



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

**ISAAC BEVILAQUA DE ALBUQUERQUE GUIMARÃES**

**EFEITOS MODULATÓRIOS DO ÓLEO DE ALHO (*ALLIUM SATIVUM*), DA  
ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA NO ESTRESSE OXIDATIVO  
AGUDO E NA INFLAMAÇÃO INDUZIDOS POR GENTAMICINA NO  
FÍGADO DO RATO**

**FORTALEZA  
2016**

**ISAAC BEVILAQUA DE ALBUQUERQUE GUIMARÃES**

**EFEITOS MODULATÓRIOS DO ÓLEO DE ALHO (*ALLIUM SATIVUM*), DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA NO ESTRESSE OXIDATIVO AGUDO E NA INFLAMAÇÃO INDUZIDOS POR GENTAMICINA NO FÍGADO DO RATO**

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

**Área de concentração:** Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse

**Orientador:** Prof. Dr. Miguel Nasser Hissa

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Sergio 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)

---

- G978e    Guimarães, Isaac Bevilaqua de Albuquerque.  
          Efeitos modulatórios do óleo de alho (*allium sativum*), da acupuntura e da  
          eletroacupuntura no estresse oxidativo agudo e na inflamação induzidos por gentamicina no  
          fígado do rato / Isaac Bevilaqua de Albuquerque Guimarães. – 2016.  
          67 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. Miguel Nasser Hissa.  
          Coorientação: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.
1. Gentamicina. 2. Estresse oxidativo. 3. Inflamação. 4. Acupuntura. 5. Eletroacupuntura.  
I. Título.

**ISAAC BEVILAQUA DE ALBUQUERQUE GUIMARÃES**

**EFEITOS MODULATÓRIOS DO ÓLEO DE ALHO (*ALLIUM SATIVUM*), DA ACUPUNTURA E DA ELETROACUPUNTURA NO ESTRESSE OXIDATIVO AGUDO E NA INFLAMAÇÃO INDUZIDOS POR GENTAMICINA NO FÍGADO DO RATO**

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

**Aprovada em 05/02/2016**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Joaquim José de Lima Silva  
Centro Universitário Christus

---

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

---

Prof. Dr. Miguel Nasser Hissa  
Universidade Federal do Ceará (UFC) (Orientador)

Dedico este trabalho, ao Deus Pai Todo-Poderoso, pela vida e pela oportunidade de melhorar sempre.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, PROF. MIGUEL NASSER HISSA, pelo acolhimento de minha proposta de pesquisa e pelos ensinamentos, meu muito obrigado.

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

À PROF. Dra. RAIMUNDA HERMELINDA MAIA MACENA e a PROF. MS. MEYSSA QUEZADO DE FIGUEIREDO pela expressiva contribuição para o aprimoramento deste trabalho de pesquisa e pela participação da banca de qualificação deste projeto de pesquisa.

Ao PROF. DR. JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA por sua participação na banca de defesa desse manuscrito.

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

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

A minha namorada, educadora física MARIANA RODRIGUES DE SOUZA, por sua participação ativa no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Aos alunos da Faculdade de Medicina da U.F.C. Giselle Castro de Abreu e Francisco Adalberto Saraiva Neto, pela responsabilidade e dedicação com que participaram deste experimento.

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

Às Sras. Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Fontenele, secretárias do Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela eficiência, atenção e dedicação sempre dispensadas aos alunos da pós-graduação.

A todos os colegas da pós-graduação por compartilharem comigo essa jornada de anseios e expectativas para a realização deste Curso de Mestrado.

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

## RESUMO

Os aminoglicosídeos introduzidos no arsenal terapêutico há quase 70 anos, continuam a ser a droga de escolha em pacientes portadores de infecções graves, produzidas por bacilos Gram negativos. Os efeitos tóxicos da gentamicina (GM), são conhecidos há muito tempo. Estudos disponíveis na literatura científica, publicados em 2010 e 2011, demonstraram que a administração de 200mg de gentamicina em dose única, por gavagem, produzia efeitos tóxicos e oxidativos no coração, no rim e no fígado de ratos Sprague-Dawley. Apesar disso, ainda são relativamente escassos estudos investigando os efeitos hepatotóxicos da droga. O alho (*Allium sativum*), na medicina popular desde a antiguidade, possui inúmeras atividades biológicas, tais como atividade anticancerígena, antimicrobiana, anti-hipertensiva, imunomodulatória e antioxidante. No estresse oxidativo o óleo de alho (OA) modula os níveis de antioxidantes e de peroxidação lipídica, atuando na eliminação de radicais livres. Sabe-se, por outro lado, que a aplicação da acupuntura (Ac) no acuponto VB34 (*Yanglingquan*) reduz a toxicidade, protege o tecido hepático e normaliza a atividade imune em ratos intoxicados por tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ). A utilização da eletroacupuntura (EAc) pode potencializar os efeitos da Ac. Para avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do OA, da Ac e da EAc realizou-se um estudo prospectivo, controlado e comparativo entre ratos da linhagem Wistar submetidos aos efeitos hepatotóxicos da GM. Foram utilizados 30 ratos machos, com idade de 12 a 14 semanas e peso variando de 267 a 373 g. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos de seis animais: G1 – CT (Controle), G2- Oleo de alho G3 - Acupuntura, G4– EAc2 (Eletroacupuntura 2 Hz), G5 – EAc100 (Eletroacupuntura 100 Hz). Para a indução da hepatotoxicidade todos os animais receberam GM (100mg/Kg ip.) durante 5 dias consecutivos. A partir do 7º dia os ratos (G2) foram tratados com óleo de alho (gavagem), Ac e EAC (2 100 /hz) (G3-G5) durante 20 minutos, em dias alternados, durante 10 dias. Os ratos do G1 receberam óleo de oliva por gavagem. Amostras de sangue arterial e o fígado foram coletados 48 horas após o término do experimento, sob anestesia com hidrato de cloral. Parâmetros analisados incluíram aspartato amino transferase - AST, alanina amino transferase - ALT, malonaldeído (MDA), glutatona reduzida (GSH) e mieloperoxidase (MPO). A seguir os ratos foram mortos por dose triplicada de anestésico. Os valores de AST e ALT nos ratos do G1 foram semelhantes aos valores normais conhecidos, sugerindo que as lesões tóxicas foram de menor intensidade em função de um curto período de aplicação. Houve aumento significativo das concentrações de GSH plasmático e tecidual nos grupos G4 e G5, comparados ao controle positivo. Não foram verificadas diferenças nas concentrações de MDA plasmático. Houve aumento significativo da concentração de MDA hepático, comparando-se o grupo G5 ao controle G1. Houve redução significativa da atividade da MPO no fígado dos ratos dos grupos G4 e G5. Esses achados confirmam a atividade antiinflamatória da EAc. O OA não teve efeitos protetores sobre o estresse oxidativo ou a inflamação. Conclui-se que a EAc tem efeito protetor sobre o estresse oxidativo e a inflamação no fígado de ratos intoxicados com GM. O óleo de alho não demonstrou efeito protetor nas doses utilizadas neste estudo.

**Descritores:** Gentamicina; estresse oxidativo; inflamação; acupuntura; eletroacupuntura.

## ABSTRACT

Aminoglycosides, introduced to the therapeutic arsenal for almost 70 years, continue to be the drug of choice in patients with serious infections, produced by gram-negative bacilli. The toxic effects of gentamicin (GM), are known for a long time. Available studies in the scientific literature, published in 2010 and 2011, have demonstrated that the administration of 200 mg of gentamicin in a single dose by gavage, produced toxic and oxidative effects in heart, kidney and liver of Sprague-Dawley rats. Nevertheless, they are still relatively few studies investigating the hepatotoxic effects of this drug. Garlic (*Allium sativum*), used in folk medicine since antiquity, has many biological activities, such as anticancer, antimicrobial, antihypertensive, immunomodulatory and antioxidant activities. In the presence of oxidative stress the garlic oil (GO) modulates levels of antioxidants and lipid peroxidation, acting on elimination of free radicals. It is known, moreover, that the application of acupuncture (Ac) in acupoint VB34 (*Yanglingquan*) reduces the toxicity, protects liver tissue and normalizes the immune activity in rats intoxicated by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). The use of electroacupuncture (EAc) can potentiate the effects of Ac. For assessment of antioxidant and anti-inflammatory activity of OA, Ac and EAc, a prospective, controlled and compared study was carried out in Wistar rats submitted to the hepatotoxic effects of GM. Thirty male rats, aged from 12 to 14 weeks and weight ranging from 267 to 373 g. were randomly distributed into five groups of six animals: G1(control), G2- garlic oil, G3 Ac, G4 EAc2 (electroacupuncture 2 Hz), G5-EAc100 (electroacupuncture 100 Hz). For the induction of hepatotoxicity all animals received GM (ip 100mgKg) during 5 consecutive days. Beginning on the 7th day the rats (G2) were treated with garlic oil (by gavage), Ac and EAC (2-100 Hz) (G3-G5) for 20 minutes on alternate days for 10 days. G1 rats received olive oil by gavage. Arterial blood samples and the liver were collected 48 hours after the end of the experiment, under anesthesia with chloral hydrate. Parameters analyzed included, aspartate amino transferase (AST) - alanine amino transferase (ALT), malondialdehyde (MDA), reduced Glutathione (GSH) and myeloperoxidase (MPO). Next the rats were killed by triple dose of anesthetic. G1 AST and ALT values were similar to normal values known, suggesting that the toxic lesions were of lower intensity possibly due to a short period of induced toxicity. There was a significant increase of plasma and tissue concentrations of GSH in groups G4 and G5, compared to positive control. No differences were observed in plasma MDA concentrations. However there was a significant increase in the of hepatic MDA concentration, comparing the Group G5 to positive control G1. There was significant reduction of MPO activity in the liver of G4 and G5 rats. These findings confirm the anti-inflammatory activity of the EAc. It is concluded that the EAc has a protective effect on hepatic oxidative stress and liver inflammation of GM intoxicated rats. Garlic oil showed no protective effect at the doses used in this study.

**Keywords:** Gentamicin; Oxidative stress; Inflammation; Acupuncture; Electroacupuncture.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição dos grupos .....	26
Figura 2	Ratos posicionados na rede, para aclimatação .....	28
Figura 3	Desenho identificando o local de inserção das agulhas, no membro pélvico direito do rato .....	29
Figura 4	Modelo 608 Fix portátil .....	31
Figura 5	Detalhe da aplicação da eletroacupuntura. Eletrodos tipo garra conectados às agulhas inseridas no membro pélvico do rato (rato 4, EAc 100).....	31
Figura 6	Variação do peso do fígado ao termino do experimento	38
Figura 7	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de aspartato amino transferase (AST) sérica nos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1), no último dia do estudo .....	39
Figura 8	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de alanina amino transferase (ALT) sérica nos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo .....	40
Figura 9	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no sangue dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina comparados ao grupo controle (G1), no último dia do estudo .....	41
Figura 10	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo .....	42
Figura 11	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de malondialdeido (MDA) no sangue dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1), no último dia do estudo .....	43
Figura 12	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de malondialdeido (MDA) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1), no último dia do estudo .....	44
Figura 13	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1), no último dia do estudo .....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso médio dos ratos utilizados no estudo .....	38
Tabela 2	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de aspartato amino transferase (AST) sérica nos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1), ,no último dia do estudo .....	39
Tabela 3	Oleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de alanina amino transferase (ALT) sérica nos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1),no último dia do estudo .....	40
Tabela 4	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no sangue dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1),no último dia do estudo .....	41
Tabela 5	Efeitos do oleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1),no último dia do estudo.....	42
Tabela 6	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de malondialdeido (MDA) no sangue dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1),no último dia do estudo .....	43
Tabela 7	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de malondialdeido (MDA) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo .....	44
Tabela 8	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de mieloperoxidase (MPO) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, após intoxicação com gentamicina, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	45
Tabela 9	Resumo das análises bioquímicas .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
Ac	Acupuntura
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
$-\text{CH}_2$	Grupamento metileno
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DP	Desvio Padrão
E36	Acuponto <i>Zusanli</i>
EAc	Eletroacupuntura
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G1	Grupo Controle Positivo
GAc	Grupo Acupuntura
GEAc100	Grupo Eletroacupuntura 100 hertz
GEAc2	Grupo Eletroacupuntura 2 hertz
GM	Gentamicina
GOA	Grupo óleo de alho
GPx	Glutationaperoxidase
GSH	Glutaciona
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio
$\text{H}_2\text{O}\bullet$	Radical hidroperoxila
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
$\text{H}_3\text{PO}_4$	Ácido fosfórico
Hz	Hertz
ip	Intraperitoneal
LPO	Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação

M	Mol
mA	Miliampére
MDA	Malondialdeído
mg/dL	Miligramma por decilitro
mg/mL	Miligramma por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPO	Mieloperoxidase
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
O <sub>2</sub> •	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
r.p.m.	Rotações por minuto
R3	Acuponto <i>Taixi</i>
RL	Radicais livres
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ROO•	Radicalperoxila
SOD	Enzima superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMB	Tetrametilbenzidina
UFC	Universidade Federal do Ceará
VB34	Acuponto <i>Yanglingquan</i>
μmol/g	Micro mol por grama
μmol/L	Micro mol por litro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
	1.1 Hepatotoxicidade da gentamicina	17
	1.2. Estresse oxidativo	18
	1.3 Efeitos protetores do alho	19
	1.4 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura	20
	1.5 Justificativa e Relevância	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	24
<b>3</b>	<b>MÉTODO</b> .....	25
	3.1 Aspectos éticos	25
	3.2 Tipo de estudo e amostra	25
	3.3 Distribuição da amostra	26
	3.4 Indução da hepatotoxicidade	27
	3.5 Delineamento experimental	27
	3.6 Condicionamento dos ratos	28
	3.7 Localização dos pontos de acupuntura / eletroacupuntura	28
	3.8 Tratamentos (Ac, Eac, gavagens)	29
	3.9 Coleta de amostras e morte dos animais	31
	3.10 Determinação das concentrações de AST e ALT	32
	3.11 Avaliação da peroxidação lipídica	32
	3.12 Determinação das substancias reativas ao acido tiobarbitúrico	32
	3.13 Determinação de grupos sulfidrilicos não proteicos	33
	3.14 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase	35
	3.15 Análise estatística	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	37
	4.1 Complicações	37
	4.2 Peso dos ratos	37
	4.3 Peso do fígado	38
	4.4 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos sadios intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de AST e ALT no sangue dos animais	39

4.4.1	Efeitos sobre a concentração de AST no sangue dos ratos	39
4.4.2	Efeitos sobre a concentração de ALT no sangue dos ratos	40
4.5	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos sadios intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de GSH no sangue e no fígado dos animais	41
4.5.1	Efeitos sobre a concentração de GSH no sangue dos ratos	41
4.5.2	Efeitos sobre a concentração de GSH no fígado dos ratos	42
4.6	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos sadios intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de MDA no sangue e no fígado dos animais	43
4.6.1	Efeitos sobre a concentração de MDA no sangue dos ratos	43
4.6.2	Efeitos sobre a concentração de MDA no fígado dos ratos	44
4.7	Efeitos sobre a concentração de MPO no fígado dos ratos	45
4.8	Resumo dos achados laboratoriais .....	46
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
7	<b>REFERENCIAS</b> .....	52
8	<b>APÊNDICES</b> .....	59
	APÊNDICE A- Pesos dos animais e do fígado.....	59
	APÊNDICE B-Marcadores de lesão hepática.....	60
	APÊNDICE C-Marcadores do estresse oxidativo.....	61
	APÊNDICE D- Marcadores da lipoperoxidação.....	62
	APÊNDICE E -Marcadores inflamatórios no fígado.....	63
	APÊNDICE F - Gráfico padrão para o cálculo da atividade da MPO.....	64
	APÊNDICE G -Gráfico padrão para o cálculo da concentração de GSH no fígado.....	65
	APÊNDICE H - Gráfico padrão para o cálculo da concentração de GSH no soro.....	66
9	<b>ANEXOS</b> .....	67
	..ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética.....	67

## 1 INTRODUÇÃO

Os aminoglicosídeos, introduzidos no arsenal terapêutico há quase 70 anos, continuam a ser um dos fármacos utilizados em pacientes portadores de infecções graves, incluindo septicemia, endocardite bacteriana e outras produzidas por bacilos Gram negativos. (BEGG.;BARCLAY, 1995). A absorção dos aminoglicosídeos é complexa e envolve vários componentes da membrana celular bacteriana que são regulados pelas condições de crescimento, pH, osmolaridade, concentração de cátions divalentes, fonte de carbono e poliaminas (MEDEIROS *et al.*, 1971).

Os aminoglicosídeos são formados por dois ou mais aminoácidos unidos por ligação glicosídica do núcleo de hexose que normalmente se encontra numa posição central. Esta hexose ou aminociclitol é a estreptidina ou a 2-desaxiestreptamina (BUSSE; WOSTMANN; BAKKER, 1992). Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica através de sua ligação na subunidade ribossômica 30s induzindo a leituras incorretas e interrupção prematura da tradução do RNA mensageiro (RNAm) (CHAMBERS, 2006). Os aminoglicosídeos são altamente solúveis em água, estáveis em pH 6 a 8 e possuem estrutura polar catiônica, o que impede a sua absorção oral e dificulta sua penetração no espaço intracelular ou através da barreira hematoencefálica (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os fármacos bactericidas tem como alvo o ribossomo, um complexo de ribonucleoproteína responsável pela síntese de cadeias polipeptídicas, baseadas em informações contidas no RNAm. (SETNY, P.; TRYLSKA, 2009). A ligação dos antibióticos ao sítio A da região decodificadora, na porção 16S da subunidade 30s do ribossoma bacteriano tem como consequência uma falha na tradução e seleção dos aminoácidos, com formação de proteínas aberrantes. Estas proteínas são utilizadas na formação da membrana bacteriana, destruindo a sua semipermeabilidade e produzindo a morte do microorganismo (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2009).

## 1.1 Hepatotoxidade da gentamicina

Praticamente toda substância introduzida no organismo, após sua absorção pelo trato intestinal, tem o fígado com órgão fundamental no processo metabólico. Por outro lado, a maioria das drogas e xenobióticos são lipofílicos, o que possibilita a sua travessia através das membranas celulares (WEINSHILBOUM 2003). Os processos bioquímicos realizados pelos hepatócitos tornam essas substâncias ainda mais hidrofílicas, originando produtos hidrossolúveis que são excretados na urina ou bile (GUENGERICH 2001).

A lesão hepática produzida por fármacos é classificada em como intrínseca ou idiopática. A primeira (hepatotoxicidade intrínseca) é considerada como sendo dose-dependente e previsível, enquanto que a segunda (hepatotoxicidade idiopática) advém independentemente da dose administrada e ocorre de forma totalmente imprevisível (RUSSMAN *et al.*, 2009). Laboratorialmente, a lesão hepática pode ser definida como hepatocelular ou citolítica, colestática e mista, na dependência dos valores de alanina-transferase (ALT) e fosfatase alcalina e da relação entre esses parâmetros (MATOS; MARTINS, 2005; LOZANO-LANAGRÁN *et al.*, 2011)

Os aminoglicosídeos são conhecidos há quase 70 anos, e constituem uma grande família de potentes antibióticos. O primeiro a ser introduzido no tratamento de infecções bacterianas foi a estreptomicina, em 1944. Dezenove anos mais tarde, em 1963, a gentamicina (GM) foi isolada do actinomiceto *Micromonospora purpurea*. (BEGG; BARCLAY, 1995).

Os efeitos tóxicos da GM são conhecidos há muito tempo. (LOPEZ-NOVOA *et al.*, 2011). Lv *et al.* (2010) trataram ratos Sprague-Dawley com 200mg de GM aplicada em dose única, por gavagem, e constataram efeitos tóxicos e oxidativos no coração, no rim e no fígado desses animais. Várias publicações abordando os efeitos nefrotóxicos e ototóxicos de GM estão disponíveis na rede mundial mas estudos investigando os efeitos hepatotóxicos da droga ainda são escassos. Um desses estudos demonstrou que a administração intraperitoneal de GM durante 8 dias induzia uma lesão hepática, demonstrada pelo aumento marcante das atividades de aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) de soro (AL-KENANNY; AL-HAYALY; AL-BADRANY, 2012). Em uma publicação mais recente, a hepatotoxicidade foi induzida no fígado

de ratos após administração de GM(100 mg/kg) por via intraperitoneal durante três dias consecutivos. A hepatotoxicidade foi comprovada pelo aumento dos níveis séricos de ALT e AST (ADEMILUYI *et al.*, 2013).

## 1.2 - Estresse oxidativo

Durante o metabolismo basal normal das células aeróbicas há uma produção constante de espécies reativas de oxigênio, conhecidas genericamente como radicais livres. Concomitantemente ocorre uma contínua inativação desses radicais livres através da ação de antioxidantes, cuja finalidade é a manutenção da integridade estrutural e funcional das biomoléculas. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). Nos mamíferos, no tecido oxigenado, o oxigênio sofre redução tetravalente, com a aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água, radicais superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroperoxila ( $H_2O^{\bullet}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Cabe aos sistemas protetores do organismo a desativação dos radicais livres (RL), sendo essa capacidade fundamental para segurar a reversibilidade das lesões e a prevenção da morte celular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

Sob condições fisiológicas, o balanço entre os agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a redução das defesas antioxidantes. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Quando ocorre o estresse oxidativo só restam aos organismos vivos três alternativas: 1) adaptação, por aumento da atividade dos sistemas antioxidantes; 2) lesão tecidual, por agressão aos lipídios, carboidratos ou proteínas; 3) morte celular, por necrose ou apoptose (DRÖGE, 2002).

A Glutathiona (GSH) é o tiol de baixo peso molecular (0.5-10 mM/L) mais abundante nas células animais. A concentração de GSH mitocondrial é semelhante a do citosol (10-14 mM) (MARI *et al.*, 2009). A maior concentração de GSH é encontrada no fígado, um órgão importante nos processos de detoxificação e eliminação de toxinas. No fígado humano são encontrados 6,400 mmol/kg. (CHAPPLE, 1996; DHIVYA, 2012), enquanto que no plasma os valores encontrados são relativamente baixos (2-20  $\mu$ mol/L) (WU *et al.*, 2004).

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta (DENEKE; FANBURG, 1989).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos RL sobre os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, podendo evoluir até a morte celular (BENZIE, 1996). A LPO tem início quando RL dotados de elétrons desemparelhados, promovem a remoção de um átomo de hidrogênio de um grupamento metileno (-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•). Esses radicais peroxila podem extrair um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídio, estabelecendo assim a propagação da reação. O novo radical, ao reagir com o oxigênio, origina novo radical peroxila, permitindo que a reação da peroxidação lipídica se torne contínua, pela repetição dos ciclos oxidativos (LLESUY, 2002).

À medida que as reações em cadeia se processam, proteínas de transporte ou enzimas de membrana podem ser inativadas ou pode ocorrer aumento da permeabilidade da bicamada lipídica da membrana, alterando a homeostase. Finalmente, na etapa de conclusão, ocorre a formação de um intermediário instável (tetróxido), a partir dos radicais peroxila (mecanismo de Russell), que sofre decomposição, originando oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e grupos carbonila excitados, entre outros produtos (LLESUY, 2002).

### 1.3 - Efeitos protetores do alho

O alho (*Allium sativum*) vem sendo usado na medicina popular e na culinária desde a antiguidade. Estudos prévios mostraram que o alho possui inúmeras atividades biológicas, tais como atividade anticancerígena, antimicrobiana, antiaterosclerótica, anti-hipertensiva, imunomodulatória e antioxidante (AGARWAL, 1996; AMAGASE *et al.*, 2001; BANERJEE; MUKHERJEE; MAULIK, 2003; VAZQUEZ-PRIETO *et al.*, 2011).

Vários são os componentes sulfatados do alho com propriedades medicinais, sendo a alicina (dialil-tiosulfinato) o componente biológico mais ativo e que representa 70% dos compostos sulfatados existentes no alho (MIRON *et al.*, 2000). O odor característico do alho é produzido pela presença de alicina (dialil-tiosulfinato) e outros componentes sulfúricos solúveis em óleo (CRAIG, 1999; AMAGASE *et al.*, 2001).

A alicina elimina fungos e inibe o desenvolvimento de bactérias que se encontrem à sua volta, e tem poder antioxidante provocando uma reação instantânea com os grupos livres de tiol, penetrando facilmente nas células biológicas e desativando as suas enzimas (MIRON *et al.*, 2000).

O óleo de alho (OA) exerce seus efeitos protetores no estresse oxidativo, modulando os níveis de antioxidantes e de peroxidação lipídica, atuando na eliminação de radicais livres (PERCHELLET *et al.*, 1986; BOREK, 2001). e aumentando o conteúdo de GSH intracelular (KIM *et al.*, 2001; SHAARAWY *et al.*, 2009). Além disso, o OA suprime a formação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, aumentando a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatiónperoxidase (GPx). (BOREK, 2001).

Ademiluyi *et al.* (2013) condicionaram ratos com rações contendo 2 e 4% de alho durante 27 dias; posteriormente os ratos foram tratados com a administração intraperitoneal de GM 100mg/kg/dia, durante apenas 3 dias, para indução da hepatotoxicidade. Trinta dias mais tarde os animais foram sacrificados, ficando evidente o efeito protetor do alho *in natura* sobre o estresse oxidativo.

#### **1.4- Efeitos da Acupuntura e da Eletroacupuntura**

A acupuntura (Ac) é uma modalidade terapêutica originária da China, onde é praticada a milênios. Segundo Pai (2005) não se pode estabelecer uma data precisa para o aparecimento da acupuntura, porque as suas origens perdem-se no tempo. No Brasil, embora praticada informalmente há muitos anos, somente foi reconhecida como especialidade médica, pelo Conselho

Federal de Medicina, em 1995, conforme a resolução normativa 1455 e pela Associação Médica Brasileira (AMB) em 1998 (PAI, 2005).

O uso da acupuntura em animais é, acredita-se, tão antigo quanto a história da acupuntura humana. Um documento descoberto no Sri Lanka sobre o uso de acupuntura em elefantes indianos sugere que o uso de acupuntura no tratamento de animais vem sendo praticado há mais de 3000 anos (ALTMAN,1997).

Os locais escolhidos para a inserção das agulhas de acupuntura são denominados "acupontos". Esses locais foram empiricamente determinados no transcorrer de milhares de anos de prática médica. Trata-se, na realidade, de uma região da pele em que é grande a concentração de terminações nervosas sensoriais e tem uma relação íntima com os nervos, vasos sanguíneos tendões, periosteos e cápsulas articulares (DING-ZONG,1990). Estudos demonstraram a presença de um grande número de mastócitos nos ratos, sendo esse número ainda maior nos acupontos. Finalmente é importante salientar que os acupontos possuem propriedades elétricas diversas das áreas adjacentes: condutância elevada, menor resistência, padrões de campo organizados e diferenças de potencial elétrico (ALTMAN, 1992).

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 (JAGGAR, 1992; SCHOEN, 1993). A eletroacupuntura (EAc) é um método terapêutico utilizado para potencializar os efeitos da acupuntura manual e consiste na aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade e frequência variável em agulhas metálicas introduzidas no corpo do animal ou ser humano. Lin *et al.* (2004) demonstraram que a EAc de 2 Hz acelera a liberação de peptídeos opiáceos endógenos produzidos pelas glândulas suprarrenais. Estudos revelaram que quando baixas (2Hz) e altas (100Hz) frequências são utilizadas consecutivamente com duração de 3 segundos, há liberação simultânea de três tipos de peptídeos opiáceos (encefalinas, endorfinas e dinorfinas) (CHEN; HAN, 1992).

Estudos demonstraram que correntes elétricas de diferentes intensidades, quando usadas para eletroestimulação, desempenham diferentes efeitos no organismo. Em geral, baixas intensidades, produzem efeitos

mínimos enquanto que maiores intensidades produzem efeitos mais acentuados em estudos clínicos e experimentais (CHESTERTON *et al.*, 2003; MORAN *et al.*, 2011; SHUKLA *et al.*, 2011; SATO *et al.*, 2012).. Por outro lado, a frequência da estimulação elétrica é importante, pois mesmo quando se usa a mesma intensidade de corrente são produzidos efeitos diferentes. Acreditava-se que um tempo de estimulação maior apresentaria melhores resultados. Entretanto, em estudos conduzidos por pesquisadores da Universidade Federal do Ceará ficou evidenciado que a EAc, quer utilizando baixa (até 10 Hz) ou alta frequência (acima de 10 até 100 Hz), tem efeitos protetores sobre o estresse oxidativo, em ratos, independentemente do tempo de estimulação. No estudo desenvolvido por Acioli *et al.* (2014) os ratos receberam eletroestimulação durante 5 minutos, no ponto E29 (Gulai) localizado no abdome. Um outro estudo, conduzido por Silva *et al.* (2011) demonstrou que a estimulação elétrica durante 30 minutos, usando 10 e 100 Hz induz um aumento significativo das concentrações de GSH no fígado e no rim de animais saudáveis.

Yinet *al.* (2006) demonstraram que a aplicação da acupuntura manual no acuponto VB34 (*Yanglingquan*) reduza toxicidade, protege o tecido hepático e normaliza a atividade imune em ratos intoxicados por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). Segundo a Medicina Tradicional Chinesa (MTC), as funções do acuponto VB34 são regular e tonificar o fígado, a vesícula biliar e facilitar o fluxo suave do *Qi* (termo médico oriental para "energia vital"). O acuponto VB34 é usado clinicamente para tratamento da icterícia, hepatite aguda, doenças biliares, cirrose do fígado e hipertensão devido ao excesso de Yang do fígado (ROSS, 2003). O acuponto E36 (*Zusanli*) combinado ao VB34 é usado para tratamento de hepatites, enquanto que o acuponto R3 (*Taixi*) está indicado para tratamento de inflamações do rim (nefrites) (WEN, 2008)

## 1.5 Justificativa e relevância

Cada profissional que lida com o tratamento de infecções sonha com a descoberta de uma medicação ou terapia capaz de eliminar as bactérias invasoras que se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos hoje conhecidos. Quando houve a descoberta dos aminoglicosídeos pensou-se que

se teria ali um medicamento eficaz contra os diversos agentes infectantes responsáveis pelas mortes de indivíduos debilitados. O fator limitante do uso da gentamicina é, sem sombra de dúvida, seus efeitos colaterais, ototóxicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos, produzindo lesões irreversíveis nos citados órgãos. Embora seu uso tenha se tornado menos freqüente, tendo em vista a descoberta de outros antibióticos igualmente ou mais eficazes, embora de custo mais elevado, o que dificulta seu uso por pacientes de menor poder aquisitivo, a GM continua tendo seu lugar no arsenal terapêutico atual. . Nesses casos, a utilização da gentamicina, isoladamente ou mesmo associada a outros fármacos ainda é uma opção terapêutica que não deve ser menosprezada. Justifica-se assim a busca por alternativas terapêuticas que possam diminuir os efeitos adversos desse aminoglicosídeo.

Tendo como fundamento as pesquisas apresentadas, este estudo foi concebido para analisar os efeitos do óleo de alho e da acupuntura/eletroacupuntura sobre a inflamação e o estresse oxidativo, no fígado de ratos previamente saudáveis e experimentalmente intoxicados com altas doses de GM. Para comprovação dos possíveis efeitos protetores do óleo de alho, da Ac e da EAc nesses animais foram estudadas as alterações dos marcadores de lesão hepática (aspartato amino transferase - AST e alanina amino transferase - ALT), do estresse oxidativo (glutathiona reduzida - GSH e MDA) e da inflamação (mieloperoxidase - MPO). Não foram encontrados na literatura médica trabalhos semelhantes, o que confere ineditismo à presente pesquisa.

## **2 OBJETIVO**

- **OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos modulatórios do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura no estresse oxidativo e na inflamação induzidos por gentamicina no fígado de ratos.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Avaliar o estresse oxidativo e a inflamação hepática em ratos Wistar intoxicados por gentamicina;
- 2) Avaliar o possível efeito hepatoprotetor do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura em ratos Wistar intoxicados por gentamicina.

### **3 MÉTODO**

#### **3.1 Aspectos Éticos**

O estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais e aprovado em reunião realizada em 12 de dezembro de 2014, protocolo nº 04/2014 (Anexo A).

Foram observados os Princípios Éticos na Experimentação Animal e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) na execução do projeto.

Por tratar-se de projeto compartilhado entre dois pesquisadores, a parte geral do estudo tem vários parágrafos semelhantes. Foram usados os mesmos animais, com análise de diferentes órgãos e compartilhamento dos resultados. Este projeto investigou, especificamente, a inflamação hepática e o estresse oxidativo sistêmico (no soro) e local (no tecido hepático) em animais intoxicados com altas doses de gentamicina.

#### **3.2 Tipo de Estudo e Amostra**

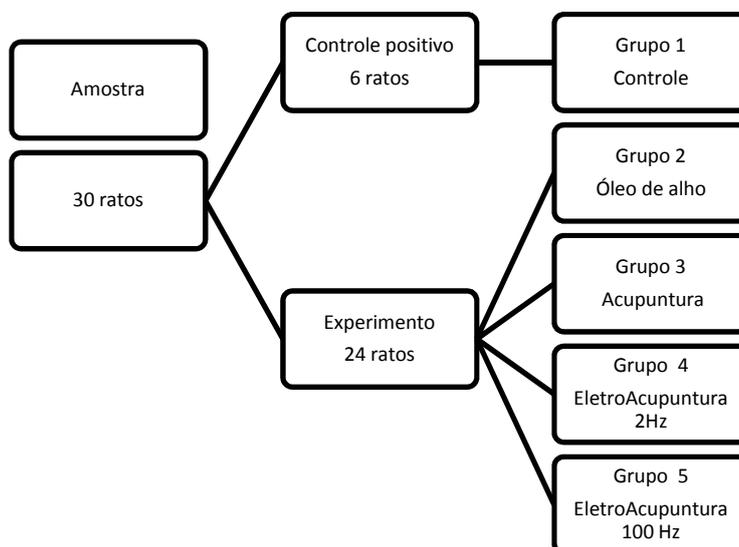
Trata-se de um estudo prospectivo, controlado e comparativo entre cinco grupos de ratos Wistar submetidos aos efeitos hepatotóxicos da gentamicina (GM) para o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo. Foram utilizados 30 ratos, com idade de 12 a 14 semanas, machos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, Rodentia, Mammalia) e peso variando de 267 a 373 g, 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. 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*. A higienização das gaiolas e o cuidado dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável. Os ratos foram previamente aclimatados por um período de 7 dias antes da realização do experimento. Os procedimentos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

### 3.3 Distribuição da Amostra

Trinta (30) ratos foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos de seis animais, assim denominados: G1 – **CT** (Controle), G2- Oleo de alho G3**Ac**- (Acupuntura), G4– **EAc2** (Eletroacupuntura 2 Hz), G5 – **EAc100** (Eletroacupuntura 100 Hz.). A figura 1 mostra a distribuição dos grupos.

Figura 1 - Distribuição dos grupos



### 3.4 Indução da hepatotoxicidade

Para a indução da hepatotoxicidade todos os animais (Grupos G1-G5) receberam GM (gentamicina injetável, 80 mg/2ml, SANTISA LABORATÓRIO FARMACÊUTICO, Bauru - SP) durante 5 dias consecutivos. O aminoglicosídeo foi aplicado por via intraperitoneal (IP) na dose de 100mg/Kg de peso do animal, acrescentando-se soro fisiológico (SF) até completar 1,0ml. A dose de GM foi selecionada tendo por base o trabalho de Ademiluyi *et al.* (2013).

### 3.5 Delineamento experimental

O Quadro 1 apresenta, em detalhe, as diversas fases do experimento

Quadro 1 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL					
Grupos (n=6)	Indução da toxicidade		Tratamento	Coleta de amostras	
	Dias 1-5		Dias 7 - 16	Dia 19	
G1 GM +óleo de oliva (controle)	GM 100mg/Kg, diluídos em SF até completar 1,0 ml, em dias alternados, por via intraperitoneal	REPOUSO (24 horas)	Óleo de oliva 1,0 ml por gavagem em dias alternados, durante 10 dias	REPOUSO (48 horas)	Coleta de 3,0 ml de sangue arterial e remoção do fígado para análises bioquímicas (AST, ALT, MDA, GSH e MPO) sob anestesia geral (Hidrato de Cloral) i.p. Após coleta, os animais receberam dose triplicada de anestésico para induzir o óbito
G2- GM + Óleo alho +óleo de oliva			Óleo de alho <sup>[1]</sup> , acrescido de óleo de oliva para completar 1,0 ml por gavagem, em dias alternados, durante 10 dias		
G3-GM +Ac			Ac, 20 minutos em dias alternados, durante 10 dias		
G4 - GM + EAc 2 Hz			EAC <sup>[2]</sup> , 2 Hz, 20 minutos em dias alternados, durante 10 dias		
G5 - GM + EAc 100 Hz			EAC <sup>[2]</sup> , 100 Hz, 20 minutos em dias alternados, durante 10 dias		
<p><b>Notas:</b><sup>[1]</sup> óleo de alho = 100mg/kg <sup>[2]</sup> EAC = corrente elétrica com intensidade de 1,0 mA e 2 ou 100 Hz de frequência, pulsos quadrados com duração de 2 segundos, ondas tipo Burst, com intervalo (repouso) de 2 segundos.</p>					

### 3.6 Condicionamento dos ratos

Para realizar os procedimentos (Ac e EAc) sem a utilização de anestésicos, os ratos foram colocados em dispositivos de contenção semelhantes as redes utilizadas por nordestinos, com aberturas para a saída dos membros, suspensas em um arco metálico confeccionado para tal finalidade e onde os animais ficaram em repouso, por 20 minutos, durante 6 dias consecutivos. A falta de apoio para as patas os impedia de se locomoverem. No primeiro dia houve tentativa de fuga, mas os ratos logo se acostumaram e permaneciam calmos, necessitando apenas a imobilização dos membros pélvicos com tiras de esparadrapo fixado às estruturas metálicas, para a aplicação da Ac e da EAc (Figura 2).

Figura 2 - Rato posicionado na rede, para aclimação (preparação para as sessões de Ac e EAc).



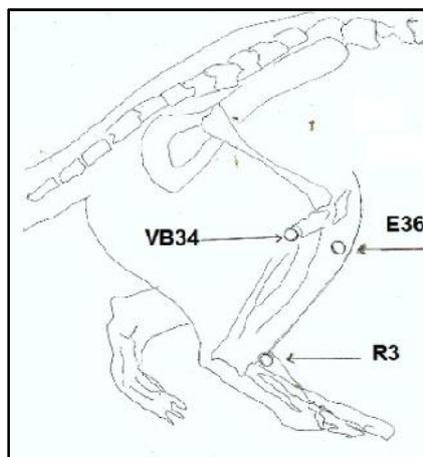
Fonte: o autor (2015)

### 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. Um estudo mais completo foi apresentado por Yin *et al.* (2008), mapeando 121 acupontos. O acuponto *Zusanli* (E-36) se localiza, no rato, 5 mm abaixo da cabeça fibular e 2 mm lateral ao tubérculo anterior da fíbula;

transitam, nessa região os ramos laterais do nervo sural cutâneo, o ramo cutâneo do nervo safeno e o ramo profundo do nervo peroneal (MARTINS; GARCIA, 2003; YIN *et al.*, 2008). O VB-34 se localiza, no homem, na depressão anterior e inferior da cabeça fibular; transitam, nessa região, os ramos laterais do nervo suralcutâneo e o ramo profundo do nervo fibular (MARTINS; GARCIA, 2003). O acuponto *Yanglingquan* (VB34): está localizado, no rato, na depressão anterior e inferior à cabeça da fíbula, (YIN *et al.*, 2008). O Acuponto *Taixi* (R-3) se localiza, no homem, na face medial do pé, entre a parte mais saliente do maléolo interno e o tendão do calcâneo e é usado clinicamente para tratar distúrbios inflamatórios do sistema urinário, incluindo nefrite e cistite, entre outras doenças (MARTINS; GARCIA, 2003). No rato o acuponto R-3 se localiza na face medial do pé, posterior ao maléolo medial, em uma depressão entre a ponta do maléolo medial e o calcâneo (LI *et al.*, 2011). A Figura 3 ilustra o posicionamento das agulhas no membro pélvico dos ratos.

Figura 3 - Desenho identificando o local de inserção das agulhas, no membro pélvico direito do rato



Fonte: o autor(2015)

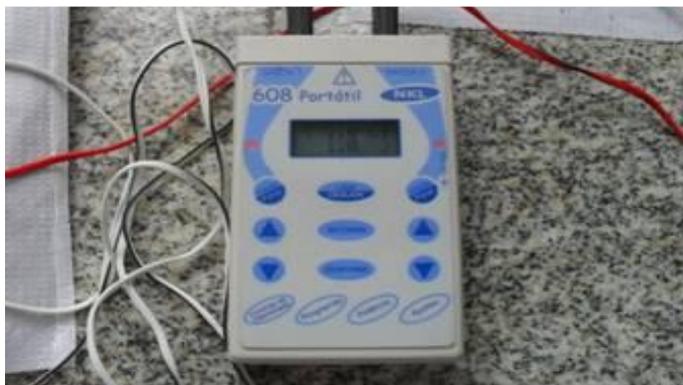
### 3.8 Tratamentos (Ac, EAc e gavagens)

No 6º dia do experimento foi iniciada a segunda etapa do estudo. Sessões de AC, EAC 2Hz e EAC 100 Hz foram aplicadas aos animais dos grupos 3, 4 e 5, respectivamente, durante 20 minutos nos ratos alojados nos dispositivos de aclimação. Os ratos do Grupo 1 (controle) e Grupo 2 (óleo de

alho) também foram acomodados da mesma maneira que os demais animais antes da gavagem. A gavagem foi administrada aos ratos do Grupo 1 (óleo de oliva, 1,0 ml, - azeite extra virgem, fabricado por SALOV SPA, Massarosa, Italia) e aos ratos do Grupo 2 -óleo de alho, produzido por SOROCAPS FARMACÊUTICA LTDA, Sorocaba, SP) 100 mg/Kg peso, acrescido de óleo de oliva até completar o volume de 1,0 ml). As intervenções (gavagem, Ac e EAc) foram repetidas em dias alternados, durante 10 dias, totalizando 5 (cinco) aplicações para cada grupo.

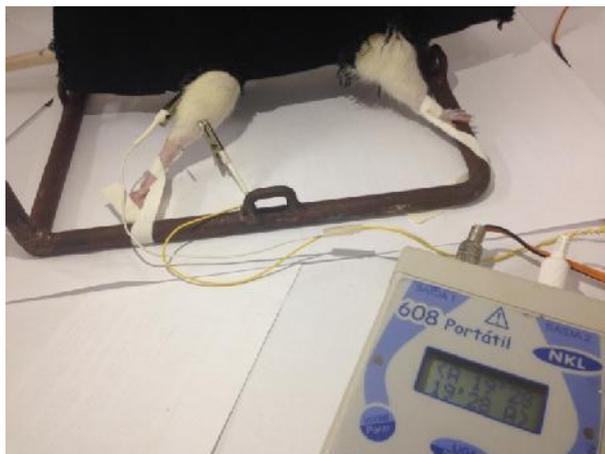
Para a realização da Ac (G3) foram inseridas agulhas metálicas de aço inoxidável, descartáveis, de 0,18 mm de diâmetro / 8 mm de comprimento (modelo DCB 132, fabricadas na China e distribuídas no Brasil por DongBang Produtos de Acupuntura -EPP, São Caetano do Sul – SP). As agulhas foram inseridas no membro pélvico direito, no ponto *Zusanli* (E-36) e nos pontos *Yanglingquan* (VB-34).e *Taixi* (R-3). As agulhas foram retiradas após 20 minutos. Este procedimento foi repetido no mesmo horário (no período da manhã), em dias alternados,perfazendo um total de cinco aplicações. Nos ratos tratados com EAc (G4 e G5), após introdução das agulhas nos acupontos E36 e VB34, eletrodos com garras tipo jacaré, foram conectados às agulhas de acupuntura. No grupo G4 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) (Figura 4) , previamente calibrado pelo fabricante. No grupo G5 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, em dias alternados,perfazendo um total de cinco aplicações(Figura 5).

Figura 4-Eletroestimulador NKL modelo 608  
Fix portátil



Fonte: o autor (2015)

Figura 5 - Detalhe da aplicação da eletroacupuntura. Eletrodos tipo garra conectados às agulhas inseridas no membro pélvico do rato (rato 4, EAc 100 Hz)



Fonte: o autor 2015 (rato 4, EAc 100 Hz)

### 3.9 Coleta de amostras e morte dos animais

Quarenta e oito horas após o término do experimento procedeu-se a colheita de amostras. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (25mg/Kg peso I.P). A seguir, o sangue arterial foi coletado por punção da aorta abdominal, centrifugado (2500 rpm /15 min) e o soro obtido foi

armazenado em temperatura de  $-70^{\circ}$  para posterior análise de parâmetros bioquímicos (aspartato amino transferase - AST, alanina amino transferase - ALT, malonaldeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH) e mieloperoxidase (MPO). O fígado foi lavado em soro fisiológico gelado, pesado e medido, sendo o lobo direito reservado para exames bioquímicos. Após a coleta todos os ratos foram mortos por dose triplicada (overdose) de anestésico.

### **3.10 Determinação das concentrações de AST e ALT**

Foram utilizados "kits" comerciais (AST/GOT LiquiformVet e ALT/GPT LiquiformVet, fornecidos por LABTEST, Lagoa Santa, MG). As determinações foram realizadas segundo as determinações do fabricante, utilizando a fotolorimetria em aparelho de automação laboratorial (LABMAX PLENNO Labtest). Os valores obtidos foram expressos em U/L).

### **3.11 Avaliação da peroxidação lipídica**

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

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

### **3.12 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico(TBARS):**

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

#### Reagentes:

Cloreto de potássio: 1,15%

Ácido tiobarbitúrico: 0,6%

Ácido fosfórico: 1%

N-butanol

Procedimento:

O teor de TBARS ( $\mu\text{mol/g}$  de tecido) foi quantificado pelo método de Uchiyama e Mihara (1978), freqüentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica. A amostra do tecido (fígado) a ser analisado foi congelada em nitrogênio líquido e estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  imediatamente após a coleta e lavagem com soro fisiológico gelado ( $4^{\circ}\text{C}$ ) para remover quaisquer vestígios de sangue. Após pesagem, a amostra de tecido foi homogeneizada em KCl gelado 1,15%, resultando em uma solução ácida com concentração a 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5 ml de cada amostra e acrescentou-se 1,0 ml da solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 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 520nm e 535nm 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 TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão

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

A determinação dos grupos SH foi realizada pelo Método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrozenzóico) (DTNB – reagente de Ellman) com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412nm em espectrofotômetro (VANKEL, 50 UV-VIS, VARIAN, São Paulo, SP).

*Drogas e reagentes*

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Ácido tricloacético (ATC, 50%)

Tampão TRIS 0,4 M pH 8,9

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

Metanol

Glutathiona (GSH, 1 mg/ml).

*Preparação dos reagentes:*

Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

EDTA Na<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*



*Procedimento:*

A amostra de tecido (500 mg) é pesada e homogeneizada em 5 ml de EDTA 0,02M gelado, com bastão de vidro e filtrado em lã de vidro. Retiram-se 4,0 ml do homogenato e mistura-se com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético 50%. O tubo é agitado e centrifugado a 3000 g por 15 minutos. Retiram-se 2,0 ml do sobrenadante e acrescenta-se 4 ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 M; agita-se a mistura para homogeneização. Em seguida, lêem-se as absorbâncias no espectrofotômetro à 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH foi obtida comparando-se o valor da absorbância com uma tabela padrão de GSH, previamente preparada. (APÊNDICES F e G)

### 3.14 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

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

O acúmulo de neutrófilos no tecido foi medido pelo método de dosagem de mieloperoxidase. Após coleta, a amostra foi acondicionada em *ependorf* com buffer gelado (NaCl 0,1 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaEDTA 0,015 M, pH 4,7). O tecido foi pesado e em seguida homogeneizado em Polytron® PT 3100 a 13000 rpm. No pellet foi feita lise hipotônica com solução de NaCl 0,2% e após 30s adição de NaCl 1,6% com glicose 5%. Após centrifugação, o pellet foi ressuspenso em buffer NaPO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e novamente homogeneizado. 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 tetrametilbenzidina (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, preparada previamente (APÊNDICE E). As concentrações de MPO foram expressas em unidade / mg de tecido.

### 3.15 Análise Estatística

A significância da eficácia dos tratamentos sobre os valores de AST, ALT, GSH, TBARS e Atividade da MPO, nos momentos amostrados foi avaliada com o teste de ANOVA /Dunnett quando o pressuposto da normalidade foi identificado com a utilização do teste de Kolmogorov-Smirnov (com os parâmetros de Dallai-Wilkinson-Lilliefors,  $p > 0,05$ ) e expressos como Média ± Erro Padrão da Média (Média ± EPM). Os dados que não obedeceram à curva de normalidade foram analisados por meio de testes não paramétricos (teste de Mann-Whitney com variação das medianas) e os resultados apresentados em mediana e intervalos interquartílicos. Os dados do estudo

foram analisados no software Graphpad Prism versão 5.0 para Windows, considerando-se uma probabilidade de erro de tipo I ( $\alpha$ ) de 0,05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Complicações

Não ocorreram óbitos durante o estudo. Entretanto, a imobilização dos ratos e a indução da hepatotoxicidade pela aplicação da GM condicionaram o aparecimento de alterações clínicas não letais, no curso do experimento.

Durante o processo de aclimação ao repouso no dispositivo (20 minutos, durante 7 dias consecutivos), realizado antes da indução da hepatotoxicidade, vários animais apresentaram irritabilidade, na tentativa de libertação da imobilização forçada, notadamente no primeiro dia. No 6º dia da aclimação os animais já permaneciam calmos e aceitavam tranquilamente a imobilização no dispositivo.

Após o 2º dia de indução da hepatotoxicidade todos os animais apresentaram fezes líquidas ou semi-líquidas. Esse sintoma persistiu até o dia seguinte ao término do processo de indução da hepatotoxicidade. Observou-se ainda a presença de dermatite de contato ao esparadrapo usado na imobilização das patas, notadamente no membro pélvico.

Finalmente, durante a última etapa do experimento (coleta de amostras), realizada com os animais anestesiados por hidrato de cloral, não ocorreram complicações.

### 4.2 Peso dos ratos

Os pesos individuais dos ratos, aferidos no início do experimento, estão apresentados no Apêndice A. A tabela 1 contém os valores (pesos médios) obtidos na pesagem dos animais de cada grupo nas diversas fases do experimento.. Observou-se uma variação de peso inicial 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.

<b>Tabela 1 - Peso médio dos ratos utilizados no estudo</b>				
<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Peso médio</b>		
		<b>Dia 1</b>	<b>Dia 6</b>	<b>Dia 20</b>
<b>G1 - Grupo controle</b>	6	318,33	316,33	347,00
<b>G2 - Grupo óleo de alho</b>	6	332,33	317,50	319,50
<b>G3 - Grupo Acupuntura</b>	6	326,83	307,50	328,83
<b>G4 - Grupo EAc 2 Hz</b>	6	320,00	315,17	332,17
<b>G5 - Grupo EAc 100 Hz</b>	6	347,00	319,50	328,83

Fonte: Elaborada pelo autor

NOTASn = número de ratos de cada grupo

Dia 1 = primeiro dia do experimento, antes da indução da hepatotoxicidade

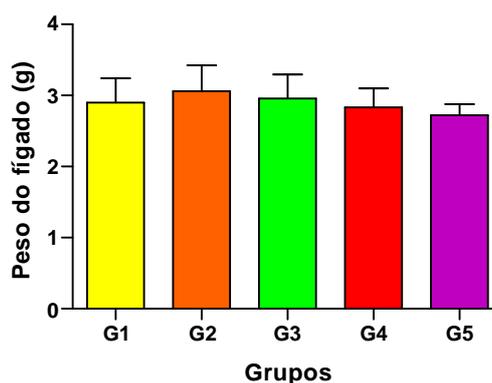
Dia 6 = um dia após a indução da hepatotoxicidade, antes do início dos tratamentos

Dia 20 = quarenta e oito horas após a conclusão dos tratamentos

### 4.3 Peso do fígado

O peso do fígado não apresentou alterações significantes, comparando-se cada grupo ao controle G1 (Figura 6)

Figura 6 - Variação do peso do fígado ao término do experimento.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2015)

NOTA: Teste:ANOVA / Dunnett. Diferenças não significantes

4.4 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT) no sangue de ratos após intoxicação com gentamicina

#### 4.4.1 Efeitos sobre a concentração de AST no sangue dos ratos

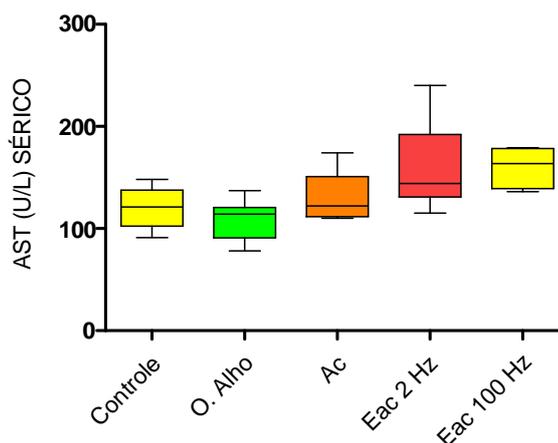
Não foram verificadas diferenças significantes nas concentrações de AST, comparando-se os grupos G2-G5 ao controle positivo G1 (Tabela 2, Figura 7).

Tabela 2 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de aspartato amino transferase (AST) sérica nos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1), após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo

n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	91,00	78,00	110,0	115,0	136,0
Percentil 25	102,3	90,75	111,5	130,8	139,0
Mediana	<b>121,0</b>	<b>114,0</b>	<b>122,0</b>	<b>144,0</b>	<b>163,5</b>
Percentil 75	137,5	120,5	150,8	192,0	178,3
Valor máximo	148,0	137,0	174,0	240,0	179,0

Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz. Ausência de diferenças significantes

Figura 7 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de aspartato amino transferase (AST) sérica nos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1), após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo



Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz. Ausência de diferenças significantes

#### 4.4.2 Efeitos sobre a concentração de ALT no sangue dos ratos

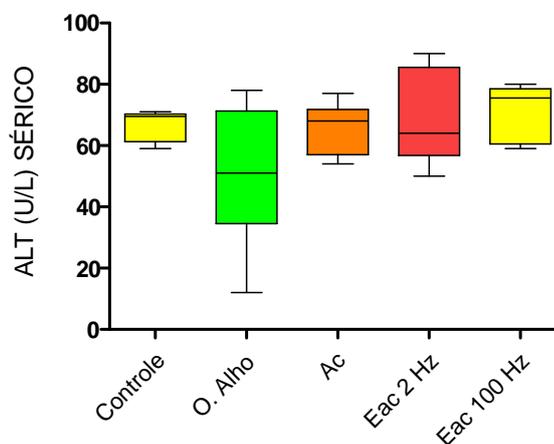
Não foram verificadas diferenças significantes nas concentrações de ALT, comparando-se os grupos G2-G5 ao controle positivo G1 (Tabela 3, Figura 8).

Tabela 3 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de alanina amino transferase (ALT) sérica nos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo

n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	59,00	42,00	54,00	50,00	59,00
Percentil 25	61,25	42,00	57,00	56,75	60,50
Mediana	<b>69,50</b>	<b>51,00</b>	<b>68,00</b>	<b>64,00</b>	<b>75,50</b>
Percentil 75	70,25	71,25	71,75	85,50	78,50
Valor máximo	71,00	78,00	77,00	90,00	80,00

Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz. Ausência de diferenças significantes

Figura 8 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de alanina amino transferase (ALT) sérica nos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo



Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz. Ausência de diferenças significantes

#### 4.5 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no sangue e no fígado de ratos após intoxicação com gentamicina

##### 4.5.1 Efeitos sobre a concentração de GSH no sangue dos ratos

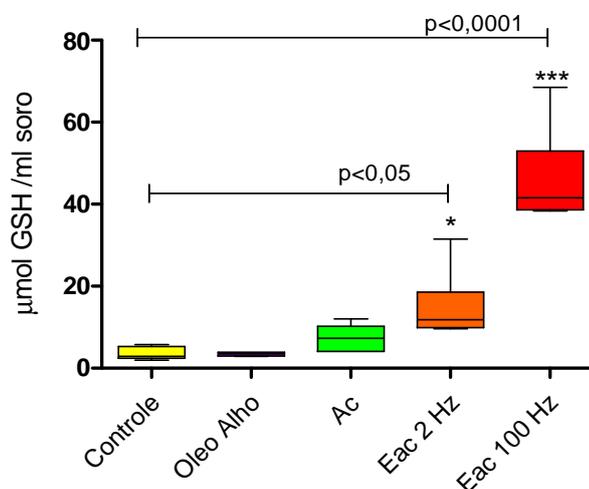
Houve aumento significativo das concentrações de GSH plasmático nos grupos G4 ( $p < 0,05$ ) e G5 ( $p < 0,0001$ ), comparados ao controle positivo. As concentrações de GSH plasmático nos ratos tratados com óleo de alho não foram significativamente diferentes das concentrações aferidas no G1 (Tabela 4, Figura 9).

Tabela 4 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no sangue dos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo.					
n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	1,98	2,91	4,08	9,65	38,36
Percentil 25	2,44	2,96	4,11	9,87	38,62
Mediana	2,88	3,50	7,31	11,82	41,59
Percentil 75	5,30	3,88	10,24	18,58	52,96
Valor máximo	5,78	3,88	12,02	31,50	68,47

Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz

\*  $p < 0,05$ / \*\*\* $p < 0,0001$  comparados ao controle G1

Figura 9 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no sangue dos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo



Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn. Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz. \*  $p < 0,05$ / \*\*\* $p < 0,0001$  comparados ao controle G1

#### 4.5.2 Efeitos sobre a concentração de GSH no fígado dos ratos

Houve aumento significativo das concentrações de GSH no tecido hepático dos grupos G4 ( $p < 0,001$ ) e G5 ( $p < 0,0001$ ), comparados ao controle positivo (Tabela 5, Figura 10).

Tabela 5 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo.

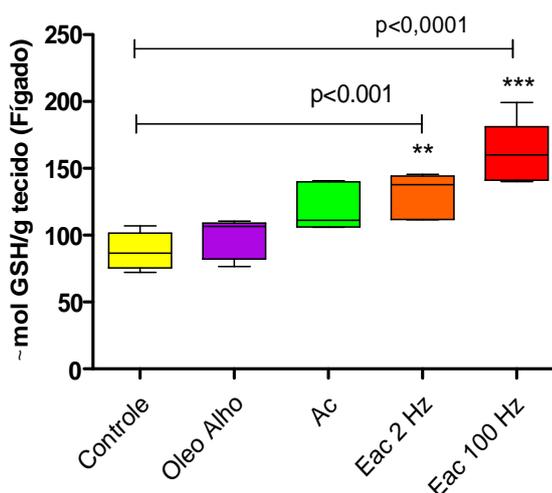
n = 6, cada	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	72,22	76,61	105,90	111,50	140,20
Percentil 25	75,52	82,11	106,10	111,70	141,10
Mediana	<b>86,57</b>	<b>106,60</b>	<b>111,20</b>	<b>137,80</b> **	<b>160,10</b> ***
Percentil 75	101,60	109,10	139,90	144,40	181,10
Valor máximo	107,10	110,60	140,80	145,50	199,40

Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn

Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz

\*\*  $p < 0,001$  / \*\*\* $p < 0,0001$  comparados ao controle G1

Figura 10 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo.



Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn

Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz

\*\*  $p < 0,001$  / \*\*\* $p < 0,0001$  comparados ao controle G1

#### 4.6 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de malondialdeído (MDA) no sangue e no fígado de ratos após intoxicação com gentamicina

##### 4.6.1 Efeitos sobre a concentração de MDA no sangue dos ratos

Não foram verificadas diferenças significantes nas concentrações de MDA, comparando-se os grupos G2-G5 ao controle positivo G1 (Tabela 5, Figura 11).

Tabela 6 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de malondialdeído (MDA) no sangue dos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo

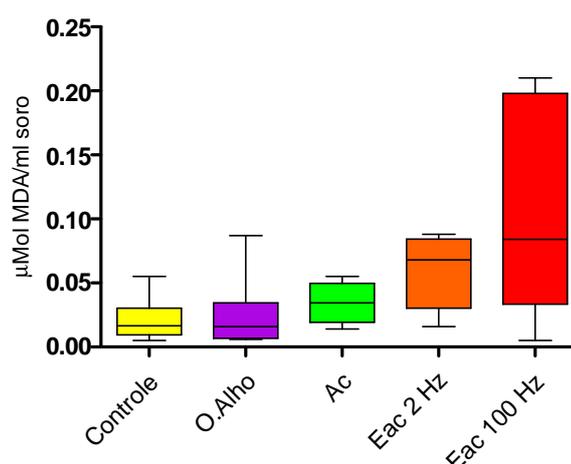
n = 6, cada	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	0,0050	0,0060	0,0140	0,0160	0,0050
Percentil 25	0,0095	0,0067	0,0192	0,0302	0,0335
Mediana	<b>0,0165</b>	<b>0,0160</b>	<b>0,0345</b>	<b>0,0680</b>	<b>0,0840</b>
Percentil 75	0,03025	0,0345	0,0497	0,0842	0,1980
Valor máximo	0,0550	0,0870	0,0550	0,0880	0,2100

Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn

Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz

Diferenças não significantes

Figura 11 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de malondialdeído (MDA) no sangue dos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo



Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn

Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz. Diferenças não significantes

#### 4.6.2 4433'Efeitos sobre a concentração de MDA no fígado dos ratos

Houve aumento significativo da concentração de MDA, comparando-se o grupo G5 ao controle positivo G1 (Tabela 7, Figura 12).

Tabela 7 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de malondialdeído (MDA) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo

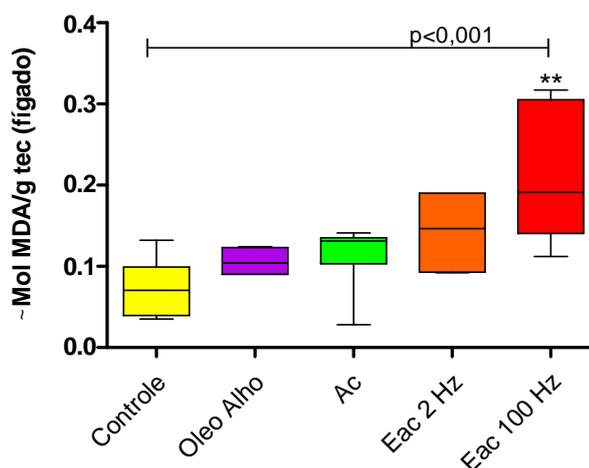
n = 6, cada	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	0,0350	0,0900	0,0280	0,0920	0,1120
Percentil 25	0,0395	0,0900	0,1030	0,0927	0,1405
<b>Mediana</b>	<b>0,0705</b>	<b>0,1040</b>	<b>0,1310</b>	<b>0,1465</b>	<b>0,1910</b> <b>**</b>
Percentil 75	0,0990	0,1233	0,1350	0,1900	0,3050
Valor máximo	0,1320	0,1240	0,1410	0,1900	0,3170

Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn

Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz

\*\*  $p < 0,001$  comparado ao controle G1

Figura 12 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de malondialdeído (MDA) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo



Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn

Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz

\*\*  $p < 0,001$  comparado ao controle G1

#### 4.7 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de mieloperoxidase (MPO) no fígado de ratos após intoxicação com gentamicina

Houve redução significativa da atividade da MPO no tecido hepático dos ratos dos grupos G4 e G5 (Tabela 8, Figura 13)

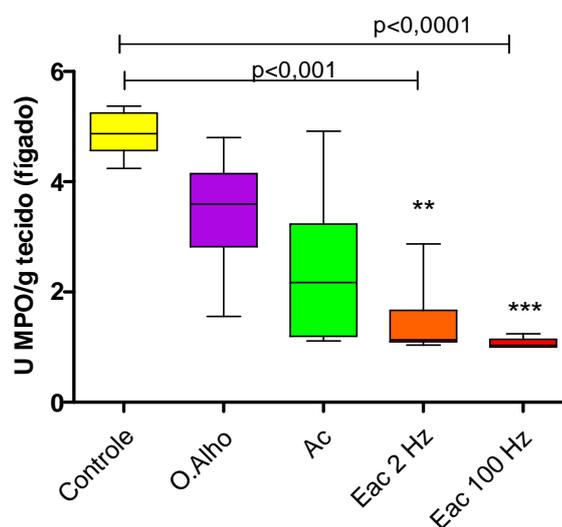
Tabela 8 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz), sobre as concentrações de mieloperoxidase (MPO) no fígado dos ratos dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) após intoxicação com gentamicina, no último dia do estudo.					
n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	4,241	1,558	1,111	1,038	1,001
Percentil 25	4,566	2,820	1,198	1,097	1,001
Mediana	<b>4,875</b>	<b>3,600</b>	<b>2,174</b>	<b>1,130</b> **	<b>1,033</b> ***
Percentil 75	5,250	4,150	3,231	1,669	1,143
Valor máximo	5,374	4,803	4,918	2,872	1,240

Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn

Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100 Hz

\*\*  $p < 0,001$  / \*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao controle G1

Figura 13- Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre a atividade da MPO no fígado dos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo



Fonte: O autor (2015). Teste: Kruskal-Wallis / Dunn

Legendas: G1 - Controle, G2- Óleo de alho, G3 -Ac, G4, EAc 2 Hz, EAc 100

H7

## 4.8 Resumo dos achados laboratoriais (Tabela 9)

A Tabela 9 apresenta um resumo das análises bioquímicas.

Tabela 9 - Resumo dos achados laboratoriais								
Indicador	Sangue (soro)				Tecido (fígado)			
	OA	Ac	EAc 2	EAC 100	OA	Ac	EAc 2	EAC 100
Ureia	S/A	S/A	S/A	S/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Creatinina	S/A	S/A	S/A	S/A	N/A	N/A	N/A	N/A
GSH	S/A	S/A	↑	↑	S/A	S/A	↑	↑
MDA	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	↑
MPO	S/A	N/A	N/A	N/A	S/A	S/A	↓	↓

Legendas:

S/A = sem alterações significantes

N/A = não avaliado

↑ = aumento significativo, comparado ao controle G1

↓ = redução significativa, comparado ao controle G1

Fonte: o autor (2015)

## 5 DISCUSSÃO

Modelos animais têm sido utilizados para estudar os efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura no controle e tratamento de diversas afecções (TANAHASHI et al., 2011; FENG ; ZHANG, 2014; MO et al., 2014; PHUNCHAGO et al., 2015). Sabe-se que desde o ano 500 aC pesquisadores utilizaram animais em estudos anatômicos. Naquela época, Alcmaeon, adquiriu conhecimentos anatômicos através da prática da dissecação de animais. Hipócrates (460 a.C.) utilizava animais em seus estudos com finalidade claramente didática. Anos depois, Aristóteles (384-322 a.C.) realizou estudos comparativos entre órgãos humanos e de animais e observou semelhanças e diferenças no tamanho e função de diversos órgãos. Galeno (129-210 d.C.), em Roma, foi talvez o primeiro pesquisador a realizar a vivissecação com objetivos experimentais. (PETROIANU, 1996;MENEZES, 2002)

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

Vários trabalhos, utilizando modelos animais, já foram realizados nas dependências do Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX) do Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, todos utilizando ratos na pesquisa de efeitos protetores da acupuntura/Eletroacupuntura no estresse oxidativo. (FIGUEIREDO et al., 2011; SILVA et al., 2011; SANTOS et al., 2013; LIMA et al., 2013; ACIOLI et al., 2014)

Para evitar o agravamento do estresse oxidativo, optou-se por realizar as aplicações de Ac e EAc em ratos acordados, sem o uso de anestésicos. Sabe-se que vários anestésicos, entre os quais citam-se o éter dietílico, o halotano e o óxido nitroso, podem desencadear a formação de radicais livres no fígado. Por outro lado, a exposição do rato a uma mistura de óxido nitroso a 50% durante 15 minutos não alterou a função mitocondrial do rato (VAN JAARSVELD et al., 1991). Assim, os animais foram acomodados em dispositivos especialmente elaborados com a finalidade de diminuir o estresse da imobilização por 20 minutos, tempo de aplicação da Ac/EAc. Isso exigiu um condicionamento prévio dos animais. Para tanto os animais foram acomodados

nos dispositivos, com imobilização dos membro pélvicos, durante 20 minutos, durante 7 dias consecutivos. Ao término do período de pre-condicionamento os animais adentravam o dispositivo com facilidade, embora apresentassem tentativa de fuga ocasionalmente.

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

Uma das vantagens da utilização de animais de experimentação é a melhor homogeneidade dos grupos. Os pesos dos animais incluídos no estudo não apresentaram diferenças significantes, no estudo comparativo.

No dia 1 o peso dos ratos variou de 318,33 a 347,0 g em seus respectivos grupos. No dia 6, após a indução da hepatotoxicidade, observou-se uma moderada (-3,86%) redução de peso (variação: 307,5 a 319,5 g). Finalmente, no dia 20 o peso variou de 319,50 a 347,00. Houve recuperação do peso, em relação ao dia 6 do experimento. A ausência de diferenças significantes comparando-se o peso dos ratos tratados com óleo de alho, acupuntura ou eletroacupuntura e o controle positivo pode significar, na nossa percepção, que aminoglicosídeo não foi capaz de induzir lesões histológicas importantes no fígado desses animais.

Annie, Rajagopal e Malini (2005) trataram ratos com GM 40mg/kg/dia por via subcutânea durante 13 dias e observaram que os animais tratados com GM mostraram uma redução inicial do peso no 14<sup>o</sup> dia. Entretanto, no 24<sup>o</sup> dia de tratamento, observou-se um aumento de peso do ratos, comparados aos valores obtidos no 14<sup>o</sup> dia. (ANNIE; RAJAGOPAL; MALINI, 2005).

Os valores normais de AST ( $152,4 \pm 6,5$ ) e ALT ( $61 \pm 2,4$ ) no rato Wistar foram determinados no biotério da Universidade Federal da Paraíba (CASTELLO BRANCO et al., 2011). No presente estudo, nos ratos do grupo controle positivo (ratos previamente sadios tratados com GM) foram constatados os seguintes valores medianos de AST (91 - 148, mediana 121) e ALT (59-71, mediana 69,5), valores esses muito próximos aos valores normais apresentados por Castello Branco et al. (2011). Esses dados permitem admitir que as lesões induzidas pela GM, no presente estudo, foram moderadas em

função de um menor tempo de tratamento (5 dias). Galaly, Ahmed e Mahmoud (2014) administraram GM 100mg/kg em dias alternados durante 21 dias e constataram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de ALT e AST nos ratos tratados com o antibiótico.

No presente estudo houve aumento significativo das concentrações de GSH no sangue dos ratos dos grupos G4 ( $p < 0,05$ ) e G5 ( $p < 0,0001$ ), comparados ao controle positivo. Ocorreu também aumento significativo das concentrações de GSH no tecido hepático dos grupos G4 ( $p < 0,001$ ) e G5 ( $p < 0,0001$ ), comparados ao controle positivo. Por outro lado, as concentrações de GSH no sangue e no fígado dos ratos tratados com óleo de alho não foram significativamente diferentes das concentrações aferidas no G1.

Silva et al. (2011) demonstraram que a EAc aplicada durante 30 minutos, em sessão única, utilizando diferentes frequências (10 e 100 Hz) induz um aumento significativo das concentrações plasmáticas e teciduais de GSH no fígado e rim de ratos tratados com EAc. O efeito protetor da Ac/EAc também foi demonstrado por Lima et al. (2012) em retalhos cutâneos randomizados em dorso de ratos Wistar. Esses pesquisadores demonstraram um aumento significativo das concentrações teciduais e plasmáticas de GSH no 7º dia do experimento, após duas aplicações (dias 3 e 7) de EAc nas frequências de 3 e 100 Hz.

Não foram verificadas diferenças significantes nas concentrações de MDA no sangue dos ratos, comparando-se os grupos G2-G5 ao controle positivo G1. Por outro lado, houve aumento significativo da concentração de MDA hepático, comparando-se o grupo G5 ao controle positivo G1.

Em estudo conduzido por Abdultawabe e Ayuob em 2013, ratos diabéticos induzidos por aloxano e tratados com óleo de alho apresentaram uma redução significativa dos níveis de peroxidação lipídica em homogenatos de tecido hepático, além de aumento significativo dos tióis totais (ABDULTAWAB; AYUOB, 2013). No presente estudo o óleo de alho não alterou os níveis de peroxidação lipídica.

Esses resultados são conflitantes com um estudo realizado por outros pesquisadores. Wang et al. (2011) estudaram os efeitos da EAc em modelo experimental de doença de Parkinson em camundongos e verificaram que o

uso da EAc (100 Hz) reduziu significativamente as concentrações cerebrais de MDA no 7º dia do experimento. Siuet al. (2004) trataram ratos submetidos aos efeitos da isquemia/reperfusão cerebral com EAc (2 Hz, 30 min) em sessão única e demonstraram diminuição da peroxidação lipídica.

Houve redução significativa da atividade da MPO no tecido hepático dos ratos dos grupos G4 e G5. Esses achados confirmam a atividade antiinflamatória da EAc. Por outro lado a administração de óleo de alho não produziu efeitos moduladores sobre a inflamação. Brucketal (2005) foram os primeiros pesquisadores que elucidaram os efeitos antiinflamatórios da alicina no fígado em um modelo *in vivo* de hepatite imune-mediada. Os autores demonstraram que o uso da alicina atenua as lesões hepáticas provavelmente por causa de seus efeitos imunomoduladores, efeitos sobre as células T e moléculas de adesão e a inibição da ativação de NF-kB.

Uma revisão cuidadosa deste estudo demonstra algumas fragilidades. Em primeiro lugar, nota-se a ausência de um grupo controle basal para se verificar os valores dos diversos indicadores antes do início dos experimentos. Outro fato importante é a ausência de um grupo controle tratado apenas com óleo de oliva. Sabe-se que esse óleo pode ter um efeito protetor sobre o estresse oxidativo, segundo afirmam Nakhiet al.(2010). Como o óleo de alho foi misturado ao óleo de oliva poderia haver um efeito positivo no grupo tratado apenas com óleo de oliva, diminuindo as diferenças entre os grupos, o que poderia dificultar na detecção de diferenças significantes. Finalmente, foram usados ratos com peso superior aos animais utilizados por outros pesquisadores; ratos mais velhos poderiam ser mais resistentes à hepatotoxicidade.

Esses fatos justificam uma continuação deste projeto, incluindo grupos para condicionamento, cujos resultados seriam comparados a grupos tratados após a indução da hepatotoxicidade, utilizando um maior número de sessões. Espera-se assim que os resultados possam ser mais significativos.

## 6 CONCLUSÃO

A eletroacupuntura, nas frequências de 2/100 Hz exerce um efeito protetor sobre o estresse oxidativo hepático, promovendo um aumento da glutathione reduzida e reduzindo a atividade da mieloperoxidase em ratos intoxicados com altas doses de gentamicina.

A eletroacupuntura na frequência de 100 Hz tem um efeito pro-peroxidativo local, promovendo aumento da peroxidação lipídica no fígado de animais intoxicados com gentamicina.

O óleo de alho, nas doses utilizadas no presente estudo não tem efeito protetor sobre o tecido hepático em animais intoxicados com gentamicina.

## 7 REFERENCIAS

ADEMILUYI AO, OBOH G, OGUNSUYI OB, AKINYEMI AJ. Attenuation of gentamycin-induced nephrotoxicity in rats by dietary inclusion of ginger (*Zingiberofficinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes. **Nutr Health**. 2012 Oct;21(4):209-18. doi: 10.1177/0260106013506668. PMID: 24197862.

ADEMILUYI AO, OBOH G, OWOLOYE TR, AGBEBI OJ. Modulatory effects of dietary inclusion of garlic (*Allium sativum*) on gentamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. **Asian Pac J Trop Biomed**. 2013 Jun;3(6):470-5. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60098-2. PMID: 23730560

AGARWAL KC. Therapeutic actions of garlic constituents. **Med Res Rev**. 1996 16(1):111-24. PMID: 8788216

ALI, B.H., 1995. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. **GenPharmacol** 26, 1477–1487.

ALTMAN, S. **Terapia pela acupuntura na clínica de pequenos animais**. In ETTINGER, S.J. Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato. 3ed. São Paulo: Manole, 1992, V.1, p.454-459.

\_\_\_\_. **Acupuncture therapy in small animal practice**. The Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian, v.19, n.11, p.1233-1245, 1997.

AMAGASE H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. **J Nutr**. 2006 Mar;136(3 Suppl):716S-725S. PMID: 16484550

AMAGASE, H., PETESCH, B., MATSUURA, H., KASUGA, S., ITAKURA, Y., 2001. Intake of garlic and its bioactive components. **J.Nutr**. 131, 955S–962S.

BALAKUMAR P, ROHILLA A, THANGATHIRUPATHI A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? **Pharmacol Res** 62 (2010) 179–186. doi:10.1016/j.phrs.2010.04.004

BANDAY AA, FAROOQ N, PRIYAMVADA S, YUSUFI ANK, KHAN, F. Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate

metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. **Life Sci** 82 (2008) 450–459.

BANERJEE, S.K., MUKHERJEE, P.K., MAULIK, S.K., 2003. Garlic as an antioxidant. **Phytother. Res.** 17, 97–106.

BEGG, E.J.; BARCLAY, M.L. Aminoglycosides--50 years on. **Br J Clin Pharmacol.** 1995 Jun;39(6):597-603. PMID: 7654476

BENZIE IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int J Food Sci Nutr.** 1996 May;47(3):233-61. PMID: 8735779

BOREK, C., 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. **J. Nutr.** 131, 1010–1015.

BRADLEY, J. R.; THIRU, S.; POBER, J. S. Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. **Am J Pathol** 1995;146(1):27-32.

BUSSE HJ; WÖSTMANN C; BAKKER EP. The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins. **J Gen Microbiol.** 1992 Mar;138(3):551-61.

CARMIA, B., 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. **J. Nutr.** 131,1010S–1015S.

CHESTERTON LS, FOSTER NE, WRIGHT CC, BAXTER GD, BARLAS P. Effects of TENS frequency, intensity and stimulation site parameter manipulation on pressure pain thresholds in healthy human subjects. **Pain.** 2003;106:73–80.

CHAMBERS, HF. **Aminoglicosídeos.** In: Brunton, Larence L, Lazo JS, Parker KL, organizadores. Goodman E. Gilman. *As bases farmacológicas de terapêutica.* 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill 2006;1039-54.

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

CHONGHUO, T. **Tratado de Medicina Chinesa**. São Paulo: Roca, 1993.

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

CUZZOCREA, S., MAZZON, E., DUGO, L., SERRAINO, I., DI PAOLA, R., BRITTI, D., DE SARRO, A., PIERPAOLI, S., CAPUTI, A., MASINI, E., SALVEMINI, D., 2002. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 16 450 (1), 67–76.

DENEKE SM, FANBURG BL. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol.** 1989 Oct;257(4 Pt 1):L163-73. PMID: 2572174

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

DURANTE-MANGONI E.; GRAMMATIKOS A.; UTILI R.; FALAGAS M. Do we still need the aminoglycosides? **Intern J Antimicrobial Agents**, v. 33, p.201-205, 2009.

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

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.

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

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

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

KACEW S, BERGERON MG. Pathogenic factors in aminoglycoside-induced nephrotoxicity. **ToxicolLett.** 1990 May;51(3):241-59; discussion 237-9.

KIM, K.M., CHUN, S.B., KOO, M.S., CHOI, W.J., KIM, T.W., KWON, Y.G., CHUNG, H.T., BILLIAR, T.R., KIM, Y.M., 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allylcysteine. **FreeRadic. Biol. Med.** 30, 747–756.

LANAGRAM M, ROBLES M, LUCENA M, ANDRADE R. Hepatotoxicity in 2011 - advancing resolutely. **RevEspEnferm Digest**, 103(9):472-79, 2011.

LI C-R, CHENG Z-D, ZHANG Z-X, KIM A, HA J-M, SONG YY, ZHENG J, CHEN Y-G. Effects of Acupuncture at TaixiAcupoint (KI3) on Kidney Proteome. **Amer J Chin Med**, v.39, n. 4, p. 687–692, 2011.

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

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

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

MATOS L; MARTINS B. Hepatites tóxicas: revisão da literatura. **Rev Soc. Port Med Intern.**, 12(4):239-58, 2005

MEDEIROS, A.A., O BRIEN, T.F., WACKER, W.E.C. AND YOUNG, N.F. Effect of salt concentration on the apparent in vivo susceptibility of Pseudomonas and other Gram-negative bacilli to gentamycin. **J. Infect. Dis.** 124: S59-S64, 1971.

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

MINGEOT-LECLERCQ, M.P., GLUPCZYNSKI, Y., TULKENS, P., 1999. Aminoglycoside: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 43,727–737.

MIRON T, RABINKOV A, MIRELMAN D, WILCHEK M, WEINER L. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. **BiochimBiophysActa**. 2000 Jan 15;1463(1):20-30.

MIRON T, BERCOVICI T, RABINKOV A, WILCHEK M, MIRELMAN D. [3H]Allicin: preparation and applications. **Anal Biochem**. 2004 Aug 15;331(2):364-9. PubMed PMID: 15265743

MORALES A.I; DETAILLE D, PRIETO M, PUENTE A, BRIONES E, ARÉVALO M, LEVERVE X, LÓPEZ-NOVOA JM, EL-MIR MY. Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. **Kidney Int**. 2010 May;77(10):861-9. doi: 10.1038/ki.2010.11. Epub 2010 Feb 17.

MORAN F, LEONARD T, HAWTHORNE S, HUGHES CM, MCCRUM-GARDNER E, JOHNSON MI, RAKEL BA, SLUKA KA, WALSH DM. Hypoalgesia in response to transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) depends on stimulation intensity. **J Pain**. 2011;12:929–935.

OLIVEIRA, J.F.P; CIPULLO, J.P; BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz J Cardio surgery**, 21 (4):444-452, 2006.

PANZER RB. A comparison of the traditional Chinese versus transpositional zangfu organ association acupoint locations in the horse. **Am J Chin Med**. 1993;21(2):119-31. PMID:8237889

PEDRAZA-CHAVERRI, J., BARRERA, D., MALDONADO, P.D., CHIRINO, Y.I., MACIAS-RUVALCABA, N.A., MEDINA-CAMPOS, O.N., CASTRO, L., SALCEDO, M.I., HERNANDEZ-PANDO, R., 2004. S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. **BMC Clin.Pharmacol**. 4 (1), 5.

PERCHELLET, E., ABNEY, L., ZIRNSTEIN, J., BELMAN, S., 1986. Effects of garlic and onion oils on glutathione peroxidase activity, the ratio of reduced/oxidized glutathione and ornithine decarboxylase induction in isolated mouse epidermal cells treated with tumor promoters. **CancerBiochem. Biophys**. 8,299–312.

ROSS J. **Combinações de Pontos de Acupuntura: a chave para o êxito clínico.** São Paulo: Roca, 2003. 490 p.

RUSSMANN S., KULLAC-UBLICK G., GRATAGLIANO I., Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. **Curr Med Chem.**, 16:3041-53, 2009.

SATO KL, SANADA LS, RAKEL BA, SLUKA KA. Increasing intensity of TENS prevents analgesic tolerance in rats. **J Pain.** 2012;13:884–890.

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.

SEDLAK, J.; LINDASAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **AnalBiochem** 1968;25(1):192-205.

SETNY, P.; TRYLSKA J. Search for Novel Aminoglycosides by Combining Fragment-Based Virtual Screening and 3D-QSAR Scoring. **JChem Information and Modeling**, v.49, p.390-400, 2009.

SHAARAWY, S.M., TOHAMY, A.A., ELGENDY, S.M., ABD-ELMAGEED, Z.Y., BAHNASY, A., MOHAMED, M.S., KANDIL, E., MATROUGUI, K., 2009. Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. **Int. J. Biol. Sci.** 5, 549–557.

STOJILJKOVIC N.; STOJILJKOVIC B.; RANDJELOVICA P.; VELJKOVICA S.; SZCZEPANSKA M.; ADAMCZYK P.; ZIORA K.; SZCZEPA S.K.I.T. Rasburicase in the treatment of acute kidney injury in a boy with non-malignant hyperuricemia. **Pediatrics Polska**, v.87, n.5, p.521-4, 2012.

SHUKLA S, TOROSSIAN A, DUANN JR, LEUNG A. The analgesic effect of electroacupuncture on acute thermal pain perception--a central neural correlate study with fMRI. **Mol Pain.** 2011;7:45.

TANAHASHI N, SHIKAMI J, YONEDA M, ISHIDA T. Effects of manual acupuncture at GB34 on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **J Acupunct Meridian Stud.** 2011 Dec;4(4):214-9. doi: 10.1016/j.jams.2011.09.012.

VAZQUEZ-PRIETO MA, RODRIGUEZ LANZI C, LEMBO C, GALMARINI CR, MIATELLO RM. Garlic and onion attenuates vascular inflammation and oxidative stress in fructose-fed rats. **J Nutr Metab.** 2011;2011:475216. doi: 10.1155/2011/475216. Epub 2011 Aug 25. PMID:21876795

WEN, T.S. **Manual Terapêutico de Acupuntura.** Hsing, W.T. ed. ;Manole, SP 2008. 401 p.

**APENDICE A**  
**Pesos dos animais e do fígado**

Peso dos ratos (g) antes do início do experimento					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	325	336	356	305	365
2	322	335	321	333	337
3	343	309	315	306	321
4	333	325	309	333	353
5	320	316	360	328	367
6	267	373	300	315	339

Peso dos ratos (g) ao término experimento					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	325	336	356	305	365
2	322	335	321	333	337
3	343	309	315	306	321
4	333	325	309	333	353
5	320	316	360	328	367
6	267	373	300	315	339

Peso do fígado ao término do experimento					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	2,85	2,87	3,38	2,79	2,87
2	2,25	3,29	2,94	2,92	2,53
3	2,9	2,41	3,23	2,59	2,8
4	3,22	3,37	2,42	2,58	2,54
5	3,11	3,32	2,99	3,3	2,89
6	3,06	3,09	2,78	2,83	2,69

## APENDICE B

### MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA

AST					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	106,0	114,0	110,0	136,0	179,0
2	91,0	95,0	125,0	240,0	172,0
3	148,0	114,0	119,0	136,0	140,0
4	134,0	78,0	174,0	152,0	155,0
5	117,0	137,0	112,0	176,0	178,0
6	125,0	115,0	143,0	115,0	136,0

ALT					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	69,0	12,0	70,0	59,0	74,0
2	59,0	55,0	77,0	90,0	77,0
3	71,0	78,0	68,0	66,0	78,0
4	70,0	42,0	68,0	84,0	61,0
5	62,0	69,0	58,0	62,0	80,0
6	70,0	47,0	54,0	50,0	59,0

## APENDICE C

### MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

GSH - Sangue					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
<b>1</b>	1,975	2,971	4,084	11,027	47,790
<b>2</b>	2,590	3,469	4,113	31,503	38,357
<b>3</b>	5,139	2,912	12,022	12,608	43,923
<b>4</b>	3,147	3,879	9,650	9,943	38,709
<b>5</b>	5,783	3,527	8,449	14,278	68,471
<b>6</b>	2,619	3,879	6,164	9,650	39,265

GSH - Fígado					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
<b>1</b>	92,14	105,03	105,91	142,23	149,85
<b>2</b>	72,22	108,25	106,20	133,44	140,18
<b>3</b>	107,08	110,60	114,11	143,99	175,04
<b>4</b>	76,61	76,61	140,77	111,77	199,35
<b>5</b>	81,01	108,54	139,60	145,45	170,35
<b>6</b>	99,76	83,94	108,25	111,47	141,35

## APENDICE D

### MARCADORES DA LIPOPEROXIDAÇÃO

MDA - Sangue					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
<b>1</b>	0,022	0,087	0,014	0,083	0,194
<b>2</b>	0,012	0,007	0,023	0,035	0,005
<b>3</b>	0,021	0,016	0,048	0,073	0,058
<b>4</b>	0,011	0,006	0,021	0,063	0,043
<b>5</b>	0,055	0,016	0,046	0,016	0,110
<b>6</b>	0,005	0,017	0,055	0,088	0,210

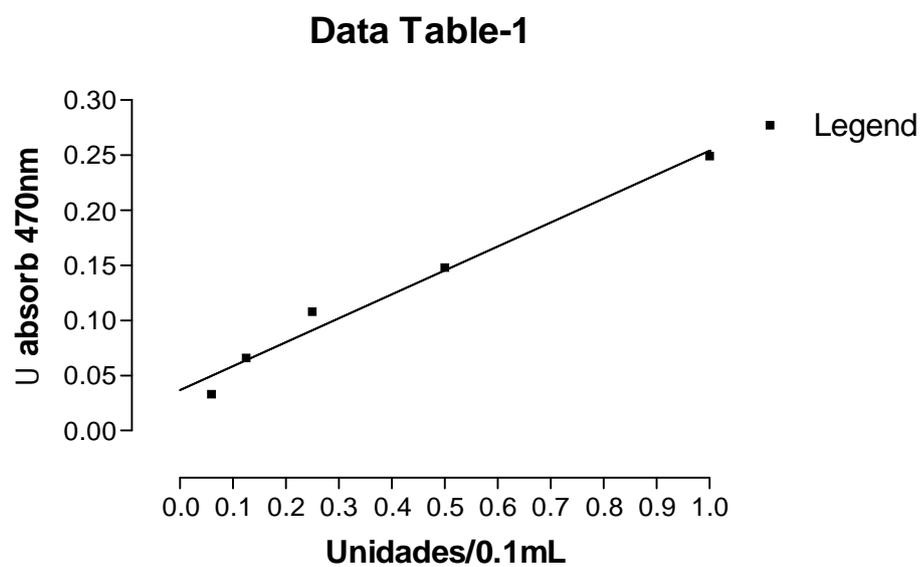
MDA - Fígado					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
<b>1</b>	0,035	0,094	0,141	0,190	0,301
<b>2</b>	0,078	0,114	0,130	0,092	0,112
<b>3</b>	0,088	0,090	0,028	0,190	0,165
<b>4</b>	0,063	0,090	0,128	0,190	0,150
<b>5</b>	0,041	0,123	0,133	0,093	0,217
<b>6</b>	0,132	0,124	0,132	0,103	0,317

**APENDICE E****MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO FÍGADO**

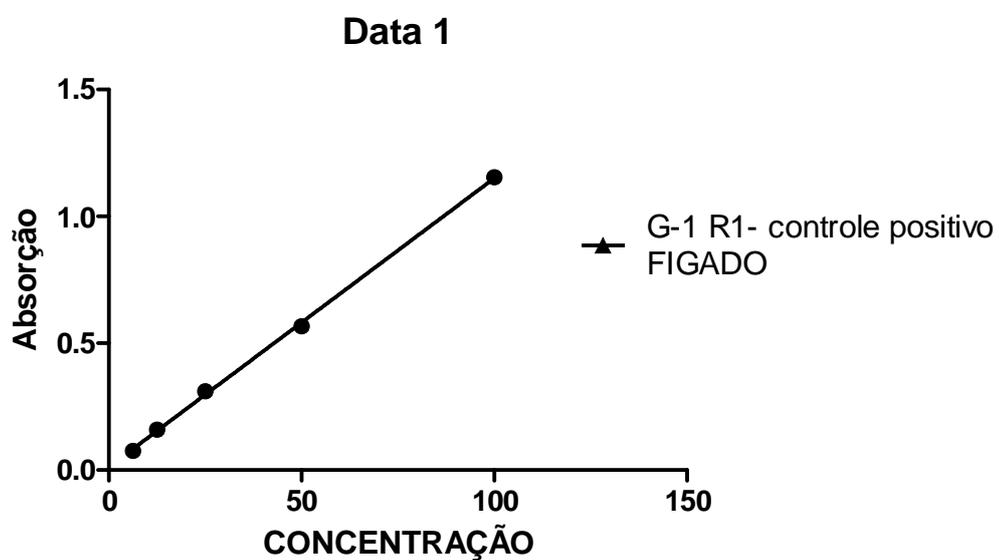
MPO - Fígado					
<b>Rato</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>
<b>1</b>	4,241	3,406	1,111	2,872	1,019
<b>2</b>	4,849	3,794	2,508	1,121	1,111
<b>3</b>	4,674	3,241	4,918	1,139	1,047
<b>4</b>	5,374	3,932	2,669	1,268	1,001
<b>5</b>	4,900	4,803	1,840	1,116	1,240
<b>6</b>	5,208	1,558	1,227	1,038	1,001

## APENDICE F

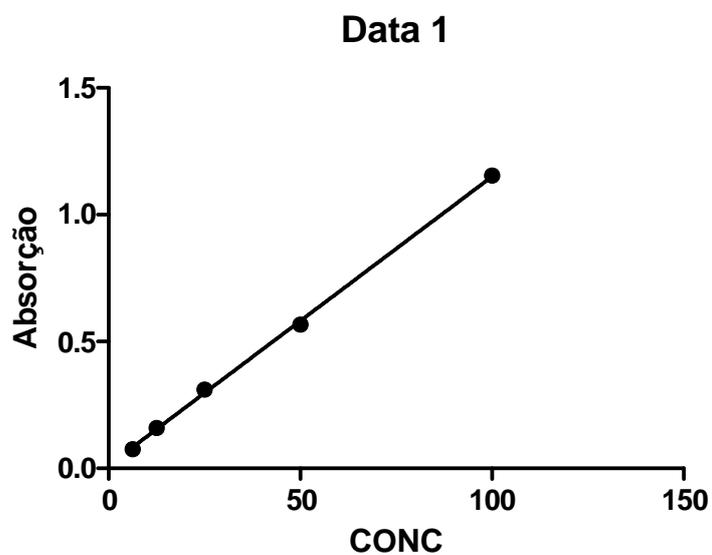
## GRÁFICO PADRÃO PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE DA MPO



## APENDICE G

GRÁFICO PADRÃO PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE GSH  
NO FÍGADO

## APENDICE H

GRÁFICO PADRÃO PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE GSH  
NO SANGUE

## 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  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 04/2014, sobre o projeto intitulado: **“EFEITOS MODULATÓRIOS DA ELETROACUMPUNTURA E DO ÓLEO DE ALHO (ALLIUM SATIVUM) NO ESTRESSE OXIDATIVO AGUDO E NA INFLAMAÇÃO INDUZIDAS PELA GENTAMICINA NO FÍGADO DO RATO”**, de responsabilidade do Prof. Dr. Isaac Bevilaqua de Albuquerque Guimarães e 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 12 de dezembro de 2014.

Fortaleza, 16 de dezembro de 2014

  
Prof. Dr. Rodrigo Jose Bezeira de Siqueira

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA