



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

ANDRÉ BRITO BASTOS GUIMARÃES

**EFEITOS MODULATÓRIOS DA ACUPUNTURA E DA
ELETROACUPUNTURA NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA
INFLAMAÇÃO AGUDOS INDUZIDOS POR DEPRESSÃO
EXPERIMENTAL NO RIM DO RATO**

**FORTALEZA
2016**

ANDRÉ BRITO BASTOS GUIMARÃES

**EFEITOS MODULATÓRIOS DA ACUPUNTURA E DA
ELETROACUPUNTURA NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA
INFLAMAÇÃO AGUDOS INDUZIDOS POR DEPRESSÃO
EXPERIMENTAL NO RIM DO RATO**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará (UFC), 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. Francisco das Chagas Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Botelho Guimarães

**FORTALEZA
2016**

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

-
- G976e Guimarães, André Brito Bastos.
 Efeitos modulatórios da acupuntura e da eletroacupuntura no estresse oxidativo e na inflamação agudos induzidos por depressão experimental no rim do rato./ André Brito Bastos Guimarães. – 2016. 75f.: il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Mestrado em Cirurgia, Fortaleza, 2016.
 Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.
 Orientação: Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros.
 Co-Orientação: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.
1. Depressão. 2. Inflamação. 3. Estresse Oxidativo. 4. Acupuntura. 5. Eletroacupuntura. I. Título.

CDD 616.8527

ANDRÉ BRITO BASTOS GUIMARÃES

**EFEITOS MODULATÓRIOS DA ACUPUNTURA E DA
ELETROACUPUNTURA NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA
INFLAMAÇÃO AGUDOS INDUZIDOS POR DEPRESSÃO
EXPERIMENTAL NO RIM DO RATO**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará (UFC), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em 04 / 02 / 2016

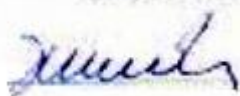
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Orleancio Gomes Ripardo de Azevedo
Faculdades Nordeste (FANOR)



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



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

Dedico este trabalho ao meu pai, Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães, exemplo maior de sabedoria e perseverança na busca do conhecimento e na dedicação ao ensino de qualidade.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que todos os dias da minha vida me dá forças para nunca desistir.

Ao meu orientador, PROF. DR. FRANCISCO DAS CHAGAS MEDEIROS, pelo acolhimento como orientando.

Ao meu co-orientador, PROF. DR. SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES, pelo incentivo, ensinamentos, acolhimento, confiança e paciência, tornando, assim, possível alcançar o meu objetivo. A ele minha eterna gratidão pela realização de um sonho.

Ao PROF. DR. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas, da Universidade Federal do Ceará pelo apoio, ensinamentos e pela grande dedicação na busca do conhecimento científico.

Ao PROF. DR. LUSMAR RODRIGUES VERAS coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas, da Universidade Federal do Ceará pelo apoio e ensinamentos preciosos.

Aos componentes da Banca de Qualificação, Professoras Ms. LORENA PIKANÇO DE LIMA, Coordenadora do Curso de Graduação em Enfermagem da Faculdade Ateneu, PROF. DRA MARIA APARECIDA ALVES DE OLIVEIRA da Universidade Federal do Maranhão, campus Imperatriz e PROF. DRA. REGINA FÁTIMA GONÇALVES FEITOSA do Departamento de Saúde Comunitária da UFC, meus sinceros agradecimentos pela contribuição expressiva para a melhoria deste projeto de pesquisa.

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, secretárias do Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela eficiência,atenção e dedicação sempre dispensadas aos alunos da pós-graduação e a todos os colegas da pós-graduação por compartilharem comigo essa jornada de anseios e expectativas para a realização deste Curso de Mestrado. Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução deste trabalho.

RESUMO

Depressão é um termo usado por profissionais de saúde para descrever um espectro de alterações de humor, variando em características, intensidade e duração. A exposição ao estresse crônico pode desencadear mudanças a longo prazo ou permanentes nas respostas emocionais, fisiológicas e comportamentais que influenciam a suscetibilidade e a evolução de enfermidades. Estudos demonstraram que a exposição prolongada a estressores psicológicos pode aumentar o risco de enfermidades devido à maior produção de substâncias oxidantes e das resultantes lesões oxidativas. O estresse crônico moderado (ECM) é um modelo experimental de depressão que tem por objetivo verificar a relação entre a exposição de sujeitos, comumente ratos, a um conjunto de estímulos aversivos crônicos e moderados por um longo e ininterrupto período de tempo. Um número crescente de trabalhos científicos tem demonstrado que as citocinas inflamatórias desempenham um papel importante na gênese do processo inflamatório presente em pacientes que padecem de transtornos depressivos. Considerando que o estresse oxidativo, a inflamação e a depressão estão relacionados, este estudo foi concebido para analisar os efeitos da acupuntura (Ac) e da eletroacupuntura (EAc) sobre a inflamação e o estresse oxidativo agudos produzidos por depressão experimental no rim do rato. Para avaliação dos efeitos da Ac e da EAc, 24 ratos saudáveis foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos (G1-G4) e submetidos ao ECM durante 42 dias. Na comprovação da instalação do estado depressivo nos animais experimentais foram submetidos ao Teste de Preferência da Sacarose (TPS) e ao Teste do Nado Forçado (TNF). Os ratos dos grupos G2-G4 foram tratados com AC e EAC (2Hz e 100 Hz), respectivamente, durante 12 dias, em dias alternados, por 20 minutos. No 63º dia do experimento os animais foram sedados com hidrato de cloral por via intraperitoneal para a coleta do rim direito e 3,0ml de sangue arterial. Posteriormente os animais foram sacrificados utilizando-se uma dose triplicada do mesmo fármaco. Foram avaliadas as concentrações de uréia e creatinina, glutathiona reduzida (GSH), malonaldeído (MDA) e atividade de mieloperoxidase (MPO). O uso da EAc promoveu aumento significativo ($p < 0,0001$) das concentrações de uréia sérica no último dia do estudo. Não ocorreram alterações nos ratos tratados com Ac. Houve aumento significativo das concentrações de GSH sérico e tecidual (rim) no último dia do estudo nos roedores dos grupos G3-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1). Não foram observadas diferenças significantes nas concentrações de MDA sérico e tecidual (rim) na comparação entre os Grupos G2-G4 e o grupo controle G1. Entretanto, houve diminuição significativa na atividade da mieloperoxidase no rim dos ratos comparando-se os grupos G2-G4 ao grupo G1. Conclui-se que a Ac e a EAc exercem um efeito protetor sobre o estresse oxidativo renal e promovem redução do processo inflamatório no rim de ratos submetidos ao estresse moderado crônico imprevisível.

Descritores: Depressão; estresse oxidativo; inflamação; acupuntura; eletroacupuntura.

ABSTRACT

Depression is a term used by health professionals to describe a spectrum of mood changes, varying in characteristics, intensity and duration. Exposure to chronic stress can trigger long-term or permanent changes in the physiological, behavioral and emotional responses that influence susceptibility and the evolution of disease. Studies have shown that prolonged exposure to psychological stressors may increase the risk of disease due to increased production of oxidizing substances and the resulting oxidative damage. Moderate chronic stress (MCS) is an experimental model of depression which aims to check the relationship between exposure of subjects, commonly rats, to a set of aversive and moderate chronic stimuli for a long and uninterrupted period of time. An increasing number of scientific studies have shown that the inflammatory cytokines play an important role in the genesis of inflammatory process present in patients suffering from depressive disorders. Whereas the oxidative stress, inflammation and depression are related, this study was designed to examine the effects of acupuncture (Ac) and electro acupuncture (EAc) on inflammation and oxidative stress produced by experimental depression in rat kidney. In order to evaluate the modulatory effects of Ac and EAc, 24 healthy rats, randomly divided into 4 groups (G1-G4) were submitted to the ECM for 42 days. The sucrose preference test (SPT) and the Forced Swim test (FST). were used for verification of the depressive state. G2-G4 rats were treated with Ac and EAc (2Hz and 100 Hz), respectively, for 12 days, on alternate days, for 20 minutes. In the 63th day of the experiment, the animals were sedated with chloral hydrate for the collection of the right kidney and 3 ml of arterial blood. Later the animals were sacrificed using a triple dose of the same drug. Levels of urea and creatinine, reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) activity were assayed. The use of the EAc promoted a significant increase ($p < 0.0001$) in serum urea concentrations on the last day of the study. Changes did not occur in rats treated with Ac. There was a significant increase in serum and tissue (kidney) concentrations of GSH in G2-G4 groups compared to control group (G1) on the last day of the study. No significant differences were observed in the serum and renal tissue in MDA concentrations when comparing groups G2-G4 with the control group G1. However, there was a significant decrease in the activity of myeloperoxidase in the kidney of the rats (G2-G4 versus G1 groups). It is concluded that the Ac and the EAc exert a protective effect on renal oxidative stress and reduce the inflammatory process in the kidney of rats exposed to moderate chronic unpredictable stress.

Keywords: Depression; Oxidative stress; Inflammation; Acupuncture; Electroacupuncture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho do experimento	25
Figura 2	Delineamento do experimento	28
Figura 3	Rato posicionado no dispositivo utilizado, para aclimação (preparação para as sessões de Ac e EAc).....	29
Figura 4	Locais de inserção das agulhas de acupuntura.....	30
Figura 5	Rato posicionado para as sessão de EAc- agulhas inseridas e conectadas ao eletroestimulador	30
Figura 6	Peso do rim direito ao término do experimento	38
Figura 7	Peso do rim esquerdo ao término do experimento	38
Figura 8	Efeitos da Acupuntura e da Eletroacupuntura em ratos deprimidos submetidos ao teste de nado forçado	40
Figura 9	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico imprevisível, sobre as concentrações de uréia plasmática nos roedores dos grupos G2-G4 comparados ao grupo controle positivo (G1)	41
Figurac10	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de creatinina plasmática nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo	42
Figura 11	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de GSH plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo	43
Figura 12	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de GSH no rim dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo	44
Figura 13	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle	

	positivo (G1) no último dia do estudo	45
Figura 14	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA no rim dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo	46
Figura 15	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz)sobre a atividade da MPO (U/g tecido) no rim de ratos sadios submetidos ao estresse moderado crônico (Grupos G2-G4) comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso médio dos ratos utilizados no estudo	39
Tabela 2	Alterações do peso do rato durante o experimento	39
Tabela 3	Alterações do peso médio dos rins dos ratos no último dia do experimento (Dia 63)	40
Tabela 4	Teste de preferência da sacarose, realizado em 3 momentos	41
Tabela 5	Teste do nado forçado. Tempo de imobilidade ou flutuação passiva dos ratos	41
Tabela 6	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico , sobre as concentrações de uréia no sangue dos animais	43
Tabela 7	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico , sobre as concentrações de creatinina no sangue dos animais	44
Tabela 8	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico , sobre as concentrações de GSH no sangue dos animais	45
Tabela 9	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre a concentração de GSH ($\mu\text{mol GSH/ g}$) no rim de ratos sadios submetidos ao estresse moderado crônico (Grupos G2-G4) comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo	46
Tabela10	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo	47
Tabela11	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA no rim dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo	48
Tabela12	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre a atividade da MPO (U/g tecido) no rim de ratos sadios submetidos ao estresse moderado crônico (Grupos G2-G4) comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo	49

Tabela13	Resumo dos achados laboratoriais	50
-----------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Acupuntura
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DP	Desvio Padrão
EAc	Eletroacupuntura
ECM	Estresse crônico moderado
E36	Acuponto Estômago 36
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G1	Grupo Controle
GAc	Grupo Acupuntura
GEAc2	Grupo Eletroacupuntura 2 hertz
GEAc100	Grupo Eletroacupuntura 100 hertz
GSH	Glutathione reduzida
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H⁺	Íon hidrogênio
Hz	Hertz
IP	Intraperitoneal
mA	Miliampére
MDA	Malondialdeído
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
µmol/L	Micro mol por litro
µmol/g	Micro mol por grama
MPO	Mieloperoxidase
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
LPO	Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
	1.1 Estresse oxidativo	17
	1.2. A Inflamação e o estado depressivo	19
	1.3 A Acupuntura	20
	1.4 A eletroacupuntura	23
	1.5 Relevância e Justificativa	24
2	OBJETIVO.....	25
3	MÉTODO.....	26
	3.1 Aspectos éticos	26
	3.2 Tipo de estudo e amostra	26
	3.3 Distribuição da amostra	27
	3.4 Indução da depressão	27
	3.5 Testes comportamentais	28
	3.5.1 Teste de Preferência da Sacarose (TPS)	28
	3.5.2 Teste de nado forçado (TNF)	29
	3.6 Localização dos pontos de acupuntura / eletroacupuntura	29
	3.7 Delineamento experimental	30
	3.8 Condicionamento dos ratos	30
	3.9 Protocolo de aplicação da Acupuntura / Eletroacupuntura	31
	3.10 Coleta de amostras	33
	3.11 Exames laboratoriais	33
	3.11.1 Determinação das concentrações de Ureia e Creatinina	34
	3.11.2 Avaliação da peroxidação lipídica	34
	3.11.3 Determinação das substancias reativas ao acido tiobarbitúrico(MDA).....	34
	3.11.4 Determinação de grupos sulfidrilicos não proteicos (Glutationa- GSH)	35
	3.11.5 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)	36
	3.12 Análise estatística	37
4	RESULTADOS.....	38
	4.1 Complicações.....	38
	4.2 Peso dos ratos	38
	4.3 Peso dos rins	39
	4.4 Testes comportamentais	40
	4.4.1 Teste de preferência da sacarose	40
	4.4.2 Teste do nado forçado	41
	4.5 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico , sobre as concentrações de uréia e creatinina no sangue dos animais	42
	4.5.1 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) sobre a concentração de uréia no sangue dos ratos	42
	4.5.2 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) sobre a concentração de creatinina no sangue dos ratos.....	43
	4.6 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, sobre as concentrações de GSH no sangue e no rim dos animais	44

4.6.1	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a concentração de GSH no sangue dos ratos	44
4.6.2	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) sobre a concentração de GSH no rim dos ratos	45
4.7	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, sobre as concentrações de MDA no sangue e no rim dos animais	46
4.7.1	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) sobre a concentração de MDA no sangue dos ratos	46
4.7.2	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) sobre a concentração de MDA no rim dos ratos	47
4.8	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, sobre as concentrações de MPO no rim dos animais.	48
4.9	Resumo dos achados laboratoriais	49
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÃO.....	54
7	REFERENCIAS	55
8	APÊNDICES.....	63
	Apêndice A - Rotina para a aplicação dos estressores moderados e imprevisíveis	63
	Apêndice B - Peso dos animais	64
	Apêndice C - Peso dos rins.....	65
	Apêndice D - Teste de preferência da sacarose (TPS) (G1-G2).....	66
	Apêndice E Teste de preferência da sacarose (TPS) (G3-G4).....	67
	Apêndice F Teste de natação forçada TNF (G1-G2).....	68
	Apêndice G - Teste de natação forçada TNF (G3-G4).....	69
	Apêndice H Marcadores de lesão renal.....	70
	Apêndice I Marcadores de estresse oxidativo.....	71
	Apêndice J Marcadores de inflamação.....	72
9	ANEXOS	73
	Anexo A Aprovação do Comitê de Ética.....	73
	Anexo B Gráfico padrão para o cálculo da atividade da MPO.....	74
	Anexo C Gráfico padrão para o cálculo da concentração de GSH	75

1 INTRODUÇÃO

Depressão é um termo usado por profissionais de saúde para descrever um espectro de alterações de humor, variando em características, intensidade e duração. Os sintomas da depressão têm, muitas vezes, um impacto significativo na qualidade de vida de indivíduos acometidos desse mal, demandando uma interação freqüente com os sistemas de saúde (VEDSTED;CHRISTENSEN, 2005; SMITS et al., 2008)

O transtorno depressivo maior foi considerado, no início desse milênio, como um dos quatro maiores problemas de saúde pública. Projeções para o ano de 2030 indicam que esse distúrbio se colocará entre as três doenças mais incapacitantes juntamente com a doença isquêmica cardíaca e a síndrome da imunodeficiência adquirida (USTUN et al., 2004; MATHERS; LONCAR, 2006)

Os impactos econômicos da depressão na sociedade são significativos, chegando a 118 bilhões de euros na Europa em 2004 (SOBOCKI et al., 2006). Nesse contexto, indivíduos deprimidos apresentam maiores gastos em saúde e incapacidade para o trabalho, (SIMON, 2003) menor aderência a tratamentos médicos prescritos (DIMATTEO; LEPPER; CROGHAN, 2000) e risco mais elevado de mortalidade pós-cirurgia cardíaca (BLUMENTHAL et al., 2003).

Os primeiros episódios de depressão são muitas vezes relacionados com um estressor psicossocial significativo. Segundo Weiss e Post, durante o episódio depressivo ocorre uma cascata de alterações neurobiológicas que podem propiciar a recorrência da depressão no futuro, desta feita desencadeada por estressores menos importantes (WEISS; POST, 1994).

Evidências indicam que indivíduos constantemente deprimidos apresentam maiores limitações funcionais, morbidade e mortalidade prematura do que indivíduos sem depressão. Pesquisas realizadas nos últimos 20 anos tem mostrado que há uma relação entre depressão e as alterações funcionais do sistema nervoso central. influenciando diretamente os processos fisiológicos do organismo (COHEN; JANICKI-DEVERTS; MILLER, 2007).

A exposição ao estresse crônico pode desencadear mudanças a longo prazo ou permanentes nas respostas emocionais, fisiológicas e comportamentais que influenciam a suscetibilidade e a evolução de

enfermidades. Como exemplo pode-se citar o cuidado prolongado de um parente próximo com uma doença irreversível (BAUM; COHEN; HALL, 1993; - McEWEN, 1998).

Conforme Willner (1987) o estresse crônico moderado (ECM) é um modelo experimental de depressão que tem por objetivo verificar a relação entre a exposição de sujeitos, comumente ratos, a um conjunto de estímulos aversivos crônicos e moderados por um longo e ininterrupto período de tempo (no mínimo três semanas e no máximo seis semanas). Esse modelo experimental induz nos animais submetidos ao ECM um comportamento denominado "anedonia", uma característica comportamental similar à perda de interesse ou prazer e também apresentados por humanos com sintomas de melancolia, diagnosticados como portadores de depressão (WILLNER et al., 1987). Estudos utilizando ECM em ratos demonstraram comportamento depressivo, manifestado por variação na ingestão de alimentos (TANNENBAUM ET AL., 2002; GAMARO et al., 2003), perda de peso corporal (WILLNER, 1997) e diminuição na atividade motora (STREKALOVA et al., 2004), entre outros.

O estresse crônico moderado (ECM) é amplamente utilizado para induzir sintomas de depressão em animais (WILLNER; MUSCAT; PAPP, 1992; - WILLNER, 2005). No entanto, diferenças no protocolo EMC usado pelos diferentes pesquisadores, resultando em uma possível inconformidade ou utilização inadequada do modelo, podem ser a razão para a taxa relativamente pobre de sucesso no desenvolvimento de antidepressivos eficazes. (ASLANI et al., 2014).

A associação do estado depressivo ao estresse oxidativo foi estudada por Maes et al em 2008. A recíproca também é verdadeira. Estudos comprovaram a existência de uma relação causal entre a presença de inflamação, o estresse oxidativo e o estado depressivo (SARANDOL ET AL., 2007; MICHEL ET AL, 2007- NG ET AL., 2008; MAES, 2008).

A exposição prolongada a estressores psicológicos pode aumentar o risco de enfermidades devido à produção aumentada de substâncias oxidantes e as resultantes lesões oxidativas (LIU; MORI, 1999). Evidências epidemiológicas e experimentais indicam que doenças circulatórias e digestivas e o desenvolvimento ou progressão de neoplasias malignas estão associados à

supressão da imunidade decorrente do estresse experimental induzido em animais. (LAUDENSLAGER et al., 1983; 25 -OKIMURA; NIGO, 1986).

Mesmo considerando a ausência de comprovação definitiva dos mecanismos envolvidos na produção de substâncias oxidantes e as lesões teciduais associadas durante o estado depressivo, acredita-se que o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes podem ter um papel fundamental na gênese das lesões teciduais desenvolvidas em decorrência do estresse crônico (LIU; MORI, 1999; -SANT'ANNA et al., 2003). Para Baris et al. (2010) o desequilíbrio oxidante/antioxidante (estresse oxidativo) desempenha um papel fundamental na produção de lesões induzidas pelo estresse em múltiplos órgãos e tecidos (BARIS et al., 2010).

1.1 Estresse oxidativo

Há evidências que comprovam a presença do estresse oxidativo renal durante o estado depressivo. Um estudo demonstrou aumento do conteúdo renal de superóxido dismutase desidrogenase (SOD) em camundongos submetidos ao teste de nado forçado (NAKAO et al.2000).. Pedreañez et al. (2011) submeteram ratos ao nado forçado diariamente, por 30 minutos, durante 15 dias e constataram aumento do conteúdo de óxido nítrico (NO), de malondialdeído (MDA) e diminuição do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) no tecido renal dos animais. Pesquisas realizadas ainda no século passado confirmaram o aumento dos receptores benzodiazepínicos periféricos do rim em indivíduos deprimidos. Esses achados sugerem que o rim seja sensível ao estado depressivo (RAGO et al., 1989; BURGIN et al., 1996).

Radical livre é um termo aplicado a toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. Duas substâncias abundantes na natureza podem gerar radicais livres: o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Os efeitos nocivos do oxigênio sobre os organismos vivos variam na dependência do tipo de organismo e de seu estado fisiológico. 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).

Normalmente há um equilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e as defesas antioxidantes. Quando esse equilíbrio é rompido, quer por produção excessiva de radicais livres quer por redução das defesas antioxidantes, estabelece-se o “estresse oxidativo” (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Assim, pode-se definir o estresse oxidativo como lesão tecidual resultante de um desequilíbrio entre uma geração excessiva de radicais oxidantes e concomitante produção insuficiente de mecanismos antioxidantes de defesa (KAO et al., 2010). Exemplos de radicais livres são as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS).

A glutathiona reduzida (GSH, L- -glutamil-L-cisteinil-glicina) 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, ozona, radiação e luz ultravioleta -(DENEKE; FANBURG, 1989). A oxidação da glutathiona a transforma em GSSG (glutathiona oxidada). Como esse composto é tóxico para o meio intracelular, os sistemas de proteção entram em ação 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).

A redução na concentração de plasmática de GSH observada nos principais transtornos psiquiátricos foi documentada desde 1934 (MAES et al., 2011). Kodydková et al (2009) descobriram que mulheres deprimidas apresentam importante redução da concentração de GSH no sangue (KODYDKOVÁ et al. 2009).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres (RL) sobre os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, podendo evoluir até a 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 (1O_2) e grupos carbonila excitados, entre outros produtos (LLESUY, 2002).

1.2. A Inflamação e o estado depressivo

A depressão é um transtorno psiquiátrico comum em pacientes com doenças renais crônicas e na fase final da doença renal (TARAZ M; TARAZ S; DASHTI-KHAVIDAKI, 2015). Por outro lado, a inflamação crônica é uma manifestação prevalente entre pacientes com doenças renais crônicas. Estudos demonstraram a presença de níveis aumentados de proteína C reativa e citocinas próinflamatórias em pacientes submetidos à hemodiálise crônica (ZIMMERMANN et al., 1999; STENVINKEL, 2005) Mas, o que vem primeiro, a depressão ou a inflamação? Um estudo publicado em 2006 sugere que a relação entre inflamação e depressão parece ser bidirecional ou seja, a resposta inflamatória pode produzir sintomas depressivos, e o desenvolvimento de sintomas depressivos pode estimular a inflamação (RAISON; CAPURON; MILLER, 2006)

Um número crescente de trabalhos científicos tem demonstrado que as citocinas inflamatórias desempenham um papel importante na gênese do processo inflamatório presente em pacientes que padecem de transtornos depressivos, como comprovado por estudos que relataram associações positivas entre severidade de sintomas depressivos e vários marcadores inflamatórios (MAES et al, 1993; MAES et al, 1998; MAES et al, 2000; - SCHIEPERS, WICHERS, MAES, 2005; MAES et al, 2008; MAES et al, 2009a; MAES et al, 2009b; MAES et al, 2011).

Embora ainda não se tenha uma explicação definitiva sobre o papel da inflamação nos estados depressivos, existem muitos mecanismos plausíveis

pelos quais isso pode ocorrer. Alguns estudos apontam para a elevação dos níveis de cortisol (MILLER; PARIANTE; PEARCE, 1999), vias serotoninícas (MAES et al, 2011), neurogênese e neuroinflamação (HARRY; KRAFT, 2012).

Para a confirmação do estado depressivo foram utilizados dois testes comportamentais, o Teste de Preferência da Sacarose (TPS) e o Teste do Nado Forçado (TNF). No TPS verifica-se o consumo de líquidos (solução adocicada e água). Os animais quando deprimidos apresentam redução no consumo de líquidos (água e solução de sacarose), comparado com as aferições iniciais. O teste de nado forçado (TNF) é amplamente utilizado para a medição do comportamento depressivo em roedores. Esses animais, quando expostos a uma situação de estresse (risco de afogamento), apresentam uma reação natural (tentativa de fuga) realizando intensa atividade física. Após repetidas e infrutíferas tentativas de escape os movimentos de luta e fuga são interrompidos e o animal permanece imóvel, produzindo movimentos suficientes apenas para manter a cabeça acima da superfície da água (KIRBY e LUCKI, 1998; REDROBE e BOURIN, 1998).

1.3 A Acupuntura

Não é possível estabelecer uma data precisa para o aparecimento da acupuntura, porque as suas origens perdem-se no tempo. Achados arqueológicos permitem supor que a técnica era praticada na China há mais de 5000 anos. O primeiro texto médico encontrado foi o Tratado de Medicina Interna do Imperador Amarelo (Nei Jing), escrito provavelmente entre 475 e 221 a.C. e que serviu de base para o desenvolvimento da Medicina Tradicional Chinesa (MTC). Trata-se de um diálogo entre o Imperador Amarelo e seu ministro, Qi Bai, versando sobre medicina. O famoso 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).

A Europa tomou conhecimento da acupuntura nos séculos XVI e XVII através de missionários jesuítas que chegavam do Oriente trazendo a novidade. Na década de 1950 passou-se a usar a acupuntura com base

científica e integração da medicina chinesa com a ocidental. Nos anos 60 iniciaram-se pesquisas utilizando anestesia com acupuntura. Na década de 70, devido à explosão demográfica na China, o regime autorizou o atendimento dos pacientes por pessoas não qualificadas, conhecidos como “médicos pés descalços”, o que resultou em graves complicações, inclusive óbitos. Essa experiência desastrosa levou o governo chinês a restringir seu uso aos médicos com formação especializada, integrando os conhecimentos históricos aos conhecimentos da medicina ortodoxa ocidental. No Brasil, a acupuntura foi oficialmente reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) como especialidade médica em 1995, conforme a resolução normativa 1455. Essa decisão ratificada pela Associação Médica Brasileira (AMB) em 1998 (HONG, 2005).

Acupuntura (AC), é uma forma de terapia que busca a cura das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas em pontos específicos (JAGGAR, 1992; SCHOEN, 1993) denominados acupontos.

A inserção da agulha de acupuntura produz três efeitos básicos: efeito local, efeito segmentar e efeito suprasegmentar (FILSHIE; WHITE, 2002). O efeito local está relacionado à lesão provocada pela inserção da agulha ocorrendo na ocasião a liberação de diversas substâncias que estimulam os quimiorreceptores, determinando uma ativação de mastócitos, responsáveis pela liberação de histamina. A histamina provoca vasodilatação capilar, liberação de íons potássio, bradicinina, serotonina e prostaglandina, que diminuirão o limiar de excitação das fibras nervosas. (NAKANO; YAMAMURA, 2010).

A lesão tecidual local, com liberação de substâncias bioquímicas, como substância P e a transformação do ácido aracdônico em leucotrienos, em tromboxane dos tipos A e B, em Prostaglandinas PGE e PGD. Essas substâncias algógenas irão estimular os quimioceptores. A substância P, um quimioceptor inflamatório, ativa os mastócitos e estes passam a liberar histamina, que por sua vez irão estimular as fibras C e provocar vasodilatação capilar, fenômeno este facilmente constatável ao se puncionar a pele com uma agulha de acupuntura. Localmente são liberados ainda íons potássio, bradicinina, serotonina e prostaglandina que irão estimular os quimioceptores,

diminuindo conseqüentemente o limiar de excitação (NAKANO; YAMAMURA, 2010).

Os estímulos aferentes conduzidos por fibras somáticas (nociceptivos e produzidos pela inserção da agulha de acupuntura) chegam ao corno posterior da medula espinhal onde estabelecem sinapses: com neurônios motores homolaterais e/ou contralaterais, formando o arco reflexo somatossomático; com neurônios pré-ganglionares simpáticos formando o arco reflexo somatovisceral; e com neurônios do trato próprio-espinhal. (NAKANO; YAMAMURA, 2010).

Os mecanismos bioquímicos que explicam os efeitos da acupuntura nos sistemas antioxidantes ainda não foram satisfatoriamente esclarecidos. 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). (LIU et al. 2006) Por outro lado, Siu, Lo e Leung (2005) 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 (SIU; LO; LEUNG, 2005).

A seleção dos pontos de acupuntura para cada tratamento obedece princípios definidos pela Medicina Tradicional Chinesa e adaptados para cada situação clínica pelo profissional acupunturista. Nesse processo de seleção entram em jogo três habilidades: empirismo, análise e intuição. A primeira habilidade, o empirismo resulta de um processo de tentativas e erros. A segunda habilidade, a análise, resulta de um aprendizado constante. Para uma análise correta o profissional deve ser detentor de conhecimentos teóricos dos fundamentos e teorias da MTC. Essa habilidade de sentir e perceber as emoções dos outros, com compaixão e sensibilidade é fundamental para a orientar a seleção dos pontos que serão utilizados no tratamento. . Finalmente, a terceira habilidade, a intuição, não é um substituto da análise mas sim um complemento dela. Análise e intuição devem ser comparadas e essas duas habilidades devem ser comprovadas na prática (ROSS, 2003).

Os acupontos utilizados neste pesquisa foram selecionados tendo como base a experiência clínica dos orientadores, suportada por trabalhos científicos publicados. O primeiro acuponto selecionado, o E36 (*Zusanli*) é usado,

cl clinicamente, para fortalecimento dos processos mentais. Sua estimulação promove uma melhora dos processo mentais associados as deficiências energéticas do organismo como na depressão, propiciando força e segurança necessárias para a liberação dos bloqueios emocionais (ROSS, 2003).O segundo acuponto selecionado, o R3 (Taixi) tem inúmeras indicações entre as quais tratamento dos distúrbios mentais, psicose, alegria excessiva, ansiedade e melancolia (MARTINS e GARCIA, 2003). A terceira escolha recaiu sobre o acuponto VB34 (*YangLingquan*), de ação comprovada na proteção hepática, em animais intoxicados por tetracloreto de carbono (YUN-KYOUNG et al., 2006).

1.4 A Eletroacupuntura

A eletroacupuntura (EAC) consiste na aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade e frequência variável em agulhas metálicas introduzidas no corpo do animal ou ser humano. A escolha do formato da onda, frequência e intensidade da descarga vão definir o tipo de efeito que se busca atingir. Sabe-se que o estímulo produzido pela corrente elétrica modulada pelo dispositivo eletrônico associado ao efeito próprio da agulha de acupuntura desencadeiam uma resposta inflamatória localizada, estimulando a reparação tecidual (KARIME, 2006).

Estudos publicados comprovaram os efeitos protetores da eletroacupuntura (EAc) sobre os estresse oxidativo renal. SILVA et al. (2011) demonstraram, em ratos, que uma única aplicação de EAc utilizando 10 ou 100 Hz durante 30 minutos aumentava os níveis teciduais de GSH e atenuava o estresse oxidativo induzido por xilazina+ketamina no rim e no fígado de animais anestesiados (SILVA et al. 2011). O pre-tratamento com EAc foi capaz de atenuar a resposta inflamatória e a lesão renal induzidas por lipopolissacarídeos (GU et al., 2011).

1.5 Relevância e Justificativa

Sintomas depressivos e ansiedade são comuns em pacientes com doença renal crônica. Estudos experimentais demonstraram que é possível induzir o estresse oxidativo renal em roedores submetidos a uma série de estressores crônicos e aleatórios. Essas alterações são provocadas pelo estabelecimento de um quadro depressivo prévio. Há uma busca constante por tratamentos que possam reduzir ou mesmo evitar a ocorrência da depressão, potencialmente lesiva ao funcionamento de vários órgãos.

Fármacos utilizados no tratamento da depressão, embora relativamente eficazes, não são isentos de efeitos colaterais e terminam por perder sua eficácia ou perpetuar seu uso. Na Medicina Tradicional Chinesa, as emoções em excesso, a tristeza ou a alegria podem produzir lesões nos órgãos internos. Justifica-se assim a busca de alternativas terapêuticas que possam prevenir ou tratar o estado depressivo, utilizando métodos alternativos e evitando suas conseqüências deletérias.

Tendo como fundamento as pesquisas apresentadas, este estudo foi concebido para analisar os efeitos da acupuntura/electroacupuntura sobre a inflamação e o estresse oxidativo produzidos pela depressão experimental no rim do rato. Para comprovação dos efeitos moduladores da Ac e da EAc em ratos experimentalmente deprimidos foram estudadas as alterações dos marcadores de lesão renal (uréia e creatinina), do estresse oxidativo (glutathione reduzida - GSH e malondialdeído - MDA) e da inflamação (mieloperoxidase - MPO). Não foram encontrados na literatura médica trabalhos semelhantes, o que confere ineditismo à presente pesquisa.

2 OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos modulatórios da acupuntura e da eletroacupuntura no estresse oxidativo e na inflamação agudos induzidos por depressão experimental no rim de ratos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o estresse oxidativo e a inflamação sistêmicos e renal em ratos Wistar deprimidos experimentalmente;
- 2) Avaliar o possível efeito nefroprotetor da acupuntura e da eletroacupuntura em ratos Wistar deprimidos experimentalmente.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos Éticos

O estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais e aprovado em reunião do comitê em 26 de outubro de 2015, protocolo nº 86/2014 (Anexo A). Foram observados os Princípios Éticos na Experimentação Animal, obedecendo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Por tratar-se de projeto "guarda-chuva" compartilhado entre dois pesquisadores, a parte geral do estudo tem vários parágrafos semelhantes. Foram usados os mesmos animais, com análise de diferentes órgãos e compartilhamento dos resultados. Neste subprojeto a ênfase foi nas alterações renais.

3.2 Tipo de Estudo e Amostra

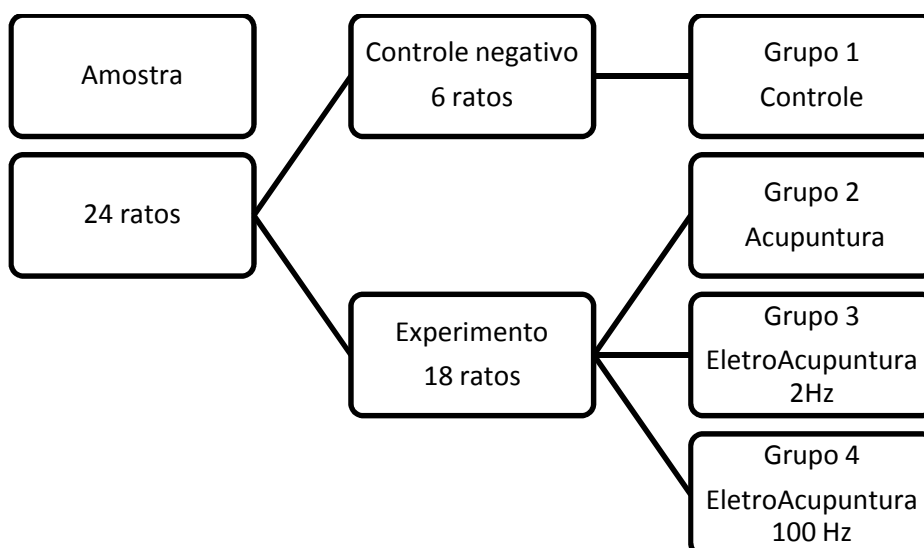
Trata-se de um estudo prospectivo, controlado e comparativo entre quatro grupos de ratos Wistar submetidos ao estresse moderado crônico durante seis (6) semanas, para o desenvolvimento de um quadro depressivo. Foram utilizados 24 ratos, com idade de 12 a 16 semanas, machos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, Rodentia, Mammalia), com peso variando de 230 e a 340g, da linhagem Wistar, saudáveis e bem nutridos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes. Foi observada a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. 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 ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Foi observada a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (Nuvilab CR-1®, Irradiada, QUIMTIA S.A., Canguiri, Colombo, Paraná) foram ofertadas *ad libitum* até 12 horas antes do experimento. A higienização das gaiolas e o cuidado dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável. Os ratos foram previamente

aclimatados por um período de 7 dias antes da realização do experimento. Os procedimentos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

3.3 Distribuição da Amostra

Vinte e quatro (24) ratos foram randomizados em quatro grupos de seis animais, assim denominados: G1 – **CT** (Controle), G2 - Acupuntura, G3– **EAc2** (Eletroacupuntura 2 Hz), G4 – **EAc100** (Eletroacupuntura 100 Hz.). A figura 1 mostra o desenho do experimento.

Figura 1 - Desenho do experimento



3.4 Indução da Depressão

A depressão foi induzida utilizando-se um protocolo validado por estudos disponíveis na literatura médica (WILLNER; MUSCAT; PAPP,1992; KONKLE, et al., 2003 WILLNER, 2005). denominado Estresse Crônico Moderado (ECM). O protocolo ECM usado é uma versão ligeiramente modificada do protocolo ECM imprevisível (WILLNER, 2005) e consiste, basicamente, na aplicação de estressores moderados e imprevisíveis, de modo aleatório, durante 6 semanas:

confinamento em um espaço restrito por 2 h, inclinação da gaiola durante 4 h, habitação em cama úmida durante 8 horas, privação de alimentos durante 12 h seguida por exposição de comida inacessível para os animais durante 1 h, jejum hídrico durante 12 h seguido da exposição da garrafa d'água vazia durante 1 hora. A aplicação dos estressores seguiu um padrão randômico, para evitar que os animais fossem submetidos aos estressores em dias predeterminados, evitando o aprendizado (Apêndice A)

3.5 Testes comportamentais

Para a comprovação da instalação do estado depressivo nos animais experimentais foram utilizados o Teste de Preferência da Sacarose (TPS) e o Teste do Nado Forçado (TNF).

3.5.1. Teste de Preferência da Sacarose (TPS)

O TPS foi realizado em 3 diferentes intervalos de tempo: TPS1 (DIA 1, antes do início do EMC), TPS2, ao final da terceira semana do EMC, no 21º dia do experimento) e TPS3 no último dia do EMC (no 42º dia do experimento). Em cada etapa do TPS, os animais foram colocados em jejum total por 22 horas. Após esse período, os ratos foram colocados em gaiolas individuais, seguindo-se a oferta de água potável e solução de sacarose a 2% em recipientes de vidro contendo respectivamente 100ml de solução de sacarose ou água potável, durante 1 h. Após conclusão dos testes os animais tiveram acesso à água e ração *ad libitum*. Para cálculo do consumo a utilizou-se a fórmula (BEKRIS et al., 2005):

$$PS = \frac{IS (g)}{(IS + IA)g} \times 100$$

Onde:

PS= Preferência da sacarose

IS = ingestão de solução de sacarose 2%(g)

IA= ingestão de água potável (g)

3.5.2. Teste de nado forçado

O Teste do Nado Forçado (TNF) foi realizado em duas sessões . Os ratos foram colocados individualmente em um cilindro aberto (45 cm de altura x 20 cm de diâmetro), contendo água a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$. Na primeira sessão (re-teste), os ratos foram colocadas no cilindro por 15 minutos, sendo que na sessão teste (24 horas após a sessão pre-teste), os animais permaneceram na água por 5 minutos. O tempo de mobilidade (nadar e escalar) e o tempo de imobilidade (flutuar e congelar) foram então determinados (KIRBY e LUCKI, 1998).

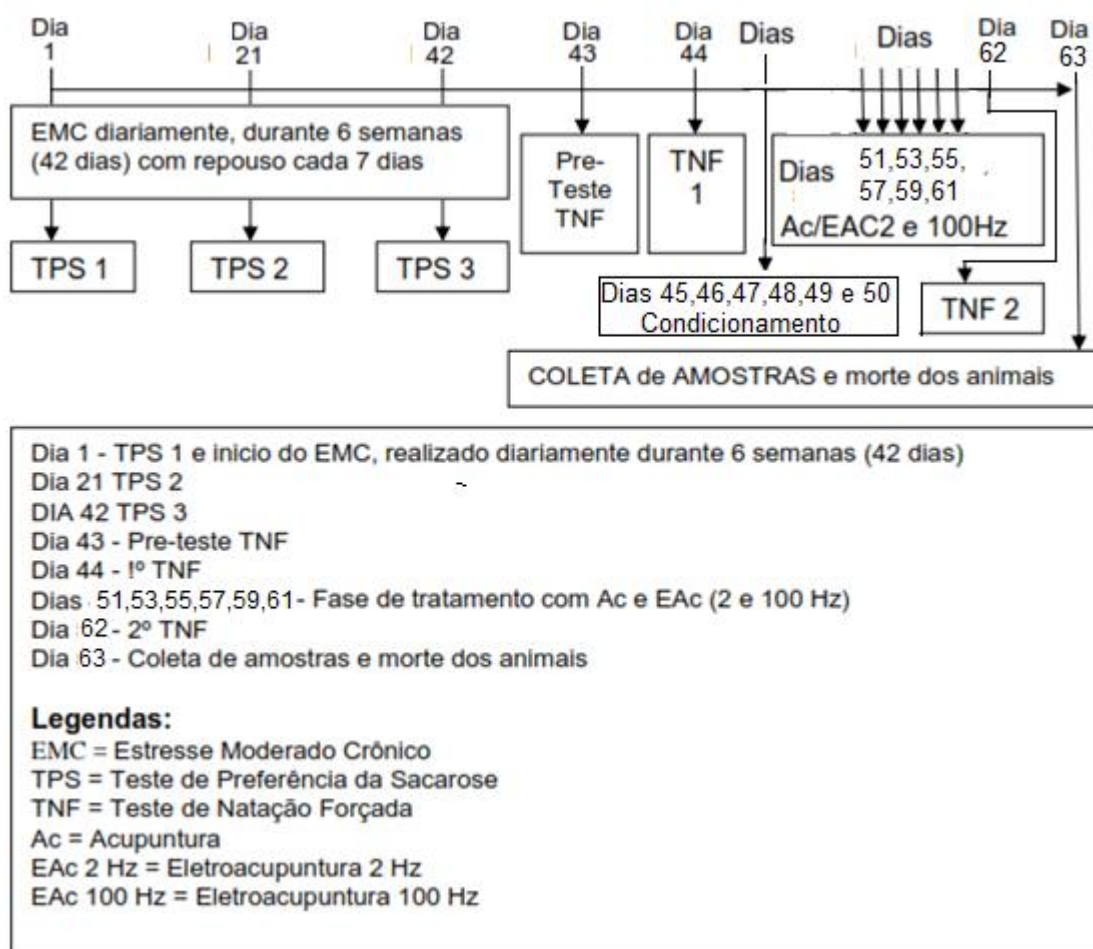
3.6 Localização dos pontos de Acupuntura / Eletroacupuntura

Segundo Panzer (1993) é possível transpor para os demais animais vertebrados, as posições dos diversos acupontos descritos nos gráficos propostos para o homem, tendo como base a semelhança das estruturas anatômicas. Um estudo mais completo foi apresentado por Yin et al. (2008), mapeando 121 acupontos. O acuponto *Zusanli* (E-36) se localiza, no rato, 5 mm abaixo da cabeça fibular e 2 mm lateral ao tubérculo anterior da fíbula; transitam, nessa região os ramos laterais do nervo sural cutâneo, o ramo cutâneo do nervo safeno e o ramo profundo do nervo peroneal (MARTINS; GARCIA, 2003; YIN et al., 2008). O VB-34 se localiza, no homem, na depressão anterior e inferior da cabeça fibular; transitam nessa região os ramos laterais do nervo sural cutâneo e o e o ramo profundo do nervo fibular (MARTINS; GARCIA, 2003). Segundo Yin et al (2008) o acuponto *Yanglingquan* (VB34); está localizado na depressão anterior e inferior à cabeça da fíbula, no rato (YIN et al., 2008). O Acupunto *Taixi* (R-3) se localiza, no homem, na face medial do pé, entre a parte mais saliente do maléolo interno e o tendão do calcâneo e é usado clinicamente para tratar distúrbios emocionais (ansiedade, melancolia entre outras indicações (MARTINS; GARCIA, 2003). No rato o acuponto R-3 se localiza na face medial do pé, posterior ao maléolo medial, em uma depressão entre a ponta do maléolo medial e o calcâneo (LI et al., 2011).

3.7 Delineamento experimental

A figura 2 mostra o delineamento do experimento (procedimentos e linha de tempo).

Figura 2 - Delineamento do experimento



3.8 Condicionamento dos ratos

Para realizar os procedimentos (Ac e EAc) sem a utilização de anestésicos, os ratos foram colocados em dispositivos de contenção semelhantes as redes utilizadas por nordestinos, com aberturas para a saída dos membros, suspensas em um arco metálico confeccionado para tal

finalidade e onde os animais ficaram em repouso, por 20 minutos, durante 6 dias consecutivos. A falta de apoio para as patas os impedia de se locomoverem. No primeiro dia houve tentativa de fuga, mas os ratos logo se acostumaram e permaneciam calmos, necessitando apenas a imobilização dos membros pélvicos com tiras de esparadrapo fixado às estruturas metálicas, para a aplicação da Ac e da EAc (Figura 3).

Figura 3 - Rato posicionado no dispositivo para aclimatação (preparação para as sessões de Ac e EAc).



Ratos 3 e 4, grupo controle

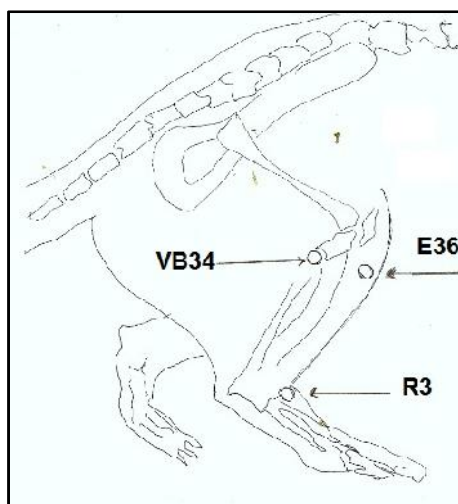
Fonte: o autor

3.9 Protocolo de aplicação da Acupuntura / Eletroacupuntura

Para a realização da Ac (G2) agulhas metálicas de aço inoxidável, descartáveis, de 0,18mm de diâmetro / 8mm de comprimento (modelo DCB 132, fabricadas na China e distribuídas no Brasil por Dong Bang Produtos de Acupuntura -EPP, São Caetano do Sul – SP) foram inseridas no membro pélvico direito, no ponto *Zusanli* (E-36) e nos pontos *Yanglingquan* (VB-34) e *Taixi* (R-3). As agulhas foram retiradas após 20 minutos (Figura 4). Este procedimento foi repetido no mesmo horário (no período da manhã), em dias alternados, perfazendo um

total de seis aplicações. Nos ratos tratados com EAc (G3 e G4), após introdução das agulhas nos acupontos E36 e VB34, eletrodos com garras tipo jacaré foram conectados às agulhas de acupuntura (Figura 5). No grupo G3 foi aplicada uma corrente elétrica com intensidade de 1,0 mA e 2Hz de frequência, pulsos quadrados com duração de 2 segundos, ondas tipo Burst, com intervalo (repouso) de 2 segundos. O estímulo elétrico foi mantido por 20 minutos, utilizando o eletroestimulador modelo 608 Fix portátil (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil), previamente calibrado pelo fabricante. No grupo G4 a corrente elétrica foi aplicada aos pontos já citados, utilizando os parâmetros descritos, alterando apenas a sua frequência, que foi de 100 Hz. Transcorridos 20 minutos, os eletrodos e as agulhas foram retirados. Este procedimento foi repetido em ambos os grupos, no mesmo horário (no período da manhã), em dias alternados, perfazendo um total de seis aplicações.

Figura 4 - Locais de inserção das agulhas de acupuntura



Rato 2, Grupo 2

Fonte: o autor

Figura 5 - Rato posicionado na rede, para as sessão de EAc - agulhas inseridas e

conectadas ao eletroestimulador



Rato 5, grupo 4

Fonte: o autor

3.10 Coleta de amostras

No dia seguinte ao término dos tratamentos procedeu-se a colheita de amostras. Para tanto os animais foram sedados com hidrato de cloral 25mg/Kg peso I.P., para coleta de sangue arterial (3,0 ml) e dos rins. Os rins removidos foram lavados em soro fisiológico gelado, pesados e medidos, sendo o rim direito reservado para exames bioquímicos. Após a coleta todos os ratos foram mortos por dose triplicada (overdose) de anestésico.

3.11 Exames laboratoriais

O sangue arterial coletado por punção da aorta abdominal foi centrifugado (2500 rpm /15 min); o soro obtido e armazenado em temperatura de -70° para posterior análise de parâmetros bioquímicos (Ureia, creatinina, malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH). Do rim direito foi removido um fragmento (cerca de 500 mg de tecido renal) que foi utilizado para a dosagem de mieloperoxidase (MPO) e o restante do rim foi homogeneizado em tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0). O homogeneizado foi centrifugado a 700 r.p.m (rotações /min) durante 10 minutos a 4° C e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de MDA e de GSH.

3.11.1 Determinação das concentrações de Ureia e Creatinina

As concentrações de uréia e creatinina séricas, foram determinadas através dos kits comerciais Creatinina K Vet e Uréia UV Liquiform Vet (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fornecedor, em aparelho de automação laboratorial (LABMAX PLENNO Labtest®). Os valores obtidos foram expressos em mg/dL.

3.11.2 Avaliação da peroxidação lipídica

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

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

3.11.3 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA):

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:

O teor de MDA ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) foi quantificado pelo método de Uchiyama e Mihara (1978), freqüentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica. A amostra do tecido (rim) foi congelada em nitrogênio líquido e estocada 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 2,0 minutos de agitação a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. A absorvância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida a 520 nm e 535 nm em espectrofotômetro de ultra violeta visível, marca VANKEL 50 UV-VIS (Varian Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP). A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de MDA, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão.

3.11.4 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 nitrobenzóico) (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 absorvância 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).

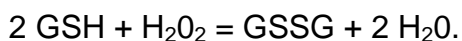
Preparação dos reagentes:

Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

EDTA Na_2 0,2M PM 372,2 (% 211g + H_2O *qsp* 70.0 ml)

EDTA Na_2 0,02M (30 ml de EDTA Na_2 0,2M + H_2O *qsp* 300 ml)

Reação



Procedimento:

A amostra de tecido (500 mg) é pesada e homogeneizada em 5 ml de EDTA 0,02M gelado, com bastão de vidro e filtrado 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.

3.11.5 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 NaClO₂ 0,2% e após 30s adição de NaCl 1,6% com glicose 5%. Após centrifugação, o pellet foi ressuscitado em buffer NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio re-homegeneizado. 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 X). As concentrações de MPO foram expressas em unidade / mg de tecido.EAc

3.12 Análise Estatística

A significância da eficácia do tratamento com Ac, EAc 2 Hz e EAc 100 Hz sobre os valores de Uréia, Creatinina, GSH, TBARS e Atividade da MPO, nos momentos amostrados foi avaliada com o teste de ANOVA /Dunnett quando o pressuposto da normalidade foi identificado com a utilização do teste de Kolmogorov-Smirnov (com os parâmetros de Dallai-Wilkinson-Lilliefor, $p>0,05$) e expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (Média \pm EPM). Para a comparação dos resultados obtidos nos testes comportamentais foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas. Os dados que não obedeceram à curva de normalidade foram analisados por meio de testes não paramétricos (teste de Mann-Whitney com variação das medianas) e os resultados apresentados em mediana e intervalos interquartílicos. Os dados do estudo foram analisados no software Graphpad Prism versão 5.0 para Windows, *GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A., www.graphpad.com*, considerando-se uma probabilidade de erro de tipo I (α) de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Complicações

Não ocorreram óbitos durante o estudo. Entretanto, a indução da depressão pela aplicação do estresse crônico moderado condicionou o aparecimento de diversas alterações clínicas não letais, no curso do experimento.

Durante o processo de aclimação ao repouso, realizado após a conclusão da primeira etapa do estudo (aplicação do ECM), vários animais apresentaram irritabilidade, na tentativa de libertação da imobilização forçada, notadamente no primeiro dia. No dia seguinte observou-se a presença de fezes diarréicas. No 6º dia da aclimação os animais já permaneciam calmos e aceitavam tranquilamente a imobilização no dispositivo.

Após o 1º dia de tratamento (acupuntura ou eletroacupuntura) os animais apresentaram as seguintes alterações:

- Diarréia: 2 ratos (G2R4 e G4R6)
- Epistaxe moderada: 1 rato G4R1
- Dermatite de contato ao esparadrapo usado na imobilização das patas traseiras: quase todos os animais

Finalmente, durante a última etapa do experimento (coleta de amostras), realizada com os animais sedados por hidrato de cloral, observaram-se as seguintes complicações:

- Hematúria: 1 rato (G1R1)
- Hipoxia (sangue arterial escuro): 1 rato (G2R5)
- Diarréia: 1 rato (G3R3)

4.2 Peso dos ratos

Os pesos aferidos no início do experimento estão relacionados no Apêndice B. A Tabela 1 contém os valores (pesos médios) obtidos na pesagem dos animais de cada grupo. Observou-se uma variação de peso dos animais entre 230 e 340g, com peso médio de $283,5 \pm 28,4$. Não se observaram diferenças significantes entre os pesos médios de cada grupo, denotando uniformidade da amostra.

Tabela 1 - Peso médio dos ratos utilizados no primeiro dia do estudo

Grupos	n	Peso médio (X±DP) ^(a)
G1 - Grupo Controle	6	284,2±17,14
G2 - Grupo Acupuntura	6	303,2±30,5
G3 - Grupo Eletroacupuntura2 Hz	6	263,3±27,3
G4 - Grupo Eletroacupuntura100 Hz	6	283,3±28,0

Fonte: Elaborada pelo Autor

Notas:n= número de ratos de cada grupo

^(a)X±DP = média ± desvio padrão

Durante todo o experimento houve alteração do peso dos animais. Os pesos aferidos no último dia do estudo (Dia 63) foram comparados aos pesos verificados no dia de término do processo de indução do EMC. Observou um discreto aumento de peso (5,03%) no grupo G1. O aumento mais importante ocorreu nos ratos do grupo G4 tratados com EAc 100 Hz (18,03%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Alterações do peso dos ratos durante o experimento

Grupos	Dia 1	Dia 21	Dia 42	Dia 63	% aumento do peso
G1 - Grupo Controle	284,17	294,00	330,33	347,83	5,03
G2 - Grupo Acupuntura	303,17	333,17	326,50	353,50	7,64
G3 - Grupo EAC2 Hz	263,33	288,00	308,17	358,00	13,92
G4 - Grupo EAC100 Hz	283,33	292,50	287,17	350,33	18,03

Percentuais referem-se ao incremento do peso no último dia do experimento (Dia 63) comparado ao peso aferido ao término do EMC(Dia 42).

Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

4.3 Peso dos rins

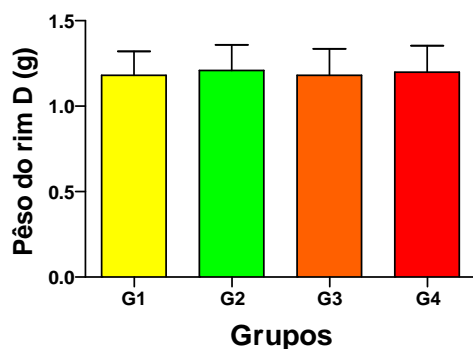
O peso dos rins não apresentou alterações significantes, comparando-se cada grupo ao controle G1. Os valores variaram de 1,09 a 1,14g para o rim esquerdo (Peso médio: 1,12g) e 1,18 a 1,21g, peso médio 1,19g para o rim direito (Figuras 6-7) (Apêndice C).

Tabela 3 - Alterações do peso médio dos rins dos ratos no último dia do experimento (Dia 63)

Grupos	n	Rim D	Rim E
G1 - Grupo Controle	6	1,18	1,13
G2 - Grupo Acupuntura	6	1,21	1,15
G3 - Grupo EAC2 Hz	6	1,18	1,09
G4 - Grupo EAC100 Hz	6	1,19	1,14

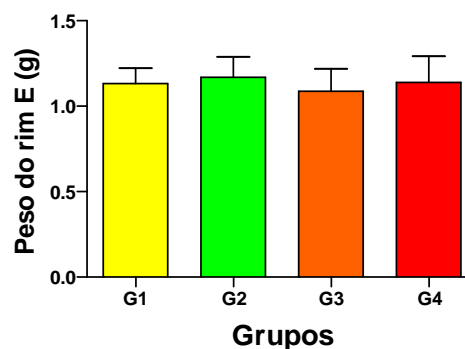
Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

Figura 6 - Peso do rim direito ao termino do experimento



Fonte: elaborado pelo autor
Teste de ANOVA / Dunnett. Diferenças não significantes

Figura 7-Peso do rim esquerdo ao termino do experimento



Fonte: elaborado pelo autor
Teste de ANOVA / Dunnett. Diferenças não significantes

4.4 Testes comportamentais

4.4.1 Teste de preferência da sacarose

O TPS foi realizado em 3 diferentes intervalos de tempo: TPS-1 (DIA 0, antes do início do EMC), TPS-2, ao final da terceira semana do EMC, no 21º dia do experimento) e TPS-3 no último dia do EMC (42º dia do experimento) (Tabela 4). O teste comprovou que no TPS3, ocorreu o estabelecimento da anedonia em todos os grupos.

Tabela 4 - Teste de preferência da sacarose, realizado em 3 momentos

GRUPOS	TPS-1	TPS-2	TPS-3
G1 - Grupo Controle	2,840	68,69	0,38 ^(a)
G2 - Grupo Ac	6,336	78,82	0,66 ^(a)
G3 - Grupo EAC 2 Hz	6,244	71,97	0,60 ^(a)
G4 - Grupo EAC 100 Hz	4,159	73,78	0,50 ^(a)

Fonte: Elaborada pelo autor

TPS-1 (DIA 0, antes do início do EMC);

TPS-2, ao final da terceira semana do EMC, no 21º dia do experimento);

TPS-3 no último dia do EMC (no 42º dia do experimento);.

Valores calculados

TPS = Ingestão de sacarose [g]/(Ingestão de sacarose [g] + ingestão de água [g])*100

(a) anedonia, segundo definição de Beckis et al., 2005.

4.4.2 Teste do nado forçado

Houve redução significativa do tempo de imobilidade e flutuação passiva, nos ratos submetidos ao estresse moderado crônico, tratados com Ac (30,61%), EAc 2 Hz (58,00%) ou EAc 100 Hz (23,88%). A redução foi mínima no grupo controle (4,81%). A figura 8 ilustra os efeitos dos diversos tratamentos em três intervalos do estudo.

Tabela 5 -Teste do nado forçado. Tempo (segundos) de imobilidade ou flutuação passiva dos ratos.

Grupos	Pré-Teste (Dia 43)	TNF_1 (Dia 44)	TNF_2 (Dia62)	% redução
G1	202	104	99	4,81
G2	92	49	34	30,61
G3	110	50	21	58,00
G4	134	67	51	23,88

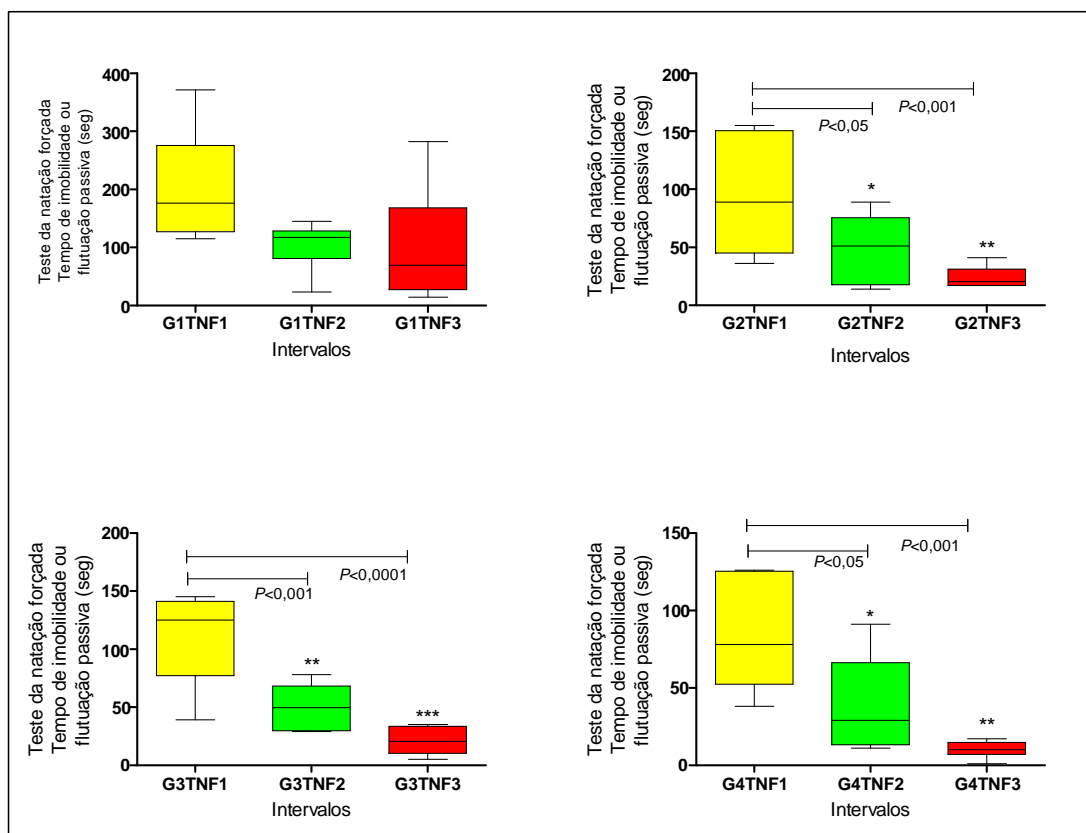
Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

Valores expressos em segundos

O TNF foi realizado em três etapas, a primeira (pré-teste) no 43º dia do experimento, após a conclusão do protocolo EMC; a segunda no 44º dia (TNF_1) um dia após o pré-teste e o teste final no 62º dia (no dia seguinte ao término do tratamento). A coluna % redução exibe os percentuais de redução da atividade no Dia 62 (no dia seguinte ao término do experimento, antes da coleta de amostras e morte do animal).

Os quatro gráficos exibidos na figura 8 ilustram o comportamento de cada grupo no teste de nado forçado. O grupo G1 (controle) não apresentou diferenças significativas na comparação com os grupos tratamento. Os grupos G2-G4 apresentaram redução significativa do tempo de imobilidade e flutuação passiva.

Figura 8 - Efeitos da Acupuntura e da Eletroacupuntura em ratos deprimidos submetidos ao teste de nado forçado.



Fonte: o autor (2015)

Nota: Teste ANOVA de medições repetidas/Dunnett

*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001 comparados ao controle TNF1.

4.5 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de uréia e creatinina no sangue dos animais.

4.5.1 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) sobre a concentração de uréia no sangue dos ratos.

O uso da EAc (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos promoveu aumento significativo ($p < 0,0001$) das concentrações de uréia sérica no último dia do estudo. Não ocorreram alterações nos ratos tratados com Ac. (Tabela 6 Figura 9).

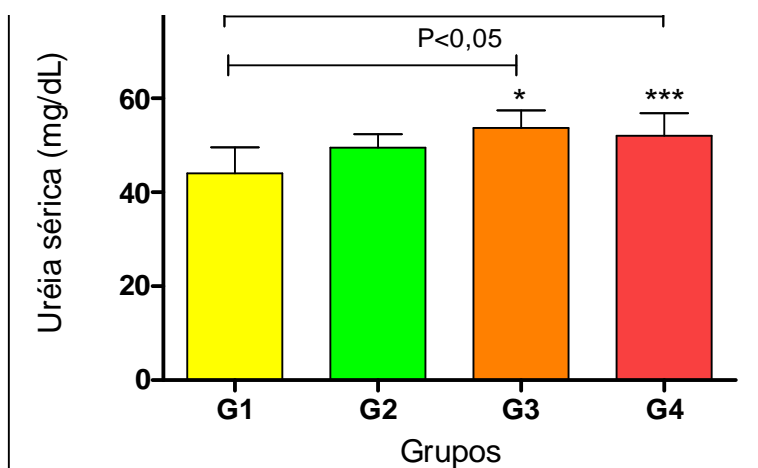
Tabela 6 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de uréia sérica nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.

G1	G2	G3	G4
44,00 ± 5,55	49,50 ± 2,88	53,67 ± 3,78*	52,00 ± 4,82 ***

Fonte: O Autor (2015)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT *** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ comparados ao controle (G1).

Figura 9 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico imprevisível, sobre as concentrações de uréia sérica nos roedores dos grupos G2-G4 comparados ao grupo controle positivo (G1).



Fonte: o autor (2015)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT *** $p < 0,0001$, $p < 0,05$ comparados ao controle (G1).

4.5.2 Efeitos da EAc (2 Hz e 100 Hz) sobre a concentração de creatinina no sangue dos ratos.

Não ocorreu alteração na concentração de creatinina sérica na comparação entre os ratos deprimidos (G2-G4) tratados com Ac e EAc (2 e 100 Hz), e o grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.

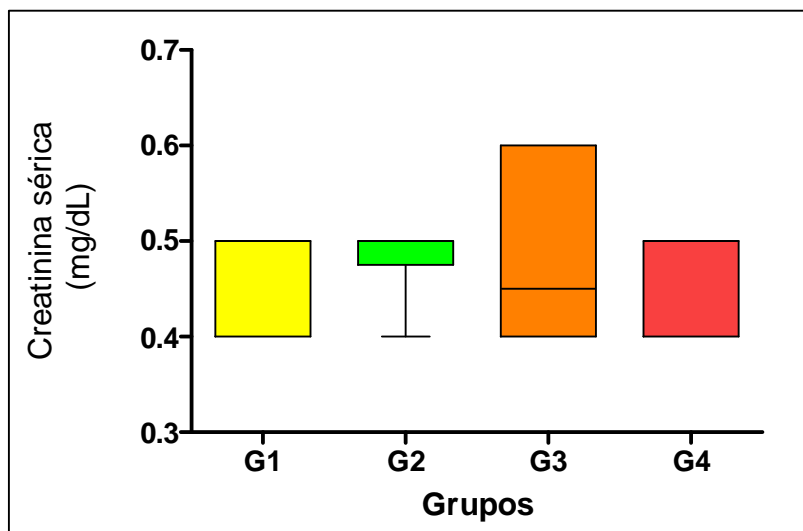
Tabela 7 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de creatinina sérica nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.

n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4
Valor mínimo	0,4000	0,4000	0,4000	0,4000
Percentil 25	0,4000	0,4750	0,4000	0,4000
Mediana	0,5000	0,5000	0,4500	0,5000
Percentil 75	0,5000	0,5000	0,6000	0,5000
Valor máximo	0,5000	0,5000	0,6000	0,5000

Fonte: o autor (2015)

Teste: ANOVA / DUNNETT - Diferenças não significantes.

Figura 10 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de creatinina sérica nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.



Fonte: o autor (2015)

Teste: ANOVA / DUNNETT - Diferenças não significantes.

4.6 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de GSH no sangue e no rim dos animais.

4.6.1 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre as concentrações de GSH no sangue dos ratos.

Houve aumento significativo das concentrações de GSH sérico nos roedores dos grupos G3-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo (Tabela 8, Figura 11).

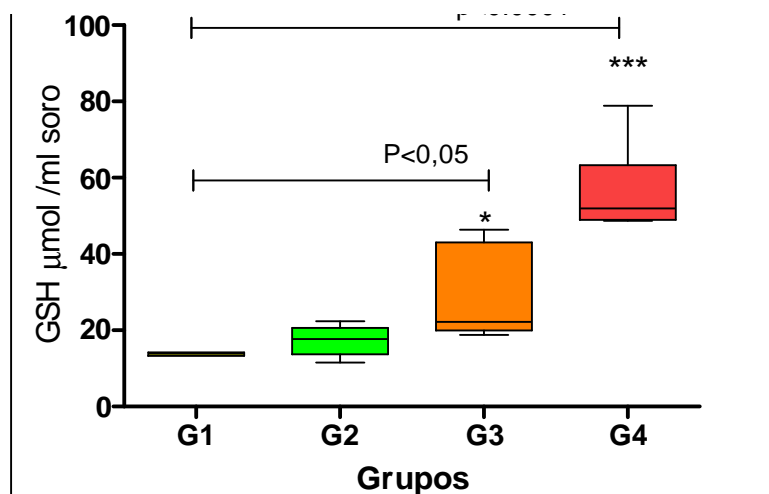
Tabela 8 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de GSH sérico nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.

n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4
Valor mínimo	13,28	11,55	18,79	48,73
Percentil 25	13,33	13,73	19,93	48,99
Mediana	13,87	17,68	22,19*	51,96***
Percentil 75	14,25	20,61	43,00	63,33
Valor máximo	14,25	22,39	46,38	78,84

Fonte: o autor (2015)

Teste: Kruskal Wallis/Dunn, *** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ comparados ao controle (G1).

Figura 11 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de GSH sérico nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.



Fonte: o autor (2015)

Teste: Kruskal Wallis/Dunn , *** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ comparados ao controle (G1).

4.6.2 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre as concentrações de GSH no rim dos ratos.

Houve aumento significativo concentrações de GSH tecidual nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo (Tabela 9, Figura 12).

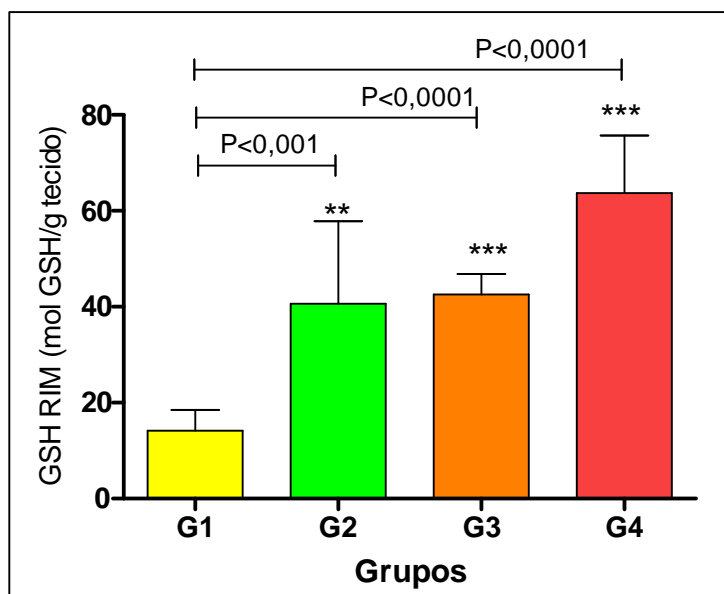
Tabela 9- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de GSH no rim dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.

G1	G2	G3	G4
14,17±4,33	40,63±17,17**	42,54±4,31***	63,68±12,02***

Fonte: o autor (2015)

Teste: ANOVA / DUNNETT - ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo G1.

Figura 12 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de GSH no rim dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.



Fonte: o autor (2015)

Teste: ANOVA / DUNNETT - ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo G1.

4.7 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA no sangue e no rim dos animais.

4.7.1 *Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre as concentrações de MDA no sangue dos ratos.*

Não foram observadas diferenças significantes das concentrações de MDA na comparação entre os Grupos G2-G4 e o grupo controle G1 (Tabela 10, Figura 13).

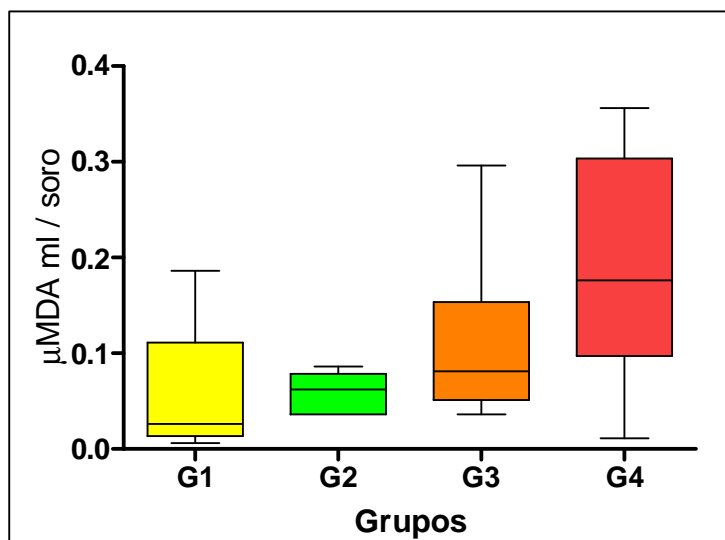
Tabela 10 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA sérico nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo

n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4
Valor mínimo	0,0060	0,0360	0,0360	0,0110
Percentil 25	0,0135	0,0360	0,0510	0,09725
Mediana	0,0260	0,0620	0,0810	0,1760
Percentil 75	0,1110	0,0785	0,1535	0,3035
Valor máximo	0,1860	0,0860	0,2960	0,3560

FONTE: O Autor (2015)

Nota: Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Diferenças não significantes.

Figura 13- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA sérico nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.



Fonte: O Autor (2015)

Nota: Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Diferenças não significantes.

4.7.2 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre as concentrações de MDA no rim dos ratos.

Não foram observadas diferenças significantes das concentrações de MDA na comparação entre os Grupos G2-G4 e o grupo controle G1 (Tabela 11, Figura 14).

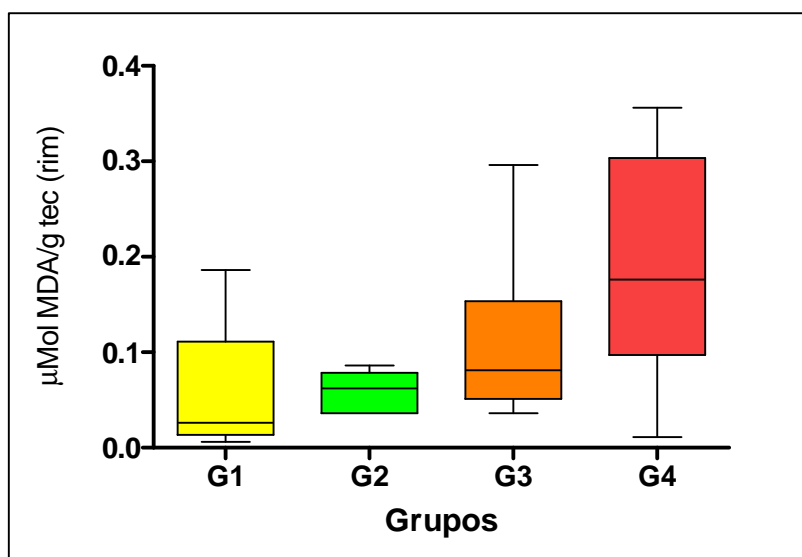
Tabela 11 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA no rim dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.

	G1	G2	G3	G4
Valor mínimo	0,0060	0,0360	0,0360	0,0110
Percentil 25	0,0135	0,0360	0,0510	0,09725
Mediana	0,0260	0,0620	0,0810	0,1760
Percentil 75	0,1110	0,0785	0,1535	0,3035
Valor máximo	0,1860	0,0860	0,2960	0,3560

Fonte: O Autor (2015)

Nota: Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Diferenças não significantes.

Figura 14 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA no rim dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia



Fonte: O Autor (2015)

Nota: Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Diferenças não significantes.

4.8 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre a atividade da mieloperoxidase no rim dos animais.

Houve diminuição significativa na atividade da mieloperoxidase no rim dos ratos na comparação entre os Grupos G3-G4 e o grupo controle G1 (Tabela 12, Figura 15).

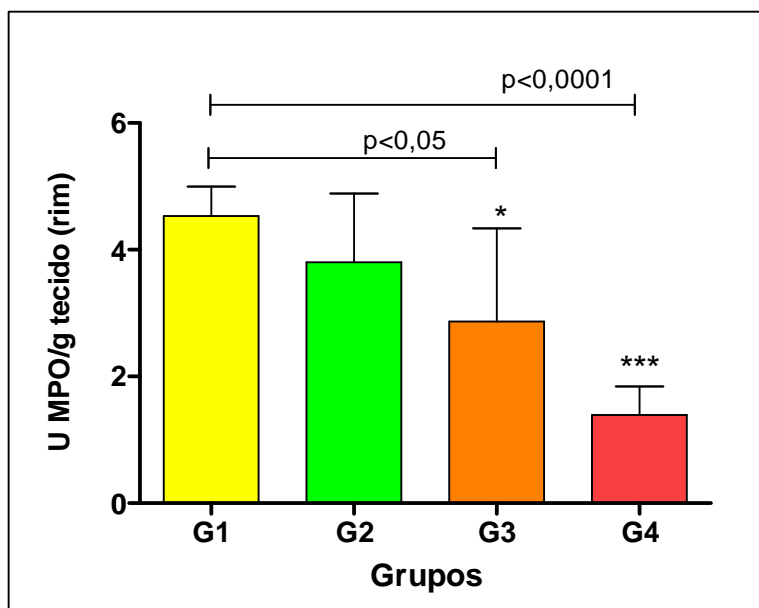
Tabela 12 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre a atividade da MPO (U/g tecido) no rim de ratos saudáveis submetidos ao estresse moderado crônico (Grupos G2-G4) comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.

G1	G2	G3	G4
4,535±0,464	3,803±1,085	2,865±1,470 *	1,390±0,451***

Fonte: o autor (2015)

Teste: ANOVA / DUNNETT - ***p<0,0001, p<0,05, comparados ao grupo G1.

Figura 15 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre a atividade da MPO (U/g tecido) no rim de ratos saudáveis submetidos ao estresse moderado crônico (Grupos G2-G4) comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo



Fonte: o autor (2015)

Teste: ANOVA / DUNNETT - ***p<0,0001 comparado ao grupo G1.

4.9 Resumo do achados laboratoriais

A Tabela 13 apresenta um resumo dos achados laboratoriais

Indicador	Sangue (soro)			Tecido (RIM)		
	Ac	EAc2	EAc100	Ac	EAc2	EAc100
Ureia	S/A	↑	↑	N/A	N/A	N/A
Creatinina	S/A	S/A	S/A	N/A	N/A	N/A
GSH	S/A	↑	↑	↑	↑	↑
MDA	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
MPO	N/A	N/A	N/A	S/A	↓	↓

↑ = aumento significativo, comparado ao controle G1

↓ = redução significativa, comparado ao controle G1

N/A - Não avaliado

S/A - Sem alterações

Fonte: o autor (2015)

6.DISSCUSSÃO

O presente estudo investigou as alterações renais induzidas pelo estresse oxidativo decorrente de uma série de estressores moderados capazes de desencadear um estado de anedonia em ratos.

O estresse moderado crônico imprevisível (EMC) tem sido empregado por diversos pesquisadores para investigar aspectos específicos de transtornos do humor, incluindo alterações comportamentais e fisiológicas (WILLNER et al, 1994; ANISMAN et al., 1996;, SOLBERG; HORTON; TUREK, 1999; DUNCKO et al., 2001; GITTO; PAPP, 2001) KUBERA et al., 2001).

O uso de animais em pesquisas tem sido objeto de intermináveis discussões. Sabe-se que desde o ano 500 aC pesquisadores utilizaram animais em estudos anatômicos. Naquela época, Alcmaeon, adquiriu conhecimentos anatômicos através da prática da dissecação de animais. Hipócrates (460 a.C.) utilizava animais em seus estudos com finalidade claramente didática. Anos depois, Aristóteles (384-322 a.C.) realizou estudos comparativos entre órgãos humanos e de animais. Galeno (129-210 d.C.), em Roma, foi talvez o primeiro pesquisador a realizar a vivissecação com objetivos experimentais. (MENEZES, 2002)

Atualmente, o uso de animais é permitido, desde que observadas rigorosas normas estabelecidas com a finalidade de limitar o uso de animais aos casos onde não seja possível a utilização de outras formas de pesquisa.

O cérebro é muito mais vulnerável a ação oxidativa dos radicais livres do que outros tecidos, uma vez que ele utiliza 20% do oxigênio consumido pelo organismo (CLARKE; SOKOLOFF, 1999). Além disso, o cérebro contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, e ferro, culminando com uma baixa concentração de enzimas antioxidantes. Deste modo, o estresse psicológico, que acompanha o estado depressivo, pode induzir um aumento da peroxidação lipídica (HIBBELN; SALEM, 1995).

As células, na sua maioria, podem tolerar um grau moderado de estresse oxidativo, considerando que possuem capacidade de defesa antioxidante e sistemas de reparo que reconhecem e removem moléculas danificadas por oxidação. Entretanto, ocorrendo um desequilíbrio acentuado

entre a produção de radicais livres e uma produção insuficiente de antioxidantes estabelece-se o estresse oxidativo (GOSMANOVA et al., 2011).

No presente estudo buscou-se submeter os ratos ao tratamento com acupuntura e eletroacupuntura. Em humanos, esses tratamentos são aplicados sem a utilização de anestésicos locais ou sistêmicos. A introdução de uma agulha de fino diâmetro produz um desconforto mínimo e perfeitamente tolerável pela grande maioria dos pacientes. Entretanto a aplicação desse método de tratamento em animais de laboratório torna-se difícil, pois os animais utilizados nas pesquisas não permanecem imóveis após o agulhamento, resultando em expulsão da agulha introduzida, que deve permanecer no local de aplicação por um tempo variável, geralmente 15 a 20 minutos. O estímulo elétrico, ao ser aplicado, pode resultar em contração muscular e movimento dos animais, prejudicando o possível efeito benéfico do tratamento. Por outro lado, o pre-condicionamento para o tratamento, realizado durante 6 dias e mantendo o animal em repouso em dispositivos semelhantes as redes usadas pela população nordestina, com imobilização parcial pelo mesmo tempo utilizado no estudo permitiu a sua realização em condições semelhantes àquelas verificadas em humanos tratados com os mesmos procedimentos. Saliente-se que esse procedimento não foi totalmente inócua pois vários animais apresentaram alterações patológicas nos primeiros dias de imobilização, tais como irritabilidade, diarreia, epistaxe moderada e dermatite de contato ao esparadrapo usado na imobilização dos animais.

Um estudo conduzido por Selek et al. (2008) demonstrou alto risco (58%) de obesidade em indivíduos deprimidos. A recíproca também foi comprovada, com a verificação do aumento dos casos de depressão (55%) entre indivíduos obesos.

No presente estudo não se observaram diferenças significantes entre os pesos médios de cada grupo, denotando uniformidade da amostra. Por outro lado, houve aumento de peso dos animais ao longo do experimento na comparação entre os pesos aferidos no último dia do estudo, quando comparados aos pesos verificados no dia de término do processo de indução do EMC. O aumento variou de 5,03% a 18,03%, este último nos ratos tratados com EAc 100 Hz. Todavia, o peso dos rins não apresentou alterações significantes, comparando-se cada grupo ao controle G1.

Os testes comportamentais comprovaram o estabelecimento da anedonia em todos os ratos, demonstrando a validade do modelo estudado.

Creatinina e ureia são duas substâncias presentes na corrente sanguínea, que podem ser dosadas através de exames de sangue quando se pretende fazer uma avaliação da função dos rins. Elevações dos valores dessas duas substâncias são a principal forma de se diagnosticar precocemente doenças renais. Embora não tenha ocorrido variação significativa da concentração de uréia plasmática nos ratos tratados com Ac, o uso da EAc (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos promoveu aumento significativo ($p < 0,0001$) das concentrações de uréia plasmática no último dia do estudo, sugerindo que a EAc não impediu o desenvolvimento de lesão renal em ratos deprimidos. Por outro lado não ocorreu alteração na concentração de creatinina na comparação entre os ratos deprimidos (G2-G4) tratados com Ac e EAc (2 e 100 Hz), e o grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo. Este último indicador é mais preciso na avaliação da função renal que o anterior, sugerindo que a lesão renal talvez não seja expressiva.

Houve aumento significativo concentrações de GSH no tecido renal e no plasma dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo.

Não foram observadas diferenças significantes das concentrações de MDA no plasma e no tecido renal na comparação entre os Grupos G2-G4 e o grupo controle G1.

Efeitos antioxidativos da EAc de baixa frequência foram demonstrados por Siu, Lo e Leung (2004). Esses pesquisadores estimularam acupontos VB20 localizado na face posterior do pescoço e o acuponto E36 usado no presente estudo e concluíram que a EAc de 2 Hz poderia reduzir a intensidade da lipoperoxidação em tecido cerebral submetido à isquemia.

Silva et al (2011) submeterem ratos expostos aos efeitos oxidantes da cetamina usada como anestésico e observaram um aumento da peróxidação lipídica após o uso de EAc de 10 Hz, durante 30 minutos. Os efeitos da peroxidação lipídica no tecido renal foram ainda mais pronunciados quando se aumentou a frequência da eletroacupuntura para 100 Hz.

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.

A inflamação foi reduzida ou atenuada considerando que houve diminuição significativa na atividade da mieloperoxidase no rim dos ratos na comparação entre os Grupos G2-G4 e o grupo controle G1.

Estudo realizado por Santos et al.(2013) mostrou diminuição da atividade da MPO, utilizando diferentes tipos de estimulação (AC, EAc -2 e 100 Hz). Resultado semelhante foi apresentado por da Silva et al. (2011), usando um modelo experimental de peritonite em camundongos. Também houve redução significativa da atividade da MPO em retalhos cutâneos randomizados no dorso de ratos (LIMA et al., 2012) onde estudaram os efeitos da EAc em randomizados abas de pele em ratos e descobriu a redução significativa na atividade MPO.

Este estudo apresenta algumas fragilidades:

1) a ausência de um grupo controle basal para se verificar os valores dos diversos indicadores antes do início dos experimentos;

2) a ausência de um grupo de animais que deveriam ser avaliados ao término da indução do estado depressivo, para permitir uma melhor comparação temporal dos resultados;

3) o peso dos ratos foi superior aos observados por outros pesquisadores; nesse contexto os animais mais velhos poderiam ser, talvez, mais resistentes à depressão que ratos mais jovens;

4) há uma proposta de continuação desse estudo utilizando substâncias de conhecida atividade antidepressiva, o poderia trazer novas informações sobre o potencial antidepressivo e antioxidante da eletroacupuntura. Esse estudo poderia contemplar maior tempo de exposição ao estresse, maior tempo de tratamento dos animais bem como uma avaliação temporal dos resultados, trabalhando com um número maior de grupos.

7 CONCLUSÃO

A acupuntura não tem efeito protetor sobre a inflamação no rim de ratos submetidos ao estresse moderado crônico imprevisível.

A acupuntura e a eletroacupuntura não têm efeitos moduladores sobre a peroxidação lipídica no modelo estudado.

A eletroacupuntura exerce um efeito protetor sobre o estresse oxidativo sistêmico e renal em ratos submetidos ao estresse moderado crônico imprevisível.

Acupuntura e a eletroacupuntura exercem um efeito protetor sobre o estresse oxidativo renal em ratos submetidos ao estresse moderado crônico imprevisível.

A eletroacupuntura promove o submetidos ao estresse moderado crônico imprevisível experimentalmente.

7.REFERENCIAS

ASLANI S, HARB MR, COSTA PS, ALMEIDA OF, SOUSA N, PALHA JA. Day and night: diurnal phase influences the response to chronic mild stress. **Front BehavNeurosci**. Mar 14;v.8, p.82, 2014. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00082. eCollection 2014.

BARIS C, KASIMAYKOLGAZI M, ERSOY Y, ERCAN F; BERRAK C, YEGEN BC. Stress-induced multiple organ damage in rats is ameliorated by the antioxidant and anxiolytic effects of regular exercise. **Cell Biochem Funct**; v. 28, p. 469–479, 2010. DOI: 10.1002/cbf.1679

BAUM A, COHEN L, HALL M. Control and intrusive memories as possible determinants of chronic stress. **Psychosom Med**.;v.55, n.3, p.274-86,1993.

BENZIE IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int J Food Sci Nutr**.;v.47,n.3,p.233-61,1996.

BLUMENTHAL JA, LETT HS, BABYAK MA, WHITE W, SMITH PK, MARK DB, JONES R, MATHEW JP, NEWMAN MF; NORG Investigators. Depression as a risk factor for mortality after coronary artery bypass surgery. **Lancet**. Aug 23;v.362,n.9384,p.604-9, 2003 doi:10.1016/S0140-6736(03)14190-6

BURGIN R, WEIZMAN R, GAVISH M. Repeated swim stress and peripheral-type benzodiazepine receptors. **Neuropsychobiology**; v.33,n.1,p.28-31,1996.

COHEN S, JANICKI-DEVERTS D, MILLER G E. Psychological stress and disease. **JAMA**. Oct 10v.298,n.14,p.1685-7, 2007

DENEKE SM, FANBURG BL. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol**. v.257n.4 Pt 1,p.L163-73,1989

DIMATTEO MR, LEPPER HS, CROGHAN TW. Depression is a risk factor for noncompliance with medical treatment: meta-analysis of the effects of anxiety and depression on patient adherence. **Arch Int Med**.;v.160,n.14,p.:2101-7, 2000

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

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.

GAMARO GD, MANOLI LP, TORRES IL, SILVEIRA R, DALMAZ C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochem Int.** Jan;v.42,n.2,p.107-14, 2003.

GU G, ZHANG Z, WANG G, HAN F, HAN L, WANG K, LIU J, LI W. Effects of electroacupuncture pretreatment on inflammatory response and acute kidney injury in endotoxaemic rats. **J Int Med Res.**;v.39,n.5,p.1783-97,2011.

HARRY GJ, KRAFT AD. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.** v.4,n.10,p.1265-77,2008. doi: 10.1517/17425255.4.10.1265

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

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

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.

KIRBY LG, LUCKI I. The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. **Stress.**;v.2,n.4,p.:251-63, 1998.

KODYDKOVÁ J, VÁVROVÁ L, ZEMAN M, JIRÁK R, MACÁSEK J, STANKOVÁ B, TVRZICKÁ E, ZÁK A. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women..**Clin Biochem** 2009;v.42,n.13-14,p.1368-74. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.06.006.

KONKLE, A. T. M., BAKER, S. L., KENTNER, A. C., BARBAGALLO, L. S., MERALI, Z., BIELAJEW, C.. Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared. **Brain Res.** v.992,p.227–238. 2003. doi: 10.1016/j.brainres.2003.08.047

LAUDENSLAGER ML, RYAN SM, DRUGAN RC, HYSON RL, MAIER SF. Coping and immunosuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. **Science**; v.221,p.568–570,1983.

LI, C.R.; CHENG, Z.D.; ZHANG, Z.X.; KIM, A.; HA, J.M.; SONG, Y.Y.; ZHENG, J.; CHEN, Y.G. Effects of acupuncture at Taixi acupoint (KI3) on kidney proteome. **Am J Chin Med.**;v. 39, n.4, p.:687-9, 2011.

LIU JK, MORI A. Stress, aging, brain oxidative damage. **Neurochem Res** v.24, p.1479–1497, 1999;

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.

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.

MAES M, DE VOS N, PIOLI R, DEMEDTS P, WAUTERS A, NEELS H, et al. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. **J Affect Disord**;v.58,n.3,p.241–6, 2000

MAES M, GALECKI P, CHANG YS, BERK M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuro psychopharmacol Biol Psychiatry**. 2011 v.35, n.3, p.676-92. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.05.004.

MAES M, KUBERA M, LEUNIS JC. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. **Neuro Endocrinol Lett**;v.29,n.1, p.117–24, 2008

MAES M, MIHAYLOVA I, KUBERA M, UYTTERHOEVEN M, VRYDAGS N, BOSMANS E. Increased 8hydroxy-deoxyguanosine, a marker of oxidative damage to DNA, in major depression and myalgic encephalomyelitis / function in restraint-stressed mice. **Jpn J Pharmacol**; v.40:p 505, 1986

MAES M, SONG C, LIN A, DE JONGH R, VAN GASTEL A, KENIS G, et al. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. **Cytokine** v.10,n.4, p.313–8, 1998

MAES M, STEVENS WJ, DECLERCK LS, BRIDTS CH, PEETERS D, SCHOTTE C, et al. Significantly increased expression of T-cell activation markers (interleukin-2 and HLA-DR) in depression: further evidence for an inflammatory process during that illness. **Prog Neuro psychopharmacol Biol Psychiatry**;v.17,n.2,p.241–55,1993

MAES M, YIRMYIA R, NORABERG J, BRENE S, HIBBELN J, PERINI G, et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metab Brain Dis**;v.24,n.1,p.27–53, 2009

MAES M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. **Neurol Endocrinol Lett Jun**;v.29,n.3,p.:287-91. 2008

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

MATHERS CD, LONCAR D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Med.**, v.3, p. e442, 2006

McEWEN BS. Protective and damaging effects of stress mediators. **N Engl J Med**. Jan 15;v.338, n.3, p.171-9, 1998.

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.

MICHEL TM, FRANGOU S, THIEMEYER D, CAMARA S, JECE J, NARA K. Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder a postmortem study. **Psychiatry Res**;v.151,p.145–50. 2007

MILLER AH, PARIANTE CM, PEARCE BD. Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression. **Adv Exp Med Biol**;v.461,p.107-16,1999.

NAKBI A, TAYEB W, DABBOU S, ISSAOUI M, GRISSA AK, ATTIA N, HAMMAMI M. Dietary olive oil effect on antioxidant status and fatty acid profile in the erythrocyte of 2,4-D- exposed rats. **Lipids Health Dis**.;v.9:n.89. 2010 doi: 10.1186/1476-511X-9-89.

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

NAKAO, C.; OKAWARA, T.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; MIYAZAKI, H.; HAGA, S. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **J Appl Physiol**;v.88,p.649–54, 2000

NG F, BERK M, DEAN O, BUSH AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol**; Sep;v.11,n.6,p.851-76, 2008. doi: 10.1017/S1461145707008401.

OKIMURA T, NIGO Y. Stress and immune responses: suppression of T cell function in restraint-stressed mice. **Jpn J Pharmacol**; v.40: 505–511, 1986

PANZER, R.B.A comparison of the traditional Chinese versus transpositional zangfu organ association acupoint locations in the horse. **Am J Chin Med**.;v,21,n.2, p.119-31,1993.

PEDREAÑEZ A, ARCAYA JL, CARRIZO E, RINCÓN J, VIERA N, PEÑA C, VARGAS R, MOSQUERA J. Experimental depression induces renal oxidative stress in rats. **Physiol Behav**. Oct 24;v.104,n.5,p.1002-9.,2011 doi: 10.1016/j.physbeh.2011.06.021.

RAGO L, KIIVET RA, HARRO J, POLD M. Central- and peripheral-type benzodiazepine receptors: similar regulation by stress and GABA receptor agonists. **Pharmacol Biochem Behav**; v.32,n.4, p.879-83. 1989

RAISON CL, CAPURON L, MILLER AH. Cytokines sing the blues: Inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol**.; v.27,p.24–31,2006.

RATNAKAR S, BANUPRIYA C, DOURERADJOU P, VIVEKANANDAM S, SRIVASTAVA MK, KONER BC. Evaluation of anxiety, depression and urinary protein excretion among the family caregivers of advanced cancer patients. **Biol Psychol**;v.79,p.234–8, 2008

NAKAO C, OKAWARA T, KIZAKI T, OH-ISHI S, MIYAZAKI H, HAGA S. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **J Appl Physiol**;v.88, p.649–54, 2000

REDROBE JP, BOURIN M. Evidence of the activity of lithium on 5-HT_{1B} receptors in the mouse forced swimming test: comparison with carbamazepine and sodium valproate. **Psychopharmacology** (Berl). Feb;v.141, n.4,p.370-7. 1999

ROSS, J. **Combinações dos pontos de acupuntura:a chave para o êxito clínico**. Roca, São Paulo, 2003.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p.112-119, 2001.

SANT'ANNA ID, DE SOUSA EB, DE MORAES AV, LOURES DL, MESQUITA ET, DA NOBREGA AC. Cardiac function during mental stress: cholinergic modulation with pyridostigmine in healthy subjects. **Clin Sci**; v.105, p. 161–165, 2003

SARANDOL A, SARANDOL E, EKER SS, ERDINC S, VATANSEVER E, KIRLI S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative–antioxidative systems. **Hum Psychopharmacol**;v.22,p.67–73, 2007

SCHIEPERS OJ, WICHERS MC, MAES M. Cytokines and major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**; v.29,n.2, p.201–17, 2005

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: AAEP, 1993. p.39.

SILVA AH, FIGUEIREDO LM, DIAS PA, PRADO NETO AX, VASCONCELOS PR, GUIMARÃES SB. Electroacupuncture attenuates liver and kidney oxidative stress in anesthetized rats. **Acta Cir Bras**.;Suppl 1, p.60-5. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502011000700013>.

SIMON GE. Social and economic burden of mood disorders. **Biol Psychiatry**.;v.54,n.3, p.208-15, 2003. Review DOI:10.1016/S0006-3223(03)00420-7

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.

SMITS FT, WITTKAMPF KA, SCHENE AH, BINDELS PJ, VAN WEERT HC. Interventions on frequent attenders in primary care: a systematic literature review. **Scand J Prim Health Care**. v.26,n.(2, p.111-6, 2008;. doi: 10.1080/02813430802112997..

SOBOCKI P, JÖNSSON B, ANGST J, REHNBERG C. Cost of depression in Europe. **J Ment Health Policy Econ**. Jun;v.9,n.2, p.87-98, 2006.

STENVINKEL P. Inflammation in end-stage renal disease—A fire that burns within. **Contrib Nephrol.**; v.149, p.185–199, 2005

STREKALOVA T, SPANAGEL R, BARTSCH D, HENN FA, GASS P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. **Neuropsychopharmacology**. Nov;v.29, n.11, p.2007-17, 2004.

TANNENBAUM B, TANNENBAUM GS, SUDOM K, ANISMAN H. Neurochemical and behavioral alterations elicited by a chronic intermittent stressor regimen: implications for allostatic load. **Brain Res.**;v. 953, n.1-2, p.82-92, 2002.

TARAZ M, TARAZ S, DASHTI-KHAVIDAKI S. Association between depression and inflammatory/anti-inflammatory cytokines in chronic kidney disease and end-stage renal disease patients: a review of literature. **Hemodial Int**. Jan;v.19, n.1, p.11-22, 2015. doi: 10.1111/hdi.12200.

USTUN TB,. AYUSO-MATEOS JL, CHATTERJI S.,. MATHERS C, MURRAY CJL. Global burden of depressive disorders in the year **Br. J. Psychiatry**, v.184 p. 386–392, 2004

VEDSTED P, CHRISTENSEN MB. Frequent attenders in general practice care: a literature review with special reference to methodological considerations. **Public Health.**;v.119, n.2, p.118-37, 2005.

WEISS SR, POST RM. Caveats in the use of the kindling model of affective disorders. **Toxicol Ind Health**. v.10, n.4-5, p.421-47, 1994.

WILLNER P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**. 2005;52(2):90-110. Epub 2005 Jul 19. PMID: 16037678

WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl)**.;v.134, n.4, p.319-29. 1997

WILLNER P., MUSCAT R., PAPP M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v.16, p.525–534, 1992. doi: 10.1016/S0149-7634(05)80194-0.

WILLNER, P., TOWER, D., SAMPSON, S., SOPHOKLEOUS S., MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoring by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v.93, p.358-364,(198).

ZIMMERMANN J, HERRLINGER S, PRUY A, METZGER T,WANNER C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. **Kidney Int.**; v.55,p.:648–658,1999

APENDICE A

ROTINA PARA A APLICAÇÃO DOS ESTRESSORES MODERADOS E IMPREVISÍVEIS DURANTE 6 SEMANAS PARA A INDUÇÃO DO ESTRESSE MODERADO CRÔNICO (EMC) NOS RATOS

SEMANA	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado	Domingo
1	24	3	16	28	30	2	REPOUSO
2	32	4	17	23	36	22	
3	33	5	14	21	19	20	
4	1	15	26	6	10	34	
5	12	29	18	35	8	25	
6	11	13	9	7	27	31	
<p>Distribuição e descrição dos estressores: 01-06 = Confinamento em um espaço restrito por 2 h (08 as 10 horas), 07-12 = Inclinação da gaiola durante 4 horas (08 as 12 horas) 13-18 = Habitação em cama úmida durante 8 horas (08 as 16 horas) 19-24= privação de alimentos durante 12 h seguida por exposição de comida inacessível para os animais durante 1 hora (08 as 21 horas) 25-30= jejum hídrico durante 12 horas seguido da exposição da garrafa d'água vazia durante 1 hora (08 as 21 horas) Repouso, com oferta de ração e água <i>ad libitum</i> Para a geração dos números randômicos foi utilizado o Gerador on-line de Números Randômicos, disponível em http://randomnumbergenerator.intemodino.com/pt/ [Acesso em 27Maio 2014]</p>							

APENDICE B
Pesos dos animais

Peso dos ratos (g) antes do início do experimento (Dia 1)				
Rato	G1	G2	G3	G4
1				
2	284	280	301	266
3	268	323	230	295
4	287	340	244	252
5	278	298	282	327
6	272	320	277	297

Peso dos ratos (g) ao término do EMC (Dia 42)				
Rato	G1	G2	G3	G4
1				
2	384	315	330	296
3	287	350	248	227
4	309	382	292	209
5	284	268	304	370
6	356	305	331	329

APENDICE C
Pesos dos rins

Peso do Rim Direito				
Rato	G1	G2	G3	G4
1	1,176	1,234	1,323	1,171
2	1,105	1,343	0,904	1,235
3	1,260	1,271	1,123	0,919
4	0,941	0,931	1,214	1,319
5	1,296	1,165	1,199	1,360
6	1,306	1,313	1,319	1,186

Peso do Rim Esquerdo				
Rato	G1	G2	G3	G4
1	1,250	1,163	1,101	0,975
2	1,055	1,271	0,896	1,175
3	1,113	1,302	1,153	0,919
4	1,017	0,962	1,004	1,257
5	1,152	1,169	1,094	1,260
6	1,213	1,152	1,280	1,248

APÊNDICE D

Grupos 1-2

Teste de preferência da sacarose (TPS)

Grupo 1	TPS1		TPS2		TPS3		
	Rato	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)
1		15	15	25	29	5	13
2		10	10	23	9	11	10
3		20	8	22	12	17	10
4		12	20	25	10	3	18
5		8	5	16	18	4	14
6		5	5	25	6	5	5

Teste de preferência da sacarose (TPS)

Grupo 2	TPS1		TPS2		TPS3		
	Rato	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)
1		10	4	18	12	20	7
2		14	0	17	27	20	4
3		11	5	10	15	22	2
4		7	0	26	7	7	16
5		0	4	26	5	6	10
6		11	3	17	4	16	5

APÊNDICE E

Grupos 3-4

Teste de preferência da sacarose (TPS)

Grupo 3	TPS1		TPS2		TPS3	
	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)
1	14	26	18	35	12	12
2	30	10	19	17	11	5
3	0	18	17	14	6	8
4	30	8	18	17	10	8
5	44	20	21	16	18	10
6	12	16	33	1	20	6

Teste de preferência da sacarose (TPS)

Grupo 4	TPS1		TPS2		TPS3	
	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)	Volume ingerido (água)	Volume ingerido (sacarose)
1	10	5	28	3	10	8
2	12	5	37	8	20	5
3	9	3	12	16	8	10
4	10	8	24	12	8	12
5	9	2	30	8	7	20
6	30	10	26	26	6	5

APÊNDICE F

Grupos 1-2

Teste de natação forçada TNF(Tempo de inatividade)

Grupo 1	TNF1 (minutos / segundos)	TNF2 (minutos / segundos)	TNF3 (minutos / segundos)
Rato			
1	06:11	02:03	02:10
2	04:04	00:59	04:42
3	03:24	01:15	00:14
4	02:11	00:40	00:38
5	01:55	02:25	00:32
6	02:28	00:23	01:40

Grupo 2	TNF1 (minutos / segundos)	TNF2 (minutos / segundos)	TNF3 (minutos / segundos)
Rato			
1	02:35	00:29	00:21
2	00:48	00:14	00:17
3	01:41	01:11	00:41
4	00:36	00:19	00:20
5	01:07	00:53	00:28
6	02:29	00:49	01:17

APÊNDICE G

Grupos 3-4

Teste de natação forçada TNF (Tempo de inatividade)

Grupo 3	TNF1 (minutos / segundos)	TNF2 (minutos / segundos)	TNF3 (minutos / segundos)
Rato			
1	02:15	01:05	00:33
2	01:30	00:30	00:12
3	01:55	00:42	00:35
4	02:25	00:29	00:15
5	00:39	01:18	00:05
6	02:20	00:57	00:26

Grupo 4	TNF1 (minutos / segundos)	TNF2 (minutos / segundos)	TNF3 (minutos / segundos)
Rato			
1	00:57	00:58	00:00
2	02:06	00:16	00:14
3	00:38	01:03	00:11
4	01:05	00:20	00:09
5	02:05	00:38	00:09
6	01:31	00:31	00:17

APENDICE H
MARCADORES DE LESÃO RENAL

UREIA				
Rato	G1	G2	G3	G4
1	38,	48,	50,	53,
2	43,	45,	53,	47,
3	42,	50,	55,	45,
4	46,	52,	56,	55,
5	41,	53,	59,	56,
6	54,	49,	49,	56,

CREATININA				
Rato	G1	G2	G3	G4
1	0,5	0,5	0,5	0,4
2	0,5	0,5	0,4	0,5
3	0,5	0,4	0,4	0,5
4	0,4	0,5	0,4	0,4
5	0,4	0,5	0,6	0,5
6	0,5	0,5	0,6	0,5

APENDICE I

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

GSH - Plasma				
Rato	G1	G2	G3	G4
1	13,3407	14,4538	21,3964	58,1595
2	13,8387	11,5538	41,8724	48,7271
3	13,2821	22,3923	22,9782	54,2928
4	14,2488	20,0196	20,3125	49,0786
5	13,8973	18,8186	18,7893	78,8407
6	14,2488	16,5337	46,3836	49,6352

GSH - Rim				
G2	G1	G2	G3	G4
1	8,6538	37,6542	40,5835	54,6443
2	18,0276	64,8970	40,5835	51,7150
3	8,9467	37,3613	43,2199	71,3416
4	18,3206	46,7351	36,4825	74,5638
5	15,6842	44,9775	48,7857	52,3009
6	15,3912	12,1690	45,5634	77,4932

MDA - Plasma				
Rato	G1	G2	G3	G4
1	0,036	0,036	0,066	0,196
2	0,016	0,076	0,056	0,156
3	0,186	0,086	0,106	0,126
4	0,086	0,036	0,036	0,286
5	0,006	0,066	0,096	0,356
6	0,016	0,058	0,296	0,011

MDA - Rim				
G2	G1	G2	G3	G4
1	0,036	0,036	0,066	0,196
2	0,016	0,076	0,056	0,156
3	0,186	0,086	0,106	0,126
4	0,086	0,036	0,036	0,286
5	0,006	0,066	0,096	0,356
6	0,016	0,058	0,296	0,011

APENDICE J**MARCADORES DE INFLAMAÇÃO NO RIM**

MPO - Rim				
G2	G1	G2	G3	G4
1	4,231	4,752	4,213	0,992
2	4,351	3,757	1,549	1,305
3	4,176	2,282	4,420	2,024
4	4,877	2,973	1,711	1,397
5	5,324	3,844	1,342	1,780
6	4,250	5,208	3,955	0,844

ANEXO A PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA




Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITOS MODULATÓRIOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO INDUZIDOS POR DEPRESSÃO EXPERIMENTAL NO RIM DO RATO)", protocolo nº 86/2014, sob responsabilidade do Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de outubro de 2015.

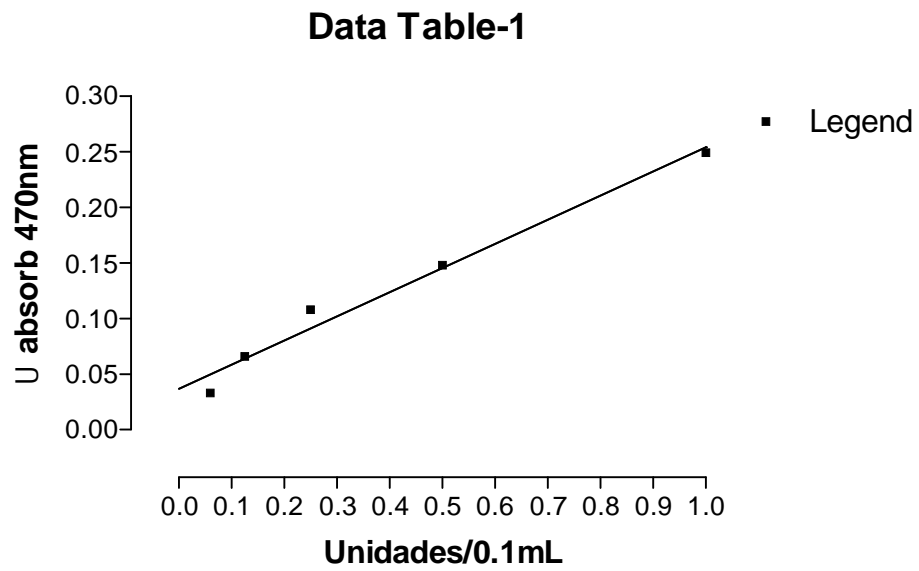
Vigência do projeto	01/08/2014 a 31/07/2016
Espécie/Linhagem	Ratos Wistar
Nº de Animais	24
Peso/Idade	150 a 250g
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 18 de novembro de 2015


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sique: 1520734

ANEXO B

GRÁFICO PADRÃO PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE DA MPO



ANEXO C

GRÁFICO PADRÃO PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE GSH

