



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS

LORENA PICANÇO DE LIMA

**EFEITOS DA ACUPUNTURA MANUAL E DA ELETROACUPUNTURA SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM RATOS**

FORTALEZA

2011

LORENA PICANÇO DE LIMA

**EFEITOS DA ACUPUNTURA MANUAL E DA ELETROACUPUNTURA SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia celular no estresse.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

FORTALEZA

2011

LORENA PICANÇO DE LIMA

**EFEITOS DA ACUPUNTURA MANUAL E DA ELETROACUPUNTURA SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia celular no estresse.

Aprovada em 13/10/2011

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a Nirla Gomes Guedes
Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ)

A Deus.

Aos meus pais, Lima e Carmem.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães, pela competente orientação e incentivo; que, com sua sabedoria, paciência e compreensão, soube me guiar por esta trajetória e por seu exemplo como médico e como pessoa na construção de um mundo melhor.

Ao programa de Pós-Graduação em Médico-Cirúrgica da Universidade Federal do Ceará pelo direcionamento profissional e científico que me proporcionou.

Ao Dr. Joaquim José de Lima Silva pelo apoio e doação de seu valioso conhecimento contribuindo para a realização desta pesquisa.

À minha família (Lima, Carmen, Layara e Luana) por mais essa conquista.

Ao meu noivo, Flávio Cavalcante Gusmão, por seu incentivo, preocupação e dedicação e por tudo o que já vivemos e ainda vamos viver.

À técnica de Enfermagem Daniele Feijão de Sousa que participou diretamente deste trabalho e me ajudou em todos os momentos.

A todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

A isquemia dos retalhos cutâneos aumenta a morbidade dos procedimentos em reconstrução cirúrgica. As lesões decorrem da parada/redução do fluxo sanguíneo (isquemia) e são agravadas pela reintrodução de sangue rico em oxigênio (reperusão). Acupuntura (AC) promove a estimulação de pontos específicos do corpo (acupontos) com objetivo de atingir um efeito terapêutico ou homeostático. Eletroacupuntura (EA) consiste na aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade e frequência variável através da agulha previamente inserida em determinado acupontos. A escolha do formato da onda, frequência e intensidade da descarga definem o tipo de efeito que será atingido. Considerando que alguns estudos publicados têm demonstrado os efeitos protetores da AC/EA na preservação de retalhos cutâneos, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da AC/EA no processo inflamatório e no estresse oxidativo em retalhos cutâneos randomizados, em ratos. Quarenta ratos foram utilizados no estudo. Trinta-e-dois animais foram submetidos à construção do retalho dorsal (8 x 2,5cm) e posteriormente distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n = 8): G-2 (trauma cirúrgico); G-3 (Acupuntura); G-4 (EA 3Hz); G- 5 (EA 100Hz). Os 8 ratos restantes (G-1) serviram como controle basal. Todos os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (90mg/kg) + xilazina (10mg/kg) nos dias 1, 3 e 7. No dia 1, agulhas de aço inoxidável foram introduzidas nos acupontos DM-14[Dazhui], DM-2[Yaoshu] e F-13[Zhangmen] bilateralmente, nos ratos do grupo G3. Esses acupontos se localizam, respectivamente, na borda cranial, caudal e próximo ao bordo lateral do retalho. No G4, após a inserção das agulhas, foi aplicada uma estimulação elétrica (3 Hz, 10 mA) durante 30 minutos. Os procedimentos foram repetidos nos dias 3 e 7. No G5 utilizou-se uma frequência de 100Hz. Amostras de sangue e de pele foram coletadas ao término dos procedimentos (AC/EA) nos grupos G3, G4, G5 e após 30 minutos de anestesia nos grupos G1/G2, para dosagens de mieloperoxidase (MPO), Malonaldeído (MDA) e glutathiona (GSH). Os resultados foram comparados utilizando-se o teste t para amostras não pareadas. A AC diminuiu a atividade da MPO na pele dos ratos G3 ($6,41 \pm 1,39$ vs. $3,11 \pm 2,80$, $p < 0,001$). Houve também diminuição significativa ($p < 0,01$) com a EA (3 Hz) ($6,41 \pm 1,39$ vs. $1,19 \pm 0,39$, $p < 0,0001$) e 100 Hz ($6,41 \pm 1,39$ vs. $1,38 \pm 0,19$) comparados com o G2. A AC induziu aumento significativo das concentrações de GSH no plasma ($6,56 \pm 1,32$ vs. $21,48 \pm 4,40$) e na pele ($54,15 \pm 3,10$ vs. $180,50 \pm 10,35$). Houve aumento significativo as concentrações plasmáticas e teciduais nos ratos do G4/G5. A concentração de MDA aumentou significativamente nos

grupos G4/G5. Considerando os resultados encontrados, conclui-se que a AC/EA atenuam a resposta inflamatória na pele e reduzem o estresse oxidativo sistêmico e local, promovendo o aumento das concentrações plasmáticas e teciduais de GSH. Por outro lado, a EA exerce efeito pró-peroxidativo no plasma e na pele de ratos saudáveis, submetidos ao estresse cirúrgico.

Palavras-chave: Retalhos Cirúrgicos. Inflamação. Estresse oxidativo. Acupuntura. Eletroacupuntura.

ABSTRACT

Ischemia of the skin flaps increases the morbidity in surgical reconstruction procedures. Injuries resulting from the interruption or reduction of blood flow (ischemia) and are exacerbated by the reintroduction of oxygen-rich blood (reperfusion). Acupuncture (AC) promotes the stimulation of specific body points (acupoints) in order to achieve a therapeutic or homeostatic effect. Electroacupuncture (EA) is the application of electric current of low intensity and variable frequency through the needle inserted into specific acupoints previously. The choice of waveform, frequency and discharge intensity define the type of effect that will be reached. Whereas some published studies have demonstrated the protective effects of AC/EA in the preservation of skin flaps, this study aimed to investigate the effects of AC/EA in inflammation and oxidative stress in randomized skin flaps in rats. Forty rats were used in the study. Thirty-two animals underwent dorsal flap construction (8 x 2.5cm) and then were distributed randomly into 4 groups (n = 8): G-2 (surgical trauma), G-3 (Acupuncture), G -4 (2 Hz EA), G-5 (EA 100 Hz). The remaining 8 rats served as baseline control (G-1). All rats were anesthetized intraperitoneally with ketamine (90mg/kg) + xylazine (10mg/kg) on days 1, 3 and 7. In day 1 stainless steel needles were introduced in DM-14 [Dazhui], DM-2 [Yaoshu] and F-13 [Zhangmen] acupoints bilaterally in G3 rats. The acupoints are located, respectively, on the cranial, caudal edges and near the lateral edge of the skin flap. In G4, after insertion of needles, EA was applied (3Hz, 10 mA) for 30 minutes. The procedures were repeated on days 3 and 7. In G5 a frequency of 100Hz was used. Blood and skin samples were collected at the end of procedures (AC/AE) in groups G3, G4, G5, and after 30 minutes of anesthesia in G1/G2 rats for myeloperoxidase (MPO), malonaldehyde (MDA) and glutathione (GSH) assays. The results were compared using the t test for unpaired samples. Skin MPO activity decreased significantly in G3 rats (6.41 ± 1.39 vs. 3.11 ± 2.80 , $p < 0.001$). There was also a significant decrease (6.41 ± 1.39 vs. 1.19 ± 0.39) of MPO activity with EA (3 Hz) and 100 Hz (6.41 ± 1.39 vs. 1.39 ± 0.19) compared with G2. Plasma (6.56 ± 1.32 vs. 21.48 ± 4.40) and tissue (54.15 ± 3.10 vs. 180.50 ± 10.35) GSH levels increased significantly in G3 rats. A significant increase in plasma and tissue GSH concentrations occurred in G4/G5 rats. MDA levels increased significantly in groups G4/G5. Considering these results it is concluded that both AC/EA, applied to healthy rats, attenuate skin inflammatory response and reduce systemic and local oxidative stress, promoting an increase in plasma and tissue concentrations of GSH. On

the other hand, EA has pro-peroxidative effect in plasma and skin of healthy rats subjected to surgical stress.

Keywords: Surgical Flaps. Inflammation. Oxidative stress. Acupuncture. Electroacupuncture.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acupuntura manual
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato sintetase
DM – 2	Acuponto Yaoshu
DM – 14	Acuponto Dazhui
EA	Eletoacupuntura
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F – 13	Acuponto Zhangmen
FADH	Dinucleotídio de flavina e adenina
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
Hz	Hertz
mA	Microampére
MPO	Mieloperoxidase
MTC	Medicina tradicional chinesa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
PAF	Fator de agregação plaquetária
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Lesão de isquemia e reperfusão	12
1.2 Radicais livres e relação com lesão de isquemia/reperfusão	15
1.3 Acupuntura (AC) e eletroacupuntura (EA)	17
2 OBJETIVO	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Aspectos éticos	22
3.2 Amostra	22
3.3 Procedimento anestésico	22
3.4 Delineamento experimental	23
3.5 Distribuição da amostra	23
3.6 Desenho do Experimento	24
3.7 Coleta de material para análise	30
3.8 Técnica Laboratorial	32
3.9 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	38
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE A - DADOS BRUTOS CONCENTRAÇÃO DE TBARS, GSH E MPO	56
ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL PARA IMPLEMENTAÇÃO DA PESQUISA	58

1 INTRODUÇÃO

A isquemia dos retalhos cutâneos ocasionando necrose dos mesmos constitui um importante problema clínico, aumentando a morbidade dos procedimentos em reconstrução cirúrgica. Várias medidas têm sido utilizadas para melhorar a sobrevivência desses retalhos, sendo direcionadas principalmente para a melhoria do fluxo sanguíneo e oxigenação dos tecidos, diminuição das necessidades metabólicas ou bloqueio da lesão ocasionada pela reperfusão, induzida pela isquemia (SOUSA FILHO *et al.*, 2008, p. 25).

A lesão de reperfusão é um fenômeno que ocorre quando os tecidos são submetidos à isquemia por um período variável de tempo e, após o qual, o fluxo sanguíneo é refeito. Entretanto, não basta reperfundir os tecidos isquemiados, pois, o suporte sanguíneo re-estabelecido não reverte a lesão causada pela isquemia, nem previne o dano tecidual ocasionado pelo sangue oxigenado nos tecidos do retalho que sofreu tal isquemia (AYDOGAN *et al.*, 2006, p. 3). Logo, é necessário que esses tecidos passem por processos de recuperação eficaz que evitem piores complicações.

A manutenção da sobrevivência do animal depende da captação de substratos energéticos, da sua utilização para a produção da energia necessária ao seu funcionamento e da eliminação dos resíduos tóxicos provenientes do metabolismo. Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados, nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal. A susceptibilidade de uma célula ou de um tecido ao estresse oxidativo depende de um grande número de fatores que incluem a disponibilidade de antioxidantes e a capacidade de inativação ou eliminação dos produtos oxidados formados (JORDÃO JR. *et al.*, 1998, p. 438).

Em condições normais a formação de radicais livres e as defesas antioxidantes se encontram em aproximado estado de equilíbrio. Portanto, é fácil entender que a quebra desta condição em favor dos radicais livres crie uma situação de desequilíbrio que é denominada de estresse oxidativo.

Apesar de extensas pesquisas com utilização de diferentes estratégias para evitar as lesões resultantes da isquemia/reperfusão processo complicações dos retalhos, ainda há muito a ser esclarecido, havendo, portanto, necessidade de novas investigações, tanto experimentais quanto clínicas (SOUSA FILHO *et al.*, 2008, p. 55).

A acupuntura, um tratamento de saúde milenar baseado na Medicina Tradicional Chinesa (MTC), consiste no uso de agulhas inseridas em pontos específicos (JAGGAR, 1992, p. 13; SCHOEN, 1993, p. 39) denominados acupontos. É também uma forma de terapia reflexa, onde o estímulo de uma área age sobre outra(s), através, principalmente de um estímulo nociceptivo (LUNDEBERG, 1993, p. 72). A acupuntura ficou conhecida no ocidente pela sua eficiência no tratamento das dores musculoesqueléticas. Porém, muitas outras condições clínicas podem se beneficiar do tratamento (MEDEIROS e SAAD, 2009, p. 70). A eletroacupuntura (EA) é um método terapêutico utilizado para potencializar os efeitos da acupuntura manual e consiste na aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade e frequência variável em agulhas metálicas introduzidas no corpo do animal ou ser humano.

Os mecanismos bioquímicos que explicam os efeitos da acupuntura nos sistemas antioxidantes ainda não foram satisfatoriamente esclarecidos. Liu *et al.* (2006, p. 47) 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 glutathione peroxidase (GSH-Px). Por outro lado, Siu, Lo e Leung (2005, p. 389) demonstraram que a EA aumenta a expressão de tioredoxina nos cérebros isquêmicos de ratos, minimizando as alterações oxidativas dos grupos tiol das proteínas adjacentes à lesão.

Bar *et al.* (2002, p. 8) demonstraram que a acupuntura induz uma melhoria da circulação periférica em pacientes com distrofia simpática reflexa dos membros inferiores. Uema *et al.* (2008, p. 355) verificaram um aumento da sobrevivência de retalhos cutâneos em ratos Wistar, após a aplicação da eletroacupuntura durante oito dias. O aumento da viabilidade de retalhos cutâneos foi demonstrado utilizando acupuntura manual e eletroacupuntura nas frequências de 2 Hz e 80 Hz e corrente de 2 mA e 20 mA.

1.1 Lesão de isquemia e reperfusão

A isquemia decorre da obstrução do fluxo sanguíneo. Com o retorno do fluxo sanguíneo, ocorre a reperfusão tecidual, determinando a brusca chegada do oxigênio e nutrientes ao tecido, com significativo aumento dos radicais livres, fenômeno de extrema importância, principalmente durante os primeiros 60 a 90 segundos, já que lesa a área reperfundida, ocasionando microinfartos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989, p. 543). A lesão de reperfusão é um termo usado para descrever as alterações, funcionais e estruturais,

que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia. Em adição à reversão da isquemia, a restauração do fluxo sanguíneo pode resultar em um número de efeitos nocivos: necrose de células irreversivelmente lesadas, acentuado edema celular e restauração não uniforme do fluxo para todas as porções do tecido. Esta restauração caótica do fluxo tissular é conhecida como fenômeno do não refluxo, que é o resultado de um círculo vicioso de disfunção endotelial vascular, redução da perfusão local, mais alterações disfuncionais, mais edema e outros (EVORA *et al.*, 1996, p. 69). A reversibilidade deste processo relaciona-se diretamente com a duração da isquemia, o objetivo terapêutico principal é restabelecer a reperfusão o mais rápido possível. Embora o benefício da reperfusão precoce seja inquestionável, a reintrodução do oxigênio em um meio isquêmico inicia uma corrente complexa de eventos levando a lesões tissulares adicionais e a um acúmulo intracelular de cálcio (KU, 1982, p. 576; BRAUNWALD, 1985, p. 1715).

Muito se tem estudado nos últimos 35 anos para se definir a patogênese da lesão de reperfusão. Estes estudos incluem investigações laboratoriais, observações clínicas e grandes ensaios clínicos. Teorias tentam integrar três observações básicas: 1) o comprometimento do relaxamento vascular observado após isquemia-reperfusão afeta, primariamente, os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; 2) seqüestradores (scavengers) de radicais livres do oxigênio limitam a lesão de reperfusão, e 3) o bloqueio da ativação e adesão dos neutrófilos podem reduzir a lesão de reperfusão (SECCOMBE e SCHAFF, 1994, p. 33). Consideráveis informações têm sido acumuladas mostrando que o efeito deletério da reoxigenação se deva, principalmente, às ações de radicais livres do oxigênio (CASE, 1989, p. 65).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) têm sido implicadas numa variedade de processos patológicos, incluindo a lesão de isquemia/reperfusão promovendo a necrose de tecidos reperfundidos e retalhos microcirúrgicos (MANSON *et al.*, 1983, p. 88; ANGEL *et al.*, 1988, p. 234). Vários autores estudaram retalhos cutâneos em ratos na tentativa de reproduzir, experimentalmente, as lesões cutâneas decorrentes da isquemia /reperfusão (SARGI *et al.*, 1986, p. 640; HARASHIMA *et al.*, 1991, p. 502).

O mecanismo de lesão celular, na presença de ERO, parece estar ligado à lipoperoxidação da membrana celular. Este processo pode ser medido indiretamente pela dosagem de dialdeído malônico (MDA), seu produto estável final (SLATER, 1984, p. 285). O MDA é o produto final da lipoperoxidação e tem sido considerado marcador de lesão tissular (FREITAS *et al.*, 2002, p. 76). Várias estruturas celulares são afetadas por esse processo. As

mitocôndrias são alvos importantes dos danos provocados pelos processos de isquemia e reperfusão. Nelas ocorrem diminuição das atividades da nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada com hidrogênio (NADH) desidrogenase, do carreador de adenosina difosfato / adenosina trifosfato (ADP/ATP) e da ATP sintetase, além do aumento na atividade da fosfolipase A2 (KONOY e TANAKA, 1982, p. 151). Ocorre ainda, acentuado acúmulo de cálcio e aumento da geração de radicais livres pelas mitocôndrias. A associação destes eventos pode ser responsável pelas lesões e morte celular, decorrentes da reperfusão, possivelmente por um fenômeno de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna (FARBER *et al.*, 1981, p. 274).

Sabe-se que a isquemia, ao mesmo tempo que evita ou minimiza sangramentos durante a cirurgia, induz diferentes intensidades de sofrimento. Nos organismos submetidos a isquemia hepática, seguida de reperfusão, ocorre interação complexa entre alterações microvasculares, liberação de mediadores inflamatórios, radicais livres de oxigênio, ativação de neutrófilos, plaquetas, células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais. A ativação destas células pode levar à liberação de fator de necrose tumoral (TNF), leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas, endotelinas, fator de ativação plaquetária, causando danos à membrana celular, membrana mitocondrial interna e endotélio levando a distúrbios na microcirculação hepática (COLLARD e GELMAN, 2001, p. 5). A ativação das células de Kupffer e neutrófilos induzida pela isquemia e reperfusão pode ser intermediada pelo fator de ativação plaquetária, propiciando a liberação de radicais livres de oxigênio, aumento do influxo de cálcio e redução de agentes antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutatona, aumentando a produção de MDA. A ativação de fosfolipases A2 pode produzir graves danos aos lípidos de membrana e alterações da permeabilidade mitocondrial (BOIN, 1997, p. 32).

O neutrófilo tem sido implicado como um mediador central da lesão tissular em, virtualmente, todo sistema orgânico susceptível à lesão de reperfusão (EVORA *et al.*, 1996, p. 70). Certamente, esta célula sanguínea participa de uma série de mecanismos que são capazes de causar grave destruição tissular. Entretanto, tem sido muito difícil demonstrar um papel causal direto para o neutrófilo na lesão de reperfusão. É possível que neutrófilos ativados estejam presentes em tecidos reperfundidos, como uma resposta celular, normal e inespecífica, causada pelos variados tipos de lesão endotelial (EVORA *et al.*, 1996, p. 70). Embora um papel central dos neutrófilos na lesão de reperfusão seja questionado, é importante reconhecer

a sua significativa contribuição para a patogênese deste processo (NICHOLS *et al.*, 1988, p. 945).

Lefer e Lefer (1991, p. 112) propuseram, em seu estudo, um mecanismo para explicar a patogênese da lesão miocárdica de reperfusão. Ela integra a maioria dos conceitos apresentados nesta revisão, os quais sugerem, fortemente que o comprometimento da produção de óxido nítrico (NO) é “um evento essencial precoce na lesão de reperfusão e contribui significativamente para a necrose da célula miocárdica e lesão cardíaca que ocorre várias horas mais tarde”. O aumento precoce da produção de radicais livres do oxigênio na isquemia e reperfusão compromete seletivamente a transdução do sinal para a via da produção e liberação do NO.

A pequena quantidade de NO produzida reage rapidamente na presença de altas concentrações de ânion superóxido para formar o ânion tóxico peroxinitrito. Na ausência de NO, plaquetas e neutrófilos aderem à superfície da célula endotelial, que se torna ativada e libera fatores vasoativos (serotonina, fator ativador plaquetário - PAF, ADP, tromboxano, etc.), enzimas hidrolíticas (elastase e colagenase), e citocinas (interleucinas, fator de necrose tumoral - TNF). Isto resulta em lesão endotelial adicional e acelera o recrutamento e ativação de neutrófilos e plaquetas adicionais. As plaquetas e neutrófilos acumulados ocluem o vaso e o tecido dependente torna-se, uma vez mais, isquêmico (LEFER e LEFER, 1991, p. 113).

1.2 Radicais livres e relação com lesão de isquemia-reperfusão

Por volta de 1924, foram realizados os primeiros estudos a respeito de radicais livres. No entanto, só nos anos setenta, começaram a surgir trabalhos, relatando a importância dos radicais livres para os seres vivos, particularmente os aeróbicos (VANNUCHI *et al.*, 1998, p. 40).

Qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais que um elétrons livres na sua órbita externa é denominado de radical livre. Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados tem uma instabilidade elétrica muito grande, e por esta razão, mesmo tendo meia vida muito curta, apresentam grande capacidade reativa, o que pode acontecer com qualquer composto que esteja próximo, a fim de captar um elétron desse composto para sua estabilização, independente de ser uma molécula, uma célula, ou tecido do organismo, a partir do que, acontecem reações em cadeia de lesão celular. Devido a esta característica, é denominado de substância oxidante (ALVAREZ *et al.*, 1996, p. 403).

O oxigênio tem a sua atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico. Desta forma, a formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células, a fim de gerar o ATP (energia). Também os radicais livres, produzidos pelos macrófagos e neutrófilos (glóbulos brancos de defesa), são usados contra bactérias e fungos invasores do organismo, produzindo ação lesiva à estes microrganismos (VANNUCHI *et al.*, 1998, p. 41). Normalmente, em torno de 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando-se água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons na mitocôndria, bem como no retículo endoplasmático, onde o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede a redução tetravalente do O₂ pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo simultaneamente 4 elétrons para o oxigênio, que se reduz diretamente à água: $O_2 + 4H^+ + 4e^- \Rightarrow 2H_2O$. As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, o NADH, o FADH e a ubiquinona ou coenzima Q (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989, p. 502).

Todavia, como já referido, de 2 a 5% do O₂ é reduzido univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas 1 elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não parelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que algumas vezes constituem os radicais livres. Forma-se, destarte, a primeira espécie tóxica reativa de oxigênio, o superóxido, conforme esquema: $O_2 + e^- \Rightarrow O_2^{\bullet-}$. Além da superóxido, são exemplos de ERO: radical hidroxila (OH•), radical alcóxil (RO•), radical peróxil (ROO•), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO), dentre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989, p. 502).

As ERO estão envolvidas em todo processo da patogênese da lesão de isquemia-reperfusão. Se o período de isquemia ou hipoxia for curto, a injúria tecidual pode ser minimizada com a reintrodução de nutrientes. A reintrodução de O₂ na isquemia ou hipoxia tecidual prolongada poderia causar injúria tecidual adicional (injúria de reoxigenação), que é, em parte, mediada por radicais de oxigênio. Durante a reoxigenação, através da reperfusão, ocorre a produção de radicais livres com seus efeitos deletérios, piorando a isquemia. A xantina oxidase é produzida a partir da xantina desidrogenase na presença do íon Ca²⁺, gerando radicais livres que vão lesar os tecidos, por isso preconiza-se o uso de antioxidantes como a SOD ou o manitol antes do restabelecimento arterial (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985, 543).

Os radicais livres são lesivos através de uma variedade de mecanismos: 1) peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; 2) oxidação de grupos sulfidril inativando uma variedade de enzimas; 3) alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida; 4) direta inativação do óxido nítrico (NO) comprometendo os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; 5) formação de peroxinitrito, um ânion instável e tóxico, reagindo com o NO; 6) ativação de citocinas como a interleucina-1. Dentro da luz de vasos reperfundidos os ânions superóxidos estimulam a agregação plaquetária e iniciam a liberação de variados fatores vasoconstritores, incluindo o ADP, o PAF, a serotonina e o tromboxane A₂ (SECCOMBE e SCHAFF, 1994, p. 33).

1.3 Acupuntura (AC) e Eletroacupuntura (EA)

O termo AC, cunhado no século XVII por jesuítas, deriva dos radicais latinos *acus* e *pungere*, que significam agulha e puncionar. Originalmente, o vocábulo chinês que a define - Zhenjiu - possui sentido mais abrangente: literalmente “agulha-moxabustão”, que inclui outras técnicas de estímulo do ponto (MACIOCIA, 2007, p. 109). Na acupuntura tradicional chinesa, agulhas são inseridas em pontos situados em “meridianos” (canais invisíveis pelos quais circularia uma substância fluídica), com a intenção de influenciar o fluxo dessa substância hipotética. Mas os avanços científicos que elucidaram os mecanismos de ação levaram a uma redefinição da AC como especialidade médica, atualmente descrita em termos biológicos (NESTLER, 2002, p. 65).

O conhecimento da AC em uma perspectiva histórica contribui para reduzir o estranhamento que pode advir do primeiro contato entre sua filosofia e o pensamento científico. A origem da AC remonta à pré-história, precedendo a criação da escrita (4.000 a.C.). Apesar de essa técnica ter florescido na Medicina Tradicional Chinesa (MTC), restringir seu desenvolvimento inicial ao território chinês é uma hipótese que pode não ser verdadeira. Múmias humanas pré-históricas encontradas na Sibéria, Peru, Chile e no Tirol portando tatuagens circulares não ornamentais contendo partículas de carvão e localizadas paralelamente e ao longo da coluna vertebral, sugerem o conhecimento da localização dos pontos de AC e o uso do estímulo térmico dos mesmos, para além do continente asiático. Sem sombra de dúvida, a sistematização de conhecimentos e o amadurecimento da técnica se

deram na China das grandes Dinastias (VETERINARY ACUPUNCTURE, 1992, p. 25; DORFER, 1999, p. 1024).

A MTC permaneceu como forma exclusiva de terapia exercida na China até que as práticas médicas ocidentais fossem introduzidas durante a dinastia Ching (1644 a 1911), quando a AC foi rejeitada pela elite e chegou a ser banida pelo governo. Na década de 1940, Mao Tsé-Tung, líder da Revolução Chinesa, estimula uma política de integração entre os dois sistemas médicos, incrementando o ensino e pesquisa com MTC, declarando que “a Medicina e a Farmacologia chinesas são um palácio de grandes tesouros, devendo ser feitos todos os esforços para sua exploração, e para sua ascensão a níveis mais elevados”. Os baixos custos dessa prática colaboraram nessa decisão, permitindo à população maior acesso à saúde. A China faz uso da AC para promoção da hipoalgesia cirúrgica em pacientes humanos desde o fim da década de 1950 e em animais, desde 1970 (VETERINARY ACUPUNCTURE, 1973, p. 38).

Foi só a partir de 1972, quando os efeitos da acupuntura na anestesia foram praticamente comprovados, que a comunidade científica mundial reconheceu os méritos da técnica. Na China, a acupuntura é praticada em grande escala por médicos com formação tradicional, enquanto a medicina química do Ocidente é considerada uma terapia alternativa (FURLAN *et al.*, 2006, p. 36).

Enquanto a identificação precisa do agente e a compreensão dos mecanismos das afecções são essenciais para a prática médica científica, o exercício da AC prioriza o enfoque nas respostas orgânicas individuais, produzindo uma abordagem particular para cada paciente. Em termos práticos, pode-se dizer que a medicina científica usa intervenções que mimetizam ou bloqueiam a ação da bioquímica orgânica. A AC, por sua vez, visa afetar os níveis de atividade funcional nos órgãos e sistemas. Pequeno ou nenhum efeito da AC ocorre sobre as funções que estão normais. É somente na disfunção que o “mecanismo de equilíbrio” mostra resultados claros (SCOGNAMILLO-SZABÓ *et al.*, 2004, p. 15). Há evidências que a acupuntura pode estimular a produção de endorfinas, serotonina e acetilcolina dentro do sistema nervoso central, aumentando a analgesia (FURLAN *et al.*, 2005, p. 39).

Através da acupuntura pode-se promover duas ações no organismo: a primeira ação é localizada, onde a puntura (agulhamento) desencadeia reações fisiológicas. O corpo entende a inserção da agulha como uma agressão, assim promove no local um aumento na circulação sanguínea, nutrição e oxigenação celular, aumento da energia vital Qi que tonifica a

musculatura revitalizando a pele. A segunda ação consiste em estimular o equilíbrio interno dos órgãos (SILVA, 2008, p. 22).

Desconhecendo experiências prévias com eletroacupuntura na França, o Professor Jisheng Han inicia em Pequim, em 1965, pesquisas com eletroacupuntura e seus mecanismos de ação (MACDONALD, 1993, p. 67). Eletroacupuntura consiste na passagem de corrente elétrica através da agulha. A escolha do formato da onda, frequência e intensidade da descarga vão definir o tipo de efeito atingido. É, provavelmente, depois do agulhamento simples, a técnica mais disseminada e melhor estudada de AC. A corrente elétrica potencializa o efeito da AC manual e tem por objetivo promover um processo inflamatório agudo, pois o estímulo da corrente gerado pelo aparelho de eletroacupuntura, juntamente com o estímulo físico da agulha, desencadeia essa resposta inflamatória localizada gerando um processo de reparação tecidual (KARIME, 2006, p. 41).

Em estudo realizado por fisioterapeutas dermatofuncionais utilizando eletroacupuntura aplicada à estria atrófica, após a aplicação do estímulo elétrico, ocorreu um aumento no número de fibroblastos jovens, uma neovascularização e todas as funções inerentes da pele foram recuperadas, inclusive o retorno da sensibilidade dolorosa no local após algumas sessões. Logo, o aspecto da pele se apresenta muito próxima ao normal, onde também foi observado algum tipo de reorganização das fibras colágenas (GUIRRO *et al.*, 1991). Segundo WHITE *et al.* (2008, p. 57), observou uma epiderme mais espessa, maior quantidade de fibroblastos, fibras elásticas e colágenos e maior número de vasos após a aplicação da corrente elétrica.

Os registros oficiais sobre a introdução da AC no Brasil são raros. De qualquer modo, sua história se confunde com a chegada dos primeiros imigrantes chineses (1812), japoneses (1908) e outros povos orientais ao nosso país. Existe a versão que os índios da América do Sul já utilizavam a inserção de espinhos na pele com objetivos terapêuticos. Na primeira metade do século XX, grande parte da AC praticada por Orientais ficou restrita às suas comunidades, devido a dificuldades com a língua. Sua difusão na sociedade brasileira é incrementada na década de 1950 quando o fisioterapeuta Friedrich Johann Spaeth, nascido em Luxemburgo e naturalizado brasileiro, funda a Sociedade Brasileira de AC e Medicina Oriental (1958). Em 1961, juntamente com os médicos Ermelino Pugliesi e Ary Telles Cordeiro, Spaeth funda o Instituto Brasileiro de AC (IBRA), primeira clínica institucional de AC do Brasil. No mesmo ano, chega ao Brasil o médico Wu Tou Kwang, que se tornou um

dos nomes de destaque no campo de ensino das técnicas médicas chinesas no país (FROIO, 2009, p. 26).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, existe uma vasta gama de desordens tratáveis pela AC: doenças musculares, ósseas e articulares, dores de cabeça, ansiedade, depressão, asma, bronquite, mal posicionamento fetal, acidente vascular cerebral, entre outras. Na Medicina Veterinária, disfunções reprodutivas, neurológicas, musculoesqueléticas, dermatológicas, dor, emergências anestésicas e discopatias, podem ser tratadas com sucesso com a AC. No Brasil, cerca de 70% dos casos encaminhados consistem em quadros nervosos e/ou musculoesqueléticos, consideradas as doenças com melhor índice de recuperação quando tratadas com AC (MACIOCIA, 2007, p. 112; SCHOEN, 2006, p. 39).

Ainda assim, a prática clínica da AC em animais esbarra em dificuldades inerentes à Medicina Veterinária, tais como variação estrutural e funcional entre as espécies, necessidade de contenção em pacientes agressivos e manejo adequado de animais agitados ou assustados, dentre outras. Porém, o encaminhamento de casos difíceis ou crônicos é prática comum, fazendo a casuística da AC veterinária uma seleção de pacientes complicados (SCOGNAMILLO-SZABÓ *et al.*, 2010, p. 40).

A AC possui inúmeras vantagens se comparada a outras técnicas como, por exemplo, a medicamentosa. Além de ser praticamente indolor, não necessita de tempo para recuperação, o custo para sua realização é baixo, não possui efeitos colaterais e os resultados são rápidos.

O presente trabalho considera a possibilidade de redução do estresse oxidativo e da inflamação em retalhos cutâneos randomizados com a aplicação de acupuntura manual e eletroacupuntura nos pontos adjacentes ao retalho cutâneo. A ausência de trabalhos enfatizando os efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo e a inflamação em retalhos cutâneos randomizados em animais sadios motivou a presente pesquisa, tornando relevante o objetivo desse estudo.

2 OBJETIVO

Investigar os efeitos da estimulação manual (acupuntura) e elétrica (eletroacupuntura) sobre o estresse oxidativo e a inflamação em retalhos cutâneos randomizados em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O estudo foi previamente submetido e aprovado pela Comissão do Comitê de Ética e Pesquisa (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais em fevereiro de 2009, processo n°. 04/09, (Anexo A), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal n°. 6.638, de 08 de maio de 1979.

3.2 A amostra

Foram utilizados 40 ratos adultos, machos (*Rattus norvegicus*: var. albinus, Rodentia, Mammalia), com massa corpórea variando de 250 a 390g da linhagem Wistar, saudáveis e bem nutridos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina, criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes.

Os animais ficaram hospedados em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$). Observou-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (Guabi Nutrilabor®, Mogiana Alimentos, São Paulo) foram ofertadas *ad libitum* até 12 horas do antes 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 do experimento. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

3.3 Procedimento anestésico

A anestesia foi obtida pela aplicação, por via intraperitoneal (ip) de uma solução anestésica, contendo cloridrato de Ketamina 90 mg/Kg + Xilazina 10 mg/Kg. Obtido o nível

anestésico adequado, o animal foi colocado na mesa operatória, em decúbito dorsal. A cada aplicação da solução anestésica usou-se seringa descartável de 1 ml e agulha descartável 13x4,5 sendo após a aplicação descartadas em lixos apropriados.

3.4 Delineamento experimental

Trata-se de um estudo experimental, prospectivo, controlado e comparativo entre diferentes grupos de ratos Wistar submetidos aos efeitos da AC e da EA. Utilizou-se para a construção dos retalhos cutâneos, um modelo descrito na literatura (MCFARLANE *et al.*, 2008, p. 178).

3.5 Distribuição da amostra

Os 40 ratos foram distribuídos ao acaso em 5 grupos numericamente iguais (n=8).

- **Grupo Controle 1 (G1)** (n=8): somente anestesia no 1º, 3º e 7º dia de estudo; Sacrifício no 7º dia, após 30 minutos;
- **Grupo Controle 2 (G2)** (n=8): procedimento cirúrgico no 1º dia do estudo, sob anestesia; somente anestesia no 3º e 7º dia; Sacrifício no 7º dia, após 30 minutos;
- **Grupo Acupuntura (G3)** (n=8): procedimento cirúrgico sob anestesia no 1º dia do estudo. Aplicação de Acupuntura manual com inserção de uma agulha em cada ponto pré-determinado (total de 4 pontos por animal), somente no 3º e 7º dia de estudo. As agulhas foram mantidas por 30 minutos. Sacrifício no 7º dia, imediatamente após o término da sessão de acupuntura e coleta do material;
- **Grupo EletroAcupuntura 3 Hz (G4)** (n=8): procedimento cirúrgico sob anestesia 1º dia do estudo. Aplicação de Acupuntura manual com inserção de uma agulha em cada ponto pré-determinado (total de 4 pontos por animal), e a aplicação da estimulação elétrica (3 Hz, 10 mA, pulsos quadrados, utilizando o eletroestimulador modelo EL 608 (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil) durante 30 minutos, quando foram retiradas as agulhas. A eletroacupuntura foi realizada no 3º e 7º dia de estudo. Sacrifício no 7º dia, imediatamente após o término da sessão de eletroacupuntura e coleta do material;
- **Grupo EletroAcupuntura 100 Hz (G5)** (n=8): procedimento cirúrgico sob anestesia no 1º dia. Aplicação de Acupuntura manual com inserção com inserção de uma agulha em cada

ponto pré-determinado (total de 4 pontos por animal) seguindo-se a aplicação da estimulação elétrica (100 Hz, 10 mA, pulsos quadrados, utilizando o eletroestimulador modelo EL 608 (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil), no 3º e 7º dia de estudo, durante 30 minutos, em seguida foram retiradas as agulhas. Sacrifício no 7º dia, após o término da sessão de eletroacupuntura e coleta do material.

As agulhas de acupuntura esterilizadas descartáveis, de aço inoxidável foram introduzidas nos acupontos previamente selecionados pela proximidade aos retalhos. São eles: o DM-14 (localizado na depressão entre os processos espinhosos da sétima vértebra cervical e primeira vértebra torácica, na linha mediana posterior), o DM-2 (localizado na depressão entre o sacro e a primeira vértebra coccígea, na linha mediana posterior) e o F-13 (localizado na depressão posterior ao fim da décima-segunda costela, linha axilar média, bilateralmente) (CHANG *et al.*, 2008). Os acupontos DM-14 [Dazhui], DM-2 [Yaoshu] e F-13 (Zhangmen) se localizam, respectivamente, na borda cranial, na borda caudal e próximo ao bordo lateral (bilateralmente) do retalho cutâneo (UEMA *et al.*, 2008, p. 354).

3.6 Desenho do experimento

A construção dos retalhos cutâneos randomizados de base cranial, mediando 8 x 2,5 cm, foi realizada de acordo com a técnica descrita por McFarlane *et al.* (2008, p. 179). Após anestesia, realizou-se epilação (Figura 1) e, posteriormente, desenho do retalho de pele, de forma retangular utilizando pincel atômico de tinta permanente, medindo 8,0cm (Figura 2) de comprimento por 2,5cm de largura, de base caudal (Figura 3). Após marcação do retalho, foi feita antissepsia com polvidine® degermante tópico, colocação dos campos cirúrgicos e, com bisturi de lâmina 15, a pele foi incisada (Figura 4) e o retalho cutâneo elevado abaixo do panículo carnoso (Figura 5), equivalente ao tecido subcutâneo em humano. Logo em seguida, o retalho foi reposicionado e suturado na área doadora, com fio de nylon 5-0, pontos separados (Figura 6), finalizando a construção do retalho (Figura 7).

Após a construção do retalho cutâneo nos grupos G3, G4 e G5 foram inseridas agulhas de acupuntura (Figura 8) nos acupontos pré-determinados (Figura 9). Nos ratos do grupo G4 e G5 foi necessário o uso do eletroestimulador modelo EL 608 (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil). Antes de ser utilizado, o aparelho foi programado conforme frequências e potências supracitadas sob confirmação anterior no

Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (Figura 10-12). Eletrodos foram conectados às agulhas e ao eletro-estimulador e aplicadas ondas quadradas pulsantes por 30 minutos (Figura 13).

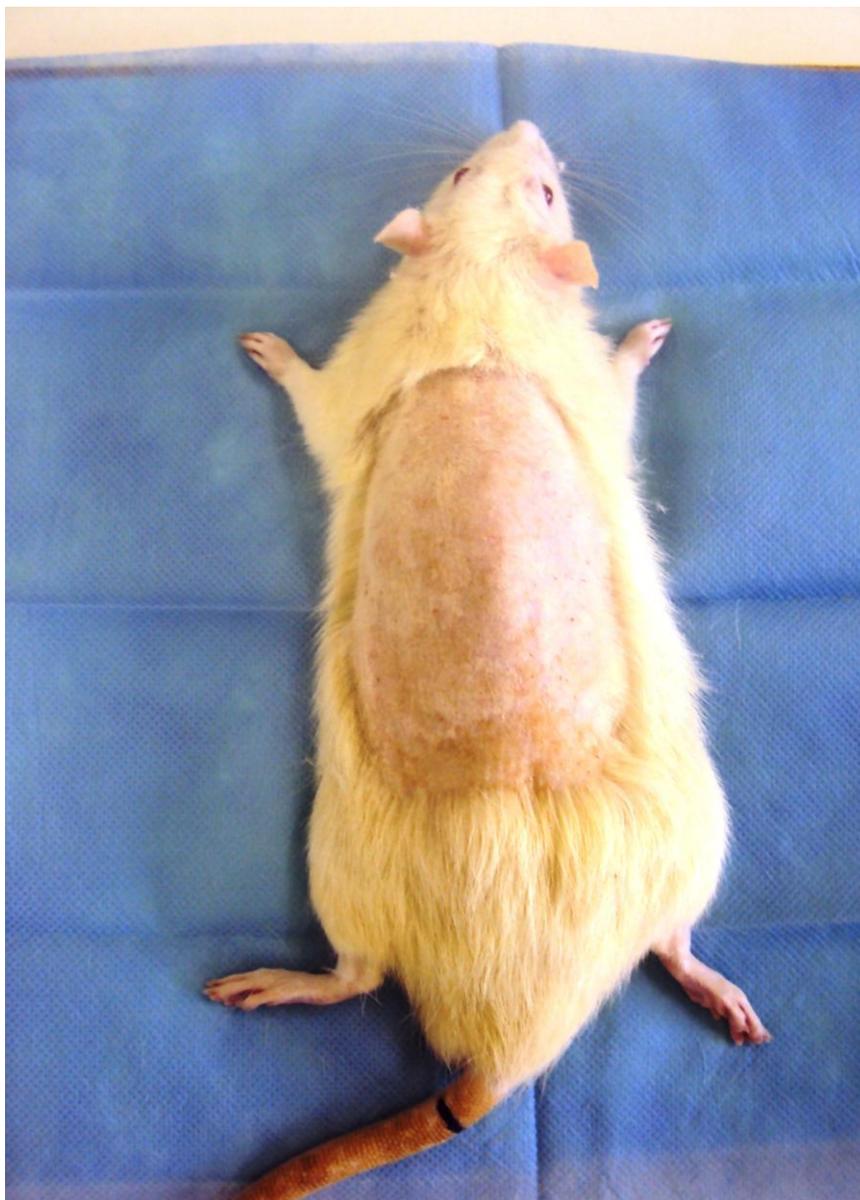


Figura 1 – Fotografia exibindo a área epilada no dorso do rato

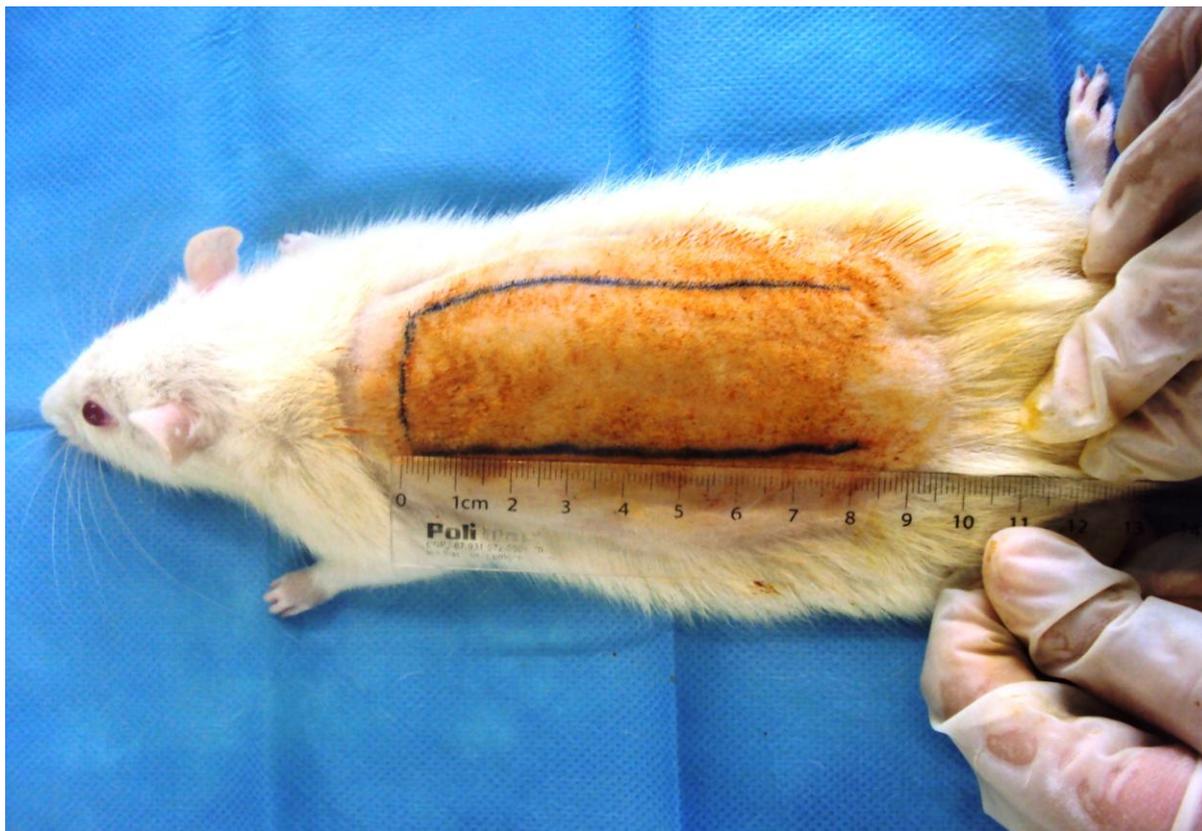


Figura 2 – Fotografia exibindo os detalhes da marcação do retalho cutâneo, com 8 cm de comprimento



Figura 3 – Fotografia exibindo os detalhes da marcação do retalho cutâneo, com 2,5 cm de largura



Figura 4 – Construção do retalho cutâneo: incisão cirúrgica



Figura 5 – Construção do retalho cutâneo: retalho elevado, expondo o leito cruento

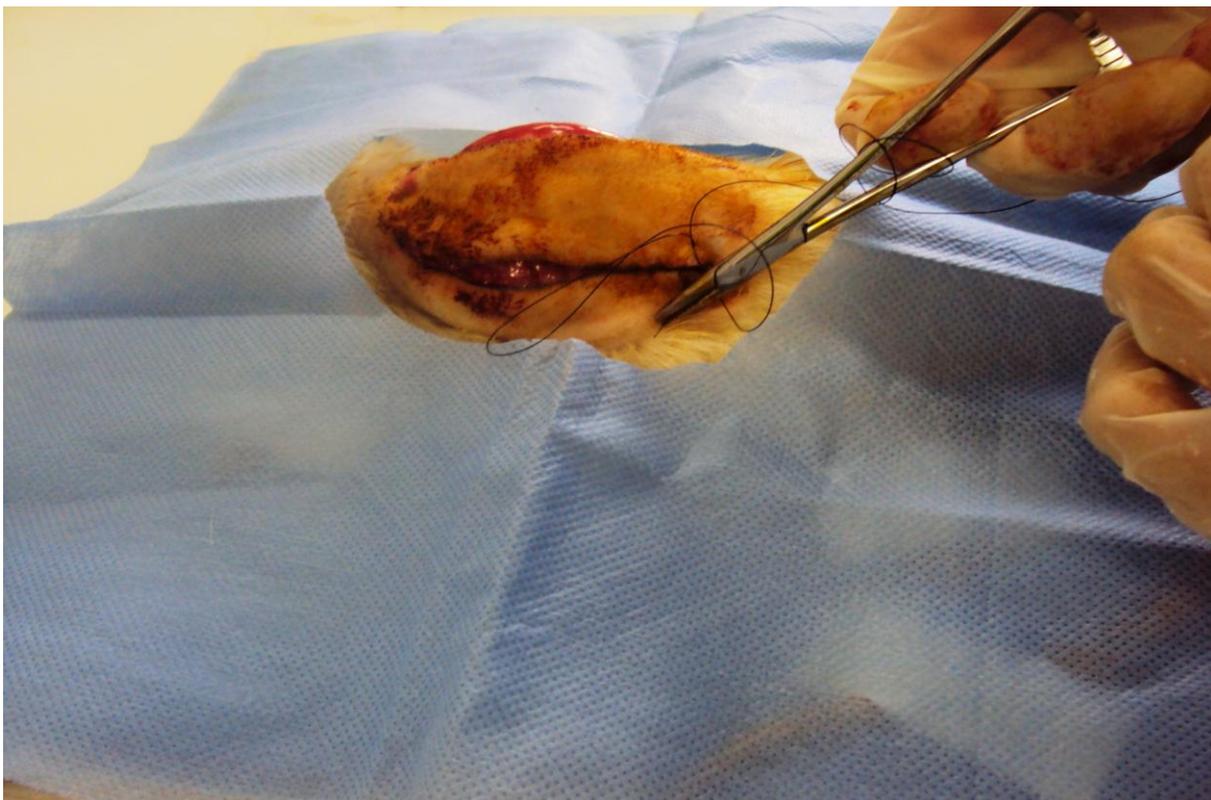


Figura 6 – Construção do retalho cutâneo: retalho em processo de sutura



Figura 7 – Construção do retalho cutâneo: conclusão da sutura do retalho

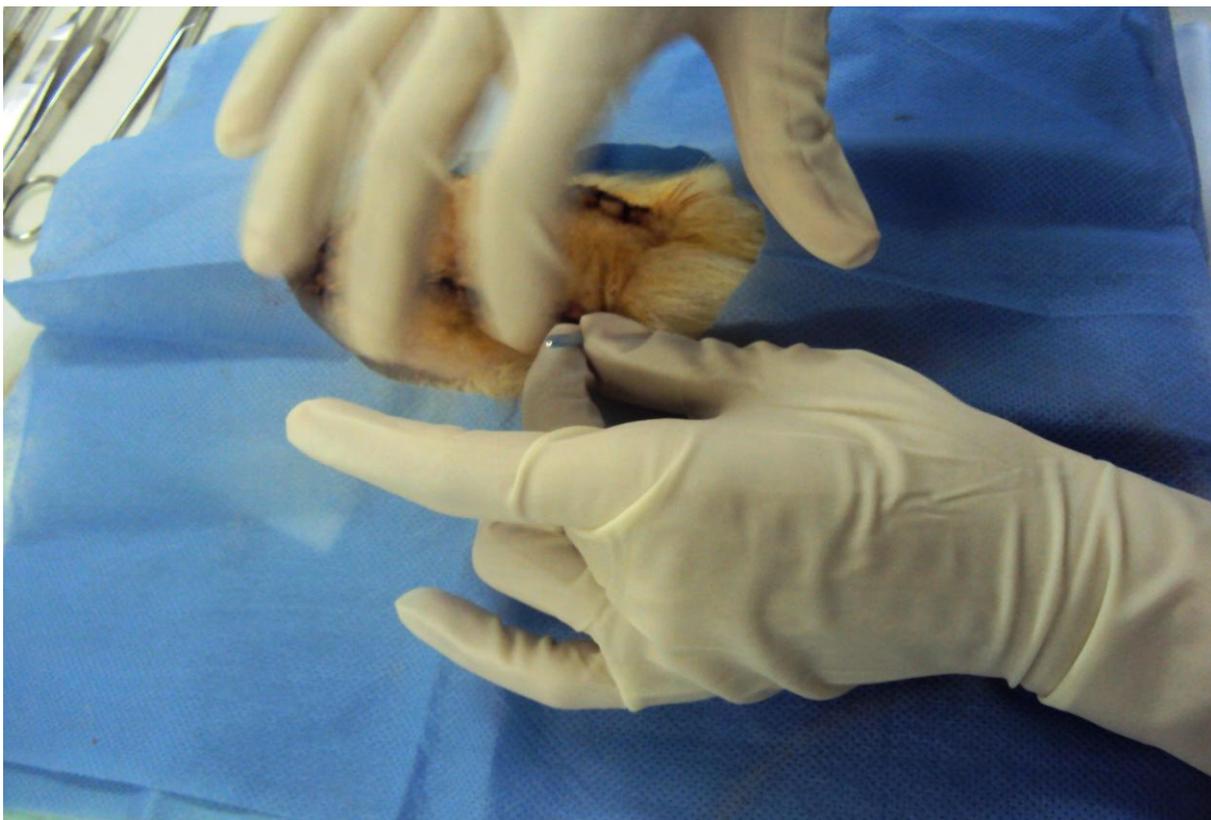


Figura 8 – Técnica de agulhamento em acupontos: inserção das agulhas, que são manipuladas dentro de envólucro plástico

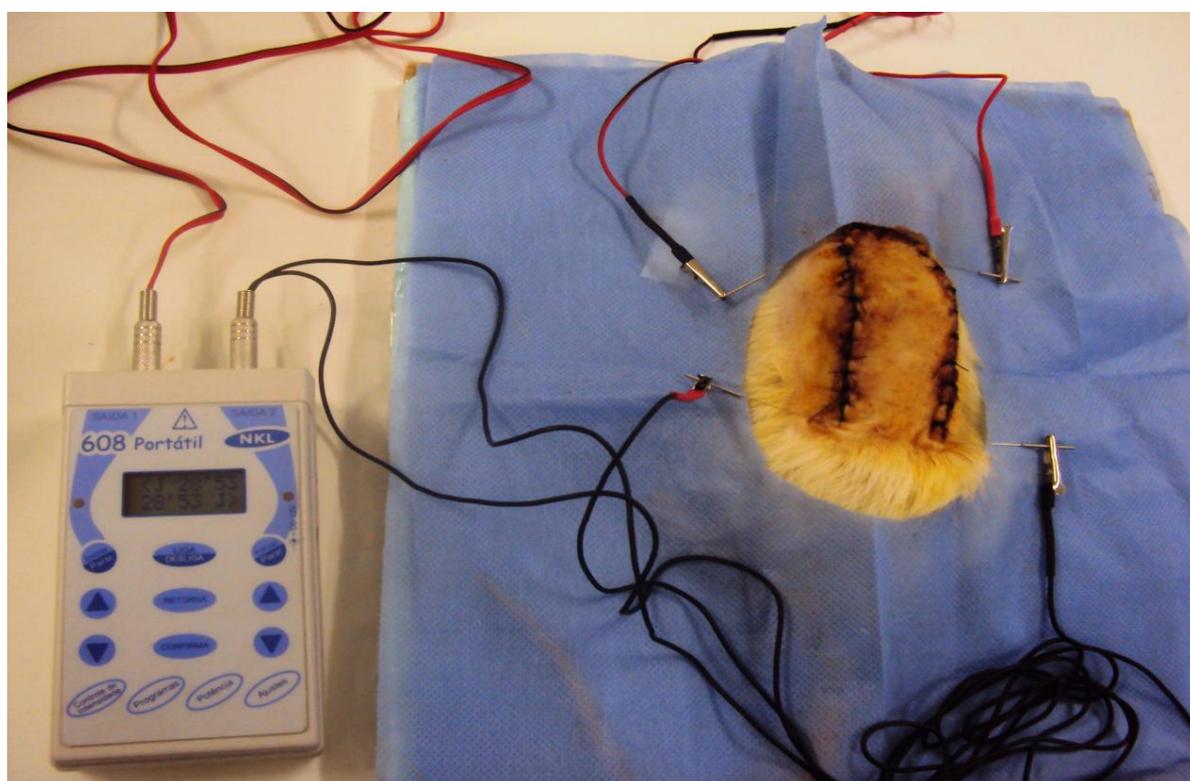


Figura 9 – Posicionamento das agulhas nos acupontos DM-14, DM-2 e F-13 (a partir da extremidade distal do retalho cutâneo)

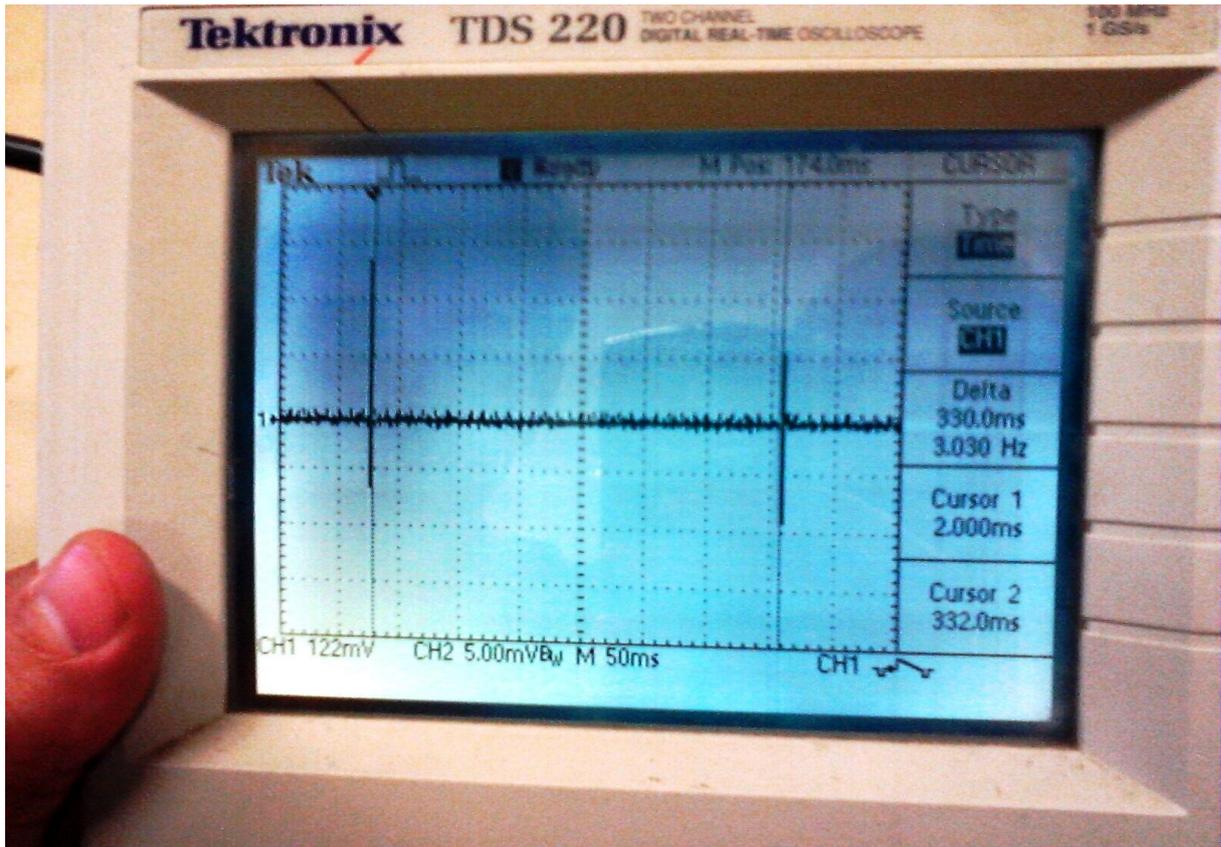


Figura 10 – Eletroestimador calibrado para estimulação elétrica (3 Hz, 10 mA), utilizando o Tektronix TDS 220 do Instituto de Física da Universidade Federal do Ceará

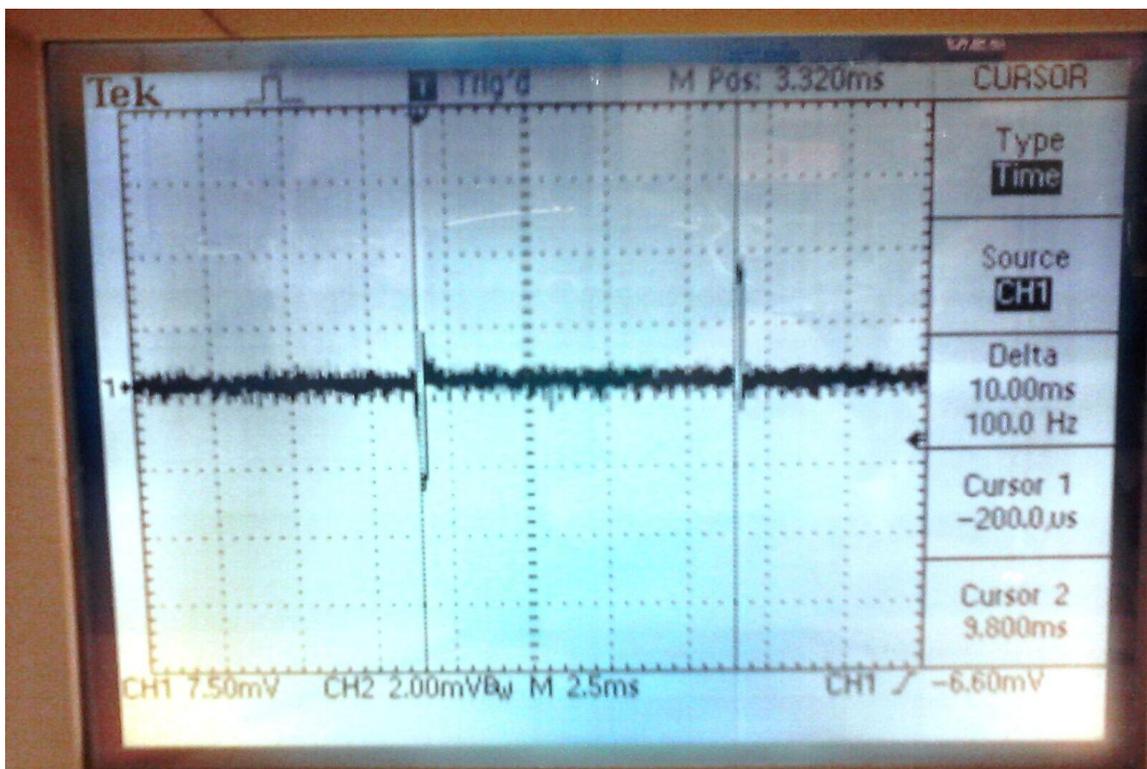


Figura 11 – eletroestimador calibrado para estimulação elétrica (100 Hz, 10 mA)



Figura 12 – confirmação de calibre do eletroestimulador modelo EL 608 em aparelho Osciloscópio no Laboratório do Departamento de Física da UFC

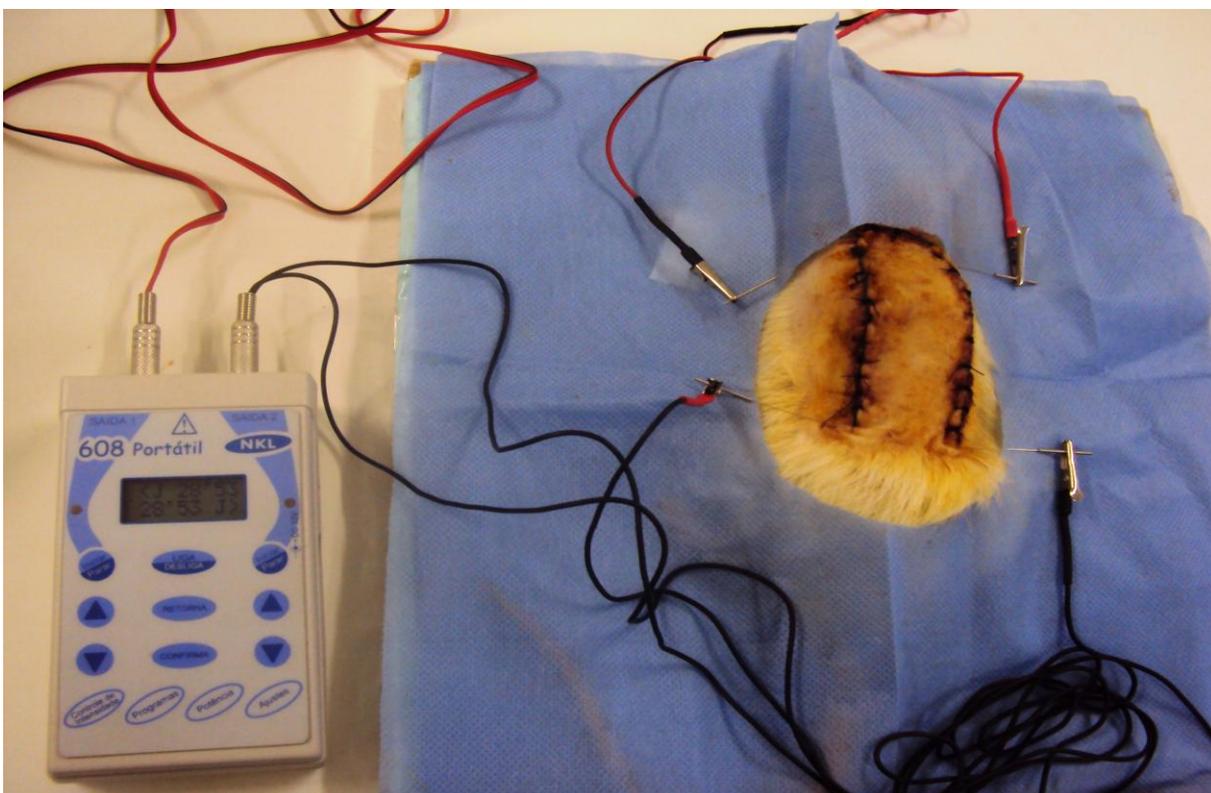


Figura 13 – Eletroestimulador conectado às agulhas em acupontos pré-determinados

3.7 Coleta do material para análise

Amostras de sangue arterial da artéria aorta abdominal e de tecido (retalho cutâneo) foram coletados no sétimo dia, ao término da sessão de acupuntura/electroacupuntura e no mesmo intervalo nos ratos dos grupos controle. As amostras (1x2,5 cm, espessura total do retalho) foram coletados no terço médio do retalho (Figura 14). Após a coleta, cada segmento de tecido coletado foi dividido em 3 amostras, medindo cada uma 1x1cm. Os dois segmentos próximos às margens do retalho foram utilizados para análises bioquímicas.

Os segmentos foram conservados em frascos de vidro contendo nitrogênio líquido (NL) no qual é uma substância que serve para armazenar amostras laboratoriais em baixa temperatura (aproximadamente de -70°C).

Para a coleta das amostras de sangue arterial foi realizada laparotomia utilizando bisturi de lâmina 15, respeitando técnica asséptica (Figura 15). Antes da coleta, o material necessário, seringa de 3ml e agulha 25x8, foi preparado adequadamente usando Heparina®, no corpo da seringa, como forma de evitar a coagulação sanguínea. Após o procedimento, o sangue coletado foi armazenado em tubos de ensaio de vidro para posteriormente serem analisados (Figura 16).

Após as coletas de tecido e sangue, ainda sob efeito anestésico adequado, os animais foram sacrificados por dessangramento.

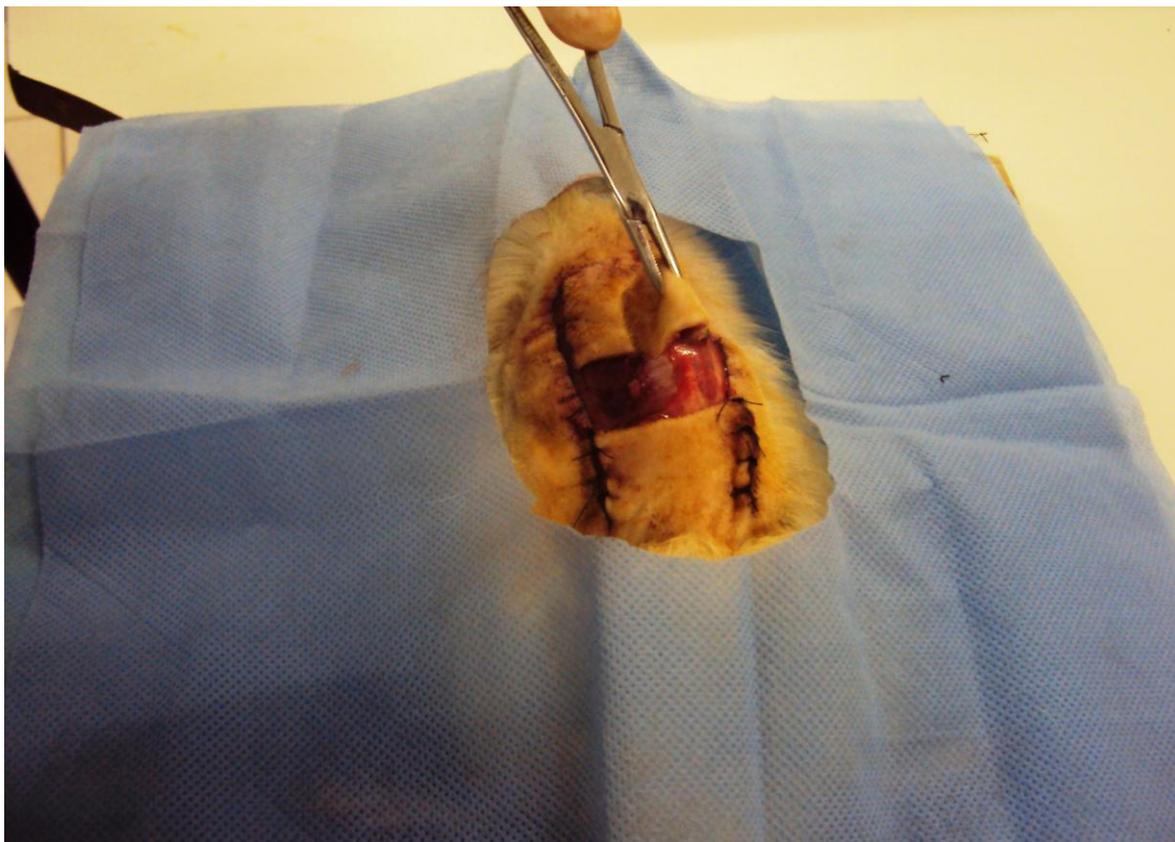


Figura 14 – coleta do retalho cutâneo

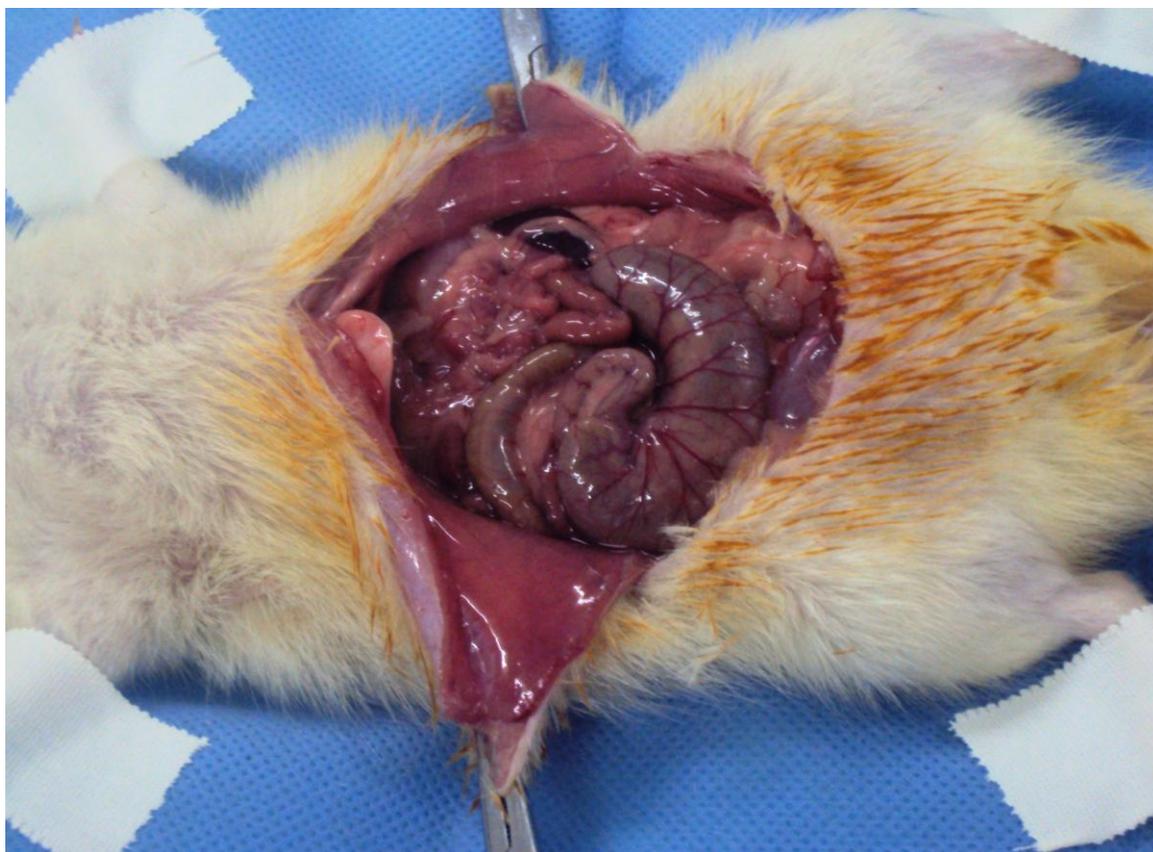


Figura 15 – laparotomia

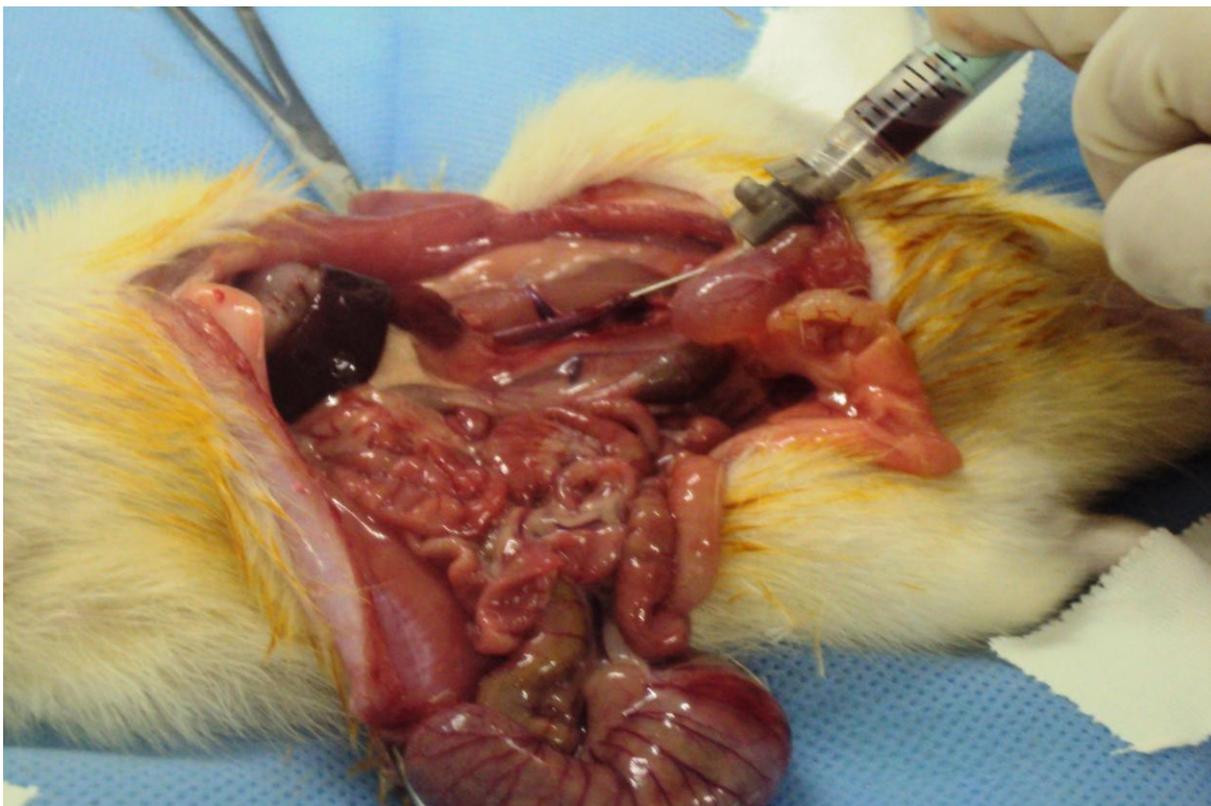


Figura 16 – coleta de sangue arterial na aorta abdominal

3.8 Técnica laboratorial

Os efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em retalhos cutâneos randomizados foram avaliados através das dosagens teciduais e séricas de substâncias reagentes ao ácido tio-barbitúrico (TBARS) e glutatona (GSH). A dosagem das concentrações teciduais da mieloperoxidase (MPO), considerada um marcador de estresse oxidativo (PEDRO *et al.*, 2003) foi incluída na avaliação.

3.8.1 Determinação de substâncias reagentes ao ácido tio-barbitúrico (TBARS)

O teste com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido) foi introduzido por Kwon e Watts (1964), é um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica.

A técnica tem por objetivo quantificar o dialdeído malônico (“MDA”) formado na peroxidação lipídica. O “MDA” é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico (“TBA”) originando composto de cor rosa. Esse composto, quando extraído da solução por um solvente orgânico (n-butanol), tem sua concentração determinada

e expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica é de fácil execução, baixo custo e pode ser empregada para determinação das “TBARS” para posterior dosagem de “MDA” em diferentes materiais biológicos, especialmente em tecidos, utilizado para estimar a peroxidação lipídica.

A amostra de tecido (segmentos 1B e 2B) foi homogeneizada (Homogeneizador Virtis Company, modelo Virtis 23, teflon) em 2 mL de tampão fosfato, pH 7,0 e, posteriormente, centrifugados por 5 minutos a 1000rpm (Centrífuga Fanem, modelo 215). Colheram-se 200 µL do sobrenadante do homogenato centrifugado e a ele foram adicionados: 1 mL de ácido tricloroacético 20% e 400 µL de ácido tiobarbitúrico a 1,6%, sendo essa mistura incubada por 30 minutos a 95 graus Celsius. Os lípides foram extraídos através da mistura com n-butanol (1,6 mL), de vigorosa agitação e nova centrifugação por 10 minutos a 3000rpm. A absorbância de camada orgânica foi medida em espectrofotômetro (530nm) (Espectrofotômetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, UV/Visible Spectrophotometer). Os níveis de malondialdeído foram expressos em valores de absorbância em µmol MDA/g de tecido fresco (BUEGE e AUST, 1978; MIHARA e UCHIYAMA, 1978; OKHAWA, 1979).

As diferenças entre os valores obtidos nas duas leituras foram utilizadas para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão, preparada.

3.8.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (glutathiona-GSH)

A determinação dos grupos sulfidrílicos foi realizada pelo método de Sedlak e Lindsay (1968). Todos os cálculos foram baseados em diferentes densidades ópticas, medida a 412nm em espectrofotômetro (beckman Du-640, Fullerton, Califórnia). Comparando a diferença de absorvância das amostras antes e depois que as reações bioquímicas ocorressem, as concentrações de glutathiona foram calculadas como µmol/g de tecido.

As drogas reagentes foram 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). A reação $[2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$, $2\text{GSH} + \text{Ácido Graxo} - \text{OOH} = \text{GSSG} + \text{Ácido Graxo} - \text{OH} + \text{H}_2\text{O}]$. O procedimento deu-se através da pesagem e homogeneização em 5 ml de EDTA 0,002M gelado, em seguida, mistura-se o homogenato com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético 50 %.

O tubo é centrifugado a 3000g por 15 minutos, misturado com 4ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 mol/ml.

A seguir, agita-se para homogeneizar e ler-se as absorvâncias no espectrofotômetro à 412 nm, dentro de 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH é obtida comparando-se o valor da absorvância com uma tabela padrão de GSH, previamente estipulada. As concentrações de GSH foram expressas em $\mu\text{mol/g}$ de tecido.

3.8.3 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 feita lise hipotônica com solução de NaCl 0,2% e após 30s adição de NaCl 1,6% com glicose 5%. Após centrifugação, o *pellet* foi ressuspensionado em buffer NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% *hexadecyltrimethylammonium bromide* e rehomogeneizado.

Após centrifugação a 13000rpm, 5 WL do sobrenadante foram utilizados para a dosagem em placas de 96 wells diluído em 45 WL de NaPO₄ 0,08 M. A atividade da mieloperoxidase no sobrenadante foi dosada usando *tetramethylbenzidine* (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 absorvância com uma tabela padrão de MPO, preparada previamente. As concentrações de MPO foram expressas em unidade / mg de tecido.

3.9 Análise 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 (DP).

Para comparações entre os diversos grupos com o grupo controle foi utilizado o teste de Dunnett (ANOVA). Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se o

programa de análise estatística *GraphPad Prism*® versão 5.00 para *Windows*, *GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A., www.graphpad.com*. Os gráficos também foram gerados com o mesmo programa estatístico.

Os resultados foram apresentados sob forma de tabelas e gráficos. A significância estatística foi fixada em 0,05% ($p < 0,05$), assinalando-se com os símbolos [*], [**] e [***] os valores significantes nas comparações inter-grupais.

4 RESULTADOS

Todos os animais foram pesados pela pesquisadora, no mesmo horário para evitar variações circadianas, utilizando a mesma balança (balança analítica Ohaus AS2600) no início do experimento (Tabela 1) e diariamente até o último dia do experimento (Tabela 2).

Tabela 1 – Pesos dos ratos no 1º dia de estudo

Grupos Ratos	G1	G2	G3	G4	G5
R1	295g	315g	365g	340g	350g
R2	330g	300g	255g	345g	340g
R3	340g	285g	390g	365g	390g
R4	284g	340g	270g	365g	335g
R5	315g	310g	325g	375g	370g
R6	340g	300g	330g	335g	320g
R7	285g	290g	285g	325g	285g
R8	300g	280g	355g	345g	350g

Tabela 2 – Pesos dos ratos no 7º dia de estudo

Grupos Ratos	G1	G2	G3	G4	G5
R1	305g	325g	375g	310g	330g
R2	330g	310g	275g	345g	340g
R3	345g	290g	390g	365g	370g
R4	280g	335g	270g	355g	345g
R5	325g	310g	315g	375g	380g
R6	355g	290g	330g	330g	320g
R7	290g	290g	275g	-----	295g
R8	300g	285g	355g	325g	-----

4.1 – Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre o estresse oxidativo

4.1.1 Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações teciduais e plasmáticas de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido)

Não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações teciduais de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$), comparando os grupos G2 e G3 ao controle G1, no 7º dia do estudo. Houve aumento significativo das concentrações de TBARS nos grupos G4 e G5, comparados ao grupo controle (G1) no mesmo período (Tabela 3, Figura 17).

Tabela 3 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações de *TBARS* na pele ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido) dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

G1 (n=8)	G2 (n=8)	GRUPOS		
		G3 (n=8)	G4 (n=7) ¹	G5 (n=7) ¹
0,157±0,07	0,204±0,15	0,272±0,12	0,374±0,13 *	0,417±0,22**

*p<0,05 - comparado ao controle (G1) **p<0,01 - comparado ao controle (G1) Teste: Dunnett (ANOVA)
Valores ($\mu\text{mol MDA/g}$) expressos como Média±DP ¹Um rato morreu durante o experimento

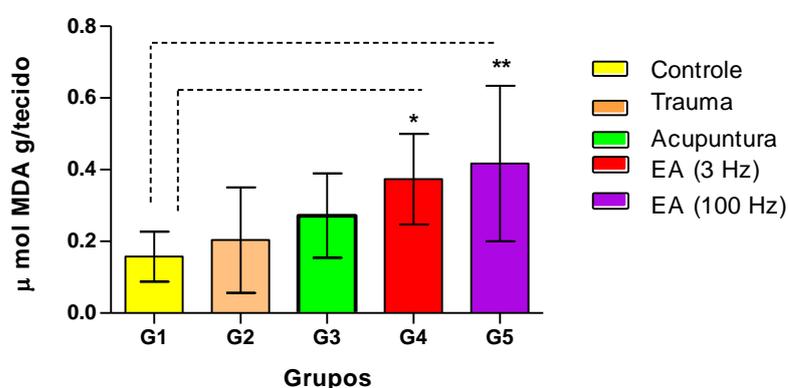


Figura 17 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações de *TBARS* na pele ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido) dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

*p<0,05 - comparado ao controle (G1) **p<0,01 - comparado ao controle (G1) Teste: Dunnett (ANOVA)
Valores ($\mu\text{mol MDA/g}$) expressos como Média±DP

4.1.2 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações plasmáticas de *TBARS* ($\mu\text{mol MDA/ml}$)

Não foram encontradas diferenças significantes nas concentrações plasmáticas de *TBARS* ($\mu\text{mol MDA/ml}$), comparando os grupos G2 e G3 ao controle G1, no 7º dia do estudo. Houve aumento significativo das concentrações de *TBARS* nos grupos G4 e G5, comparados ao grupo controle (G1) no mesmo período (Tabela 4, Figura 18).

Tabela 4 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações de *TBARS* no plasma ($\mu\text{mol MDA/ml}$) dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

G1 (n=8)	G2 (n=8)	GRUPOS		
		G3 (n=8)	G4 (n=7) ¹	G5 (n=7) ¹
0,120±0,05	0,178±0,10	0,223±0,14	0,307±0,12**	0,366±0,08***

p<0,01 - comparado ao controle (G1) *p<0,001 - comparado ao controle (G1) Teste: Dunnett (ANOVA)
 Valores ($\mu\text{mol MDA/ml}$) expressos como Média \pm DP
¹Um rato morreu durante o experimento

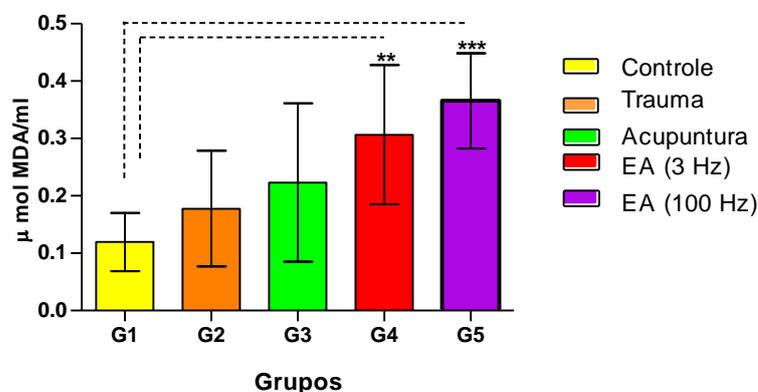


Figura 18 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações de TBARS na pele dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

p<0,01 - comparado ao controle (G1) *p<0,001 - comparado ao controle (G1) Teste: Dunnett (ANOVA)
 Valores expressos como Média \pm DP

4.1.3 Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações teciduais de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido)

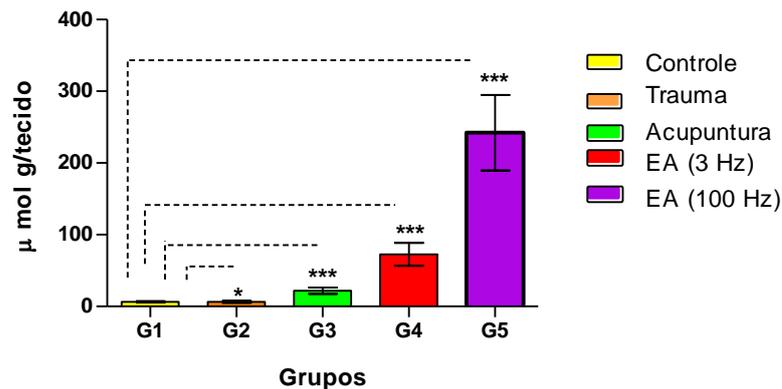
Houve aumento significativo das concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido) nos grupos G2, G3, G4 e G5, comparados ao grupo controle (G1) (Tabela 5, Figura 19).

Tabela 5 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações de GSH na pele ($\mu\text{mol/g}$ tecido) dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

GRUPOS				
G1 (n=8)	G2 (n=8)	G3 (n=8)	G4 (n=7) ¹	G5 (n=7) ¹
16,24 \pm 0,93	54,15 \pm 3,10*	180,50 \pm 10,35***	612,50 \pm 16,89***	2042,00 \pm 56,31***

*p<0,05 - comparado ao controle (G1) ***p<0,0001 - comparado ao controle (G1) Teste: Dunnett (ANOVA)
 Valores ($\mu\text{mol MDA/g}$) expressos como Média \pm DP

¹Um rato morreu durante o experimento



*p<0,05 - comparado ao controle (G1) ***p<0,001 - comparado ao controle (G1) Teste: Dunnett (ANOVA)
Valores expressos como Média±DP ¹Um rato morreu durante o experimento

Figura 19 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações de GSH na pele (µmol/g tecido) dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

p<0,01 - comparado ao controle (G1) *p<0,001 - comparado ao controle (G1) Teste: Dunnett (ANOVA)
Valores expressos como Média±DP

4.1.4 Efeitos da Acupuntura e da Eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações plasmáticas de GSH (µmol/ml)

Houve aumento significativo das concentrações de GSH (µmol /g tecido) nos grupos G4 e G5, comparados ao grupo controle (G1). Não foram encontradas diferenças significativas nas comparações dos grupos G2 e G3, com o controle (Tabela 6, Figura 20).

Tabela 6 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações de GSH no plasma (µmol/ml) dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

GRUPOS				
G1 (n=8)	G2 (n=8)	G3 (n=8)	G4 (n=7) ¹	G5 (n=7) ¹
6,52±0,97	6,56±1,32	21,88±4,40	72,69±15,83***	242,30±52,78***

*p<0,0001 - comparado ao controle (G1)
Valores (µmol MDA/g) expressos como Média±DP

Teste: Dunnett (ANOVA)
¹Um rato morreu durante o experimento

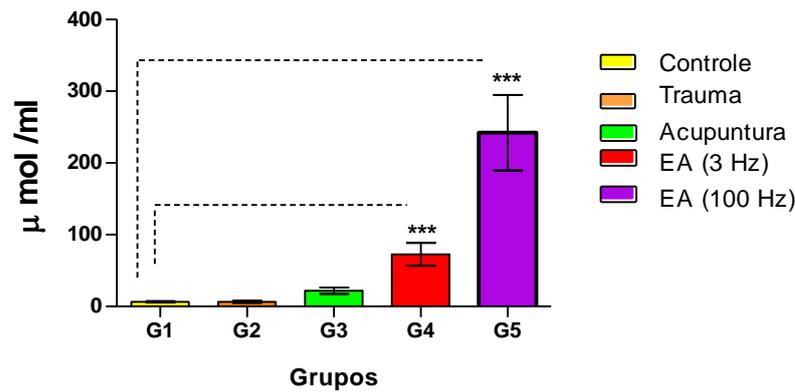


Figura 20 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre as concentrações de *GSH* no plasma ($\mu\text{mol/ml}$) dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

* $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1) Teste: Dunnett (ANOVA) Valores ($\mu\text{mol MDA/g}$) expressos como Média \pm DP
¹Um rato morreu durante o experimento

4.2 – Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre o estresse oxidativo e a inflamação

4.2.1 Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre a atividade da mieloperoxidase na pele (U/g) de ratos

Não foram encontradas diferenças significantes na atividade da mieloperoxidase, comparando-se o grupo G2 ao controle, no 7º dia do estudo. Houve redução significativa na atividade da mieloperoxidase nos grupos G3, G4 e G5, comparados ao controle G1, no mesmo período (Tabela 7, Figura 21).

Tabela 7 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na pele (U/g) dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

GRUPOS				
G1 (n=8)	G2 (n=8)	G3 (n=8)	G4 (n=7) ¹	G5 (n=7) ¹
6,73 \pm 1,29	6,40 \pm 1,39	3,11 \pm 2,80***	1,19 \pm 0,39***	1,38 \pm 0,19***

*** $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1)
 Valores ($\mu\text{mol MDA/g}$) expressos como Média \pm DP
¹Um rato morreu durante o experimento

Teste: Dunnett (ANOVA)

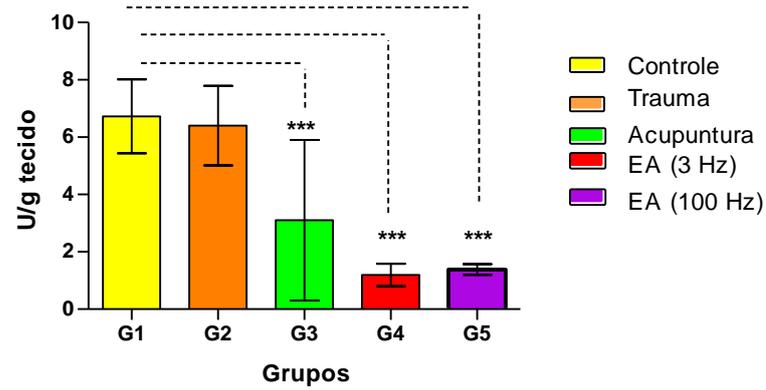


Figura 21 - Efeitos do trauma cirúrgico, da acupuntura e da eletroacupuntura (3 e 100 Hz) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na pele (U/g) dos ratos (Grupos G2-G5) comparados ao grupo controle (G1) no 7º dia do estudo.

* $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1) Teste: Dunnett (ANOVA) Valores ($\mu\text{mol MDA/g}$) expressos como Média \pm DP

¹Um rato morreu durante o experimento

5 DISCUSSÃO

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.*, 2007, p. 532).

A isquemia de retalhos, com conseqüente necrose, continua a ser um importante problema clínico, aumentando a morbidade dos procedimentos de reconstrução cirúrgica (SOUSA FILHO *et al.*, 2008, p. 10). A isquemia tem fundamental papel em muitas situações clínicas perioperatórias. As conseqüências da isquemia em diferentes tecidos dependem de sua duração e de sua reoxigenação decorrentes da reperfusão tecidual (SILVA JR. *et al.*, 2002, p. 98; TARDINI *et al.*, 2003, p. 73). Dependendo desse tempo pode haver desde simples alterações bioquímicas até necrose celular, afetando diretamente o processo de cicatrização (SILVA JR. *et al.*, 2002, p. 98). Vários estudos experimentais têm demonstrado a eficácia de drogas no sentido de prevenir ou atenuar as lesões de isquemia e reperfusão. Têm sido testadas a superóxido dismutase, catalase, manitol, alopurinol, vitamina E, N-acetilcisteína, compostos quelantes de ferro, inibidores da enzima conversora da angiotensina e antagonistas dos canais de cálcio (COLLARD e GELMAN, 2001, p. 10). No presente estudo, testou-se um método diferenciado utilizando acupuntura e eletroacupuntura.

Neste estudo a inflamação e estresse oxidativo foram induzidos utilizando um modelo de retalho cutâneo randomizado em ratos, originalmente descrito em 1965 por McFarland e medindo 2,5 cm de largura e 8 cm de comprimento. Adicionalmente, o uso da combinação Ketamina/Xilazina para indução anestésica pode ter colaborado para o aumento do estresse oxidativo (ALVA; PALOMEQUE; CARBONELL, 2006, p. 316). A xilazina é um agonista alfa adrenérgico usado como sedativo, analgésico e relaxante muscular em medicina veterinária. Outros pesquisadores utilizaram essa mistura, nas mesmas concentrações (DE LIMA *et al.*, 2009, p. 106). Três ratos, um do grupo G2 (R5) e dois do grupo G3 (R4 e R6) necessitaram de aplicação adicional (metade da dose utilizada inicialmente) da mistura anestésica durante o processo de sutura da pele. Dois ratos, um do grupo G4 (R7) e um do G5 (R8) morreram instantaneamente após anestesia no 7º dia de experimento e por essa razão foram excluídos do estudo. Trabalhos demonstram que o uso do anestésico ketamina influencia na atividade da expressão da proteína de choque térmico (HSP70), durante episódio

de isquemia/reperfusão, no córtex cerebral e hipocampo de ratos. Os resultados indicam que a ketamina, injetado 1h antes do tratamento cirúrgico, aumenta a concentração celular de HSP70 nos grupos de animais isquêmicos e nos animais submetidos a cirurgia simulada (RENIS *et al.*, 1994, p. 347). A proteína de choque térmico induzível 70 (Hsp70) é uma proteína de estresse, cuja expressão é ativada quando a célula ou organismo é colocado sob condições de lesão. É a principal proteína produzida como resposta celular a diferentes fatores estressores, como choque térmico, neoplasias e transformações oxidativas. A Hsp70 é essencial para a recuperação celular, sobrevivência e funções normais da célula (GUSHOVA e MARGULIS, 2006, p. 110).

Sabe-se que vários anestésicos, entre os quais citam-se o éter dietílico, o halotano e o óxido nitroso, podem desencadear a formação de radicais livres no fígado. A exposição do rato a uma mistura de óxido nitroso a 50% durante 15 minutos não alterou a função mitocondrial do rato (VAN JAARVELD *et al.*, 1991, p. 153). Outros pesquisadores demonstraram que a anestesia com cloridrato de ketamina (30mg/Kg, i.p.) não induz alterações nas concentrações de TBARS (AKGÜR; KILINC; AKTUG, 1993, p. 391).

Vários métodos são utilizados para a avaliação do estresse oxidativo. A lipoperoxidação é um marcador para a lesão das membranas celulares e, no método de TBARS, é aferida através da formação de um composto intermediário da lipoperoxidação, o malondialdeído (MDA). O teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA) foi introduzido por Kohn e Liversedge em 1944 e ainda é um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica (CHIRICO, 1994, p. 316). O estresse oxidativo pode ser avaliado por dosagens de glutatona reduzida (GSH) e/ou pelo cálculo da razão glutatona reduzida/glutatona (FERREIRA; MATSUBARA, 1997, p. 64).

No presente experimento, a construção dos retalhos cutâneos não induziu, aparentemente, o aumento da peroxidação lipídica, como era esperado. Ressalte-se que a coleta a de material foi feita no 7º dia pós-operatório, o que poderia explicar a ausência do aumento do MDA nos ratos do grupo G2, não submetidos ao tratamento pela AC/EA (Tabelas 3 e 4). Por outro lado, verificou-se que a utilização da EA propiciou um aumento da peroxidação lipídica, o que não ocorreu quando foi utilizada apenas a acupuntura. Resultado semelhante foi apresentado por Honório-Silva (2009, p. 56), utilizando EA nas frequências de 10 e 100 Hz. Shi *et al.* (2010, p. 398) utilizaram duas frequências (2 e 100 Hz) alternadamente durante 60 minutos aplicadas no acuponto "Zusanli," localizado cinco milímetros abaixo da cabeça da fíbula sob a articulação do joelho e 2 mm lateralmente ao tubérculo anterior da

tíbia (YIN *et al.*, 2008, p. 162) pode promover o fluxo sanguíneo hepático, inibem a peroxidação lipídica e aliviam o edema e disfunção hepática em ratos sépticos.

Entretanto, outros pesquisadores apresentaram resultados diametralmente opostos. Wang *et al.* (2011, p. 193) estudaram os efeitos da EA em modelo experimental de doença de Parkinson em camundongos e verificaram que o uso da EA (100 Hz) reduziu significativamente as concentrações teciduais de MDA no 7º dia do experimento. Assim, não há uma explicação clara para justificar achados tão diferentes. Questiona-se se o tamanho dos animais com maior massa ponderal poderia ter influenciado esse resultado, considerando que o rato é muito maior que o camundongo. Estudos adicionais poderão trazer novos esclarecimentos.

O aumento das concentrações de GSH, no 7º dia do experimento, claramente demonstrado nas Tabelas 5 e 6, tanto no tecido (pele) dos ratos tratados com AC e EA mostra que estes tratamentos são capazes de reduzir o estresse oxidativo, aumentando das reservas de GSH. Por outro lado, a aplicação da AC não induziu aumento das concentrações de GSH nos ratos tratados, diferentemente da EA onde o aumento ocorreu tanto nos ratos submetidos à AC quanto nos animais tratados com EA, independentemente da frequência utilizada. Já o aumento verificado na pele dos ratos submetidos apenas ao trauma cirúrgico (Tabela 5) poderia ser consequente ao mecanismo de recuperação do próprio organismo, ao final do período de cicatrização. Em um estudo publicado recentemente, Wang *et al.* (2011, p. 194) analisaram os conteúdos de GSH no tecido cerebral em modelo experimental de doença de Parkinson em camundongos, sendo constatado um aumento significativo da concentração de GSH no 3º dia do experimento. Entretanto, o aumento de GSH não persistiu até o 7º dia, quando não foram verificadas diferenças significantes nas concentrações de GSH, nos animais tratados pela EA (100 Hz), comparados ao grupo controle. Os mecanismos pelos quais a acupuntura e a eletroacupuntura estimulam uma maior produção de GSH ainda não foram esclarecidos.

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, p. 212). A mieloperoxidase, por outro lado, forma os radicais livres e substâncias oxidantes citotóxicas difusíveis que promovem lesões oxidativas aos tecidos e a células endoteliais no contexto da resposta inflamatória aguda. A MPO reflete o grau do processo inflamatório agudo (PEDRO *et al.*, 2003, p. 213).

No presente experimento, com relação a atividade da MPO nos retalhos dos animais estudados dos grupos G3, G4 e G5, observou-se que houve diminuição considerável da atividade da enzima, em relação ao grupo controle G1, como pode ser visto na tabela 5. 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 ratos; nessa pesquisa, a acupuntura aplicada a um único ponto, sem estimulação elétrica, provocou significativos efeitos anti-inflamatórios, com redução da atividade da mieloperoxidase.

Considerações finais

Os efeitos da AC e da EA em tecidos de animais anestesiados submetidos ao trauma cirúrgico foram cuidadosamente estudados. Os resultados obtidos ratificam achados demonstrados por outros pesquisadores. As causas da ausência de aumento dos níveis de peroxidação lipídica em animais não tratados com AC ou EA não ficaram esclarecidas, pois a argumentação que haveria uma compensação natural, resultante da atividade auto-protetora, inerente aos organismos vivos, foi contestada pelo trabalho de Wang *et al.* (2011), já discutido anteriormente. Estudos utilizando um maior número de coletas, em diferentes períodos posteriores ao trauma cirúrgico, poderão esclarecer esses questionamentos.

5 CONCLUSÃO

Nas condições em que foi desenvolvido este trabalho, pode-se concluir que:

- 1) A eletroacupuntura promove aumento local e sistêmico da peroxidação lipídica.
- 2) A acupuntura e a eletroacupuntura reduzem o estresse oxidativo local e sistêmico e atenuam a resposta inflamatória na pele de ratos saudáveis.

REFERÊNCIAS

- ALVA, N.; PALOMEQUE, J.; CARBONELL, T. Nitric oxide induced by ketamine/xylazine anesthesia maintains hepatic blood flow during hypothermia. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 1, p. 64-69, 2006.
- ALVAREZ, J.G.; MINARETZIS, D.; BARRET, C. B. The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. **Fertilidade Steril**, v. 65, p. 400-405, 1996.
- AKGÜR, F. M.; KILINC, K.; AKTUG, T. Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in prepuberal rats. **Urol. Res.**, v. 21, n. 6, p. 389-393, 1993.
- ANGEL, M. F.; RAMASASTRY, S. S; SWARTZ, W. M. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. **Plast. Reconst. Surg.**, v. 81, n. 2, p. 233-239, 1988.
- AYDOGAN, H.; GURLEX, A.; PARLAKPINAR, H.; ASKAR, I.; BAY-KARABULUT, A.; AYDOGAN, N.; FARIZ, A.; ACET, A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. **Jour. of Plast., Reconst. and Aesth. Surg.**, p. 01-06, 2006.
- BANNERMAN, R. H. The world health organization viewpoint on acupuncture. **American Journal of Acupuncture**, v. 8, n. 3, p. 231-235, 1980.
- BÄR, A.; LI, Y.; EICHLISBERGER, R.; ANGST, F.; AESCHLIMANN, A. Acupuncture improves peripheral perfusion in patients with reflex sympathetic dystrophy. **J. Clin. Rheumatol.**, v. 8, n. 1, p. 6-12, jul. 2002.
- 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. 146, n. 1, p. 27-32, jan. 1995.
- BRAUNWALD, E.; KLONER, R. A. Myocardial reperfusion: A double-edge sword? **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 1713-1719, 1985.
- BOIN, I. F. S. F. **Atuação do WEB 2086 como inibidor da ação do fator de ativação plaquetária (PAF) em ratos wistar submetidos à isquemia hepática seltiva normotérmica e reperfusão.** 1997. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CASE, R. B. The ischemic myocardium: Metabolic, electrolyte and atructural abnormalities. In: Carvalho VB, Macruz R, eds - *Cardiopatia Isquêmica: Aspectos de Importância Clínica.* **Sarvier**, São Paulo, p. 63-72, 1989.

CHIRICO, S. High Performance Liquid Chromatography-based Thiobarbituric acid tests. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 314-318, 1994.

COLLARD, C.D, GELMAN, S. Pathophysiology, Clinical manifestations and prevention of ischemia – reperfusion injury. **Anesthesiology**, v. 94, p. 1-11, 2001.

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 01 Outubro 2011.

DE LIMA SILVA, J. J.; GUIMARÃES, S. B., DA SILVEIRA, E. R.; DE VASCONCELOS P. R.; LIMA, G. G.; TORRES, S. M.; DE VASCONCELOS, R. C. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. **Aesthetic Plast. Surg.**, v. 33, n.1, p.104-109, 2009.

DORFER, L. A medical report from the stone age? **Lancet**, v. 354, n. 9183, p. 1023-1025, 1999.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de isquemia-reperusão: aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 66, n. 4, 1996. Atualização.

FARBER, J. L.; CHIEN, K. R.; MITTNNACHT, S. JR. The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. **Am. J. Pathol.**, v. 102, p. 271-281, 1981.

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.

FREITAS, F. A. S. D.; PICCINATO, C. E.; CAMPOS, A. D.; CHERRI, J. Estudo da isquemia e reperusão em retalhos cutâneos de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 74-78, 2002. Suplemento 3.

FROIO, L.R. **A expansão da Medicina Tradicional Chinesa: uma análise da vertente cultural das Relações Internacionais**. 2006. 120f. Dissertação (Mestrado em Relações Internacionais) - Universidade de Brasília, Instituto de Relações Internacionais, IREL, Brasília, 2006.

FURLAN, A. D.; VAN TULDER, M. W; CHERKIN, D. C; TSUKAYAMA, H; LAO, L.; KOES, B. W; BERMAN, B. M. **Centro Cochrane do Brasil – Acupuntura para lombalgia**. 2005. 207f. Revisão Sistemática publicada na Cochrane Library, São Paulo, 2006.

GUIRRO, E. C. O.; FERREIRA, A. L.; GUIRRO, R. R.J. Estudos preliminares dos efeitos da corrente galvânica de baixa intensidade no tratamento de estrias atróficas da cútis humana. **Anais do X Congresso Brasileiro de Fisioterapia**, Fortaleza, CE, 1991.

GUZHOVA, I.; MARGULIS, B. Hsp70 chaperone as a survival factor in cell pathology. **Int Rev. Cytol.**, v. 254, p. 101-149, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1985, 543 p.

_____ **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989, 543 p.

HARASHIMA, T.; SAWADA, Y.; WATANABE, S. The relationship between venous occlusion time in island flaps and flap survivals. **Plast. Reconst. Surg.**, v. 44, p. 500-505, 1991.

HONÓRIO-SILVA, A. **Efeitos da Acupuntura e da Eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em ratos sadios**. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Universidade Federal do Ceará, 2009.

JAGGAR, D. History and basic introduction to veterinary acupuncture. **Problems in Vet. Med.**, v. 4, n. 1, p. 13-15, 1992.

JORDÃO JR A. A.; CHIARELLO P. C.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, jul./set. 1998.

KARIME, G. K. G. de M. Estudo comparativo por meio do método de varredura e galvanopuntura. **Revista Fisio & Terapia**, ano X, n. 51, jul./ago. 2006.

KONOY, O. K.; TANAKA, J. Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. **Transplantation**, v. 33, p. 150-155, 1982.

KU, D. D. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. **Science**, v. 218, p. 576-578, 1982.

LEFER A. M.; LEFER D. J. Endothelial dysfunction in myocardial ischemia and reperfusion: role of oxygen-derived free radicals. **Basic Res. Cardiol.**, v. 86, p. 109-116, 1991. Supplement 2.

LIU, C. Z.; YU, J. C.; ZHANG, X. Z.; FU, W. W.; WANG, T.; HAN, J. X. Acupuncture prevents cognitive deficits and oxidative stress in cerebral multi-infarction rats. **Neurosci. Lett.**, v. 393, n. 1, p. 45-50, 2006.

LUNDEBERG, T. Peripheral effects of sensory nerve stimulation (acupuncture) in inflammation and ischemia. **Scand. J. Rehab. Med.**, v. 29, p. 61-86, 1993. Supplement.

MACDONALD, A.J.R. A brief review of the history of electrotherapy and its union with acupuncture. **Acupuncture in Medicine**, v. 11, n. 2, p. 66-75, 1993.

MACIOCIA, G. **Os fundamentos da medicina chinesa: um texto abrangente para acupunturistas e fisioterapeutas.** São Paulo: Roca, 2007. 1000p.

MANSON, P. N.; ANTHENELLI, R. M.; IM, M. J. The role of oxygen – free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. **Ann. Surg.**, v. 198, n. 1, p. 87-90, 1983.

MCFARLANE, R. M.; DEYOUNG, G.; HENRY, R. A. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 35, p. 177–182, 2008.

MEDEIROS, R.; SAAD, M. Acupuntura: efeitos fisiológicos além do efeito placebo. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 69-72, 2009.

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

MIZOCK, B.; FALK, J. Lactic acidosis in critical illness. **Crit. Care Med.**, v. 20, n. 1, p. 80-93, 1992.

MOTA, D. S. C. D. **Estudo da microcirculação e do efeito do óleo de peixe e de seus componentes purificados em retalhos cutâneos randomizados em hamsters.** 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

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 Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-534, 2007.

NESTLER, G. Traditional Chinese medicine. **Med. Clin. North Am.**, v. 86, p. 63-73, 2002.

NICHOLS, W. W.; MEHTA, J. L.; DONNELLY, W. H.; LAWSON, D.; THOMPSON, L., RIET, M. Reduction in coronary vasodilator response following coronary occlusion and reperfusion in anesthetized dog: Role of endothelium-derived relaxing factor, myocardial neutrophil infiltration and prostaglandins. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 20, p. 943-954, 1988.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Revista Saúde do Mundo.** Genebra: Organização Mundial de Saúde, 1979. 40p.

OHKAWA, J. Lipid peroxidation in erythrocytes of patients with type 2 diabetes mellitus. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 71-74, 1979.

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. Gastreenterol.**, v. 10, p. 209-214, 2003.

RENIS, M.; DI, G. C.; SORRENTI, V.; RUSSO, A.; LA DELFA, C.; REALE, S.; BARCELLONA, M. L.; VARELLA, A. Heat shock proteins following rat cerebral

ischemic/reperfusion episode: effect of ketamine. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 33, n.2, p. 345-354, may. 1994.

RIBEIRO, M. E.; YOSHIDA, W. B. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. **J. Vasc. Br.**, v. 4, n. 2, p. 183-194, 2005.

SAGI, A.; FERDER, M.; LEVENS, D.; STRAUCH, B. Improved survival of island flaps after prolonged ischemia by perfusion with superoxide dismutase. **Plast. Reconst. Surg.**, v. 77, n. 4, p. 639-642, 1986.

SCHIPPERS, R. **The history of veterinary acupuncture and moxibustion outside China.** 1993. 81f. Thesis (PHD – Tierärztliche) - Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1993.

SCHOEN, A. **Acupuntura veterinária: da arte antiga à medicina moderna.** 2.ed. São Paulo: Roca, p. 91-108, 2006.

SCHOEN, A. M. Introduction to veterinary acupuncture: scientific basis and clinical applications. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. **Proceedings**, San Diego, p. 39, 1993.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R. Effect of various acupuncture treatment protocols upon sepsis in wistar rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 251-256, 2004.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BECHARA, G. H. Acupuntura: histórico, bases teóricas e sua aplicação em Medicina Veterinária. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, fev. 2010.

SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Reperfusion injury. In: Vasoactive Factors Produced By The Endothelium: Physiology and Surgical Implications. **R.G. Landes Company**, Austin, p. 27-41, 1994.

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, oct. 1968.

SHI, X; ZHANG, L.J.; BAI, H.Y.; BAO, C.M.; HU, S.; GUAN, L. Effects of electroacupuncture on hepatic blood flow and lipid peroxidation in septic rats [Artigo em Chinês] **Zhongguo Zhen Jiu**, v. 30, n. 5, p. 397-400, 2010.

SILVA, J. D. O. **Estética facial: a eficácia da acupuntura no tratamento de rugas:** 2008. 90 f. Monografia (Especialização em Acupuntura) – Faculdade de Educação, Ciência e Tecnologia, Unisaúde, Montes Claros, 2008.

SILVA JR., O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G., BRISOTTI, J. L., OLIVEIRA, A. F., SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, p. 96-100, 2002. Suplemento 3.

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 Sciences**, v. 77, n. 4, p. 386-99, jun. 2005.

SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 283-287, 1984.

SOUSA FILHO, M. V. P.; LEAL, P. R. A.; SBALCHIERO, J. C.; MARQUES, M. J. M. Efeito do Extrato de Ginkgo Biloba na sobrevida de retalhos cutâneos em ratos. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 5-56, 2008.

TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B.; NOVELLI, E. L. B.; SEQUEIRA, J. L. Avaliação de dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos com oclusão temporária carotídea associada ou não à oclusão vertebral. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 6, p. 70-77, 2003.

UEMA, D.; ORLANDI, D.; FREITAS, R. R.; RODGÉRIO, T.; YAMAMURA, Y.; TABOSA, A. F. Effect of eletroacupuncture on DU-14 (Dazhui), DU-2 (Yaoshu), and Liv-13 (Zhangmen) on the survival of Wistar rats' dorsal skin flaps. **J. Burn. Care Res.**, v. 29, n. 2, p. 353-357, 2008.

VAN JAARSVELD, H.; KUYL, J. M., DE WET; E. H., ALBERTS, D. W.; VAN DER WESTHUIZEN, F. D. Effect of various mixtures of diethylether, halothane, nitrous oxide and oxygen on low molecular weight iron content and mitochondrial function of the rat myocardium. **Free Rad. Res. Commun.**, v. 15, n. 3, p. 151-57, 1991.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO-JUNIOR, A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no defesa de sistema antioxidante. **Simpósio: Nutrição Clínica**. Medicina, Ribeirão Preto, v. 31, p. 31-44, 1998.

VETERINARY ACUPUNCTURE. Beijing: Beijing Agricultural University, 1992. 222p.

VETERINARY ACUPUNCTURE: old wives' tale or new clinical tool? **Modern Veterinary Practice**, v. 54, n. 12, p. 37-42, 1973.

WANG, H.; PAN, Y.; XUE, B.; 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, 190-197, 2011.

WHITE, P. A. S.; GOMES, R. C.; MENDONÇA, A. C.; BRAGANHOLO, L. P.; FERREIRA, A. S. Efeitos da galvanopuntura no tratamento das estrias atroficas. **Fisioterapia Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 53-58, jan./fev. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on basic training and safety in acupuncture**. Genebré: World Health Organization, 1999. 20p.

YIN, C. S.; JEONG, H. S.; PARK, H. J.; BAIK, Y.; YOON, M. H.; CHOI, C. B.; KOH, H. G. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Res Vet Sci.**, v. 84, n. 2, p. 159-165, 2008.

ZHANG, H.; LIU, L.; HUANG, G.; ZHOU, L.; WU, W.; ZHANG, T.; HUANG, H. Protective effect of electroacupuncture at the Neiguan point in a rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion injury. **Can J Cardiol.**, v. 25, n. 6, p. 359-63, 2009.

APÊNDICE

APÊNDICE A - DADOS BRUTOS CONCENTRAÇÃO DE TBARS, GSH E MPO

Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no tecido (pele) - grupos G1-G5				
GRUPOS				
G1	G2	G3	G4	G5
4,757	5,388	4,448	1,908	1,434
6,996	6,075	1,531	1,134	1,494
4,978	6,946	3,171	1,443	1,176
6,600	8,513	7,881	1,282	1,738
8,430	7,319	6,052	0,835	1,217
7,351	4,651	0,747	0,840	1,305
7,858	7,526	0,738	0,904	1,323
6,867	4,821	0,273		

Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no plasma - grupos G1-G5				
GRUPOS				
G1	G2	G3	G4	G5
0,085	0,224	0,501	0,323	0,290
0,141	0,092	0,093	0,288	0,352
0,205	0,109	0,283	0,180	0,307
0,172	0,062	0,322	0,149	0,488
0,052	0,300	0,157	0,462	0,454
0,090	0,120	0,167	0,457	0,275
0,087	0,337	0,098	0,288	0,394
0,124	0,178	0,167		

Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /g}$) no tecido (pele) - grupos G1-G5				
GRUPOS				
G1	G2	G3	G4	G5
15,977	53,257	177,523	591,744	1972,481
16,475	54,917	183,056	610,188	2033,961
15,919	53,062	176,872	589,574	1965,248
16,885	56,284	187,613	625,377	2084,591
16,534	55,112	183,707	612,358	2041,194
16,885	56,284	187,613	625,377	2084,591
17,090	56,967	189,892	632,972	2109,907
14,190	47,301	157,669		

Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /g}$) no plasma - grupos G1-G5				
GRUPOS				
G1	G2	G3	G4	G5
6,587	6,377	21,256	70,852	236,173
6,150	6,103	20,344	67,815	226,049
6,200	6,007	20,022	66,741	222,469
7,880	4,047	13,489	44,963	149,877
4,773	7,747	25,822	86,074	286,914
7,733	7,037	23,456	78,185	260,617
6,347	8,480	28,267	94,222	314,074
6,523	6,713	22,378		

Concentrações de MPO (U/g) no tecido (pele) - grupos G1-G5

57

GRUPOS				
G1	G2	G3	G4	G5
4,757	5,388	4,448	1,908	1,434
6,996	6,075	1,531	1,134	1,494
4,978	6,946	3,171	1,443	1,176
6,600	8,513	7,881	1,282	1,738
8,430	7,319	6,052	0,835	1,217
7,351	4,651	0,747	0,840	1,305
7,858	7,526	0,738	0,904	1,323
6,867	4,821	0,273		

ANEXO

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL PARA
IMPLEMENTAÇÃO DA PESQUISA

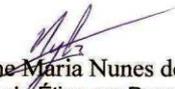
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

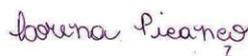
DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 04/09, sobre o projeto intitulado: **“Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura na isquemia- Reperfusão de retalhos cutâneos randomizados em ratos”**, de responsabilidade de LORENA PICANÇO DE LIMA, 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 29 de junho de 2009.

Fortaleza, 29 de junho de 2009.


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


Lorena Picanço