



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

MARIANA RODRIGUES DE SOUZA

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

**FORTALEZA
2016**

MARIANA RODRIGUES DE SOUZA

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

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

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

Orientador: Prof. Dr. 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)

S239e Souza, Mariana Rodrigues de.
Efeitos modulatórios do óleo de alho (*allium sativum*), da acupuntura e da eletroacupuntura no estresse oxidativo e na inflamação induzidos por gentamicina no rim do rato / Mariana Rodrigues de Souza. – 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. Sérgio Botelho Guimarães.

1. Gentamicina. 2. Estresse oxidativo. 3. Inflamação. 4. Acupuntura. 5. Eletroacupuntura.
I. Título.

CDD 617

MARIANA RODRIGUES DE SOUZA

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

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

Aprovada em 05 /02 /2016

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Dedico este trabalho ao Deus Todo Poderoso, que me concedeu a oportunidade de obter mais uma vitória em minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

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

Ao PROF. DR. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em 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.

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

Aos PROF. DR. MIGUEL NASSER HISSA e PROF. DR. JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA pela participação na banca de defesa desse manuscrito.

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 Srs. 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

O aminoglicosídeo gentamicina, tem papel de destaque no tratamento de infecções graves, produzidas por bacilos Gram negativos, apesar de seu efeito tóxico. A especificidade da gentamicina para toxicidade renal está relacionada com a sua acumulação no túbulo renal proximal, causando um número de alterações morfológicas e bioquímicas em seres humanos e animais experimentais. O alho (*Allium sativum*), possui inúmeras atividades biológicas, tais como atividade anticancerígena, antimicrobiana, anti-hipertensiva, imunomodulatória e antioxidante. No estresse oxidativo o óleo de alho modula os níveis de antioxidantes e de peroxidação lipídica, atuando na eliminação de radicais livres. Acupuntura é uma modalidade terapêutica, originária da antiga China. A eletroacupuntura é um método terapêutico utilizado para potencializar os efeitos da acupuntura e consiste na aplicação de frequência elétrica variável e de baixa intensidade em agulhas metálicas inseridas no corpo do animal ou ser humano. Para avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura realizou-se um estudo prospectivo, controlado e comparativo entre ratos da linhagem Wistar submetidos aos efeitos nefrotóxicos da gentamicina. Trinta ratos machos, com 12-14 semanas de idade e peso variando de 267 a 373g, 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 nefrotoxicidade todos os animais receberam gentamicina (100mg/Kg ip.) durante 5 dias consecutivos. A partir do 7º dia do experimento os ratos (G2-G5) foram tratados com óleo de alho (gavagem), acupuntura e eletroacupuntura (2 100 /hz) durante 20 minutos, em dias alternados, durante 10 dias. Os ratos do G1 receberam óleo de oliva por gavagem. Amostras de sangue arterial e os rins foram coletados 48 horas após o término do experimento, sob anestesia com hidrato de cloral. Parâmetros analisados incluíram uréia e creatinina, malondialdeído, glutatona reduzida e mieloperoxidase. A seguir os ratos foram sacrificados por dose triplicada de anestésico. Os valores de uréia e creatinina 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 glutatona reduzida sérica e tecidual nos grupos G4 e G5, comparados ao controle G1. Não foram verificadas diferenças nas concentrações de malondialdeído sérico. Entretanto, houve aumento significativo da concentração de malondialdeído renal, comparando-se o grupo G5 ao controle G1, sugerindo que a estimulação elétrica usando 100 Hz pode induzir aumento da peroxidação lipídica. Houve redução significativa da atividade da mieloperoxidase no rim dos ratos dos grupos G4 e G5. Esses achados confirmam a atividade antiinflamatória da eletroacupuntura. Conclui-se que, neste modelo, o óleo de alho e a acupuntura não induzem efeitos protetores sobre o estresse oxidativo ou a inflamação e que a estimulação elétrica (2/100 Hz) reduz o estresse oxidativo enquanto que a eletroacupuntura 100 Hz aumenta a lipoperoxidação no tecido renal.

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

ABSTRACT

The aminoglycoside gentamicin (GM) has major role in the treatment of serious infections, produced by gram-negative bacilli, despite its toxic effect. The specificity of the GM for renal toxicity is related to its accumulation in renal proximal tubule, causing a number of morphological and biochemical changes in humans and experimental animals. Garlic (*Allium sativum*), 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. Acupuncture (Ac) is a therapeutic modality originating in ancient China. The electroacupuncture (EAc) is a therapeutic method used to potentiate the effects of acupuncture and consists of the application of low-intensity electric current and variable frequency in metallic needles inserted in the body of the animal or human being. For assessment of antioxidant and anti-inflammatory activity of GO, Ac and EAc, a prospective, controlled and comparative study was carried out in Wistar rats submitted to the nephrotoxic effects of GM. Thirty male rats, aged from 12 to 14 weeks and weight ranging 267-373 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). All the rats received GM (ip 100mgKg) during 5 consecutive days for the induction of nephrotoxicity. On the 7th day of the experiment, G3-G5 rats were treated with Ac and EAc (2hz / 100 hz) during 20 minutes, every other day, for 10 days. G1 rats were treated with olive oil by gavage. Arterial blood samples and the right kidney were collected 48 hours after the end of the experiment, under anesthesia with chloral hydrate. Parameters analyzed included blood urea and creatinine, malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and myeloperoxidase (MPO). Next the rats were killed by triple dose of anesthetic. G1 urea and creatinine 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 serum MDA concentrations. In addition, there was significant increase of renal MDA, when comparing groups G5 versus G1 control, suggesting that electrical stimulation using 100 Hz can induce increased lipoperoxidation. There was significant reduction of MPO activity in the kidney of rats from groups G4 and G5. These findings confirm the anti-inflammatory activity of the EAc. It is concluded that, in this model, the OA and Ac do not induce protective effects on oxidative stress or inflammation and that the electric stimulation (2/100 Hz) reduce the oxidative stress while the EAc 100 Hz increases lipoperoxidation in kidney tissue.

Keywords: Gentamicin; Oxidative stress; Inflammation; Acupuncture; Eletroacupuncture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho do experimento	25
Figura 2	Aplicação da gentamicina por via intraperitoneal, utilizando-se seringa plástica graduada descartável de 1,0 ml e agulha 28G (13 x 45 mm).....	26
Figura 3	Rato posicionado no dispositivo, para aclimatação (preparação para as sessões de Ac e EAc).....	27
Figura 4	Desenho identificando o local de inserção das agulhas, no membro pélvico direito do rato (rato 3, grupo EAc 2 Hz).....	28
Figura 5	Modelo 608 Fix portátil.....	29
Figura 6	Detalhe da aplicação da eletroacupuntura. Eletrodos tipo garra conectados às agulhas inseridas no membro pélvico do rato (rato 4, EAc 100 Hz).....	30
Figura 7	Peso do rim direito ao termino do experimento.....	36
Figura 8	Peso do rim esquerdo ao termino do experimento.....	36
Figura 9	Relação peso dos rins/peso do rato.....	37
Figura 10	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 uréia sérica nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	38
Figura 11	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 creatinina sérica nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	39
Figura 12	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100Hz) em ratos sadios intoxicados com gentamicina, sobre as concentraçõesGSHsérico nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	40
Figura 13	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos sadios intoxicados com gentamicina sobre as concentrações GSH no tecido renal dos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	41
Figura 14	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 sérico nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	42

Figura 15	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 renal dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo	43
Figura 16	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos sadios intoxicados com gentamicina, sobre a atividade da MPO no rim dos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso médio dos ratos utilizados no estudo	36
Tabela 2	Relação peso dos rins/peso do rato	37
Tabela 3	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de uréia sérica nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	38
Tabela 4	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de creatinina sérica nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	39
Tabela5	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina sobre as concentrações de GSH sérico nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	40
Tabela6	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina sobre as concentrações de GSH no rim dos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	41
Tabela7	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina sobre as concentrações de MDA sérico nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	42
Tabela8	Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de MDA no rim dos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	43
Tabela9	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 rim dos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo.....	44
Tabela10	Tabela 10 - Resumo dos achados laboratoriais	45

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	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
H ⁺	Íon hidrogênio
$\text{H}_2\text{O}\bullet$	Radical hidroperoxila
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_3PO_4	Ácido fosfórico
Hz	Hertz
ip	Intraperitoneal
LPO	Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação

M	Mol
mA	Miliampére
MDA	Malondialdeído
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPO	Mieloperoxidase
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
O ₂ •	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
r.p.m.	Rotações por minuto
R3	Acuponto <i>Taixi</i>
RL	Radicais livres
RNA _m	RNA mensageiro
ROO•	Radical peroxila
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

1	INTRODUÇÃO	16
	1.1 Nefrotoxicidade 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 Relevância e Justificativa	22
2	OBJETIVO	23
3	MÉTODO	24
	3.1 Aspectos éticos	24
	3.2 Tipo de estudo e amostra	24
	3.3 Distribuição da amostra	25
	3.4 Indução da nefrotoxicidade	25
	3.5 Condicionamento dos ratos	26
	3.6 Localização dos pontos de acupuntura / eletroacupuntura	27
	3.7 Tratamentos (Ac, Eac e gavagens)	28
	3.8 Coleta de amostras e morte dos animais	30
	3.9 Exames laboratoriais	30
	3.9.1 Avaliação da peroxidação lipídica	30
	3.9.2 Determinação das substancias reativas ao acido tiobarbitúrico (TBARS)	31
	3.9.3 Determinação de grupos sulfidrilicos não proteicos (Glutathiona- GSH)	31
	3.9.4 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)	33
	3.10 Analise estatística	33
4	RESULTADOS	35
	4.1 Complicações	35
	4.2 Peso dos ratos	35
	4.3 Peso dos rins	35
	4.4 Relação peso dos rins/peso do rato	37
	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 uréia e creatinina no sangue dos animais	38
	4.5.1 Efeitos da GM sobre a concentração de uréia no sangue dos ratos	38
	4.5.2 Efeitos da GM sobre a concentração de creatinina no sangue dos ratos	39
	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 GSH no sangue e no rim dos animais	40
	4.6.1 Efeitos da GM sobre a concentração de GSH no sangue dos ratos	40
	4.6.2 Efeitos da GM sobre a concentração de GSH no rim dos ratos	41
	4.7 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 rim dos animais	42
	4.7.1 Efeitos da GM sobre a concentração de MDA no sangue dos ratos	42
	4.7.2 Efeitos da GM sobre a concentração de MDA no rim dos ratos	43

	4.8 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de MPO no rim dos animais	44
	4.9 Resumo dos achados laboratoriais (tabela 10)	45
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERENCIAS	52
8	APÊNDICES	58
	Apêndice A- Pesos dos animais e dos rins	58
	Apêndice B- Marcadores de Lesão renal	59
	Apêndice C- Marcadores de estresse oxidativo	60
	Apêndice D- Marcadores de lipoperoxidação	61
	Apêndice E -Marcadores inflamatórios no rim	62
	Apêndice F -Gráfico padrão para o cálculo da atividade da MPO	63
	Apêndice G -Gráfico padrão para o cálculo para o cálculo da concentração de GSH no rim	64
	Apêndice H -Gráfico padrão para o cálculo da concentração de GSH no soro	65
	Apêndice I - Delineamento experimental	66
9	ANEXOS	67
	Anexo A- Parecer do Comitê de Ética	67

1 INTRODUÇÃO

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming há quase 100 anos foi um marco histórico que determinou o início da era da antibioticoterapia. Essa descoberta abriu o caminho a novos investimentos científicos na pesquisa, resultando na descoberta de novos antibióticos (PEREIRA; PITA, 2005).

Os aminoglicosídeos, introduzidos no arsenal terapêutico há quase 70 anos, continuam a ser a droga de escolha em pacientes portadores de infecções graves, incluindo septicemia, endocardite bacteriana e outras produzidas por bacilos Gram negativos (BEGG.;BARCLAY, 1995).

O primeiro isolamento de um organismo descrito como *Actinomyces griseus* foi relatado por Krainsky (1914), que obteve esta cultura de um solo russo (WAKSMAN; REILLY; HARRIS, 1948). Estudos iniciados em 1939, no Departamento de Microbiologia da Unidade de Agricultura Experimental da Universidade Rutgers, de New Jersey, nos Estados Unidos, por Waksman *et al.* culminaram, em 1943, após exame de vários actinomicetos de solo, com o isolamento de uma cepa de *Streptomyces griseus* que produzia uma substância capaz de inibir o crescimento do bacilo da tuberculose e de diversos microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos. No ano seguinte, em 1944, surgiu a estreptomicina, o primeiro aminoglicosídeo utilizado na prática médica. Dezenove anos mais tarde, em 1963, a gentamicina (GM) foi isolada do actinomiceto *Micromonospora purpurea* (BEGG; BARCLAY, 1995).

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 protéica 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 Nefrotoxicidade da gentamina

A especificidade da GM para toxicidade renal está relacionada com a sua acumulação no túbulo renal proximal, causando um número de alterações morfológicas e bioquímicas em seres humanos e animais experimentais (KACEW e BERGERON, 1990; ALI, 1995; MINGEOT-LECLERCQ *et al.*, 1999). As lesões renais são resultantes da necrose tubular direta, sem alterações morfológicas nas estruturas glomerulares (CUZZOCREA *et al.*, 2002; PEDRAZA-CHAVERRI *et al.*, 2004).

Banday *et al.* (2008) estudaram os efeitos tempo-dependentes da administração de GM sobre as enzimas do metabolismo dos carboidratos, escova de borda da membrana (BBM) e estresse oxidativo nos tecidos de rim de rato. e concluíram que a administração do fármaco induz lesões oxidativas nos tecidos renais, resultando em alterações do metabolismo dos carboidratos, diminuição das atividades da BBM e lisossomos, associadas ao aumento da lipoperoxidação (BANDAY *et al.* 2008). Esses pesquisadores verificaram que tratamentos até de 15 dias de duração são bem tolerados por ratos, que continuaram se alimentando normalmente e não apresentaram declínio do peso corporal. Entretanto, ocorreu aumento das concentrações de uréia e creatinina no período, principalmente no 10º dia de tratamento. Além disso o uso de GM elevou os níveis de malondialdeído (MDA) tanto no córtex como na medula renal e simultaneamente elevou a concentração de tiois (GSH), principalmente no córtex renal.

Estudos publicados na última década demonstraram que a GM induz aumento da geração de radicais livres, notadamente o anion superóxido, os radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio além das espécies reativas de nitrogênio na córtex renal, resultando em deterioração estrutural e funcional dos rins (CUZZOCREA *et al.*, 2002; BALAKUMAR *et al.*, 2010). Para agravar ainda mais o quadro clínico a GM promove redução das concentrações de Glutaciona (GSH), superóxido dismutase (SOD) e de catalase no tecido renal (MORALES *et al.*, 2010). Nesse contexto, a lesão renal se manifesta através do aumento acentuado da peroxidação lipídica, identificada pelo aumento da concentração do MDA, a formação de nitrosina e finalmente a oxidação da proteína no parênquima renal (STOJILJKOVIC *et al.*, 2012).

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 peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Cabe as sistemas protetores do organismo a desativação dos radicais livres, sendo essa capacidade fundamental para assegurar a reversibilidade das lesões e a prevenção da morte celular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

Sob condições fisiológicas, o balanço entre os agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a redução das defesas antioxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). 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 Glutathione (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 radicais livres sobre os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, podendo evoluir até a morte celular (BENZIE, 1996). A LPO tem início quando RL dotados de elétrons desemparelhados, promovem a remoção de um átomo de hidrogênio de um grupamento metileno (-CH₂-), produzindo um novo radical (-CH•-). Sob condições aeróbicas, esse radical centrado no carbono combina-se com o oxigênio (O₂) formando radicais peroxila (ROO•). Esses radicais peroxila podem extrair um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídio, estabelecendo assim a propagação da reação. O novo radical, ao reagir com o oxigênio, origina novo radical peroxila, permitindo que a reação da peroxidação lipídica se torne contínua, pela repetição dos ciclos oxidativos (LLESUY, 2002).

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

1.3 Efeitos protetores do alho

Estudos publicados demonstraram que o alho (*Allium sativum*) possui inúmeras atividades biológicas, tais como atividade anticancerígena, antimicrobiana, anti-aterosclerótica, anti-hipertensiva, imunomodulatória e

antioxidante (AGARWAL 1996; AMAGASE et al., 2001; BANERJEE; MUKHERJEE; MAULIK 2003; AMAGASE 2006; VAZQUEZ-PRIETO et al., 2011).

Vários são os componentes sulfatados do alho com propriedades medicinais, sendo a alicina (dialil-tiosulfonato) 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-tiosulfonato) e outros componentes sulfúricos solúveis em óleo (AMAGASE et al., 2001).

A alicina elimina fungos e inibe o desenvolvimento de bactérias que se encontrem á 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 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; CARMIA, 2001). e aumentando o conteúdo de GSH intracelular (KIM et al., 2001; SHAARAWY et al., 2009). Além disso, o óleo de alho suprime a formação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, aumentando a atividade das enzima superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx) (BOREK, 2001).

1.4 Efeitos da Acupuntura e da Eletroacupuntura

A acupuntura (Ac) é um ramo da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) e inclui, na sua prática, um conjunto de conhecimentos teóricos e empíricos. A MTC utiliza a experiência teórica e clínica de uma pratica originada há milênios e compreende uma longa série de técnicas e procedimentos onde se destacam a aplicação de agulhas (acupuntura), ventosas, calor (moxabustão), massagens (Tui Na) e outras técnicas. O conhecimento da Acupuntura e da MTC foi durante muitos séculos transmitido de geração para geração. Apesar de ser uma prática muito antiga, a acupuntura e seus efeitos terapêuticos tem despertado o interesse da comunidade científica que busca explicação para resultados terapêuticos muitas vezes surpreendentes. Muitas pesquisas científicas recentes têm contribuído para uma melhor compreensão do

potencial terapêutico e dos possíveis mecanismos de ação, afirma Wen (2008) em seu livro "Manual Terapêutico de Acupuntura", originariamente publicado em Mandarim e recentemente traduzido para o idioma português. 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 (HONG 2005).

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) denominados acupontos. A eletroacupuntura (EA) é um método terapêutico utilizado para potencializar os efeitos da acupuntura manual e consiste na aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade e frequência variável em agulhas metálicas introduzidas no corpo do animal ou ser humano. Lin *et al.* (2004) demonstraram que a EA de 2 Hz acelera a liberação de peptídeos opiáceos endógenos (EOPs) 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).

Antigamente, no período neolítico, utilizavam-se agulhas feitas de pedra afiada, jade, sílex, ossos e até bambu. Posteriormente com o surgimento da cerâmica, as agulhas passaram a ser feitas com pedaços de cerâmica afiados (CHONGHUO, 1993).

A seleção dos pontos de acupuntura (acupontos) utilizados especificamente para tratar cada doença obedece princípios definidos pela Medicina Tradicional Chinesa e adaptados para cada situação clínica pelo profissional acupunturista. Assim, o conhecimento das leis que regem a aplicação da acupuntura, o domínio da técnica de inserção das agulhas e sobretudo a experiência do acupunturista são fundamentais para o sucesso da terapêutica. Os acupontos utilizados neste pesquisa foram selecionados tendo como base a experiência clínica dos orientadores, e a indicação do uso dos diversos pontos, como explicado a seguir. O primeiro acuponto selecionado, o E36 (*Zusanli*), quando estimulado promove harmonização dos distúrbios

metabólicos e melhora dos processo mentais associados as deficiências energéticas do organismo como na depressão, liberando os bloqueios emocionais (ROSS, 2003). O segundo acuponto selecionado, o R3 (*Taixi*) tem inúmeras indicações entre as quais tratamento dos distúrbios mentais, psicose, alegria excessiva, ansiedade e melancolia (MARTINS e GARCIA, 2003). A terceira escolha recaiu sobre o acuponto VB34 (*Yang Ling Quan*), de ação comprovada na proteção hepática, em animais intoxicados por tetracloreto de carbono (YIN *et al.*, 2006).

1.5 - Relevância e Justificativa

A descoberta da gentamicina trouxe esperança aos pacientes que padeciam de infecções graves decorrentes da invasão do organismo por bactérias gram-negativas, de reconhecida resistência à penicilina, até então largamente utilizada no tratamento de infecções bacterianas. Um fato limitante do uso intensivo da gentamicina foi a constatação de seus efeitos ototóxicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos, produzindo lesões irreversíveis nos citados órgãos. Mesmo diante desses vieses, ainda há lugar para a utilização da gentamicina, geralmente associada a outros fármacos em infecções das vísceras e da cavidade abdominal. 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 da acupuntura/eletroacupuntura sobre a inflamação e o estresse oxidativo renais, decorrentes da aplicação intraperitonal de altas doses de GM, em ratos previamente sadios. Para comprovação dos efeitos moduladores da Ac e da EAc em ratos experimentalmente intoxicados foram estudadas as alterações dos marcadores de lesão renal (uréia e creatinina), 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 rim de ratos saudáveis.

- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o estresse oxidativo sistêmico e renal em ratos Wistar intoxicados por gentamicina;
- 2) Avaliar a inflamação renal em ratos Wistar intoxicados por gentamicina;
- 3) Avaliar o possível efeito nefroprotetor 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 do comitê em 26 de março de 2015, protocolo nº20/2015 (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 renal e o estresse oxidativo sistêmico (no soro) e local (no tecido renal) em animais saudáveis intoxicados com altas doses de gentamicina.

3.2 Tipo de Estudo e Amostra

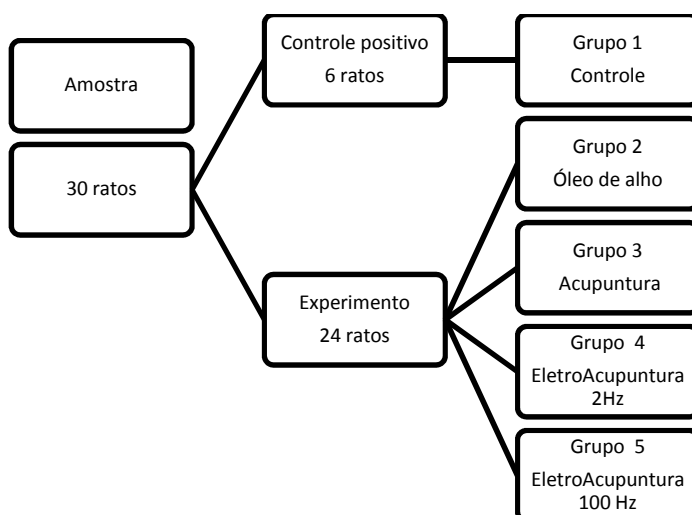
Trata-se de um estudo prospectivo, controlado e comparativo entre cinco grupos de ratos Wistar submetidos aos efeitos nefrotóxicos da gentamicina (GM) para o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo. Foram utilizados 30 ratos machos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, Rodentia, Mammalia), com idade variando de 12 a 14 semanas e peso entre 267 a 373 g, da linhagem Wistar, saudáveis, 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. 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 randomizados em cinco grupos de seis animais, assim denominados: G1 – **CT** (Controle), G2- Oleo de alho G3 - Acupuntura, G4– **EAc2** (Eletroacupuntura 2 Hz), G5 – **EAc100** (Eletroacupuntura 100 Hz.). A figura 1 mostra o desenho do experimento.

Figura 1 - Desenho do experimento



O desenho representando as várias etapas do projeto pode ser visualizado no Apêndice I.

3.4 Indução da nefrotoxicidade

Para a indução da nefrotoxicidade 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 e duração do tratamento tiveram por base o trabalho de Ademiluyi et al (2012) (Figura 2).

Figura 2 - Aplicação da Gentamicina por via intraperitoneal, utilizando-se seringa plástica graduada descartável de 1,0 ml e agulha 28G (13 x 45 mm)



Fonte: O autor (2015)

3.5 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 brasileiros 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 permaneceram calmos, necessitando apenas a imobilização dos membros pélvicos com tiras de esparadrapo fixado às estruturas metálicas, para a aplicação da Ac e da EAc.

Figura 3 -Rato posicionado no dispositivo, para aclimação de Ac e EAc).

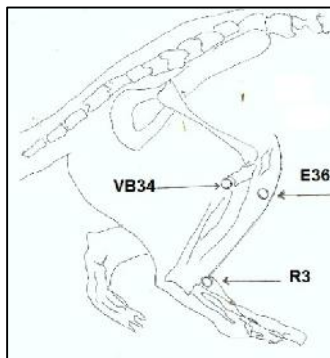


Fonte: o autor (2015)

3.6 Localização dos pontos de Acupuntura / Eletroacupuntura

Segundo Panzer (1993) é possível transpor para os demais animais vertebrados, as posições dos diversos acupontos descritos nos gráficos propostos para o homem, tendo como base a semelhança das estruturas anatômicas. Um estudo mais completo foi apresentado por Yin et al. (2008), mapeando 121 acupontos. O acuponto *Zusanli* (E-36) se localiza, no rato, 5 mm abaixo da cabeça fibular e 2 mm lateral ao tubérculo anterior da fíbula; transitam, nessa região os ramos laterais do nervo sural cutâneo, o ramo cutâneo do nervo safeno e o ramo profundo do nervo peroneal (MARTINS; GARCIA, 2003; YIN et al., 2008). O VB-34 se localiza, no homem, na depressão anterior e inferior da cabeça fibular; transitam, nessa região, os ramos laterais do nervo sural cutâneo e o 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 4 ilustra o posicionamento das agulhas no membro pélvico dos ratos.

Figura 4 - Desenho identificando o local de inserção das agulhas, no membro pélvico direito do rato



Fonte: O autor (2015)

3.7 Tratamentos (Acupuntura, Eletroacupuntura 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 animais alojados nos dispositivos. 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 Dong Bang 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) e 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, VB34 e R3, eletrodos com garras tipo jacaré, foram conectados às agulhas de acupuntura inseridas em E36 e VB34. No grupo G4 foi aplicada uma corrente elétrica com intensidade de 1,0 mA e 2 Hz 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 (Figura 5) (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil) , 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 - modelo 608 Fix portátil



Fonte: o autor (2015)

Figura 6- 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)

3.8 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 para coleta de sangue arterial (3,0 ml) e dos rins. Os rins foram pesados; o rim direito foi lavado em soro fisiológico gelado, pesado, medido e reservado para exames bioquímicos. Após a coleta todos os ratos foram mortos por dose triplicada (overdose) do anestésico.

3.9 Exames laboratoriais

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

3.9.1 Avaliação da peroxidação lipídica

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

tem por objetivo quantificar o dialdeídomalônico (MDA) formado na peroxidação lipídica. Procedeu-se, a seguir, a extração deste composto usando um solvente orgânico (n-butanol),

3.9.2 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:

As amostras dos tecidos (rins) a serem analisados foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C imediatamente após a coleta e lavagem com soro fisiológico gelado (4°C) para remover quaisquer vestígios de sangue. Após pesagem, a amostra de tecido foi homogeneizada em KCl gelado 1,15%, resultando em uma solução ácida com concentração a 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5 ml de cada amostra e acrescentou-se 1,0 ml da solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 1%). A mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo seguido da adição de 4,0 ml de N-butanol. Após 2,0 minutos de agitação a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. A absorbância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida a 520 nm e 535 nm em espectrofotômetro de ultra violeta visível, marca VANKEL 50 UV-VIS (Varian Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP). A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão.

3.9.3 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 absorvância a 412nm em espectrofotômetro (VANKEL, 50 UV-VIS, VARIAN, São Paulo, SP).

Drogas e reagentes

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Ácido tricloroacético (ATC,50%)

Tampão TRIS 0,4 M pH 8,9

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

Metanol

Glutathiona (GSH, 1 mg/ml).

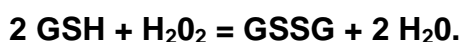
Preparação dos reagentes:

Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

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

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

Reação



Procedimento:

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 absorvâncias no espectrofotômetro à 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH foi obtida comparando-se o valor da absorvância com uma tabela padrão de GSH, previamente preparada.

3.9.4 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

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

O acúmulo de neutrófilos no tecido foi medido pelo método de dosagem de mieloperoxidase. Após coleta, a amostra foi acondicionada em *eppendorf* com buffer gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M, pH 4,7). O tecido foi pesado e em seguida homogeneizado em Polytron® PT 3100 a 13000 rpm. No pellet foi feita lise hipotônica com solução de NaClO₂ 2% e após 30s adição de NaCl 1,6% com glicose 5%. Após centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em buffer NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% 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 NaPO₄ 0,08 M. A atividade da mieloperoxidase no sobrenadante foi dosada usando tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM e H₂O₂ (0,5 mM) e lida no leitor de placas de 96 wells à 450 nm. Obtêm-se a concentração final de MPO comparando-se o valor da absorbância com uma tabela padrão de MPO, preparada previamente (APÊNDICE F). As concentrações de MPO foram expressas em unidade / mg de tecido.

3.10 Análise Estatística

A significância da eficácia do tratamento com óleo de alho, Ac, EAc 2 Hz e EAc 100 Hz sobre os valores de ureia, creatinina, GSH, MDA, 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 ± Desvio Padrão da Média (Média ± DP). 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 (α) de 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Complicações

Não ocorreram óbitos durante o estudo. Entretanto, a imobilização dos ratos e a indução da nefrotoxicidade pela aplicação da GM condicionaram o aparecimento de alterações clínicas não letais, tais como diarreia, dermatite de contato e alterações na coloração da urina, no curso do experimento.

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

Após o 2º dia de indução da nefrotoxicidade todos os animais apresentaram fezes líquidas ou semi-líquidas. Esse sintoma persistiu até o dia seguinte ao término do processo de indução da nefrotoxicidade. 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 (Dados brutos). 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. A tabela 1 apresenta os valores obtidos nas diversas fases do experimento.

Tabela 1 - Peso médio dos ratos utilizados no estudo

Grupos	n	Peso médio		
		Dia 1	Dia 6	Dia 20
G1 - Grupo	6	318,33	316,33	347,00
G2 - Grupo óleo	6	332,33	317,50	319,50
G3 - Grupo	6	326,83	307,50	328,83
G4 - Grupo EAc 2	6	320,00	315,17	332,17
G5 - Grupo EAc	6	347,00	319,50	328,83

Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

NOTAS n = número de ratos de cada grupo

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

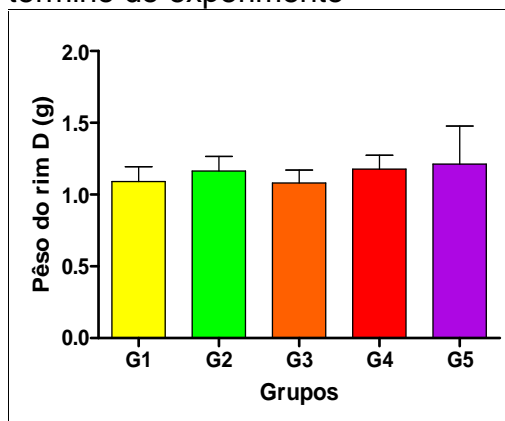
Dia 6 = um dia após a indução da nefrotoxicidade, antes do início dos tratamentos

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

4.3 Peso dos rins

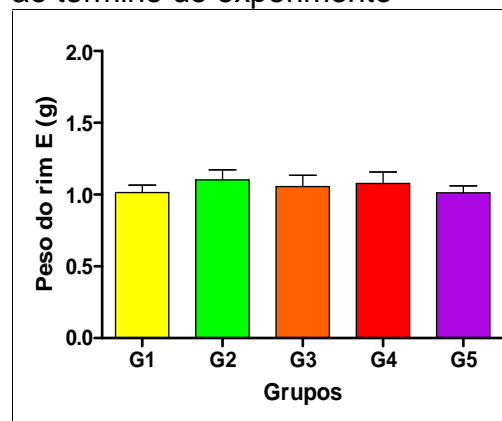
O peso dos rins não apresentou alterações significantes, comparando-se cada grupo ao controle G1 (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Peso do rim direito ao termino do experimento



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

Figura 8 -Peso do rim esquerdo ao termino do experimento



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

4.4 Relação peso dos rins/peso do rato

O uso da GM não alterou a relação peso médio dos rins/peso do rato, comparando-se os grupos tratados com óleo de alho, Ac ou EAc ao grupo controle. (Tabela 2 Figura 9).

Tabela 2 - Relação peso dos rins/peso do rato

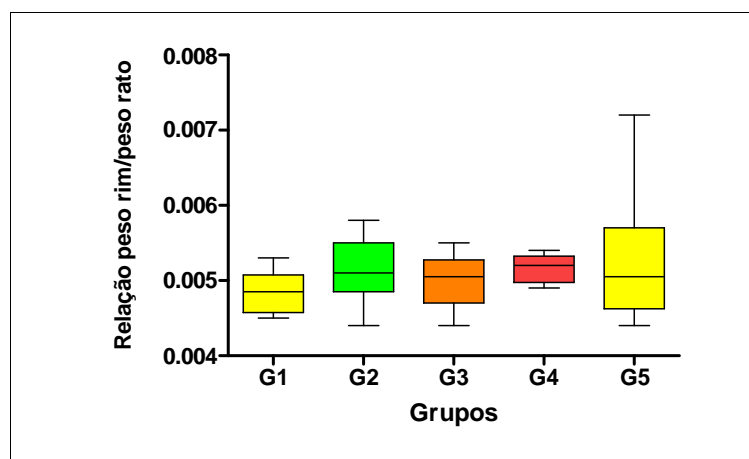
Grupos	N	Peso médio	
		Rins	Ratos
G1 - Grupo controle	6	1,60	347,00
G2 - Grupo óleo de alho	6	1,72	319,50
G3 - Grupo Acupuntura	6	1,61	328,83
G4 - Grupo EAc 2 Hz	6	1,72	332,17
G5 - Grupo EAc 100 Hz	6	1,72	328,83

Fonte: Elaborada pelo autor (2015)

NOTAS n = número de ratos de cada grupo

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

Figura 9 - Relação peso dos rins/peso do rato



Fonte: Elaborado pelo Autor (2015)

NOTA: Teste: ANOVA / Dunnett. Diferenças não significantes

4.5 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de uréia e creatinina no sangue dos animais

4.5.1 Efeitos da GM sobre a concentração de uréia no sangue dos ratos

Não foram verificadas diferenças significativas nas concentrações de uréia, comparando-se os grupos G2-G5 ao controle positivo G1 (Tabela 3, Figura 10).

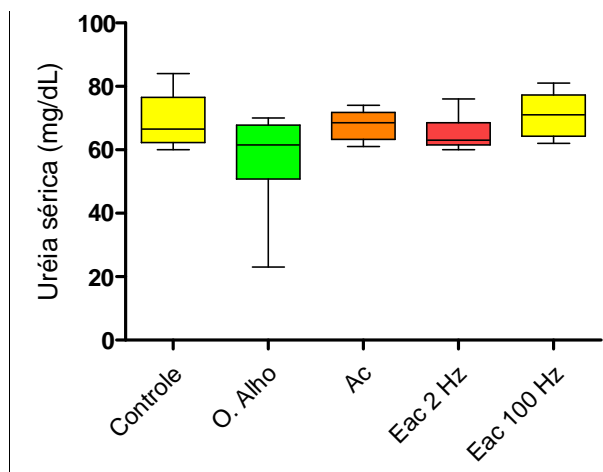
Tabela 3 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de uréia sérica nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo					
n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	60,00	23,00	61,00	60,00	62,00
Percentil 25	62,25	50,75	63,25	61,50	64,25
Mediana	66,50	61,50	68,50	63,00	71,00
Percentil 75	76,50	67,75	71,75	68,50	77,25
Valor máximo	84,00	70,00	74,00	76,00	81,00

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 significativas

Figura 10 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em rato saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de uréia sérica nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do



Fonte: O autor (2015)

Teste: Kruskal-Wallis / Dunn

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

4.5.2 Efeitos da GM sobre a concentração de creatinina no sangue dos ratos

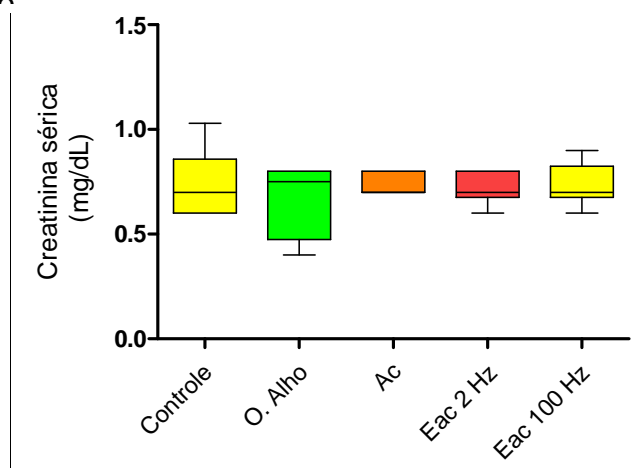
Não foram verificadas diferenças significantes nas concentrações de creatinina sérica, comparando-se os grupos G2-G5 ao controle positivo G1 (Tabela 4, Figura 11).

Tabela 4 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de creatinina sérica nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo					
n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	0,600	0,400	0,700	0,600	0,600
Percentil 25	0,600	0,475	0,700	0,675	0,675
Mediana	0,700	0,750	0,700	0,700	0,700
Percentil 75	0,858	0,800	0,800	0,800	0,825
Valor máximo	1,030	0,800	0,800	0,800	0,900

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 11 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de creatinina sérica nos 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

4.6 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de GSH no sangue e no rim dos animais

4.6.1 Efeitos da GM sobre a concentração de GSH no sangue dos ratos

Houve aumento significativo das concentrações de GSH sérico nos grupos G4 ($p < 0,05$) e G5 ($p < 0,0001$), comparados ao controle positivo (Tabela 5, Figura 12)

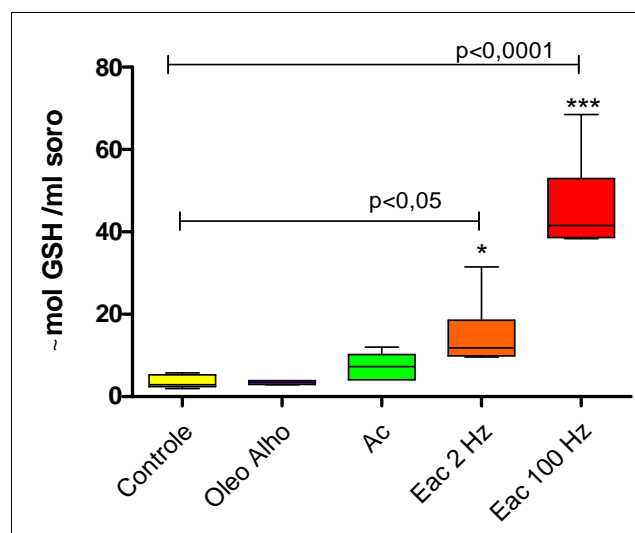
Tabela 5 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de GSH sérico nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo					
n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
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 12 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações GSH sérico nos 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 Hz. * $p < 0,05$ / *** $p < 0,0001$ comparados ao controle G1

Houve aumento significativo das concentrações de GSH no tecido renal dos grupos G4 ($p < 0,001$) e G5 ($p < 0,0001$), comparados ao controle positivo (Tabela 6, Figura 13)

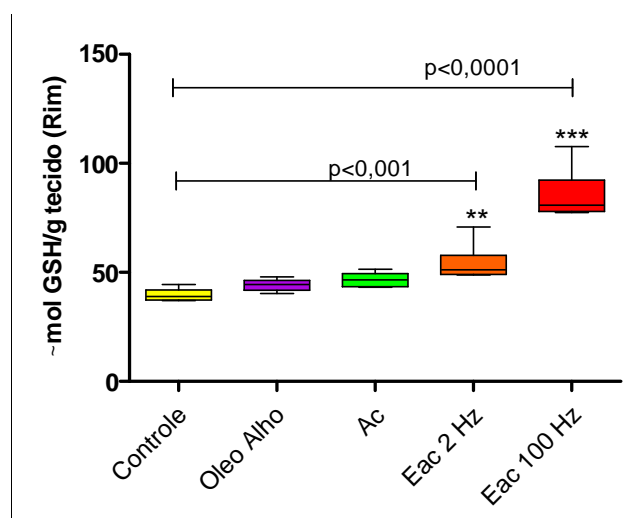
Tabela 6 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de GSH no rim dos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo					
n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	37,07	40,29	43,22	48,79	77,49
Percentil 25	37,29	41,83	43,44	49,01	77,93
Mediana	38,97	44,39	46,59	51,13 **	80,86 ***
Percentil 75	41,97	46,37	49,45	57,79	92,29
Valor máximo	44,39	47,91	51,42	70,76	107,7

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 as concentrações GSH no tecido renal 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 Hz

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

4.7 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de MDA no sangue e no rim dos animais

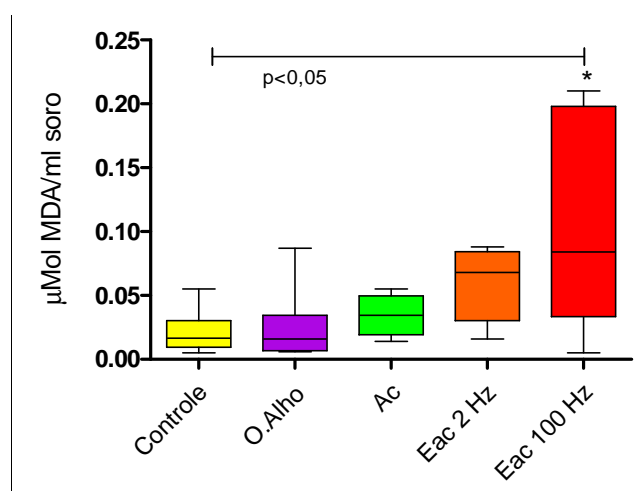
4.7.1 Efeitos da GM sobre a concentração de MDA no sangue dos ratos

Houve aumento significativo da concentração de MDA, comparando-se o grupo G5 ao controle positivo G1 (Tabela 7, Figura 14).

Tabela 7 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de MDA sérico nos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) 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	0,0165	0,0160	0,0345	0,0680	0,0840*
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
 *p<0,05 comparado ao controle G1

Figura 14 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de MDA sérico nos 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 Hz

*p<0,05 comparado ao controle G1

4.7.2 Efeitos da GM sobre a concentração de MDA no rim dos ratos

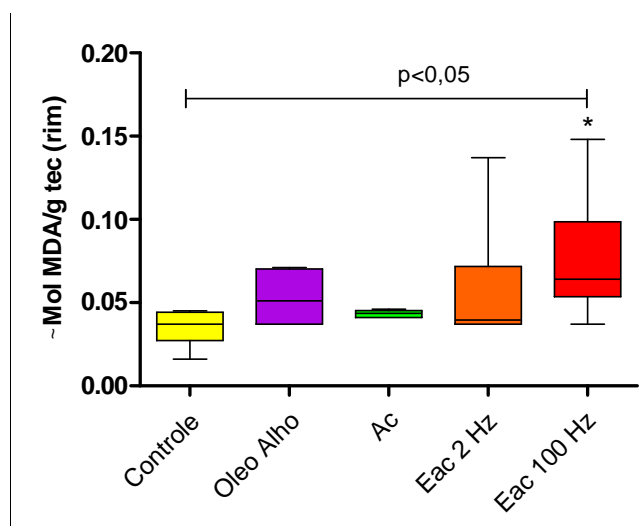
Houve aumento significativo da concentração de MDA, comparando-se o grupo G5 ao controle positivo G1 (Tabela 8, Figura 15).

Tabela 8 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de MDA no rim dos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo

n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	0,033	0,041	0,044	0,037	0,148
Percentil 25	0,031	0,061	0,043	0,039	0,059
Mediana	0,041	0,037	0,041	0,037	0,082*
Percentil 75	0,016	0,037	0,041	0,137	0,037
Valor máximo	0,044	0,070	0,046	0,040	0,064

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 comparado ao controle G1

Figura 15 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de MDA renal 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

4.8 Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre as concentrações de MPO no rim dos animais

Houve redução significativa da atividade da MPO no tecido renal dos ratos dos grupos G4 e G5 (Tabela 9, Figura 16)..

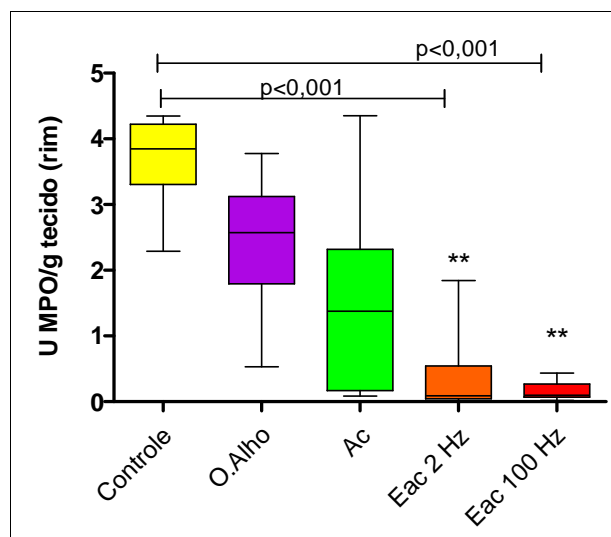
Tabela 9 - Efeitos do óleo de alho, da acupuntura e da eletroacupuntura (2 Hz e 100 Hz) em ratos saudáveis intoxicados com gentamicina, sobre a atividade da MPO no rim dos roedores dos grupos G2-G5, comparados ao grupo controle (G1) no último dia do estudo					
n = 6, cada grupo	G1	G2	G3	G4 -	G5
Valor mínimo	2,29	0,531	0,085	0,010	0,019
Percentil 25	3,31	1,79	0,171	0,044	0,068
Mediana	3,85	2,57	1,38	0,090 **	0,098 **
Percentil 75	4,22	3,12	2,32	0,544	0,268
Valor máximo	4,35	3,78	4,35	1,840	0,434

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 comparados ao controle G1

Figura 16 - 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 rim 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 Hz

** p<0,001 comparados ao controle G1

4.9 Resumo dos achados laboratoriais (Tabela 10)

Tabela 10 - Resumo dos achados laboratoriais								
Indicador	Sangue (soro)				Tecido (RIM)			
	OA	Ac	EAc 2	EAC 100	OA	Ac	EAc 2	EAC 100
Ureia	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	↑
MPO	S/A	N/A	N/A	N/A	S/A	S/A	↓	↓

↑ = aumento significativo, comparado ao controle G1

↓ = redução significativa, comparado ao controle G1

Fonte: o autor (2015)

5 DISCUSSÃO

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

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

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/Eletoacupuntura no estresse oxidativo. (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 "redes" especialmente desenhadas 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 membros 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 durante os experimentos, uma vez que o jejum pré-operatório agrava o estresse oxidativo em ratos Wistar adultos (LIU et al., 1993).

Os pesos dos animais incluídos no estudo não apresentaram diferenças significantes, no estudo comparativo (Tabela 1). 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 nefrotoxicidade, 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 percepção destes pesquisadores, que o aminoglicosídeo não foi capaz de induzir lesões histológicas importantes no rim desses animais.

Annie, Rajagopal e Malini (2005) trataram ratos com GM 40mg/kg/dia por via subcutânea durante 13 dias e observaram que os roedores tratados com GM mostraram uma redução inicial do peso no 14º dia. Entretanto, no 24º dia de tratamento, observou-se um aumento de peso dos ratos, comparados aos valores obtidos no 14º dia. (ANNIE; RAJAGOPAL; MALINI, 2005). Um estudo conduzido por El-Kashef et al. (2015) demonstrou que a administração de alicina significativamente diminuiu a relação de peso do rim / peso do rato. No presente estudo onde foi utilizado o óleo de alho, não se verificou alterações significantes do peso dos animais entre os grupos estudados, no último dia do experimento

El-Kashef et al. (2015) trataram ratos Wistar adultos com GM 100mg/kg durante 7 dias consecutivos. Os resultados desse estudo mostram que, administração de GM à ratos Wistar produz um padrão típico de nefrotoxicidade, manifestada pelo significativo aumento da creatinina e uréia séricas (EL-KASHEF et al., 2015). Resultado semelhante foi encontrado por outros pesquisadores (JAFAREY; CHANGIZI ASHTIYANI; NAJAFI, 2014).

Segundo Castello Branco et al. (2011) os valores normais de uréia e creatinina, aferidos no biotério da UFC no rato Wistar, são os seguintes: uréia ($61,7 \pm 1,8$) e creatinina ($0,6 \pm 0,0$) (CASTELLO BRANCO et al., 2011). No

presente estudo, no rato do grupo controle, os valores de uréia variaram entre 60 e 84 (mediana 66,50) e os valores de creatinina variaram entre 0,6-1,03 (mediana: 0,7), podendo ser considerados valores normais. Esses dados permitem admitir que as lesões induzidas pela GM, no presente estudo, foram moderadas. Esse resultado está em desacordo com os resultados obtidos por outros pesquisadores (JAFAREY; CHANGIZI ASHTIYANI; NAJAFI, 2014; EL-KASHEF et al., 2015). No presente estudo foram utilizados animais mais velhos e com maior peso (267 a 373 g), que receberam aplicações intraperitoniais de GM (100mg/Kg de peso do animal) durante 5 dias. É possível que o tempo de indução da nefrotoxicidade tenha sido muito curto, o que explicaria a ausência de lesões renais importantes.

Um estudo interessante foi publicado por Houghton, English e Bennett em 1988. Os pesquisadores submeteram ratos a uma infusão contínua de gentamicina, com dose aproximada de 20mg/kg/dia por um período de 6 meses. Foram feitas avaliações repetidas das funções e histologia renal durante o período de tratamento e verificou-se que a depuração da creatinina manteve-se estável até a vigésima semana de tratamento. Foi observado, no entanto, que, apesar da manutenção das concentrações séricas de GM, os animais desenvolveram lesões das células dos túbulos proximais já no primeiro mês de tratamento. Verifica-se assim que a duração do tratamento pode influenciar os efeitos nefrotóxicos da GM, mesmo usando doses sub-terapêuticas.

No presente estudo houve aumento significativo das concentrações de GSH sérico nos grupos G4 ($p < 0,05$) e G5 ($p < 0,0001$), comparados ao controle positivo. Ocorreu também aumento significativo das concentrações de GSH no tecido renal dos grupos G4 ($p < 0,001$) e G5 ($p < 0,0001$), comparados ao controle positivo. Por outro lado, as concentrações de GSH sérico/renal nos 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

(fígado e rim) de GSH. O efeito protetor da Ac/EAc também foi demonstrado por Lima et al. (2012) em retalhos cutâneos randomizados em dorso de ratos Wistar. Esses pesquisadores demonstraram um aumento significativo das concentrações teciduais e plasmáticas de GSH no 7º dia do experimento, após duas aplicações (dias 3 e 7) de EAc nas frequências de 3 e 100 Hz.

Houve aumento significativo da concentração de MDA sérico e renal, comparando-se o grupo G5 ao controle positivo G1.

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. Siu, Lo e Leung trataram ratos submetidos aos efeitos da isquemia/reperfusão cerebral com EAc (2 Hz, 30 min) em sessão única e demonstraram diminuição da peroxidação lipídica. Entretanto, estudos realizados por Silva et al. (2011) demonstraram aumento da peroxidação lipídica no rim de ratos saudáveis, após 30 minutos de estimulação elétrica (10 e 100 Hz), em uma única sessão.

Houve redução significativa da atividade da MPO no tecido renal dos ratos dos grupos G4 e G5. Esses achados confirmam a atividade anti-inflamatória da EAc. Por outro lado a administração de óleo de alho não teve efeitos protetores sobre a inflamação. Este resultado se opõe ao resultado apresentado por El-Kashef et al (2015), onde a administração de alicina resultou num decréscimo significativo de nível de MPO no tecido renal, quando comparado ao grupo controle positivo.

Os resultados encontrados mostram que a EAc exerce um efeito protetor sobre o rim, atenuando o estresse oxidativo e promovendo uma redução do processo inflamatório. Por outro lado, o uso da EAc 100 Hz promoveu um aumento da peroxidação lipídica, o que não ocorreu com a EAc de baixa intensidade (2 Hz). A ausência de efeitos protetores do óleo de alho não era esperada, tendo como base trabalhos anteriormente publicados por outros autores. Saliente-se que a maioria dos autores usou formas purificadas do óleo de alho (alicina). Apesar da ausência de efeitos antioxidantes, o que poderia indicar que o volume de óleo de alho não teria sido suficiente, tem-se que

salientar que os ratos apresentaram diarreia após seu uso, o que poderia levar a uma rápida eliminação da substância, reduzindo sua absorção.

Considerações finais

Este estudo apresenta algumas fragilidades:

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

2) a ausência de um controle tratado apenas com óleo de oliva uma vez que essa substância poderia influenciar o resultado final, por ter efeitos antioxidativos (NAKBI et al., 2010), o que poderia reduzir a diferença entre os grupos, não permitindo a detecção de diferenças significantes;

3) os ratos apresentaram pesos superiores aos observados por outros pesquisadores; nesse contexto os animais poderiam ser mais ou menos resistentes à nefrotoxicidade da gentamicina que ratos mais jovens;

Há uma proposta de continuação desse estudo com o condicionamento dos animais, utilizando substâncias de reconhecida capacidade antioxidante. Esses resultados seriam comparados com aqueles obtidos após a indução da toxicidade seguida do tratamento com eletroacupuntura. Contudo, os resultados encontrados no presente estudo mostram que a EAc exerce um efeito protetor sobre o rim, atenuando o estresse oxidativo e promovendo uma redução do processo inflamatório.

6 CONCLUSÃO

A eletroacupuntura, nas frequências de 2/100 Hz exerce um efeito protetor sobre o estresse oxidativo renal, 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 sistêmico e local, promovendo aumento da peroxidação lipídica no soro e no rim de animais intoxicados com gentamicina.

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

7 REFERENCIAS

- ACIOLI, P.C.; ALBUQUERQUE, A. DE O.; GUIMARÃES, I.B.; ARAUJO, R.W.; VASCONCELOS, P.R.; GUIMARÃES, S.B. Protective effects of abdominal electroacupuncture on oxidative stress and inflammation due to testis torsion/detorsion in rats. **Acta Cir Bras.**;v. 29, n.7, p.450-6, 2014.
- ADEMILUYI, A.O.; OBOH, G.; OGUNSUYI, O.B.; AKINYEMI, A.J. Attenuation of gentamicin-induced nephrotoxicity in rats by dietary inclusion of ginger (*Zingiberofficinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes. **Nutr Health**,. n.4, p.209-18. 2012.
- AGARWAL, K.C. Therapeutic actions of garlic constituents. **Med Res Rev.** 1996 v.16,n. 1,p.111-24, 1996.
- ALI, B.H. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. **General Pharmacol** v.26,p.1477–87, 1995.
- AMAGASE H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. **J Nutr.** Mar;v.136,n.3 (Suppl), p.716S-725S, 2006.
- AMAGASE, H.; PETESCH, B.; MATSUURA, H.; KASUGA, S.; ITAKURA, Y. Intake of garlic and its bioactive components. **J. Nutr.** v.131,p. 955S–962S, 2001.
- ANNIE S, RAJAGOPAL PL, MALINI S. Effect of *Cassia auriculata* Linn. root extract on cisplatin and gentamicin-induced renal injury. **Phytomedicine.** v.12,n.8,p.555-60, 2005.
DOI:10.1016/j.phymed.2003.11.010
- BALAKUMAR, P.; ROHILLA, A.; THANGATHIRUPATHI, A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? **Pharmacol Res** v.62, n.179–186, 2010.
- BANDAY, A.A.; FAROOQ, N.; PRIYAMVADA, S.; YUSUFI, A.N.K; 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** v.82, p.450-59, 2008.
- BANERJEE, S.K.; MUKHERJEE, P.K.; MAULIK, S.K. Garlic as an antioxidant. **Phytother. Res.** v.17,p. 97–106, 2003.
- BRADLEY, J.R.; THIRU, S.; POBER, J,.. Hydrogen peroxide-induced endothelial retraction is accompanied by a loss of the normal spatial organization of endothelial cell adhesion molecules. **Am J Pathol.** v.147,n.3,p.627-41. 1995
- BEGG, E.J.; BARCLAY, M.L. Aminoglycosides--50 years on. **Br J Clin Pharmacol.** v.39,n.6, p.597-603,1995.
- BENZIE, I.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int J Food Sci Nutr**, v.47,n.3,p.233-61, 1996.
- BOREK, C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. **J. Nutr.** v.131, p.1010–15, 2001.

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

BUSSE, H.J.; WÖSTMANN, C.; BAKKER, E.P.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.** v.138,n.3,p.551-61,1992.

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

CASTELLO BRANCO, .A.C.S.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N.; SANTOS, H.B.; OLIVEIRA K.M.; RAMALHO, J.A.; DANTAS, J.D. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério Prof. Thomas George. **RBCS**, v.15, n.2, p.209-14, 2011.

CHAMBERS, H.F. **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;p.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. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. **Eur. J. Pharmacol.** v. 450,n.1,p. 67–76, 2002.

DENEKE, S.M; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol.** v.257,n,4 Pt 1,p.L163-73, 1989.

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.

EL-KASHEF DH, EL-KENAWI AE, SUDDEK GM, SALEM HA. Protective effect of allicin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Int Immunopharmacol.** v.29,n.2,p.679-86, 2015. doi: 10.1016/j.intimp.2015.09.010.

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.

HOUGHTON DC, ENGLISH J, BENNETT WM. Chronic tubulointerstitial nephritis and renal insufficiency associated with long-term "subtherapeutic" gentamicin. **J Lab Clin Med**. v.112, n.6, p.694-703, 1988.

JAFAREY M, CHANGIZI ASHTIYANI S, NAJAFI H. Calcium dobesilate for prevention of gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Iran J Kidney Dis**. v.8,n.1,p.46-52, 2014.

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

KACEW, S.; BERGERON, M.G. Pathogenic factors in aminoglycoside-induced nephrotoxicity. **Toxicol Lett**. v.51,n.3, p.241-59; discussion 237-9, 1990.

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. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. **Free Radic. Biol. Med**. v.30, p. 747-56, 2001

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

LIMA LP, DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE A, DE LIMA SILVA JJ, MEDEIROS FD, DE VASCONCELOS PR, GUIMARÃES SB. Electroacupuncture attenuates oxidative stress in random skin flaps in rats. **Aesthetic Plast Surg**. v.36,n.5,p.1230-5,. 2012. doi: 10.1007/s00266-012-9926-x.

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

LIU, P.T.; SYMONS, A.M.; HOWARTH, J.A.; BOULTER, P.S.; PARKE, DV. Studies in surgical trauma: oxidative stress in ischaemia-reperfusion of rat liver. **Clin Sci (Lond)**. v.86,n.4,p.453-60,1994.

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.

- MENEZES, H.S. Ética e pesquisa em animais. *Rev AMRIGS.*, v.46,n.3,4, p.105-8, 2002
- 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., Aminoglycoside:activity and resistance. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy*** ,v.43,p.727-37, 1999.
- 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. ***Biochim Biophys Acta***. v.1463,n.1,p.20-30, 2000.
- MIRON T, BERCOVICI T, RABINKOV A, WILCHEK M, MIRELMAN D. [3H]Allicin: preparation and applications. ***Anal Biochem.***, v.331,n.2,p.364-9, 2004.
- 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.***n.10, p.861-9. doi: 10.1038/ki.2010.11. Epub 2010 Feb 17. 2010
- NAKBI A, TAYEB W, GRISSA A, ISSAOUI M, DABBOU S, CHARGUI I, ELLOUZ M, MILED A, HAMMAMI M. Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. ***Nutr Metab (Lond)***. v.7,p.80, 2010 doi: 10.1186/1743-7075-7-80.
- OLIVEIRA, J.F.P; CIPULLO, J.P; BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos.***Braz J Cardiov surgery***, v.21,n.4, p.444-52, 2006.
- PANZER, R.B.A comparison of the traditional Chinese versus transpositional zangfu organ association acupoint locations in the horse. ***Am J Chin Med.***,v.21,n.2,p.119-31,1993.
- 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. 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.***,v.4,n.1,p. 5, 2004.
- PERCHELLET, E., ABNEY, L., ZIRNSTEIN, J., BELMAN, S. 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. ***Cancer Biochem. Biophys.*** n,8,p.299-312. 1986
- PEREIRA AL, PITA JR. ALEXANDER FLEMING (1881-1955). Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). 129. ***Rev. Fac. Letras - HISTÓRIA.*** Porto, III Série, vol. 6, p. 129-151, 2005.

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

SANTOS EL, DIAS BH, ANDRADE AC, PASCOAL AM, VASCONCELOS FILHO FE, MEDEIROS FD, GUIMARÃES SB. Effects of acupuncture and electroacupuncture on estradiol-induced inflammation and oxidative stress in health rodents. **Acta Cir Bras**. v.28, n.8, p. 582-8, 2013.

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. **Anal Biochem**;v.25,n.1,p.192-205, 1968

SETNY, P.; TRYLSKA J. Search for Novel Aminoglycosides by Combining Fragment-Based Virtual Screening and 3D-QSAR Scoring. **J Chem 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. Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. **Int. J. Biol. Sci**. v.5,p. 549-57, 2009.

SILVA AH, FIGUEIREDO LM, DIAS PA, PRADO NETO AX, VASCONCELOS PR, GUIMARÃES SB. Electroacupuncture attenuates liver and kidney oxidative stress in anesthetized rats. **Acta Cir Bras**.;v.26 Suppl 1:60-5. 2011.

SIU FK, LO SC, LEUNG MC. Effectiveness of multiple pre-ischemia electro-acupuncture on attenuating lipid peroxidation induced by cerebral ischemia in adult rats. **Life Sci**. v.75,n.11,p.1323-32, 2004

SIU FK, LO SC, LEUNG MC. Electroacupuncture reduces the extent of lipid peroxidation by increasing superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in ischemic-reperfused rat brains. **Neurosci Lett**. v.354,n.2, p.158-62, 2004.

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.

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**. v.4,n.4,p.214-9,2011. doi: 10.1016/j.jams.2011.09.012.

VAN JAARSVELD H, KUYL JM, DE WET EH, ALBERTS DW, VAN DER WESTHUIZEN FD. Effect of various mixtures of diethylether, halothane, nitrous oxide and oxygen on low molecular weight iron content and mitochondrial function of the rat myocardium. **Free Radic Res Commun**., v.15, n.3,p.151-7,1991.

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**, p.475216. 2011. doi: 10.1155/2011/475216.

WAKSMAN SA, REILLY HC, HARRIS DA. *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waksman and Henrici. **J Bacteriol.**,v.56, n.3, p.259-69.

WANG H, PAN Y, XUE B, WANG X, ZHAO F, JIA J, LIANG X, WANG X. The antioxidative effect of electro-acupuncture in a mouse model of Parkinson's disease. **PLoS One.**;v.6,n.5,p.e19790. 2011.doi: 10.1371/journal.pone.0019790.

WEN, T.S. **Manual terapêutico de acupuntura**. Editora Manole, 2008.

YIM YK, LEE H, HONG KE, KIM YI, LEE BR, KIM TH, YI JY. Hepatoprotective effect of manual acupuncture at acupoint GB34 against CCl4-induced chronic liver damage in rats. **World J Gastroenterol.** v.12, n.14, p.2245-9, 2006.

APENDICE A

Pesos dos animais e do rim direito

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 rim direito ao término do experimento					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	0,96	1,29	1,15	1,08	1,16
2	1,14	1,14	0,99	1,22	1,73
3	1,15	1,06	1,13	1,04	1,16
4	1,02	1,11	0,99	1,3	0,95
5	1,03	1,1	1,2	1,2	1,15
6	1,24	1,29	1,02	1,22	1,12

APENDICE B

MARCADORES DE LESÃO RENAL

UREIA (soro)					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	63,0	23,0	71,0	76,0	68,0
2	60,0	60,0	74,0	64,0	65,0
3	84,0	67,0	64,0	66,0	74,0
4	64,0	60,0	70,0	62,0	62,0
5	69,0	63,0	61,0	60,0	81,0
6	74,0	70,0	67,0	62,0	76,0

CREATININA (soro)					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	0,60	0,8	0,7	0,8	0,7
2	0,60	0,8	0,7	0,6	0,7
3	1,03	0,7	0,7	0,7	0,7
4	0,70	0,8	0,8	0,8	0,6
5	0,70	0,4	0,8	0,7	0,9
6	0,80	0,5	0,7	0,7	0,8

APENDICE C

MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

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

GSH - RIM					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	41,169	42,341	43,220	50,250	87,160
2	38,826	45,563	43,513	70,756	77,493
3	44,392	47,907	51,422	52,008	83,059
4	37,361	43,220	48,786	49,079	78,079
5	39,119	45,856	47,614	53,473	107,66
6	37,068	40,291	45,563	48,786	78,665

APENDICE D

MARCADORES DA LIPOPEROXIDAÇÃO

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

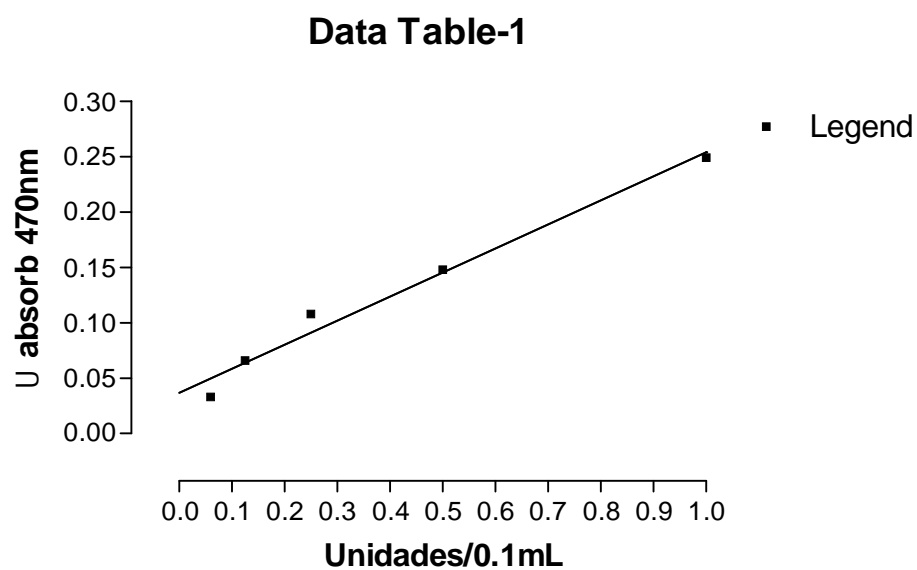
MDA - RIM					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	0,016	0,037	0,041	0,037	0,037
2	0,027	0,037	0,041	0,037	0,054
3	0,037	0,051	0,044	0,040	0,064
4	0,044	0,070	0,045	0,072	0,099
5	0,045	0,071	0,046	0,137	0,148
6	0,016	0,037	0,041	0,037	0,037

APENDICE E**MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO RIM**

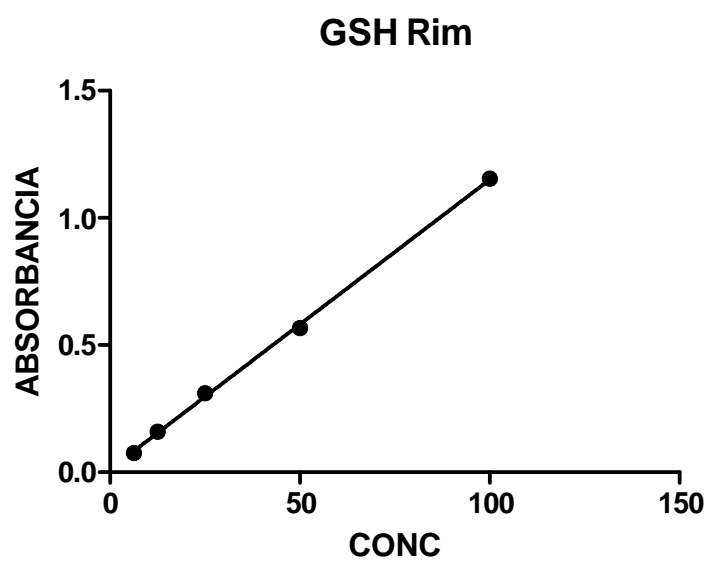
MPO - RIM					
Rato	G1	G2	G3	G4	G5
1	2,291	2,379	0,085	1,844	0,085
2	3,821	2,766	1,480	0,093	0,084
3	3,646	2,213	4,351	0,111	0,019
4	4,347	2,904	1,641	0,056	0,111
5	3,872	3,775	1,273	0,088	0,213
6	4,181	0,531	0,199	0,010	0,434

APENDICE F

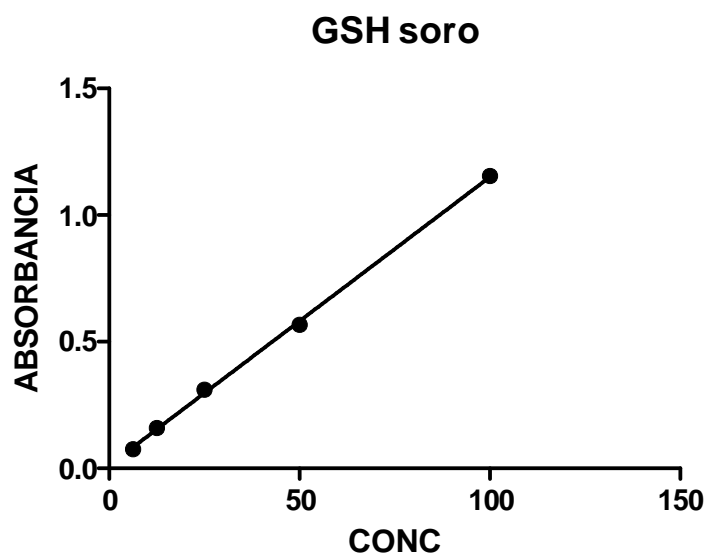
GRÁFICO PADRÃO PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE DA MPO



APENDICE G

GRÁFICO PADRÃO PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE GSH
NO RIM

APENDICE H

GRÁFICO PADRÃO PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE GSH
NO SORO

APENDICE I
Delineamento experimental

Quadro 1 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL					
<i>Grupos (n=6)</i>	Indução da toxicidade		Tratamento		Coleta de amostras
	Dias 1-5		Dias 7 - 16		Dia 19
G1 GM (controle)	GM 100mg/Kg +SF até completar 1,0 ml durante 5 dias, administrados IP	REPOUSO (24 horas)	Nenhum	REPOUSO (48 horas)	Coleta de 3,0 ml de sangue arterial e remoção do fígado para análises bioquímicas (UREIA, CREATININA, 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 de Oliva			Óleo de oliva, 1,0 ml por gavagem, em dias alternados, durante 10 dias		
G3- GM + Óleo alho +óleo de oliva			Óleo de alho ^[1] , acrescido de óleo de oliva para completar 1,0 ml por gavagem, em dias alternados, durante 10 dias		
G4 - GM + EAc 2 Hz			EAC ^[2] , 2 Hz, 20 minutos em dias alternados, durante 10 dias		
G5 - GM + EAc 100 Hz			EAC ^[2] , 100 Hz, 20 minutos em dias alternados, durante 10 dias		
<p>Notas:^[1] óleo de alho = 100mg/kg ^[2] 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>					

ANEXO A
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



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

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 20/2015, sobre o projeto intitulado: “Efeitos modulatórios do ácido salicílico e da eletroacupuntura no estresse oxidativo agudo e na inflamação induzidos pela gentamicina no rim de rato”, de responsabilidade do Prof. Dr. Sergio Botelho Guimarães está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

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

Fortaleza, 27 de março de 2015

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL