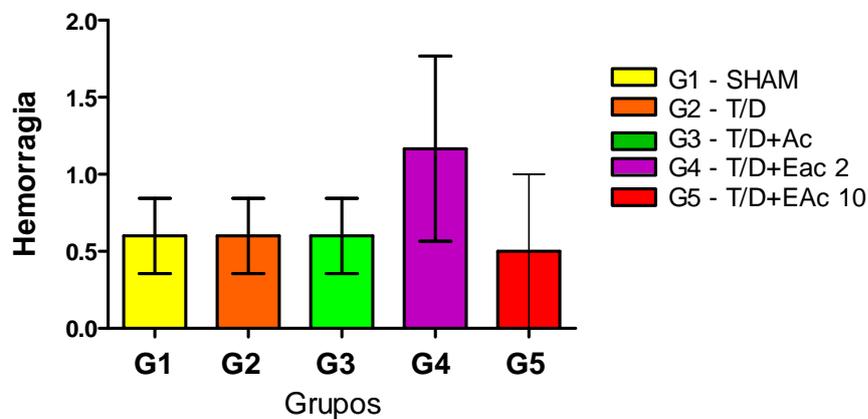


FIGURA 16 - Efeitos da Isquemia/Reperfusão, da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 10Hz) sobre a presença de hemorragia intersticial (Média ± DP) em ratos saudáveis submetidos à torção/destorção do testículo (grupos G2-G5), comparados ao controle G1, ao término do estudo.

FONTE: O Autor (2014)

Teste: Dunnett (ANOVA): sem diferenças significantes

5 DISCUSSÃO

A escolha do rato para a avaliação dos efeitos da AC/EAC na torção / destorção do testículo se justifica, considerando que outros pesquisadores utilizaram o roedor em estudos que buscavam identificar substâncias capazes de promover proteção da gônada contra os efeitos lesivos dos radicais livres resultantes da isquemia/reperfusão do órgão (allopurinol: AKGÜR et al., 1994; zinc aspartate: OZKAN et al., 2000; raxofelast: ROMEO et al., 2004; dehidroepiandrosterona: AKSOY et al., 2007; ácido lipóico: GUIMARÃES et al., 2007; dimetilsulfóxido: GUIMARÃES; KIMURA; VASCONCELOS, 2010; ternatina: GUIMARÃES et al., 2011; L-alanil-glutamina: LEITAO et al., 2011; melatonina e ozônio: EKICI et al., 2012). Modelos animais têm sido utilizados para estudar os efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura no controle e tratamento de diversas afecções. Pesquisas realizadas em ratos constituem um promissor recurso experimental por apresentarem semelhanças anatomofisiológicas com a espécie humana e relativa homogeneidade interespecie (MUNIZ et al., 2004).

Com relação à restrição alimentar e hídrica optou-se por manter a oferta de água antes e durante os experimentos, uma vez que o jejum pré-operatório agrava o estresse oxidativo em ratos Wistar adultos (LIU et al., 1993).

Os fármacos utilizados na indução anestésica (ketamina +xilasina), aplicados por via intraperitoneal, são freqüentemente usados para induzir anestesia em animais. Essa combinação proporciona um plano anestésico profundo, o que permite a realização de procedimentos que exijam grande manipulação do animal (SUMITRA, 2004; RODRIGUES, 2006). A mistura anestésica utilizada propiciou sedação e analgesia adequadas, permitindo a realização do procedimento de coleta de amostras com uma única aplicação. Um animal morreu logo após a aplicação da mistura anestésica e foi substituído. Não ocorreram outras mortes durante a realização do experimento.

O modelo experimental usado no presente estudo para induzir isquemia e reperfusão por torção do testículo na gônada do animal foi descrito por Ryan *et al.* em 1988. Neste modelo, a torção do testículo é feita através da execução de duas voltas completas (720°) e fixação do ligamento mesorquial (sutura transmesorquial), permitindo um insulto vascular ideal, sem trauma parenquimatoso, assemelhando-se

ao que acontece no quadro clínico encontrado em humanos. Segundo Ryan, Gorey e Fitzpatrick (1988) há nesse modelo um comprometimento inicial do retorno venoso, edema intersticial progressivo e crescente aumento da tensão no tecido testicular e no cordão espermático resultando, após certo tempo, em interrupção do fluxo sanguíneo arterial. Ainda segundo esses pesquisadores, a torção experimental de 360° é ineficaz do ponto de vista da produção de congestão venosa e estase arterial (RYAN; GOREY; FITZPATRICK, 1988).

O tempo de isquemia foi fixado em 3 horas. Segundo AKUGÜR et al. (1994), quando a isquemia excede 6 horas de duração a lesão de reperfusão não ocorre. A explicação se deve ao fato de que períodos de isquemia maiores que 4 a 6 horas resultam em lesão tecidual irreversível (RALITCHKOVA *et al*, 1990; BECKER e TURNER, 1995).

Os órgãos apresentam variações na tolerância à isquemia. Estudos demonstraram que o fígado é o órgão dotado de melhor capacidade antioxidante, seguido pelo sangue, coração e músculo (DI MEO; VENDITT; DE LEO, 1996). No testículo, curtos períodos de isquemia parcial não produzem a lesão de reperfusão; a relativa baixa temperatura e a baixa tensão de oxigênio no tecido testicular, podem contribuir possivelmente para prevenção de lipoperoxidação induzida pela isquemia (BERGH et al., 1988).

A detecção da lipoperoxidação é uma das evidências mais usadas para dar suporte ao envolvimento de radicais livres em processos biológicos. É uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (GUTTERIDGE, 1995).

Para avaliação do estresse oxidativo foram aferidas as concentrações de GSH e malonaldeído (MDA) no testículo e no plasma. O MDA, também conhecido como aldeído malônico ($C_3H_4O_2$) é um aldeído de cadeia curta, resultante da decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (BONNES; GUÉRIN, 1992).

A seleção do acuponto Gulai (E29) para aplicação da Ac/EAc fundamentou-se no estudo de Cakmak et al. (2008). Foram utilizadas as mesmas intensidades e frequências de corrente elétrica para a estimulação transcutânea, buscando reproduzir no rato os efeitos observados em humanos pelos autores citados. Esperava-se que o aumento do fluxo sanguíneo demonstrado por aqueles

pesquisadores após a aplicação da EAc pudesse atenuar o estresse oxidativo e a inflamação presentes na torção/destorção do testículo.

Considerando que a torção testicular em duas voltas completas (720°) reduz drasticamente o sangue que chega ao órgão reprodutor, como se esperar que a aplicação da Ac/EAc possa atenuar os efeitos da isquemia/reperfusão?

Uma das melhores técnicas disponíveis para avaliação do fluxo sanguíneo testicular, segundo postulam Becker, Prillaman e Turner (1997), é a Doppler fluxometria a laser, pois permite mensuração contínua do fluxo sanguíneo microvascular, enquanto a maioria dos outros métodos descritos fornece uma determinação estática, em períodos de tempo predeterminados, de vasos sanguíneos mais calibrosos. Naquele estudo ficou demonstrado que a perfusão de testículos de ratos submetidos a torção de 720 graus é reduzida para 8% dos valores controles (BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997). Valores menores foram encontrados por Turner e Brown (1993), utilizando a técnica com microesferas radioativas (valores de fluxo sanguíneo variando de 3% a 4%).

Efeitos menos drásticos já haviam sido observados por Unlüer, Ercan e Akdas (1984). Esses pesquisadores observaram reduções mais brandas do fluxo sanguíneo após torção de 720 graus, variando entre 8% e 16%, através do *clearance* de xenônio-133. Um resultado ainda mais contundente foi apresentado por Palmer, Plzak e Cromie (1997), utilizando Doppler fluxometria a laser. Estes pesquisadores mostraram valores de fluxo sanguíneo residual de 38,3% com o mesmo grau de torção, sugerindo que a torção de 720 graus não é um modelo preciso de isquemia testicular, pois permite a passagem de sangue para o testículo. Apesar da torção experimental de 720 graus poder restringir acentuadamente o fluxo sanguíneo testicular, existe variação na quantidade absoluta de suprimento sanguíneo persistente para o testículo (TURNER; BROWN, 1993).

A explicação para a presença de fluxo sanguíneo residual demonstrada pelos trabalhos citados tem sua explicação na anatomia dos ratos. O canal inguinal do rato tem continuidade com a cavidade abdominal, e o testículo é impedido de retornar à cavidade abdominal apenas em função da existência de um tampão de gordura supra-epididimário (FERREIRA et al., 2000).

No presente estudo, a EAc (2 e 10Hz) promoveu aumento significativo nas concentrações de GSH tecidual nos grupos G4 (53,8±17,6 vs. 32,4±2,33, p<0,05) e G5 (69,7±12,4 vs. 32,4±2,33, p<0,001) comparados ao controle G1. Por outro lado, a

Ac não foi capaz de alterar significativamente as concentrações de GSH no grupo G3 comparado ao G1 ($45,5 \pm 10,2$ vs. $32,4 \pm 2,33$). Os resultados obtidos também comprovaram um aumento significativo nas concentrações de GSH plasmático (G4xG1: $82,4 \pm 5,95$ vs. $24,1 \pm 0,42$, $p < 0,001$ e G5xG1: $34,6 \pm 3,22$ vs. $24,1 \pm 0,42$, $p < 0,001$).

Silva et al. (2011) demonstraram que a EAc aplicada durante 30 minutos, em sessão única, utilizando diferentes frequências (10 e 100 Hz) induz um aumento significativo das concentrações plasmáticas e teciduais (fígado e rim) de GSH. O efeito protetor da Ac/EAc também foi demonstrado por Lima et al. (2012) em retalhos cutâneos randomizados em dorso de ratos Wistar. Esses pesquisadores demonstraram um aumento significativo das concentrações teciduais e plasmáticas de GSH no 7º dia do experimento, após duas aplicações (dias 3 e 7) de EAc nas frequências de 3 e 100 Hz. Santos et al. (2013) estudaram os efeitos da acupuntura sobre o estresse oxidativo no ovário e no plasma de ratas. Os autores concluíram que a EAc, aplicada nas frequências de 2 e 100 Hz, durante 20 minutos, em dias alternados, durante 10 dias, proporcionou um aumento das concentrações de GSH plasmático e tecidual. A estimulação com agulhas (Ac) sem o acréscimo da corrente elétrica produziu efeito semelhante no plasma das ratas mas foi inócua no tecido ovariano. Assim, tanto baixas (2, 3, 10 Hz) quanto altas frequências (100 Hz), usadas em diferentes intervalos (5, 20 e 30 minutos), em aplicação única ou múltipla podem promover o aumento das concentrações de GSH em diferentes tecidos e no plasma dos ratos submetidos à EAc, assegurando proteção antioxidativa aos animais tratados.

Com relação à peroxidação lipídica, verificou-se um aumento significativo nas concentrações de MDA tecidual nos grupos G4 ($0,295 \pm 0,028$ vs. $0,113 \pm 0,068$, $p < 0,01$) e G5 ($0,378 \pm 0,112$ vs. $0,113 \pm 0,068$, $p < 0,001$) comparados ao controle G1. O aumento da peroxidação lipídica foi mais marcante no plasma onde houve aumento global das concentrações de MDA em todos os grupos estudados. Os valores encontrados foram, respectivamente $0,310 \pm 0,133$ vs. $0,092 \pm 0,069$, $p < 0,001$ (G2 vs. G1), $0,365 \pm 0,040$ vs. $0,092 \pm 0,069$, $p < 0,001$ (G3 vs. G1), $0,385 \pm 0,078$ vs. $0,092 \pm 0,069$, $p < 0,001$ (G4 vs. G1) e $0,395 \pm 0,087$ vs. $0,092 \pm 0,069$, $p < 0,001$ (G5 vs. G1).

Esses resultados são conflitantes com um estudo realizado por outro pesquisador. Wang et al. (2011) estudaram os efeitos da EAc em modelo

experimental de doença de Parkinson em camundongos e verificaram que o uso da EAc (100 Hz) reduziu significativamente as concentrações cerebrais de MDA no 7º dia do experimento. Como explicar achados tão diferentes? Uma explicação poderia estar relacionada ao tamanho dos animais testados por Wang et al., que utilizaram camundongos no estudo, tendo em vista que o rato é muito maior que o camundongo. Um outro estudo, mais antigo, utilizando ratos, mostrou resultados semelhantes. Siu et al. (2004) trataram ratos submetidos aos efeitos da isquemia/reperfusão cerebral com EAc (2 Hz, 30 min) em sessão única e demonstraram um aumento da atividade de enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e superóxido dismutase e concomitante diminuição da peroxidação lipídica. Nos animais não isquêmicos a EAc não alterou as atividades dessas enzimas. Evidentemente são necessários estudos adicionais para elucidação destes questionamentos.

A MPO catalisa a oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de um halogênio, constituindo a ligação entre o peróxido de hidrogênio-halogênio-MPO um sistema altamente tóxico para os microorganismos (PEDRO *et. al.*, 2003). Além disso a MPO forma radicais livres e substâncias oxidantes citotóxicas difusíveis que promovem lesões oxidativas aos tecidos e a células endoteliais no contexto da resposta inflamatória aguda. Em outras palavras, a MPO reflete o grau do processo inflamatório agudo (PEDRO *et. al.*, 2003).

Com relação à inflamação os achados mostraram que a EAc (2Hz e 10Hz) diminuiu significativamente a atividade da MPO no testículo dos ratos submetidos à torção do testículo (grupos G4-G5), comparados ao controle G1. Entretanto não houve diferença significativa na atividade da MPO nos ratos submetidos ao agulhamento (Ac). Esse achados já foram relatados por outros pesquisadores, estudando os efeitos da Ac/EAc sobre diferentes órgãos e tecidos. Santos et al. (2013), demonstraram a ação anti-inflamatória da Ac/EAc no tecido ovariano, confirmada pela redução da atividade da MPO em todos os tipos de estimulação (AC, EAc2 Hz e EAc 10 Hz). A redução da atividade da MPO com a utilização da AC já foi demonstrada em trabalho recentemente publicado por Da Silva et al. (2011), utilizando modelo experimental de peritonite em camundongos. Nessa pesquisa, a acupuntura aplicada a um único ponto, durante 10 minutos sem estimulação elétrica, provocou significativos efeitos anti-inflamatórios, com redução da atividade da MPO.

Lima et al. (2011) estudaram os efeitos da EAc em retalhos cutâneos randomizados em ratos e constataram significativa redução da atividade da MPO.

Ao término desse estudo constata-se que os resultados aqui obtidos ratificam em parte os achados obtidos por outros pesquisadores. O aumento de GSH ocorreu nos vários estudos apresentados e foi amplamente comprovado neste experimento (SILVA et al., 2011; LIMA et al., 2011; SANTOS et al., 2013). A redução da atividade da MPO também foi constatada em outros estudos (LIMA et al, 2011; Da SILVA et al., 2011; SANTOS et al., 2013). Não se encontrou ainda uma explicação para o aumento da peroxidação lipídica identificada após a aplicação da EAc, considerando que outros pesquisadores demonstraram uma redução da lipoperoxidação, como se verificou no estudo de Siu et al. (2005).

6 CONCLUSÃO

Nas condições em que foi desenvolvido este trabalho, resta demonstrado:

- 1) A acupuntura e a eletroacupuntura reduzem o estresse oxidativo local e sistêmico e atenuam a resposta inflamatória.
- 2) A eletroacupuntura promove aumento local e sistêmico da peroxidação lipídica no plasma e no testículo de ratos saudáveis submetidos à torção/distorção do testículo.

REFERÊNCIAS

AHMED, F.A.; WHELAN, J.; ANNE M.; JEQUIER, A.M.; CUMMINS, J.M. Torsion-induced injury in rat testes does not affect mitochondrial respiration or the accumulation of mitochondrial mutations. **Int. J. Androl.**, v. 23, p. 347-356, 2000.

AKCORA, B.; ALTUG, M.E.; KONTAS, T.; ATIK, E. The protective effect of darbepoetin alfa on experimental testicular torsion and detorsion injury. **Int. J. Urol.**,v.14, n.9, p. 846-50, 2007.

AKGÜR, F.M.; KILINC, K.; AKTUG, T.; OLGUNER, M. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. **J. Urol.**, v. 15, p. 1715-1717, 1994.

AKGUR,F.M.; KILINC, K.; AKTUG, T. Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. **Urol Res.**,v. 21, p. 395-9, 1993.

AKSOY, H.; YAPANOGLU, T.; AKSOY, Y.; ÖZBEY, I.; TURHAN, H.; GURSAN, N. Dehydroepiandrosterone treatment attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion in rats. **J. Pediatr. Surg.**, v. 42, p. 1740-1744, 2007.

AW, T.Y. Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. **News Physiol. Sci.**; v.18, p.201-4, 2003.

BALDRY, P. **Acupuntura, Pontos-gatilhos e Dor Musculoesquelética**. São Paulo: Roca, 2008;486p.

BECKER, E. J.; PRILLAMAN, H. M.; TURNER, T. T. Microvascular blood flow is altered after repair of testicular torsion in the rat. **J. Urol.**, v.157, n. 4, p. 1493-98, 1997.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v.47, p.233-261, 1996.

BRADLEY, J. R.; THIRU, S.; POBER, J. S. Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. **Am J Pathol.**; v.46, n.1, p.27-32, 1995.

CAKMAK, Y.O.; BEKIROGLU, N.; AKPINAR, I.N.; EKINCI, G. Point- and frequency-specific response of the testicular artery to abdominal electroacupuncture in humans. **Fertil. Steril.**, v.90, p.1732-8, 2008.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHEN, X. H.; HAN, J. S. Analgesia induced by electroacupuncture of different frequencies is mediated by different types of opioid receptors: another cross tolerance study. **Behav. Brain. Res.**,v.47, p.143-9, 1992.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Rio de Janeiro, 1999.

DA SILVA, M.D.; GUGINSKI, G.; WERNER, M.F.; BAGGIO, C.H.; MARCON, R.; SANTOS, A.R. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. **Evid Based Complement. Alternat. Med.**, 217946,2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3135881/?tool=pubmed>. Acesso em 26 Jan 2014.

DAI, M.; MA, X-P.; SHI, Z.; WU, H-G.; ZHAO, T-P.; JIANG, G-N. Effect of Acupuncture on Serum SOD and MDA of Rats in Menopause. **J. Acupunct. Tuina. Sci.**, v.6, n.79-82, 2008

EKICI S, DO AN EKICI AI, ÖZTÜRK G, BENLI AKSUNGAR F, SINANO LU O, TURAN G, LÜLECI N. Comparison of melatonin and ozone in the prevention of reperfusion injury following unilateral testicular torsion in rats. **Urology**,v.80,n.4, p.899-906, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

CHIRICO, S. High performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. **Methods in Enzimology.**, v. 233, p. 314-318, 1994.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Lesão e morte celular**. In: ROBBINS: Patologia estrutural e funcional. 5.ed.,Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996, p.1-30.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of celular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 257, n. 4 (Pt 1), p. L163-173, 1989.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 47-97, 2002.

FERREIRA, U.; NETTO JÚNIOR, N.R.; ESTEVES, S.C.; RIVERO, M.A.; SCHIRREN, C. Comparative study of the fertility potential of men with only one testis. **Scand. J. Urol. Nephrol.**; v. 25, n. 4, p. 255-9, 1991.

FIGUEIREDO, L.M.; SILVA, A.H.; PRADO NETO, A.X.; HISSA, M.N.; VASCONCELOS, P.R.; GUIMARÃES, S.B. Electroacupuncture stimulation using different frequencies (10 and 100 Hz) changes the energy metabolism in induced hyperglycemic rats. **Acta Cir. Bras.**,v.26, Supl 1, p.47-52, 2011

FILSHIE, J.; WHITE, A. **Acupuntura médica: um enfoque científico do ponto de vista ocidental**. São Paulo: Roca, 2002. p.185-198.

GALLEANO, M. PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocyte resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1271, n. 2-3, p. 321-326, 1995.

GUIMARÃES, S. B. **Efeitos do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico ou ternatina sobre o estresse oxidativo em ratos jovens submetidos à torção do cordão espermático**. Dissertação (Doutorado em Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

GUIMARÃES, S.B.; KIMURA, O.S.; VASCONCELOS, P.R. Dimethylsulfoxide attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. **Acta Cir Bras.**,25, n.4, p.357-61, 2010.

GUIMARÃES, S.B.; SANTOS, J.M.; ARAGÃO, A.A.; KIMURA, O.S.; SILVEIRA, E.R.; VASCONCELOS, P.R. Ternatin pretreatment attenuates testicular injury induced by torsion/detorsion in Wistar rats. **Acta Cir Bras.**, v.26, n.4, p.325-8, 2011.

GUIMARÃES, S.B.; SANTOS, J.M.; ARAGÃO, A. A.; DE SANDES, K.O.; BARBOSA, P.H.; DE VASCONCELOS, P.R. Protective effect of alpha-lipoic acid in experimental spermatic cord torsion. **Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 76-80, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.

HASHIMOTO, T; AIKAWA, T. Needling effects on nociceptive neurons in rats spinal cord. **Proceedings of World Congress on Pain IASF, Seattle** p.428, 1993.

HONG, J. P. **Acupuntura: de terapia alternativa a especialidade médica**. São Paulo: Centro de Estudos Integrado de Medicina Chinesa, 2005. 192 p.

HUANG, Z.Z.; CHEN, C.; ZENG, Z.; YANG, H.; OH, J.; CHEN, L.; LU, S.C. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. **FASEB J.**; v,15, n.1, p.19-21. 2001.

JONES, D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. **Methods Enzymol.**; v.348, p.93-112, 2002.

KAWAKITA, K.; FUNAKOSHI, M..Supression of the jawopening reflex by conditioning A-delta fiber stimulation and electroacupuncture in the rat. **Exp. Neurol.**, v.78, n.461-5,1982.

KUMAZAWA, T.; PERL, E. R. Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. **J. Comp. Neurol.**, v.177,p.417-34,1978.

LEITÃO, J.P.; SANTOS, J.M.; VASCONCELOS, R.C.; GARCIA, J.H.; VASCONCELOS, P.R.; GUIMARÃES, S.B. L-alanyl-glutamine dipeptide pretreatment attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. **Acta Cir Bras.** ,v.26, Supl 1,p.21-5, 2011

LLESUY, S.F. Introducción y Espécies Activas de Oxigênio. In: MARRONI, N. P. (org.). **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, p. 21-32.

LIMA, L.P.; DE OLIVEIRA, ALBUQUERQUE A.; DE LIMA SILVA, J.J.; DAS CHAGAS, DE VASCONCELOS, P.R.; GUIMARÃES, S.B. Electroacupuncture attenuates oxidative stress in random skin flaps in rats. **Aesthetic Plast. Surg.**,v.36, n.5, p.1230-5, 2012.

LIN, J.G.; CHEN, W.C.; HSIEH, C.L.; TSAI, C.C.; CHENG, Y.W.; CHENG, J.T.; CHANG, S.L. Multiple sources of endogenous opioid peptide involved in the hypoglycemic response to 15 Hz electroacupuncture at the Zhongwan acupoint in rats. **Neurosci. Lett.**, v.366, n.1, p. 39–42 , 2004.

LIU, C-Z.; YU, J-C.; ZHANG, X-Z.;FUB, W-W.; WANG, T.; HANA, J-X. Acupuncture prevents cognitive deficits and oxidative stress in cerebral multi-infarction rats. **Neurosci. Lett.**, v. 393, p.45-50, 2006.

MARTINS, E. I.; GARCIA, E. G. **Pontos de Acupuntura: guia ilustrado de referência.** São Paulo: Roca 2003; 180 p.

MIHARA, M; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.**, v.86, n. 1, p. 271-278, 1978.

MEISTER, A. Mechanism and regulation of the glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase of Escherichia coli. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 62, p. 315-374, 1989.

MUNIZ, L. R. F.; FARIA, M. H. G.; VASCONCELOS, P. R. L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cir.Bras.**;v.19, n. 5, p. 529-534, 2004.

MUNIZ, L. R. F.; FARIA, M. H. G.; VASCONCELOS, P. R. L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cir.Bras.**, v.19, n. 5, p. 529-534, 2004.

NAKANO, M. A. Y.; YAMAMURA, Y. **Livro dourado da acupuntura em dermatologia e estética.** São Paulo: Center AO, 2010. 303p.

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; PEREZ, J.A.P. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth *in vivo*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, n. 03/04, p. 410-418, 1999.

OZKAN, K.U.; BORAN, Ç.; KILINC, M.; GARIPARDIC, M.; KURUTAS, E.B. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissues antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion-destorsion. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, n. 1, p. 101-103, 2000.

PALMER, J. S.; PLZAK, L. F.; CROMIE, W. J. Comparison of blood flow and histological changes in rat models of testicular ischemia. **J. Urol.**,v. 158, n. 3, pt. 2, p. 1138-1140, 1997.

PEDRO, A. J.; SIQUEIRA, M. C.; SILVA, M.; SILVA, Z.; FONTES, G.; GARD-BRITO, B.; ROCHA, P.; GRIMA, N.; PINTO, H. C.; BICHO, M.; RAMALHO, F.; CARNEIRO DE MOURA, M. Mieloperoxidase como marcador de stress oxidativo na cirrose hepática. **J. Port. Gastrenterol.**, v. 10, p. 209-14, 2003.

REGADERA, J.; NISTAL, M.; PANIAGUA, R. Testis, epididymis, and spermatic cord in elderly men. Correlation of angiographic and histologic studies with systemic arteriosclerosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.109, n.7, p.663-667, 1985.

RODRIGUES, S.F.; OLIVEIRA, M.A.; MARTINS, J.O.; SANNOMIYA, P.; TOSTES, R.C.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B. Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. **Life sci.**, v. 79, p. 1630-1637, 2006.

ROMEO, C.; ANTONUCCIO, P.; ESPOSITO, M.; MARINI, H.; IMPELLIZZERI, P.; TURIACO, N.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A.; ZUCCARELLO, B.; SQUADRITO, F. Raxofelast, a hydrophilic vitamin e-like antioxidant, reduces testicular ischemia-reperfusion injury. **Urol. Res.**, v. 5, p. 367-371, 2004.

RYAN, P.C.; GOREY, T.F.; FITZPATRICK, J.M. Experimental testicular torsion: fixation without parenchymal trauma. **Eur. Urol.**, v. 14, n. 2, p. 141-144, 1988.

SANTOS, E.L.; DIAS, B.H.; DE ANDRADE, A.C.; PASCOAL, A.M.; DE VASCONCELOS FILHO, F.E.; MEDEIROS, F.DAS CHAGAS, GUIMARÃES, S.B. Effects of acupuncture and electroacupuncture on estradiol-induced inflammation and oxidative stress in health rodents. **Acta Cir. Bras.**, v, 28, n.8, p.582-8, 2013.

SEDLAK, J.; LINDASAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, n.1, p.192-205, 1968.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Rad. Biol. Med.**: v.27, n. 9/10, p. 916–21, 1999.

SILVA, A.H.; FIGUEIREDO, L.M.; DIAS, P.A.; PRADO NETO, A.X.; VASCONCELOS, P.R.; GUIMARÃES, S.B. Electroacupuncture attenuates liver and kidney oxidative stress in anesthetized rats. **Acta Cir. Bras.**; v.26, Suppl 1, p.60-5, 2011.

SIU F.K.; LO, S.C.; LEUNG, M.C. Electro-acupuncture potentiates the disulphide-reducing activities of thioredoxin system by increasing thioredoxin expression in ischemia-reperfused rat brains. **Life Sci.**, v.77, n.4, p.386-99, 2005.

STENER-VICTORIN E, FUJISAWA S, KUROSAWA M. Ovarian blood flow (OBF) responses to electroacupuncture stimulation depend on estrous cycle and on site and frequency of stimulation in anesthetized rats. **J. Appl. Physiol.**, v.101, p.84–91,2006.

SUMITRA, M.; MANIKANDANA, P.; RAOB, K.V.K.; NAYEEMC, M.; MANOHARD, B. M.; PUVANAKRISHNAN, R. Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine,

xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats-A comparative analysis. **Life sci.**, v. 75, p. 1887-1896, 2004.

TSUCHIYA, M.; SATO, F. E.; INOUE, M.; ASADA, A. Acupuncture Enhances Generation of Nitric Oxide and Increases Local Circulation. **Anesth. Analg.**, v.104, p.301-7, 2007.

TURNER, T. T.; BROWN, K. J. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. **Biol. Reproduc.**, v. 49, n. 2, p.401-7, 1993.

UNLÜER, S. E.; ERCAN, M. T.; AKDAS, A. Testicular blood flow in experimental torsion and epididymo-orchitis measured by ¹³³Xe clearance technique in rabbits. **Urological Res.**,v. 12, n. 3, p. 183-6, 1984.

WANG, H.; PAN, Y.; XUE, B.; WANG, X.; ZHAO, F.; JIA, J.; LIANG, X.; WANG, X. The antioxidative effect of electro-acupuncture in a mouse model of Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 6, n.5, e19790, 2011.

WOOLF, C. J. **Segmental afferent fibre-induced analgesia**: transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) and vibration. In: Wall P. D. Melzack R.(eds) Textbook of Pain. **Churchill Livingstone, New York**, p. 884-96, 1983.

WRIGHT, J.E. Torsion of the testis. **Br. J. Surg.**, v. 64, p.274-276, 1977.

YAMAMURA, Y. **Acupuntura: a arte de inserir**. São Paulo: ROCA, 2001. p 37-39.

APENDICE A

Curvas-padrão de GSH e MPO

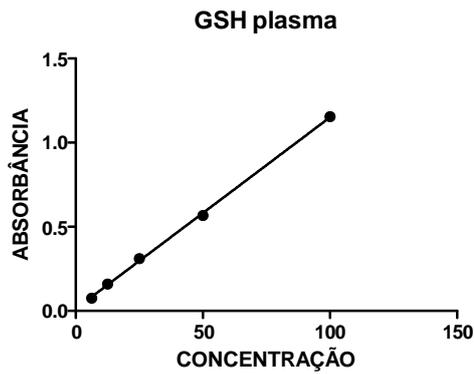


FIGURA 17 - Curva padrão para cálculo da concentração de glutatona (GSH) no plasma

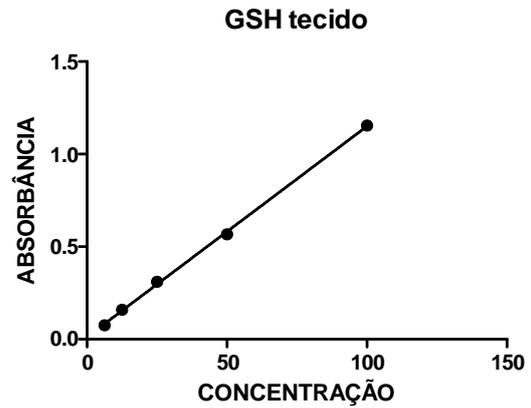
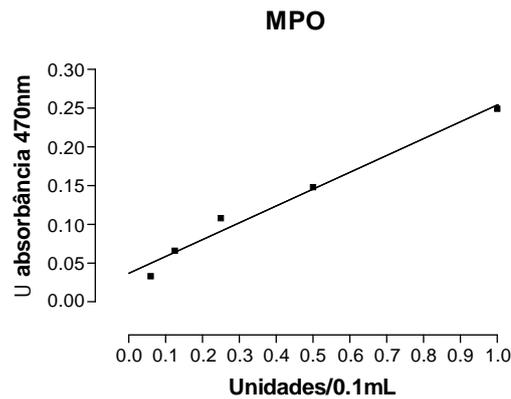


FIGURA 18 Curva padrão para cálculo da concentração de glutatona (GSH) no tecido (testículo)



9 Curva padrão para cálculo da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido (testículo)

APÊNDICE B
DADOS BRUTOS
PESO DOS RATOS

RATO nº	GRUPO	PESO (g)
1	G1 - CONTROLE BASAL	276
2	G1 - CONTROLE BASAL	263
3	G1 - CONTROLE BASAL	269
4	G1 - CONTROLE BASAL	240
5	G1 - CONTROLE BASAL	258
6	G1 - CONTROLE BASAL	265
7	G2 T/D (SHAM)	266
8	G2 T/D (SHAM)	263
9	G2 T/D (SHAM)	260
10	G2 T/D (SHAM)	230
11	G2 T/D (SHAM)	268
12	G2 T/D (SHAM)	265
13	G3 T/D + Ac	270
14	G3 T/D + Ac	265
15	G3 T/D + Ac	290
16	G3 T/D + Ac	290
17	G3 T/D + Ac	290
18	G3 T/D + Ac	290
19	G3 T/D + EAc 2Hz	270
20	G3 T/D + EAc 2Hz	260
21	G3 T/D + EAc 2Hz	260
22	G3 T/D + EAc 2Hz	300
23	G3 T/D + EAc 2Hz	260
24	G3 T/D + EAc 2Hz	290
25	G3 T/D + EAc 10 Hz	252
26	G3 T/D + EAc 10 Hz	264
27	G3 T/D + EAc 10 Hz	230
28	G3 T/D + EAc 10 Hz	226
29	G3 T/D + EAc 10 Hz	230
30	G3 T/D + EAc 10 Hz	242

APÊNDICE C

DADOS BRUTOS

Concentrações de GSH no testículo

Rato nº	G1-Sham	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+Eac 2	G5- T/D+Eac 10
1	28,280	28,866	37,654	37,947	70,170
2	31,210	31,796	64,897	47,321	73,685
3	33,260	31,503	37,361	38,240	44,978
4	33,553	33,553	46,735	47,614	77,786
5	34,725	31,210	44,978	74,271	74,857
6	33,553	45,563	41,462	77,200	76,907

Concentrações de GSH no plasma

Rato nº	G1-Sham	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+Eac 2	G5- T/D+Eac 10
7	23,593	24,707	22,861	76,203	32,938
8	24,091	21,806	22,832	76,106	32,879
9	23,535	23,857	24,443	81,476	30,419
10	24,501	30,272	24,707	82,355	35,604
11	24,150	23,213	26,113	87,042	35,897
12	24,501	23,857	27,343	91,143	39,705

Concentrações de MDA no testículo

Rato nº	G1-Sham	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+Eac 2	G5- T/D+Eac 10
13	0,053	0,114	0,221	0,288	0,265
14	0,140	0,167	0,312	0,294	0,288
15	0,045	0,174	0,055	0,284	0,562
16	0,154	0,083	0,355	0,281	0,313
17	0,215	0,210	0,192	0,273	0,418
18	0,073	0,046	0,175	0,350	0,423

Concentrações de MDA no plasma

Rato nº	G1-Sham	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+Eac 2	G5- T/D+Eac 10
19	0,070	0,250	0,310	0,320	0,370
20	0,050	0,200	0,340	0,380	0,330
21	0,220	0,360	0,370	0,280	0,500
22	0,120	0,300	0,380	0,450	0,510
23	0,040	0,200	0,360	0,490	0,340
24	0,050	0,550	0,430	0,390	0,320

APÊNDICE D**DADOS BRUTOS**

Atividade da MPO no testículo					
Rato nº	G1-Sham	G2 - T/D	G3 - T/D+Ac	G4 - T/D+Eac 2	G5- T/D+Eac 10
25	6,895	7,416	6,877	2,734	0,3572
26	7,015	6,420	4,213	5,591	0,2310
27	5,457	4,946	7,084	5,609	0,0100
28	6,158	5,637	4,374	0,254	0,8400
29	7,987	6,508	4,006	0,296	0,4430
30	6,913	7,872	1,088	0,291	0,4020

APÊNDICE E

DADOS BRUTOS

Avaliação histológica do testículo

G1 (Grupo Sham)

Rato Nº	TUBULOS SEMINÍFEROS			INTERSTICIO		
	DEE	DCCG	RTS	H	E	Pr
1						
2	A	P+	A	A	P+	A
3						
4	A	P+	A	A	P+	A
5	A	P+	A	P+	P+	A
6	A	P+	A	A	P+	A

Notas¹: A = Ausência P = presença

Intensidade da lesões:(+),(++),(+++)

DEE - Degeneração de espermatozoides e espermátides

DCCG - Degeneração da camada de células germinativas

RTS - Ruptura dos túbulos seminíferos

H - Hemorragia; E - Edema; Pr - Proliferação das células de Leydig

Notas²: As lâminas R1 e R3 foram excluídas do estudo por critérios morfológicos

G2 (Isquemia/Reperusão)

Rato Nº	TUBULOS SEMINÍFEROS			INTERSTICIO		
	DEE	DCCG	RTS	H	E	Pr
7	A	P++	A	P+	P+	A
8	A	P+	A	A	P+	A
9	A	P+	A	P+	P+	P+
10						
11	A	P++	A	P+	P+	A
12	A	P+	A	A	P+	A

Notas¹: A = Ausência P = presença

Intensidade da lesões:(+),(++),(+++)

DEE - Degeneração de espermatozoides e espermátides

DCCG - Degeneração da camada de células germinativas

RTS - Ruptura dos túbulos seminíferos

H - Hemorragia; E - Edema; Pr - Proliferação das células de Leydig

Notas²: A lâmina R10 for excluída do estudo por critérios morfológicos

APÊNDICE F

DADOS BRUTOS

Avaliação histológica do testículo

G3 (Grupo Acupuntura)

Rato Nº	TUBULOS SEMINÍFEROS			INTERSTICIO		
	DEE	DCCG	RTS	H	E	Pr
13	A	P+	A	P+	P++	A
14	A	P+	A	A	P++	A
15	A	P+	A	P+	P+	A
16	A	P+	A	P+	P+	A
17	A	P++	A	P+	P++	A
18	A	P+	A	A	P+	A

Notas¹: A = Ausência P = presença

Intensidade da lesões:(+),(++),(+++)

DEE - Degeneração de espermatozoides e espermátides

DCCG - Degeneração da camada de células germinativas

RTS - Ruptura dos túbulos seminíferos

H - Hemorragia; E - Edema; Pr - Proliferação das células de Leydig

Notas²: As lâminas G1R1 e G1R3 foram excluídas do estudo por critérios morfológicos

G4 (Eletroacupuntura 2 Hz)

Rato Nº	TUBULOS SEMINÍFEROS			INTERSTICIO		
	DEE	DCCG	RTS	H	E	Pr
19	A	P+	A	P+	P+	A
20	A	P++	A	P+++	A	A
21	A	P++	A	A	P+	A
22	A	P+	A	A	P+	A
23	A	P+	A	P+++	A	A
24	A	P+	A	A	P+	A

Notas¹: A = Ausência P = presença

Intensidade da lesões:(+),(++),(+++)

DEE - Degeneração de espermatozoides e espermátides

DCCG - Degeneração da camada de células germinativas

RTS - Ruptura dos túbulos seminíferos

H - Hemorragia; E - Edema; Pr - Proliferação das células de Leydig

APÊNDICE G

DADOS BRUTOS

Avaliação histológica do testículo

G5 (Eletroacupuntura 10 Hz)

Rato Nº	TUBULOS SEMINÍFEROS			INTERSTÍCIO		
	DEE	DCCG	RTS	H	E	Pr
19	A	P++	A	A	P+	A
20	A	P+	A	A	P+	A
21	A	P+	A	A	P+	A
22	A	P+	A	A	P+	A
23	A	P++	A	P+++	A	A
24	A	P++	A	A	P+	A

Notas¹: A = Ausência P = presença

Intensidade da lesões:(+),(++),(+++)

DEE - Degeneração de espermatozoides e espermátides

DCCG - Degeneração da camada de células germinativas

RTS - Ruptura dos túbulos seminíferos

H - Hemorragia; E - Edema; Pr - Proliferação das células de Leydig

ANEXO 1



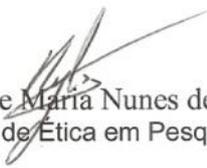
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 18/2012, sobre o projeto intitulado: “**AVALIAÇÃO DO EFEITOS PROTETORES DE ELETROACUPUNTURA ABDOMINAL SOBRE A LESÃO DECORRENTE DA TORÇÃO/DESTORÇÃO DO TESTÍCULO EM RATOS**”, de responsabilidade de Porfirio Cezar Passos Acioli está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de maio de 2012.

Fortaleza, 24 de maio de 2012


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA