



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

**ANDREA DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE**

**EFEITOS MODULATÓRIOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA  
SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE RATOS  
DEPRIMIDOS EXPERIMENTALMENTE**

**FORTALEZA  
2016**

**ANDREA DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE**

**EFEITOS MODULATÓRIOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA  
SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE RATOS  
DEPRIMIDOS EXPERIMENTALMENTE**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências médico-cirúrgicas. Área de concentração: Efeitos da Acupuntura e Eletroacupuntura Sobre o Metabolismo Energético, Estresse Oxidativo e a Inflamação em Animais.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães

**FORTALEZA  
2016**

---

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A1e ALBUQUERQUE, ANDREA DE OLIVEIRA.  
EFEITOS MODULATÓRIOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA  
SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE RATOS  
DEPRIMIDOS EXPERIMENTALMENTE / ANDREA DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE. –  
2016.  
92 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós- Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. SERGIO BOTELHO GUIMARAES.

1. Acupuntura . 2. estresse oxidativo. 3. Fígado. 4. Depressão em rato. I. Título.

CDD 617  
617

---

**ANDREA DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE**

**EFEITOS MODULATÓRIOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA  
SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE RATOS  
DEPRIMIDOS EXPERIMENTALMENTE**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências médico-cirúrgicas. Área de concentração: Efeitos da Acupuntura e Eletroacupuntura Sobre o Metabolismo Energético, Estresse Oxidativo e a Inflamação em Animais.

Aprovada em: 04/02/2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Orleânicio Gomes Ripardo de Azevedo  
Faculdade Fanor | DeVry

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois minha acreditação na ciência só tem sentido baseado na fé de algo maior.

Agradeço a minha mãe, Maria Luciene Vieira de Oliveira, cujo seu sim me possibilitou a vida, e, cuja a caminhada e batalha diária para nos dedicar o melhor de si possibilitou todas as condições de uma vida confortável e repleta de amor. Uma mulher guerreira, que ultrapassou todos os obstáculos de uma vida humilde e se tornou um exemplo a ser seguido. Meu exemplo de mulher. Que sempre abriu todas as portas guiou nossos caminhos ao sucesso e me dedicou um amor incondicional e inenarrável.

Ao meu pai, Francisco Das Chagas Dias de Albuquerque, que, apesar de não entender muito de pesquisa, procurou sempre me ensinar os princípios da vida, como tratar os outros como gostaríamos de ser tratados, reforçando a necessidade de uma boa educação para se alcançar o sucesso na vida, que junto a minha mãe, dedicou um amor pleno e sereno.

A minha irmã, Aline de Oliveira Albuquerque, que esteve presente na minha pesquisa e na minha vida, e apesar de sua pouca idade sempre foi um exemplo a ser seguido.

A minha tia Maria Auxiliadora Dias de Albuquerque, cujo terceiro sim possibilitou minha vida e, cuja dedicação admirável, acompanhou-me desde infância até então, estando presente nos piores e melhores momentos da minha vida, protagonizando um espaço especial na caminhada do meu sucesso pessoal e profissional que tenho hoje, sendo solícita e amorosa em todos os detalhes da minha vida.

Aos meus avós e tios paternos e maternos, em especial minha avó Maria de Lourdes Dias de Albuquerque, minha tia Paula Franscinete Dias de Albuquerque, minha madrinha Walhistes Frota Albuquerque, que sempre se procuraram em proporcionar condições para que eu alcançasse oportunidades únicas na vida pessoal e profissional.

Ao meu namorado, Abel Brasil Ramos da Silva, por ter acompanhado diretamente e me incentivado em todo o processo da pesquisa, desde as idas ao laboratório até a compreensão dos dados estatísticos, pela disponibilidade e paciência, pelo ensino e apoio emocional constante.

Aos primos, mesmo que por vezes distantes, que apoiaram e incentivaram minha carreira, e se fizerem de exemplo, já que a grande maioria seguiu ou seguirá uma carreira na área da saúde.

Aos amigos, pela compreensão nas ausências, e motivação constante, pelos momentos de alegria e desabafos.

Ao meu orientador, Dr. Sérgio Botelho Guimarães, que possibilitou meu ingresso na pesquisa desde a graduação, que, de forma indescritível, fez-se presente em todo o processo até a minha pós-graduação, guiando todos os meus passos, contribuindo, com seu conhecimento, para o meu engrandecimento profissional.

A secretária Magda Gomes Fontinele, que, além dos conselhos pessoais, incentivou meu ingresso ao ensino, pelo estágio em docência, e acompanhou e me motivou a nunca desistir.

Ao Dr. Paulo Roberto Leitão, o qual também me orientou enquanto graduanda e possibilitou o meu encantamento pelo estresse oxidativo e contribuiu, com seu conhecimento, para o meu engrandecimento profissional.

A todos os Mestres e Doutores que contribuíram para meu aprendizado teórico e prático.

A todos os pós-graduandos, graduandos e técnicos de laboratório do departamento de cirurgia e do departamento de fisiologia e farmacologia que estavam presentes, direta ou indiretamente, na minha jornada de pesquisas laboratoriais, seja na graduação ou na pós-graduação, e fizeram desses momentos mais produtivos e mais leves.

Aos meus colegas de trabalho do Núcleo de Tecnologias de Educação a Distância em saúde da UFC (NUTEDS), que compreenderam minha ausência, em alguns momentos, e contribuíram para minha qualificação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela confiança e apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos professores da banca pela disponibilização e contribuição com esta pesquisa.

## RESUMO

**Efeitos modulatórios da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a inflamação e o estresse oxidativo no fígado de ratos deprimidos experimentalmente.** Andrea de Oliveira Albuquerque. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas. Departamento de Cirurgia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

O estresse, atualmente, é um dos principais fatores que têm sido associados com a ocorrência de depressão, uma das formas mais comuns de psicopatia, cujo impacto social é alto. Podemos apontar uma estreita relação entre o estresse e a depressão, a partir de evidências que apontam a presença de anormalidades nos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio e glutatona reduzida (GSH) na atividade de enzimas antioxidantes. Sabe-se que o desequilíbrio entre oxidante e antioxidante (estresse oxidativo) desempenha um papel fundamental na produção de lesões induzidas pelo estresse, o qual, nesse estudo, associou-se a lesão hepática. Os impactos dos distúrbios emocionais sobre o fígado parecem estar associados à maior gravidade das doenças hepáticas. Baseado nisso, utiliza-se a acupuntura manual no acuponto VB34 (*Yanglingquan*) com o intuito de gerar respostas hepatoprotetoras e no ponto E36 (*Zusanli*) para fortalecer os processos mentais. Assim, esse trabalho objetivou avaliar os efeitos modulatórios da acupuntura e eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo agudo e a inflamação no fígado de ratos deprimidos experimentalmente. Tratou-se de um estudo prospectivo, controlado e comparativo entre quatro grupos de ratos Wistar, 24 ratos machos distribuídos randomicamente em grupos de seis, submetidos ao estresse crônico moderado (ECM) durante seis (6) semanas, para o desenvolvimento de um quadro depressivo, constatado por Teste de Preferência a Sacarose e Teste de Natação Forçada. Seguido por tratamento de Acupuntura (Ac), Eletroacupuntura 2Hz (Eac 2Hz) e Eletroacupuntura 100 Hz (Eac 100Hz), excetuando-se o grupo controle. Foram utilizados os acupontos VB34 e E36 como tratamentos, e o ponto R3 (*Taixi*), foi utilizado como potencializador. O tratamento durou 20 min, repetido em dias alternados, perfazendo seis (6) aplicações. Ao final, foram coletadas amostras de sangue e de fígado para análise bioquímica, que incluíram a análise de transaminase glutâmico oxalacética/ aspartato aminotransferase (TGO/ALT) e transaminase glutâmico-pirúvica/alanina aminotransferase (TGP/AST) séricas, dialdeído malônico (MDA) sérico e hepático, glutatona reduzida (GSH) sérica e hepática e mieloperoxidase hepática (MPO). No presente estudo observou-se que o tratamento proposto com Ac, Eac 2Hz e Eac 100Hz, promoveu redução significativa de AST sérica, aumento da GSH hepático para todos os grupos tratados. Observou-se, também, um aumento muito significativo ( $p < 0,0001$ ) de GSH sérico relacionados ao tratamento com Eac 100Hz e significativo ( $p < 0,05$ ) relacionado a Ac, uma redução significativa de MDA hepático ( $p < 0,05$ ) e uma redução muito significativa de MPO hepático ( $p < 0,0001$ ), relacionado ao uso da Eac 100Hz. Conclui-se, então, que a aplicação do tratamento em ratos previamente deprimidos promoveu proteção local e sistêmica sobre o estresse oxidativo por aumento das concentrações de GSH, além de reduzir o estado inflamatório. Enfatiza-se que tratamento com Eletroacupuntura 100Hz se mostrou significativamente mais promissor como tratamento.

**Descritores:** Acupuntura e eletroacupuntura; Inflamação e estresse oxidativo; Fígado; Depressão em rato.

## ABSTRACT

**Modulatory effects of acupuncture and electroacupuncture on inflammation and oxidative stress in the rat's liver experimentally depressed.** Andrea de Oliveira Albuquerque. Master's degree. Post-graduation Program *Stricto Sensu* in Medical-Surgical Sciences. Federal University of Ceará. Professor: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

Stress is currently one of the main factors that have been associated with the occurrence of depression, one of the most common forms of psychopathy, the social impact is high. We can point to a close relationship between stress and depression, from evidence pointing to the presence of abnormalities in cellular levels of reactive oxygen species and reduced glutathione (GSH) in the activity of antioxidant enzymes. It is known that the imbalance between oxidant and antioxidant (oxidative stress) plays a key role in the production of lesions induced by stress, which in this study associate with liver injury. The impact of emotional disorders on the liver appears to be associated with increased severity of liver disease. Based on this, the manual acupuncture is used in acupoint VB34 (*Yanglingquan*) in order to generate hepatoprotective answers and E36 point (*Zusanli*) to strengthen the mental processes. This study aimed to evaluate the modulatory effects of acupuncture and electroacupuncture on oxidative stress and inflammation in the liver of rat experimentally depressed. This was a prospective, controlled study, comparing four Wistar rats groups, there were 24 male rats randomly assigned in groups of six, subjected to Chronic Mild Stress (CMS) for six (6) weeks for the development an experimental depression, this frame was evidenced by Sucrose Preference Test and the Forced Swim Test. After we performed the treatment Acupuncture (Ac), electroacupuncture 2 Hz (Eac 2 Hz )and electroacupuncture 100 Hz (Eac 100Hz ) , except for the control group. The acupoints VB34 and E36 were used as treatments, and the point R3 (*Taixi*) was used as the potentiator. The treatment lasted 20 min, repeated on alternate days, totaling six (6) applications. In the end, blood samples and liver samples were collected for biochemical analysis, which included the transaminase analysis glutamic oxaloacetic / aspartate aminotransferase (AST/ALT) and transaminase glutamic pyruvic / alanine aminotransferase (ALT/AST) serum, malonic dialdehyde (MDA) serum and liver, reduced glutathione (GSH) serum and liver and myeloperoxidase (MPO) liver. In the present study it was observed that the proposed treatment with Ac, Eac 2Hz, Eac and Eac100Hz, caused a significant reduction of serum AST, increased hepatic GSH for all treated groups. There was also a significant increase ( $p < 0, 0001$ ) serum GSH related to treatment with Eac 100Hz and significant ( $p < 0.05$ ) related to Ac, a significant reduction in hepatic MDA ( $p < 0, 05$ ), and a very significant reduction in hepatic MPO ( $p < 0.0001$  ) , related to the use of Eac 100Hz . It was concluded, then, that the applications of the treatment in rats previously depressed promoted local and systemic protection on oxidative stress by increasing GSH concentrations and reduce the inflammatory state. It is emphasized that treatment with electroacupuncture 100Hz was significantly more promising as a treatment.

**Descriptors:** Acupuncture and Electroacupuncture; Inflammation and Oxidative Stress; Liver; Depression of mouse.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 16 |
| 1.1 DEPRESSÃO .....   | 16 |
| <b>1.1.1 Panorama epidemiológico e características</b> .....  | 16 |
| <b>1.1.2 Fisiopatologia da depressão</b> .....  | 17 |
| 1.2 RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE E DEPRESSÃO .....  | 18 |
| <b>1.2.1 Fisiopatologia de resposta ao estresse</b> .....   | 18 |
| 1.3 MODELO EXPERIMENTAL NO DESENVOLVIMENTO DA DEPRESSÃO .....   | 24 |
| 1.4. RELAÇÃO ENTRE DEPRESSÃO E HEPATOPATIA .....  | 24 |
| 1.5. MEDICINA TRADICIONAL CHINESA (MTC).....  | 26 |
| <b>1.5.1. Relação do fígado com a depressão para a MTC</b> .....  | 26 |
| <b>1.5.2. Acupuntura</b> .....  | 27 |
| <b>1.5.5 Efeitos da acupuntura no processo inflamatório, no sistema anti-oxidante e na resposta ao estresse</b> .....   | 30 |
| 1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....  | 32 |
| 2 OBJETIVO.....   | 33 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....   | 33 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 33 |
| 3 MÉTODO.....   | 34 |
| 3.1 TIPO DE ESTUDO E AMOSTRA .....  | 34 |
| 3.2 DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA.....  | 34 |
| 3.3 INDUÇÃO DA DEPRESSÃO .....  | 35 |
| 3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS .....  | 36 |
| <b>3.4.1 Teste de Preferência da Sacarose (TPS)</b> .....   | 36 |
| 3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....   | 38 |
| 3.6 CONDICIONAMENTO DOS RATOS.....  | 39 |
| 3.7 LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE ACUPUNTURA / ELETROACUPUNTURA .....   | 39 |
| <b>3.7.1 Protocolo de aplicação da Acupuntura / Eletroacupuntura</b> .....  | 40 |
| 3.8 COLETA DE AMOSTRAS .....  | 41 |
| 3.9 EXAMES LABORATORIAIS.....   | 41 |
| <b>3.9.1 Avaliação da peroxidação lipídica e quantificação de dialdeído malônico (MDA)</b> .....  | 42 |
| <b>3.9.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH)</b> .....   | 42 |
| <b>3.9.3 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)</b> .....   | 43 |
| <b>3.9.4 Mensuração da atividade da Alanino aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e da Aspartato aminotransferase (AST) ou Transaminase glutâmico oxalácetico (TGO)</b> ..... | 44 |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 46 |
| 3.11 ASPECTOS ÉTICOS .....  | 47 |
| 4 RESULTADOS.....   | 48 |
| 4.1 COMPLICAÇÕES E PERDAS DE ANIMAIS .....  | 48 |
| 4.2 PESO DOS RATOS .....  | 48 |
| 4.3. PESO DO FÍGADO .....   | 49 |
| 4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS .....  | 50 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.4.1 | Teste de preferência da sacarose .....   | 50 |
| 4.4.2 | Teste de nado forçado.....   | 51 |
| 4.5   | EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA (2 HZ E 100 HZ) SOBRE OS MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS SÉRICOSEM RATOS DEPRIMIDOS, INDUZIDOS POR ESTRESSE MODERADO CRÔNICO (APÊNDICE H) ..... | 53 |
| 4.5.1 | Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a concentração de aspartato amino transferase - AST no sangue dos ratos.....   | 53 |
| 4.5.2 | Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de alanina amino transferase - ALT no sangue dos ratos .....   | 54 |
| 4.5.3 | Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de GSH no sangue dos ratos .....   | 55 |
| 4.5.4 | Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de MDA no sangue dos ratos.....  | 56 |
| 4.6   | EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA (2 HZ E 100 HZ) SOBRE O TECIDO HEPÁTICO DE RATOS DEPRIMIDOS, INDUZIDOS POR ESTRESSE MODERADO CRÔNICO (APÊNDICE I) .....                      | 58 |
| 4.6.1 | Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de GSH no fígado de ratos.....   | 58 |
| 4.6.2 | Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de MDA no fígado de ratos ...  | 59 |
| 4.6.3 | Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de MPO no fígado de ratos....  | 60 |
| 5     | DISCUSSÃO .....  | 63 |
| 6     | CONCLUSÃO .....  | 67 |
|       | BIBLIOGRAFIA.....  | 68 |
|       | APÊNDICES E ANEXOS.....  | 80 |
|       | APÊNDICE A .....   | 80 |
|       | APÊNDICE B .....   | 81 |
|       | APÊNDICE C .....   | 83 |
|       | APÊNDICE D .....   | 83 |
|       | APÊNDICE E .....   | 85 |
|       | APÊNDICE F.....  | 86 |
|       | APÊNDICE G.....  | 90 |
|       | APÊNDICE H.....  | 91 |
|       | APÊNDICE I.....  | 93 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Desenho do experimento .....   | 35 |
| Figura 2 - Delineamento do experimento .....  | 38 |
| Figura 3 - Rato posicionado na rede para aclimação (preparo para o procedimento de Acupuntura e Eletroacupuntura).....  | 39 |
| Figura 4 - Rato posicionado na rede para sessões de Acupuntura - Agulhas inseridas.....   | 40 |
| Figura 5- Rato posicionado na rede para as sessão de EAc - agulhas inseridas e conectadas ao eletroestimulador .....  | 41 |
| Figura 6 -Variação do peso do fígado no último diado experimento (dia 20).....  | 50 |
| Figura 7- Teste de preferência da sacarose.....   | 51 |
| Figura 8- Efeitos da Acupuntura e da Eletroacupuntura em ratos deprimidos submetidos ao teste de nado forçado .....   | 53 |
| Figura 9- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico sobre as concentrações de AST nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo.....     | 54 |
| 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 ALT nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo .....  | 55 |
| 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 negativo (G1) no último dia.....  | 56 |
| 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 MDA plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia.....  | 57 |
| 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 GSH no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia.....  | 59 |
| 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 fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia.....  | 60 |
| Figura 15- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre a atividade da MPO no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do es ..... | 61 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Peso médio dos ratos utilizados no primeiro dia do estudo .....   | 49 |
| Tabela 2- Alterações do peso dos ratos durante o experimento * .....  | 49 |
| Tabela 3 - Alterações do peso médio do fígado dos ratos no último dia do experimento (Dia 20).....  | 50 |
| Tabela 4- Teste de preferência da sacarose, realizado em 3 momentos .....   | 51 |
| Tabela 5- Teste do nado forçado. Tempo (m/s) de imobilidade ou flutuação passiva dos ratos .....  | 52 |
| 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 AST nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo.....                                  | 54 |
| 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 ALT nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo.....                                  | 55 |
| 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 plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia.....                                 | 56 |
| 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 MDA plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia.....                                 | 57 |
| 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 GSH no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo.....                       | 58 |
| 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 ( $\mu\text{Mol/g}$ ) no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo..... | 59 |
| Tabela 12- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre a atividade da MPO no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo ...                             | 61 |
| Tabela 13- Consolidado dos resultados dos grupos tratados (G2-G4) em comparação com o grupo controle (G1) .....   | 62 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| ACTH                          | hormônio adrenocorticotrófico                      |
| a.C.                          | Antes de cristo                                    |
| AMB                           | Associação Médica Brasileira                       |
| Ac                            | Acupuntura manual                                  |
| ALT                           | Alanino aminotransferase                           |
| AST                           | Aspartato aminotranferase                          |
| CRH                           | Hormônio liberador de corticotrofina               |
| CAT                           | Catalase   |
| CH <sub>2</sub>               | Grupo Metila                                       |
| CUMS                          | Chronic unpredictable mild stress                  |
| CFM                           | Conselho Federal de Medicina                       |
| CT                            | Grupo controle                                     |
| E36                           | Estômago 36  |
| Eac                           | Eletroacupuntura                                   |
| ECM                           | Estresse crônico Moderado                          |
| GSH                           | Glutathiona Reduzida                               |
| GR                            | Glutathiona redutase                               |
| GPx                           | Glutathiona Peroxidase                             |
| GSSG                          | Glutathiona Oxidada                                |
| HPA                           | Hipófise-Pituitária-Adrenal                        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peroxido de hidogênio                              |
| HOCl                          | Ácido Hipocloroso                                  |
| Hz                            | Hertz  |
| IL-1                          | Interleucina 1                                     |
| IL-6                          | Interleucina 6                                     |
| LPO                           | Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação            |
| MTC                           | Medicina Tradicional Chinesa                       |
| MPO                           | Mieloperoxidase                                    |
| MDA                           | Dialdeído malônico                                 |
| NADPH                         | Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida |

|                             |                                    |
|-----------------------------|------------------------------------|
| OMS                         | Organização Mundial de Saúde       |
| O <sub>2</sub>              | Gás Oxigênio                       |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Superoxido                         |
| RL                          | Radicais livres                    |
| ROO•                        | Radicais peroxila                  |
| SNA                         | Sistema Nervoso Autônomo           |
| SNC                         | Sistema Nervoso Central            |
| SOD                         | Superóxido Dismutase               |
| SP                          | Substância P                       |
| TNF- $\alpha$               | Fator de Necrose tumoral alfa      |
| TPS                         | Teste de Preferência a Sacarose    |
| TNF                         | Teste de Natação Forçada           |
| TBARS                       | Ácido tiobarbitúrico               |
| TGP                         | Transaminase glutâmico pirúvico    |
| TGO                         | Transaminase glutâmico oxalácetico |
| VB34                        | Vesícula Biliar 34                 |
| WHO                         | World Health Organization          |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEPRESSÃO

### 1.1.1 Panorama epidemiológico e características

A depressão é uma das formas mais comuns de psicopatologia. E, segundo o último estudo da World Health Organization ou Organização Mundial de Saúde (2012), atingia cerca de 350 milhões de pessoas em 2012, refletindo uma prevalência de, aproximadamente, 17% da população mundial.

De acordo com as perspectivas dessa mesma pesquisa da OMS, nos próximos quatro anos a depressão será a segunda causa mundial relacionada ao absenteísmo e ao ônus laboral. Em 2012 já ocupávamos quarta posição. A estimativa para o futuro é uma relação de uma em cada cinco pessoas, em algum momento da vida, com uma alteração psiquiátrica que necessite de acompanhamento especializado (ABELHA, 2014).

Por isso, é considerada um problema de saúde pública, cujo ônus pode levar não somente a perda monetária, mas, também, a perda de relacionamentos, de empregos, e, com frequência, da própria vida (NESTLER et. al., 2002; ABELHA, 2014). Atualmente, os impactos econômicos da depressão chegaram a 118 bilhões de euros na Europa em 2004 (SOBOCKI et al., 2006). Mas, o que se observa é que a depressão está se tornando a doença com maiores custos econômicos e sociais para os governos, devido aos gastos com tratamento e às perdas de produção (DIMATTEO; LEPPER; CROGHAN, 2000; BLUMENTHAL et al., 2003; SIMON, 2003).

Estima-se que no Brasil ocupe o terceiro lugar dentre os países mais depressivo no mundo, com aproximadamente 54 milhões de pessoas que em algum momento de suas vidas desenvolverão algum tipo de depressão, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos e graves, muitas com risco de suicídio (NARDI, 2000).

O suicídio representa o pior desfecho relacionado ao quadro depressivo. Oliveira em 2010, trouxe uma comparação da relação suicídio por ano no estado do Ceará de 1998 a 2007, o que se observou foi um aumento de 265 casos para 525. Estes valores representam um aumento de 65,69% na taxa de suicídio no estado.

Especialistas apontam que os motivos para esse quadro alarmante são vários, desde alterações biológicas à herança genética, mas destaca-se o estilo de vida excessivamente atarefado e a busca precoce pelo diagnóstico (ABELHA, 2014).

Assim, para se fechar o diagnóstico e realizar um manejo adequado é necessário que se faça a diferenciação entre depressão e flutuação de humor cotidiana. De acordo com OMS (2012) e a Sociedade Americana de Psiquiatria (2014), no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, a depressão se caracteriza como problema com um grau de cronicidade, relacionado a ausência de prazer ou interesse, associados a distúrbios do sono e do peso, com idéias recorrentes de morte, o que pode torná-la um grave problema de saúde, e as flutuações de humor habituais estão relacionadas a respostas emocionais de curta duração para os desafios da vida cotidiana.

### **1.1.2 Fisiopatologia da depressão**

Algumas hipóteses parecem estar envolvidas na fisiopatologia da depressão, mas sua etiologia ainda não está bem definida. Uma das teorias pioneiras fala da deficiência na atividade monoaminérgica no cérebro (ELHWUEGI, 2004). Descrita por volta de 1965, postula que o maior processo neuroquímico envolvido na depressão é a disfunção na neurotransmissão monoaminérgica e a concomitante diminuição das monoaminas norepinefrina e/ou serotonina na fenda sináptica, e também pode ser estendida para dopamina.

A disfunção pode estar relacionada com síntese, armazenamento ou liberação das monoaminas ou estas podem manter-se inalteradas, mas as atividades dos receptores e/ou mensageiros intracelulares podem estar alteradas. Essa hipótese pode ser comprovada pelo mecanismo de ação dos antidepressivos relacionados com o aumento de monoaminas no cérebro (NEMEROFF, 2007).

Porém, outras hipóteses parecem estar envolvidas na fisiopatologia da depressão. Estudos sugerem o envolvimento da desregulação imunológica no desencadeamento da depressão, hipótese que se relaciona com o presente estudo (DANTZER; KELLEY, 2007; KIM et al, 2007; LEONARD; MAES, 2012). Descrita por Smith (1991), revisado por Berton et. al (2012), a hipótese relaciona as citocinas pró-inflamatórias, as quais são produzidas por macrófagos ativados, como contribuintes para muitos dos sintomas da depressão.

Isto pode ser fundamentado pelo alto índice de depressão clínica relacionada ao tratamento com citocinas (ex: interferon gama, usado no combate a infecções e alguns tipos de câncer) que conduz ao modelo de depressão induzida por citocinas (RAISON et. al, 2005). Além disso, Filho (2014) verificou o aumento nos níveis de uma gama de citocinas (ex: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) em homens e mulheres depressivas, sendo restaurados aos níveis do controle após 12 semanas de terapia antidepressiva.

## 1.2 RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE E DEPRESSÃO

Os primeiros episódios de depressão são muitas vezes relacionados com um estressor psicossocial significativo. A exposição ao estresse crônico pode desencadear uma cascata de alterações neurobiológicas que podem propiciar mudanças em longo prazo ou permanentes nas respostas emocionais, fisiológicas e comportamentais que influenciam a suscetibilidade e a evolução de enfermidades (WEISS; POST, 1994; MCEWEN, 1998).

### 1.2.1 Fisiopatologia de resposta ao estresse

Os principais mecanismos envolvidos na resposta ao estresse envolvem o sistema nervoso autônomo (SNA) e o eixo Hipófise - Pituitária - Adrenal (HPA) (FILHO, 2014).

O SNA, subdividido em simpático e parassimpático, provocam alterações rápidas nos estados fisiológicos através da inervação dos órgãos alvos. Um exemplo é a liberação de noradrenalina, nas terminações dos nervos simpáticos, e adrenalina pela estimulação simpática das células da medula da glândula adrenal, que levam, por meio da inervação simpática, ao rápido aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial. Essa excitação do SNA pode ser diminuída rapidamente em razão do reflexo parassimpático, resultando em respostas de curta duração (ULRICH-LAI *et al.*, 2009).

Por outro lado, outro mecanismo importante no estresse, é a ativação do eixo HPA, que resulta na elevação dos níveis de glicocorticóides circulantes. A exposição ao estressor ativa os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo que secretam hormônios liberadores, como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH - do inglês *corticotropin-releasing hormone*). Esse, por sua vez, atinge a hipófise anterior promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH – do inglês *adrenocorticotropic hormone*), que vai atuar no córtex da glândula adrenal promovendo a síntese e liberação de glicocorticóides, como, por exemplo, do cortisol em humanos e do corticosterona em roedores (FILHO, 2014).

Diferentemente dos mecanismos simultâneos do sistema nervoso autônomo, a ação dos glicocorticóides, desencadeada pelo eixo HPA, ocorre dezenas de minutos após o início do estresse (ULRICH-LAI *et al.*, 2009). Eles obedecem a um ritmo pulsátil, de acordo com o ciclo circadiano, e atuam, principalmente, sobre os receptores de mineralocorticóides, os quais possuem grande afinidade pelos corticosteróides, sendo ocupados mesmo em níveis baixos. Já em situação de estresse, há uma explosão secretória, que ativa o receptor de glicocorticóide, estes receptores possuem dez vezes menos afinidade pelos corticosteróides, e só são ocupados diante desse grande aumento.

Após a ligação com seu receptor, os corticosteróides promovem a transcrição gênica no núcleo das células e, assim, influenciam na taxa de secreção de proteínas específicas, de acordo com o tipo de célula. Os glicocorticóides circulantes promovem a mobilização da energia e potencializam alguns efeitos do sistema nervoso simpático. Desempenham, também, um papel chave no controle da atividade do eixo HPA e na finalização da resposta ao estresse, através de uma realimentação inibitória em áreas cerebrais (JOELS; BARAM 2009).

Em pacientes depressivos, a concentração de glicocorticóides parece está frequentemente elevada, a qual caracteriza a disfunção no eixo HPA (NESTLER et al., 2002). Isto também leva à hiperatividade do sistema nervoso simpático e a hipertrofia das adrenais, causando uma diminuição nos níveis de catecolaminas, como a noradrenalina, adrenalina e dopamina na corrente sanguínea, e aumento dos níveis plasmáticos de cortisol.

Alguns estudos de imagem e ressonância magnética compararam pacientes deprimidos e pacientes saudáveis, neles foi observada a redução no volume do córtex pré-frontal e do hipocampo dos pacientes deprimidos, demonstrando que o estresse pode levar a atrofia e morte dos neurônios hipocampais e, também, a redução da neurogênese (GOULD et al., 1997; ONGUR et al., 1998; MACQUEEN et al., 2003; FILHO, 2014). Lembrando que o hipocampo e o córtex pré-frontal participam de funções de alta ordem como memória, aprendizado, atenção e impulsos, tomada de decisões, bem como desempenham um papel chave na modulação autonômica e endócrina de resposta ao estresse.

Nesse sentido, sugere-se que alterações funcionais nestas áreas parecem favorecer o desenvolvimento de transtornos mentais, como ansiedade e depressão. Além de mediar aspectos cognitivos da depressão decorrente do estresse, tais como deficiências de memória e sentimentos de culpa, desesperança e suicídio (CZEHet al., 2008; DREVETS, 2000; FILHO, 2014).

Como citado anteriormente, pacientes com depressão possuem uma hiperatividade do HPA que ao levar um aumento da ativação do sistema nervoso simpático desencadeia uma hiperativação da amígdala, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias a partir de macrófagos. Sintomaticamente, o resultado inclui fadiga, perda de apetite e libido, bem como a hipersensibilidade à dor (TSIGOS et al., 2002). Também podem levar a diminuição do suporte neurotrófico e a neurotransmissão monoaminérgica resultando em apoptose neuronal.

O estresse leva a depressão que tem como consequência uma desregulação imune central. Isso ocorre devido à ativação da micróglia, células responsáveis pela defesa no caso de lesão ou infecção, por meio de liberação de uma gama de moléculas que, dependendo do

estímulo inicial, podem ser tróficas ou citotóxicas. Assim, ocorre a liberação adicional de citocinas inflamatórias o que diminui a plasticidade celular (DUMAN; MONTEGGIA, 2006).

A partir das hipóteses apontadas, o sucesso da terapia antidepressiva estaria dependente da normalização dos processos inflamatórios e da regulação da sinalização monoaminérgica, entre outros fatores que são alterados pelo estresse (FEDERAL; PAMPA, 2014).

### ***1.2.1.1. Estresse oxidativo e mecanismos anti-oxidantes***

O estresse, atualmente, é um dos principais fatores que têm sido associados com a ocorrência de depressão. Embora o estresse agudo seja essencial para a sobrevivência dos seres vivos, a exposição prolongada a estímulos estressantes tem sido diretamente relacionada com o início e a progressão dos processos patológicos relacionado as vias oxidativas e desenvolvimento da depressão, como relatou os autores citados a cima. Esse processo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e das defesas antioxidantes, estabelecendo, assim, o “estresse oxidativo”, que culmina na produção excessiva de radicais livres. (TVEDE et al., 1993; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LIU; MORI, 1999; SARANDOL et al., 2007; MICHEL et al, 2007; MUNHOZ et al., 2008 NG et al., 2008).

A produção de radical livre (RL) é um termo aplicado a toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados, são produzidas durante o metabolismo basal das células aeróbicas e incluem moléculas radicalares, como o ânion superóxido e o radical hidroxila, ou não-radicalares como o peróxido de hidrogênio. Duas substâncias abundantes na natureza podem gerar radicais livres: o oxigênio no estado fundamental ( $O_2$ ) e o óxido nítrico (NO) (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 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Para detoxificar estas espécies reativas, o organismo possui um sistema de defesas antioxidantes formado por agentes capazes de, em baixas concentrações, retardar ou inibir significativamente a injúria de um substrato oxidável (HALLIWELL, 2001). Estes agentes antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos, dentre os quais se destacam a enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx), e não enzimáticos, como a glutathiona reduzida (GSH) (SIES, 1993).

A glutathiona reduzida (GSH, *L-γ-glutamyl-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, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta (GALLEANO; PUNTARULO, 1995; DENEKE; FANBURG, 1989).

Está onipresente nas células e possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo, por meio da metabolização da água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e de outros peróxidos de hidrogênio, de compostos xenobióticos, do ácido ascórbico ou como cofactor da glutathiona-peroxidase e glutathiona-S-transferase ou ainda na desativação de radicais. Atua também na manutenção da comunicação entre as células, na prevenção da oxidação dos grupos tiol presentes nas proteínas e no transporte do cobre intracelular. A mitocôndria e o núcleo têm a sua própria reserva de GSH, de importância crucial na proteção destas estruturas contra a ação das espécies reativas de oxigênio (HUBER et. al, 2008).

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 glutathionaredutase. A relação ideal GSH/GSSG (100:1) é mantida através desse mecanismo (MEISTER, 1989).

O fígado, é um importante marcador de combate ao estresse oxidativo, na busca da homeostase, sua degradação da GSH e GSSG nos seus aminoácidos ocorre ao nível extracelular de todas as células do corpo e é catalisada ao nível renal, numa reação catalisada pela  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase e pela cisteinil-glicina-dipeptidase (HUBER et. al, 2008).

Para a depressão, podemos apontar uma estreita relação com o estresse, a partir de evidências que apontam a presença de anormalidades nos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio e glutathiona reduzida (GSH) na atividade de enzimas antioxidantes como fatores cruciais no desenvolvimento da depressão (BILICI et al., 2001; KUMAR et al., 2011).

Estudos mostram uma relação entre a redução na concentração de plasmática de GSH observada nos principais transtornos psiquiátricos, documentado desde 1934 (MAES et al., 2011). Da mesma forma, Kodydková et al (2009) descreveu a redução de GSH no sangue de mulheres deprimidas, constatando uma significativa alteração na atividade das enzimas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas em pacientes deprimidos (BILICI et al., 2001; OZCAN et al., 2004; KUMAR et al., 2011).

Embora os mecanismos exatos de produção de substâncias oxidantes decorrentes do estresse psicológico e as lesões teciduais associadas aos efeitos oxidantes dessas substâncias ainda permaneçam obscuros, (LIU; MORI 1999; SANT'ANNA et al, 2003), sabe-se que o desequilíbrio entre oxidante e antioxidante (estresse oxidativo) desempenha um papel fundamental na produção de lesões induzidas pelo estresse em múltiplos órgãos e tecidos decorridos de estresse crônico (CAKIR et al., 2010; BARIS, et al 2010).

Uma das explicações para associação do estresse oxidativo a transtornos psiquiátricos se dá pela riqueza de ácidos graxos insaturados no sistema nervoso central (SNC), substratos passíveis de oxidação. Processo que ocorre pela peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), no qualos RL, dotados de elétrons desemparelhados, promove a remoção de um átomo de hidrogênio de um grupamento metileno (-CH<sub>2</sub>-), produzindo um novo radical (-CH•-). Sob condições aeróbicas, esse radical centrado no carbono combina-se com o oxigênio (O<sub>2</sub>) formando radicais peroxila (ROO•), que é capaz de extrair um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídio, estabelecendo assim a propagação da reação.

À medida que as reações em cadeia se processam, proteínas de transporte ou enzimas de membrana podem ser inativadas, alterando a homeostase (LLESUY, 2002). Além disso substâncias como ferro e cobre, que catalisam reações de oxidação e neurotransmissores são potencialmente oxidantes (HALLIWELL, 2006), somado ao alto consumo de oxigênio pela células neurais, fazem delas células carentes de defesas antioxidantes, o que resulta em destruição oxidativa dos neurônios e neurodegeneração (BENZIE, 1996; LLESUY, 2002; FREITAS et al., 2014).

Essa teoria, de associação do estresse oxidativo a depressão, se fundamenta em estudos que usaram antidepressivos clássicos (ex: fluoxetina) para verificar suas propriedades antioxidantes. Alguns trabalhos forneceram evidências de que os efeitos cumulativos antioxidantes promovidos por diferentes classes de antidepressivos representam um mecanismo universal de ação antidepressiva (LI et al., 2000; KOLLA et al., 2005). Em vista disso, tem sido alvo de interesse de muitos pesquisadores a busca por novos compostos que possuam atividade biológica antioxidante com o mínimo de toxicidade e efeitos adversos (KUMAR et al., 2011; FREITAS et al., 2014).

### ***1.2.1.2. Inflamação***

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 (DENTINO et al., 1999; PARIANTE; PEARCE, 1999; KOP et al., 2002; SUAREZ; KRISHNAN; LEWIS, 2003; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009; MILLER; HARRY; KRAFT, 2012).

A neuroinflamação desempenha um papel importante na patogênese da isquemia cerebral, caracterizada pelo recrutamento tempo-dependente da micróglia, como citado anteriormente, a infiltração de vários tipos celulares inflamatórios para o local afetado e produção de mediadores pró-inflamatórios.

Crescentes evidências demonstram o papel da mieloperoxidase (MPO) como participante central do elo na inflamação pela reação com peróxido de hidrogênio. É responsável pela geração de ácido hipocloroso, ele gera produtos secundários (radicais livres e substâncias oxidantes difusíveis) com amplas ações biológicas, atividade antimicrobiana (bactericida) e pró-inflamatória, oxidação de compostos endógenos (alguns medicamentos e toxinas) e, também, dano oxidativo ao hospedeiro, podendo levar a apoptose. Esta diretamente associada a processo inflamatório vigente (ROMAN et. al, 2008; CRUZ; CAMPA, 2009).

Esta enzima é encontrada em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica. Possui uma proteína lisossomal armazenada nos seus grânulos e um pigmento heme, que causa a sua cor verde em excreções ricas em neutrófilos. Os grânulos intracelulares azurófilos de neutrófilos, tem sido usada com sucesso como um marcador bioquímico de recrutamento destas células no pulmão e no miocárdio isquêmico. A dosagem de MPO correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação. É uma técnica que possibilita demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (THIRU et. al, 1995; CRUZ; CAMPA, 2009).

Estudos recentes apontam os prováveis mecanismos pelos quais a mieloperoxidase é capaz de promover oxidação de lipoproteínas. Macrófagos utilizam NADPH oxidase para produzir superóxido ( $O_2^-$ ) que pode dismutar e formar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A MPO catalisa reações com  $H_2O_2$  para gerar oxidantes citotóxicos mais potentes como HOCl (ácido hipocloroso) e radical tirosil, sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCl. Por meio de ensaios de alta sensibilidade e especificidade, diversos produtos finais estáveis gerados por essas espécies têm sido detectados. Além de marcadores da atividade da MPO, sua importância clínica se dá por promover dano oxidativo (ROMAN et. al, 2008).

### 1.3 MODELO EXPERIMENTAL NO DESENVOLVIMENTO DA DEPRESSÃO

A depressão é fortemente influenciada por eventos estressantes e traumáticos ao longo da vida, sugerindo que pacientes deprimidos devam ter prejuízos em estratégias de lidar com situações aversivas (KLOET et al., 2005). Devido a isso, a maioria dos modelos depressivos é baseada na exposição do animal a uma variedade de estressores.

Atualmente, modelos de estresse estão baseados em estresses fortes, moderados ou a combinação dos dois, além de estresses repetidos ou variados (imprevisíveis), por um período ininterrupto (no mínimo três semanas e no máximo seis semanas). Os modelos de estresse crônico parecem serem mais apropriados para modelos de depressão comparados a outros modelos. Além disso, estresse crônico e frustração crônica comumente induzem alterações neurobiológicas, as quais podem levar à depressão (WILLNER, 1997).

Uma exposição prolongada ao estresse psicológico pode incrementar o aparecimento de doenças em decorrência do aumento da produção de oxidantes e o do desenvolvimento de lesões oxidativas (LIU; MORI 1999). Com base nesta observação, o modelo animal de estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS – do inglês Chronic unpredictable mild stress) foi desenvolvido para simular um comportamento denominado "anedonia", comportamental similar à perda de interesse ou prazer apresentada por humanos com sintomas de melancolia, diagnosticados como portadores de depressão (LIU et al, 2014; WILLNER et al , 2005).

### 1.4. RELAÇÃO ENTRE DEPRESSÃO E HEPATOPATIA

Como uma afecção multifatorial, a depressão possui uma complexa interação de fatores sociais, psicológicos e biológicos. Havendo, assim, estudos que mostram uma inter-relação muito próxima entre a depressão e patologias físicas. Síndromes metabólicas ou afecções de órgãos, como doenças cardiovasculares, podem comprometer a saúde mental e levar a depressão (OMS, 2012).

A depressão acomete as pessoas independentemente de suas idades, etnias e classes socioeconômicas, trazendo prejuízos na qualidade das relações interpessoais, podendo apresentar comorbidade com outras doenças psiquiátricas e neurológicas, como ansiedade e doença de Parkinson ou desencadeando o desenvolvimento de afecções de órgãos específicos, como hepatopatias (GOTLIB; JOORMANN, 2010; BRHLIKOVA et al., 2011; YOUSSEF et al., 2013).

Poucos estudos trazem uma relação direta de alteração de transaminases e distúrbio depressivo, apesar da correlação clínica. Isso se justifica, talvez, pela alta sensibilidade dessas enzimas e pela baixa associação entre o grau de lesão hepatocelular relacionada ao nível alterado de aminotransferases, a necrose em si não é necessária para se observar essas alterações. Estas enzimas são liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade. Assim, a elevação absoluta das aminotransferases tem grande significado diagnóstico, e não prognóstico, nas hepatopatias agudas (PAKNEJAD et. al, 2006).

Já os estudos clínicos apontam para uma relação substancial de causa e consequência entre depressão e hepatopatia. Youssef et al. (2013) e alguns outros poucos autores, por exemplo, descreveram a gravidade da depressão e ansiedade estava associada ao grau de lesão hepática. Para comprovação da hipótese, investigaram 567 pacientes com o diagnóstico histológico de esteatose hepática não-alcoólica. Nesse estudo, os pacientes apresentavam depressão subclínica (53%) ou clínica (14%). Os pesquisadores concluíram que a depressão estava positivamente associada à degeneração hidrópica (balonosa) dos hepatócitos (ELWING, et. al, 2006; SURDEA-BLAGA; DUMITRAȘCU, 2011).

Fukudo et al. (1989) estudaram o impacto dos distúrbios emocionais sobre o fígado e concluíram, que os transtornos do estresse psicológico e do humor estavam associados à maior gravidade das doenças hepáticas. Ainda verificaram uma correlação significativamente positiva entre o grau de lesões hepáticas (fibrose lobular, infiltração de células inflamatórias e necrose) ao estresse psicológico.

Outros estudos, por outro lado, mostraram uma associação entre doença hepática gordurosa / não alcoólica com o aumento da prevalência de transtornos do humor (ELWING et al, 2006; WEINSTEIN et al, 2011). Uma possível explicação é a forte ligação da doença hepática gordurosa / não alcoólica com a resistência à insulina e diabetes mellitus, ambos frequentemente associados com os sintomas da depressão e da ansiedade (KOSLOW et al., 1982; WINOKUR et al., 1988; ANDERSON et al., 2002). A relação inversa também pode explicar essa associação, níveis aumentados de cortisol, epinefrina e citocinas pró-inflamatórias encontrados em pacientes com o transtornos do humor já foram descritos relacionados com doença hepática gordurosa / não alcoólica (MAES et al., 1998; MILLER et al., 2003; PENNINX et al., 2003). Um grande problema apontado durante estas pesquisas foi a escassez de literatura sobre a temática.

## 1.5. MEDICINA TRADICIONAL CHINESA (MTC)

A Medicina Tradicional Chinesa (MTC) é a denominação usualmente dada ao conjunto de práticas de medicina tradicional em uso na China, desenvolvidas no curso de sua história, com escritos que datam até dois mil anos antes de Cristo. Tem por princípio básico o equilíbrio, que se dá pela teoria da energia vital do corpo (*chi* ou *qi*) que circula pelo corpo através de canais, chamados de meridianos, os quais teriam ramificações que os conectariam aos órgãos (CHUNG et. al, 2007) .

Foi desenvolvida empiricamente a partir da experiência clínica. Ela inclui entre seus princípios o estudo da relação de yin/yang, da teoria dos cinco elementos e do sistema de circulação da energia pelos meridianos do corpo humano, tendo como base o reconhecimento das leis fundamentais que governam o funcionamento do organismo humano e sua interação com o ambiente (CHONGHUO, 1993).

### 1.5.1. Relação do fígado com a depressão para a MTC

Para a Medicina Tradicional Chinesa (MTC) a depressão esta associada a deficiência, quando simplesmente não existe energia suficiente para sentimentos positivos; ou com estagnação, quando existe energia, mas o fluxo de energia e das emoções está bloqueada. A depressão também pode estar associada com o excesso, como na depressão maníaca, ou com a irregularidade, como no caso de depressão acompanhada de ansiedade (ROSS, 2003).

Assim a depressão pode ser dividida de acordo com suas características. Para isso existem cinco tipos de depressão segundo a MTC, água, terra, fogo, metal e madeira. Seus sintomas estão associados a desordem de algum órgão e geram sintomas específicos (MACIOCIA, 1996).

A análise do fígado (*gan*), por exemplo, relacionado com a depressão do tipo madeira, caracteriza-se por indivíduos com uma rotina extenuante e que subitamente perdem a motivação e a direção, por terem tido, por algum motivo (geralmente o fracasso) forçado a abandonar uma ação muito desejada e assim perdem o sentido de viver. Emoções associadas a depressão mental prolongada podem enfraquecer o fígado de forma a torná-lo incapaz de estimular o fluxo livre de energia, levando a distúrbios hepáticos e diminuição da resistência às infecções. Assim, sentimentos como frustração e a raiva podem, também, resultar em alterações hepáticas (YOUSSEF et al 2013).

O fígado, entre outros órgãos, está relacionado às atividades emocionais, especialmente a depressão e a raiva. Ele tem como função controlar o humor. A disfunção do

fígado geralmente é acompanhada de alterações emocionais, tais como depressão e irritação (MACIOCIA, 1996).

Os outros elementos estão associados a desordem em outros órgãos, assim temos que depressão água, esta relacionada ao rim e a bexiga e tem como característica o medo, a terra, esta relacionada ao baço-pâncreas e ao estômago e tem como desordem a reflexão, ao fogo, esta relacionado ao coração e ao intestino delgado tem como desordem a alegria e o metal, cujos órgãos que se relacionam são o pulmão e o intestino grosso e caracteriza-se pela tristeza. Assim como visto na depressão madeira, os elementos indicam os sinais relacionados a desordem dos órgãos e norteiam a terapêutica a ser aplicada (ROSS, 2003).

### **1.5.2. Acupuntura**

Não é possível estabelecer uma data precisa para o surgimento da acupuntura. 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. se tornou base para a 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 dois 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 foi ratificada pela Associação Médica Brasileira (AMB) em 1998 (HONG, 2005).

A acupuntura manual (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

denominados acupontos (JAGGAR, 1992; SCHOEN, 1993). Consiste na aplicação de agulhas em pontos definidos do corpo, chamados de "Pontos de Acupuntura" ou "Acupontos" que se distribuem principalmente sobre linhas chamadas "meridianos chineses" e "canais", para obter diferentes efeitos terapêuticos conforme o caso tratado (MAO-LIANG, 2001).

### **1.5.2.1 Acuponto**

Para a MTC, os acupontos são determinados por meridianos. Estes são conhecidos como "canais de energia", utilizados na acupuntura e outros métodos terapêuticos da medicina tradicional chinesa. Através de estímulos em determinados pontos do meridiano, pode-se reequilibrar as energias do corpo e de órgãos.

Para a descrição anatômica ocidental o acuponto é definido como um ponto da pele de sensibilidade espontânea ao estímulo e à resistência elétrica reduzida. Possui um diâmetro de 0,1 a 5 cm, entretanto é uma área de condutividade elétrica amplamente aumentada comparada às áreas da pele ao redor (TAFFAREL, 2009). Estes estão localizados próximos a articulações e bainhas tendíneas, vasos, nervos e septos intramusculares, na ligação músculo-tendínea, nos locais de maior diâmetro do músculo e nas regiões de penetração dos feixes nervosos da pele (DRAEHMPAHEL; ZOHMANN, 1997). Quando um ponto de acupuntura é puncionado, ocorre sensação de parestesia elétrica ou calor. Essa sensação é denominada como *De Qi*. Os animais demonstram essa sensação com um leve repuxo de pele, uma discreta sonolência ou um breve tremor de cauda (HWANG & EGERBACHER, 2006).

Chan em 1984, concluiu que muitos dos pontos de Acupuntura correspondem a locais de penetração das fibras nervosas na fáscia muscular, 309 pontos estão localizados sobre terminações nervosas e 286 pontos localizados sobre os principais vasos sanguíneos, rodeados pelos *Nervi vasorum*, a inervação própria dos vasos sanguíneos. Alguns pontos de Acupuntura correspondem aos pontos gatilhos (*Trigger points*, em inglês), que são pontos localizados na musculatura, sensíveis ao toque e que condicionam o surgimento de sintomas à distância, como dores de cabeça, por exemplo.

Na escolha dos acupontos para o tratamento do fígado relacionado a um estado depressivo, a escolha do acuponto E36 (*Zusanli*), de acordo com os conceitos da Medicina Tradicional Chinesa, é utilizado e descrito na literatura por terem efeito nos estados emocionais e aliviarem os sintomas da ansiedade e de depressão. Outro acuponto relacionado a depressão é o VB34 (*Yanglingquan*) que se correlaciona com deficiência do sangue (*xue*) do fígado, este apresenta diagnóstico ocidental de episódio depressivo grave sem sintomas

psicóticos e ansiedade generalizada (COSTA; PEREIRA, 2012). O uso da R3 (*Taixi*) pode potencializar o efeito desejado pela acupuntura nesses pontos, com o mecanismo de liberação de fluxo de energia.

Baseado nisso, Yun-Kyounget al. (2006) demonstraram que a aplicação da acupuntura manual no acuponto VB34 (*Yanglingquan*) reduz a toxicidade por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), protegendo o tecido hepático. O uso clínico desse acuponto também demonstrou benefícios para tratamento da icterícia, hepatite aguda, doenças biliares, cirrose do fígado e hipertensão (ROSS, 2003).

Por outro lado, o ponto E36 (*Zusanli*) é usado, clinicamente, para fortalecimento dos processos mentais. A estimulação desse acuponto está associada a melhora dos processos mentais associados às deficiências energéticas do organismo como na depressão, propiciando força e segurança necessárias para a liberação dos bloqueios emocionais (ROSS, 2003).

#### **1.5.2.2. 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 desencadeia uma resposta inflamatória localizada, como citado acima, estimulando a reparação tecidual (KARIME, 2006).

Alguns efeitos da eletroacupuntura foram demonstrados por Siu, Lo e Leung (2005), cujo aumento da expressão de tioredoxina nos cérebros isquêmicos de ratos, minimizando as alterações oxidativas dos grupos tiol das proteínas adjacentes à lesão. Silva et al. (2011) trouxe que, em ratos, 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 e ketamina no rim e no fígado de animais anestesiados. O pré-tratamento com EAc foi capaz de atenuar a resposta inflamatória e a lesão renal e hepática induzidas por lipopolissacarídeos (GU et al., 2011).

Wang et al. (2009) e Zhao et al. (2008) trazem, então, a estimulação com eletroacupuntura de baixas frequências, menores do que 5 Hz, promovem a liberação de metaencefalinas na medula espinal, com estimulação de fibras "A $\delta$ ". As frequências altas, maiores do que 100 Hz liberam dinorfina na medula espinal e estimulam principalmente

fibras C e, frequências mais altas, ao redor de 200 Hz, estimulam analgesia relacionada com serotonina e noradrenalina.

### **1.5.5 Efeitos da acupuntura no processo inflamatório, no sistema anti-oxidante e na resposta ao estresse**

O processo inflamatório pode ser definido como a reação do tecido vivo vascularizado a um agressor local (COTRAN et al., 1994) e, independente de sua causa, o processo inflamatório se caracteriza por uma série de reações, cuja complexidade das alterações bioquímicas, morfológicas e funcionais regulam o processo, na maioria das vezes, de homeostase.

No processo inflamatório há ativação de neurônios sensitivos periféricos, que transmitem sinais aferentes, respondem à estimulação elétrica ou estimulação química com um reflexo axônico local desencadeando a liberação de potentes peptídeos vasoativos na área inervada. A inflamação neurogênica é causada pela excitação de fibras aferentes primárias do tipo C e liberação de mediadores em suas terminações periféricas, levando à contração de musculatura lisa, aumento na permeabilidade vascular, recrutamento de células inflamatórias, degranulação de mastócitos e estimulação de secreção mucosa (SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA, 2001).

Na acupuntura, onde há um elemento agressor, o mecanismo desencadeado é diferente. Dentro do conhecimento atual de fisiologia, esse método estimula receptores específicos, com efeitos de modulação da atividade neurológica em três níveis – local, espinhal ou segmentar, e supra-espinhal ou suprasedgmentar.

Já em 1985, Wang relatou que a aplicação de agulhas de acupuntura estimulava fibras nervosas específicas e que as sensações produzidas pelo estímulo por acupuntura correspondem àquelas experimentadas pelo estímulo das fibras nervosas do tipo A delta ( $A \delta$ ), como choque, sensação de peso ou parestesia.

Ação segmentar da Acupuntura é o conjunto de mecanismos fisiológicos que ocorrem do local do estímulo com agulha até a medula espinhal. Compreende-se esse segmento como um dermatomo ou zonas de organização reflexa do sistema nervoso periférico. O estímulo de fibras nervosas " $A \delta$ " por agulhas de Acupuntura ativa o interneurônio inibitório, ou célula pedunculada, na lâmina II do corno posterior da medula espinhal. A célula pedunculada, com a liberação de metencefalina, bloqueia, na área conhecida como Substância Gelatinosa, a transmissão do sinal da dor conduzido pelas fibras tipo "C" para os tratos ascendentes da medula. Por outra via ascendente, o trato espinotalâmico, o estímulo da fibra " $A \delta$ " é

conduzido ao Córtex cerebral, onde são interpretadas, ou "percebidas" como sensação de parestesia que ocorrem durante o estímulo por acupuntura (NAKANO; YAMAMURA, 2010)

O estímulo das fibras "A  $\delta$ " prossegue através do trato espinotalâmico até o córtex cerebral, onde é percebido conscientemente e à medida que segue neste trajeto, há colaterais para os diversos níveis da medula espinhal, com liberação de Beta-endorfina, um dos tipos de morfina do próprio organismo, e afetando vias neurológicas descendentes que terminam por reforçar a estimulação da célula pedunculada, com efeito analgésico sobre o estímulo das fibras tipo C, e que usam o neurotransmissor serotonina, o chamado "Hormônio do bem-estar", o que explica bem os efeitos da acupuntura não só no tratamento da dor, como também da depressão e dos estados de ansiedade.

O estímulo da agulha de acupuntura atinge áreas do encéfalo mais elevadas, como o hipotálamo e a hipófise, promovendo o equilíbrio do funcionamento destes centros. Como a hipófise é uma glândula, ocasionalmente chamada de glândula mãe, que coordena a função de diversas outras glândulas do corpo, o efeito da acupuntura sobre este órgão afeta o funcionamento das glândulas supra renais, da tireóide, dos ovários, dos testículos, e assim tem ação terapêutica sobre a hipertensão arterial, dismenorréia, tensão pré-menstrual, disfunções da libido, e outras patologias.

Assim, sugerem que a acupuntura pode ter efeitos diretos na regulação periférica da liberação de mediadores do processo inflamatório e da dor, levando a uma redução da liberação periférica de substância P (SP), pró-inflamatória (CHIANG et al, 1973; MELSZACK et al, 1977).

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 glutatona peroxidase (GSH-Px).

Além disso, do efeito analgésico mais conhecido e estudado, a acupuntura pode ter efeito neuroregenerador (KIM et al., 2003) e neuroprotetor (JANG et al., 2003). A estimulação do ponto *Zusanli* (E36) é capaz de aumentar a proliferação celular no giro denteado (KIM et al., 2003), diminuir a expressão de c-Fos, marcador neural de nocicepção, e a apoptose no hipocampo após isquemia causada por oclusão das carótidas (JANG et al., 2003). Além disso, a acupuntura também se mostrou efetiva nas alterações plásticas induzidas por estresse.

A estimulação do ponto *Zusanli* aumentou a expressão de fatores neurotróficos no hipocampo de ratos submetidos ao estresse de imobilização. Além dos efeitos já citados, estudos experimentais apontam que a acupuntura pode diminuir as respostas de estresse, e regularizar respostas autonômicas (TEIXEIRA, 2010).

Recentes pesquisas neurofisiológicas sobre o mecanismo de ação da analgesia por acupuntura trouxeram grandes subsídios ao entendimento do modo de ação geral da acupuntura. Postulam que, a ativação destas fibras propaga para o mesencéfalo ações como a ativação de vias descendentes de inibição da dor; a liberação do hormônio corticotrófico (ACTH) e de endorfinas pelo sistema hipotálamo-hipófise e a liberação de neuromediadores como a serotonina, noradrenalina, acetilcolina e dopamina no encéfalo (ZHAO, 2008).

Estes três fenômenos vão resultar não somente na inibição ou supressão da transmissão da dor como também na diminuição da associação da característica aversiva ao fenômeno nociceptivo. Por outro lado, a liberação de diferentes neuromediadores como a serotonina, noradrenalina, acetilcolina e dopamina pelo estímulo acupuntural pode ser relacionado não só aos efeitos analgésicos da acupuntura mas também a diversos outros efeitos encefálicos (WANG et al., 2008).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos nos efeitos induzidos pela acupuntura estão relacionados com intensidade, duração e frequência do estímulo acupuntural. A baixas frequências liberam encefalina por todo sistema nervoso central e  $\beta$ -endorfina no cérebro, sendo inibidas por naloxona, um antagonista opióide específico, enquanto que as frequências mais altas liberam dinorfina na medula espinhal (FILHO, 2014).

## 1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Diante da heterogeneidade da resposta clínica aos antidepressivos e susceptibilidade aos efeitos adversos (TRIVEDI et al., 2006), surge, no estudo da acupuntura e eletroacupuntura, a importância da investigação de novos agentes terapêuticos para tratar a depressão e suas comorbidades.

Considerando que a depressão tem efeitos deletérios sobre o fígado, a avaliação dos possíveis efeitos protetores da acupuntura/electroacupuntura sobre o estresse oxidativo e a inflamação no fígado de ratos submetidos ao Estresse Moderado Crônico (EMC), um modelo experimental de depressão, confere o ineditismo desta pesquisa.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos modulatórios da acupuntura e eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo agudo e a inflamação induzidos por depressão experimental no fígado de ratos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o estresse oxidativo a inflamação hepática em ratos Wistar experimentalmente deprimidos.
- Avaliar os possíveis efeitos hepatoprotetores da acupuntura e da eletroacupuntura em ratos Wistar experimentalmente deprimidos.

### 3 MÉTODO

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO E AMOSTRA

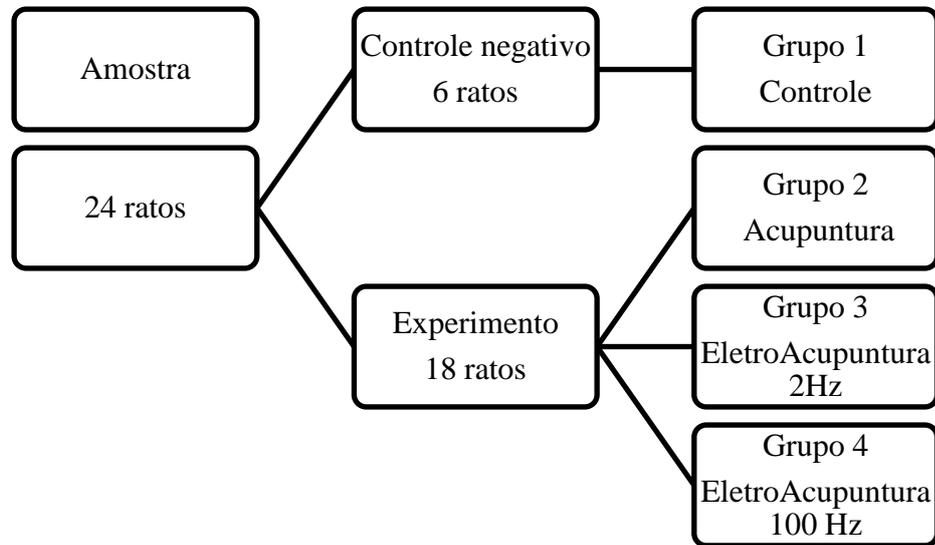
Trata-se de um estudo prospectivo, controlado e comparativo entre quatro grupos de ratos Wistar submetidos ao estresse moderado crônico durante seis (6) semanas, para o desenvolvimento de um quadro depressivo. Foram utilizados 24 ratos, com idade de 12 a 16 semanas, machos (*Rattus norvegicus*: var. *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. 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. 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 exame 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.

#### 3.2 DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA

Vinte-e-quatro (24) ratos foram aleatoriamente distribuídos 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.

Para melhor compreensão do desenho do experimento, optou-se por realizar um grupo controle negativo, o qual recebeu todos os estressores que os demais grupos, mas não foi submetido a tratamentos já comprovados na literatura.

Figura 1 - Desenho do experimento



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

### 3.3 INDUÇÃO DA DEPRESSÃO

A depressão foi induzida utilizando-se um protocolo validado por estudos disponíveis na literatura médica denominado Estresse Moderado Crônico (EMC) (WILLNER; MUSCAT; PAPP, 1992; KONKLE, et al., 2003; WILLNER, 2005). O protocolo EMC usado é uma versão modificada do protocolo EMC (WILLNER, 2005) e consiste, basicamente, na aplicação de estressores moderados, de modo aleatório, apresentação de diferentes tipos de estressores é essencial para a indução de depressão experimental, durante 6 semanas, período máximo, segundo a literatura: confinamento em um espaço restrito por 2 horas, inclinação da gaiola durante 4 horas, habitação em cama úmida durante 8 horas, privação de alimentos durante 12 horas seguida por exposição de comida inacessível para os animais durante 1 hora, jejum hídrico durante 12 horas 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 (Quadro D1, Apêndice D). Este modelo parece simular melhor a condição do ambiente humano, principalmente pela exposição do indivíduo a estressores diários moderados e variados do que a eventos traumáticos.

### 3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os modelos animais experimentais de depressão representam uma valiosa ferramenta de estudo dos aspectos neurobiológicos da depressão, como também para a pesquisa de novas alternativas terapêuticas na depressão e ainda, os mecanismos de ação pelos quais exercem seus efeitos (WILLNER, 1997).

Embora humanos e roedores apresentem diferenças marcantes na anatomia encefálica, diversos circuitos que regem respostas comportamentais e fisiológicas, estão conservados entre estas espécies (CRYAN; HOLMES, 2005). Por meio de inferências baseadas em achados provenientes de modelos animais, podem-se elucidar comportamentos, vias neurais e fatores genéticos relacionados ao transtorno depressivo e aperfeiçoar o entendimento do comportamento humano frente à doença.

Existe uma hipótese de que algumas espécies de animais podem, através dos testes, exibir alterações de comportamento do tipo depressivo (do inglês depressive-like), ou seja, parecido com alguns comportamentos apresentados pelos humanos. Em geral, nos testes os animais são expostos a um evento estressante inescapável e o comportamento deste animal frente a esse evento é avaliado (FILHO, 2014).

Paradigmas que empregam a exposição ao estresse agudo ou subcrônico incluem teste de nado forçado, que empregam a exposição em curto prazo ao estresse inevitável e incontrolável e podem prever a resposta dos animais a um tratamento. Outro modelo amplamente empregado no teste de roedores é o teste de preferência a sacarose (FILHO, 2014).

#### 3.4.1 Teste de Preferência da Sacarose (TPS)

O SPT explora o componente da anedonia relacionado com a depressão. Este sentimento comum em indivíduos deprimidos caracteriza-se pelo desinteresse por atividades anteriormente prazerosas, como o consumo de substâncias adocicadas. Animais anedônicos não apresentam preferência por nenhuma das garrafas. A similaridade do componente anedônico pode ser comparável ao ser humano o que torna o modelo de preferência por sacarose bastante válido (PENG et al., 2008)

O TPS foi realizado em 3 diferentes intervalos de tempo: TPS1, realizado no dia zero, 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 de ofertade 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)

O TPS explora o componente da anedonia relacionado com a depressão. Entre os pacientes depressivos é muito comum o sentimento de anedonia, em que os indivíduos se mostram desinteressados por atividades anteriormente prazerosas. A metodologia do teste é variável, mas consiste basicamente em colocar os animais em caixas individuais com água e solução de sacarose à disposição e medir a preferência por solução doce em relação ao total da ingestão de líquido. Animais anedônicos não apresentam preferência por nenhuma das garrafas, sendo a preferência resgatada por tratamento crônico, mas não agudo, com antidepressivos. A similaridade da latência para o efeito do tratamento e o componente anedônico a ser comparável ao ser humano tornam o modelo de preferência por sacarose bastante válido (PENGet al., 2008).

### **3.4.2 Teste de natação forçada**

O teste de natação forçada (TNF) é amplamente utilizado para a medição do comportamento depressivo em roedores. Proposto por Porsolt e colaboradores, em 1977, neste teste os roedores são expostos a uma situação aversiva, nadar em um tanque cilíndrico com água, onde eles não podem tocar o fundo do cilindro ou fugir (escape). Esses animais, quando expostos a uma situação de estresse (risco de afogamento), apresentam uma reação natural (tentativa de fuga) realizando intensa atividade física. Depois de 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, 1997).

O teste foi realizado em dois momentos, após a exposição aos estressores e antes do início do tratamento, a fim de comprovar a eficácia da aplicação dos estressores, e um posterior, para avaliar a eficácia do tratamento. Esses momentos foram antecedidos por um teste de adaptação (pré-teste) que também foi comprobatório de anedonia, e, por isso, usado para os dados estatísticos.

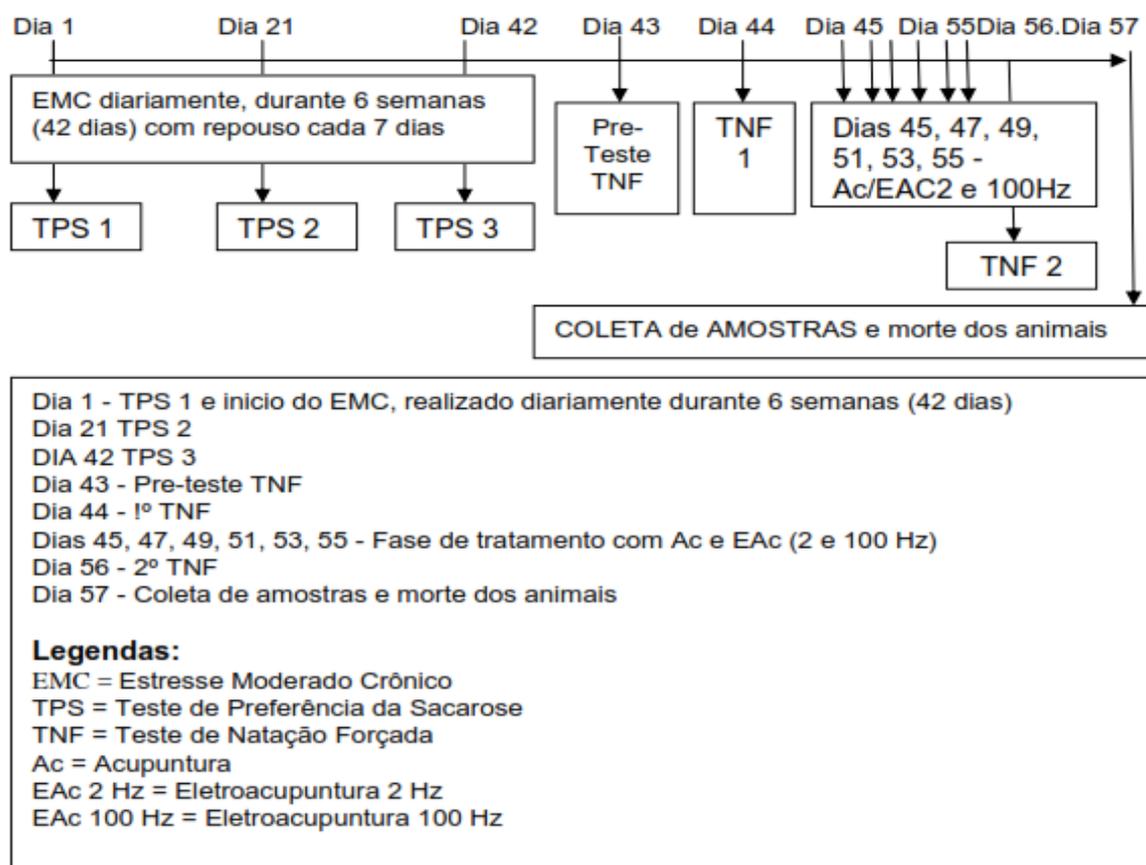
A hipótese que justifica o comportamento animal é baseada na ideia de que o animal “perde a esperança de escapar” de tal situação, em outras palavras a falta de persistência em escapar é percebida como uma desistência e refletida em tempo de imobilidade descrito como um estado depressivo (THIERRY et al., 1984).

O tratamento tem como objetivo reverter esse quadro diminuindo assim o tempo de imobilidade fazendo com que o animal não desista de escapar das situações impostas a ele.

### 3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

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

Figura 2 - Delineamento do experimento



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

### 3.6 CONDICIONAMENTO DOS RATOS

Os animais foram condicionados em redes artesanais, criadas, adaptadas e previamente testadas para a realização de acupuntura em ratos. Esse método pareceu ser mais eficaz do que o uso de anestésico para aplicação das agulhas de acupuntura, como observada em estudos anteriores, pois o mesmo poderia desencadear viés a pesquisa. Para que os animais pudessem permanecer nas "redes", durante os tratamentos, todos os ratos foram colocados nos dispositivos, permanecendo em repouso durante 20 minutos (Figura 3).

Figura 3 - Rato posicionado na rede para aclimação (preparo para o procedimento de Acupuntura e Eletroacupuntura)



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

### 3.7 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. Em um estudo mais completo foi mapeado 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. O VB34 se localiza, no homem, na depressão anterior e inferior da cabeça fibular; transitam, nessa região, os ramos laterais do nervo sural cutâneo e o ramo profundo do nervo fibular. O acuponto *Yanglingquan* (VB34): está localizado na depressão anterior e inferior à cabeça da fíbula, no rato (MARTINS; GARCIA, 2003; SANTOS, 2013).

### 3.7.1 Protocolo de aplicação da Acupuntura / Eletroacupuntura

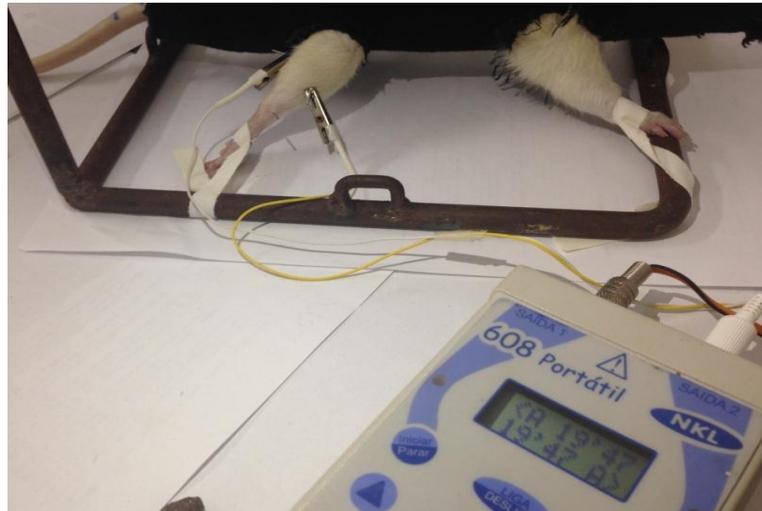
Para a realização da Ac (G2) agulhas metálicas de aço inoxidável, descartáveis, de 0,18 mm de diâmetro / 8 mm de comprimento (modelo DCB 132, fabricadas na China e distribuídas no Brasil por DongBang Produtos de Acupuntura -EPP, São Caetano do Sul – SP) foram inseridas no membro pélvico direito, no ponto relacionado ao fígado e em mais dois pontos que potencializam o efeito anti-depressivo. Os pontos escolhidos foram: no ponto *Zusanli* (E-36) e nos pontos *Yanglingquan* (VB-34) e Taixi (R-3), este último como ponto de controle. As agulhas foram retiradas após 20 minutos. 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. 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 - Rato posicionado na rede para sessões de Acupuntura - Agulhas inseridas



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Figura 5- Rato posicionado na rede para as sessão de EAc - agulhas inseridas e conectadas ao eletroestimulador



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

### 3.8 COLETA DE AMOSTRAS

No dia seguinte ao término dos tratamentos procedeu-se a coleta das amostras. Para tanto os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 25mg/Kg peso com administração Intraperitoneal, para coleta de sangue arterial (3,0 ml) e do fígado, ambos os lóbulos. O fígado removido foi lavado em soro fisiológico gelado, pesados e medidos, sendo o lóbulo direito reservado para exames bioquímicos e o esquerdo para exames histopatológicos. Após a coleta todos os ratos foram mortos por dose triplicada (overdose) de anestésico.

### 3.9 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  $-70^{\circ}$  para posterior análise de parâmetros bioquímicos (Alanino Aminotransferase/ Transaminase glutâmico pirúvica (AST/TGP), Aspartato aminotransferase/ transaminase Glutâmico oxalácetico (ALT/TGO) ; dialdeído malônico ou malonaldeído (MDA), glutatona reduzida (GSH)). Do lóbulos direito foi removido um fragmento (cerca de 125 mg de tecido hepático) que foi utilizado para a dosagem de mieloperoxidase (MPO) e o restante (aproximadamente 125 mg) do fígado foi homogeneizado em tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0). O homogeneizado foi

centrifugado a 700 rotações /min durante 10 minutos a 4 ° C e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de MDA e de GSH.

### **3.9.1 Avaliação da peroxidação lipídica e quantificação de dialdeído malônico (MDA)**

O dialdeído malônico (MDA) é produto final da peroxidação dos lipídeos, é um metabólito da lipoperoxidação que exprime indiretamente a ação dos radicais livres no soro, servindo na avaliação do estresse oxidativo. A técnica tem por objetivo quantificar o dialdeídomalônico (MDA) formado na peroxidação lipídica.

O procedimento acontece pela extração deste composto usando um solvente orgânico (n-butanol), determinando-se a concentração de MDA que é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido (ácido tiobarbitúrico), originando um composto de cor rosa. A concentração de MDA pode ser expressa por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

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. O aumento do teor de MDA esta relacionado comelevada quantidade de espécies reativas de oxigênio o que caracteriza o estresse oxidativo. Assim como sua diminuição relaciona-se com a redução de radicais livres.

As amostras dos tecidos (fígado), foram lavadas com soro fisiológico gelado (4° C) para remover quaisquer vestígios de sangue, pesadas e estocadas a -70°C imediatamente após a coleta. Posteriormente, 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 ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 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 absorbância 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.

### **3.9.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH)**

A glutathiona está onipresente nas células, possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo, por meio da

metabolização da água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e de outros peróxidos de hidrogênio, de compostos xenobióticos, do ácido ascórbico ou como cofactor da glutatona-peroxidase e glutatona-S-transferase ou ainda na desativação de radicais. Atua também na manutenção da comunicação entre as células, na prevenção da oxidação dos grupos tiol presentes nas proteínas e no transporte do cobre intracelular. A mitocôndria e o núcleo têm a sua própria reserva de GSH, de importância crucial na proteção destas estruturas contra a ação das espécies reativas de oxigênio (HUBER et. al, 2008).

Por ser sintetizada no fígado, se faz um importante marcador de combate ao estresse oxidativo, na busca da homeostase, sua degradação da GSH e GSSG nos seus aminoácidos ocorre ao nível extracelular de todas as células do corpo e é catalisada ao nível renal, numa reação catalisada pela  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase e pela cisteinil-glicina-dipeptidase (HUBER et. al, 2008).

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, cuja preparação dos reagentes encontra-se no Apêndice B. A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412nm em espectrofotômetro (Beckman DU-640, Fullerton, Califórnia).

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.

### **3.9.3 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)**

A enzima mieloperoxidase (MPO), presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica, tem participação em diversos processos fisiológicos e deletérios. Ela é responsável pela geração de ácido hipocloroso e também pela oxidação de compostos endógenos, alguns medicamentos e toxinas. Além de ser um importante agente bactericida (CRUZ; CAMPA, 2009). Os produtos primários da ação de MPO, o ácido hipocloroso gera

produtos secundários com amplas ações biológicas em eventos como apoptose, ela está diretamente associada a processo inflamatório virgente. Possui uma proteína lisossomal armazenada nos seus grânulos. e um um pigmento heme, que causa a sua cor verde em excreções ricas em neutrófilos,

Esta enzima é encontrada nos grânulos intracelulares azurófilos deneutrófilos e, tem sido usada com sucesso como um marcador bioquímico de recrutamento destas células no pulmão e no miocárdio isquêmico. A dosagem de MPO correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação. É uma técnica que possibilita demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (THIRU et. al, 1995; CRUZ; CAMPA, 2009).

Após coleta, a amostra foi pesada, foi acondicionada em eppendorf com buffer gelado (NaCl 0,1 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaEDTA 0,015 M, pH 4,7). O tecido foi homogeneizado em Polytron® PT 3100 a 13000 rpm. No pellet foi feita lise hipotônica com solução de NaCl 0,2% e após 30s adição de NaCl 1,6% com glicose 5%. Após centrifugação, o pellet foi ressuspenso em buffer NaPO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% hexadecyltrimethylammoniumbromide e rehomogeneizado. Após centrifugação a 13000 rpm, 5 mL do sobrenadante foram utilizados para a dosagem em placas de 96 wells diluído em 45 mL de NaPO<sub>4</sub> 0,08 M. A atividade da mieloperoxidase no sobrenadante foi dosada usando tetramethylbenzidine (TMB) 1,6 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 (Apêndice C). As concentrações de MPO foram expressas em unidade mg/dl de tecido.

### **3.9.4 Mensuração da atividade da Alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e da Aspartato aminotransferase (AST) ou Transaminase glutâmico oxalácetico (TGO)**

A alanina aminotransferase (ALT), ou alanina transaminase, também conhecida como transaminase glutâmica pirúvica (TGP), é uma enzima transaminase. É encontrada no plasma e em vários tecidos corpóreos, mas é geralmente associada ao fígado. Estas enzimas são liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade. A necrose em si não é necessária, e há baixa correlação entre o grau de lesão hepatocelular e o nível das aminotransferases (PAKNEJAD et. al, 2006).

A ALT catalisa a transferência do grupamento Amina da Alanina - Cetoglutarato, levando à formação de Piruvato e Glutamato. O Piruvato em presença do lactato desidrogenase (LDH) reage com a nicotinamida adenina dinucleótido hidreto (NADH), reduzindo-se a Lactato e o NADH oxida-se a NAD<sup>+</sup>. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da ALT na amostra. O soro ou plasma colhido com EDTA ou heparina, obtido livre de hemólise. O uso de kits Biocontrol N e P Bioclin. L foi usado para o processamento da Amostra. Foi usado 1,0 mL do reagente, seguido de transferência para cubeta termostaticada à 37°C e espera 1 minuto. Foi realizada a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro. Repetiram-se as leituras após 1, 2 e 3 minutos. Foi calculada a média das diferenças de absorvância por minuto (A/min.). No caso de uma variação média na absorvância 0,080 em 365 nm, repetir a determinação, diluindo  $\geq 334$  nm ou a amostra com NaCl 0,85%. Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

A maior atividade da ALT está localizada no tecido hepático. Menores atividades ocorrem no músculo esquelético, coração, rins e pâncreas. Sua atividade encontra-se aumentada na hepatite viral e tóxica (30 - 50 ou 100 vezes os valores de referência - VR), bem como em outras doenças hepáticas (DH), associadas à necrose hepática.

O teste ALT geralmente é feito junto com outros testes que verificam danos no fígado, incluindo aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (LDH) e bilirrubina. Ambos os níveis de ALT e AST são testes confiáveis para o fígado.

Já a transaminase glutâmico oxalacética (TGO), também chamada de aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima transaminase que catalisa a conversão da porção nitrogenada de um aminoácido para um resíduo de aminoácido. É essencial para a produção de energia no ciclo de Krebs, a TGO é encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias de muitas células, primariamente no fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e hemácias. Da mesma forma da TGP, essas enzimas estão presentes no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade. Assim, a elevação absoluta das aminotransferases tem grande significado diagnóstico, e não prognóstico, nas hepatopatias agudas (PAKNEJA, 2006).

A AST catalisa a transferência de grupos Amina do Aspartato- Cetoglutarato, levando à formação de Glutamato para o Oxalacetato. O Oxalacetato em presença do malato desidrogenase (MDH) reage com o NADH, reduzindo-se a Malato e o NADH oxida-se a NAD<sup>+</sup>. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da AST na amostra.

A amostra continha soro e foi utilizado kits Biocontrol N e P Bioclin. Com 1,0 mL do reagente. A amostra foi transferida para cubeta termostaticada à 37°C e esperou-se 1 minuto.

Foi repetido as leituras após 1, 2 e 3 minutos. Foi calculado a média das diferenças de absorvância por minuto (A/min.).

É necessário saber que a atividade das enzimas Aspartato Amino Transferase - AST no plasma aumenta após 6 a 8 horas do infarto do miocárdio, alcançando um pico em 24 a 48 horas após o acometimento. Nos casos das hepatopatias o aumento é 3 a 50 ou 100 vezes os valores de referência (VR).

Nas doenças hepáticas crônicas associadas à necrose celular, devido ao aumento da liberação da AST - mitocondrial, pode haver inversão da relação ALT/AST. Ocorre, ainda, aumento de seus níveis na mononucleose infecciosa e nas colestases intra e extra hepáticas.

TGP e TGO são indicadores sensíveis de dano hepático em diferentes tipos de doenças. Mas deve ser enfatizado que ter níveis mais altos que o normal destas enzimas não indica, necessariamente, uma doença hepática estabelecida.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar o efeito do tratamento com Ac, EAc 2 Hz e EAc 100 Hz sobre os valores de Uréia, Creatinina, GSH, TBARS e atividade da MPO foi aplicado o teste ANOVA/Dunnet, tanto para comparação independente como para a comparação pareada, com a finalidade de verificar a existência de igualdade/diferença entre as médias dos procedimentos adotados. Porém, para aplicar essa metodologia - ANOVA - precisa-se do pressuposto de normalidade nos dados, ou seja, os dados devem ser bem distribuídos em torno da média, simétricos e unimodais.

A análise desse pressuposto pode ser realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov (com os parâmetros de Dallai-Wilkinson-Lilliefors,  $p > 0,05$ ), se o p-valor calculado for maior que 0,05 aceita-se a hipótese de normalidade, além de serem expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (Média  $\pm$  EPM). Se o pressuposto for rejeitado, então, utilizou-se a metodologia alternativa do teste não-paramétricos. 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 GraphpadPrism 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 ( $\alpha$ ) de 0,05.

### 3.11 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. Foram observados os Princípios Éticos na Experimentação Animal, obedecendo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA / CEUA/ UFC), em 26 de março de 2015 nº do Protocolo 87/2014 (APÊNDICE A), e obedeceu os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 COMPLICAÇÕES E PERDAS DE ANIMAIS

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

Durante o processo de aclimatação ao repouso na "rede" (20 minutos, durante 7 dias consecutivos), realizado após a conclusão da primeira etapa do estudo (aplicação do EMC), vários animais apresentaram irritabilidade, na tentativa de libertação da imobilização, durante os primeiros dias. Observou-se, também, a presença de fezes diarréicas. No 6º dia da aclimatação 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: dois ratos (G2R4 e G4R6); Epistaxe moderada 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 anestesiados 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 apresentados no Apêndice E (Tabela A1/A2, Dados brutos). 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

| <b>Grupos</b>                            | <b>Peso médio (X±DP) *</b> |
|--|----------------------------|
| <b>G1</b> - Grupo Controle               | 284,2±17,14                |
| <b>G2</b> - Grupo Acupuntura             | 303,2±30,5                 |
| <b>G3</b> - Grupo Eletroacupuntura2 Hz   | 263,3±27,3                 |
| <b>G4</b> - Grupo Eletroacupuntura100 Hz | 283,3±28,0                 |

\*X±DP = média ± desvio padrão

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Durante todo o experimento houve alteração do peso dos animais. Os pesos aferidos no último dia do estudo (Dia 54) 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 tratados com EAc 100 Hz (18,03%) (Tabela 2).

Tabela 2- Alterações do peso dos ratos durante o experimento \*

| <b>Grupos</b>                | <b>Dia 1</b> | <b>Dia 21</b> | <b>Dia 42</b> | <b>Dia 54</b> | <b>%<br/>aumento<br/>do peso</b> |
|------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|----------------------------------|
| <b>G1</b> - Grupo Controle   | 284,17       | 294,00        | 330,33        | 347,83        | 5,03                             |
| <b>G2</b> - Grupo Acupuntura | 303,17       | 333,17        | 326,50        | 353,50        | 7,64                             |
| <b>G3</b> - Grupo EAC2 Hz    | 263,33       | 288,00        | 308,17        | 358,00        | 13,92                            |
| <b>G4</b> - 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 54) comparado ao peso (g) aferido ao término do EMC (Dia 42).

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

#### 4.3. PESO DO FÍGADO

O peso do fígado variou de 4,45 a 4,75g (pesomédio: 4,60 g). Não foram observadas variação significativa (Apêndice G), como demonstrado na Tabela 3, Figura 6.

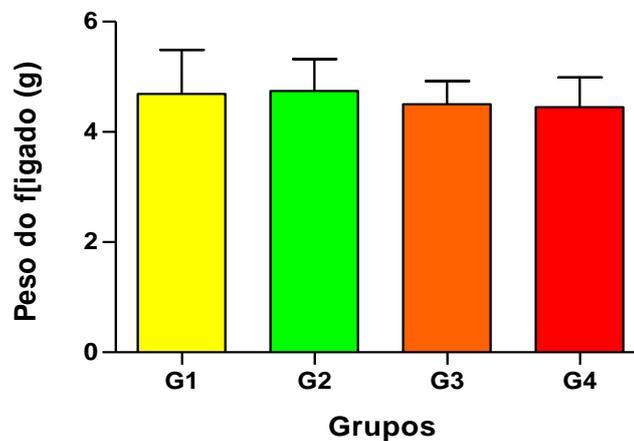
Tabela 3 - Alterações do peso médio do fígado dos ratos no último dia do experimento (Dia 20)

| Grupos                       | N | Lobo D | Lobo E | Peso Total |
|------------------------------|---|--------|--------|------------|
| <b>G1</b> - Grupo Controle   | 6 | 2,24   | 2,45   | 4,69       |
| <b>G2</b> - Grupo Acupuntura | 6 | 2,38   | 2,36   | 4,75       |
| <b>G3</b> - Grupo EAC2 Hz    | 6 | 2,36   | 2,15   | 4,51       |
| <b>G4</b> - Grupo EAC100 Hz  | 6 | 2,36   | 2,09   | 4,45       |

\* Peso(g) aferido dois dias após o término dos tratamentos

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Figura 6 -Variação do peso do fígado no último dia do experimento (dia 20)



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Baseado no teste de ANOVA / Dunnett, a tabela 3 demonstra que não houve significância entre o peso do fígado comparando os demais grupos com o controle (G1).

#### 4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes corroboraram com o estabelecimento da anedonia segundo Apêndice F.

##### 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). O teste comprovou o estabelecimento da anedonia em todos os grupos (Tabela 4, Figura 7).

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

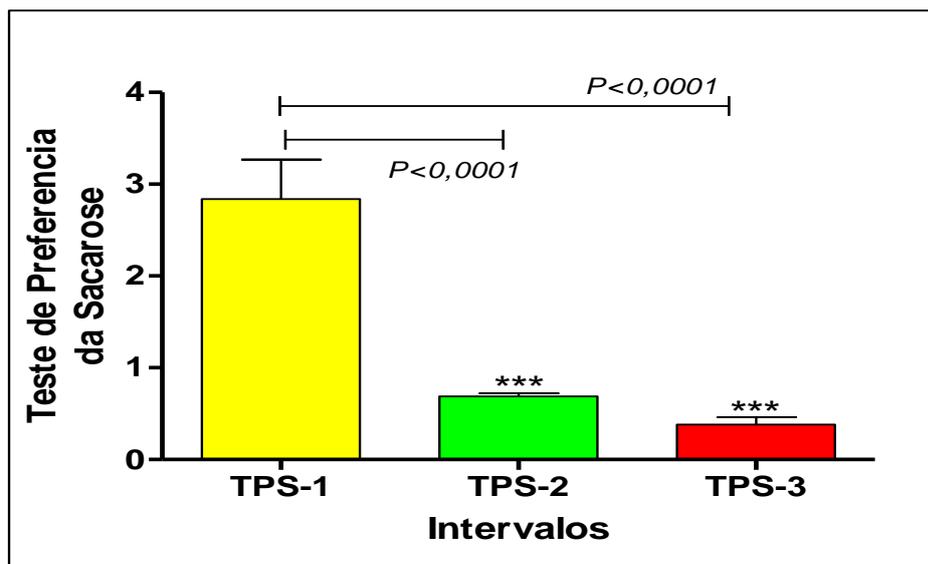
| Grupos                | TPS-1* | TPS-2* | TPS-3* |
|-----------------------|--------|--------|--------|
| G1 - Grupo Controle   | 2,840  | 68,69  | 0,38** |
| G2 - Grupo Acupuntura | 6,336  | 78,82  | 0,66** |
| G3 - Grupo EAC2 Hz    | 6,244  | 71,97  | 0,60** |
| G4 - Grupo EAC100 Hz  | 4,159  | 73,78  | 0,50** |

\* TPS-1 ((Dia zero, 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:  $TPS = \frac{\text{Ingestão de sacarose [g]}}{\text{Ingestão de sacarose [g]} + \text{ingestão de água [g]}} * 100$

\*\* Aneidonia, segundo definição de Moreau J-L., 2004.

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Figura 7- Teste de preferência da sacarose



\* 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).

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

#### 4.4.2 Teste de 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 tabela 5 e figura 8 ilustra os efeitos dos diversos tratamentos em três intervalos do estudo.

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

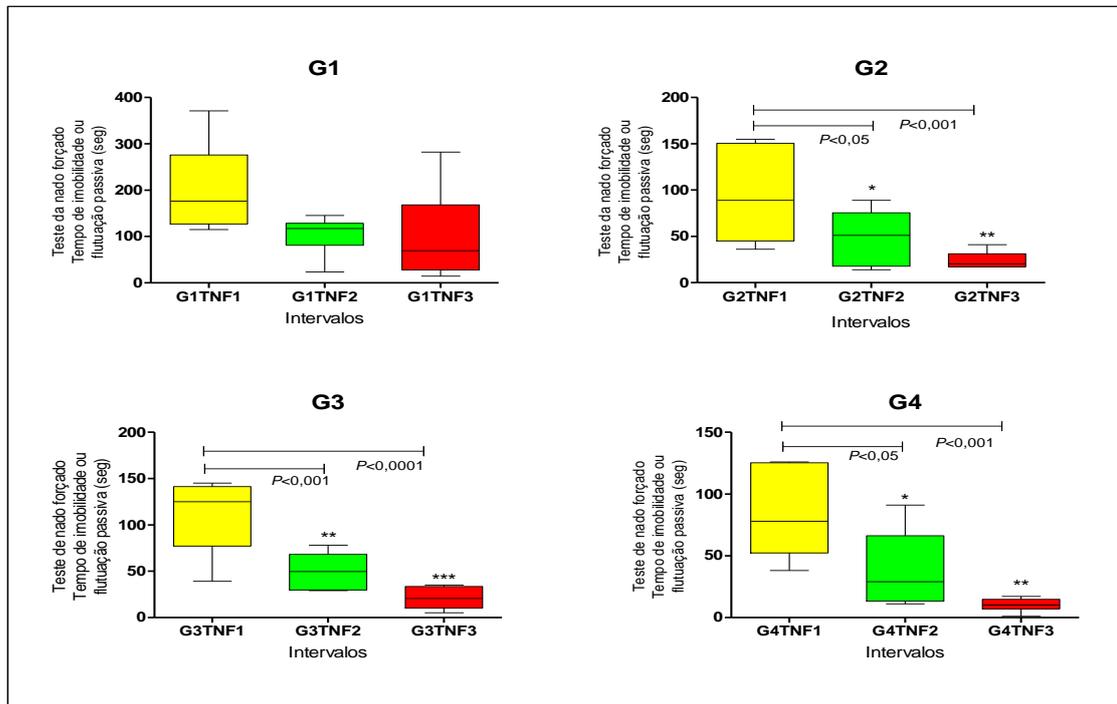
| <b>Grupos</b>                | <b>Pré-teste<br/>(Dia 43)</b> | <b>TNF 1<br/>(Dia 44)</b> | <b>TNF 2<br/>(Dia 53)</b> | <b>% Redução</b> |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|
| <b>G1</b> - Grupo Controle   | 202                           | 104                       | 99                        | 4,81             |
| <b>G2</b> - Grupo Acupuntura | 92                            | 49                        | 34                        | 30,61            |
| <b>G3</b> - Grupo EAC2 Hz    | 110                           | 50                        | 21                        | 58,00            |
| <b>G4</b> - Grupo EAC100 Hz  | 134                           | 67                        | 51                        | 23,88            |

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

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 53º dia (no dia seguinte ao término do tratamento). A coluna % redução exibe os percentuais de redução da atividade no Dia 53 (no dia seguinte ao término do experimento, antes da coleta de amostras e morte do animal).

Os 4 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: Elaborada pelo autor (2016)

No grupo G1 observa-se que não houve diferença nos índices calculados, por meio do teste estatístico aplicado - ANOVA. Por mais que, visualmente, o gráfico aparente que há certo aumento no primeiro teste e diminua no segundo teste, voltando a crescer no terceiro teste, o procedimento estatístico não foi capaz de detectar a diferença entre os testes.

Os testes realizado para essa análise foram o teste ANOVA de medições repetidas/Dunnett cujo  $P < 0,05$ ,  $P < 0,001$ ,  $P < 0,0001$  comparados ao controle G1.

#### 4.5 EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA (2 HZ E 100 HZ) SOBRE OS MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS SÉRICOS EM RATOS DEPRIMIDOS, INDUZIDOS POR ESTRESSE MODERADO CRÔNICO (APÊNDICE H)

##### 4.5.1 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a concentração de aspartato amino transferase - AST no sangue dos ratos

O uso da Ac ou da EAc (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos promoveu redução significativa ( $p < 0,0001$ ) das concentrações de AST no último dia do estudo (Tabela 6, Figura 9).

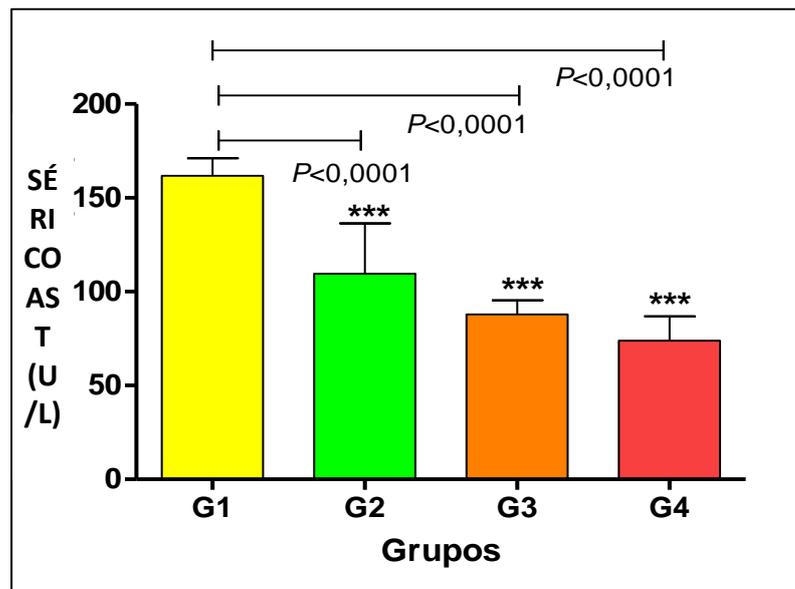
Tabela 6- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de AST (U/L) nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo.

| Grupos                | AST               |
|-----------------------|-------------------|
| G1 - Grupo Controle   | 161,80 ± 9,24     |
| G2 - Grupo Acupuntura | 109,50 ± 26,88*** |
| G3 - Grupo EAC2 Hz    | 87,83 ± 7,60***   |
| G4 - Grupo EAC100 Hz  | 73,83 ± 13,1***   |

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os testes realizado para essa análise foram ANOVA/ DUNNETT cujo  $***p < 0,0001$  comparado ao controle (G1).

Figura 9- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico sobre as concentrações de AST (U/L) nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo.



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os testes usados para essa análise foram o Teste ANOVA/ DUNNETT cujo  $***p < 0,0001$  comparado ao controle (G1).

#### 4.5.2 Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de alanina amino transferase - ALT no sangue dos ratos

Não foram observadas alterações significantes nas concentrações de ALT 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 (Tabela 7, figura 10).

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 ALT (U/L) nos roedores

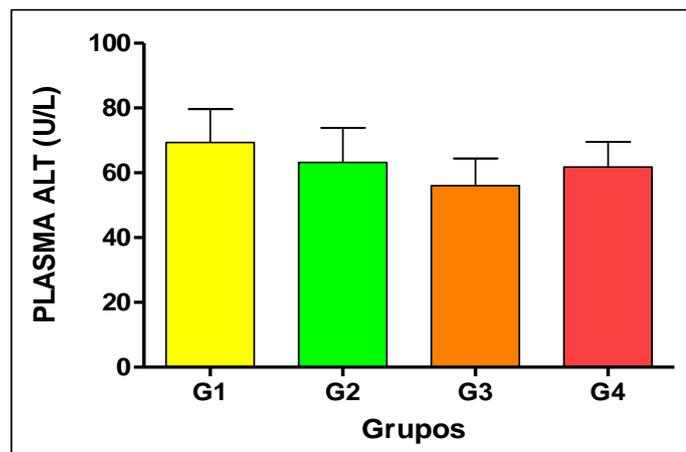
| Grupos                | ALT         |
|-----------------------|-------------|
| G1 - Grupo Controle   | 69,33±10,25 |
| G2 - Grupo Acupuntura | 63,17±10,70 |
| G3 - Grupo EAC2 Hz    | 56,00±8,462 |
| G4 - Grupo EAC100 Hz  | 61,83±7,679 |

dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do estudo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os teste usados para essa análise foram ANOVA/ DUNNETT cuja diferenças não foram 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 ALT (U/L) nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle positivo (G1) no último dia do estudo



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os Teste usados para essa análise foram ANOVA/ DUNNETT cuja diferenças não foram significantes.

#### 4.5.3 Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de GSH no sangue dos ratos

Houve aumento significativo das concentrações de GSH plasmático nos ratos tratados com EAc (2 e 100 Hz)(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 ( $\mu\text{Mol/mL}$ ) plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia

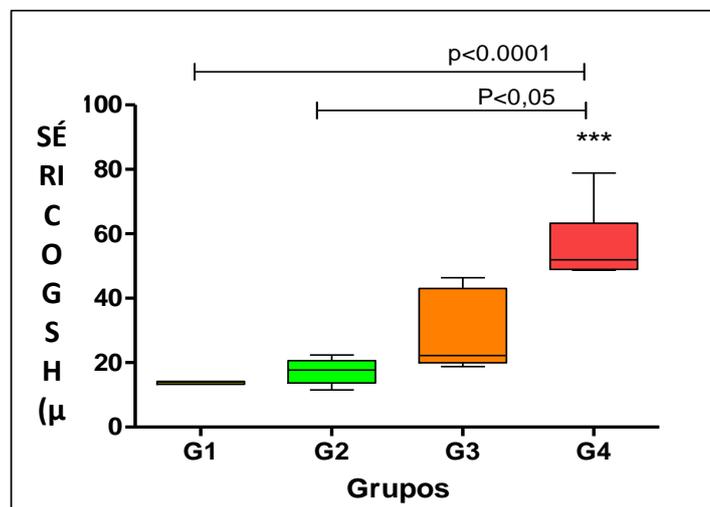
| Grupos (n=6)          | Valor mínimo | Percentil 25 | Mediana         | Percentil 75 | Valor máximo |
|-----------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|
| G1 - Grupo Controle   | 13,28        | 13,33        | <b>13,87</b>    | 14,25        | 14,25        |
| G2 - Grupo Acupuntura | 11,55        | 13,73        | <b>17,68</b>    | 20,61        | 22,39        |
| G3 - Grupo EAC2 Hz    | 18,79        | 19,93        | <b>22,19</b>    | 43,00        | 46,38        |
| G4 - Grupo EAC100 Hz  | 48,73        | 48,99        | <b>51,96***</b> | 63,33        | 78,84        |

último dia

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os teste usados para essa análise foram ANOVA / DUNNETT cujas diferenças não foram significantes\*\*\*.

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 ( $\mu\text{Mol/mL}$ ) plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os teste usados para essa análise foram ANOVA / DUNNETT cujas diferenças foram significantes.

#### 4.5.4 Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de MDA no sangue dos ratos

Não foram observadas alterações significantes nas concentrações de MDA 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 (Tabela 9, figura 12).

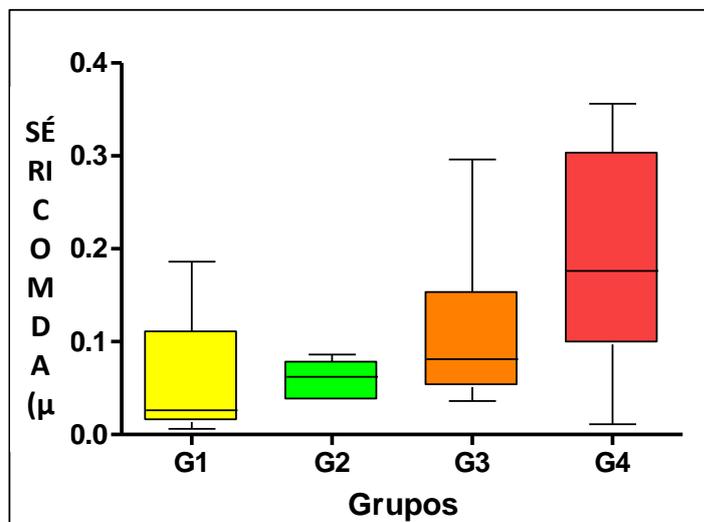
Tabela 9- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre as concentrações de MDA ( $\mu\text{Mol/mL}$ ) plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia

| Grupos (n=6)                 | Valor mínimo | Percentil 25 | Mediana | Percentil 75 | Valor máximo |
|------------------------------|--------------|--------------|---------|--------------|--------------|
| <b>G1</b> - Grupo Controle   | 0,0060       | 0,0135       | 0,0260  | 0,1110       | 0,1860       |
| <b>G2</b> - Grupo Acupuntura | 0,0360       | 0,0360       | 0,0620  | 0,0785       | 0,0860       |
| <b>G3</b> - Grupo EAC2 Hz    | 0,0360       | 0,0510       | 0,0810  | 0,1535       | 0,2960       |
| <b>G4</b> - Grupo EAC100 Hz  | 0,0110       | 0,09725      | 0,1760  | 0,3035       | 0,3560       |

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os teste usados para essa análise foram Kruskal-Wallis / Dunn. Diferenças não significante.

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 MDA ( $\mu\text{Mol/mL}$ ) plasmático nos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os Teste usados para essa análise foram. Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Cujas diferenças não foram significantes.

#### 4.6 EFEITOS DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA (2 HZ E 100 HZ) SOBRE O TECIDO HEPÁTICO DE RATOS DEPRIMIDOS, INDUZIDOS POR ESTRESSE MODERADO CRÔNICO (APÊNDICE I)

##### 4.6.1 Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de GSH no fígado de ratos

Houve aumento significativo das concentrações de GSH hepático nos ratos dos grupos G-4, comparados ao 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 GSH ( $\mu\text{Mol/g}$ ) no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia

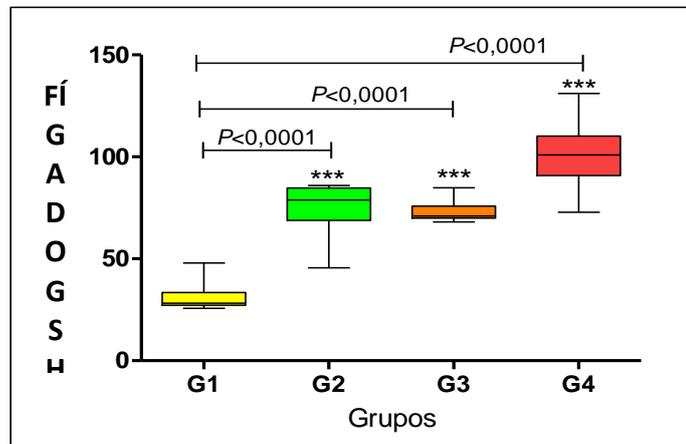
| Grupos (n=6)          | Valor mínimo | Percentil 25 | Mediana        | Percentil 75 | Valor máximo |
|-----------------------|--------------|--------------|----------------|--------------|--------------|
| G1 - Grupo Controle   | 25,64        | 27,18        | <b>28,13</b>   | 33,41        | 47,91        |
| G2 - Grupo Acupuntura | 45,56        | 68,85        | <b>78,81**</b> | 84,67        | 85,99        |
| G3 - Grupo EAC2 Hz    | 68,12        | 69,88        | <b>70,90**</b> | 75,81        | 84,82        |
| G4 - Grupo EAC100 Hz  | 72,81        | 90,82        | <b>100,9**</b> | 110,2        | 131,1        |

do estudo

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os teste usados para essa análise foram ANOVA / DUNNETT cujo **\*\*P<0,0001** comparado ao grupo G1.

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 GSH( $\mu\text{Mol/g}$ ) no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os testes usados para essa análise foi: ANOVA / DUNNETT cujo  $***P < 0,0001$  comparado ao grupo G1.

#### 4.6.2 Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de MDA no fígado de ratos

Houve redução significativa da concentração 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 ( $\mu\text{Mol/g}$ ) no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia

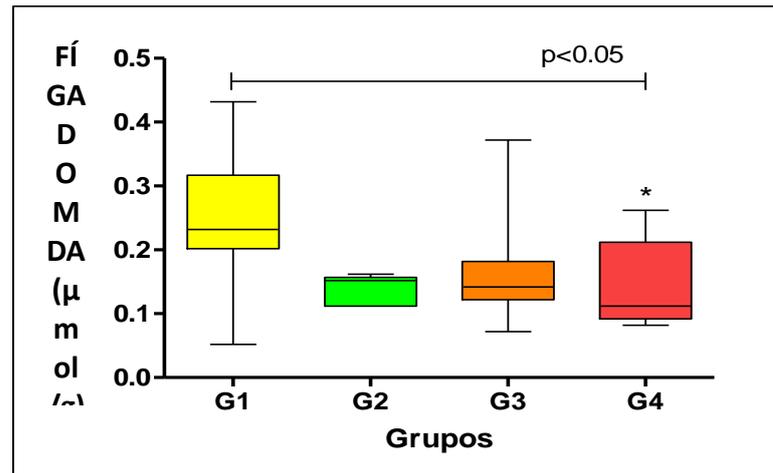
| Grupos (n=6)          | Valor mínimo | Percentil 25 | Mediana         | Percentil 75 | Valor máximo |
|-----------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|
| G1 - Grupo Controle   | 0,0520       | 0,2020       | <b>0,2320</b>   | 0,3170       | 0,4320       |
| G2 - Grupo Acupuntura | 0,1120       | 0,1120       | <b>0,1520</b>   | 0,1570       | 0,1620       |
| G3 - Grupo EAC2 Hz    | 0,0720       | 0,1220       | <b>0,1420</b>   | 0,1820       | 0,3720       |
| G4 - Grupo EAC100 Hz  | 0,0820       | 0,0920       | <b>0,1120 *</b> | 0,2120       | 0,2620       |

do estudo

Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

Os Teste usados para essa análise foram Kruskal-Wallis / Dunn. \* $p < 0,05$  comparado ao controle G1.

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 ( $\mu\text{Mol/g}$ ) no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os Teste usados para essa análise foram Kruskal-Wallis / Dunn. \* $p < 0,05$  comparado ao controle G1.

#### 4.6.3 Efeitos da acupuntura e eletroacupuntura sobre a concentração de MPO no fígado de ratos

Houve redução significativa da atividade da MPO nos ratos tratados com EAc 100 Hz comparados ao controle G1 no último dia do estudo (Tabela 12, Figura 15).

Tabela 12- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre a atividade da MPO (U/g) no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do

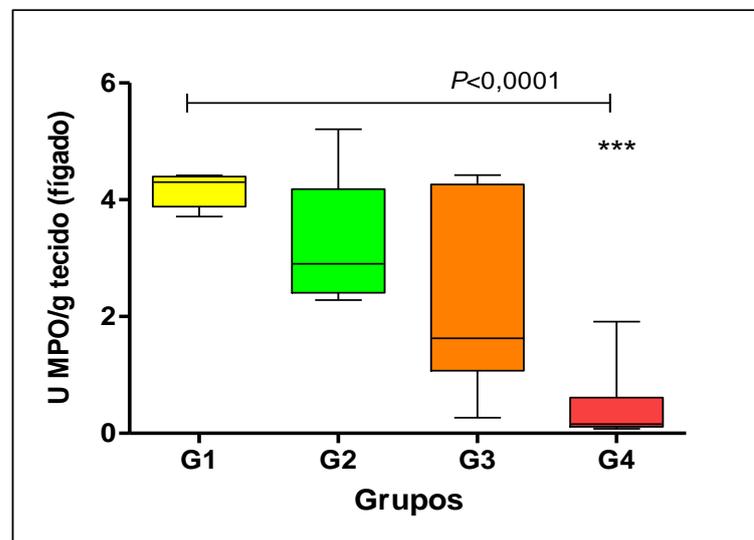
| Grupos (n=6)                 | Valor mínimo | Percentil 25 | Mediana  | Percentil 75 | Valor máximo |
|------------------------------|--------------|--------------|----------|--------------|--------------|
| <b>G1</b> - Grupo Controle   | 3,715        | 3,885        | 4,301    | 4,399        | 4,416        |
| <b>G2</b> - Grupo Acupuntura | 2,282        | 2,407        | 2,904    | 4,185        | 5,208        |
| <b>G3</b> - Grupo EAC2 Hz    | 0,268        | 1,074        | 1,630    | 4,265        | 4,420        |
| <b>G4</b> - Grupo EAC100 Hz  | 0,079        | 0,114        | 0,160*** | 0,614        | 1,913        |

estudo

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os Teste usados para essa análise foram Kruskal-Wallis / Dunn. \*\*\* $p < 0,0001$  comparado ao controle G1.

Figura 15- Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos deprimidos, induzidos por estresse moderado crônico, sobre a atividade da MPO (U/g) no fígado dos roedores dos grupos G2-G4, comparados ao grupo controle negativo (G1) no último dia do es



Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

Os teste usados para essa análise foram Kruskal-Wallis / Dunn. \* $p < 0,0001$  comparado ao controle G1.

#### 4.7. Consolidação dos resultados

Todos os parâmetros tomaram como base para comparação o Grupo Controle Negativo (G1). Foi observado que os valores de ALT sérico não foram significantes para nenhum dos grupos tratados; que os valores de AST sérico mostraram-se muito significantes (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ); o GSH sérico mostrou-se com um aumento semelhante para o G3 e G4; o GSH hepático obteve resultado significativo para todos os grupos (G2-G4); MDA hepático foi significativo para o G4; e o MPO hepático também apresentou-se significativo para G4 (Tabela 13).

Tabela 13- Consolidado dos resultados dos grupos tratados (G2-G4) em comparação com o grupo controle (G1)

| EXAMES LABORATORIAIS | G2 (Ac) | G3 (EAc 2Hz) | G4 (EAc 100Hz) |
|----------------------|---------|--------------|----------------|
| ALT/TGP (sérico)     | Ø       | Ø            | Ø              |
| AST/TGO (sérico)     | ***     | ***          | ***            |
| GSH (sérico)         | Ø       | ***          | ***            |
| MDA (sérico)         | Ø       | Ø            | Ø              |
| GSH (hepático)       | ***     | ***          | ***            |
| MDA (hepático)       | Ø       | Ø            | *              |
| MPO (hepático)       | Ø       | Ø            | ***            |

\* Onde o símbolo " Ø " significa ausência de significância entre a análise amostras , a presença de um único asterisco " \* " representa amostra com significância ( $p < 0,05$ ) e os três asteriscos conjuntos " \*\*\* " representa amostra com significância de  $p < 0,0001$ .

Fonte: Elaborada pelo autor (2016)

## 5 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos do uso da acupuntura e eletroacupuntura no fígado de ratos deprimidos. Para isso foram utilizados testes comportamentais para comprovação do estado deprimido e, para avaliar os efeitos do tratamento proposto, foram dosados mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios no plasma e no fígado. Além disso, foram observados outros fatores comportamentais que poderiam causar alterações fisiológicas no animal.

Um desses parâmetros comportamentais observado e mensurado foi a ingestão de líquidos e alimentos, mensurada por meio da alteração do peso do animal. Segundo Willner (2005) a perda de peso corporal durante a exposição ao protocolo de estresse tem sido considerada uma característica importante para se investigar anedonia no modelo de depressão discutido neste trabalho. Estudos mostram que a redução no peso corporal pode ser superior a 20%. A perda de peso durante o EMC pode estar associada aos períodos de privação de água e ração em que os sujeitos são submetidos nesse processo. Há, também, a hipótese de que os sujeitos poderiam diminuir a ingestão de líquidos e de ração como efeito decorrente da exposição aos estímulos estressores.

Para Rodrigues (2005), a perda de peso parece estar associada ao conjunto de eventos aversivos e incontroláveis aos quais os sujeitos são submetidos, e não especificamente à privação de água e comida que ocorre durante o EMC, visto que em seu estudo os sujeitos não apresentaram alteração no consumo de água e ração nesse período.

Nesse estudo, diferente das pesquisas citadas, todos os sujeitos submetidos às sessões operantes apresentaram não apenas estabilidade de peso como encontrado no trabalho de Silva (2013), mas aumentaram seu peso ao longo da pesquisa, principalmente aqueles animais tratados com Eletroacupuntura 100Hz.

O aumento de peso durante o EMC pode ser explicado por um comportamento compulsivo de se alimentar episódico, geralmente associado à privação intermitente e à apresentação de estímulos aversivos assim como ocorreu nos estudos de Thomaz (2001), Dolabela (2004) e Rodrigues (2005), Boggiano et al., (2007). E, após o tratamento, se justifica, pela diminuição do estresse oxidativo e a retomada de prazer a essa atividade. De acordo com Mehret et. al, (2010) a eletroacupuntura, por ser uma forma reconhecida de potencializar a acupuntura, tem efeitos terapêuticos melhores que a acupuntura, assim, foi observado um maior acréscimo de peso em ratos tratados com eletroacupuntura.

Segundo Zuardi (2014) a cronicidade do estresse pode levar a alterações fisiológicas, cujos mecanismos ainda não estão bem elucidados, como diarreia, a qual também foi encontrada neste estudo. Já outras alterações fisiológicas como epistaxe e hematuria, encontradas neste estudo, estão relacionadas com aumento da pressão arterial característicos da situação de estresse (TEBALDI et al., 2012).

O peso do fígado foi constante em todos os grupos não sendo observado nenhuma modificação para aqueles que receberam tratamento em comparação ao grupo controle.

Os resultados mostraram que o EMC, durante seis semanas, foi efetivo para o desenvolvimento da depressão, visto que no Teste de Preferência a Sacarose, realizado em três momentos, o primeiro antes do início do EMC, um terceiro no vigésimo primeiro dia e um terceiro teste ao final das seis semanas, assim houve, progressivamente, uma diminuição de consumo de sacarose, fato que ocorre diante da ausência de interesse para coisas com as quais antes ofereciam prazer, tendo como resultado muito significativo ( $p < 0,0001$ ).

Muitos estudos apontam o uso do Teste de Preferência a Sacarose, pois ele é considerado um marcador comportamental útil e válida de estresse crônico em animais indicando anedonia, perda de interesse ou prazer (KUMAR et al., 2011).

Outro método para constatação da depressão foi o Teste de Natação Forçada, realizado em dois momentos prévios ao tratamento, no qual os animais apresentaram-se mais tempo parados, sem o mesmo estímulo de sobrevivência de emergência, quando comparado ao momento posterior ao tratamento. Em outros estudos o TNF foi usado no estudo de antidepressivos (BORGES FILHO et al., 2013), e a redução tempo de imobilidade foi considerada indicativa de atividade antidepressiva (MAO et al., 2014), atestando a eficácia do teste para determinar a anedonia em animais.

Assim, podemos afirmar que os grupos G2-G4 apresentaram-se significativamente em anedonia quando comparados o pré-teste e o teste após o tratamento. Parâmetros como a diminuição da GSH plasmática no grupo controle, junto aos testes comportamentais, constatam que os animais estavam em estado de estresse.

Estas alterações comportamentais em ratos são comparáveis com o humor deprimido em humanos. Corroborando com esses estudos, nossos resultados indicam que EMC induziu um aumento de tempo de imobilidade no TNF e uma diminuição da preferência a sacarose (SOUZA et al., 2013; LIU et al., 2014b; MAO et al., 2014).

A agressão hepática causada por estresse oxidativo pode levar a danos hepatocelulares. Isso pode resultar em alteração na macroscopia e nos exames laboratoriais

alterados. Nesta pesquisa pôde-se se observar um padrão macroscópico considerados normais no que se refere à cor, forma, tamanho, consistência e odor. O peso do fígado foi constante em todos os grupos não sendo observado nenhuma modificação para aqueles que receberam tratamento em comparação ao grupo controle.

Quanto aos exames laboratoriais o que pode levar a alterações dos valores de TGO e/ou TGP. Geralmente esse aumento é assintomático, transitório e resolve-se após a descontinuação do estímulo, caso seja agudo. Os dados dos diversos estudos são muito consistentes em mostrar que a hepatotoxicidade é rara (< 2%), mas quando ocorre manifesta-se com aumento de TGP e/ou TGO (BERTOLAMI, 2005; DUMITRASCU. 2011).

Sabe-se que a hepatotoxicidade é dose-relacionada, com doses mais altas associadas a maiores taxas de anormalidades enzimáticas. Estudos apontam que o aumento das enzimas usualmente ocorrem nas primeiras 12 semanas exposta ao estressor, nesse estudo pôde se observar que com apenas 6 semanas de ECM houve relativa alteração de transaminase (TGO). Apesar da TGO ser mais inespecífica para lesão hepática, a sua presença, relacionado a outros parâmetros do grupo controle (valores reduzidos de GSH sérico e hepático, elevada concentração de MPA e MPO) corroboram com achados compatíveis com hepatopatia nos ratos estudados (BERTOLAMI, 2005).

Assim, o tratamento se mostrou eficaz evidenciado pela análise desses parâmetros nos demais grupos (G2-G3). O GSH sérico, por exemplo, apresentou-se com elevada significância ( $p < 0,0001$ ) para o grupo tratado com eletroacupuntura 100Hz (G4), e mostrou-se significativa ( $p < 0,05$ ) para o grupo tratado com eletroacupuntura 2Hz (G3), dados que vão ao encontro da pesquisa de Acioli (2014), estudo que também se assemelha ao método deste trabalho.

Trabalhos anteriores, como o de Silva (2009) e Santos (2012), que também utilizaram metodologia semelhante a este trabalho, com o uso de acupuntura e eletroacupuntura de frequências variáveis para tratamento de estresse oxidativo em órgãos específicos, apontaram, assim como visto nesse trabalho, um aumento de glutathiona reduzida (GSH) no tecidual entre grupos tratados comprado com o grupo controle. Houve, neste estudo, aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) da GSH em todos os grupos tratados quando comparado com o controle, corroborando com o estudo de Silva (2009).

O dialdeído malônico (MDA) é produto final da peroxidação dos lipídeos, é um metabólito da lipoperoxidação que exprime indiretamente a ação dos radicais livres no soro, servindo na avaliação do estresse oxidativo. A presença dele indica estresse oxidativo em curso. Os valores de MDA sérico não apresentaram significância neste trabalho, o MDA hepático, porém, apresentou , apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo G4 (Eletroacupuntura 100Hz) quando comparado com o grupo controle, divergindo dos trabalhos de Acioli (2014), o qual encontrou aumento significativo dos valores de MDA no órgão estudado e Silva (2009) que não achou valores significantes.

A mieloperoxidase(MPO), um marcador de neutrófilos teciduais, apresentou-se significativamente (  $p < 0,0001$ ) reduzido no G4 (grupo da eletroacupuntura 100Hz), corroborando com os achados de Acioli (2014) e Santos (2012) que apresentaram redução de MPO associados a tratamento com Eletroacupuntura.

Apesar das dificuldades encontradas ao longo da pesquisa (como a ausência de literaturas que envolvessem essa relação depressão-hepatopatia; dificuldades financeiras para desenvolver maiores análises; tamanho das agulhas, as quais foram desenvolvidas originalmente para o uso em humanos, etc) o uso da Ac, EAc 2 Hz e EAc 100 Hz apresenta-se promissor no tratamento de hepatopatias associada a depressão. Conclui-se, então, que a aplicação do tratamento em ratos previamente deprimidos promoveu proteção local e sistêmica sobre o estresse oxidativo por aumento das concentrações de GSH, além de reduzir o estado inflamatório. Enfatiza-se que tratamento com Eletroacupuntura 100Hz se mostrou significativamente mais promissor como tratamento.

## 6 CONCLUSÃO

Observou-se a instauração do estado depressivo pelo protocolo de Estresse Moderado Crônico, cujos testes comportamentais (TPS e TNF) apontaram para anedonia.

A partir dos marcadores pró-inflamatórios séricos e hepáticos elevados no grupo controle, foi sugerido a presença de estresse oxidativo sistêmico e ,principalmente, associado ao órgão em estudo.

Foi constatado que o tratamento proposto com acupuntura, eletroacupuntura 2Hz e eletroacupuntura 100Hz, promoveu redução significativa de AST sérica, aumento da GSH hepático para todos os grupos tratados. Observou-se, também ,um aumento muito significativo ( $p < 0,0001$ ) sérico de GSH, uma redução , significativa ( $p < 0,05$ ) e muito significativa ( $p < 0,0001$ ), respectivamente, de MDA e de MPO, relacionado ao uso da Eletroacupuntura de 100Hz .

Conclui-se, então, que a aplicação do tratamento em ratos previamente deprimidos promoveu proteção local e sistêmica sobre o estresse oxidativo por aumento das concentrações de GSH, além de reduzir o estado inflamatório. Enfatiza-se que tratamento com Eletroacupuntura 100Hz se mostrou significativamente mais promissor como tratamento.

## BIBLIOGRAFIA

- ABELHA, L. Depressão, uma questão de saúde pública. *Cad. saúde colet*, 2014.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *DSM-5 - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*. Artmed, 5<sup>o</sup> edição, 2014.
- ANDERSON RJ, GRIGSBY AB, FREEDLANDKE, ET AL. Anxiety and poor glycaemic control: a meta-analytic review of the literature. *Int J Psychiatry Med*, 32: 235–4, 2002.
- ACIOLI, Porfírio Cezar Passos. *Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo e a inflamação decorrentes da torção/distorção do testículo em ratos*. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Brasil, 2014.
- ASLANI S; HARBMR; COSTA P.S; ALMEIDA O.F; SOUSA N; PALHAJ.A. Day and night: diurnal phase influences the response to chronic mild stress. *Front BehavNeurosc*, 14; 8:82, Mar/2014.
- BARIS C; KASIMAYKOLGAZI M; ERSOY Y; ERCAN F; BERRAK C; YEGEN B.C. Stress-induced multiple organ damage in rats is ameliorated by the antioxidant and anxiolytic effects of regular exercise. *Cell BiochemFunct*, 28: 469–479, 2010.
- BAUM A, COHEN L, HALL M. Control and intrusive memories as possible determinants of chronic stress. *Psychosom Med*. 1993 May-Jun;55(3):274-86. PMID: 8346335.
- BENZIE I.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food SciNutr*, 47(3):233-6, May/1996.
- BEKRIS S; ANTONIOU K; DASKAS S; PAPADOPOULOU-DAIFOTI Z. Behavioral and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behav. Brain. Res.*, 161, 45–59, 2005.
- BERTOLAMI, Marcelo Chiara. Mecanismos de hepatotoxicidade. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo , v. 85, supl. 5, p. 25-27, Oct. 2005.
- BERTON, R. P. B; LIBARDI C.A; CONCEIÇÃO, M.S; BONGANHA, V; NOGUEIRA, F.R.D; CHACON-MIKAHIL, M.P.T; CAVAGLIERI, C.R; MADRUGA, V.A. Dano muscular: resposta inflamatória sistêmica após ações excêntricas máximas *Rev. bras. Educ. Fís. Esporte*, São Paulo, v.26, n.3, p.367-74, jul./set. 2012
- BILICI M; EFE H; KÖROĞLU M.A; UYDU H.A; BEKAROĞLU M; DEĞER. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord.*, 64(1):43-51, Apr/2001.
- BLUMENTHALJ.A;LETH.S;BABYAKM.A;WHITE W; SMITHP.K; MARKD.B; JONES R; MATHEWJ.P; NEWMANM.F; NORG I. Depression as a risk factor for mortality after coronary artery bypass surgery. *Lancet*, 23, 362 (9384):604-9, aug/2003.
- BOGGIANO, M. N., ARTIGA, A. I; PRITCHETT, C. E; CHANDLER-LANEY, P. C;

- SMITH, M. L; ELDRIDGE, A. J. High intake of palatable food predicts binge-eating independent of susceptibility to obesity: An animal model of lean vs. obese binge-eating and obesity with and without binge-eating. *Internacional Journal of Obesity*, 31, 1357-136, 2007.
- BORGES FILHO C; DEL FABBRO L; GOMES M.G; GOES A.T.R; SOUZA L.C; BOEIRA S.P; JESSE C.R. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol* ,698:286–91, 2013.
- BRADLEY J.R; THIRU S; POBER J.S. Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. *The American Journal of Pathology*, 146(1):27-32, 1995.
- BRHLIKOVA P. et al. Global Burden of Disease estimates of depression – how reliable is the epidemiological evidence? *Journal of the Royal Society of Medicine*, 104(1), 25-34, 2011.
- CAKIR, B; KASIMAY, O; KOLGAZI, M; ERSOY, Y; ERCAN, F; YEĞEN, B.C. Stress-induced multiple organ damage in rats is ameliorated by the antioxidant and anxiolytic effects of regular exercise. *Cell BiochemFunct.*,v.28, n.6, p.:469-79, 2010.
- CHAN S. H. H. What is being stimulated in acupuncture: evaluation of the existence of a specific substrate. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*8:25–33, 1984.
- CHIANG C.Y; CHANG C.T; CHU H.L YANG L F. Peripheral afferent pathway for acupuncture analgesia. *Scientia Sinica* 16:210-217, 1973.
- CHONGHUO, T. Tratado de Medicina Chinesa. SP, Roca, 1993.
- CHUNG V. et al. Use of traditional chinese medicine in the Hong Kong special administrative region of China. *J Altern Complement Med.*, 13(3):361-7, Apr/2007.
- CRUZ, W.A.S. ; CAMPA, A. Atividade de mieloperoxidase e formação de oxigênio singlete em monócitos, macrófagos e células dendríticas: localização versus atividade. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF). Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil, Ago/2009.
- CZEH, B.; PEREZ-CRUZ, C.; FUCHS, E.; FLUGGE, G. Chronic stress-induced cellular changes in the media pré-frontal córtex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res*, 190:1-13, 2008.
- COHEN S; JANICKI-DEVERTS D; MILLER G.E .Psychological stress and disease. *JAMA*, 10; 298(14): 1685-7, Oct/2007.
- COSTA, D.O; PEREIRA, S. efeitos neurofisiológicos da acupuntura no tratamento da ansiedade. universidade de mogi das cruces, são paulo, 2012.
- COTRAN R.S; KUMAR V; ROBBINS S.L; SCHOEN F.J. Robbins pathologic basis of

disease. *W.B. Saunders*. pp 1-35, 1994.

CRYAN J.F; HOLMES A; The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 4: 775–790, 2005.

DANTZER, R; KELLEY, K.W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behavior, and Immunity* 21:153-160, 2007.

DENEKES.M, FANBURGB.L. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol.*, 257 (4 Pt 1): L163-73, Oct/1989.

DENTINO A.N; PIEPER C.F; RAO M.K; CURRIE M.S; HARRIS T; BLAZER D.G; COHEN H.J. Association of interleukin-6 and other biologic variables with depression in older people living in the community. *J Am GeriatrSoc*, n:47 (1):6-11, Apr/1999.

DOLABELA, A. C. F. O. Um estudo sobre as possíveis interações entre o chronic mild stress e o desempenho operante. (Dissertação de mestrado). Programa de estudos Pós-graduados em Psicologia Experimental: Análise do comportamento, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2004.

DIMATTEOM.R;LEPPERH.S;CROGHANT.W. 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.*, 160(14): 2101-7, 2000.

DRAEHMPAEL, D.; ZOHMANN, A. Acupuntura no cão e no gato. Princípios básicos e prática científica. São Paulo: *Roca*, 254p, 1997.

DREVETS, W. C. Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry*, 48:813-29, 2000.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. A neurotrophic model for stress related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 59:1116-27, 2006.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28:435-51, 2004.

ELWING, J.E; LUSTMAN, P.J; WANG, H.L; CLOUSE R.E; Depressão, ansiedade e esteatohepatite não- Alcoólica. *Psychosom Med.* , 68 (4): 563-9, julho-agosto/2006.

FEDERAL, U.; PAMPA, D. O. Avaliação da bioatividade do flavonóide crisina em camundongos submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível. 2014.

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.

FILHO, C.B. Avaliação da bioatividade do flavonóide crisina em camundongos submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível. Universidade Federal do Pampa, RS, 2014.

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

FREITAS A.E; BETTIO L.E.B; NEIS V.B; SANTOS D.B; RIBEIRO C.M; ROSA P.B; FARINA M; RODRIGUES A.L.S. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-

like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 50:143–50, 2014.

FUKUDO, S; SUZUKI, J; TANAKA, Y; IWAHASHI, S; NOMURA, T. Impact of stress on alcoholic liver injury; a histopathological study. *J Psychosom. Res.*, v.33, n.4, p.515-21, 1989.  
 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 G.D; MANOLI L.P; TORRES I.L; SILVEIRA R; DALMAZ C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *NeurochemInt*, 42 (2): 107 - 14, Jan/2003.

GAZETA DO POVO; Depressão - mentes cada vez mais doentes. 2012. Disponível em: <http://www.appp.com.br/blog/depressao-mentes-cada-vez-mais-doentes/1173/> Acessado em 25/01/2016.

GERADOR DE DADOS RANDOMICOS. Disponível em <http://randomnumbergenerator.intemodino.com/pt/>. Acesso em 27 Maio 2014.

GOTLIB, I. H; JOORMANN J. “Cognition and Depression: Current Status and Future Directions.” *Annual review of clinical psychology*, y 6, 285–312, 2010.

GOULD, E.; MCEWEN, B. S.; TANAPAT, P.; GALEA, L. A. M.; FUCHS, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, 17:2492-8, 1997.

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.*, 39(5):1783-97, 2011.

HALIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97:1634-58, 2006.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 18:685-716, 2001.

HARRY G.J; KRAFT A.D. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology*, 33(2):191-206, 2012.

HONG, J. P. Acupuntura: de terapia alternativa a especialidade médica. *São Paulo: Centro de Estudos Integrado de Medicina Chinesa*, p192,2005.

HUBER, P.C; ALMEIDA, Wanda P.; FATIMA, Ângelo de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HWANG, Y.C.; LIMEHOUSE, J.B. Atlas de acupuntura canina. In: SHOEN, A.M. *Acupuntura veterinária. Da arte antiga à medicina moderna*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2006. p.122-146.

INTEMODINO GROUP. Gerador de números aleatórios. Disponível em:  
<http://randomnumbergenerator.intemodino.com/pt/> Acesso em 27/05/2014

INSTRUÇOES\_TRANSAMINASE\_ALT\_TGP\_CINETICA. Disponível em  
[http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUÇOES\\_TRANSAMINASE\\_ALT\\_TGP\\_CINETICA.pdf](http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUÇOES_TRANSAMINASE_ALT_TGP_CINETICA.pdf). Acessado em 08/01/2016.

INSTRUÇOES\_TRANSAMINASE\_AST\_TGO\_CINETICA Disponível em  
[http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUÇOES\\_TRANSAMINASE\\_AST\\_TGO\\_CINETICA.pdf](http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUÇOES_TRANSAMINASE_AST_TGO_CINETICA.pdf) Acessado em 08/01/2016.

JANG, M.-H., K; HA, G.-J. JOO; N. TAKAMURA. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshw. Biol.* 48: 1540–1550, 2003.

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

JOELS, M; BARAM, T. The neuro-symphony of estress. *Nat Rev Neurosci*, 10:459-66, 2009.  
 KARIME, G. K. G. de M. Estudo comparativo por meio do método de varredura e galvanopuntura. *Revista Fisio&Terapia*, n. 51, jul./ago. 2006.

KIRBY L.G; LUCKI I. The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. *Stress*, 2:251–263, 1998.

KIM T.H; JUNG S.H; CHO K.H. Interlinked mutual inhibitory positive feedbacks induce robust cellular memory effects. *FEBS Lett.*, 16; 581(25):4899-904, Oct/2007.

KIM U.K; JORGENSON E; COON H; LEPPERT M; RISCH N; DRAYNA D Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* 299:1221–1225, 2003.

KLOET, E. R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6:463-75, 2005.

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. *ClinBiochem*, 42(13–14):1368–74, 2009.

KONKLE A.T.M; BAKER S.L; KENTNE A.C; BARBAGALLO L.S.M; MERALI Z; BIELAJEW C. Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses. *Brain Res*, 992: 227-238, 2003.

KOSLOWSH; STOKES P.E; MENDELS J; RAMSEY A; CASPER R. Insulin tolerance test: human growth hormone response and insulin resistance in primary unipolar depressed, bipolar depressed and control subjects. *Psychol Med*, 12:45–55, 1982.

KOP W.J; GOTTDIENER J.S; TANGEN C.M; FRIED L.P; MCBURNIE M.A; WALSTON J; NEWMAN A; HIRSCH C; TRACY R.P. Inflammation and coagulation factors in persons

> 65 years of age with symptoms of depression but without evidence of myocardial ischemia. *Am J Cardiol.*, 15;89(4):419-24, Feb/2002.

KOLLA, N.; WEI, Z.; RICHARDSON, J. S.; LI, X. M. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. *J Psychiatry Neurosci*, 30:196-201, 2005.

KUMAR B; KUHAD A; CHOPRA K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. *Psychopharmacology* 214:819–28, 2011.

KUMAR, C. et al. Glutathione Revisited: A Vital Function in Iron Metabolism and Ancillary Role in Thiol-Redox Control. *The EMBO Journal* 30.10, 2044–2056, 2011.

LAUDENSLAGER M.L; RYAN S.M; DRUGAN R.C; HYSON R.L; MAIER S.F. Coping and immunosuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. *Science*, 221: 568–570, 1983.

LEONARD B; MAES M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 764–785, 2012.

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

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.

LIU, D.; XIE, K.; YANG, X.; GU, J.; GE, L.; WANG, X. et al. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behav Brain Res*, 264: 9-16, 2014.

LIU J.K; MORI A. Stress, aging, brain oxidative damage. *Neurochem Res*, 24: 1479–1497, 1999.

LI, XM, CHLAN-FOURNEY, J.; JUORIO, A. V.; BENNET, V. L.; SHRIKHANDE, S.; BOWEN, R. C. Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1). *J Psychiatry Neurosci*, 25:43-7, 2000.

MACIOCIA, G. Os Fundamentos da Medicina Chinesa: um Texto Abrangente para Acupunturistas e Fitoterapeutas. 1a Ed., São Paulo: *Roca*, 1996.

MACQUEEN, G. M.; CAMPBELL, S.; MCEWEN, B. S.; MACDONALD, K.; AMANO, S.; JOFFE, R. T. et al. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci*, 100:1387-92, 2003.

MAES M; GALECKI P; CHANG Y.S; 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 Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*,

29;35(3): 676-92, Apr/2011.

MAES M; SONG C; LIN A; 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*, 10: 313–18, 1998.

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

MAO-LIANG. Qiu (org.) Acupuntura chinesa e moxibustão. SP, Roca, 2001.

MAO, Q.Q; HUANG, Z; ZHONG, X; XIAN, X; IP, S. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice. *Behav Brain Res*, 26:140–5, 2014.

MARTINS, E.I; GARCIA, E.G. Pontos de acupuntura: Guia Ilustrado de Referência., 1ª Ed. Roca LTDA, São Paulo, 2003.

MCEWEN B.S. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*, 15; 338(3): 171-9, Jan/1998.

MEHRET, MARIANE OC; COLOMBO, Cíntia CG; SILVÉRIO-LOPES, S. M. Estudo comparativo entre as técnicas de acupuntura auricular, craneoacupuntura de Yamamoto, eletroacupuntura e cinesioterapia no tratamento da lombalgia crônica. *Rev. Bras. Terap. e Saúde*, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2010.

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.

MELSZACK R, STILLWELL D M, FOX E J Trigger points and acupuncture points for pain: correlations and implications. *Pain* 3:3-23, 1977.

MICHEL T.M; FRANGO 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*, 151: 145–50, 2007.

MILLER G.E; FREEDLANDKE; CARNEY R.M; STETLER C.A; BANKS W.A. Pathways linking depression, adiposity and inflammatory markers in healthy young adults. *Brain BehavImmun*, 17: 276–85, 2003.

MILLER A.H; MALETIC V; RAISON C.L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, 1;65(9):732-41, May/2009.

MILLER A.H; PARIANTE C.M; PEARCE B.D. Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression. *Adv Exp Med Biol.*, 461: 107-16, 1999.

MOREAU J-L. Simulating the anhedonia symptom of depression in animals. *Dialogues in*

*Clinical Neuroscience*, 4(4):351-360, 2002.

MUNHOZ CD, GARCIA-BUENO B, MADRIGAL JL, LEPSCHLB, SCAVONEC, LEZA JC. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Braz J Med Biol Res*, 41: 1037–1046, 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*, 88: 649–54, 2000.

NARDI A.E. Transtorno de Ansiedade Social. Fobia Social - A Timidez Patológica. MEDSI, Rio de Janeiro, 2000.

NESTLER, E.J., BARROT, M., DILEONE, R.J., EISCH, A.J., GOLD, S.J., MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. *Neuron*, 34: 13-25, 2002.

NEMEROFF C.B. Prevalence and management of treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry* 68 Suppl 8: 17-25, 2007.

NG F; BERK M; DEAN O; BUSH A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 11(6):851-76, Sep/2008.

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

ONGUR, D.; DREVETS, W. C.; PRICE, J. L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 95:13290-5, 1998.

PANZER, R. A comparison of the traditional Chinese vs. transpositional Zangfu Organ Association acupoint locations in the horse. *Am. J. Chinese Med.*, 21, 119-131, 1993.

OLIVEIRA, M. A. *O suicídio no estado do ceará: estudo de epidemiologia ecológica* Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil, 2010.

OZCAN, M. E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AHYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol*, 19:89-95, 2004.

PAKNEJAD, M. et al. Analysis of aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase in crevicular fluid from implants with and without peri-implantitis. *Implant dentistry*, v. 15, n. 1, p. 62-69, 2006.

PEDREAÑEZ A; ARCAYA J.L; CARRIZO E; RINCÓN J; VIERA N; PEÑA C; VARGAS R; MOSQUERA J. Experimental depression induces renal oxidative stress in rats. *Physiol Behav*, 24; 104 (5): 1002-9, Oct/2011.

PENNINX B.W; KRITCHEVSKY S.B; YAFFE K; et al. Inflammatory markers and depressed mood in older persons: results from the Health, Aging and Body Composition study. *Biol Psychiatry*, 54: 566–72, 2003.

- PENG, Q; MASUDA, N; FORD, E; DUAN, W; TRYGGESTAD, E; LADENHEIM, B; et al. Sertraline slows disease progression and increases neurogenesis in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 30, 312–322, 2008.
- PORSOLT, R. D., LePICHON, M., JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, London, v. 266, n. 5604, p. 730–32, 1977.
- RAISON C.L; BORISOV A.S; BROADWELL S.D; CAPURON L; WOOLWINE B.J; JACOBSON I.M. Depression during pegylated interferon-alpha plus ribavirin therapy: prevalence and prediction. *J Clin Psychiatry* 66: 41–48. 2005.
- RATNAKAR S; BANUPRIYA C; DOURERADJOU P; VIVEKANANDAM S; SRIVASTAVA M.K; KONER B.C. Evaluation of anxiety, depression and urinary protein excretion among the family caregivers of advanced cancer patients. *BiolPsychol*, 79: 234–8, 2008.
- REDROBE, J.P; BOURIN, M. Partial role of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, 325: 129–35, 1997.
- RODRIGUES, M. B. Interações entre o chronic mild stress e o desempenho operante: uma replicação de Dolabela. (Dissertação de mestrado). Programa de estudos Pós-graduados em Psicologia Experimental: Análise do comportamento, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. Samson, H. H., Pfeffer, A., 2005.
- ROMAN, R.M; WENDLAND, A. E; POLANCZYK, C. A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 91, n. 1, p. e12-e19, July/2008.
- ROSS, J. Combinações dos pontos de acupuntura: a chave para o êxito clínico. *Roca*, São Paulo, 2003.
- ROSS, J. Zang Fu: Sistemas de Órgãos e Vísceras da Medicina Tradicional Chinesa: Funções, Inter-relações e Padrões de Desarmonia na Teoria e na Prática. 2ª Ed., São Paulo: *Roca*, 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 I.D; DE SOUSA E.B; DE MORAES A.V; LOURES D.L; MESQUITA E.T; DA NOBREGA A.C. Cardiac function during mental stress: cholinergic modulation with pyridostigmine in healthy subjects. *ClinSci*, 105: 161–165, 2003.
- SANTOS, B. Efeito da acupuntura no tratamento de animais com sequelas neurológicas decorrentes de cinomose. 2013.
- SANTOS, E. L. W. Efeitos da acupuntura, eletroacupuntura e metformina sobre o estresse oxidativo, inflamação e glicemia em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico. 2012

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

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.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BECHARA, G. H. Acupuntura: bases científicas e aplicações. *Ciência Rural*, v. 31, n. 6, p. 1091–1099, 2001.

SEDLAK, J; LINDSAY, R. H. Estimation of Total Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Analytical Biochemistry*, 25: 1192-1205, 1968.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 215:213-9, 1993.

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

SIMON GE. Social and economic burden of mood disorders. *Biol Psychiatry*, 1;54(3): 208-15, Aug/2003.

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.

SILVA, Agamenon Honorio. Efeito da acupuntura e da eletro acupuntura sobre a glicemia lactacemia e as concentrações de lactato no fígado e rim de ratos sadios. SILVA, 2009.

SILVA, L. B. D. G. Tratamento único com dose baixa de mifepristona no período neonatal induz comportamento tipo-depressivo, 2013.

SMITS F.T; WITTKAMPFK.A; SCHENE A. H; BINDELSP.J; VAN WEERTH.C. Interventions on frequent attenders in primary care: a systematic literature review. *Scand J Prim Health Care*, 26(2):111-6,2008.

SMITH, L.L. Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Medicine Science in Sports and Exercise, Madison*, v.23, p.542-51, 1991.

SOBOCKI P; JÖNSSON B; ANGST J; REHNBERG C; Cost of depression in Europe. *J Ment Health Policy Econ*, 9(2): 87-98, jun/2006.

SOUZA, L.C; BORGES FILHO C; DEL FABBRO L; DE GOMES M.G; GOES ATR; JESSE CR Depressive-like behaviour induced by an intracerebroventricular injection of streptozotocin in mice: the protective effect of fluoxetine, antitumour necrosis factor- $\alpha$  and thalidomide therapies. *Behav Pharmacol* 24:79–86, 2013.

STREKALOVA T; SPANAGEL R; BARTSCH D; HENN F.A; GASS P. Stress-induced

anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacolog*, 29 (11): 2007-17, Nov/2004.

SUAREZ E.C; KRISHNAN R.R; LEWIS J.G. The relation of severity of depressive symptoms to monocyte-associated proinflammatory cytokines and chemokines in apparently healthy men. *Psychosom Med.*, 65(3):362-8, May-Jun/2003.

SURDEA-BLAGA T; DUMITRAȘCU, D.L. Depressão e ansiedade em esteatohepatite não-alcoólica: existe alguma associação? *Rom J Intern Med.* ,49 (4): 273-80, 2011.

TANNENBAUM B; TANNENBAUM G.S; SUDOM K; ANISMAN H. Neurochemical and behavioral alterations elicited by a chronic intermittent stressor regimen: implications for allostatic load. *Brain Res*, 25; 953 (1-2): 82-92, Oct/2002.

TAFFAREL, M. O; FREITAS, P. M. C. Acupuntura e analgesia: aplicações clínicas e principais acupontos. *Cienc. Rural*, Santa Maria , v. 39, n. 9, p. 2665-2672, Dec. 2009.

TEBALDI, M. et al. Study of blood pressure by the indirect oscillometric method (petmap®) in domestic unanesthetized dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 6, p. 1456-1464, 2012.

TEIXEIRA, F. M. Avaliação Comparativa do Efeito de Fármacos Antiinflamatórios com a Acupuntura no Modelo de Dor Pós-incisional em Ratos. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ, 2010.

THIERRY, B., STERU, L., CHERMAT, R., SIMON, P. Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? *Behav. Neural. Biol.*, San Diego, v. 41, n. 2, 180-189, 1984

TRIVEDI M.H; FAVA M; WISNIEWSKI S.R; THASE M.E; QUITKIN F; WARDEN D; RITZ L; NIERENBERG A.A; LEBOWITZ B.D; BIGGS M.M; LUTHER J.F; SHORES-WILSON K; RUSH A.J. Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. *N Engl J Med.*, 23;354(12):1243-52, Mar /2006.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors, and stress. *J Psychosom Res*, 53:865-71, 2002.

TVEDE N, KAPPEL M, HALKJAER-KRISTENSEN J, GALBO H, PEDERSEN BK. The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin 2 production. *Int J Sports Med*, 14: 275–282, 1993.

ULRICH-LAI, Y. M; HERMAN, J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. *Nat Rev Neurosci*, 10:307-409, 2009.

VEDSTED P; CHRISTENSEN M.B. Frequent attenders in general practice care: a literature review with special reference to methodological considerations. *Public Health*, p. 119(2):118-37, Feb/2005.

WANG, S-M.; KAIN, Z.N.; WHITE, P. Acupuncture Analgesia: I. The Scientific Basis. *Anesthesia and Analgesia*, v. 106, p. 602-610, 2008.

WEINSTEIN A.A; KALLMAN PRICE J; STEPANOVA M; et al. Depression in patients with nonalcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis B and C. *Psychosomatics*, 52:127-32, 2011.

WEISS S.R; POST R.M. Caveats in the use of the kindling model of affective disorders. *ToxicolInd Health*, 10(4-5):421-47, Out-Jul/1994.

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

WILLNER P; MUSCAT R; PAPP M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 16, 525-534, 1992.

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*, 93, 358-364, 1987.

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

WINOKUR A; MAISLIN G; PHILLIPS J.L; AMSTERDAM J.D. Insulin resistance after oral glucose tolerance testing in patients with major depression. *Am J Psychiatry*, 145: 325-30,1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Depression*. Fact sheet n° 369, October 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/> Acesso em 25/05/2014.

YAMAMURA, Y; NAKANO, M. A. Y. Livro Dourado da Acupuntura em Dermatologia e Estética. 1a ed 2a Reimp, São Paulo: Ed. Center AO, 2010.

YOUSSEF, N.A; ABDELMALEK, M.F; BINKS, M; GUY, C.D; OMENETTI, A; SMITH, A.D; DIEHL, A.M; SUZUKI, A. Associations of depression, anxiety and antidepressants with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* v.33, n.7, p.1062-70, 2013.

YUN-KYOUNG, Y; HYUN, L; KWON-EUI, H; YOUNG-IL, K; BYUNG-RYUL, L; TAE-HAN, K; JI-YOUNG, Y. Hepatoprotective effect of manual acupuncture at acupointGB34 against CCl4-induced chronic liver damage in rats. *World J. Gastroenterol.*, v. 12, n.14, p. 2245-9, 2006.

ZHAO, Z-Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. *Progress in Neurobiology*, v. 85, p. 355-375, 2008.

ZUARDI, A. W. Fisiologia do estresse e sua influência na saúde.rnp. fmrp. usp. br/~

psicmed/doc/Fisiologia% 20do% 20estresse. pdf>. Acesso em, v. 23, 2014.

## **APÊNDICES E ANEXOS**

### **APÊNDICE A**

#### **PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 87/2014, sobre o projeto intitulado: “Efeitos modulatórios da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a inflamação e o estresse oxidativo no fígado de ratos deprimidos”, de responsabilidade do Prof. Dr. Sergio Botelho Guimarães está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 26 de março de 2015.

Fortaleza, 27 de março de 2015

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734

## REAÇÃO DE GRUPOS SULFIDRÍLICOS NÃO PROTÉICOS NA DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA-GSH

### *Drogas e reagentes:*

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Ácido tricloroacético (ATC, 50%)

Tampão TRIS 0,4 M pH 8,9

5,5'-ditiobis (2-ácidonitrobenzóico (DTNB) 0,5M)

Metanol

Glutationa (GSH, 1 mg/ml).

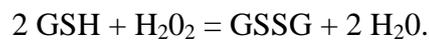
### *Preparação dos reagentes:*

Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

EDTA Na<sub>2</sub> 0,2M PM 372,2 (% 211g + H<sub>2</sub>O *qsp* 70.0 ml)

EDTA Na<sub>2</sub> 0,02M (30 ml de EDTA Na<sub>2</sub> 0,2M + H<sub>2</sub>O *qsp* 300 ml)

### *Reação:*



**APÊNDICE C****TABELA C1 - DE VALORES PADRÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE  
(MPO) - GRUPO CONTROLE NEGATIVO**

| <b>GRUPO CONTROLE</b> | <b>MPO (mg/dl)</b> |
|-----------------------|--------------------|
| Rato 1                | 1,913              |
| Rato 2                | 0,162              |
| Rato 3                | 0,181              |
| Rato 4                | 0,125              |
| Rato 5                | 0,158              |
| Rato 6                | 0,079              |

**Fonte:** próprio autor (2015).

**APÊNDICE D**

**QUADRO D1 - ROTINA PARA A APLICAÇÃO DE ESTRESSORES MODERADOS  
E IMPREVISÍVEIS DURANTE 6 SEMANAS PARA A INDUÇÃO DO ESTRESSE  
MODERADO CRÔNICO (EMC) NOS RATOS**

| SEMANA   | QUA | QUI | SEX | SAB | DOM | SEG | TER                             |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|
| Semana 1 | 33  | 15  | 26  | 21  | 17  | 27  | R<br>E<br>P<br>O<br>U<br>S<br>O |
| Semana 2 | 34  | 24  | 04  | 29  | 09  | 35  |                                 |
| Semana 3 | 01  | 20  | 32  | 16  | 22  | 12  |                                 |
| Semana 4 | 23  | 25  | 14  | 03  | 30  | 31  |                                 |
| Semana 5 | 05  | 13  | 08  | 18  | 19  | 07  |                                 |
| Semana 6 | 36  | 28  | 10  | 11  | 06  | 02  |                                 |

**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 *ad libitum*

Para a geração dos números randômicos foi utilizado o Gerador on-line de Números Randômicos, disponível em <http://randomnumbergenerator.intemodino.com/pt/> [Acesso em 27 Maio 2014].

## APÊNDICE E

## PESO DOS RATOS AO LONGO DO EXPERIMENTO

TABELA E1 - Peso dos ratos (g) antes do início do experimento (Dia 1)

| <b>Rato</b> | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>1</b>    | 284       | 280       | 301       | 266       |
| <b>2</b>    | 268       | 323       | 230       | 295       |
| <b>3</b>    | 287       | 340       | 244       | 252       |
| <b>4</b>    | 278       | 298       | 282       | 327       |
| <b>5</b>    | 272       | 320       | 277       | 297       |
| <b>6</b>    | 316       | 258       | 246       | 263       |

Fonte: próprio autor (2015).

TABELA E2 - Peso dos ratos (g) ao término do EMC (Dia 42)

| <b>Rato</b> | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>1</b>    | 384       | 315       | 330       | 296       |
| <b>2</b>    | 287       | 350       | 248       | 227       |
| <b>3</b>    | 309       | 382       | 292       | 209       |
| <b>4</b>    | 284       | 268       | 304       | 370       |
| <b>5</b>    | 356       | 305       | 331       | 329       |
| <b>6</b>    | 362       | 339       | 344       | 292       |

Fonte: próprio autor (2015).

## APÊNDICE F

## TESTES COMPORTAMENTAIS

**TABELA F1** - Teste de preferência da sacarose (TPS), em três momentos, do Grupo 1- Volume (ml) ingerido de água ou sacarose a 2%

| Grupo 1 | TPS1 |      | TPS2     |      | TPS3     |      |          |
|---------|------|------|----------|------|----------|------|----------|
|         | Rato | Água | Sacarose | Água | Sacarose | Água | 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        |

Fonte: próprio autor (2015).

**TABELA F2** - Teste de preferência da sacarose (TPS), em três momentos, do Grupo 2- Volume (ml) ingerido de água ou sacarose a 2%

| Grupo 1 | TPS1 |      | TPS2     |      | TPS3     |      |          |
|---------|------|------|----------|------|----------|------|----------|
|         | Rato | Água | Sacarose | Água | Sacarose | Água | 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        |

Fonte: próprio autor (2015).

**TABELA F3** - Teste de preferência da sacarose (TPS), em três momentos, do Grupo 3- Volume (ml) ingerido de água ou sacarose a 2%

| <b>Grupo 1</b> | <b>TPS1</b> |             | <b>TPS2</b>     |             | <b>TPS3</b>     |             |                 |
|----------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
|                | <b>Rato</b> | <b>Água</b> | <b>Sacarose</b> | <b>Água</b> | <b>Sacarose</b> | <b>Água</b> | <b>Sacarose</b> |
| <b>1</b>       |             | 14          | 26              | 18          | 35              | 12          | 12              |
| <b>2</b>       |             | 30          | 10              | 19          | 17              | 11          | 5               |
| <b>3</b>       |             | 0           | 18              | 17          | 14              | 6           | 8               |
| <b>4</b>       |             | 30          | 8               | 18          | 17              | 10          | 8               |
| <b>5</b>       |             | 44          | 20              | 21          | 16              | 18          | 10              |
| <b>6</b>       |             | 12          | 16              | 33          | 1               | 20          | 6               |

**Fonte:** próprio autor (2015).

**TABELA F4** - Teste de preferência da sacarose (TPS), em três momentos, do Grupo 4- Volume (ml) ingerido de água ou sacarose a 2%

| <b>Grupo 1</b> | <b>TPS1</b> |             | <b>TPS2</b>     |             | <b>TPS3</b>     |             |                 |
|----------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
|                | <b>Rato</b> | <b>Água</b> | <b>Sacarose</b> | <b>Água</b> | <b>Sacarose</b> | <b>Água</b> | <b>Sacarose</b> |
| <b>1</b>       |             | 10          | 5               | 28          | 3               | 10          | 8               |
| <b>2</b>       |             | 12          | 5               | 37          | 8               | 20          | 5               |
| <b>3</b>       |             | 9           | 3               | 12          | 16              | 8           | 10              |
| <b>4</b>       |             | 10          | 8               | 24          | 12              | 8           | 12              |
| <b>5</b>       |             | 9           | 2               | 30          | 8               | 7           | 20              |
| <b>6</b>       |             | 30          | 10              | 26          | 26              | 6           | 5               |

**Fonte:** próprio autor (2015).

**TABELA F5** - Teste de natação forçada (TNF), em três momentos, do Grupo 1- relacionado ao tempo (minutos: segundos) de inatividade.

| <b>Grupo 1</b> | <b>TNF1</b> | <b>TNF2</b> | <b>TNF3</b> |
|----------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Rato</b>    |             |             |             |
| <b>1</b>       | 06:11       | 02:03       | 02:10       |
| <b>2</b>       | 04:04       | 00:59       | 04:42       |
| <b>3</b>       | 03:24       | 01:15       | 00:14       |
| <b>4</b>       | 02:11       | 00:40       | 00:38       |
| <b>5</b>       | 01:55       | 02:25       | 00:32       |
| <b>6</b>       | 02:28       | 00:23       | 01:40       |

**Fonte:** próprio autor (2015).

**TABELA F6** - Teste de natação forçada (TNF), em três momentos, do Grupo 2- relacionado ao tempo (minutos: segundos) de inatividade.

| <b>Grupo 1</b> | <b>TNF1</b> | <b>TNF2</b> | <b>TNF3</b> |
|----------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Rato</b>    |             |             |             |
| <b>1</b>       | 02:35       | 00:29       | 00:21       |
| <b>2</b>       | 00:48       | 00:14       | 00:17       |
| <b>3</b>       | 01:41       | 01:11       | 00:41       |
| <b>4</b>       | 00:36       | 00:19       | 00:20       |
| <b>5</b>       | 01:07       | 00:53       | 00:28       |
| <b>6</b>       | 02:29       | 00:49       | 01:17       |

**Fonte:** próprio autor (2015).

**TABELA F7-** Teste de natação forçada (TNF), em três momentos, do Grupo 3- relacionado ao tempo (minutos: segundos) de inatividade.

| <b>Grupo 1</b> | <b>TNF1</b> | <b>TNF2</b> | <b>TNF3</b> |
|----------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Rato</b>    |             |             |             |
| <b>1</b>       | 02:15       | 01:05       | 00:33       |
| <b>2</b>       | 01:30       | 00:30       | 00:12       |
| <b>3</b>       | 01:55       | 00:42       | 00:35       |
| <b>4</b>       | 02:25       | 00:29       | 00:15       |
| <b>5</b>       | 00:39       | 01:18       | 00:05       |
| <b>6</b>       | 02:20       | 00:57       | 00:26       |

**Fonte:** próprio autor (2015).

**TABELA F8 -** Teste de natação forçada (TNF), em três momentos, do Grupo 4- relacionado ao tempo (minutos: segundos) de inatividade.

| <b>Grupo 1</b> | <b>TNF1</b> | <b>TNF2</b> | <b>TNF3</b> |
|----------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Rato</b>    |             |             |             |
| <b>1</b>       | 00:57       | 00:58       | 00:00       |
| <b>2</b>       | 02:06       | 00:16       | 00:14       |
| <b>3</b>       | 00:38       | 01:03       | 00:11       |
| <b>4</b>       | 01:05       | 00:20       | 00:09       |
| <b>5</b>       | 02:05       | 00:38       | 00:09       |
| <b>6</b>       | 01:31       | 00:31       | 00:17       |

**Fonte:** próprio autor (2015).

## APÊNDICE G

## DIMENSÕES E PESO (g) DO TECIDO ANALISADO - FÍGADO

| <b>TABELA G1 - Peso total (g) do fígado</b> |           |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Rato</b>                                 | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
| <b>1</b>                                    | 4,99      | 4,74      | 4,18      | 4,48      |
| <b>2</b>                                    | 4,14      | 4,8       | 3,81      | 4,99      |
| <b>3</b>                                    | 3,87      | 5,52      | 4,73      | 3,66      |
| <b>4</b>                                    | 4,02      | 4,18      | 4,81      | 3,94      |
| <b>5</b>                                    | 5,83      | 4,02      | 4,65      | 4,94      |
| <b>6</b>                                    | 5,29      | 5,22      | 4,86      | 4,68      |

**Fonte:** próprio autor (2015).

| <b>TABELA G2 - Peso (g) do fígado– lóbulo direito</b> |           |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Rato</b>   | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
| <b>1</b>  | 2,52      | 2,56      | 2,27      | 2,13      |
| <b>2</b>  | 2,21      | 2,18      | 1,89      | 2,63      |
| <b>3</b>  | 1,74      | 3,00      | 2,55      | 1,87      |
| <b>4</b>  | 1,91      | 1,82      | 2,65      | 2,44      |
| <b>5</b>  | 2,53      | 2,06      | 2,48      | 2,51      |
| <b>6</b>  | 2,52      | 2,68      | 2,33      | 2,56      |

**Fonte:** próprio autor (2015).

| <b>TABELA G3 - Peso (g) do fígado– lóbulo esquerdo</b> |           |           |           |           |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Rato</b>  | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
| <b>1</b>   | 2,47      | 2,18      | 1,91      | 2,35      |
| <b>2</b>   | 1,93      | 2,62      | 1,92      | 2,36      |
| <b>3</b>   | 2,13      | 2,52      | 2,18      | 1,79      |

|          |      |      |      |      |
|----------|------|------|------|------|
| <b>4</b> | 2,11 | 2,36 | 2,16 | 1,50 |
| <b>5</b> | 3,30 | 1,96 | 2,17 | 2,43 |
| <b>6</b> | 2,77 | 2,54 | 2,53 | 2,12 |

Fonte: próprio autor (2015).

## APÊNDICE H

### MARCADORES INFLAMATÓRIOS DO PLASMA (mg/dl)

**TABELA H1**–Glutathiona-GSH

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

Fonte: próprio autor (2015).

**TABELA H2**–DialdeidoMalônico (MDA)( $\mu$ Mol/g)\*

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

Fonte: próprio autor (2015).

**TABELA H3**– Transaminase glutâmico oxalacética (TGO), também chamada de Aspartato aminotransferase (AST). (U/L)

| <b>Rato</b> | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|

|          |     |     |    |    |
|----------|-----|-----|----|----|
| <b>1</b> | 147 | 98  | 88 | 65 |
| <b>2</b> | 154 | 112 | 80 | 73 |
| <b>3</b> | 166 | 65  | 98 | 98 |
| <b>4</b> | 165 | 121 | 92 | 61 |
| <b>5</b> | 170 | 115 | 91 | 77 |
| <b>6</b> | 169 | 146 | 78 | 69 |

**Fonte:** próprio autor (2015).

**TABELA H4**– Transaminase glutâmico pirúvica (TGP ), também conhecida como Alanina aminotransferase (ALT). (U/L)

| <b>Rato</b> | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>1</b>    | 73        | 56        | 54        | 64        |
| <b>2</b>    | 67        | 66        | 62        | 68        |
| <b>3</b>    | 55        | 76        | 61        | 67        |
| <b>4</b>    | 62        | 52        | 66        | 47        |
| <b>5</b>    | 75        | 75        | 44        | 61        |
| <b>6</b>    | 84        | 54        | 49        | 64        |

**Fonte:** próprio autor (2015).

## APÊNDICE I

## MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO FÍGADO (mg/dl)

| <b>TABELA I1–Glutationa -GSH</b> |           |           |           |           |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Rato</b>                      | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
| <b>1</b>                         | 47,9069   | 76,9073   | 68,1193   | 96,8268   |
| <b>2</b>                         | 27,9874   | 45,5634   | 71,0486   | 99,7561   |
| <b>3</b>                         | 27,6944   | 76,6144   | 70,7557   | 131,100   |
| <b>4</b>                         | 28,2803   | 85,9882   | 72,8062   | 102,097   |
| <b>5</b>                         | 25,6439   | 84,2306   | 70,4628   | 103,271   |
| <b>6</b>                         | 28,5732   | 80,7154   | 84,8165   | 72,8062   |

Fonte: próprio autor (2015).

| <b>TABELA I2–DialdeidoMalônico (MDA)</b> |           |           |           |           |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Rato</b>                              | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
| <b>1</b>                                 | 0,272     | 0,112     | 0,142     | 0,112     |
| <b>2</b>                                 | 0,232     | 0,152     | 0,132     | 0,092     |
| <b>3</b>                                 | 0,202     | 0,162     | 0,182     | 0,262     |
| <b>4</b>                                 | 0,362     | 0,112     | 0,112     | 0,162     |
| <b>5</b>                                 | 0,432     | 0,142     | 0,072     | 0,082     |
| <b>6</b>                                 | 0,052     | 0,152     | 0,372     | 0,092     |

Fonte: próprio autor (2015).

| <b>TABELA I3–Mieloperoxidase (MPO)</b> |           |           |           |           |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Rato</b>                            | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> |
| <b>1</b>                               | 4,393     | 2,448     | 4,213     | 1,913     |
| <b>2</b>                               | 4,351     | 2,835     | 1,549     | 0,162     |
| <b>3</b>                               | 3,715     | 2,282     | 4,420     | 0,181     |
| <b>4</b>                               | 4,416     | 2,973     | 1,711     | 0,125     |
| <b>5</b>                               | 3,941     | 3,844     | 1,342     | 0,158     |
| <b>6</b>                               | 4,250     | 5,208     | 0,268     | 0,079     |

**Fonte:** próprio autor (2015).