



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

GRACIANA TEIXEIRA COSTA

**MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA E RENAL INDUZIDA POR
ACETAMINOFENO: EFEITOS DA SILIMARINA, GLUTAMINA, ACUPUNTURA E
ELETROACUPUNTURA**

FORTALEZA

2019

GRACIANA TEIXEIRA COSTA

**MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA E RENAL INDUZIDA POR
ACETAMINOFENO: EFEITOS DA SILIMARINA, GLUTAMINA, ACUPUNTURA E
ELETROACUPUNTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

FORTALEZA

2019

GRACIANA TEIXEIRA COSTA

**MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA E RENAL INDUZIDA POR
ACETAMINOFENO: EFEITOS DA SILIMARINA, GLUTAMINA, ACUPUNTURA E
ELETROACUPUNTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Roberto Wagner Bezerra de Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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)

C872m Costa, Graciana Teixeira.

MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA E RENAL INDUZIDA POR
ACETAMINOFENO: EFEITOS DA SILIMARINA, GLUTAMINA, ACUPUNTURA E
ELETROACUPUNTURA / Graciana Teixeira Costa. – 2019.

156 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

Coorientação: Prof. Dr. Roberto Wagner Bezerra de Araújo.

1. Acetaminofeno. 2. Estresse Oxidativo . 3. Inflamação . 4. Lesão Hepática . 5. Lesão
Renal . I. Título.

CDD 617

*“O verdadeiro Doutor não é o produto de nenhuma escola científica, ele se torna
Doutor por meio da luz da sabedoria divina”.*

Lar de Clara

AGRADECIMENTOS

Ao Pai, Filho e Espírito Santo...

A minha avó, Margarida, que nas horas difíceis foi minha âncora e, especialmente agora, me inspirou a ter determinação para vencer a etapa final deste trabalho.

À minha mãe, Maria das Graças, (em memória) que sempre investiu nos meus estudos. Ela foi a minha maior torcedora quando decidi ser professora, me dando garra e confiança de ir para outro Estado exercer esta profissão.

Ao meu orientador, Prof. Sergio Botelho Guimarães, pela confiança e credibilidade, quando ainda era apenas sua paciente de Acupuntura. Ele me incentivou a iniciar o Curso de Doutorado como forma de enfrentar aquela época de tristeza e dor pela perda da minha mãe e pelo adoecimento no trabalho.

Ao Prof. Roberto Wagner Bezerra da Araújo, pela co-orientação, pelo apoio e gentileza em todos os momentos; por ter me recebido e cooperado para a realização deste trabalho e principalmente pelo exemplo de caráter e amor ao que faz. Ele foi fundamental para a finalização desta pesquisa.

Ao Prof. Francisco Das Chagas Medeiros que não permitiu a minha desistência deste trabalho, quando percebi que o tempo estava esgotando e não conseguia apoio dos laboratórios para realizar os experimentos histológicos. Ele foi a pessoa certa, na hora certa, que me apresentou ao prof. Roberto Wagner Bezerra da Araújo, essencial para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Gislei Frota Aragão, por sua delicadeza e paciência diante das minhas dúvidas. Nele, senti o que é ser aluna, pois pegou na minha mão sempre que não conseguia escrever. Sou agradecida por todas as vezes que se dispôs a se reunir comigo, criando espaço na sua agenda para me socorrer. Ele foi um dos maiores entusiastas da finalização dessa etapa e sua voz ecoou fortemente no meu coração

para que eu lutasse pelo dia de hoje. Você inspira o meu coração a crer e a querer voltar a ser professora!

Às Sras. Luciene e Magda, pelo incentivo e palavras de apoio nos momentos mais difíceis. Por acreditarem que eu era capaz, facilitando todos os trâmites de discente no curso, desde a realização da matrícula à efetivação das licenças médicas.

Ao Pedro Nascimento e Paula Ângela, pelas palavras de apoio e pelas inúmeras terapias multidimensionais e apométricas, essencial para restabelecer minha saúde física, mental, espiritual e emocional.

Ao Prof. Luís Viegas, meu eterno professor, mestre de Radiestesia e incrível psicanalista que me acolheu diversas vezes nas duas funções. Ele contribuiu muito com suas palavras de apoio, dizendo que me via caricaturalmente com o “corpo pequeno e a cabeça enorme”, referindo-se à minha inteligência. Pode ter certeza que toda noite antes de dormir lembrava isso e percebia o impacto que isso causava na minha autoestima. Ademais, foi na sua constatação radiestésica que me fez avançar neste trabalho, pois sempre dizia de que não importava o que acontecesse, esse dia chegaria.

À Irenice Campos, que fez muito mais que o seu papel de assistente social do CAPS em que sou paciente. Comoveu-se desde o primeiro dia, no acolhimento, e vestiu a camisa como minha defensora. Nunca me deixou sozinha em uma perícia médica ou judicial. Marcava encontros extras no CAPS somente para me ouvir e ainda adentrou no campo jurídico, escrevendo documentos importantes para a universidade e outros órgãos quando eu já não conseguia fazer sozinha.

Aos técnicos, Francisco Evanir Gonçalves de Lima, Francisco Deomar Maciel da Silva, Susana Moreira de Souza e João Carlos da Silva, pela participação direta na parte experimental.

À Profa Margarida Maria de Lima Pompeu, por disponibilizar o Laboratório de Investigação Diagnóstica do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFC.

Ao Bento, auxiliar do LABCEX, que colaborou quando estava realizando os experimentos.

Ao Prof. Egerton Teles, que gentilmente me atendeu gratuitamente em sessões de Acupuntura quando estive mais fragilizada. Ainda foi extremamente importante no auxílio dos experimentos de eletroacupuntura.

Aos alunos Giselle Castro de Abreu, Francisco Adalberto Saraiva Neto, Carmem Lúcia Rodrigues Ferreira pela colaboração na parte experimental deste trabalho e principalmente pela amizade.

À Milena Martins, colega da pós-graduação que colaborou diretamente nos experimentos.

À minha Casa Espiritual “Casa da Caridade”, em especial ao Dr. Fritz, que sempre foi além de médico, um verdadeiro amigo. No período mais crítico e de dúvidas, olhou os resultados desta pesquisa e disse que na hora certa, Eu saberia interpretá-los com ajuda de uma pessoa.

Ao Arnaldo da Casa da Caridade, que gentilmente conduziu o meu tratamento de fadiga crônica através do magnetismo.

Ao Seu Valdécio da Casa da Caridade, que diversas vezes aliviou as minhas dores emocionais. Ele foi um amigo ímpar e extremamente importante nesse meu processo de conhecimento espiritual.

À Dra. Clarissa, da Casa da Caridade, que entendeu a dor e a angústia da minha alma, sempre me abraçando e falando baixinho no meu ouvido “a ajuda virá na hora

certa; aprenda a pedir quando chegar"! Realmente, as pessoas e as conclusões chegaram na hora certa. Gratidão eterna.

À Dra. Fátima e Dra. Mônica, da Casa da Caridade, que sempre me deram conselhos de motivação e superação!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro.

Esta Tese representa o resultado de um trabalho feito ao longo de vários anos do quais muitas pessoas participaram, de um modo ou de outro. Portanto, fica aqui os sinceros agradecimentos a todos os que, de alguma maneira, participaram deste trabalho.

“A satisfação está no esforço, não na conquista. O esforço completo significa vitória completa”.

Mahatma Gandhi
Líder pacifista (1869-1948)

RESUMO

Modelo murino de lesão hepática e renal induzida por acetaminofeno: efeitos da silimarina, glutamina, acupuntura e eletroacupuntura. Graciana Teixeira Costa. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas. Departamento de Cirurgia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

A overdose de acetaminofeno (APAP) resulta na principal causa de insuficiência hepática induzida e provavelmente também da insuficiência renal aguda. Portanto, as investigações pré-clínicas de alterações na lesão hepática e renal induzida por APAP usando modelos animais são muito importantes. Este trabalho teve como objetivo identificar as principais alterações nos marcadores hepáticos, renais e plasmáticos envolvidos no tratamento com silimarina, glutamina, acupuntura e eletroacupuntura da lesão aguda e subaguda em ratos. Cento e quatro ratos Wistar foram divididos em dois modelos de lesão por APAP, denominados pré-condicionamento e pós-condicionamento. No primeiro, os grupos foram pré-tratados e depois induzidos à lesão, no segundo, os grupos foram induzidos à lesão e depois pós-tratados. Cada modelo foi subdividido em sete subgrupos: Controle Negativo-salina (CN), Controle Positivo (CP), Silimarina 25 mg/kg (SLM), Glutamina 1g/kg (GLN), Acupuntura (ACP), Eletroacupuntura 2Hz (EA2), Eletroacupuntura 100Hz (EA100). A lesão foi induzida com a dose de 3 g/kg de APAP. Os grupos CN e CP receberam uma dose de 2 mL de salina. Os experimentos duraram oito dias e no dia seguinte, foi feita a coleta de sangue e removido os órgãos (fígado e rins) para análise histopatológica. Foram mensurados através do plasma e tecido, os níveis de AST, ALT, Uréia, Creatinina, MPO, MDA, nitrito, GSH, colesterol e frações e triglicerídeos. A lesão causou toxicidade hepática com destruição tissular irreversível e uma toxicidade renal sem dano histológico severo. Os tratamentos atenuaram no modelo pré-condicionamento: (1) fígado: toxicidade (SLM, EA2), estresse oxidativo (SLM, GLN, ACP, EA2, EA100) e alterações histopatológicas (GLN, ACP, EA2, EA100), (2) rim: toxicidade (SLM, EA2, EA100), estresse oxidativo (SLM, GLN, ACP, EA2, EA100) e alterações histopatológicas (GLN), (3) plasma: estresse oxidativo (SLM, GLN, ACP, EA2, EA100); e pós-condicionamento: (1) fígado: toxicidade (GLN, ACP), estresse oxidativo (SLM, GLN, ACP, EA2, EA100) e alterações histopatológicas (SLM, ACP, EA2, EA100), (2) rim: estresse oxidativo (SLM, GLN, ACP, EA2, EA100) e alterações histopatológicas (SLM), (3) plasma: estresse oxidativo (ACP, EA2, EA100). Os resultados observados neste trabalho divergem de modelos de lesão hepática e renal e provavelmente pode ser atribuído ao esgotamento hepático, que resulta na perda de permeabilidade da membrana, por redução no conteúdo de colesterol. A inibição ou bloqueio das vias pró-regenerativas em doses mais altas de APAP, por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, parece influenciar a patogênese hepática e renal aguda.

Descritores: Acetaminofeno; Estresse Oxidativo; Inflamação; Lesão Hepática; Lesão Renal; Indução por Droga.

ABSTRACT

Murine model of acetaminophen-induced liver and kidney injury: effects of silymarin, glutamine, acupuncture and electroacupuncture. Graciana Teixeira Costa. Doctor's degree. Post-graduation Program *Stricto Sensu* in Medical-Surgical Sciences. Federal University of Ceará. Professor: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

Acetaminophen overdose (APAP) results in the leading cause of induced liver failure and probably also acute renal failure. Therefore, as preclinical investigations of changes in APAP-induced liver and renal injury using animal models are very important. This study aims to identify the main hepatic, renal and plasma parameters changes involved in the treatment with silymarin, glutamine, acupuncture and electroacupuncture of acute and subacute injury in rats. One hundred and four Wistar rats were divided into two APAP injury models, called preconditioning and postconditioning. In the first, the groups were pretreated and then injury-induced, in the second, the groups were injury-induced and then posttreated. Each model was subdivided into seven subgroups: Negative Control saline (CN), Positive Control (CP), Silymarin 25 mg / kg (SLM), Glutamine 1g / kg (GLN), Acupuncture (ACP), Electroacupuncture 2Hz (EA2), Electroacupuncture 100Hz (EA100). The injury was induced with a dose of 3 g / kg APAP. The CN and CP groups received a 2 mL dose of saline. The experiments lasted eight days and the next day, blood collection and organ removal (liver and kidney) were performed for histopathological analysis. Plasma and tissue levels of AST, ALT, Urea, Creatinine, MPO, MDA, nitrite, GSH, cholesterol and fractions and triglycerides were measured. The injury caused liver toxicity with irreversible tissue destruction and renal toxicity without severe histological damage. The treatments attenuated in the preconditioning model: (1) liver: toxicity (SLM, EA2), oxidative stress (SLM, GLN, ACP, EA2, EA100) and histopathological changes (GLN, ACP, EA2, EA100), (2) kidney: toxicity (SLM, EA2, EA100), oxidative stress (SLM, GLN, ACP, EA2, EA100) and histopathological changes (GLN), (3) plasma: oxidative stress (SLM, G4, ACP, EA2, EA100); and postconditioning: (1) liver: toxicity (GLN, ACP), oxidative stress (SLM, GLN, ACP, EA2, EA100) and histopathological changes (SLM, ACP, EA2, EA100), (2) kidney: oxidative stress (SLM, GLN, ACP, EA2, EA100) and histopathological changes (SLM), (3) plasma: oxidative stress (ACP, EA2, EA100). The results observed in this study differ from liver and kidney injury injury models and can probably be attributed to hepatic exhaustion, which results in loss of membrane permeability due to reduction in cholesterol content. Inhibition or blockage of pro-regenerative pathways at higher doses of APAP by a mechanism not yet fully understood seems to influence acute hepatic and renal pathogenesis.

Descriptors: Acetaminophen; Oxidative Stress; Liver Enzymes; Liver Injury; Kidney Injury; Drug Induction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA E RENAL AGUDA	21
1.2 MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA E RENAL INDUZIDA POR APAP ..	22
1.3 TOXICIDADE POR APAP	24
1.4 USOS TERAPÊUTICOS NA LESÃO HEPÁTICA E RENAL INDUZIDA POR APAP	25
1.4.1 Silimarina.....	25
1.4.2 Glutamina	26
1.4.3 Acupuntura e Eletroacupuntura	27
1.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA TOXICIDADE POR APAP	30
1.5.1 AST e ALT	30
1.5.2 Uréia e Creatinina.....	31
1.5.3 Mieloperoxidase	31
1.5.4 Malonaldeído	31
1.5.5 Óxido Nítrico.....	32
1.5.6 Glutationa hepática.....	32
1.5.7 Colesterol, Triglicerídeos e Glicose	33
1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	35
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MÉTODO.....	38
3.1 ÉTICA.....	38
3.2 AMOSTRA.....	38
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	38
3.3.1 Doses e Reagentes	39
3.3.2 Protocolo de Acupuntura e Eletroacupuntura.....	40
3.3.3 Acupontos	41
3.3.4 Coleta de Sangue.....	43
3.3.5 Procedimento Anestésico.....	43
3.3.6 Coleta de Órgãos	43

3.4 PARAMETROS AVALIADOS	43
3.4.1 Determinação De Parâmetros Bioquímicos.....	44
3.4.2 Mieloperoxidase	44
3.4.2 Malonaldeído.....	44
3.4.3 Nitrito	45
3.4.4 Glutationa Hepática	45
3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	46
3.5.1 Coloração por Hematoxilina-Eosina	47
3.5.2 Avaliação Histopatológica do Tecido Hepático.....	47
3.5.3 Avaliação Histopatológica do Tecido Renal	48
3.5.4 Estudo Histoquímico.....	49
3.5.5 Avaliação Microscópica	49
3.5.6 Documentação Fotográfica	50
3.5.7 Análise Estatística	50
4 RESULTADOS	51
4.1 MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP.....	51
4.1.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de AST no Plasma	51
4.1.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de ALT no Plasma	52
4.1.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MPO no Tecido Hepático.....	53
4.1.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Tecido Hepático	54
4.1.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Tecido Hepático.....	55
4.1.6 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Tecido Hepático	56
4.1.7 Efeito dos Tratamentos no Peso do Lobo Hepático Direito	57
4.1.8 Efeito do Tratamento no Peso do Lobo Hepático Esquerdo.....	58
4.1.9 Efeito dos Tratamentos na Histopatologia do Tecido Hepático	59
4.1.10 Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático	60
4.1.11 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático por HE	61
4.1.12 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático por Tricômico de Masson	64
4.1.13 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas por Prata Reticulina	66

4.2 MODELO MURINO DE LESÃO RENAL INDUZIDA POR APAP	68
4.2.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Uréia no Plasma	68
4.2.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Creatinina no Plasma.....	69
4.2.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MPO no Tecido Renal.....	70
4.2.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Tecido Renal	71
4.2.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Tecido Renal	72
4.2.6 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Tecido Renal	73
4.2.7 Efeito dos Tratamentos no Peso do Rim Direito.....	74
4.2.8 Efeito dos Tratamentos no Peso do Rim Esquerdo.....	75
4.2.9 Efeito dos Tratamentos na Histopatologia do Tecido Renal	76
4.2.10 Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal....	77
4.2.11 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal por HE	78
4.2.12 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal por Tricômico de Masson	81
4.2.13 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal por Prata Metenamina.....	83
4.2.14 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal por PAS.....	85
4.3 MODELO MURINO DE LESÃO NO PLASMA POR APAP	87
4.3.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Plasma	87
4.3.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Plasma.....	88
4.3.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Plasma	89
4.3.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Colesterol Total no Plasma	90
4.3.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de LDL-c no Plasma	91
4.3.6 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de HDL-c no Plasma.....	92
4.3.7 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Triglicérides no Plasma	93
4.3.8 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Glicose no Plasma	94
5. DISCUSSÃO	95
5.1 MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP.....	95
5.1.1 Efeito dos Tratamento nos Níveis de AST e ALT no Plasma	95
5.1.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MPO no Tecido Hepático.....	98
5.1.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Tecido Hepático	100

5.1.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Tecido Hepático.....	102
5.1.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Tecido Hepático	103
5.1.6 Efeito dos Tratamentos no Peso do Tecido Hepático.....	105
5.1.7 Efeito dos Tratamentos na Histopatologia do Tecido Hepático	106
5.2 MODELO MURINO DE INJÚRIA RENAL INDUZIDA POR APAP	108
5.2.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Uréia e Creatinina no Plasma	108
5.2.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MPO no Tecido Renal.....	110
5.2.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Tecido Renal.....	112
5.2.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Tecido Renal	113
5.2.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Tecido Renal	114
5.2.6 Efeito dos Tratamentos no Peso do Tecido Renal	115
5.2.7 Efeito dos Tratamentos na Histopatologia do Tecido Renal.....	117
5.3 MARCADORES PLASMÁTICOS NO MODELO DE LESÃO POR APAP	120
5.3.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA, Nitrito e GSH.....	120
5.3.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Colesterol Total, LDL-c e HDL-c	121
5.3.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Triglicerídeos	123
5.3.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Glicose.....	124
5.3.5 Considerações Finais	124
6. CONCLUSÃO.....	128
BIBLIOGRAFIA	129
APÊNDICES E ANEXOS	150
APÊNDICE A.....	150
APÊNDICE B.....	151
Coloração por Hematoxilina-Eosina	151
<i>Preparação de Hematoxilina</i>	151
<i>Preparação de Eosina</i>	151
APÊNDICE C	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Metabolismo e toxicidade de APAP.	24
Figura 2- Mecanismo de ação da Acupuntura.	29
Figura 3 - Desenho Experimental.	39
Figura 4 – Imagem Fotográfica Ilustrativa da Gavagem.	40
Figura 5 - Imagem Fotográfica Ilustrativa do Dispositivo de Imobilização.	40
Figura 6 - Localização dos acupontos em ratos.	41
Figura 7 - Níveis de AST no Plasma (U/L).	51
Figura 8 - Níveis de ALT no Plasma (U/L).	52
Figura 9 - Níveis de MPO no no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).	53
Figura 10 - Níveis de MDA no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).	54
Figura 11 - Níveis de Nitrito no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).	55
Figura 12 - Níveis de GSH no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).	56
Figura 13 - Peso do Lobo Hepático Direito (g).	57
Figura 14 - Peso do Lobo Hepático Esquerdo (g).	58
Figura 15 - Número de Escores da Análise Histopatológica do Tecido Hepático.	59
Figura 16 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático (%).	60
Figura 17 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático no Pré-Condicionamento - HE.	62
Figura 18 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático no Pós-Condicionamento - HE.	63
Figura 19 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático no Modelo Pré e Pós-Condicionamento - Tricômico de Masson.	64
Figura 20 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático no Modelo Pré e Pós-Condicionamento - Prata Reticulina.	66
Figura 21 - Níveis de Uréia no Plasma (mg/dL).	68
Figura 22 - Níveis de Creatinina no Plasma (mg/dL).	69
Figura 23 - Níveis de MPO no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).	70
Figura 24 - Níveis de MDA no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).	71
Figura 25 - Níveis de Nitrito no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).	72
Figura 26 - Níveis de GSH no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).	73
Figura 27 - Peso do Rim Direito (g).	74
Figura 28 - Peso do Rim Esquerdo (g).	75

Figura 29 - Número de Escores da Análise Histopatológica do Tecido Renal.	76
Figura 30 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal (%).	77
Figura 31 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal no Modelo Pré e Pós- Condicionamento - HE.	79
Figura 33 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal no Modelo Pré e Pós- Condicionamento - Tricômico de Masson.	81
Figura 34 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal no Modelo Pré e Pós- Condicionamento - Prata Metenamina.	83
Figura 35 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal no Modelo Pré e Pós- Condicionamento - PAS.	85
Figura 36 - Níveis de MDA no Plasma ($\mu\text{M}/\text{mL}$).	87
Figura 37 - Níveis de Nitrito no Plasma ($\mu\text{M}/\text{mL}$).	88
Figura 38 - Níveis de GSH no Plasma ($\mu\text{M}/\text{mL}$).	89
Figura 39 - Níveis de Colesterol Total no Plasma (mg/dL).	90
Figura 40 - Níveis de LDL-c no Plasma (mg/dL).	91
Figura 41 - Níveis de HDL-c no Plasma (mg/dL).	92
Figura 42 - Níveis de Triglicerídeos no Plasma (mg/dL).	93
Figura 43 - Níveis de Glicose no Plasma (mg/dL).	94
Figura 44 - Fisiopatogenia do bloqueio das vias pró-regenerativas por indução de APAP.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação Histológica da Lesão Hepática.....	47
Tabela 2 - Classificação Histológica da Lesão Renal.....	48
Tabela 3 - Níveis de AST no Plasma (U/L).....	51
Tabela 4 - Níveis de ALT no Plasma (U/L).....	52
Tabela 5 - Níveis de MPO no Tecido Hepático (µM/g).....	53
Tabela 6 - Níveis de MDA no Tecido Hepático (µM/g).....	54
Tabela 7 - Níveis de Nitrito no Tecido Hepático (µM/g).....	55
Tabela 8 - Níveis de GSH no Tecido Hepático (µM/g).....	56
Tabela 9 - Peso do Lobo Hepático Direito (g).....	57
Tabela 10 - Peso do Lobo Hepático Esquerdo (g).....	58
Tabela 11 – Número de Escores da Análise Histopatológica do Tecido Hepático.....	59
Tabela 12 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático (%).....	60
Tabela 13 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático - HE.....	61
Tabela 14 - Níveis de Uréia no Plasma (mg/dL).....	68
Tabela 15 - Níveis de Creatinina no Plasma (mg/dL).....	69
Tabela 16 - Níveis de MPO no Tecido Renal (µM/g).....	70
Tabela 17 - Níveis de MDA no Tecido Renal (µM/g).....	71
Tabela 18 - Níveis de Nitrito no Tecido Renal (µM/g).....	72
Tabela 19 - Níveis de GSH no Tecido Renal (µM/g).....	73
Tabela 20 - Peso do Rim Direito (g).....	74
Tabela 21 - Peso do Rim Esquerdo (g).....	75
Tabela 22 - Número de Escores da Análise Histopatológica do Tecido Renal.....	76
Tabela 23 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal (%).....	77
Tabela 24 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal - HE.....	78
Tabela 25 - Níveis de MDA no Plasma (µM/mL).....	87
Tabela 26 - Níveis de Nitrito no Plasma (µM/mL).....	88
Tabela 27 - Níveis de GSH no Plasma (µM/mL).....	89
Tabela 28 - Níveis de Colesterol Total no Plasma (mg/dL).....	90
Tabela 29 - Níveis de LDL-c no Plasma (mg/dL).....	91
Tabela 30 - Níveis de HDL-c no Plasma (mg/dL).....	92
Tabela 31 - Níveis de Triglicerídeos no Plasma (mg/dL).....	93

Tabela 32 - Níveis de Glicose no Plasma (mg/dL).	94
Tabela 33 – Efeito dos Tratamentos Propostos sobre as Lesões Provocadas pelo Acetaminofeno.	125

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Acupuntura
APAP	Acetaminofeno
BP6	Baço-Pâncreas 6
CAT	Catalase
CK	Células de kupfer
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CT	Colesterol total
CYP450	Citocromo 450
DMT2	Diabetes melitus tipo 2
DRC	Doença renal crônica
E36	Estômago 36
EA	Eletroacupuntura
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GLN	Glutamina
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa hepática
HE	Hematoxilina-Eosina
HPS70	Proteína de choque térmico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IHA	Insuficiência hepática aguda
IL	Interleucina
iNOS	NOS induzida
IRA	Insuficiência renal aguda
LDL-c	Lipoproteínas de baixa densidade
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malonaldeído
mGSH	GSH mitocondrial
miR-223	MicroRNA-223
MPO	Mieloperoxidase

MTC	Medicina tradicional chinesa
mtDNA	DNA mitocondrial
NAPQI	N-acetil- <i>p</i> -benzoquinoneimina
NFκβ	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Superóxido
PAS	Ácido Periódico de Schiff
R3	Rim 3
SLM	Silimarina
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicerídeos
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
TNF-α	Fator de necrose tumoral
VB34	Vesícula Biliar 34

1 INTRODUÇÃO

1.1 INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA E RENAL AGUDA

A insuficiência hepática aguda (IHA) é definida como a deterioração rápida da função hepática na ausência de uma doença pré-existente no fígado e caracteriza-se pela falta do sangue, falência múltipla de órgãos vitais e estado mental alterado. Uma característica crítica de IHA é o surgimento de uma resposta imune maciça, com o recrutamento de células efetoras e liberação descontrolada de citocinas, que destrói células e órgãos saudáveis, levando à morte. Não há atualmente uma terapia eficaz contra IHA, uma condição que mata entre um e seis pessoas por milhão a cada ano (BERNAL et al., 2010).

Nas doenças hepáticas, o mecanismo do dano hepático está relacionado à disfunção da microcirculação, superprodução de radicais livres, exaustão da substância energética, sobrecarga de cálcio, e disfunção mitocondrial. Entre esses fatores, a disfunção da microcirculação desempenha um papel importante e em grande parte decide o grau do dano tecidual (IWAKIRI; SHAH; ROCKEY, 2014). Portanto, a microcirculação hepática é um indicador biológico muito significativo no acompanhamento dos progressos de doença hepática e nos processos de tratamento (WANG et al., 2015a).

A overdose por acetaminofeno (APAP) acidental ou intencional também é uma das causas da hepatotoxicidade grave e necrose em seres vivos, especificamente em humanos (KAPLOWITZ, 2005).

A lesão renal induzida por drogas é uma das principais causas para o desenvolvimento de insuficiência renal aguda (IRA) e está entre as mais importantes complicações observadas em pacientes hospitalizados (GARRETT et al., 1999). A IRA é uma síndrome caracterizada por um súbito declínio sustentado na taxa de filtração glomerular e retenção de resíduos nitrogenados. Não obstante, pode resultar de isquemia e substâncias nefrotóxicas. Em resposta a lesão, as células tubulares renais podem sofrer danos letais e subletais (EMMETT, 2001).

A IRA foi demonstrada em situações de sobredosagem por APAP. Trumper et al. (1995), verificaram em ratos o surgimento de IRA, após overdose por APAP, com

comprometimento da hemodinâmica renal e funções tubulares e em modelo de rim perfundido isolado, diurese, natriurese e elevação da excreção de glicose.

Curiosamente, existe uma ligação plausível no quadro metabólico e fisiopatológico entre os rins e o fígado (ORLIĆ et al., 2014). Embora a nefrotoxicidade seja menos comum que a hepatotoxicidade na superdosagem de APAP, a necrose tubular renal e a IRA não parece estar relacionada com a gravidade da lesão hepática (MOUR et al., 2005), contudo, são frequentemente observadas naqueles que desenvolveram lesão hepática importante (NAUTA et al., 2005).

As doses terapêuticas de APAP também podem causar hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em alguns indivíduos, no entanto, os mecanismos e os fatores de risco não são claros.

1.2 MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA E RENAL INDUZIDA POR APAP

Em modelos que envolvem a necrose de zonas lobulares induzidas por lesão tóxica, os eventos iniciais da lesão são dominados por inflamação aguda das zonas necróticas, com infiltração de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos na área necrótica para remover os hepatócitos mortos (MICHALOPOULOS, 2007).

A contínua necrose dos hepatócitos e ativação do sistema imunológico pode ser devido à formação de agregados protéicos nos hepatócitos e ao aumento do estresse oxidativo, com maior produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (KRENKEL; MOSSANEN; TACKE, 2014).

A regeneração hepática é tanto um processo clinicamente importante, como um grande modelo para estudar o crescimento regenerativo. Muito pouco se conhece atualmente sobre os sinais de condução e de finalização desse processo, tanto em termos de sistemas de ligante/receptor e em termos de contribuições gerais, incluindo o sistema circulatório e sinalização de outros órgãos (KENG et al., 2009).

Na patogênese por APAP, várias células não-parenquimatosas, citocinas específicas e quimiocinas que recrutam leucócitos para o local do dano, são incorporadas na resposta inflamatória após uma lesão aguda do fígado (JAESCHKE; WILLIAMS, 2012). O aumento na produção de EROs também leva à disfunção da

permeabilização da membrana mitocôndria, causando necrose de hepatócitos na lesão hepática induzida por APAP (MARTIN-MURPHY; HOLT; JU, 2010; JAESCHKE et al., 2012; DU; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016).

Os macrófagos hepáticos, tradicionalmente conhecidos como células de kupfer (CK), estão localizados nos sinusóides do fígado e agem como uma primeira linha de defesa do sistema imunológico inato à exposição constante de antígenos alimentares presente no sangue e bactérias no intestino (ZIMMERMANN; TRAUTWEIN; TACKE, 2012).

Ao lado de seu papel essencial como fagócitos, as CK são a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias hepáticas como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-1 β , IL-12, IL-10) (LUEDDE; SCHWABE, 2011; GARDNER et al., 2012) e recrutamento de células inflamatórias circulantes para o fígado, desempenhando assim um papel fundamental na patogênese da lesão hepática e de esteatose não alcoólica (MARTIN-MURPHY; HOLT; JU, 2010).

Inicialmente na lesão, os macrófagos se tornam escassos, enquanto durante a fase de restauração, descobrem um modo de auto renovação independente e de infiltração de monócitos (DAMBACH et al., 2002; ZIGMOND et al., 2014).

No rim, a resposta celular à lesão é heterogênea, passando por necrose ou apoptose, enquanto outras são subletais. A gravidade e a duração da lesão aguda renal podem estar relacionadas com a proporção de células danificadas que são capazes de manter a viabilidade e contribuir para um processo de reparação coordenado, restaurando a estrutura e função do rim (DEVARAJAN et al., 2003; SUPAVEKIN et al., 2003).

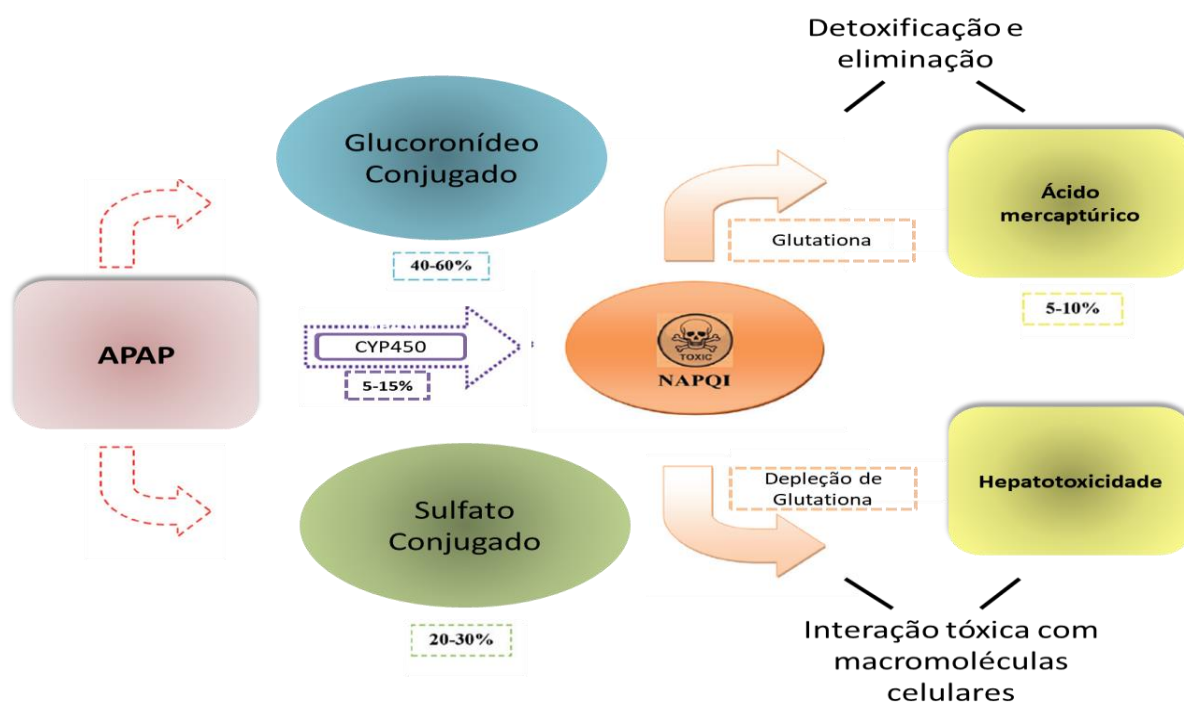
Além da lesão e necrose das células tubulares renais estarem associados a vários indicadores de apoptose, o uso de medicamentos nefrotóxicos é outra causa comum de lesão renal. Implicações fisiológicas e fisiopatológicas de cada fonte de células progenitoras para a reparação de túbulos renais lesionados ainda são desconhecidos (HAVASI; BORKAN 2011).

A localização da lesão em segmentos do néfron tem implicações patogênicas no estudo pré-clínico da nefrotoxicidade. A histomorfologia da lesão segmentar pode ajudar a definir mecanismos de ação tóxica e a buscar os biomarcadores específicos (SCHNELLMANN, 2001).

1.3 TOXICIDADE POR APAP

APAP usado em doses terapêuticas é rapidamente metabolizado no fígado por sulfatação e glucuronidação e eliminado principalmente como sulfato e glicuronídeo, metabólitos não tóxicos (PATTERN et al, 1993). No entanto, uma porção pequena do fármaco (5-15%) é metabolizada no fígado pelo citocromo P450 (CYP450), gerando um metabólito altamente tóxico e reativo, o N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI) (JAMES; MAYEUX; HINSON, 2003) que é rapidamente conjugado pela glutathiona hepática (GSH) e transformado em um produto na forma reduzida, não tóxico e solúvel em água, o ácido mercaptúrico, que pode ser então excretada através da bile após glucuronidação (FIGURA 1) (LARSEN; WENDON, 2014).

Figura 1- Metabolismo e toxicidade de APAP.



APAP - acetaminofeno, CYP450 - citocromo P450, NAPQI - N-acetil-p-benzoquinoneimina. Fonte: elaborada pela autora (2019).

Com doses maiores, os sistemas de conjugação ficam saturados e esgotam as reservas de GSH, causando extensa lesão hepática (MITCHELL et al., 1973; MITCHELL; LAUTERBURG, 1982).

O aumento desta substância causa oxidação de GSH intracelular, que resulta no esgotamento do pool de GSH e reduz suas concentrações e, logo, excede a sua taxa de desintoxicação, resultando na ligação covalente do NAPQI com proteínas celulares do parênquima hepático e o DNA com conseqüente lesão hepática, estresse oxidativo, aumento da peroxidação lipídica (LPO), danos da membrana celular e morte do hepatócito (PATTERN et al., 1993; LARSEN; WENDON, 2014).

A overdose por APAP inibe a respiração mitocondrial e provoca uma diminuição nos níveis de ATP no fígado (JAESCHKE, 1990). Sendo o fígado, o órgão mais oxidativo, o aumento do estresse oxidativo induz a apoptose (DAS et al., 2011).

Quando o sinal apoptótico está presente, uma proteína pró-apoptótica sofre uma mudança conformacional e é translocada para as mitocôndrias, causando danos e poros na membrana mitocondrial externa levando à despolarização da membrana mitocondrial. A manutenção do potencial da membrana é crucial para a sobrevivência celular, pois sua perda induz a liberação do citocromo c no citosol e ativa as vias de sinalização apoptótica (GHOSH et al., 2016).

Na maioria das vezes, investigações sobre disfunções nas mitocôndrias induzidas por drogas relatam o efeito agudo em diferentes parâmetros, como potencial e permeabilidade da membrana, consumo de oxigênio, atividade de diferentes complexos das vias respiratórias cadeia e fluxo de oxidação de ácidos graxos (PORCEDDU et al., 2018).

1.4 USOS TERAPÊUTICOS NA LESÃO HEPÁTICA E RENAL INDUZIDA POR APAP

1.4.1 Silimarina

Silimarina (SLM) é um extrato composto de polifenóis isolado de frutas e do leite de cardo de sementes de *Silybum marianum* (TURGUT et al., 2008). Essa substância possui propriedades hipolipemiantes (METWALLY; EL-GELLAL; EL-SAWAISI, 2009) e efeito inibitório na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) *in vitro* (LOCHER et al., 1998).

A hepatoproteção através das flavonolignanas acelera a atividade mitótica e, assim, leva a regeneração do tecido hepático (SHAKER; MAHMOUD; MNAA, 2010),

além de possuir fortes inibidores de leucotrienos e mediadores pró-inflamatórios por inibir a função das CK (DEHMLOW; ERHARD; DE GROOT, 1996).

A SLM é usada em todo o mundo há muitos anos como uma alternativa complementar, devido aos efeitos benéficos associados com o tratamento de doenças hepáticas (MORALES-GONZÁLEZ et al., 2013). A SLM auxilia no tratamento de distúrbios digestivos funcionais que ocorrem nas hepatopatias. Atua de forma benéfica como adjuvante no tratamento das doenças hepáticas inflamatórias crônicas. Seu efeito terapêutico é baseado em sua influência sobre a permeabilidade e a função excretora das células hepáticas, bem como na sua eficiência metabólica. É um potente estabilizador das membranas dos hepatócitos, conservando a integridade e a função fisiológica do fígado (BASIGLIO et al., 2009).

A SLM tem um grande potencial hepatoprotetor em longo prazo contra dano hepático causado por agentes tóxicos como APAP (CAMPOS et al., 1989; NENCINI; GIORGI; MICHELI, 2007). A proteção ocorre por vários mecanismos, que inclui proteção contra a eliminação de GSH, desintoxicação e redução do estresse oxidativo (CAMPOS et al., 1989).

Em nível molecular, acredita-se que SLM estimula a síntese de RNA e proteínas levando a regeneração mais rápida ao tecido do fígado, podendo modular a inflamação mediada por TNF- α . No entanto, essas vias moleculares pelos quais a SLM exerce seus efeitos ainda não são claras (GHOSH et al., 2016).

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* têm abordado os efeitos protetores da SLM contra nefrotoxicidade (EL-SHITANY; EL-HAGGAR; EL-DESOKY, 2008; HOMSI; DE BRITO; JANINO 2010; DABAK; KOCAMAN, 2015).

1.4.2 Glutamina

Esse nutriente vem demonstrando um desempenho no papel central na resposta à lesão (HONG et al., 1992), provavelmente por ser um precursor da GSH, podendo assim, afetar tanto o estresse oxidativo e inflamação no rim (PENG et al., 2013).

Células, tais como linfócitos, macrófagos, enterócitos, de proliferação rápida, mostraram que tanto a renovação celular pode ser aumentada, quanto à manutenção das estruturas e funções celulares pode ser mantida, em meios de

cultura contendo Glutamina (GLN) (CURI et al., 2005). Participa no aumento da reserva energética celular, estimula a liberação de insulina e melhora o metabolismo da glicose em condições de resistência à insulina (DÉCHELOTTE et al., 2006).

Na lesão mediada por oxidante, a suplementação com GLN pode ser um método simples, seguro e relativamente barato para melhorar a proteção antioxidante (HONG et al.1992).

A GLN pode reduzir lesão celular hepática e renal por atenuar a redução da expressão de COX-2 (ARAÚJO JUNIOR et al. 2011; ESPOSITO et al. 2011). Além disso, pode ter efeitos agudos e crônicos no metabolismo celular e regular a síntese e ativação de importantes proteínas, incluindo as da matriz extracelular mesangial, uma dos principais elementos no desenvolvimento da glomerulosclerose (CURI et al., 2005).

É comum quando os rins são submetidos a estresse oxidativo, a GLN ser o fator limitante para a preservação da capacidade antioxidante total e na síntese de GSH, da apoptose de células tubulares, da concentração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e na síntese de óxido nítrico (NO) na nefrotoxicidade (MORA et al., 2003; FULLER et al., 2007; GARRETT-COX et al. 2009; GOUVÊA JUNIOR et al. 2011; GONG et al. 2017).

A via de morte mitocondrial subsequente pode atuar parcialmente como uma sinalização precoce que promove a morte celular apoptótica que leva à lesão renal, e a GLN pode pelo menos impedir parcialmente a apoptose através do aumento dos níveis de proteína de choque térmico (HSP70) ou GSH (KIM et al. 2009). Dessa forma, a GLN diminui a disfunção renal, o dano tecidual e morte de células tubulares, atenuando a nefrotoxicidade induzida de diferentes maneiras (KIM et al. 2015a).

1.4.3 Acupuntura e Eletroacupuntura

Acupuntura (ACP), palavra derivada dos radicais latinos *acus* e *pungere*, que significam, respectivamente, agulha e puncionar, é uma forma de terapia que busca a cura das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas em pontos específicos denominados acupontos (SCHOEN, 1993). O estímulo de certo ponto (locus) ou pontos (loci) na ou perto da superfície do

corpo pela inserção de agulhas pode prevenir ou modificar a percepção da dor (analgesia) ou normalizar funções fisiológicas, incluindo controle da dor e tratamento da doença ou disfunção (LIU et al., 2001).

A Medicina Oriental tem uma história muito mais longa que a Medicina moderna convencional, e estudos dos mecanismos médicos de ACP são um aspecto importante que pode ser utilizado como um método complementar da abordagem dos problemas hepáticos e renais. Estudos ou pesquisas em países ocidentais não contemplam largamente técnicas utilizadas na Medicina Oriental, porém, essas técnicas parecem ser muito efetivas na manutenção ou tratamento da saúde. Dessa forma, a Medicina Tradicional Chinesa (MTC) pode auxiliar na proteção à toxicidade hepática e renal, prevenindo ou tratando a lesão.

Essa manobra terapêutica da MTC tem sido aplicada em clínicas por milhares de anos, e tem encontrado um efeito positivo no sistema neuroendócrino e imune, com aumentos temporários dos níveis de citocinas, além de antagonizar a resposta inflamatória com poucos efeitos colaterais (ZIJLSTRA et al., 2003; SONG et al., 2014a).

Embora a estrutura e mecanismos biológicos desta técnica não estejam estabelecidos, a quantidade de dados exhibe significantes efeitos antiinflamatórios (LIU et al., 2011).

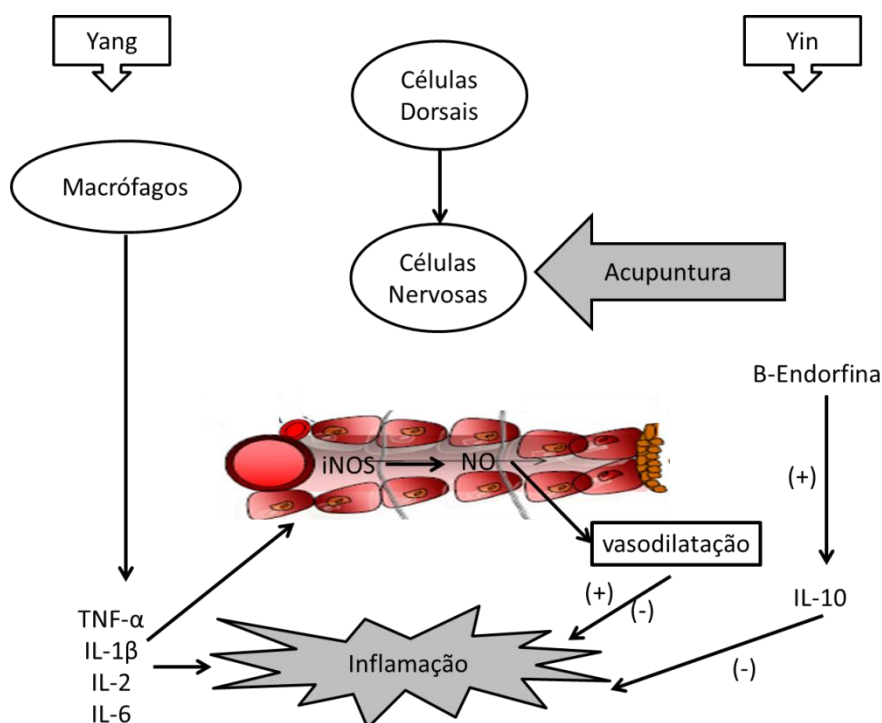
O estímulo por agulhas pode estimular a formação neurogênica de mediadores vasoativos reguladores da distribuição e o fluxo de sangue para os órgãos e tecidos afetados após o início da inflamação, ativando os sistemas de defesa (ROGERS; SCHOEN; LIMEHOUSE, 1992). Além disso, o envolvimento da serotonina parece ser uma característica geral dos efeitos mediados da ACP no esvaziamento gástrico (SUGAI et al. 2004).

A ACP está envolvida no estresse oxidativo, aumentando os níveis de antioxidante e reduzindo a LPO (DAI et al. 2008; SANTOS et al. 2013). Também parece indicar um efeito anti-hipertensivo (LEUNG et al. 2016), anti-neoplásicas (ROGERS; SCHOEN; LIMEHOUSE, 1992), neuroprotetor nas doenças degenerativas devido à regulação dos antioxidantes (LEE et al. 2018) e pode ser usada como uma opção de tratamento sinérgico para o controle da obesidade (ISMAIL et al. 2015)

Aplicar ACP no meridiano renal (R3) parece aumentar o metabolismo no rim (LI et al. 2011) e melhorar a função renal por eliminar radicais livres (SONG et al. 2014b).

A ACP tenta recuperar o equilíbrio do Yin e Yang (FIGURA 2), entre o aspecto físico, emocional e espiritual do indivíduo e o fluxo e qualidade de energia. Ativação adicional pode ser obtida através da manipulação de agulha ou eletroestimulação de diferentes frequências (ZIJLSTRA et al., 2003).

Figura 2- Mecanismo de ação da Acupuntura.



TNF-α - Fator de Necrose Tumoral, IL - Interleucina. Fonte: Figura adaptada de Zijlstra et al. (2003).

Eletroacupuntura (EA) é a estimulação elétrica através das agulhas em pontos de ACP em várias frequências (SUGAI et al. 2004). A EA tem sido cada vez mais aceita como um tratamento viável para tratamento de uma variedade de doenças e para melhorar o funcionamento visceral autônomo (SUGAI et al., 2004). Aplicada em frequências diferentes podem causar a liberação de opióides endógenos e ativação de receptores específicos (CHEN; HAN, 1992).

O estímulo elétrico do acuponto com baixa (2-10Hz) e alta (100Hz) frequência tem diferentes mecanismos na liberação seletiva de β-endorfinas, encefalinas ou

dinorfinas (CHEN; HAN, 1992). Os efeitos supressores da EA de baixa frequência são mediados por neurônios pós-ganglionares simpáticos, enquanto os efeitos supressores de EA de alta frequência são mediados pelo eixo medular simpático-adrenal (KIM et al. 2008).

A microcirculação hepática é um indicador biológico muito significativo no monitoramento do progresso da doença (WANG et al. 2015a). O estímulo pode modular a atividade vascular do tecido hepático, aumentando a perfusão, demonstrando efeito clínico na circulação hepática e nos mecanismos de vasoregulação, confirmando a teoria da MTC de que a ACP poderia promover Qi e circulação sanguínea (SONG et al., 2014a; WANG et al. 2015a).

EA pode ser provavelmente uma possível terapia adjuvante para a disfunção hepática induzida e o mecanismo está possivelmente relacionado à diminuição do conteúdo de TNF-alfa, no entanto, seu mecanismo de ação precisa de mais investigação (SHI et al. 2008; LIU et al. 2011).

EA também pode ser uma estratégia benéfica na lesão renal (GU et al. 2011). O aumento do metabolismo energético tem uma estreita correlação entre o R3 (ponto de origem) e o rim (CHEN et al. 2010).

A EA diminui o estresse oxidativo local e sistêmico (SANTOS et al., 2013), caracterizando um efeito anti-hipertensivo (OH et al. 2012). Contudo, EA pode ter um efeito pró-peroxidativo. Tanto ACP quanto EA reduz a atividade de MPO, possivelmente inibindo a infiltração de neutrófilos, sugerindo que esses métodos de tratamento podem ter um papel protetor na lesão oxidativa induzida (SANTOS et al., 2013). Alta frequência em E36 e BP6 é relatado por proteger o sistema nigroestriatal por vários mecanismos, incluindo antioxidação e antiapoptose, atenuando as alterações patológicas no cérebro (WANG et al. 2011)..

EA 10/100 Hz pode atenuar a LPO e reduzir simultaneamente o estresse oxidativo nos tecidos hepáticos e renais, porém, frequências mais altas podem induzir uma melhor proteção contra o estresse oxidativo, mas os mecanismos envolvidos ainda não estão claros (SILVA et al. 2011).

1.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA TOXICIDADE POR APAP

1.5.1 AST e ALT

As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade. A elevação absoluta das aminotransferases tem grande significado diagnóstico, mas não prognóstico, nas hepatopatias agudas. No entanto, é possível que os níveis dessas enzimas diminuam mesmo quando o tecido hepático sofre necrose (PAKNEJAD et al, 2006).

A ALT tem sido usada amplamente como biomarcador específico para toxicidade hepática pré-clínica e clínica. No entanto, um aumento nos níveis de ALT tem sido associado com a lesão musculoesquelética indicando que a enzima tem especificidade além da ausência da lesão hepática e alterações histopatológicas no fígado (NATHWANI et al., 2005).

1.5.2 Uréia e Creatinina

Marcadores séricos como uréia e creatinina avaliam o funcionamento e a capacidade da região glomerular e tubular dos néfrons. A elevação desses marcadores no plasma é tomada como índice de nefrotoxicidade, embora os níveis séricos de uréia sejam considerados fator decisivo quando se trata de fisiologia renal (SABIU; O'NEILL; ASHAFI, 2016).

1.5.3 Mieloperoxidase

A enzima mieloperoxidase (MPO) é um sinal inflamatório secretado pelos leucócitos nos compartimentos fagolisossômicos e no meio extracelular após a ativação no fagócito no sangue periférico, tecidos ou fluidos (PATTISON; DAVIES; HAWKINS, 2012; TSAI et al., 2014). MPO e oxidantes derivados podem participar como mediadores da oxidação e modificação de biomoléculas ou tecidos (KISIC et al., 2016).

1.5.4 Malonaldeído

O malonadeído (MDA) é um produto final da LPO gerado pelo ataque de radicais livres aos ácidos graxos polinsaturados.

O mecanismo da hepatotoxicidade ainda não está totalmente esclarecido, embora seja reconhecido que existe um envolvimento simultâneo da ligação covalente, LPO e estresse oxidativo (RANDLE et al., 2008).

1.5.5 Óxido Nítrico

A biodisponibilidade de NO depende da sua síntese pela enzima óxido nítrico sintase na presença de oxigênio molecular e também da sua degradação mediada por EROs, particularmente o ânion superóxido (O_2^-) (ABRANTES et al., 2014).

EROs são geradas em todas as células aeróbicas e incluem radical O_2^- , peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). O NO rapidamente reage com o O_2^- formando um peroxinitrito altamente reativo, que pode diretamente iniciar o processo de LPO, ou indiretamente, por reagir com GSH, um importante fator de defesa antioxidante (HIMMELFARB, 2009). Em circunstâncias fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre antioxidantes e oxidantes produzidos por sistemas celulares aeróbicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984).

O estresse oxidativo é o resultado de um desequilíbrio entre a produção de EROs e a sua inativação pelo sistema de proteção (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984).

1.5.6 Glutathiona hepática

Glutathiona hepática (GSH) é o mais abundante tiol não proteico celular, em concentrações na faixa milimolar no fígado. Em condições fisiológicas, o fígado é protegido do estresse oxidativo pela capacidade de seus hepatócitos sintetizarem GSH (KRETZSCHMAR, 1996).

Em condições normais, a produção contínua de EROs é compensada pela poderosa ação de enzimas protetoras como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), antioxidantes que fornecem a defesa necessária contra os danos induzidos pelo estresse oxidativo (TURGUT et al., 2008).

1.5.7 Colesterol, Triglicerídeos e Glicose

O acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, principalmente na forma de ácidos graxos livres e triglicerídeos (TG), é considerado o primeiro passo no desenvolvimento de uma lesão hepática. Contudo, a progressão da lesão além da esteatose hepática geralmente ocorre na presença do estresse oxidativo, inflamação, morte celular e fibrose (MARÍ et al. 2006).

Ademais, as reservas de GSH mitocondrial (mGSH) são essenciais para o controlar a produção de EROs por estímulos de morte celular, como TNF- α (MONTERO et al., 2010). O excesso mitocondrial de colesterol total (CT) prejudica o transporte de GSH, esgota as reservas de mGSH, promovendo a geração de EROs mitocondrial em resposta ao ligante TNF- α , causando peroxidação, que desestabiliza o lipídio da bicamada membrana mitocondrial. As consequências funcionais são sensibilização dos hepatócitos ao TNF- α , permeabilização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo c, necrose e apoptose de hepatócitos, que promovem inflamação hepática (MARÍ et al., 2006; MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2013). Os adipócitos hipertrofiados na obesidade caracterizados pela sobrecarga intracelular de colesterol têm uma diminuição na concentração de colesterol na membrana plasmática, devido a uma diluição do colesterol da membrana através de um aumento da superfície celular. A depleção relativa do colesterol da membrana ativa um fator de transcrição promovendo ainda mais o acúmulo de colesterol dentro da célula adiposa, prejudicando a sinalização de insulina intracelular e translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2013).

A overdose por APAP leva ao aumento dos níveis de aminotransferases no sangue, mas pouco conhecimento existe sobre o vínculo do fígado e ácidos graxos livres e sinalização mediada por eicosanoides (SUCIU et al., 2015).

Um estudo experimental documentou uma ligação entre hiperglicemia, estresse oxidativo e diabetes na nefropatia. Concentrações elevadas de glicose aumentam a expressão do gene óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da proteína, bem como a liberação de NO, que estão associados a um aumento concomitante da produção de O₂. Esses achados podem explicar a função endotelial

prejudicada e ser importante no desenvolvimento de doença vascular diabética (COSENTINO et al., 1997).

1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

APAP é uma medicação bastante utilizada em todo mundo, devido sua ação antipirética e analgésica, além de ter custo popular e não necessitar de prescrição médica. Dessa forma, sua comercialização é extensa atinge um grande número de usuários. Embora o consumo ocasional não produza eventos orgânicos de prejuízo à saúde, o uso contínuo, pode em algumas pessoas, como em idosos, trazer danos a diversos órgãos, como o fígado e rim.

Dados epidemiológicos sobre o uso excessivo de acetaminofeno e o número de intoxicações revelam um número expressivo de vítimas anuais por suicídio.

O mecanismo da nefrotoxicidade ainda não é claro, enquanto que a necrose hepática também é compreendida de forma incompleta. Poucas terapias que previnem ou revertem os danos hepáticos e renais causados por APAP são conhecidas, principalmente àquelas oriundas da Medicina Tradicional Chinesa, como acupuntura e eletroacupuntura. Poucos modelos experimentais foram desenhados para se estudar os efeitos desses recursos terapêuticos na lesão hepática e renal por APAP e seu mecanismo de ação.

Vários estudos destacam opções terapêuticas de regeneração hepática em lesão induzida por APAP. Os mecanismos de regeneração hepática após a lesão não são bem conhecidos e, para verificar a reprodutibilidade do modelo experimental em murinos de lesão por APAP, foi realizado este estudo.

Os ratos são amplamente utilizados para o desenvolvimento de modelos murinos de lesão hepática e renal por droga e muitos pesquisadores utilizam o modelo experimental de lesão por APAP, incluindo os campos da biologia, farmacologia e toxicologia.

Nesse sentido, um modelo de lesão hepática e renal por APAP foi elaborado com objetivos de entender como APAP produz a lesão e que parâmetros identificam a lesão. Para isso, foi levada em consideração a dose administrada de APAP, o tipo de lesão causada, prognósticos da lesão de ordem bioquímica e histopatológica.

Como tratamento de prevenção ou reversão da lesão causada por APAP, aguda ou subaguda, foi escolhido a terapia com silimarina, glutamina, acupuntura e eletroacupuntura.

Pretende-se com este estudo contribuir para a ampliação do conhecimento sobre as condições em que APAP produz os danos hepáticos e renais, fazer o diagnóstico precoce da lesão e aumentar as possibilidades de tratamento na lesão hepática e renal por APAP.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Nesta pesquisa, objetivou-se avaliar os efeitos da silimarina, glutamina, acupuntura e eletroacupuntura de 2Hz e 100Hz em um modelo experimental de lesão hepática e renal induzido por acetaminofeno (APAP).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar toxicidade hepática e renal por parâmetros bioquímicos em ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de lesão induzida por APAP por:
 - Aspartato aminotransferase
 - Alalnia aminotransferase
 - Uréia
 - Creatinina
 - Colesterol e frações
 - Triglicerídeos
 - Glicose
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo no tecido e no plasma em ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de lesão induzida por APAP por:
 - Mieloperoxidase
 - Malondialdeído
 - Nitrito
 - Glutathiona hepática
- Avaliar o tecido hepático e renal através do estudo histológico por coloração Hematoxilina-Eosina;
- Avaliar o tecido hepático e renal através do estudo histoquímico por coloração especial por ácido periódico-Schiff, tricrômica de Masson, Prata Reticulina e Prata Metenamina em ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de lesão induzida por APAP.

3 MÉTODO

3.1 ÉTICA

A utilização de animais neste experimento foi conduzida sob as condições éticas e científicas regulamentada pela Lei Federal n. 6.638, de 8 de maio de 1979.

Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (UFC) através do protocolo 44/2012 (ANEXO 1).

3.2 AMOSTRA

Foram utilizados cento e quatro ratos, com idade de 8-10 semanas, machos (*Rattus norvegicus*: var. albinus, Rodentia, Mammalia), com massa corporal total variando de 180 a 280g da linhagem Wistar, saudáveis e bem nutridos, provenientes do Biotério Central da UFC, e mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX) em gaiolas de polipropileno, providos de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forrados com maravalhas, recebendo água e comida *ad libitum*, em sala climatizada, com exaustão de gases e redução de ruídos, observando a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (Guabi Nutrilabor®, Mogiana Alimentos, São Paulo) foram ofertadas *ad libitum* até 12 horas antes do experimento.

Os ratos foram previamente aclimatados por um período de sete dias antes do início de realização do experimento para minimizar o estresse.

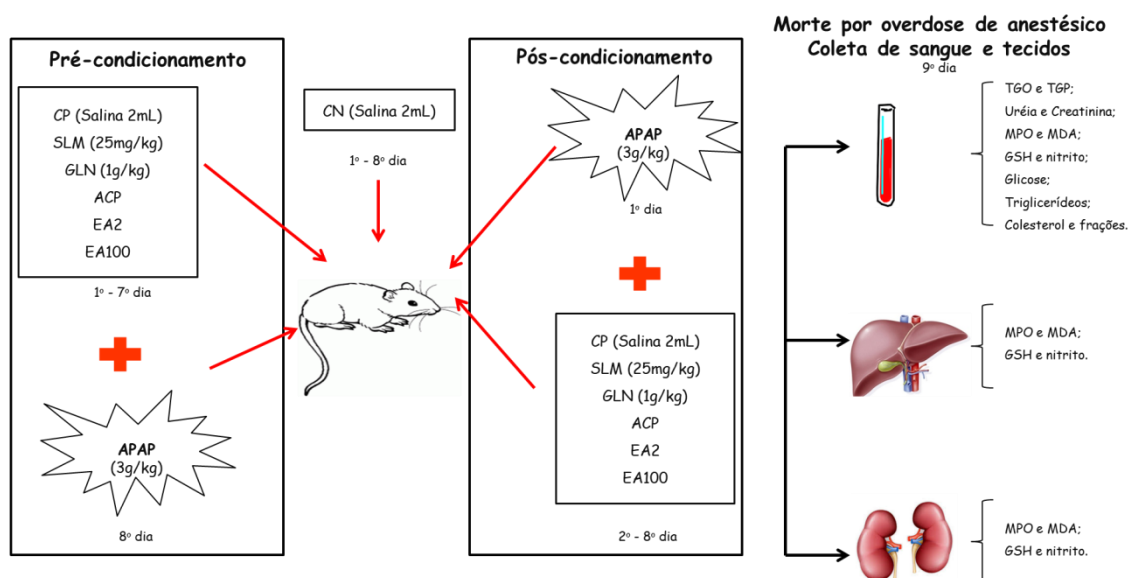
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A colocação dos animais por grupo ocorreu de forma aleatória, conforme protocolos já desenvolvidos para a indução por APAP e separados em modelos de pré e pós-condicionamento. Cada modelo foi avaliado em sete grupos de oito animais e ao fim dos experimentos, foi coletado sangue e em seguida, foram mortos por overdose anestésica para coleta de sangue e órgãos.

No modelo pré-condicionamento, o grupo Controle Negativo (CN) foi tratado com soro fisiológico 0,9%; o grupo Controle Positivo (CP) com APAP; e os demais grupos foram pré-condicionados com Salina (CP), Silimarina (SLM), Glutamina (GLN), Acupuntura (ACP), Eletroacupuntura 2Hz (EA2) e Eletroacupuntura 100Hz (EA100) e depois induzidos com APAP (FIGURA 3).

No modelo pós-condicionamento, o grupo Controle Negativo (CN) foi tratado com soro fisiológico 0,9%; o grupo Controle Positivo (CP) com APAP; e os demais grupos foram pós-condicionados com Silimarina (SLM), Glutamina (GLN), Acupuntura (ACP), Eletroacupuntura 2Hz (EA2) e Eletroacupuntura 100Hz (EA100) à indução de APAP (FIGURA 3).

Figura 3 - Desenho Experimental.



APAP - acetaminofeno, CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. AST - Aspartato aminotransferase, ALT - Alanina aminotransferase, MPO - Mieloperoxidase, MDA - Malonaldeído, GSH - Glutathiona hepática. Fonte: elaborada pela autora (2019).

3.3.1 Doses e Reagentes

Para a indução da lesão, a dose foi selecionada tendo por base o teste de toxicidade aguda de alguns estudos que usaram 3 g/kg de APAP em dose única (EL-SHAFFEY et al. 2015; SILVA et al., 2017).

As substâncias e as doses utilizadas para o tratamento da toxicidade por APAP foram baseadas em estudos prévios com ratos: 25 mg/kg de SLM (ONAOLAPO et al., 2017) e 1 g/kg de GLN (LIN et al., 2014). Os animais receberam as drogas por gavagem (FIGURA 4).

Figura 4 – Imagem Fotográfica Ilustrativa da Gavagem.

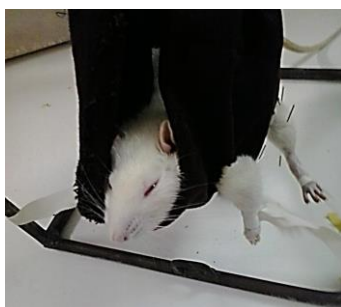


Fonte: Fotografia elaborada pela autora (2019).

3.3.2 Protocolo de Acupuntura e Eletroacupuntura

Para a utilização de ACP e EA, os animais foram primeiramente imobilizados durante 20 minutos, utilizando um dispositivo de imobilização (rede de contenção), conforme preconizado na literatura por Gondim (2012) (FIGURA 5).

Figura 5 - Imagem Fotográfica Ilustrativa do Dispositivo de Imobilização.



Fonte: Fotografia elaborada pela autora (2019).

Os animais foram adaptados sete dias antes da realização dos experimentos no dispositivo de imobilização com seus membros dianteiros e traseiros e a cauda exposta por 20 minutos. A técnica de imobilização dos animais foi elaborada pela profa. Dra. Mariana Lima Vale do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA - UFC) e adaptada pelo grupo desta pesquisa (LABCEX - UFC).

Para aplicação da ACP e EA (2 e 100), os animais foram imobilizados durante 20 minutos, utilizando o dispositivo de imobilização, conforme o protocolo do modelo pré-condicionamento ou modelo pós-condicionamento. Para padronização dos procedimentos, ratos não submetidos à ACP e EA, foram imobilizados por 20 minutos logo após as gavagens.

A ACP e EA foram realizadas diariamente, durante sete dias, inserindo-se agulhas metálicas de aço inoxidável, descartáveis, de 0,18mm de diâmetro/8mm de comprimento (modelo Dong Bang distribuídas no Brasil por Xu Li Comércio, Importação e Exportação Ltda, São Caetano do Sul - SP), perfazendo um total de sete aplicações, administrada por uma especialista em medicina oriental treinada e experiente.

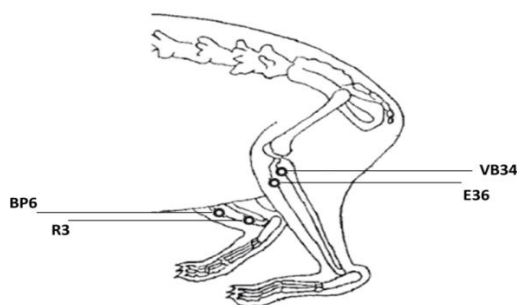
Para a eletroestimulação, as agulhas foram conectadas ao eletroestimulador Sikuro DS 100C (Sikuro Sistemas e Equipamentos Eletrônicos Ltda, Niterói - Rio de Janeiro, Brasil) da seguinte forma: cátodo conectado à agulha no membro inferior do lado direito e ânodo conectado à agulha no membro inferior do lado esquerdo.

O tempo de estimulação foi de 20 minutos na frequência (2 e 100)Hz com intensidade de 1,0 mA, pulsos quadrados com duração de 2 segundos, com intervalo (repouso) de 2 segundos .

3.3.3 Acupontos

Os pontos selecionados para o tratamento da lesão hepática e renal foram pareados em meridianos do estômago, vesícula biliar, baço pâncreas e rim (FIGURA 6).

Figura 6 - Localização dos acupontos em ratos.



E36 - Estômago 36, VB34 - Vesícula Biliar, BP6 - Baço Pâncreas, R3 -Rim 3. Fonte: Figura adaptada de Tanahashi et al. (2011) e Yim et al. (2006).

Estômago 36

Estômago 36 (E36), determinado de acordo com o meridiano do estômago humano, situa-se no rato, 5 mm abaixo da cabeça fibular e 2 mm lateral ao tubérculo anterior da fíbula, onde transitam, nessa região os ramos laterais do nervo sural cutâneo, o ramo cutâneo do nervo safeno e o ramo profundo do nervo peroneal (YIN et al., 2008).

E36 é um ponto de ACP que tem sido usado para o tratamento de doenças como inflamação, dor aguda, hipertensão, e distúrbios gastrintestinais (XIA; GUAN; YANG, 2014). Esse acuponto é principalmente investigado em terapia com ACP na doença hepática, pois se acredita na MTC, que produz efeitos de ativação e circulação sanguínea e dissipar a estase de sangue (LIU et al., 2011).

Vesícula Biliar 34

Vesícula Biliar 34, determinado de acordo com o meridiano da vesícula biliar humano, está localizada na depressão anterior e inferior à cabeça da fíbula (YIN et al., 2008).

Baço-Pâncreas 6

Baço-Pâncreas 6 (BP6), determinado de acordo com o meridiano do baço-pâncreas humano está localizado na linha tibiofibular próximo do maléolo (YIN et al., 2008). O ponto BP6 também tem sido investigado em diversos estudos sobre a atividade hepática.

Rim 3

Rim 3 (R3), determinado de acordo com o meridiano do rim humano, está localizado na depressão posterior e medial tibiofibular do maléolo (YIN et al., 2008).

Mudanças no fluxo sanguíneo renal estão claramente documentadas por se relacionar com pontos específicos de ACP, que podem ser observado com estímulo no R3 (XU, 1993).

3.3.4 Coleta de Sangue

Amostras de sangue foram retiradas do plexo orbital e depois, os animais foram mortos por overdose de anestésico.

O sangue foi colocado em tubos eppendorff de 2 mL, individuais, contendo uma gota de anticoagulante heparina. Os tubos contendo o sangue foram imediatamente centrifugados por 20 minutos, para separação do plasma, em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24). Após este procedimento, o plasma de cada tubo foi coletado e aliqotado em tubos tipo eppendorff de 2 mL e imediatamente congelados e armazenados à temperatura de - 70° C até o momento das análises.

3.3.5 Procedimento Anestésico

A anestesia utilizada para a coleta de amostras foi obtida pela aplicação por via intraperitoneal (i.p.) de uma solução anestésica, contendo hidrato de cloral a 10% (AUDAZ Reagentes Tecnológicos), na dose de 0,1mL da solução, para cada 30g/kg de peso do animal. Após cinco minutos, tempo necessário para obter o nível anestésico adequado, o animal foi colocado na mesa operatória, em decúbito dorsal. A profundidade anestésica foi avaliada por parâmetros clínicos, como: a frequência respiratória e cardíaca, reflexo da córnea e palpebral, movimentos das narinas e ou de outros grupos musculares.

3.3.6 Coleta de Órgãos

Após a morte dos animais por overdose de anestésico, foram retirados o fígado e rim para determinações morfométricas (peso e dimensões).

A metade ventral dos tecidos foi fixada por imersão em solução a 4 % de formaldeído tamponado durante 24 horas para posterior processamento histológico. Cortes de parafina de 5 micrometros de espessura foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e examinados ao microscópio óptico.

3.4 PARAMETROS AVALIADOS

3.4.1 Determinação De Parâmetros Bioquímicos

Para verificação da função hepática foram dosados no plasma dos animais os níveis de AST, ALT e para função renal, os níveis de uréia e creatinina. Para avaliação da inflamação e do estresse oxidativo, foram dosados MDA, nitrito e GSH no tecido e no plasma. Para a verificação de marcadores nutricionais foram dosados colesterol total (CT) e frações, triglicerídeos (TG) e glicose plasmática.

A dosagem plasmática foi quantificada pelo Kit Labtest Diagnóstica S.A. e determinado pelo Analisador Automático Labmax Plenno no Laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM/UFC).

3.4.2 Mieloperoxidase

Amostras de fígado e rim foram analisadas, conforme prescrito por Bradley, Christensen e Rothstein (1982). O tecido hepático e renal do lado direito foi removido para determinar a atividade da MPO. O tecido (50-70 mg) foi colocado em tampão potássio-fosfato, pH= 6,0, contendo 0,5 % do tampão HTAB (1 mL de tampão/50 mg de tecido) em um homogeneizador de tecido. O homogenato foi agitado e centrifugado por 5 min a 2500 rpm. A atividade da enzima foi determinada por medida da absorbância (450 nm) em um leitor de ELISA, realizando duas leituras em intervalos de 60 s, usando 1 mM de diidrocloreto de o-dianisidina e 0,0005 % de H₂O₂ em uma microplaca. Uma unidade de MPO foi definida como a que converte 1 μ mol de H₂O₂ em água a 22 °C. Os resultados foram expressos como unidades de μ M/g de tecido.

3.4.2 Malonaldeído

Amostras de fígado e rim foram analisadas para avaliação de MDA, conforme prescrito por Draper e Hadely (1990). O método é baseado na medida espectrofotométrica da cor roxa gerada pela reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Substâncias reativas TBARS, um marcador para peroxidação lipídica, foram determinadas pelo método de aquecimento duplo. A teoria do método foi uma

medida espectrofotométrica da cor produzida durante a reação de TBARS com MDA.

Para avaliação MDA no plasma, 2,5 mL de 100 g/L de ácido tricloroacético foi adicionado a 0,5 mL de soro num tubo de centrifugação e incubado durante 15 min a 90 ° C. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 3000 g durante 10 min e 2 mL do sobrenadante foram adicionados 1 mL a solução de 6.7 g/L de TBARS num tubo de ensaio e novamente incubada durante 15 min a 90 ° C. A solução foi então resfriada a temperatura ambiente e sua absorbância foi medida usando o espectrofotômetro Vankel 50 UV VISIVEL em 532 nm.

Para avaliação de MDA no tecido, as amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de TBARS a 0,67% e depois aquecidas num banho maria durante 30 min. Os equivalentes de MDA foram determinados em tecido e em partículas sub-relacionadas ao fígado e rim de rato espectrofotometricamente pela absorbância a 532 nm. Os resultados foram expressos como unidades de $\mu\text{M/g}$ de tecido.

3.4.3 Nitrito

Amostras de fígado e rim foram analisadas para a determinação da concentração de nitrito, através da reação colorimétrica de Griess (GREEN et al., 1982). Adicionou-se à uma placa de ELISA de 96 poços (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector, EUA) 25ul do sobrenadante da amostra em duplicata, seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Este é composto de sulfanilamida 1% diluída em H_3PO_4 2,5% (solução A) e de N-1-naphtylethtylenodiamina, também diluído em solução de H_3PO_4 2,5% (solução B). Para a confecção de uma curva-padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200uM passou por diluições seriadas. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 540 nm.

Este ensaio determina as concentrações de nitrito com base na conversão enzimática de nitrato para nitrito pela ação da nitrato-redutase. Os resultados foram expressos como unidades de $\mu\text{M/g}$ de tecido.

3.4.4 Glutaciona Hepática

Amostras de fígado e rim foram analisadas para a determinação da concentração da GSH de acordo com a reação do reagente de Ellman (1959).

Para avaliação de GSH no plasma, uma alíquota de 50 μL do plasma foi misturada em 1 mL de tampão Tris-EDTA (1 mM), sendo feita uma primeira leitura a 412 (leitura A1). Após essa leitura foi adicionado 20 μL de 5,5'- ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM, diluído em metanol. Esperou-se 15 minutos à temperatura ambiente e fez-se nova leitura. Os valores foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mL}$.

Para avaliação de GSH no tecido, preparou-se o homogenato com tecido a 10% em EDTA 0,02 M. Em seguida retirou-se 400 μL (ou 200 μL) desse homogenato e adicionou 320 μL (160 μL) de água destilada e mais 80 μL (40 μL) de ácido tricloroacético a 50% (no eppendorff). O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Em seguida foi recolhido 400 μL do sobrenadante e acrescido 800 μL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 μL de DTNB 0,01. Após 1 minuto da reação foi feita a leitura em 412 nm, através de um espectrofotômetro. A concentração da GSH reduzida foi expressa em $\mu\text{M}/\text{g}$ de tecido.

3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Amostras de fígado e rim foram colhidas após necropsia, colocadas em formol a 10% tamponado e enviadas para o Laboratório do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML/UFC) para processamento automatizado (Leica TP1020) em soluções: álcool-formol, álcool 70%, álcool 80%, álcool 100% (3 vezes), xilol (3 vezes), parafina (3 vezes) por 45 minutos.

Em seguida, o material foi levado ao inclusor (Leica ECN115H) onde contem duas placas quentes e uma fria para ser incluso em bloco de parafina (Paraplast®) a 56°C.

Após o material ser colocado no Molde de Aço Inox, derramou-se parafina aquecida sobre a amostra e foi levado para placa fria para o endurecimento da parafina (10 minutos). Depois, o bloco foi montado para corte.

Cortes histológicos de 5 μm de espessura foram realizadas com micrótomo (Leica RM2125 RTS) e, depois de montados em lâminas de vidro coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

3.5.1 Coloração por Hematoxilina-Eosina

As lâminas contendo os cortes de fígado e rim foram inicialmente desparafinizados em xilol (3 vezes) e depois, reidratados em sequência decrescente de etanol (álcool etílico absoluto, álcool etílico 90°, álcool etílico 80°, álcool etílico 70°), lavados em água corrente e, então, colocadas em solução de Hematoxilina-Eosina (H&E) de 1 a 3 minutos. Ao término deste período, as lâminas foram lavadas em água corrente e em seguida, foram colocadas, em água com amônia por 1 minuto, depois água corrente e em solução de Eosina alcólica para 1000 mL (2,5 g de eosina, 950 mL de álcool absoluto, 5 mL de ácido acético dissolvida em 50 mL de água destilada).

Para o exame microscópico das lâminas, foram constituídos índices de avaliação de lesão em “scores” descritos para o tecido hepático (Tabela 1), adaptado de Ishak et al. (1995), e para o tecido renal (Tabela 2), elaborado pela própria autora.

Para diminuir o efeito da variação interobservador, as lâminas foram examinadas por dois observadores.

3.5.2 Avaliação Histopatológica do Tecido Hepático

Para o estudo do fígado utilizou-se um modelo de escore semiquantitativo baseado em Ishak et al. (1995) modificado pela autora (TABELA 1).

Tabela 1 - Classificação Histológica da Lesão Hepática.

Classificação de Lesão Hepática Aguda por Escores Necroinflamatórios	
	Escores
A. Arquitetura Hepática	
Preservada	0
Não preservada	1
B. Lesão Hepática periportal ou periseptal (necrose por etapas)	
Ausente	0
Mínima (focal, poucas áreas portais)	1
Moderada (focal, muitas áreas portais)	2

Moderada + de 50% dos septos	3
Severa (extensa com + de 50% dos septos)	4

C. Necrose Confluyente

Ausente	0
Mínima (focal, poucas áreas portais)	1
Moderada (focal, muitas áreas portais)	2
Moderada + de 50% dos septos	3
Severa (extensa com + de 50% dos septos)	4

D. Hiperplasia de Kupfer

Presente	0
Não presente	1

E. Congestão de centro lobular

Presente	0
Não presente	1

F. Esteatose em microgota

Ausente	0
Focal (poucas áreas portais)	1
Moderada (muitas áreas portais)	2
Severa (envolvimento do parênquima)	4

Fonte: classificação histológica de Ishak et al. (1995) modificado pela autora (2019).

3.5.3 Avaliação Histopatológica do Tecido Renal

A lesão renal foi avaliada por um modelo de escore semiquantitativo elaborado pela própria autora (TABELA 2).

Tabela 2 - Classificação Histológica da Lesão Renal.

Classificação de Lesão Renal Aguda por Escores Necroinflamatórios

	Escore
<hr/>	
A. Alterações Intersticiais	
Ausente	0
Presente	1
<hr/>	
B. Nefrite	

Ausente	0
Presente	1
C. Intensidade da Nefrite	
Leve	0
Moderado	1
Severo	2
D. Necrose	
Ausente	0
Presente	1
E. Alterações Tubulares	
Ausente	0
Degeneração celular tubular epitelial sem necrose	1
Degeneração celular tubular epitelial com necrose	2

Fonte: classificação histológica elaborada pela autora (2019).

3.5.4 Estudo Histoquímico

Os cortes obtidos foram previamente expostos à rotina histológica e submetidos a diferentes técnicas de coloração: Hematoxilina-Eosina (HE), para observação das características histológicas gerais; e Tricrômico de Masson, Prata Reticulina, Prata Metenamina e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para evidenciar, respectivamente, a deposição de colágeno, trama de fibra reticular no tecido para observar a membrana e os componentes glomerulares além de mucopolisacarídeos. Todos os protocolos experimentais foram desenvolvidos segundo Spicer (1987).

3.5.5 Avaliação Microscópica

As imagens utilizadas neste estudo foram obtidas utilizando um microscópio OLYMPUS BX41, modelo U-MDOB3, obedecendo a leitura crescente pelas objetivas 5x, 10x, 20x e 40x sob a ocular 10x.

Os cortes histológicos foram analisados e classificados por dois observadores para pontuar o estágio de doença hepática. Para tanto, houve reuniões de consenso pré-julgamento para definir com precisão a interpretação das definições categóricas do sistema de pontuação a ser utilizado e clarificar os limites entre as categorias. A

avaliação foi cega independente das séries de estudo a ser realizadas pelos observadores. Outras reuniões de consenso ainda foram necessárias para discutir discrepâncias de pontuação.

3.5.6 Documentação Fotográfica

Realizada por meio de microscópio óptico OLYMPUS BX60 com câmara acoplada (ZEISS, AxioCam HRc) com uso do software Axion Vision® (ZEISS, 2000), para a aquisição das imagens.

As imagens digitais dos tecidos foram obtidas no Laboratório de Investigação Diagnóstica-DPML/UFC com o auxílio do microscópio óptico de captura Leica® DM5000 através do software Leica Application Suite (versão 2.4.1) e a partir das imagens obtidas foi construída uma prancha representativa dos grupos avaliados no aumento de 10 e 20 vezes.

3.5.7 Análise Estatística

Os valores dos testes bioquímicos, de função hepática, e renal foram submetidos aos testes estatísticos, aplicando-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e calculados a média amostral e o erro padrão da média (E.P.M.).

Para avaliar teste entre o grupo Controle Negativo e Controle Positivo, aplicou-se o Teste t-students. Para teste comparativo entre o grupo Controle Positivo e os grupo de Intervenção, aplicou-se o teste ANOVA/ Dunnett.

Os resultados foram expressos em forma de tabelas e gráficos. A significância estatística foi fixada em 0,05% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP

4.1.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de AST no Plasma

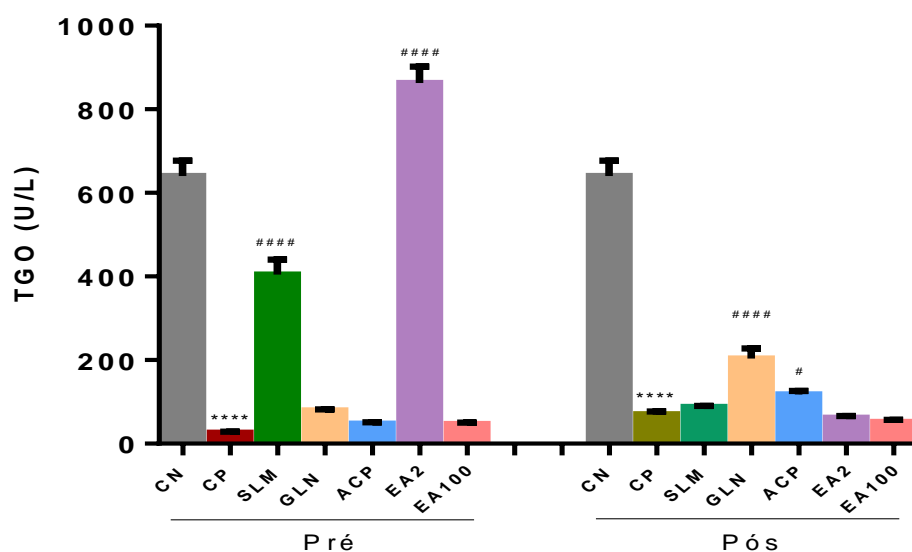
APAP causou diminuição significativa nos níveis de AST no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O pré (SLM e EA2) e pós-condicionamento (GLN e ACP) causou aumento significativo nos níveis de AST em relação ao grupo CP.

Tabela 3 - Níveis de AST no Plasma (U/L).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	640,70	25,88	404,3	79,38	47,75	862,00	46,88
	(± 36,26)	(± 2,76)	(± 36,05)	(± 2,51)	(± 3,59)	(± 39,74)	(± 3,77)
Pós	640,70	70,50	88,25	204,00	118,10	61,88	52,00
	(± 36,26)	(± 6,36)	(± 2,00)	(± 24,19)	(± 7,99)	(± 4,66)	(± 5,46)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 7 - Níveis de AST no Plasma (U/L).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de ALT no Plasma

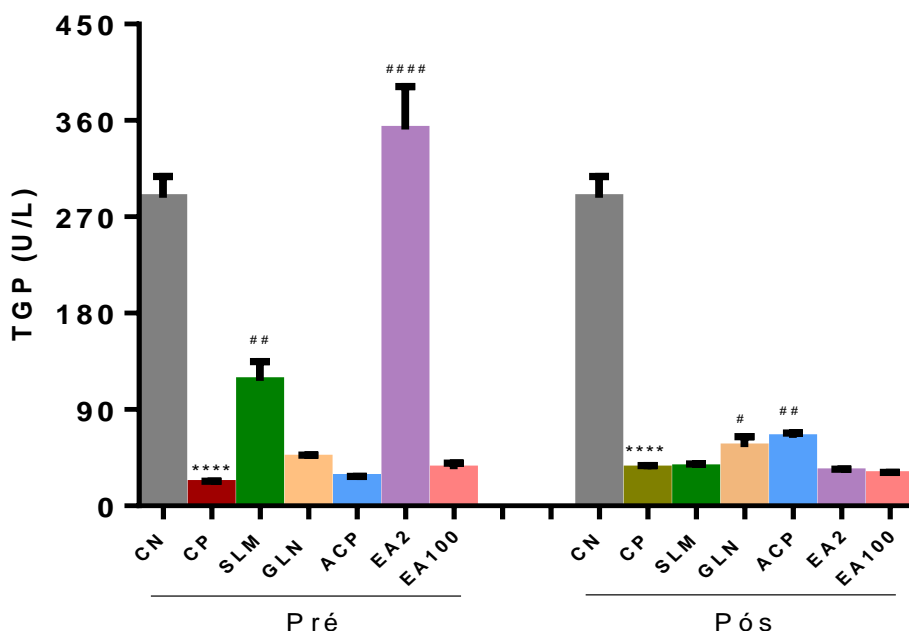
APAP causou diminuição significativa nos níveis de ALT no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O pré (SLM e EA2) e pós-condicionamento (GLN e ACP) causou aumento significativo nos níveis de ALT em relação ao grupo CP.

Tabela 4 - Níveis de ALT no Plasma (U/L).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	287,80	20,63	116,90	44,38	26,25	351,6	34,38
	(± 19,76)	(± 2,54)	(± 17,87)	(± 3,01)	(± 1,30)	(± 39,97)	(± 5,42)
Pós	287,80	34,25	35,38	54,88	63,50	31,75	28,88
	(± 19,76)	(± 3,51)	(± 3,81)	(± 9,89)	(± 4,66)	(± 2,66)	(± 2,26)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 8 - Níveis de ALT no Plasma (U/L).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MPO no Tecido Hepático

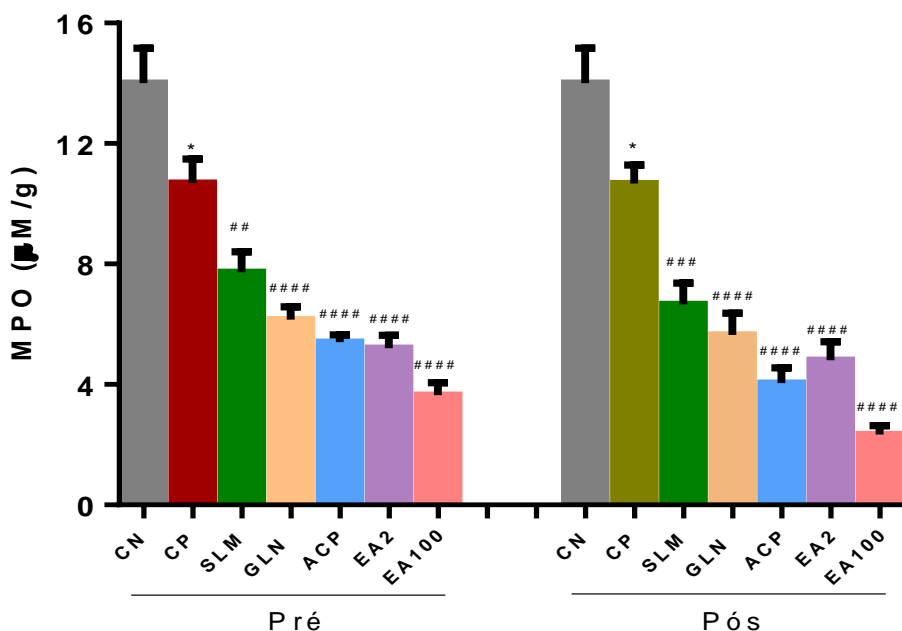
APAP causou diminuição significativa nos níveis de MPO no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O pré e pós-condicionamento (SLM, GLN, ACP, EA2 e EA100) causou diminuição significativa nos níveis de MPO em relação ao grupo CP.

Tabela 5 - Níveis de MPO no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	14,00	10,68	7,73	6,15	5,40	5,20	3,64
	($\pm 1,16$)	($\pm 0,80$)	($\pm 0,67$)	($\pm 0,42$)	($\pm 0,23$)	($\pm 0,42$)	($\pm 0,41$)
Pós	14,00	10,67	6,65	5,64	4,04	4,80	2,33
	($\pm 1,16$)	($\pm 0,61$)	($\pm 0,71$)	($\pm 0,72$)	($\pm 0,50$)	($\pm 0,61$)	($\pm 0,29$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 9 - Níveis de MPO no no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Tecido Hepático

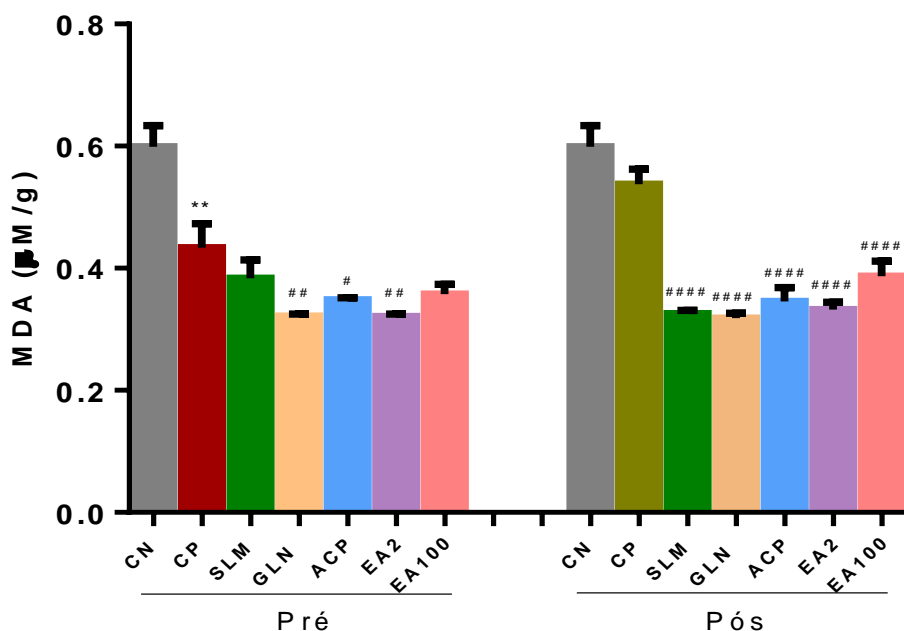
APAP causou diminuição significativa nos níveis de MDA no grupo CP (pré) em relação ao grupo CN. O pré (GLN e EA2) e pós-condicionamento (SLM, GLN, ACP, EA2 e EA100) causou diminuição significativa nos níveis de MDA em relação ao grupo CP.

Tabela 6 - Níveis de MDA no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	0,59	0,43	0,38	0,32	0,34	0,32	0,35
	($\pm 0,03$)	($\pm 0,03$)	($\pm 0,03$)	($\pm 0,00$)	($\pm 0,00$)	($\pm 0,00$)	($\pm 0,01$)
Pós	0,59	0,53	0,32	0,31	0,34	0,33	0,38
	($\pm 0,03$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,00$)	($\pm 0,00$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,02$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 10 - Níveis de MDA no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Tecido Hepático

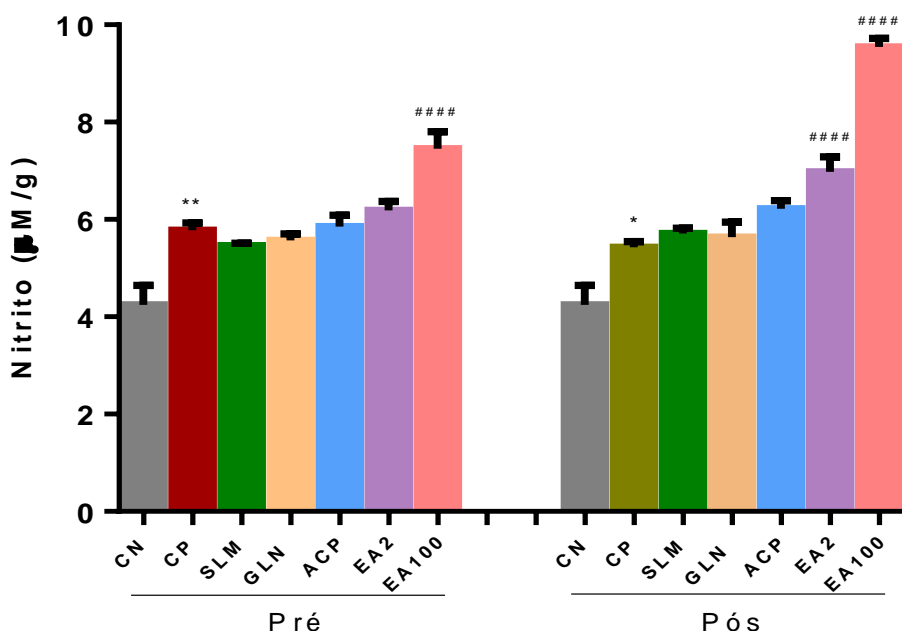
APAP causou aumento significativo nos níveis de Nitrito no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O pré (EA100) e pós-condicionamento (EA2 e EA100) causou aumento significativo nos níveis de Nitrito em relação ao grupo CP.

Tabela 7 - Níveis de Nitrito no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	4,24	5,77	5,46	5,57	5,85	6,19	7,45
	($\pm 0,39$)	($\pm 0,15$)	($\pm 0,04$)	($\pm 0,12$)	($\pm 0,23$)	($\pm 0,17$)	($\pm 0,34$)
Pós	4,24	5,42	5,71	5,63	6,21	6,97	9,54
	($\pm 0,39$)	($\pm 0,12$)	($\pm 0,10$)	($\pm 0,31$)	($\pm 0,16$)	($\pm 0,30$)	($\pm 0,17$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 11 - Níveis de Nitrito no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. * $p < 0,05$ (vs. CN), # $p < 0,05$ (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.6 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Tecido Hepático

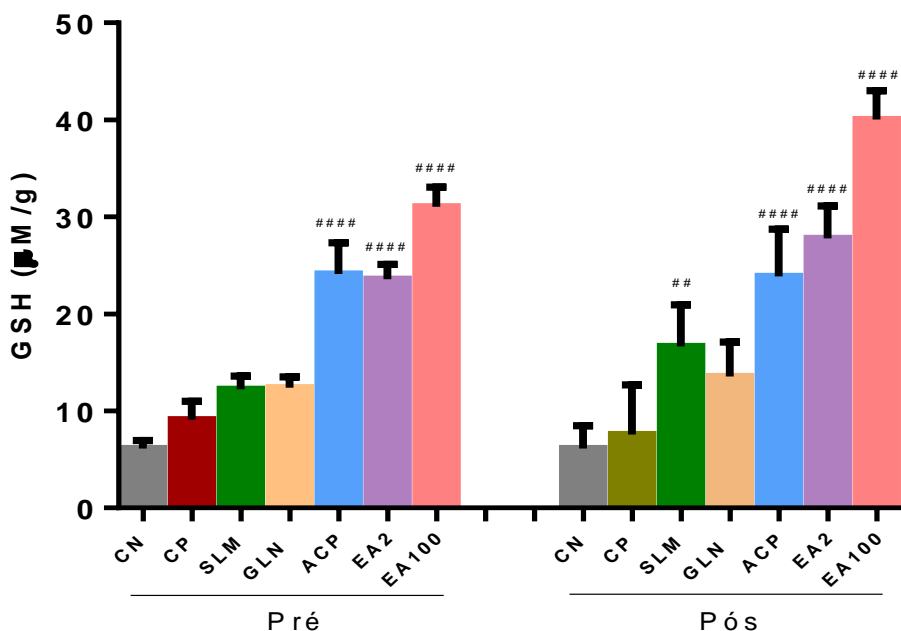
APAP não causou alteração significativa nos níveis de GSH no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O pré (ACP, EA2 e EA100) e pós-condicionamento (SLM, ACP, EA2 e EA100) causou aumento significativo nos níveis de GSH em relação ao grupo CP.

Tabela 8 - Níveis de GSH no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	6,12	9,09	12,24	12,39	24,11	23,59	31,03
	($\pm 0,83$)	($\pm 1,90$)	($\pm 1,36$)	($\pm 1,10$)	($\pm 3,24$)	($\pm 1,49$)	($\pm 2,04$)
Pós	6,12	7,55	16,64	13,56	23,85	27,80	40,03
	($\pm 0,83$)	($\pm 1,82$)	($\pm 1,52$)	($\pm 1,25$)	($\pm 1,72$)	($\pm 1,17$)	($\pm 2,96$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 12 - Níveis de GSH no Tecido Hepático ($\mu\text{M/g}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.7 Efeito dos Tratamentos no Peso do Lobo Hepático Direito

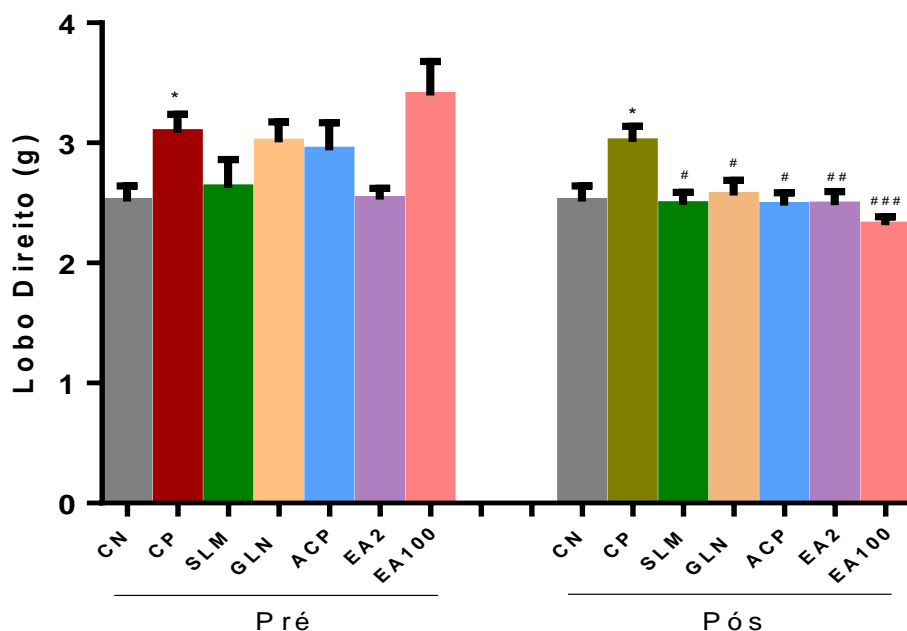
APAP causou aumento significativo no peso do lobo hepático direito no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O pós-condicionamento (CP, SLM, ACP, EA2 e EA100) causou aumento significativo no peso do lobo hepático direito em relação ao grupo CP.

Tabela 9 - Peso do Lobo Hepático Direito (g).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	2,51	3,08	2,62	3,00	2,93	2,52	3,39
	(± 0,12)	(± 0,15)	(± 0,23)	(± 0,17)	(± 0,22)	(± 0,09)	(± 0,28)
Pós	2,51	3,01	2,48	2,56	2,47	2,48	2,31
	(± 0,12)	(± 0,12)	(± 0,10)	(± 0,12)	(± 0,10)	(± 0,11)	(± 0,06)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 13 - Peso do Lobo Hepático Direito (g).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz.*p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.8 Efeito do Tratamento no Peso do Lobo Hepático Esquerdo

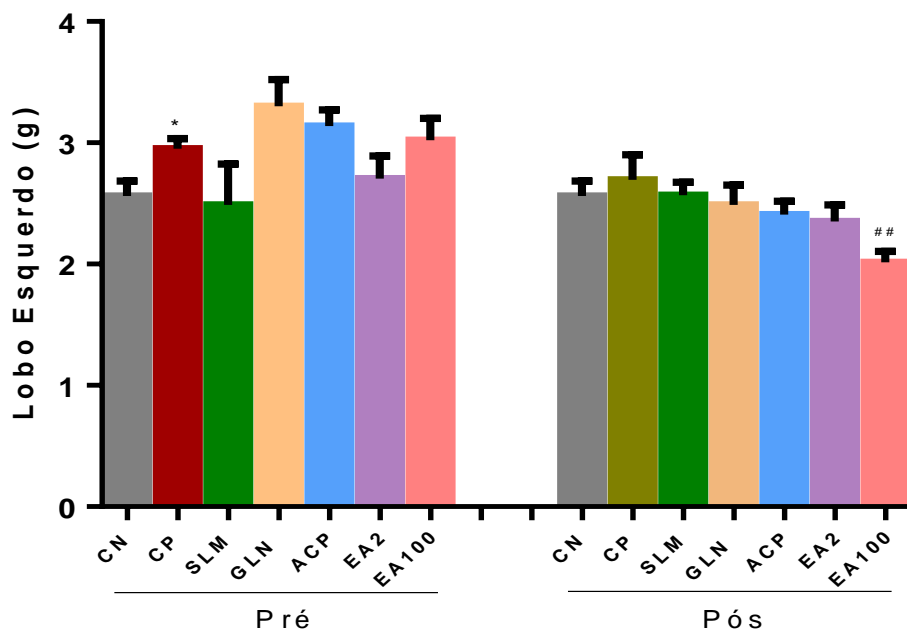
APAP causou aumento significativo no peso do lobo hepático esquerdo no grupo CP (pré-condicionamento) em relação ao grupo CN. O pós-condicionamento (EA100) causou diminuição significativa no peso do lobo hepático esquerdo em relação ao grupo CP.

Tabela 10 - Peso do Lobo Hepático Esquerdo (g).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	2,56	2,95	2,48	3,30	3,13	2,70	3,02
	(± 0,12)	(± 0,08)	(± 0,33)	(± 0,21)	(± 0,13)	(± 0,18)	(± 0,17)
Pós	2,56	2,69	2,56	2,48	2,40	2,35	2,01
	(± 0,12)	(± 0,20)	(± 0,10)	(± 0,16)	(± 0,10)	(± 0,13)	(± 0,09)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 14 - Peso do Lobo Hepático Esquerdo (g).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), ##p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.9 Efeito dos Tratamentos na Histopatologia do Tecido Hepático

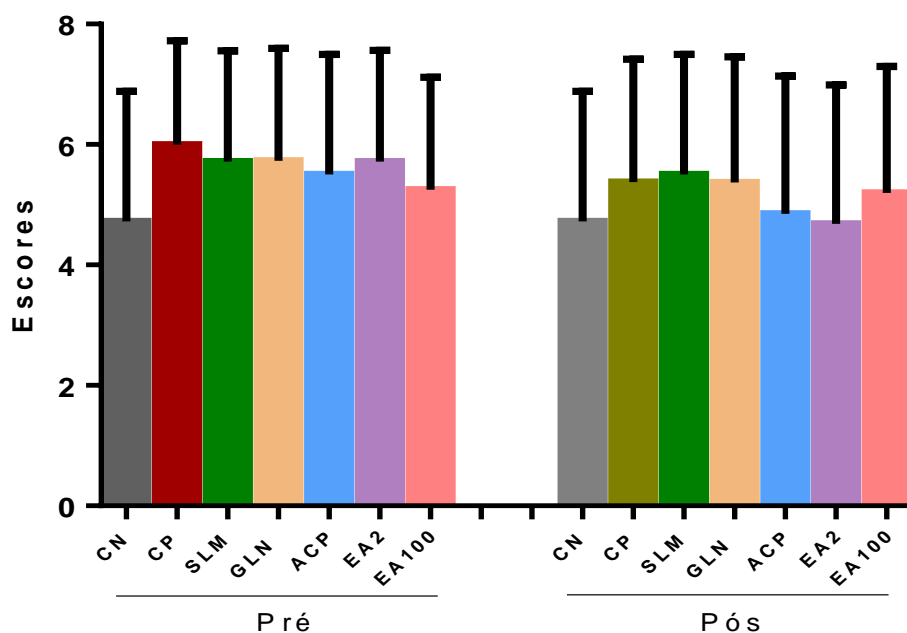
Não houve alteração significativa nos escores obtidos do estudo histopatológico em relação aos grupos CN e CP.

Tabela 11 – Número de Escores da Análise Histopatológica do Tecido Hepático.

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	4,72 (± 2,16)	5,99 (± 1,72)	5,71 (± 1,84)	5,72 (± 1,87)	5,50 (± 1,99)	5,72 (± 1,84)	5,25 (± 1,86)
Pós	4,72 (± 2,16)	5,37 (± 2,04)	5,50 (± 1,99)	5,37 (± 2,08)	4,85 (± 2,28)	4,68 (± 2,30)	5,20 (± 2,09)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 15 - Número de Escores da Análise Histopatológica do Tecido Hepático.



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz.*p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.10 Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático

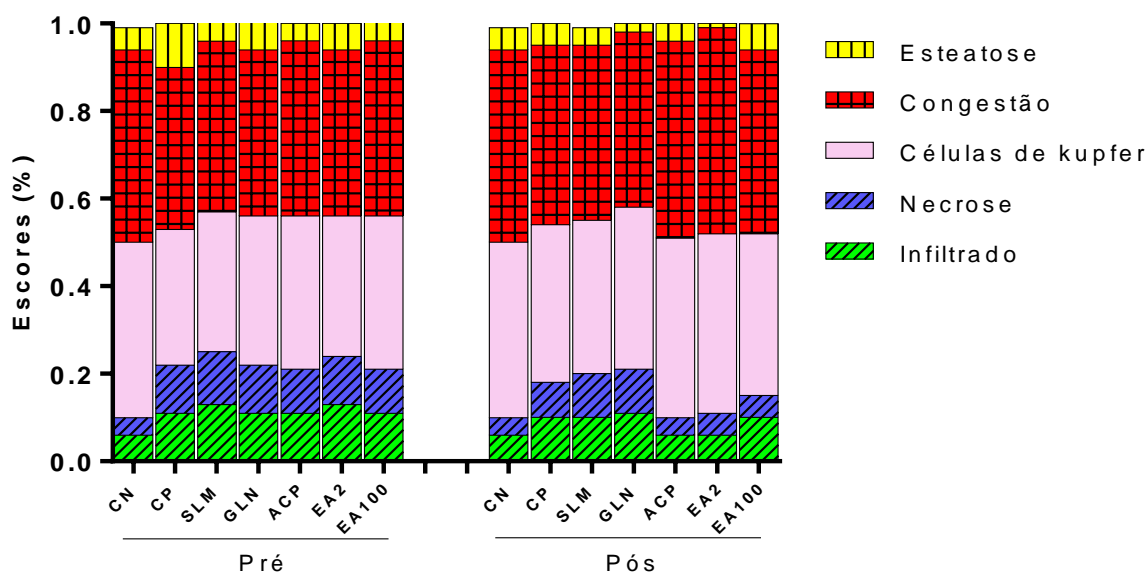
Todos os grupos apresentaram alterações histopatológicas, tais como infiltrado inflamatório, necrose, CK, congestão vascular e esteatose.

Tabela 12 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático (%).

Grupos	Pré (%)					Pós (%)				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
CN	6	4	40	44	5	6	4	40	44	5
CP	11	11	31	37	10	10	8	36	41	5
SLM	13	12	32	39	5	10	10	35	40	4
GLN	11	11	34	38	7	11	10	37	40	2
ACP	11	10	35	40	4	6	4	41	45	4
EA2	13	11	32	38	6	6	5	41	47	1
EA100	11	10	35	40	5	10	5	37	42	6

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo (APAP), SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. (a) Infiltrado inflamatório, (b) Necrose, (c) Células de kupfer, (d) Congestão vascular, (e) Esteatose. Fonte: elaborada pela autora (2019).

Figura 16 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático (%).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.11 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático por HE

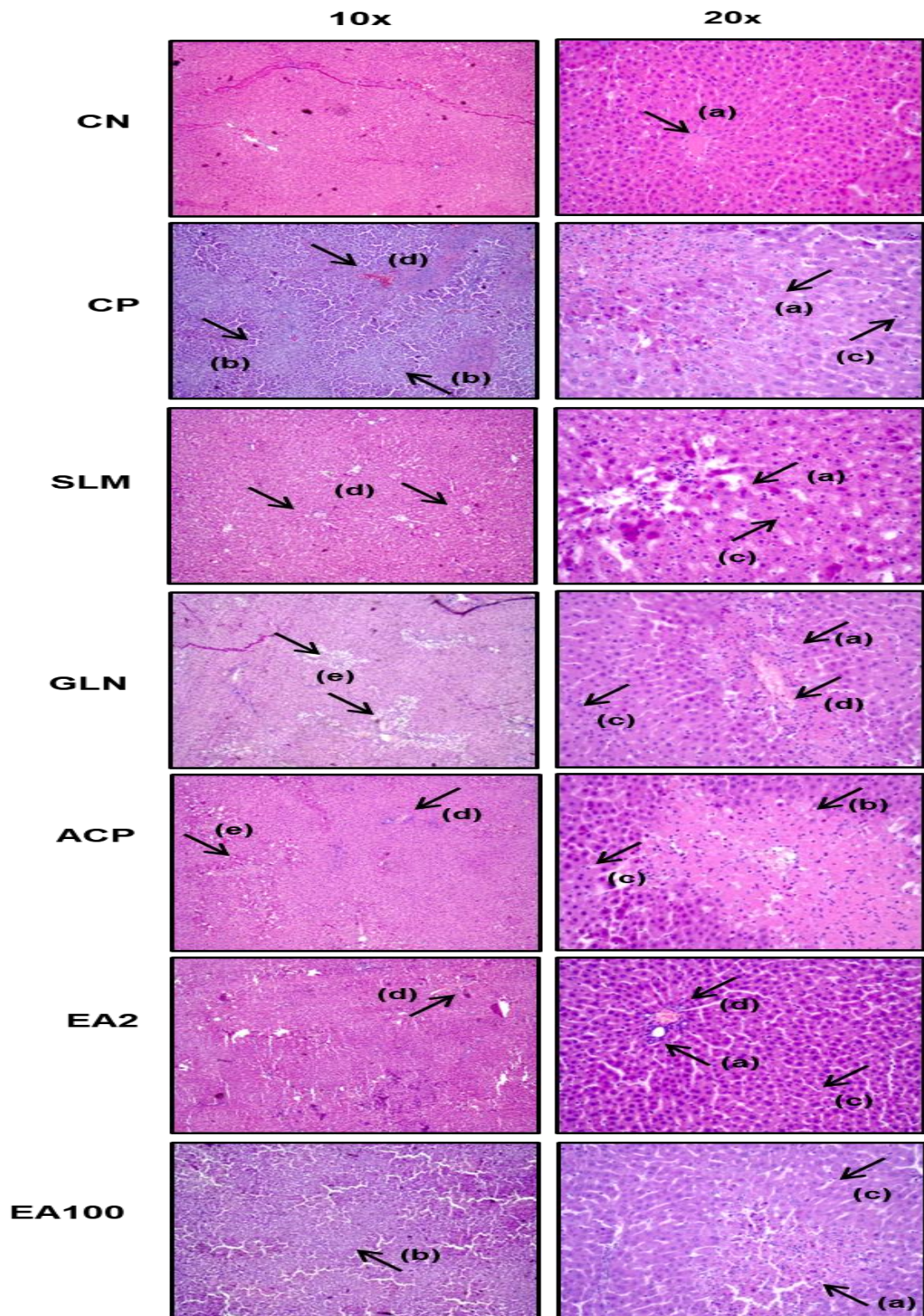
APAP acentuou as alterações histopatológicas no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. Os grupos pré (SLM, GLN, ACP, EA2 e EA100) e pós-condicionamento (GLN, ACP, EA2 e EA100) atenuaram as alterações histopatológicas em relação ao grupo CP.

Tabela 13 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático - HE.

	Pré-Condicionamento						
	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Escores	23,63	30,00	28,57	28,63	27,50	28,60	26,25
Infiltrado inflamatório	++	++++	++++	++++	+++	++++	+++
Necrose	+	++++	++++	++++	+++	++++	+++
Células de kupfer	++	++	+	+++	+++	+	+
Congestão vascular	++	++++	++++	++++	++++	++++	++
Esteatose	+	++++	+	++	+	++	+
	Pós-Condicionamento						
	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Escores	23,63	26,88	27,50	26,86	24,25	23,43	26,00
Infiltrado inflamatório	++	+++	+++	+++	++	++	+++
Necrose	+	+++	+++	+++	+	++	++
Células de kupfer	++	+++	+++	++++	++++	+++	+++
Congestão vascular	++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
Esteatose	+	+	+	+	+	+	++

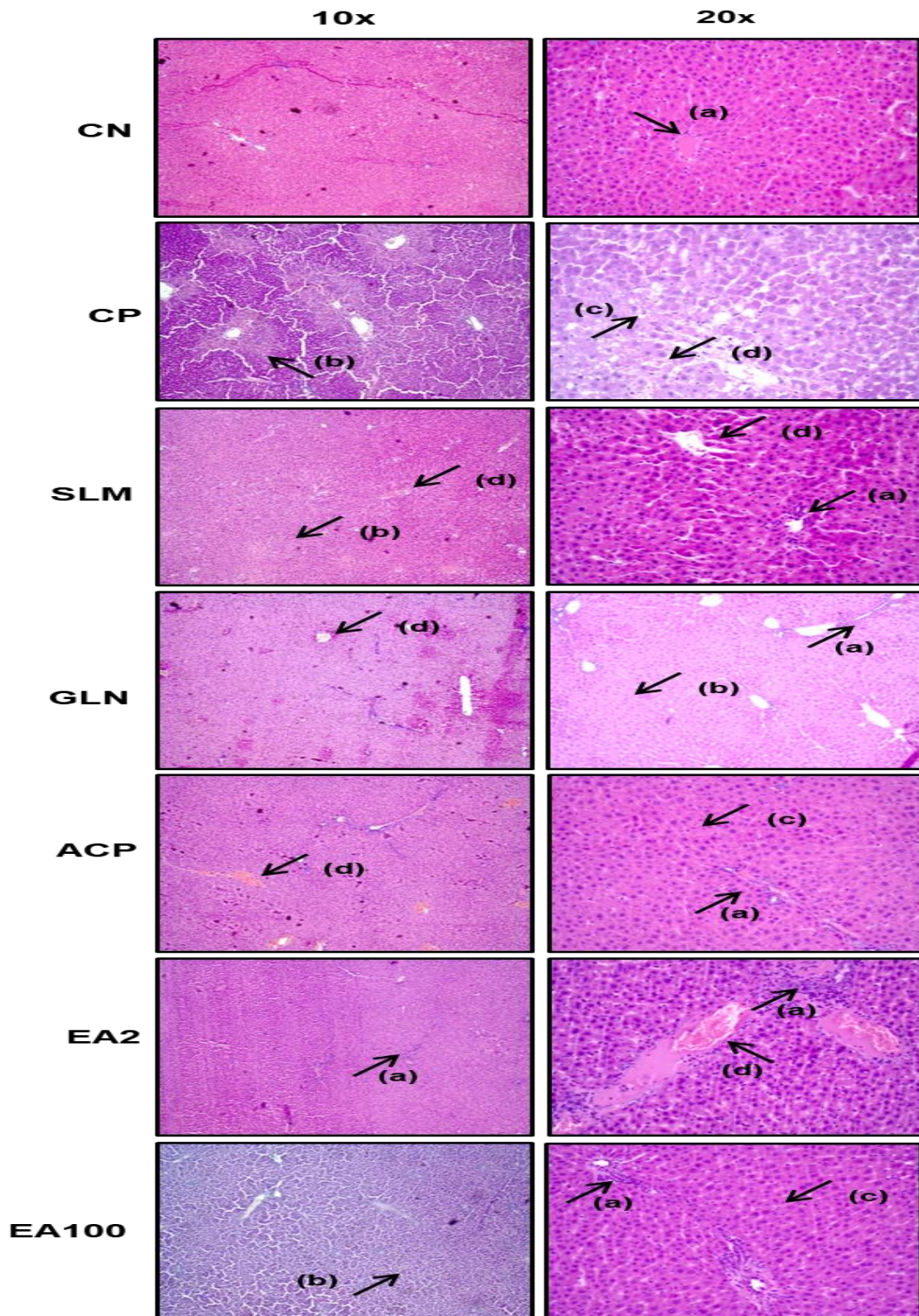
CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. (-) ausente, (+) leve, (++) moderada, (+++) intensa, (++++) severa. (n = 8). Fonte: elaborada pela autora (2019).

Figura 17 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático no Pré-Condicionamento - HE.



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. (a) Infiltrado inflamatório, (b) Necrose, (c) Células de kupfer, (d) Congestão, (e) Esteatose. Fonte: elaborada pela autora (2019).

Figura 18 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático no Pós-Condicionamento - HE.

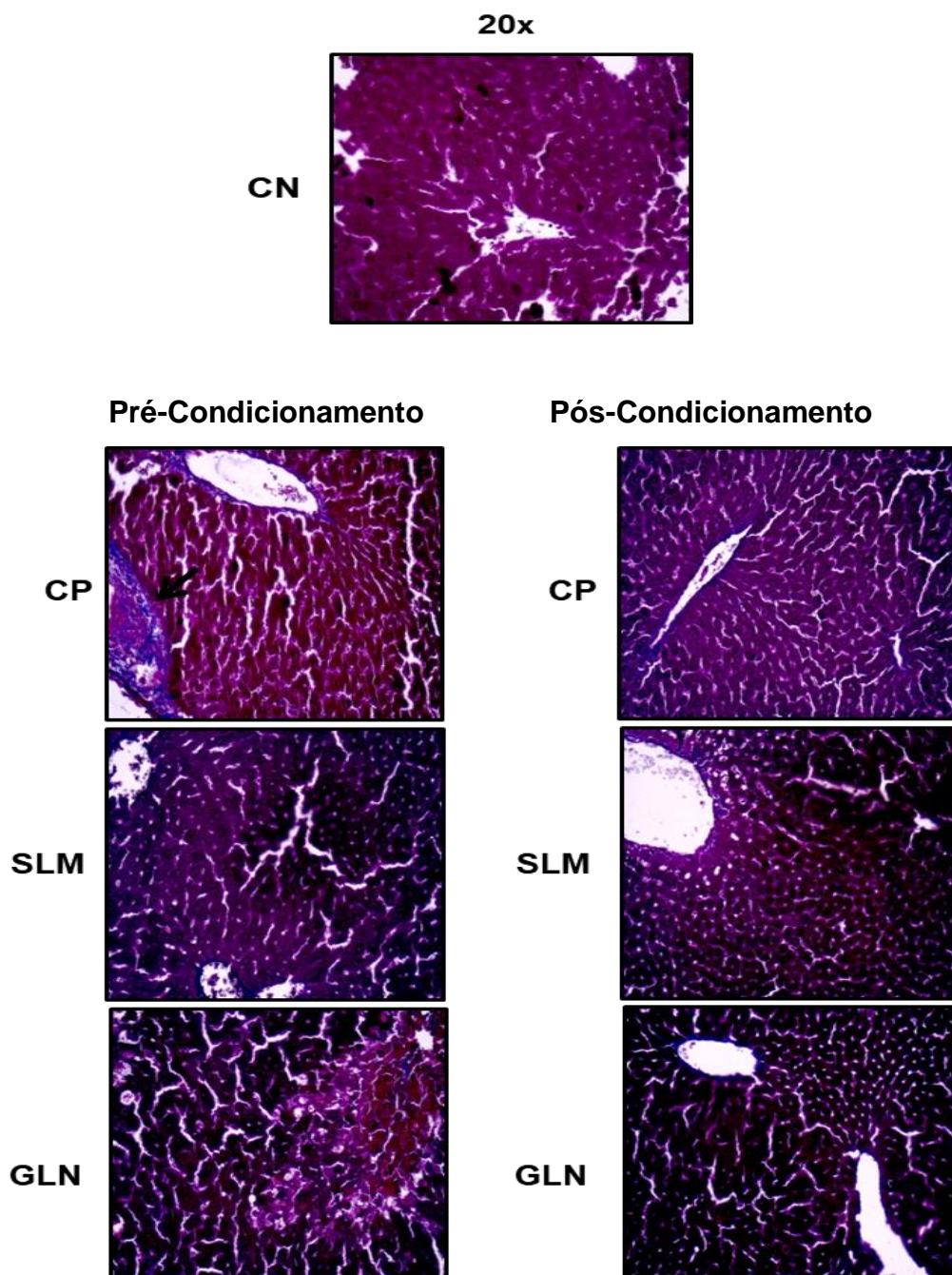


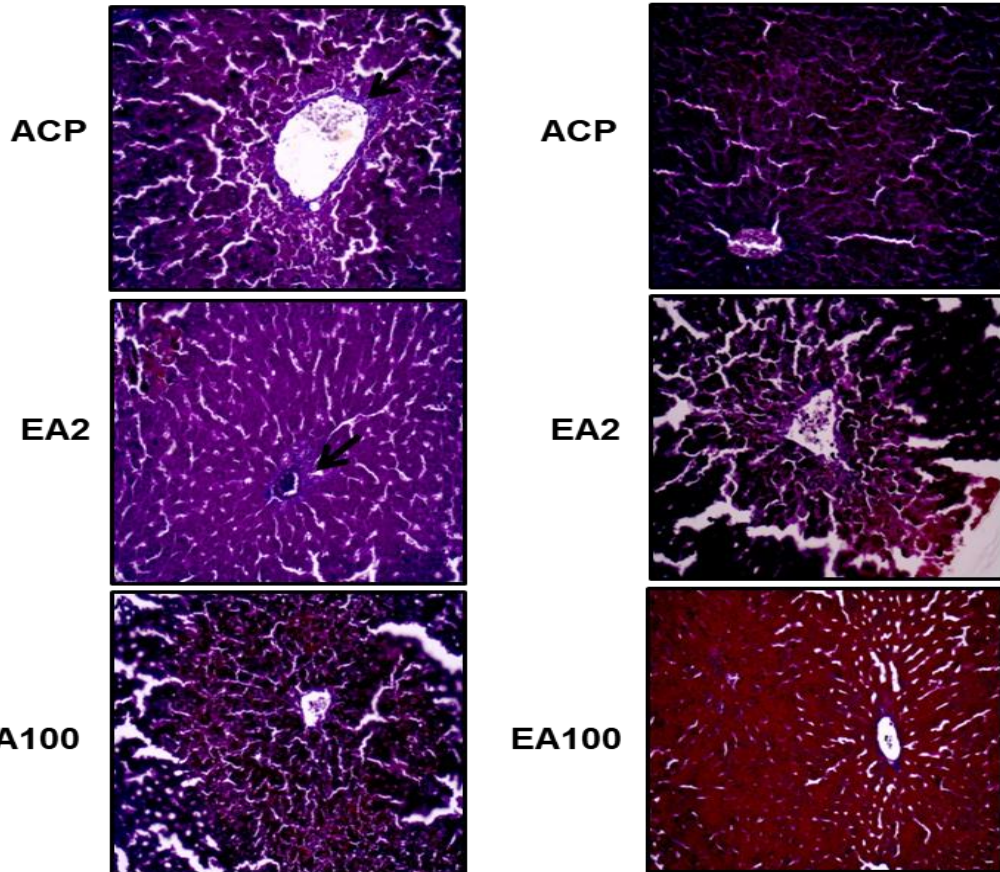
CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. (a) Infiltrado inflamatório, (b) Necrose, (c) Células de kupfer, (d) Congestão, (e) Esteatose. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.12 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático por Tricômico de Masson

Nenhum grupo apresentou formação de tecido conjuntivo no parênquima hepático. O colágeno foi observado apenas nos vasos sanguíneos do fígado.

Figura 19 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático no Modelo Pré e Pós-Condicionamento - Tricômico de Masson.



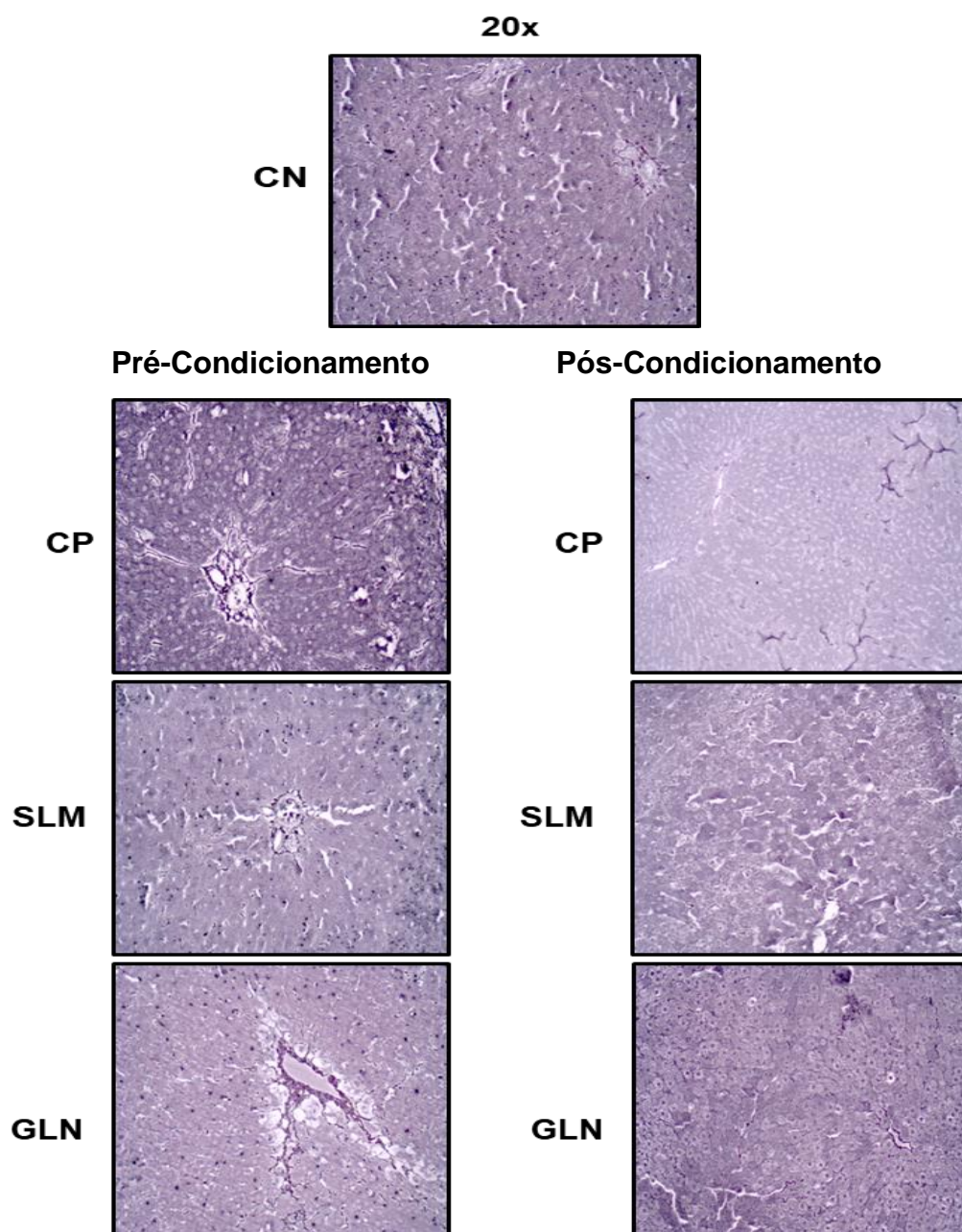


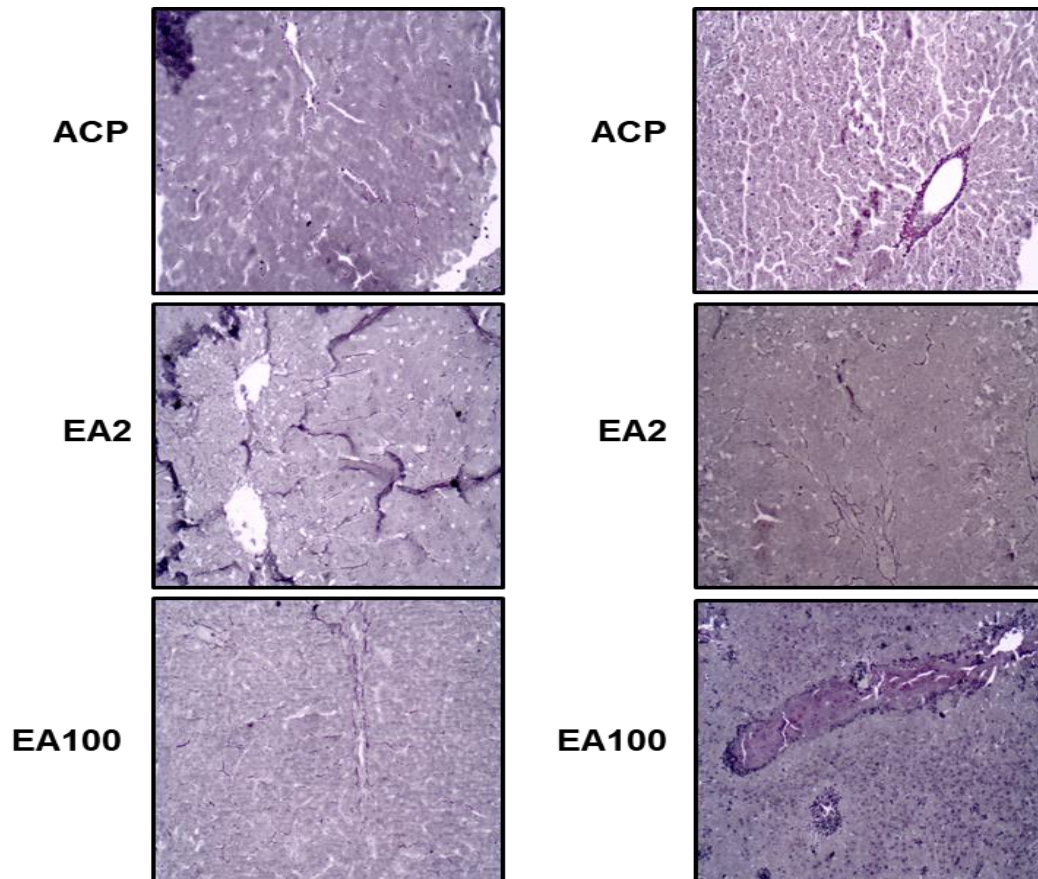
CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.1.13 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas por Prata Reticulina

Nenhum grupo apresentou colapso da trama de sustentação do fígado.

Figura 20 - Alterações Histopatológicas do Tecido Hepático no Modelo Pré e Pós-Condicionamento - Prata Reticulina.





CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2 MODELO MURINO DE LESÃO RENAL INDUZIDA POR APAP

4.2.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Uréia no Plasma

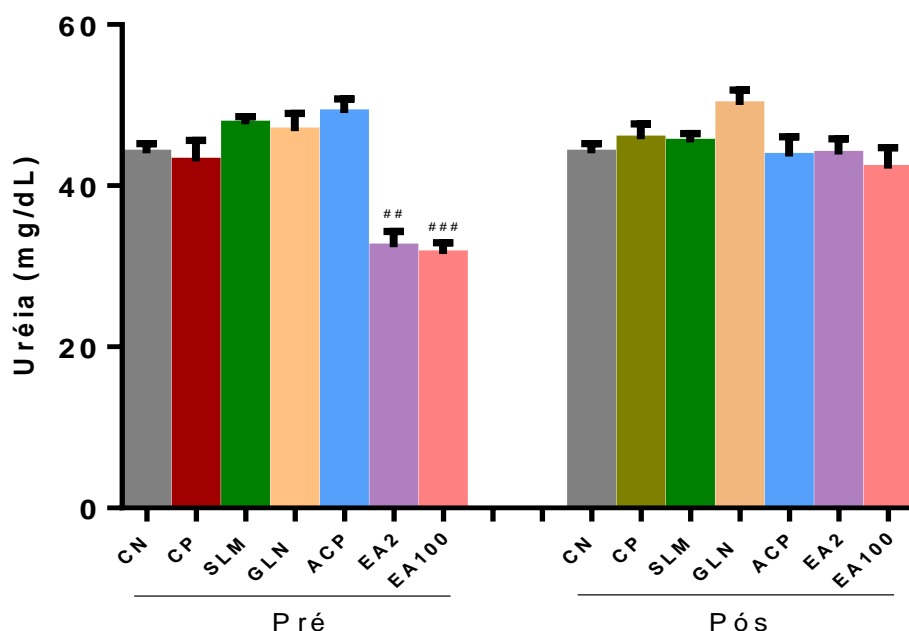
APAP não causou alteração significativa nos níveis de Uréia no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré-condicionamento (EA2 e EA100) causou diminuição significativa nos níveis de Uréia em relação ao grupo CP.

Tabela 14 - Níveis de Uréia no Plasma (mg/dL).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	44,00	43,00	47,63	46,75	49,00	32,38	31,50
	(± 1,21)	(± 2,60)	(± 0,94)	(± 2,23)	(± 1,79)	(± 1,93)	(± 1,40)
Pós	44,00	45,75	45,38	50,00	43,63	43,88	42,13
	(± 1,21)	(± 1,90)	(± 1,08)	(± 1,85)	(± 2,43)	(± 1,95)	(± 2,61)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 21 - Níveis de Uréia no Plasma (mg/dL).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Creatinina no Plasma

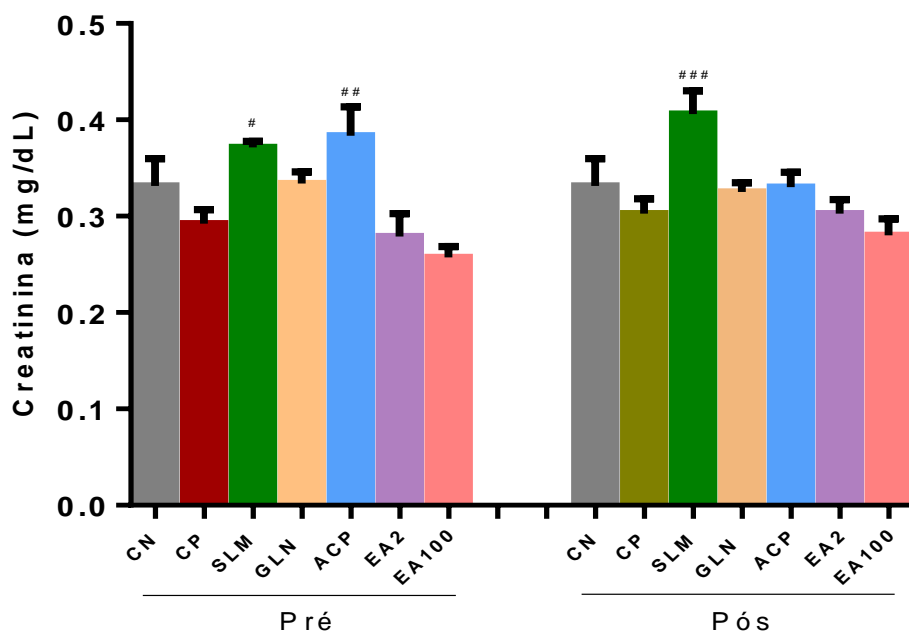
APAP não causou alteração significativa nos níveis de Creatinina no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (SLM e ACP) e pós-condicionamento (SLM) causou aumento significativo nos níveis de Creatinina em relação ao grupo CP.

Tabela 15 - Níveis de Creatinina no Plasma (mg/dL).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	0,33	0,29	0,37	0,33	0,38	0,27	0,25
	(± 0,02)	(± 0,01)	(± 0,00)	(± 0,01)	(± 0,02)	(± 0,02)	(± 0,01)
Pós	0,33	0,31	0,40	0,32	0,33	0,30	0,28
	(± 0,02)	(± 0,01)	(± 0,02)	(± 0,00)	(± 0,01)	(± 0,01)	(± 0,01)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 22 - Níveis de Creatinina no Plasma (mg/dL).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MPO no Tecido Renal

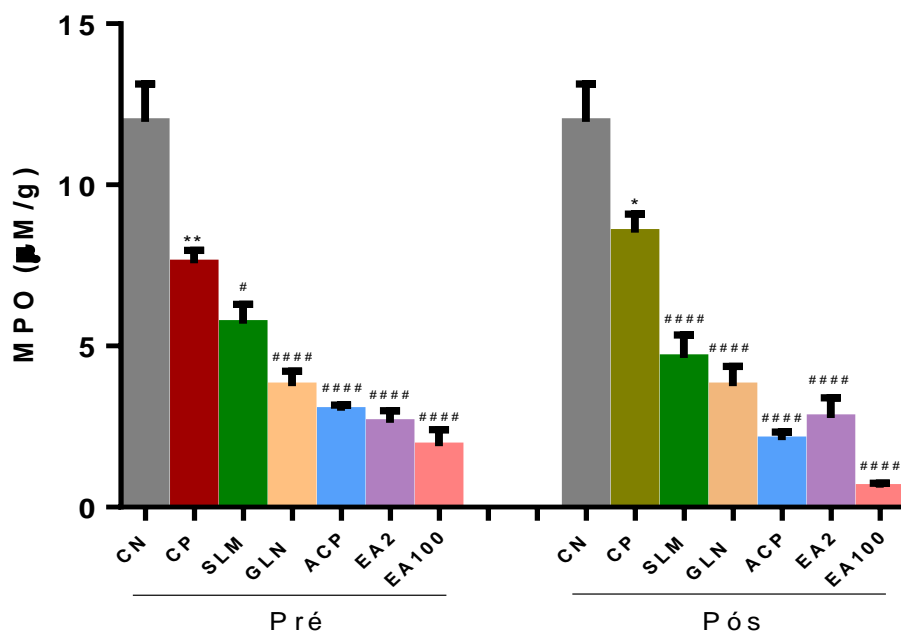
APAP causou uma diminuição significativa nos níveis de MPO no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (GLN, ACP, EA2 e EA100) e pós-condicionamento (SLM, GLN, ACP, EA2 e EA100) causou diminuição significativa nos níveis de MPO em relação ao grupo CP.

Tabela 16 - Níveis de MPO no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	11,96	7,56	5,69	3,75	2,98	2,62	1,89
	($\pm 1,17$)	($\pm 0,40$)	($\pm 0,59$)	($\pm 0,46$)	($\pm 0,18$)	($\pm 0,37$)	($\pm 0,50$)
Pós	11,96	8,51	4,62	3,75	2,08	2,77	0,60
	($\pm 1,17$)	($\pm 0,57$)	($\pm 0,71$)	($\pm 0,62$)	($\pm 0,24$)	($\pm 0,61$)	($\pm 0,14$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 23 - Níveis de MPO no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Tecido Renal

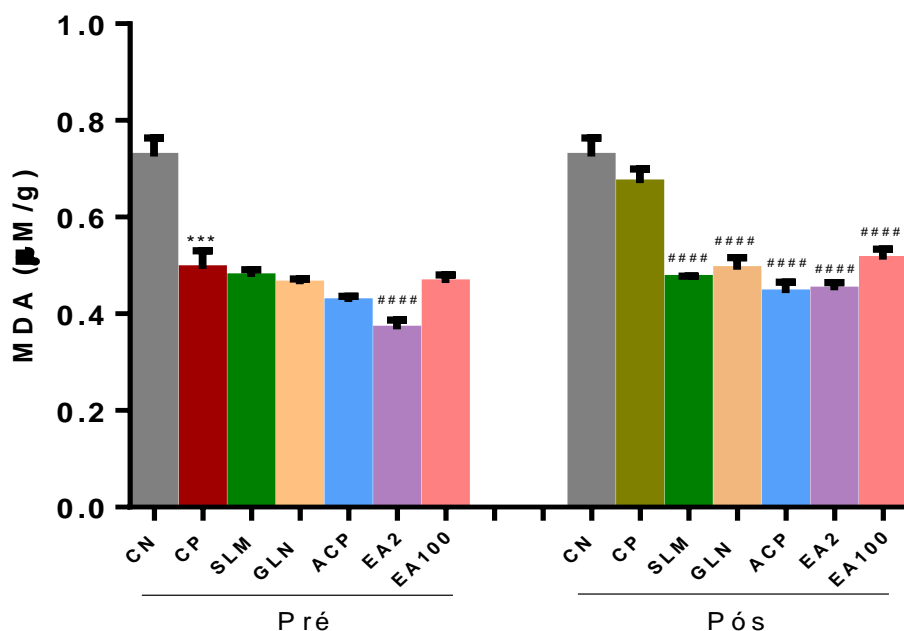
APAP causou uma diminuição significativa nos níveis de MDA no grupo CP (pré) em relação ao grupo CN. O grupo pré (EA2) e pós-condicionamento (SLM, GLN, ACP, EA2 e EA100) causou diminuição significativa nos níveis de MDA em relação ao grupo CP.

Tabela 17 - Níveis de MDA no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	0,72	0,49	0,47	0,46	0,42	0,36	0,46
	($\pm 0,03$)	($\pm 0,03$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,01$)
Pós	0,72	0,67	0,47	0,49	0,44	0,44	0,51
	($\pm 0,03$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,00$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,02$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 24 - Níveis de MDA no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Tecido Renal

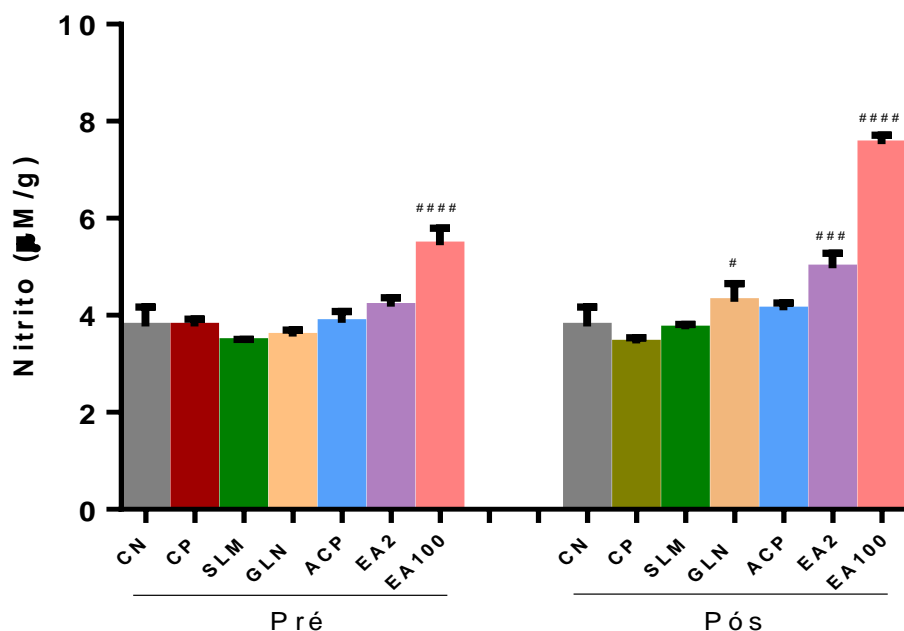
APAP não causou alteração significativa nos níveis de Nitrito no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (EA100) e pós-condicionamento (EA2 e EA100) causou aumento significativo nos níveis de Nitrito em relação ao grupo CP.

Tabela 18 - Níveis de Nitrito no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	3,77 ($\pm 0,39$)	3,76 ($\pm 0,15$)	3,45 ($\pm 0,04$)	3,56 ($\pm 0,12$)	3,84 ($\pm 0,23$)	4,18 ($\pm 0,17$)	5,44 ($\pm 0,34$)
Pós	3,77 ($\pm 0,39$)	3,41 ($\pm 0,12$)	3,70 ($\pm 0,10$)	4,28 ($\pm 0,37$)	4,10 ($\pm 0,14$)	4,96 ($\pm 0,30$)	7,53 ($\pm 0,17$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 25 - Níveis de Nitrito no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.6 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Tecido Renal

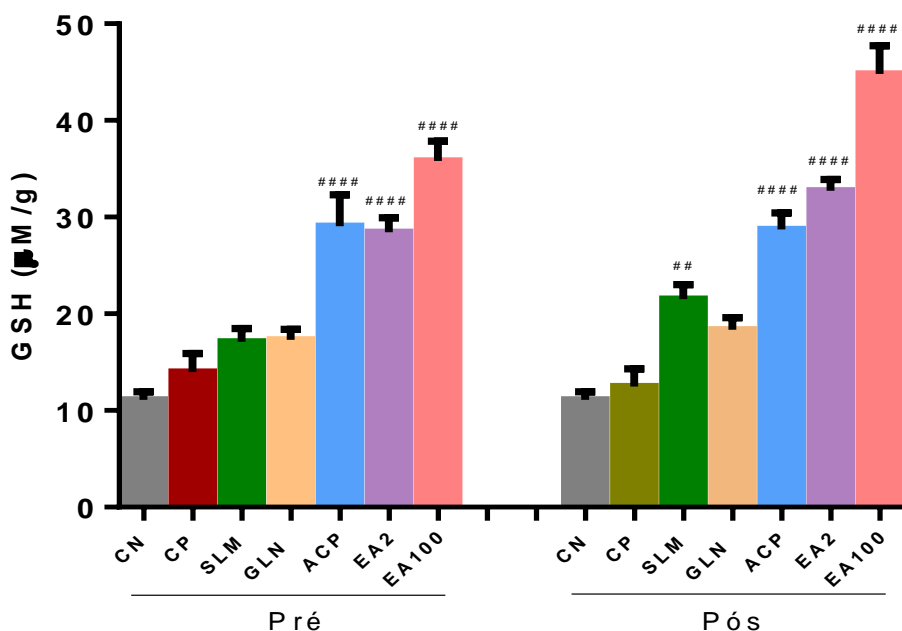
APAP não causou alteração significativa nos níveis de GSH no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (ACP, EA2 e EA100) e pós-condicionamento (SLM, ACP, EA2 e EA100) causou aumento significativo nos níveis de GSH em relação ao grupo CP.

Tabela 19 - Níveis de GSH no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	11,11	14,00	17,11	17,33	29,05	28,43	35,82
	($\pm 0,83$)	($\pm 1,90$)	($\pm 1,38$)	($\pm 1,07$)	($\pm 3,24$)	($\pm 1,52$)	($\pm 2,02$)
Pós	11,11	12,50	21,51	18,36	28,72	32,71	44,79
	($\pm 0,83$)	($\pm 1,80$)	($\pm 1,52$)	($\pm 1,24$)	($\pm 1,70$)	($\pm 1,17$)	($\pm 2,93$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 26 - Níveis de GSH no Tecido Renal ($\mu\text{M/g}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.7 Efeito dos Tratamentos no Peso do Rim Direito

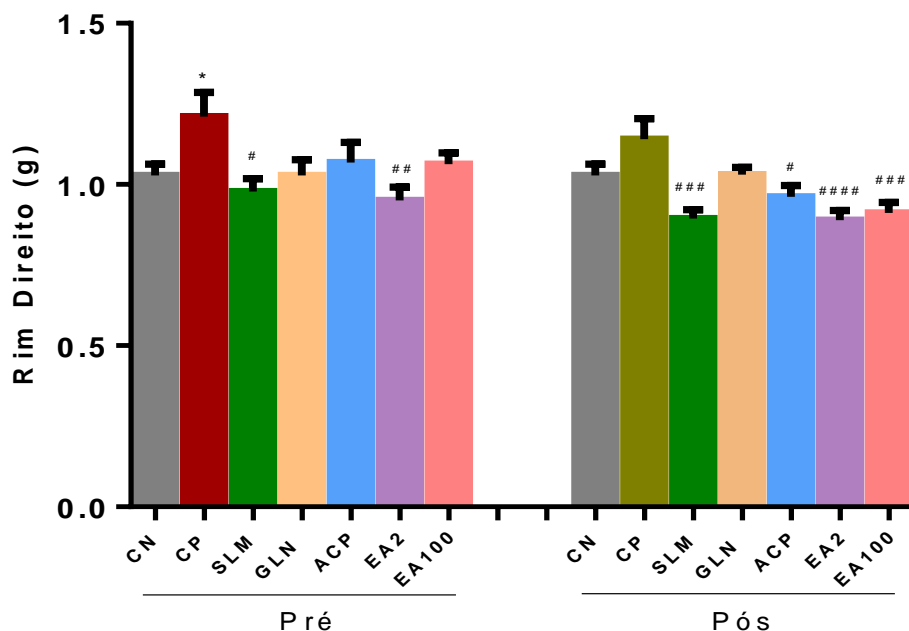
APAP causou um aumento significativo no peso do rim direito no grupo CP (pré) em relação ao grupo CN. O grupo pré (SLM e EA2) e pós-condicionamento (SLM, ACP, EA2 e EA100) causou diminuição significativa no peso do rim direito em relação ao grupo CP.

Tabela 20 - Peso do Rim Direito (g).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	1,02	1,21	0,97	1,02	1,06	0,95	1,06
	(± 0,03)	(± 0,07)	(± 0,03)	(± 0,04)	(± 0,06)	(± 0,04)	(± 0,03)
Pós	1,02	1,14	0,89	1,03	0,96	0,88	0,91
	(± 0,03)	(± 0,06)	(± 0,02)	(± 0,02)	(± 0,03)	(± 0,03)	(± 0,03)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 27 - Peso do Rim Direito (g).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.8 Efeito dos Tratamentos no Peso do Rim Esquerdo

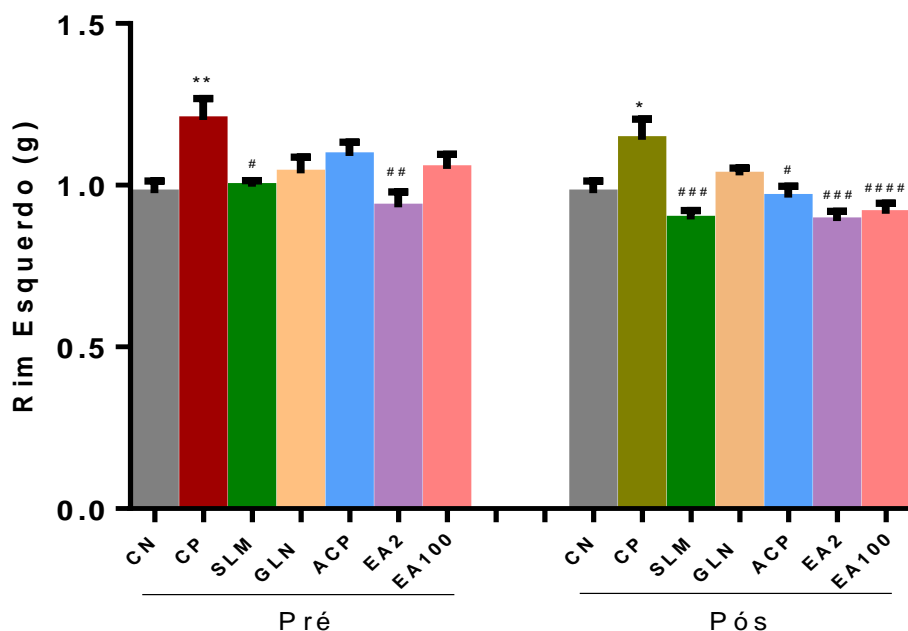
APAP causou um aumento significativo no peso do rim direito no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (SLM e EA2) e pós-condicionamento (SLM, ACP, EA2 e EA100) causou diminuição no peso do rim esquerdo em relação ao grupo CP.

Tabela 21 - Peso do Rim Esquerdo (g).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	0,97	1,20	0,99	1,03	1,09	0,93	1,05
	(± 0,03)	(± 0,06)	(± 0,01)	(± 0,05)	(± 0,04)	(± 0,04)	(± 0,04)
Pós	0,97	1,14	0,89	1,03	0,96	0,88	0,91
	(± 0,03)	(± 0,06)	(± 0,02)	(± 0,02)	(± 0,03)	(± 0,03)	(± 0,03)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 28 - Peso do Rim Esquerdo (g).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.9 Efeito dos Tratamentos na Histopatologia do Tecido Renal

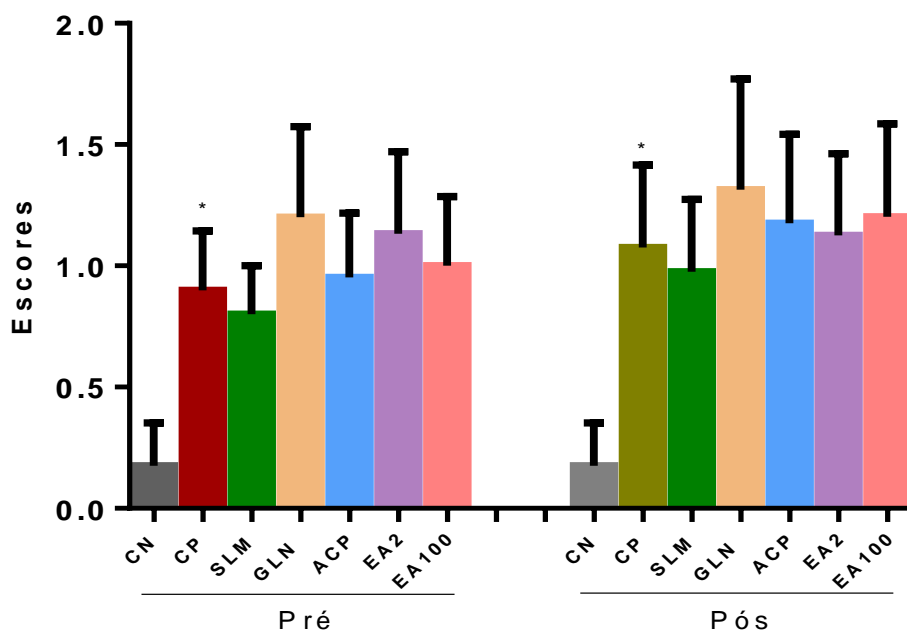
APAP causou um aumento significativo nos escores obtidos do estudo histopatológico no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. Não houve alteração significativa nos escores dos grupos pré e pós-condicionamento em relação ao grupo CP.

Tabela 22 - Número de Escores da Análise Histopatológica do Tecido Renal.

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	0,17	0,90	0,80	1,20	0,95	1,13	1,00
	(± 0,17)	(± 0,24)	(± 0,20)	(± 0,37)	(± 0,26)	(± 0,33)	(± 0,28)
Pós	0,17	1,07	0,97	1,31	1,17	1,26	1,20
	(± 0,17)	(± 0,33)	(± 0,29)	(± 0,45)	(± 0,36)	(± 0,33)	(± 0,38)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 29 - Número de Escores da Análise Histopatológica do Tecido Renal.



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.10 Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal

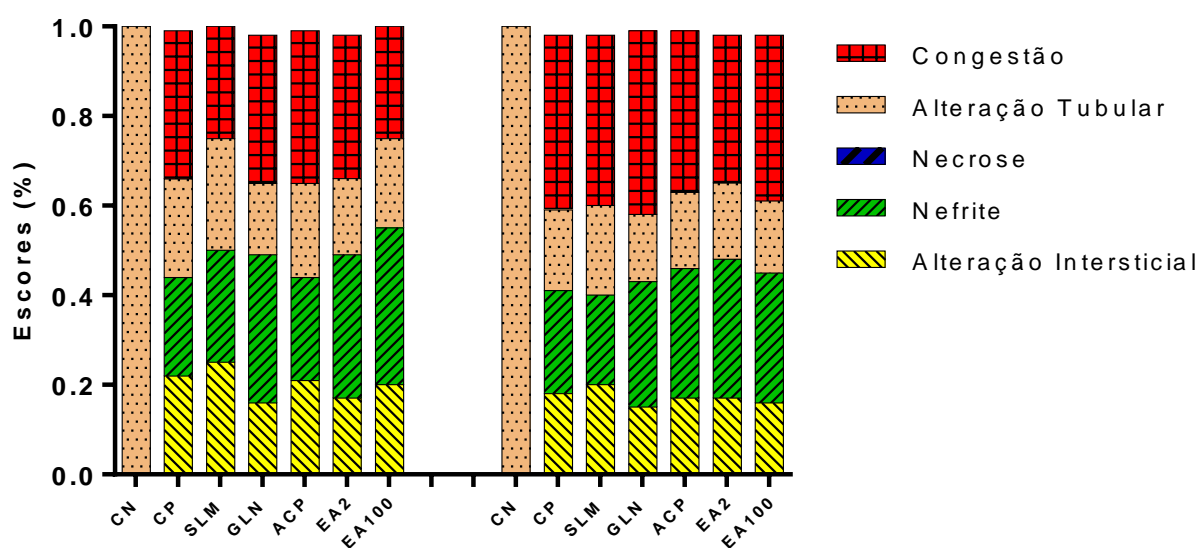
O grupo CN apresentou apenas alteração tubular e os grupos que receberam APAP apresentaram alteração intersticial, nefrite, alteração tubular e congestão.

Tabela 23 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal (%).

Grupos	Pré (%)					Pós (%)				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
CN	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0
CP	22	22	0	22	33	18	23	0	18	39
SLM	25	25	0	25	25	20	20	0	20	38
GLN	16	33	0	16	33	15	28	0	15	41
ACP	21	23	0	21	34	17	29	0	17	36
EA2	17	32	0	17	32	17	31	0	17	33
EA100	20	35	0	20	25	16	29	0	16	37

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo (APAP), SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. (a) Alteração Intersticial, (b) Nefrite, (c) Necrose, (d) Alteração Tubular, (e) Congestão. Fonte: elaborada pela autora (2019).

Figura 30 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal (%).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.11 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal por HE

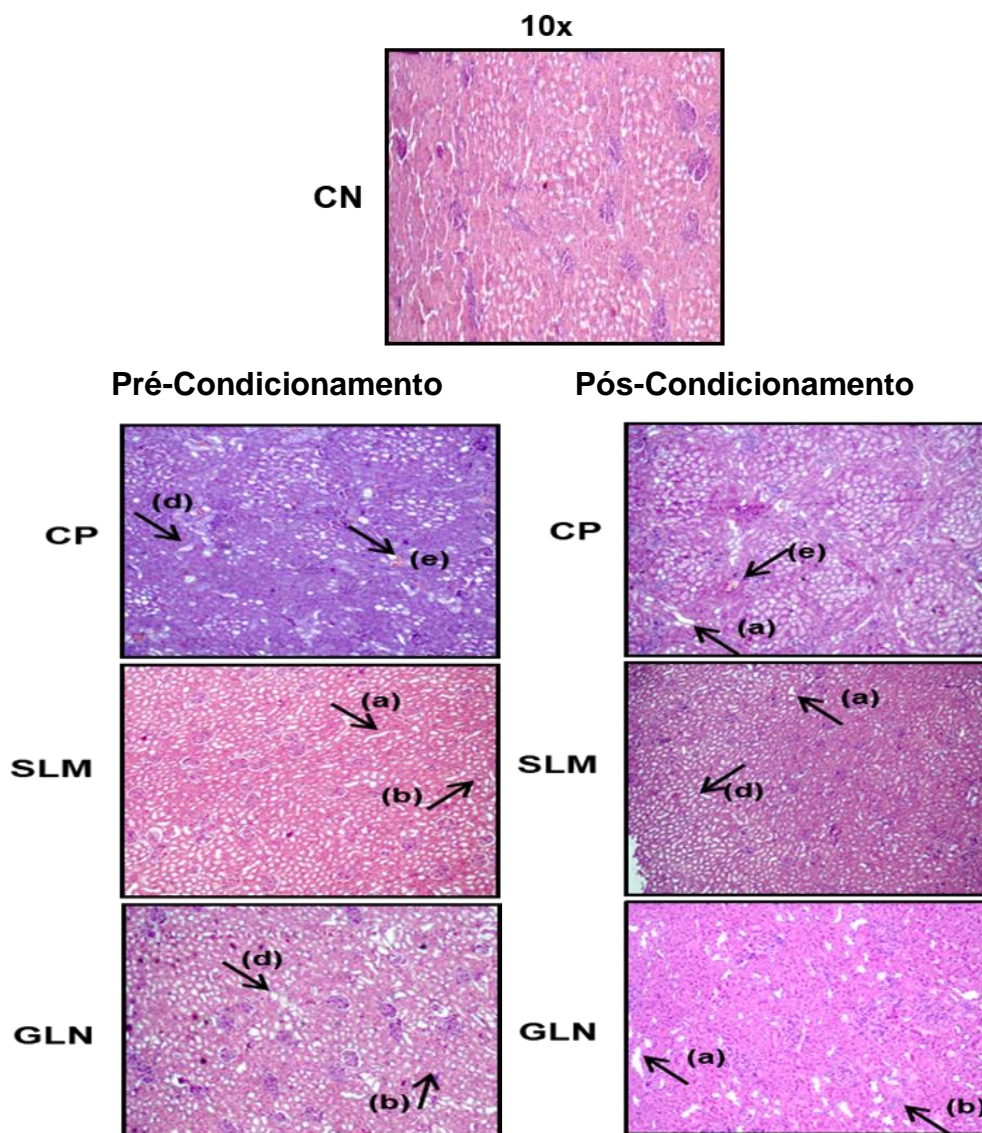
APAP acentuou as alterações histopatológicas no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. Apenas o grupo pré e pós-condicionamento (SLM) atenuou as alterações histopatológicas em relação ao grupo CP.

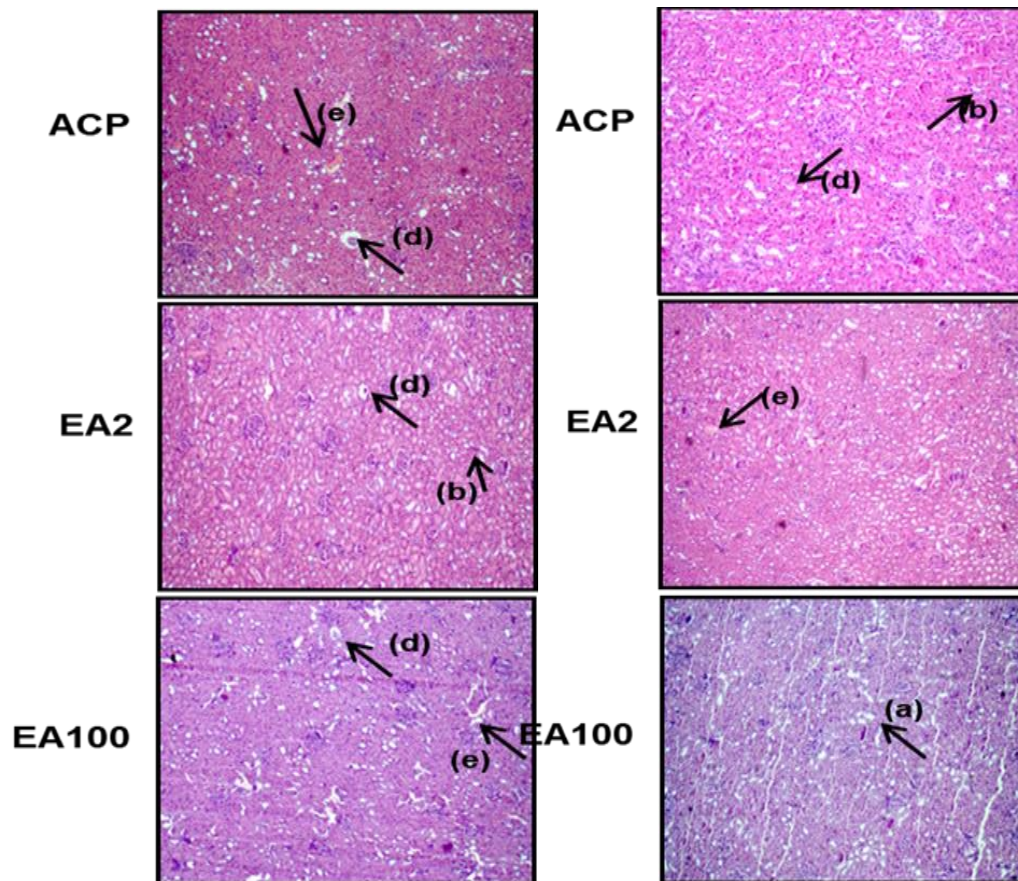
Tabela 24 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal - HE.

	Pré-Condicionamento						
	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Escores	0,88	4,5	4	6	4,76	5,66	5
Alteração Intersticial	-	++	++	++	++	++	++
Nefrite	-	++	++	++++	+++	+++	+++
Necrose	-	-	-	-	-	-	-
Alteração Tubular	++	++	++	++	++	++	++
Congestão	-	+++	++	++++	++++	++++	+++
	Pós-Condicionamento						
	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Escores	0,88	5,38	4,88	6,57	5,88	5,63	6,01
Alteração Intersticial	-	++	++	++	++	++	++
Nefrite	-	+++	++	++++	++++	++++	++++
Necrose	-	-	-	-	-	-	-
Alteração Tubular	++	++	++	++	++	++	++
Congestão	-	++++	+++	++++	++++	++++	++++

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo (APAP), SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. (-) ausente, (+) leve, (++) moderada, (+++) intensa, (++++) severa. (n = 8). Fonte: elaborada pela autora (2019).

Figura 31 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal no Modelo Pré e Pós-Condicionamento - HE.



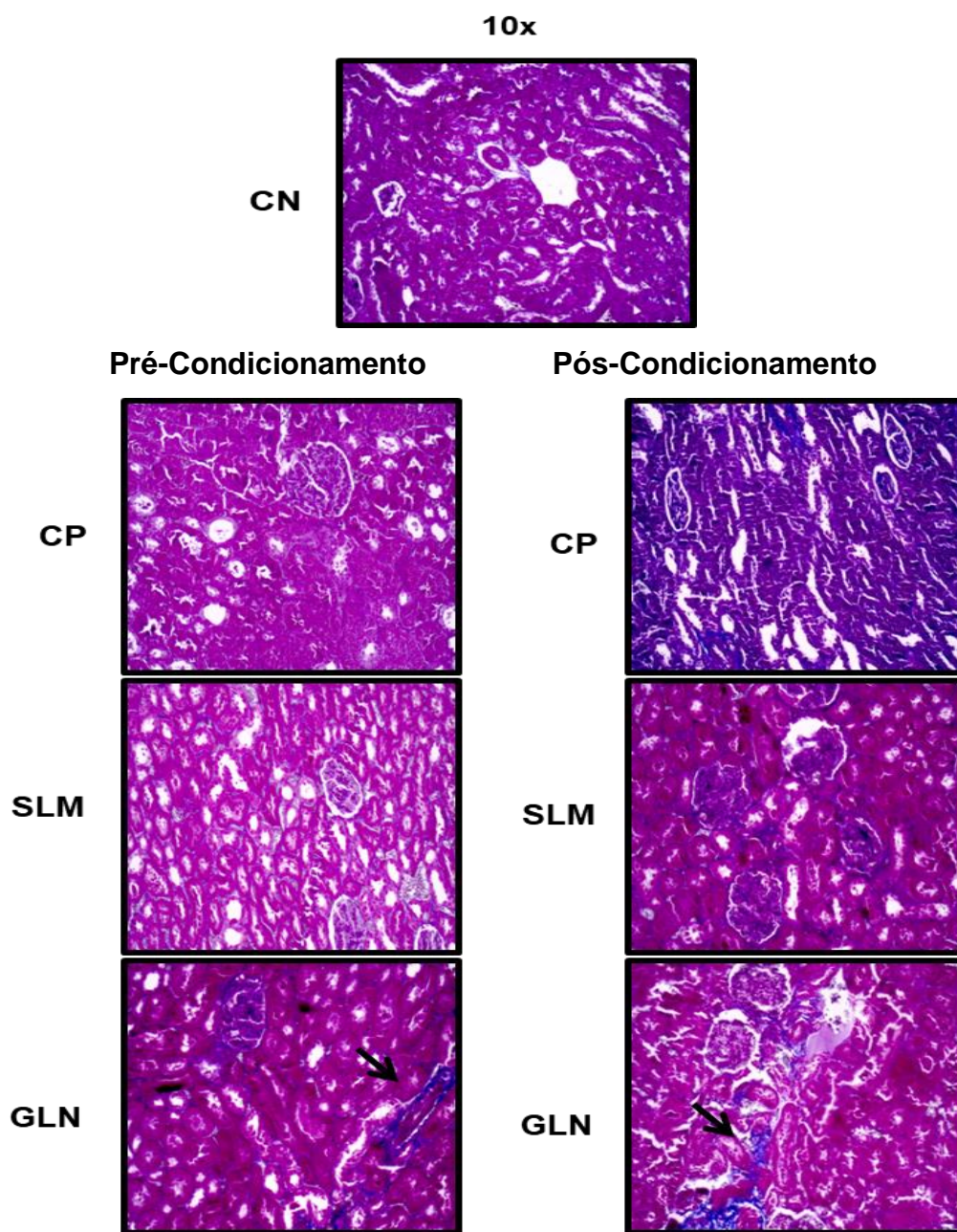


CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. (a) Alteração Intersticial, (b) Nefrite, (c) Necrose, (d) Alteração Tubular, (e) Congestão. Fonte: elaborada pela autora (2019).

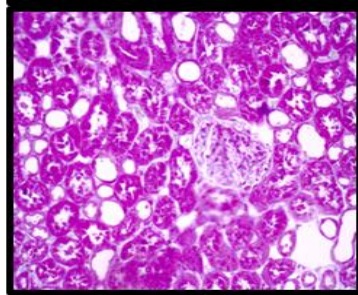
4.2.12 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal por Tricômico de Masson

Nenhum grupo apresentou formação de tecido conjuntivo no parênquima hepático. O colágeno foi observado apenas nos vasos sanguíneos do fígado.

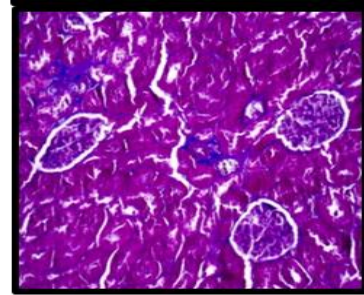
Figura 32 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal no Modelo Pré e Pós-Condicionamento - Tricômico de Masson.



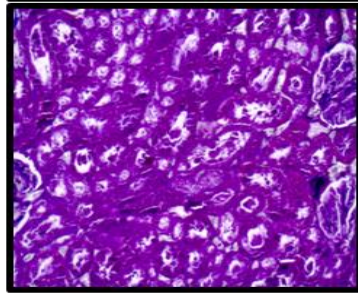
ACP



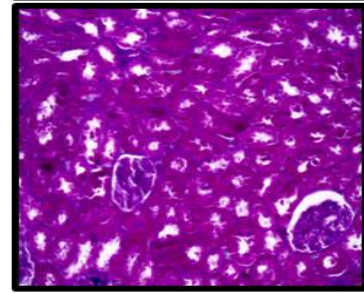
ACP



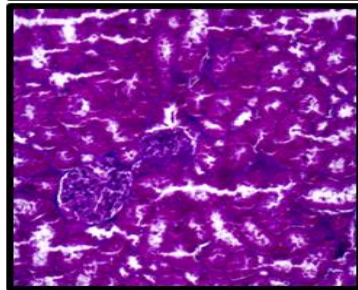
EA2



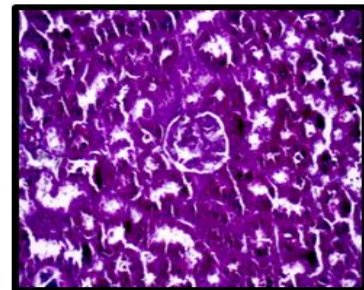
EA2



EA100



EA100

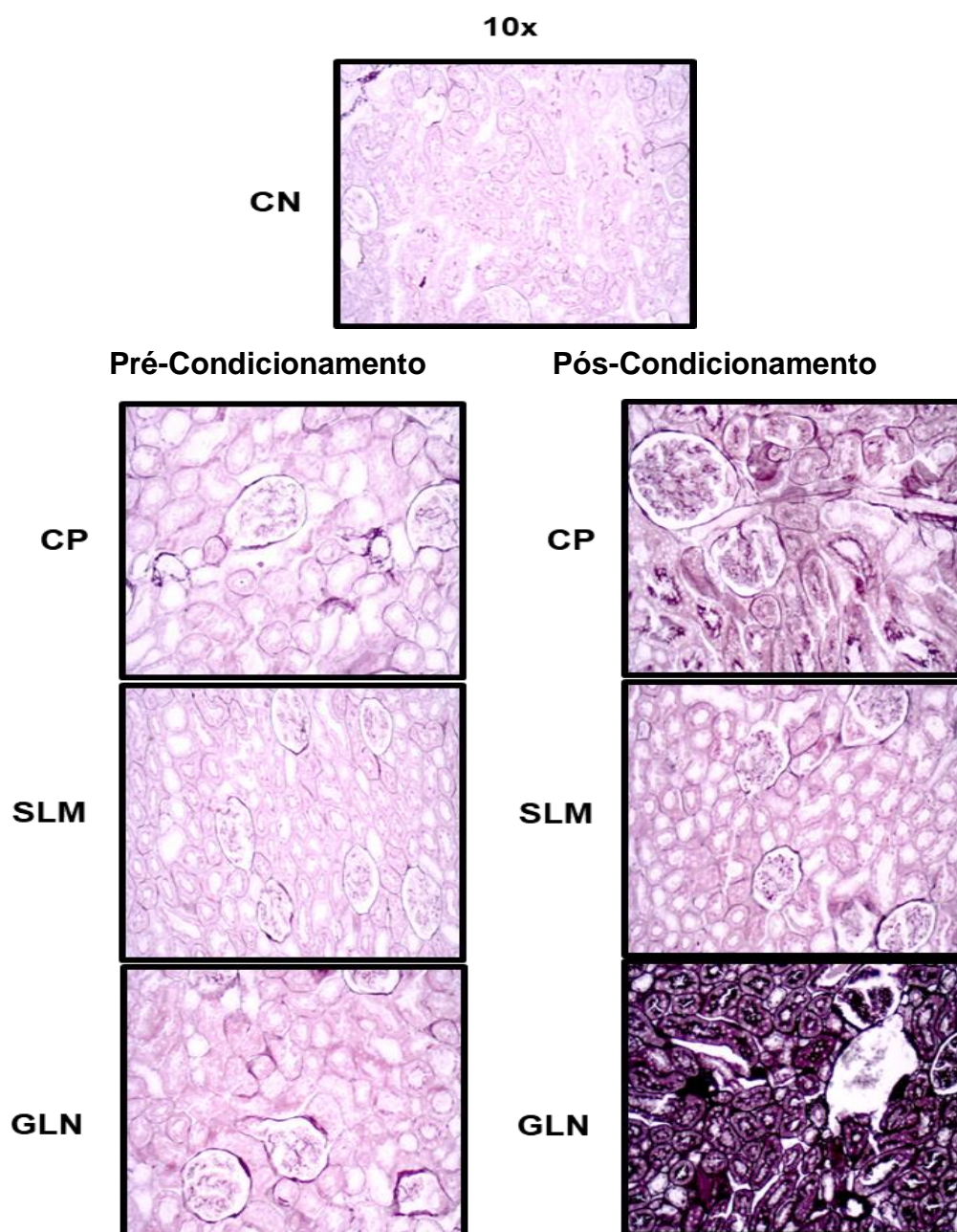


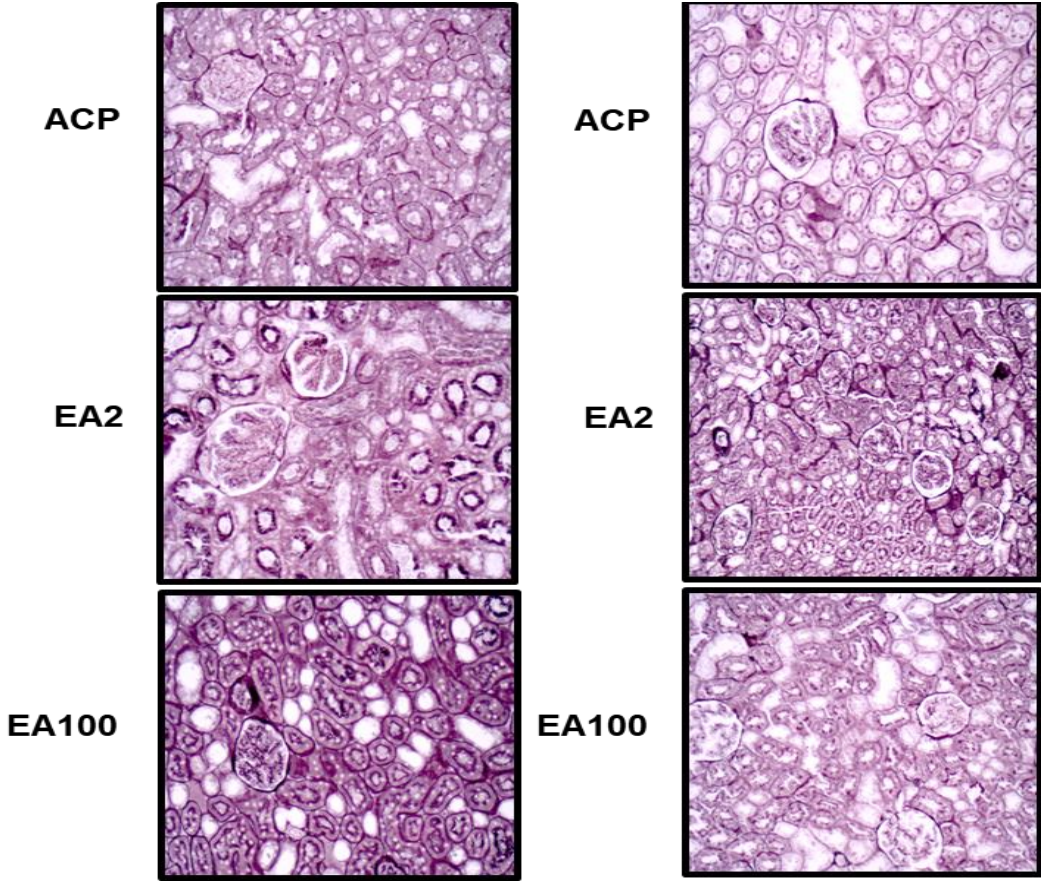
CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.13 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal por Prata Metenamina

Nenhum grupo apresentou alteração nos componentes do glomérulo.

Figura 33 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal no Modelo Pré e Pós-Condicionamento - Prata Metenamina.



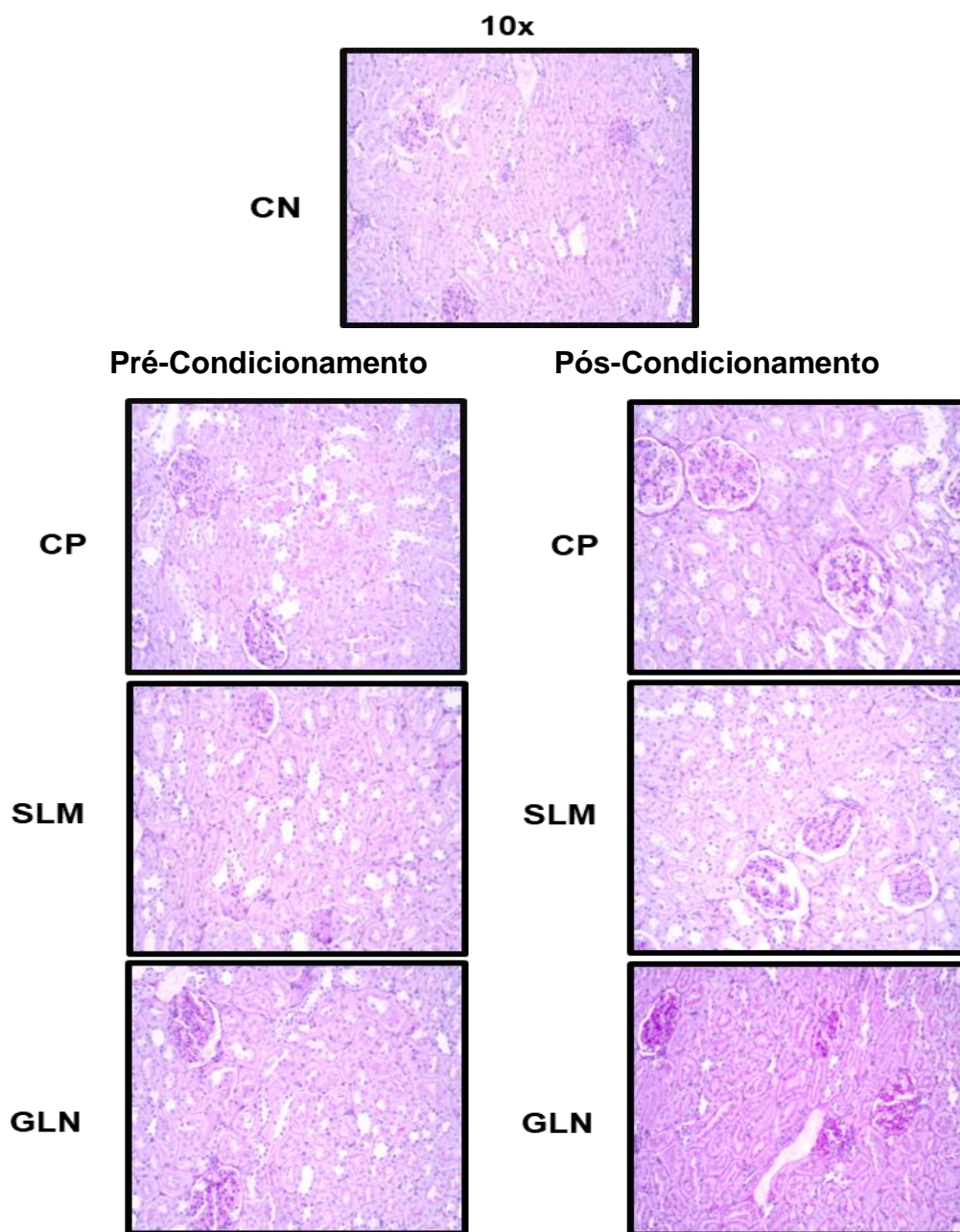


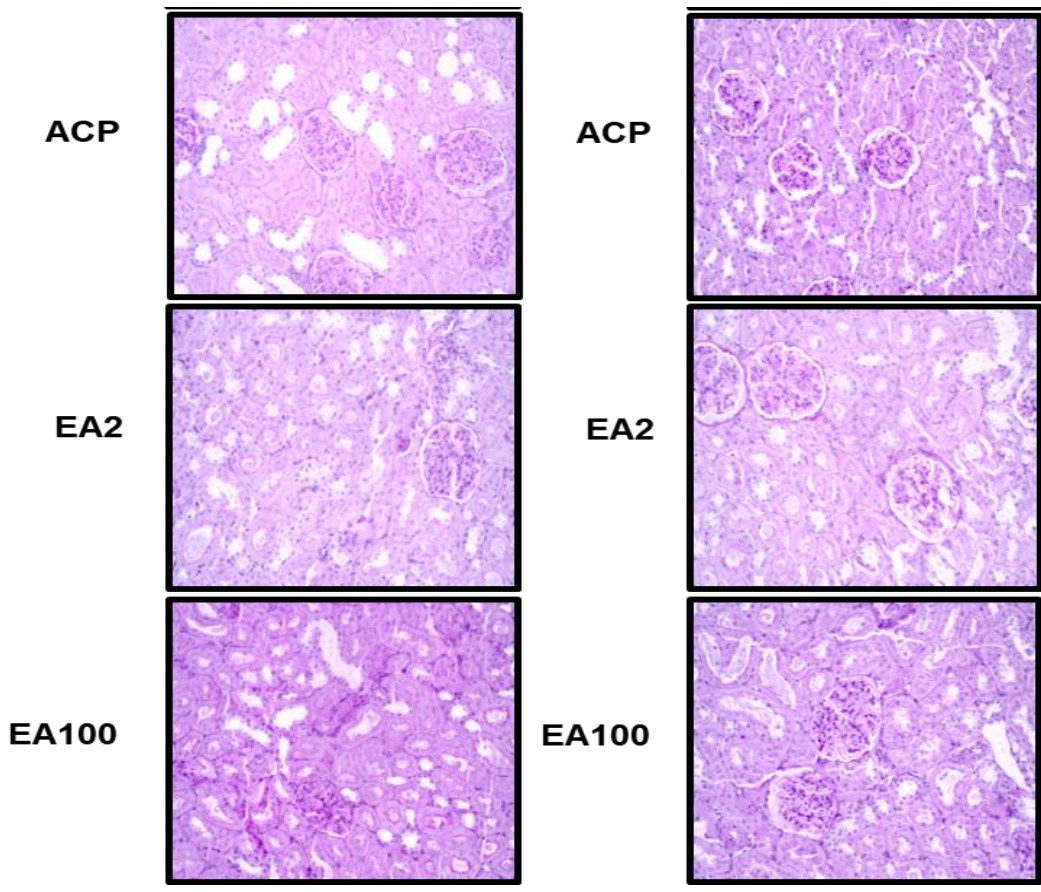
CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.2.14 Avaliação do Efeito dos Tratamentos nas Alterações Histopatológicas do Tecido Renal por PAS

Nenhum grupo apresentou alteração na membrana glomerular.

Figura 34 - Alterações Histopatológicas do Tecido Renal no Modelo Pré e Pós-Condicionamento - PAS.





CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.3 MODELO MURINO DE LESÃO NO PLASMA POR APAP

4.3.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Plasma

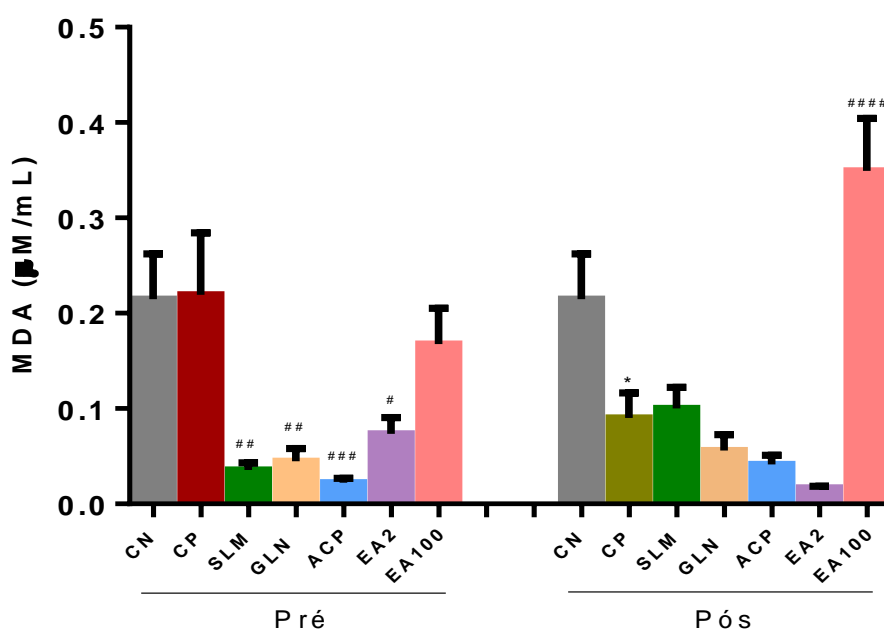
APAP causou diminuição significativa nos níveis de MDA no grupo CP (pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (SLM, GLN, ACP e EA2) causou diminuição e o pós-condicionamento (EA100) causou aumento nos níveis de MDA em relação ao grupo CP.

Tabela 25 - Níveis de MDA no Plasma ($\mu\text{M}/\text{mL}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	0,21	0,21	0,35	0,44	0,02	0,07	0,16
	($\pm 0,04$)	($\pm 0,06$)	($\pm 0,07$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,04$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,03$)
Pós	0,21	0,09	0,10	0,05	0,04	0,01	0,34
	($\pm 0,04$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,00$)	($\pm 0,00$)	($\pm 0,05$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 35 - Níveis de MDA no Plasma ($\mu\text{M}/\text{mL}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.3.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Plasma

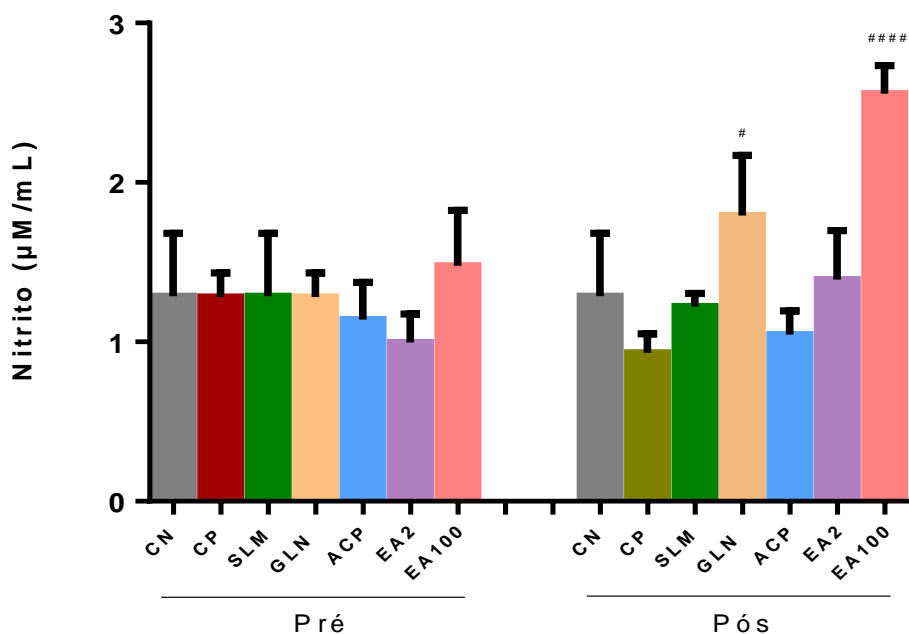
APAP não causou alteração significativa nos níveis de Nitrito no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pós-condicionamento (GLN e EA100) causou aumento nos níveis de Nitrito em relação ao grupo CP.

Tabela 26 - Níveis de Nitrito no Plasma ($\mu\text{M}/\text{mL}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	1,28	1,28	1,28	1,28	1,13	0,99	1,47
	($\pm 0,39$)	($\pm 0,15$)	($\pm 0,39$)	($\pm 0,15$)	($\pm 0,23$)	($\pm 0,17$)	($\pm 0,34$)
Pós	1,28	0,93	1,22	1,79	1,04	1,39	2,55
	($\pm 0,39$)	($\pm 0,12$)	($\pm 0,08$)	($\pm 0,37$)	($\pm 0,14$)	($\pm 0,30$)	($\pm 0,17$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 36 - Níveis de Nitrito no Plasma ($\mu\text{M}/\text{mL}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.3.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Plasma

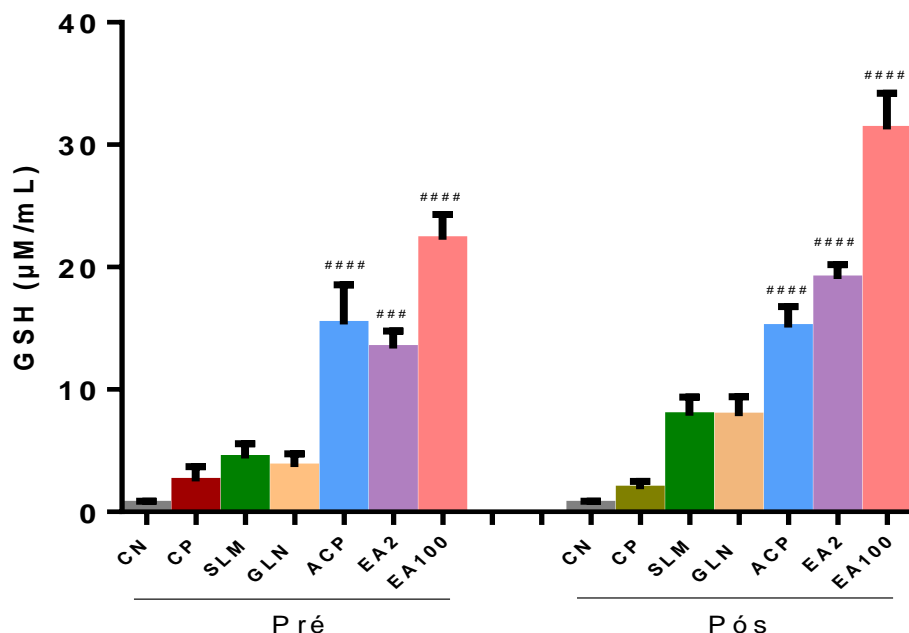
APAP não causou alteração significativa nos níveis de GSH no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (ACP, EA2 e EA100) e pós-condicionamento (ACP, EA2 e EA100) causou aumento nos níveis de GSH em relação ao grupo CP.

Tabela 27 - Níveis de GSH no Plasma ($\mu\text{M}/\text{mL}$).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	0,63	2,50	4,37	3,67	15,32	13,34	22,24
	($\pm 0,24$)	($\pm 1,20$)	($\pm 1,19$)	($\pm 3,24$)	($\pm 3,24$)	($\pm 1,43$)	($\pm 2,04$)
Pós	0,63	1,84	7,84	7,81	15,06	19,02	31,25
	($\pm 0,24$)	($\pm 0,64$)	($\pm 1,52$)	($\pm 1,61$)	($\pm 1,72$)	($\pm 1,17$)	($\pm 2,96$)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média \pm E.P.M. (n = 8).

Figura 37 - Níveis de GSH no Plasma ($\mu\text{M}/\text{mL}$).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.3.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Colesterol Total no Plasma

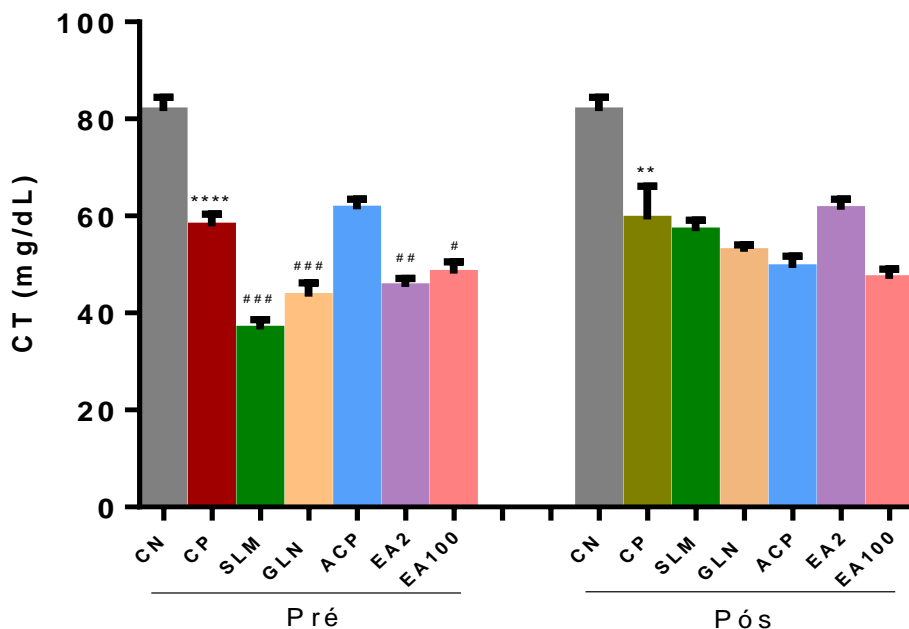
APAP causou diminuição significativa nos níveis de CT no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré-condicionamento (SLM, GLN, EA2 e EA100) causou diminuição nos níveis de CT em relação ao grupo CP.

Tabela 28 - Níveis de Colesterol Total no Plasma (mg/dL).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	81,63	57,88	36,63	43,38	61,38	45,38	48,13
	(± 2,80)	(± 2,52)	(± 1,99)	(± 2,81)	(± 2,09)	(± 1,78)	(± 2,41)
Pós	81,63	59,25	56,88	52,63	49,25	61,25	47,00
	(± 2,80)	(± 6,83)	(± 2,25)	(± 1,40)	(± 2,47)	(± 2,18)	(± 2,06)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 38 - Níveis de Colesterol Total no Plasma (mg/dL).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.3.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de LDL-c no Plasma

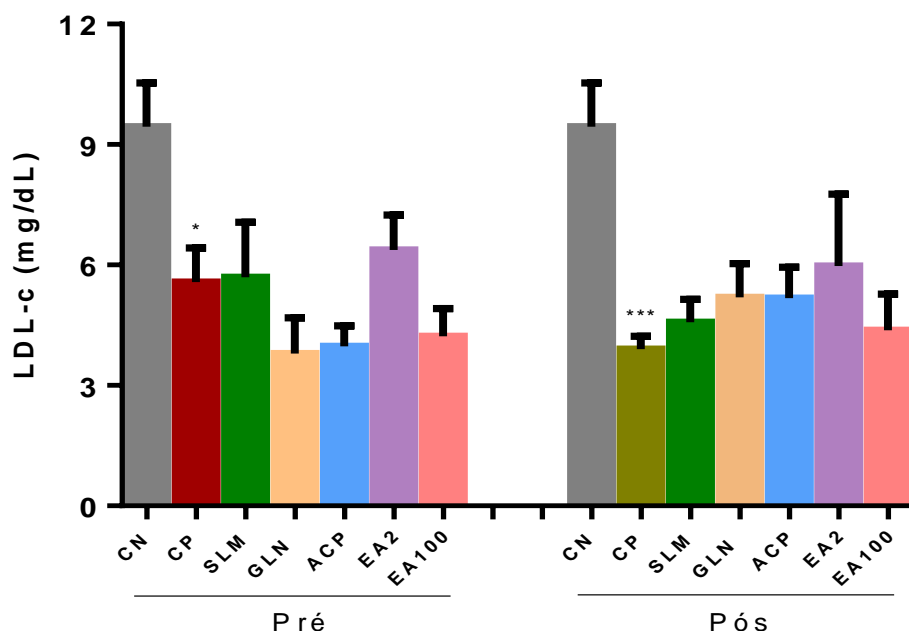
APAP causou diminuição significativa nos níveis de LDL-c no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. Não houve alteração significativa nos níveis de LDL-c do grupo pré e pós-condicionamento em relação ao grupo CP.

Tabela 29 - Níveis de LDL-c no Plasma (mg/dL).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	9,45	5,57	5,70	3,80	3,97	6,37	4,22
	(± 1,08)	(± 0,84)	(± 1,36)	(± 0,88)	(± 0,50)	(± 0,87)	(± 0,69)
Pós	9,45	3,90	4,57	5,20	5,17	5,97	4,37
	(± 1,08)	(± 0,32)	(± 0,56)	(± 0,83)	(± 0,76)	(± 1,79)	(± 0,90)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 39 - Níveis de LDL-c no Plasma (mg/dL).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.3.6 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de HDL-c no Plasma

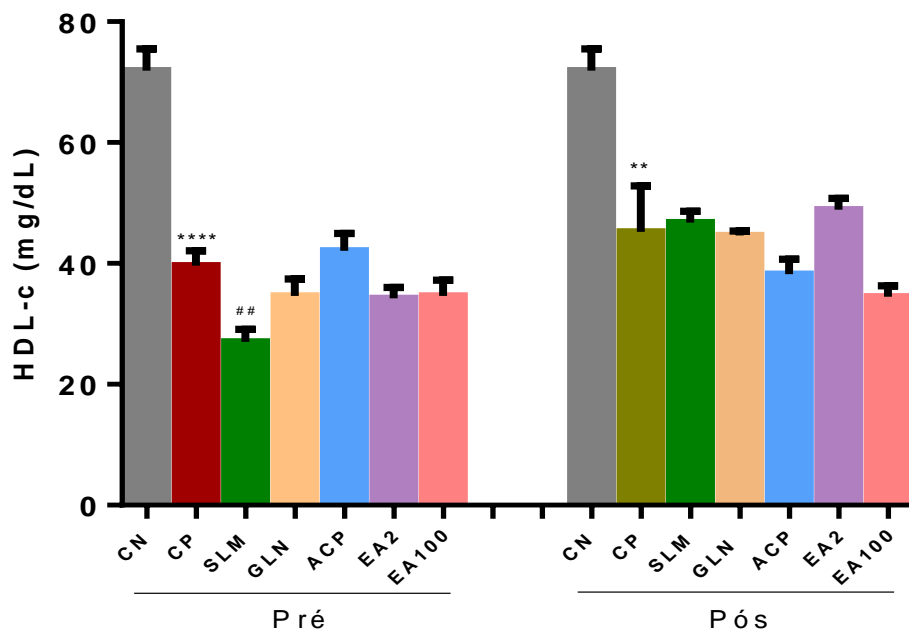
APAP causou diminuição significativa nos níveis de HDL-c no grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (SLM) causou diminuição nos níveis de HDL-C em relação ao grupo CP.

Tabela 30 - Níveis de HDL-c no Plasma (mg/dL).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	71,88	39,63	27,00	34,63	42,13	34,25	34,63
	(± 3,61)	(± 2,44)	(± 2,07)	(± 2,80)	(± 2,81)	(± 1,80)	(± 2,59)
Pós	71,88	45,25	46,75	44,63	38,25	48,88	34,50
	(± 3,61)	(± 7,61)	(± 1,85)	(± 0,73)	(± 2,42)	(± 1,87)	(± 1,83)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 40 - Níveis de HDL-c no Plasma (mg/dL).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.3.7 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Triglicerídeos no Plasma

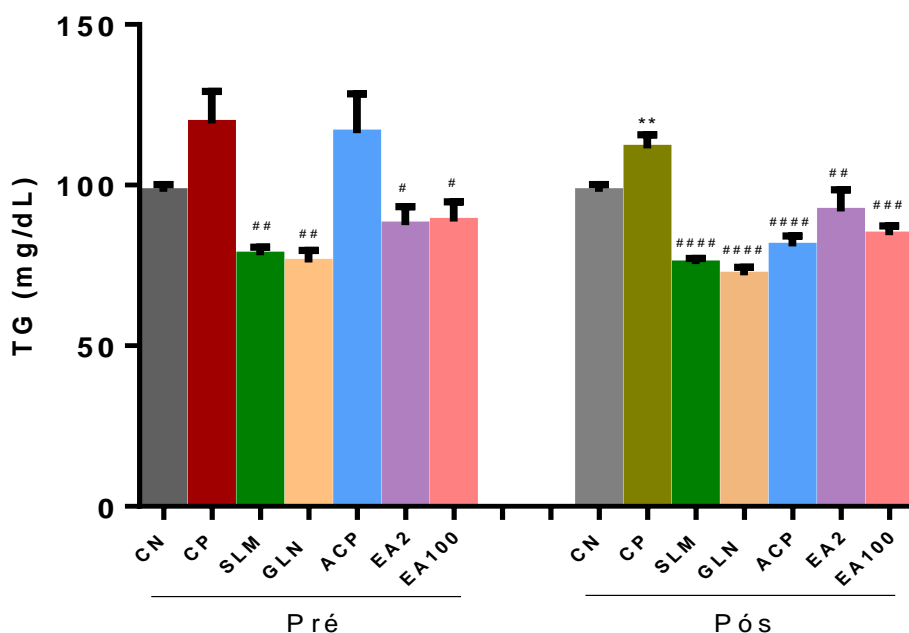
APAP causou um aumento significativo nos níveis de TG no grupo CP (pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (SLM, GLN, EA2 e EA100) e pós-condicionamento (SLM, GLN, ACP, EA2 e EA100) causou diminuição nos níveis de TG em relação ao grupo CP.

Tabela 31 - Níveis de Triglicerídeos no Plasma (mg/dL).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	97,88	119,1	78,13	75,88	116,1	87,50	88,63
	(± 2,32)	(± 10,04)	(± 2,51)	(± 3,75)	(± 12,30)	(± 5,78)	(± 6,19)
Pós	97,88	111,40	75,38	71,88	80,88	91,75	84,38
	(± 2,32)	(± 4,29)	(± 1,83)	(± 2,58)	(± 3,30)	(± 6,85)	(± 2,98)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 41 - Níveis de Triglicerídeos no Plasma (mg/dL).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

4.3.8 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Glicose no Plasma

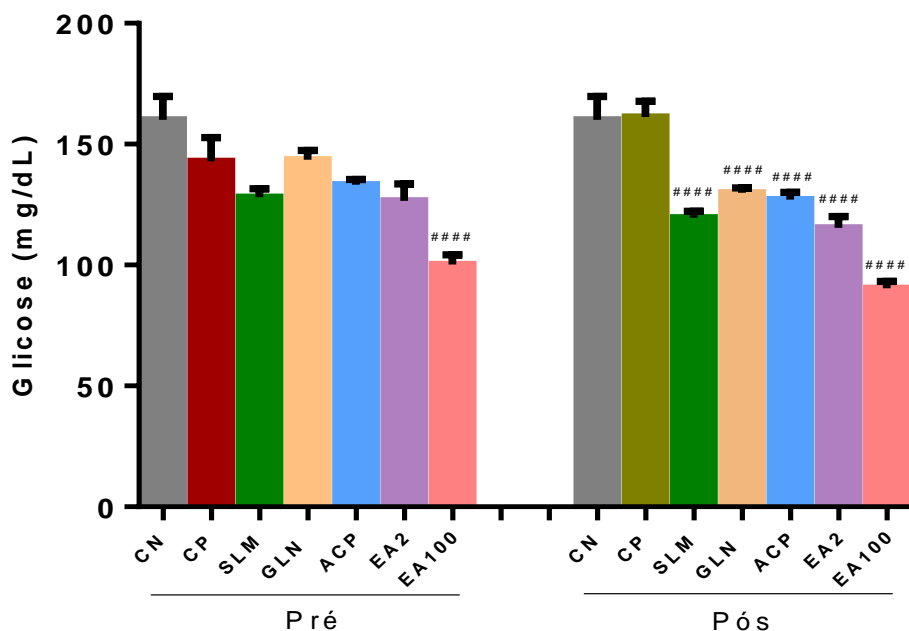
Não houve alteração significativa nos níveis de Glicose do grupo CP (pré e pós) em relação ao grupo CN. O grupo pré (EA100) e pós-condicionamento (SLM, GLN, ACP, EA2 e EA100) causou diminuição nos níveis de Glicose em relação ao grupo CP.

Tabela 32 - Níveis de Glicose no Plasma (mg/dL).

Grupos	CN	CP	SLM	GLN	ACP	EA2	EA100
Pré	160,10	142,90	128,10	143,60	133,30	126,60	100,30
	(± 9,57)	(± 9,80)	(± 3,53)	(± 3,86)	(± 2,12)	(± 6,91)	(± 3,99)
Pós	160,10	161,30	119,60	129,90	127,00	115,40	90,38
	(± 9,57)	(± 6,46)	(± 2,70)	(± 1,97)	(± 3,03)	(± 4,71)	(± 2,79)

CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. Resultados apresentam a Média ± E.P.M. (n = 8).

Figura 42 - Níveis de Glicose no Plasma (mg/dL).



CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo, SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz. *p < 0,05 (vs. CN), #p < 0,05 (vs. CP): Testes t-students e ANOVA/Dunnet. Fonte: elaborada pela autora (2019).

5. DISCUSSÃO

5.1 MODELO MURINO DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP

5.1.1 Efeito dos Tratamento nos Níveis de AST e ALT no Plasma

Vários pesquisadores relataram elevações em enzimas hepáticas séricas após a administração de doses tóxicas de APAP em ratos (JAESCHKE, 1990; RANDLE et al., 2008; DAS et al., 2011; ZHAO et al., 2011; KISAUGLU et al., 2014; UYSAL et al., 2016; PAUL et al., 2016; SILVA et al., 2017). Ao contrário desses estudos, nesse modelo murino de lesão hepática por APAP, a redução observada de AST e ALT pode sugerir que o fígado ultrapassou seu limite de produção enzimática e, portanto, um comprometimento de suas funções. De acordo com Dancygier e Rogart (2010), o declínio dessas enzimas ocorre lentamente e gradualmente durante várias semanas após a lesão, mas uma queda rápida e precipitada dentro de vários dias é prognosticamente desfavorável, indicando esgotamento do fígado. Ademais, uma análise das fases de ciclo celular feita por Bhushan et al. (2014), indicou que a inibição da regeneração não acontece simplesmente por causa da morte celular aumentada, mas devido à inibição da entrada e parada do ciclo celular em um estágio inicial das células viáveis em torno da zona necrótica a uma dose maior de APAP. Além do mais, a necrose maciça dos hepatócitos pode exceder a capacidade proliferativa dos hepatócitos (SIDHU et al., 2017).

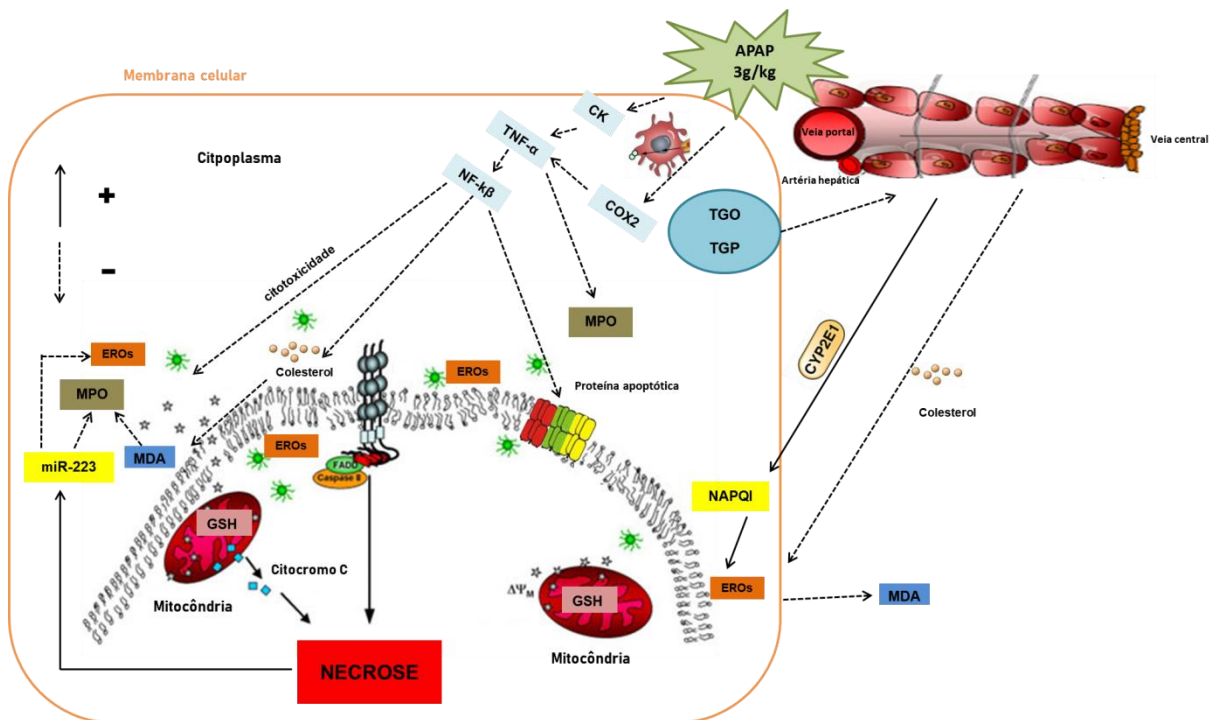
Dados sobre hepatotóxicos, em geral, sugerem que a regeneração do fígado normalmente segue os princípios de dose e resposta, porém, após lesão tóxica, o prejuízo só é reparado até uma dose limiar. Então, doses mais elevadas podem realmente inibir regeneração hepática, resultando em progressão de lesão hepática aguda e até a morte do fígado. Nesse caso, a regeneração pode ser inibida por causa do bloqueio crítico das vias pró-regenerativas (MEHENDALE, 2005).

De acordo com Paknejad et al. (2006), quando há dano na membrana do hepatócito, há aumento da permeabilidade, provocando a liberação das enzimas hepáticas em grande quantidade, no entanto, a necrose em si não é necessária para se observar as alterações dessas enzimas, justificando que pode haver uma baixa correlação entre necrose e o nível das aminotransferases. Nesse sentido, o aumento

na permeabilidade pela perda do potencial de membrana deve está associada com o aumento de lipídio, que é o que normalmente ocorre na lesão, no entanto, quando diminui a deposição de lipídio na membrana, é razoável sugerir que há uma diminuição da permeabilidade, prejudicando a liberação das enzimas hepáticas para o sangue, de acordo com o mecanismo proposto na FIGURA 44. Outros pesquisadores corroboram essa explicação, ao elucidarem que AST e ALT estão normalmente presentes no citoplasma, mas que após a lesão hepática, seus níveis se elevam no sangue devido a alterações na permeabilidade da membrana das células hepáticas (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; VARGAS-MENDOZA et al., 2014).

Um marcador relacionado ao sinal apoptótico do TNF- α na mudança conformacional da membrana correlaciona-se com o grau de lesão hepática (AST, ALT) e o tempo de sobrevivência, o que sugere que esse parâmetro pode servir como um biomarcador para hepatotoxicidade por APAP (CHEN et al 2019).

Figura 43 - Fisiopatogenia do bloqueio das vias pró-regenerativas por indução de APAP.



APAP - acetaminofeno, CK - células de kupfer, COX2 - Ciclooxigenase-2, CYP2E1 - citocromo P450 (2E1), EROs - espécies reativas ao oxigênio, GSH - glutiona hepática, MDA - malonaldeído, MPO - mieloperoxidase, NAPQI - N-acetil-p-benzoquinoneimina, NFκB - fator nuclear kappa B, TNF- α - fator de necrose tumoral. Fonte: elaborada pela autora (2019).

Vários estudos demonstram que a SLM diminuiu os níveis de AST e ALT em modelos de lesão hepática (HAU et al., 2010; DAS et al., 2011; EESHA et al., 2011; GALAL et al., 2012; TSAI et al., 2015; NI; WANG, 2016; GHOSH et al., 2016; BEKTUR et al., 2016; SILVA et al., 2017; WANG et al., 2018). A SLM forneceu proteção ao fígado reduzindo essas enzimas, demonstrando seu papel na estabilização da membrana. Isso está de acordo com a visão comumente aceita de que os níveis séricos das enzimas hepáticas retornem ao normal com a cicatrização do parênquima hepático e a regeneração de hepatócitos (WEGENER; FINTELMANN, 1999). A SLM também parece regular o potencial de membrana mitocondrial prejudicado em situação de lesão tóxica (GHOSH et al., 2016).

De forma muito particular, o pré-condicionamento com SLM neste trabalho aumentou os níveis de AST e ALT, que foram reduzidos na toxicidade por APAP, evidenciando seu papel na cicatrização do parênquima hepático e a estabilização da membrana, diminuindo a gravidade da lesão tecidual induzida.

Para Gouvêa Junior et al. (2011), o efeito da GLN é conhecido na proteção do fígado. Vários estudos observaram que GLN diminuiu significativamente os níveis de ALT, podendo reduzir o dano tecidual na lesão hepática (ARAÚJO JÚNIOR et al., 2011; SÖZEN et al., 2011; XU et al., 2014; HARTMANN et al., 2017). Neste estudo, a GLN atenuou a lesão hepática no modelo pós-condicionamento, aumentando os níveis de AST e ALT, reduzidos pela administração de APAP, demonstrando seu papel na regeneração hepática.

A literatura relata o efeito contadiórios da ACP no dano hepático. A utilização dos pontos E36 e VB34 tem relatado ser eficaz contra o dano hepático ao reduzir os níveis de AST e ALT (LIU et al., 2001; YIM et al., 2006; TANAHASHI et al., 2011). Já Huang et al. (2007) demonstraram que ACP não alterou os níveis plasmáticos de AST e ALT. Neste estudo, a ACP em E36, VB34, BP6 e R3 atenuou a lesão hepática no modelo pós-condicionamento, aumentando os níveis de AST e ALT reduzido pela administração de APAP, demonstrando seu papel atenuante da toxicidade hepática.

O acuponto E36 é a principal indicação terapêutica para doenças do sistema digestivo (SONG et al., 2014a). Shi et al. (2008) observaram que EA (2 e 100) diminuiu os níveis de AST e ALT usando E36 em diferentes modelos de lesão. Já Chen et al. (2014) observaram níveis séricos de AST e ALT acentuadamente

reduzidos com EA em BP6. O pré-condicionamento neste estudo com EA2 em E36, VB34, BP6 e R3 indicou um aumento nos níveis de AST e ALT, reduzidos anteriormente pela lesão por APAP, acima dos valores encontrados no grupo Controle Negativo, evidenciando um efeito tóxico. Provavelmente, isto seja explicado devido ao fato de que na MTC, baixas frequências são utilizadas para tonificação e a as altas frequências para sedação (JOSIELLI, 2016). Nenhum efeito positivo com EA100 foi observado nos níveis das enzimas hepáticas.

5.1.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MPO no Tecido Hepático

A produção de oxidantes começa com a ativação de neutrófilos, monócitos e macrófagos por mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) (ABRANTES et al., 2014).

Lipoproteínas oxidadas podem reduzir a capacidade funcional do transporte de colesterol reverso, e assim peróxidos lipídicos formados podem influenciar a ativação, adesão, infiltração e diferenciação de monócitos bem como a produção de oxidantes e MPO (KISIC et al., 2016).

Sabe-se que a insuficiência hepática induzida por APAP recruta um número significativo de neutrófilos no fígado. No entanto, até agora, é bastante controverso se os neutrófilos realmente contribuem para o processo de lesão (CHEN et al. 2019).

Dados da literatura mostram que a lesão hepática por indução de APAP causa elevação de indicadores de estresse oxidativo, como a MPO (MORSY et al., 2010; KISAUGLU et al., 2014; UYSAL et al., 2016). Diferente desse achado, neste trabalho, APAP provocou a diminuição de MPO nos modelos pré e pós-condicionamento, demonstrando que a partir de uma determinada dose, APAP pode inibir a produção de oxidantes.

Essa redução nos níveis de MPO parece ainda não refletir necessariamente uma regeneração hepática, mas sim o bloqueio da regeneração após uma dose maior de APAP. Bhushan et al. (2014) já teria indicado a parada do ciclo celular em um estágio inicial das células viáveis em torno da zona necrótica a uma dose maior de APAP, além de parecer haver uma diminuição de células polimorfonucleares como um reflexo da necrose hepática maciça. Os hepatócitos necróticos liberam mtDNA (DNA mitocondrial), conhecido por promover inflamação neutrofílica, mas em

situações de necrose maciça, o mtDNA induz uma via inibitória de feedback para prevenir a superativação de neutrófilos pela regulação positiva da expressão do MicroRNA-223 (miR-223), que atenua a lesão hepática pela inibição da resposta inflamatória pelos neutrófilos (HE et al., 2017).

Vias regenerativas através de fatores de crescimento, como TNF- α , fator nuclear kappa B (NF κ B) e citocinas de sinalização IL-6, são conhecidas por induzir proliferação de hepatócitos (MICHALOPOULOS, 2007) em doses regenerativas de APAP, mas, em doses não regenerativas, há uma incapacidade de ativar essas vias de sinalizações (BHUSHAN et al., 2014). Ademais, APAP por ser um inibidor seletivo de ciclo-oxigenase-2 (COX2), a indução da citocinas IL-1, IL-2 e TNF- α e outros mediadores nos sítios de inflamação podem ficar prejudicados (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

A SLM tem sido relatada por ter um papel anti-inflamatório. Prakash et al. (2014) e Wang et al. (2018) observaram que o tratamento com SLM impediu o acúmulo ou a migração de neutrófilos, através da MPO, ou inibiu a produção de fatores pró-inflamatórios (IL-1, IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α) em seus modelos de lesão. Neste trabalho, também se evidenciou o potencial da SLM na inflamação demonstrado pelos baixos níveis encontrados de MPO nos modelos pré e pós-condicionamento de lesão hepática por APAP.

A maioria dos modelos de lesão confirmaram os efeitos da GLN na inflamação, diminuindo a formação de citocinas pró-inflamatórias, na translocação nuclear de NF κ β e nos níveis de TNF- α e MPO (HE et al., 2011; SÖZEN et al., 2011; XU et al., 2014; HARTMANN et al., 2017; GONG et al., 2017). No entanto, Barros et al. (2015) não observaram efeito protetor da GLN nos níveis de NF κ β . Este trabalho também corroborou o efeito imunomodulador da GLN nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão hepática por APAP.

O efeito hepatoprotetor da ACP tem sido demonstrado em diversos estudos. VB34 é um ponto eficaz para disfunção hepática, reduz a toxicidade, protege o tecido hepático e normaliza a atividade imune (YIM et al., 2006) e E36 tem sido muito utilizado na MTC para tratar condições inflamatórias agudas (ROGERS; SCHOEN; LIMEHOUSE, 1992). Santos et al. (2013) utilizando modelos murinos de lesão, observaram que ACP em E36 diminui os níveis de MPO, possivelmente inibindo a infiltração de neutrófilos. Os resultados deste trabalho corroboram o papel

da atividade anti-inflamatória da ACP nos pontos E36, VB34, BP6 e R3 nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão hepática por APAP.

O acuponto E36 é tradicionalmente utilizado para diminuir a inflamação (XIA; GUAN; YANG, 2014). Kim et al. (2008) mostraram que EA em E36 com baixa frequência e alta frequência reduz a inflamação através dos neurônios simpáticos pós-ganglionares e do eixo medular simpático-adrenal, respectivamente.

Uma redução significativa da atividade de MPO tem sido observada usando EA em E36 e BP6 em ratos (SILVA et al., 2011; SANTOS et al., 2013). Contudo, a inflamação pode ser também avaliada pelos níveis de citocinas. Shi et al. (2008) usando EA (2 e 100) em E36 e Yu et al. (2014), usando frequências alternadas (2Hz e 15Hz) reduziram o conteúdo de TNF- α e IL-6 no tecido em seus modelos de lesão. Esses estudos podem sugerir que as rotas catalíticas que regulam os níveis de MPO sejam as mesmas que regulam os níveis de citocinas pró-inflamatórias.

As duas frequências investigadas neste estudo (2Hz e 100Hz) em E36, VB34, BP6 e R3 exerceram ação anti-inflamatória no tratamento da lesão hepática no modelo pré e pós-condicionamento na lesão hepática por APAP. A frequência mais alta, sobretudo, foi capaz de diminuir potencialmente a inflamação em relação à frequência mais baixa.

5.1.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Tecido Hepático

Vários modelos de lesão hepática por APAP observaram aumento nos níveis de MDA e da lesão oxidativa no fígado (ZHAO et al., 2011; MORSY et al., 2010; GALAL et al., 2012; KISAUGLU et al., 2014; UYSAL et al., 2016; PAUI et al., 2016; SILVA et al., 2017)

Os resultados sobre MDA encontrados no modelo pré e pós-condicionamento neste trabalho não corroboram a maioria dos trabalhos citados. A lesão no modelo pré-condicionamento parece ter sido maior por ser uma lesão aguda e, portanto, maior comprometimento das vias pró-regenerativas. Bhushan et al. (2014) teria indicado uma inibição da entrada ou parada do ciclo celular em um estágio inicial das células viáveis em torno da zona necrótica a uma dose maior de APAP. Esse achado suporta a idéia de uma redução ou bloqueio de vias que desencadeiam a formação de MDA, como eventos precoces a uma dose elevada de APAP,

presumivelmente, com propriedades metabólicas incapazes de oxidar ou responder a intermediários pró-oxidantes produzidos por células não parenquimatosas. Um baixo conteúdo de ácidos graxos polinsaturados na membrana do tecido hepático também diminuiria a formação de MDA.

SLM possui forte atividade de eliminação de radicais livres, inibe a LPO e promove a regeneração de hepatócitos danificados. Além disso, possui propriedades estabilizadoras de membrana e de prevenção a fibrose hepática (BASIGLIO et al., 2009). Em vários modelos de lesão, marcadores de estresse oxidativo, como MDA ou TBARS, foram reduzidos com SLM e seus derivados (NENCINI; GIORGI; MICHELI, 2007; GALAL et al., 2012; GHOSH et al., 2016; SILVA et al., 2017; WANG et al., 2018).

O efeito benéfico da SLM na lesão oxidativa foi observado neste trabalho no modelo pós-condicionamento da toxicidade hepática por APAP, reforçando sua hepatoproteção na LPO e no seu efeito antioxidante que auxiliam na preservação da integridade das membranas celulares e homeostase dos tecidos.

A ação benéfica da GLN é evidente na redução do estresse oxidativo em diversos modelos de lesão, através dos níveis de MDA, LPO e TBARS (LIN et al., 2014; ZABOT et al., 2014; XU et al., 2014; BARROS et al., 2015; HARTMANN et al., 2017). Corroborando esses pesquisadores, este estudo mostrou o papel da GLN na redução da lesão oxidativa por MDA, nos modelos pré e pós-condicionamento na toxicidade hepática por APAP.

Embora o papel curativo da ACP seja bem aceito clinicamente, não há muitos estudos que estabeleçam seu papel na lesão oxidativa por redução de MDA ou TBARS (TANAHASHI et al., 2011; SANTOS et al., 2013). De outro modo, este estudo comprovou a ação anti-peroxidativa da ACP nos pontos E36, VB34, BP6 e R3 nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão hepática por APAP.

Muitos modelos sugerem que o tratamento por EA estimula os mecanismos de defesa contra danos oxidativos de lipídios da membrana em acupontos como E36, VB34 ou BP6, por reduzir o conteúdo de MDA ou LPO (SIU; LO; LEUNG, 2004; WANG et al., 2011; ZHOU; CHEN, 2011; YU et al., 2010). No entanto, outros estudos contradizem esse efeito, através do aumento nas concentrações de MDA no fígado de ratos com EA10 e EA100 (SILVA et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

Ndeste trabalho, a lesão oxidativa foi amplamente diminuída com EA2 em E36, VB34, BP6 e R3 nos dois modelos de lesão hepática por APAP, enquanto EA 100Hz só demonstrou o mesmo efeito no pós-condicionamento. Silva et al. (2011) verificou aumento adicional na LPO no grupo EA100 comparado com ratos do grupo EA10.

5.1.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Tecido Hepático

O tratamento de ratos com APAP resulta em estresse oxidativo grave, evidenciado pelo aumento de EROs e NO (ZHAO et al., 2011; KISA OGLU et al., 2014). À semelhança disso, este estudo observou que APAP produziu aumento do estresse oxidativo nos modelos pré e pós-condicionamento. No entanto, Uysal et al. (2016) não observaram alteração importante nos níveis de NO no seu modelo de lesão hepática por APAP.

Vários modelos estudados apontam a redução de EROs e NO através do tratamento com SLM (PRAKASH et al., 2014; GHOSH et al., 2016, SILVA et al., 2017). Neste estudo, SLM também conseguiu prevenir o aumento de nitrito nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão hepática por APAP.

GLN atua na atividade macrófagica, interferindo na fagocitose em sítios inflamatórios (CURI et al., 2005), desempenhando um papel fundamental na proteção contra lesão por estresse oxidativo (MORA et al., 2003). Vários modelos de lesão hepática comprovam essa redução de EROs ou nitrito através do tratamento com esse nutriente (LI et al., 2015a; HARTMANN et al., 2017; GONG et al., 2017). Em concordância aos estudos anteriores, a GLN preveniu o aumento de nitrito na lesão hepática por APAP neste trabalho, sugerindo que este aminoácido é um importante modulador na limpeza de EROs.

Muitos trabalhos demonstraram os efeitos da ACP e da EA em E36, VB34 ou BP6 na redução do estresse oxidativo, pelos níveis de EROs, em diferentes lesões experimentais (HUANG et al., 2007; ZHANG et al.; 2007; ZHOU; CHEN, 2011; LIMA et al., 2012; LEUNG et al. 2016). Este trabalho também observado que ACP em E36, VB34, BP6 e R3 foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de nitrito no tecido hepático de ratos nos modelos de pré e pós-condicionamento de hepatotoxicidade por APAP.

O NO é uma substância vasodilatadora e a sua atividade mais forte está associada a alterações do fluxo sanguíneo hepático por EA em E36, com ativação de vários receptores sensoriais na área de acuponto e o sinal transmitido para o fígado para ativar o endotélio do tecido hepático (WANG et al., 2015b).

Song et al. (2014a) relataram que o estímulo por EA50 em E36 aumentou o fluxo sanguíneo hepático e as substâncias vasoativas, como NO. Esses resultados mostraram a ação modulatória na atividade vascular do tecido hepático, fornecendo experimentalmente evidência para o efeito clínico da EA na circulação hepática e os mecanismos de vasorregulação. Na lesão aguda provocada no modelo pré-condicionamento, observou-se que EA2 em E36, VB34, BP6 e R3 foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de nitrito no tecido hepático de ratos. No entanto, EA100 provocou o aumento de nitrito nos modelos pré e pós-condicionamento da hepatotoxicidade por APAP e potencialmente superior à EA2.

5.1.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Tecido Hepático

Estudos sobre a toxicidade por APAP têm demonstrado que pode existir um "limiar" para GSH, cuja depleção abaixo deste nível, resulta em lesão hepática. Uma parcela significativa de dano tecidual ocorre quando os estoques de GSH são criticamente baixos (MITCHELL; LAUTERBURG, 1982).

O mecanismo de atuação na lesão hepática induzida por APAP é iniciado por eventos intracelulares, incluindo a formação de alguns metabólitos reativos que iniciam um estresse oxidante mitocondrial (JAMES; MAYEUX; HINSON, 2003).

Evidências sugerem que durante overdoses ocorre uma exaustão de GSH e o excesso de NAPQI se combina a proteínas celulares alvo do fígado e ao DNA, que precede a lesão hepática (MITCHELL et al, 1973).

Danos ao fígado estão associados com necrose celular, aumento da LPO, diminuição no nível de GSH e disfunção mitocondrial, resultando em estresse oxidativo (MAHESWARI, MARYAMMAL; VENKATANARAYANAN, 2008; JAESCHKE et al., 2012; DU, RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016).

A dose administrada de APAP neste modelo de lesão hepática não alterou os níveis de GSH nos dois modelos de hepatotoxicidade, assim como no experimento de SILVA et al (2017), divergindo de outros estudos que demonstraram redução na

quantidade de GSH no tecido hepático de ratos (ABDEL-ZAHER et al., 2008; MORSY et al., 2010; DAS et al., 2011; ZHAO et al., 2011; GALAL et al., 2012; KISA OGLU et al., 2014; UYSAI et al., 2016).

A SLM tem natureza membranotrópico e é conhecida por exercer uma estabilização diferencial da membrana hepática (BASIGLIO et al., 2009). Em modelos *in vivo*, foi demonstrado o papel da SLM e derivados no aumento do nível de GSH (NENCINI; GIORGI; MICHELI, 2007; GALAL et al., 2012; WANG et al., 2018). Neste estudo, a SLM também melhorou o perfil antioxidante no modelo pós-condicionamento através dos níveis de GSH. Este resultado confirma que SLM pode ser efetiva em tratamentos de lesão subaguda, aumentando parâmetros protetores do estresse oxidativo, como GSH.

A GLN fornece a porção glutamato da GSH e atenua a queda nos estoques de GSH que ocorre após toxicidade por APAP. No entanto, altas concentrações no tecido podem não estar diretamente relacionadas com o efeito protetor da GLN e isto sugere que, à medida que o fígado rapidamente aumenta a síntese de GSH, há um aumento simultâneo na captação de GLN que diminui as concentrações deste aminoácido no plasma (HONG et al., 1992).

Demais efeitos de proteção antioxidante tem sido atribuída à GLN em diversos modelos de lesão. Os resultados de diversos experimentos revelaram aumento da expressão de GSH, através da suplementação com GLN, exibindo atividade antioxidante significativa e atenuando o estresse oxidativo no tecido hepático (SALOMÃO et al., 2006; SZIJÁRTÓ et al., 2007; TÜRKEZ; GEYIKOGLU; YOUSEF, 2012; LIN et al., 2014; XU et al., 2014). No entanto, assim como Barros et al. (2015), os modelos pré e pós-condicionamento neste estudo na lesão hepática por APAP não evidenciaram aumento nas concentrações de GSH, não confirmando o efeito antioxidante da GLN.

Através da detecção da atividade do sistema antioxidante, muitas pesquisas sugerem que a ACP pode reduzir o dano oxidativo em diferentes órgãos, como o fígado (SILVA et al., 2011). Os efeitos antioxidantes da ACP podem ser vistos por estimulação manual em E36 e VB34 por aumentar a os níveis de GSH, SOD e CAT (SANTOS et al., 2013; LEE et al., 2018). Esses resultados confirmam o papel antioxidante da ACP também observado neste estudo nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão hepática por APAP.

O efeito antioxidante de EA através da estimulação de pontos como E36, VB34 ou BP6 resultou em aumento nos níveis de SOD, GPx ou GSH (SIU; LO; LEUNG, 2004; YU et al., 2010; SILVA et al., 2011; WANG et al., 2011; SANTOS et al., 2013). Da mesma forma, este trabalho apresentou o mesmo resultado com EA (2Hz e 100Hz) em E36, VB34, BP6 e R3, confirmando seu papel na redução do estresse oxidativo nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão hepática por APAP. Semelhante ao que observou Silva et al. (2011), um aumento antioxidante adicional foi verificado na EA100, sugerindo que a alta frequência aumenta potencialmente a proteção contra o estresse oxidativo.

5.1.6 Efeito dos Tratamentos no Peso do Tecido Hepático

O aspecto macroscópico dos fígados dos animais do grupo Controle Negativo mostrou-se dentro dos padrões da normalidade. Por outro lado, os animais que recebem APAP mostraram em alguns animais manchas brancas e levemente elevadas no fígado, além de aparente aumento do peso. A diferença macroscópica observada no fígado foi demonstrada pelo aumento da rigidez, menor viscosidade e tenacidade, presença de esteatose e necrose no fígado.

Diversos modelos experimentais relatam um aumento no peso do fígado após sofrer lesão por um mecanismo de supercompensação da perda da função hepática (DAS; VASUDEVAN, 2006; LIN et al., 2014; PRAKASH et al., 2014). No modelo de toxicidade hepatorenal por APAP, Paul et al. (2016) mostraram experimentalmente que o peso do fígado dos animais não mudou, no entanto, o peso do parênquima direito do tecido hepático aumentou nesta pesquisa no modelo pré e pós-condicionamento na lesão hepática por APAP.

Os efeitos da SLM parecem contribuir para normalizar o peso do tecido hepático, alterado pelo modelo experimental de lesão. Alguns estudos observaram o efeito da SLM na proteção das células hepáticas de ratos, reduzindo a hepatomegalia (DAS; VASUDEVAN, 2006; PRAKASH et al., 2014). Neste trabalho, também foi observada a redução do peso do lobo direito do tecido hepático no modelo pós-condicionamento induzido por APAP. Já Eesha et al. (2011), encontrou aumento no peso do fígado dos ratos tratados com SLM em relação à redução do peso encontrado no grupo de indução.

Os efeitos da GLN na diminuição do peso hepático em ratos que apresentavam o volume hepático aumentado foi demonstrado por Lin et al. (2014). De modo semelhante, a GLN neste trabalho, reduziu o peso do lobo direito do tecido hepático no modelo pós-condicionamento.

A avaliação macroscópica do tecido de modelos de lesão tratado por ACP ainda necessita de mais documentações. Pouco se sabe sobre o efeito da ACP no peso em tecidos investigados em modelo de lesão experimental. Huang et al. (2007) verificaram que o peso do pulmão nos animais LPS tratados com ACP em E36 não sofreu alteração importante, mas neste trabalho, ACP em E36, VB34, BP6 e R3 reduziu o peso do lobo direito do tecido hepático no modelo pós-condicionamento induzido por APAP.

Yu et al. (2014) demonstraram que o tratamento com EA (2Hz e 15Hz) em E36 diminui a relação entre o peso úmido e o peso seco do pulmão em coelhos LPS. Neste trabalho, foi observado que EA (2Hz e 100hz) em E36, VB34, BP6 e R3 foi capaz de diminuir o peso do lobo direito do tecido hepático nos dois modelos de hepatotoxicidade por APAP e EA 100Hz, do lobo esquerdo no modelo pós-condicionamento. Esse achado sugere que EA de alta frequência tem um efeito maior na redução do tecido hepático por indução de APAP.

5.1.7 Efeito dos Tratamentos na Histopatologia do Tecido Hepático

O padrão histológico mais frequente de lesão hepática aguda é uma combinação característica de hepatócito edemaciado e esteatose, com ruptura da vasculatura hepática e necrose hepática centrolobular (LIU et al., 2001; HAU et al., 2010).

Modelos de toxicidade hepatorenal por APAP mostraram experimentalmente em ratos, danos hepáticos consistentes com necrose centrolobular acentuada, degeneração de hepatócitos, infiltração de células inflamatórias, congestão vascular com espaços edematosos, hemorragia extensa, dilatação sinusoidal e degeneração gordurosa no fígado (ZHAO et al., 2011; PAUL et al., 2016; UYSAL et al., 2016).

A análise histopatológica do fígado dos animais do grupo Controle Negativo mostrou-se de acordo com os padrões de normalidade, enquanto alterações histológicas típicas causadas por lesão por APAP foram encontradas nos modelos

pré e pós-condicionamento. Curiosamente, o grupo Controle Positivo do modelo pós-condicionamento apresentou vasos mais dilatados e cordões hepatocitários mais alargados, sugerindo que na lesão subaguda, o edema seja uma alteração mais comum que na lesão aguda. De um modo geral, ambos os tecidos demonstraram uma alteração clássica patológica da região da veia central, incluindo enorme alteração gordurosa, degeneração celular com necrose hepática em muitas áreas, degeneração de balonismo, infiltração de linfócitos, hemorragia, dilatação acompanhada por células inflamatórias e alguns núcleos picnóticos.

O dano estendido à maioria do lóbulo hepático com perda acentuada de seu padrão normal não se correlacionou com o aumento observado nas atividades das enzimas hepáticas. Segundo Dancygier e Rogart (2010), os níveis das aminotransferases normalmente ficam elevados quando há um processo necroinflamatório, mas não existe uma estreita correlação entre as concentrações dessas enzimas e a atividade necroinflamatória.

De acordo com Sampey et al. (2003) nos estágios iniciais da lesão, pode ocorrer esteatose, indução de um membro da família CYP450 e LPO, evidenciada imunodeteção de proteínas hepáticas agegadas com MDA. No entanto, neste trabalho foram encontrados níveis diminuídos de MDA e níveis acentuados de esteatose na avaliação histológica, o que levanta a possibilidade de outra rota autocatalítica na LPO.

A proteção hepática da SLM tem sido investigada por atenuar a lesão hepática, diminuindo a extensão da degeneração vacuolar e da necrose (HAU et al., 2010; GALAL et al., 2012; GHOSH et al. (2016). Neste trabalho, resultado semelhante foi observado pela microscopia no modelo pós-condicionamento por reduzir o peso do lobo direito do tecido hepático, aumentado com a administração de APAP. No entanto, seu efeito aumentou as alterações histopatológicas neste mesmo modelo, enquanto atenuou no modelo pré-condicionamento.

Modelos de lesão usando GLN como tratamento observaram diminuição das alterações histológicas, como necrose e infiltração de leucócitos, protegendo as estruturas lipídicas membranares em hepatócitos (HONG et al., 1992; SÖZEN et al., 2011; TÜRKEZ; GEYIKOGLU; YOUSEF, 2012; XU et al., 2014). Esse mesmo efeito foi observado no modelo pós-condicionamento neste estudo por reduzir o peso do lobo direito do tecido hepático. No resultado histopatológico, observou-se que a GLN

atenuou as alterações no modelo pré-condicionamento, mas não no modelo pós-condicionamento. Outro efeito comumente observado no tratamento com GLN em ambos os modelos de hepatotoxicidade por APAP foi o mapeamento de algumas regiões por esteatose.

Vários modelos de lesão tratados com ACP em E36 ou VB34 mostraram uma redução da patologia clássica, incluindo alteração gordurosa maciça, necrose, degeneração baloniforme e infiltração de linfócitos (LIU et al., 2001; TANAHASHI et al., 2011; YIM et al., 2006). Da mesma forma, esses parâmetros foram observados neste estudo em ambos os modelos de indução por APAP. Este resultado sugere que a ACP provavelmente controla ou inibe o desenvolvimento do dano hepático agudo e subagudo, representado nos modelos pré e pós-condicionamento.

Vários modelos de lesão apontam os benefícios da EA em E36 e BP6 nas alterações histopatológicas, reduzindo a esteatose hepática, a degeneração gordurosa, necrose celular e infiltração de células inflamatórias (FENG; ZENG; ZHUO, 2008; ZHU et al., 2012; WANG et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Este mesmo efeito foi observado nos modelos pré e pós-condicionamento pelas as duas frequências (2Hz e 100Hz) na indução por APAP.

Através de colorações especiais utilizadas neste estudo, em ambos os modelos de toxicidade hepática, não foi observada a presença de fibrose, através da formação de tecido conjuntivo, nem o colapso da trama de sustentação da fibra reticular, não indicando a falência do fígado, apesar da necrose extensa.

5.2 MODELO MURINO DE INJÚRIA RENAL INDUZIDA POR APAP

5.2.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Uréia e Creatinina no Plasma

O rim é um órgão que desempenha um papel importante em todos os seres humanos e animais. Sua função é regular a pressão sanguínea, o equilíbrio ácido-base, o balanço eletrolítico e extracelular (KANDEMIR et al. 2017).

Os mecanismos que levam à hepatotoxicidade têm sido extensivamente estudados, mas os mecanismos relativos à toxicidade renal induzida por APAP são pouco definidos.

A sobredosagem com APAP pode causar toxicidade renal aguda por isquemia tubular. Pouco se sabe sobre doença renal crônica pelo uso crônico de APAP. O risco de insuficiência renal é maior se houver co-ingestão de medicamento anti-inflamatório não esteroideal ou se o paciente já tiver a doença renal. A hepatotoxicidade induzida por APAP geralmente precede a insuficiência renal e é importante distinguir a insuficiência renal induzida por APAP da síndrome hepatorenal (SALLEM; IFTIKHAR, 2019). No entanto, embora a sobredosagem de APAP produza necrose tubular renal, a IRA não é comum no envenenamento e não parece estar relacionada com a gravidade da lesão hepática (MOUR et al., 2005).

As alterações causadas por APAP na fisiologia normal dos rins se manifestam, por exemplo, no aumento dos níveis de creatinina e uréia no sangue (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2000; SENER; SEHIRLI; AYANOĞLU-DÜLGER, 2003; NAZIROĞLU; KARAOĞLU; AKSOY, 2004; MAJHI et al., 2011; ZHAO et al., 2011; PAUL et al., 2016; SABIU; O'NEILL; ASHAFI, 2016; KANDEMIR et al., 2017). No presente modelo de lesão renal induzida por APAP, no entanto, não foi observado o mesmo resultado, sugerindo que em uma dose mais elevada de APAP, exista uma inibição ou um bloqueio na produção ou transporte desses marcadores para o plasma.

Alguns estudos evidenciam o efeito nefroprotetor da SLM. Sua administração inverteu os índices bioquímicos de lesão do rim, apresentando níveis mais baixos de uréia e creatinina e melhorando em parte as alterações nos parâmetros associados à função glomerular (EL-SHITANY; EL-HAGGAR; EL-DESOKY, 2008; TURGUT et al., 2008; CHTOUROU et al., 2014; TAN et al., 2015; GHAZNAVI et al., 2016; GHOSH et al., 2016; BEKTUR et al., 2016; ONAOLAPO et al., 2017). Contudo, um aumento nos níveis de creatinina sérica foi encontrado em um modelo de lesão renal (HOMSI; DE BRITO; JANINO 2010).

Curiosamente neste trabalho, a SLM não alterou níveis de uréia, mas aumentou os níveis de creatinina nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão renal por APAP, corroborando os experimentos de Homsí, De Brito e Janino (2010), em que houve elevação da creatinina sérica por tratamento com SLM após indução de lesão renal por glicerol. Essa condição poderia explicar que a SLM atua contra a inibição da produção ou transporte dos marcadores para o plasma causado por uma

dose elevada de APAP, provavelmente pela sua função estabilizadora de membrana (BASIGLIO et al., 2009).

O papel da GLN na proteção da nefrotoxicidade através dos marcadores de uréia e creatinina ainda é bastante controverso. Alguns estudos mostraram que os níveis séricos de uréia e creatinina não alteraram com o tratamento com GLN (FULLER et al., 2007; GOUVÊA JUNIOR et al., 2011) e outros, evidenciaram uma redução nos níveis de uréia e creatinina sérica, protegendo o rim da nefropatia induzida (KIM et al., 2009; ZHANG et al., 2009; ESPOSITO et al., 2011; KIM et al., 2015a). Neste estudo, a GLN não alterou os níveis de uréia e creatinina nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão renal por APAP.

Alterações do fluxo sanguíneo renal foram claramente relacionadas à ACP em R3 (XU, 1993). O acuponto E36 parece causar efeitos contraditórios na função renal, por aumentar, diminuir ou não alterar os níveis de uréia ou creatinina (HUANG et al., 2007; OH et al., 2012; ISMAIL et al., 2015). ACP em E36 associado ao R3 reduziu níveis de creatinina sérica após o tratamento (YU et al., 2017), e BP6 reduziu os níveis de uréia sérica (SONG et al., 2014b). Neste trabalho, o efeito de ACP em E36, VB34, BP6 e R3 não alterou os níveis séricos de uréia nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP, mas aumentou os níveis de creatinina no modelo pré-condicionamento. Este resultado sugere a ineficácia da ACP em reverter o dano induzida pela dose elevada de APAP, inibindo a produção ou transporte dos marcadores para o plasma.

Vários estudos usando EA2 em E36, BP6 ou R3 implicam seus efeitos na redução de marcadores de lesão renal, como uréia e creatinina (GU et al., 2011; PATERNO et al., 2012; OH et al., 2012; ZHANG et al., 2014a; YU et al., 2015; YU et al., 2017). À semelhança disso, EA (2Hz e 100Hz) em E36, VB34, BP6 e R3 neste trabalho foi capaz de reduzir os níveis séricos de uréia no modelo pré-condicionamento.

5.2.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MPO no Tecido Renal

MPO e derivados oxidantes podem participar como mediadores da oxidação e modificação de biomoléculas ou tecidos e contribuir para o desenvolvimento de

comorbidades e complicações no paciente com doença renal crônica (DRC) (Kisic et al. 2016).

Modelos de lesão apontam aumento nos níveis de MPO e citocinas pró-inflamatórias. O dano renal induzido por APAP causa morte apoptótica e inflamação em células tubulares renais, manifestada por um aumento nos níveis de MPO, NFkB, IL-1 β e TNF- α renal (SENER; SEHIRLI; AYANOĞLU-DÜLGER, 2003; AHMAD et al., 2012; KANDEMIR et al., 2017). Divergindo deste achado, este estudo mostrou uma redução na atividade de MPO no tecido renal nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP. Essa redução nos níveis de MPO parece não refletir necessariamente uma regeneração do tecido renal, mas sim o bloqueio da regeneração após uma dose maior de APAP, assim como observado no tecido hepático. Bhushan et al. (2014) já teria indicado a parada do ciclo celular em um estágio inicial das células viáveis em torno da zona necrótica a uma dose maior de APAP.

A SLM inibe a sinalização da via NFkB e reduz a expressão das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, com propriedade anti-inflamatória e imunomoduladora, reduzindo a infiltração de leucócitos e macrófagos (HOMSI; DE BRITO; JANINO, 2010; DABAK; KOCAMAN, 2015; LI et al., 2015b; TAN et al., 2015). Neste trabalho, a SLM confirmou o papel anti-inflamatório, através da redução dos níveis de MPO no rim de ratos nos modelos pré e pós-condicionamento por indução de APAP.

Os efeitos da GLN na redução da resposta inflamatória, infiltração renal de neutrófilos, supressão da produção e na expressão de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , TNF- α e IL-8 são evidenciados em vários estudos (ESPOSITO et al., 2011; PENG et al., 2013; KIM et al., 2015b). Neste estudo, a GLN também exerceu função anti-inflamatória contra a lesão renal induzida por APAP, através dos níveis reduzidos de MPO no tecido renal de ratos nos modelos pré e pós-condicionamento.

Poucos estudos com ACP usando os pontos utilizados nesta pesquisa têm sido realizados na investigação da resposta inflamatória no tecido renal. ACP em 36 demonstrou atenuar os níveis de TNF- α , IL6 e TGF- β 1 em modelos de lesão (ISMAIL et al, 2015; CHEN et al., 2006). De modo semelhante, ACP nos pontos E36, VB34, BP6 e R3 neste trabalho exerceu um papel anti-inflamatório, diminuindo os níveis de MPO no rim de ratos, nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP.

A EA em pontos como E36, BP6 ou R3 tem sido reconhecida por atenuar a resposta inflamatória no tecido renal, demonstrado pelos níveis de TNF- α , IL-10 e IL-1 β (XU, 1993; GU et al., 2011; ZHANG et al., 2014; YU et al., 2015). O papel anti-inflamatório da EA (2 Hz e 100Hz) em E36, VB34, BP6 e R3 também foi observado neste trabalho através dos níveis reduzidos de MPO nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP. Redução adicional nos níveis de MPO no rim ocorreu no grupo EA100, sugerindo que a alta frequência aumenta em potencial a proteção contra a inflamação no tecido renal.

5.2.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA no Tecido Renal

A lesão por APAP pode causar níveis elevados de LPO e de produtos de peroxidação, como MDA contribuindo para a patogênese do dano renal (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2000; SENER; SEHIRLI; AYANOĞLU-DÜLGER, 2003; NAZIROĞLU; KARAOĞLU; AKSOY, 2004; ABDEL-ZAHER et al., 2008; PAUL et al., 2016; KANDEMIR et al., 2017). No entanto, neste modelo de lesão renal, os níveis de MDA reduziram no modelo pré-condicionamento e não foram alterados no modelo pós-condicionamento. Esse achado parece não refletir necessariamente uma regeneração do tecido renal, assim como observado no tecido hepático. Ademais, a lesão no modelo pré-condicionamento parece ter sido maior por ser uma lesão aguda e, portanto, maior comprometimento das vias pró-regenerativas.

O papel da SLM, tanto na recuperação do tecido hepático quanto no tecido renal, é evidente pelos níveis menores de MDA e LPO (TURGUT et al., 2008; GHAZNAVI et al., 2016; GHOSH et al., 2016; CHTOUROU et al., 2014, EL-SHITANY; EL-HAGGAR; EL-DESOKY, 2008). Este resultado também foi observado neste trabalho no modelo pós-condicionamento na lesão renal por APAP sem, no entanto, alterar no modelo pré-condicionamento, assim como nos experimentos de Homsí, De Brito e Janino (2010).

O tratamento com GLN em vários modelos de lesão tem demonstrado um papel importante no estresse oxidativo por reduzir os níveis de MDA e LPO (ESPOSITO et al., 2011; WANG et al., 2015c). Tal efeito também foi observado neste trabalho no modelo pós-condicionamento por indução de APAP.

E36 e R3 são um dos principais pontos estudados na investigação do seu papel no estresse oxidativo em tratamentos com ACP, por atenuar os níveis de MDA e TBARS na lesão renal induzida (CHEN et al., 2006; HUANG et al., 2007; SILVA et al., 2011; OH et al., 2012). O ponto BP6 parece aumentar o conteúdo de MDA no modelo pré-condicionamento em relação ao modelo pós-condicionamento (SONG et al., 2014b). Outro trabalho com ACP em E36, VB34, BP6 e R3 diminuíram os níveis de MDA (WANG et al., 2015a). Corroborando esses achados, esta pesquisa também observou que ACP nos pontos E36, VB34, BP6 e R3 protege o tecido renal do estresse oxidativo no modelo pós-condicionamento na lesão renal por APAP.

EA2 em E36 e R3 é capaz de diminuir os níveis de MDA e TBARS na lesão renal (OH et al., 2012; YU et al., 2015). Este efeito foi observado neste trabalho com EA2 em E36, VB34, BP6 e R3 nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP, enquanto EA100 reduziu apenas no modelo pós-condicionamento.

5.2.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Nitrito no Tecido Renal

A citotoxicidade renal por APAP está relacionada à produção de mediadores citotóxicos pró-inflamatórios, como evidenciado pelo aumento de EROs (ABDEL-ZAHER et al., 2008; MAJHI et al., 2011; ZHAO et al., 2011; AHMAD et al., 2012). Nesse modelo de toxicidade renal não foi observado o aumento de nitrito nos dois modelos de lesão, levantando a hipótese de que a dose tóxica de APAP no fígado não seja a mesma para o rim.

Um recente estudo mostrou que a vasodilatação prejudicada induzida por APAP poderia ser atribuído ao comprometimento das vias eNOS/NO e que níveis normais de NO reforçam a hipótese de que o intenso estresse oxidativo está por trás da expressão dessas proteínas (PORTO et al. 2019).

A ação da SLM como um agente nefroprotetor foi determinada por sua propriedade de eliminação de radicais livres (TURGUT et al., 2008; CHTOUROU et al., 2014; DABAK; KOCAMAN, 2015; BEKTUR et al., 2016; GHAZNAVI et al., 2016). No entanto, nesse modelo de lesão renal por APAP, a SLM não foi capaz de reduzir os níveis de nitrito, sugerindo não ser eficaz no combate a EROs neste modelo.

Alguns trabalhos relataram a ação imunomoduladora da GLN na redução do aumento de iNOS em vários modelos de lesão, inclusive renal (ESPOSITO et al.,

2011; KIM et al., 2015b). Este resultado não foi evidenciado neste trabalho, por causar aumento nos níveis de nitrito no modelo pós-condicionamento, sugerindo ser eficaz no combate a EROs na lesão renal subaguda por APAP. Outros estudos indicam que a GLN aumenta a síntese de NO por macrófagos por estar envolvida em um processo de sinalização do epitélio intestinal de células produtoras de NO em outras partes da vasculatura (BELLOWS; JAFFE, 1999; MATHESON et al. 1999).

O uso da ACP foi relatado no controle do estresse oxidativo em diferentes órgãos e tecidos, como os rins (LIMA et al., 2012). O efeito da ACP em E36 e R3 foi demonstrado na regulação positiva da biossíntese renal de iNOS e NO (HUANG et al., 2007; OH et al., 2012). Contudo, este efeito redutor de Nitrito não foi evidenciado neste trabalho com ACP em E36, VB40, BP6 e R3 nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP, sugerindo não ser eficaz no combate a EROs neste modelo.

EA também pode atenuar o estresse oxidativo nos rins (LIMA et al., 2012). O tratamento com EA2 em E36 e R3 é evidenciada por exercer efeito antioxidante através da redução de iNOS e NO em rim de ratos induzidos (HUANG et al., 2007; GU et al., 2011; OH et al., 2012). Eles também observaram que EA2 é mais eficaz que ACP nos seus modelos de lesão. Por outro lado, outro trabalho com ACP relatou um aumento da concentração renal de NO em grupos nefrectomizados (PATERNO et al., 2012). Esse aumento também foi observado neste modelo usando os acupontos E36, VB40, BP6 e R3 na EA2 no modelo pós-condicionamento e EA100 nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão renal por APAP. Um aumento adicional também foi observado na frequência mais alta em relação à frequência mais baixa.

5.2.5 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de GSH no Tecido Renal

Alterações causadas por APAP na fisiologia normal dos rins se manifestam, por exemplo, em estresse oxidativo grave e nas alterações nos níveis de GSH no tecido renal (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2000; SENER; SEHIRLI; AYANOĞLU-DÜLGER, 2003; NAZIROĞLU; KARAOĞLU; AKSOY, 2004; MAJHI et al., 2011; ZHAO et al., 2011; SHANMUGASUNDARAM; VENKATARAMAN, 2006; SABIU; O'NEILL; ASHAFI, 2016; KANDEMIR et al., 2017). No entanto, neste estudo não

foram observados prejuízos nas concentrações de GSH nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão renal por APAP. Este resultado sugere que uma alta dose de APAP inibe ou bloqueia o transporte de GSH da mitocôndria do tecido renal, à semelhança do que ocorre no tecido hepático.

Alguns estudos evidenciam o efeito nefroprotetor da SLM principalmente ao seu papel antioxidante, protegendo tecidos vulneráveis de lesão de sobredosagem de APAP (ONALAPO et al., 2017). O papel da SLM no estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese renal por melhorar o nível de enzimas antioxidantes, como GSH (EL-SHITANY; EL-HAGGAR; EL-DESOKY, 2008; TURGUT et al., 2008; DABAK; KOCAMAN, 2015; GHAZNAVI, et al., 2016; CHTOUROU et al., 2014). O efeito positivo da SLM foi evidenciado neste trabalho apenas no modelo pós-condicionamento na lesão renal por APAP.

Vários achados parecem corroborar o efeito benéfico de GLN como um agente protetor na lesão renal, porém, alguns resultados ainda contrariam esta prerrogativa. A exemplo disso, vários resultados mostraram um efeito antioxidante positivo (SALOMÃO et al., 2006; SZIJÁRTÓ et al., 2007; ZHANG et al., 2009a), sem efeito (GOUVÊA JUNIOR et al., 2011) e redutor dos parâmetros antioxidantes (WANG et al., 2015c). Neste trabalho, o tratamento com GLN não causou alteração nos níveis de GSH no tecido renal nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP.

Através da detecção da atividade do sistema antioxidante, muitas pesquisas sugerem que a ACP e EA (10Hz e 100Hz) podem reduzir o dano oxidativo nos rins (SILVA et al., 2011). Estudos usando ACP em E36, VB34, BP6 e R3 verificaram que os níveis de SOD, GSH e GPx foram autoregulados (SILVA et al., 2011; SONG et al., 2014b; WANG et al., 2015a). Neste trabalho, de modo semelhante, foi observado que ACP e EA (2 Hz e 100Hz) em E36, VB40, BP6 e R3 foi capaz de aumentar os níveis de GSH nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP, comprovando seu potencial como agente protetor contra o estresse oxidativo. Aumento adicional nos níveis de GSH ocorreu na EA de alta frequência comparado a EA de baixa frequência, assim como ocorreu nos experimentos de Silva et al. (2011),

5.2.6 Efeito dos Tratamentos no Peso do Tecido Renal

Uma redução do rim tem sido usada como um indicador de doenças renais. O peso do rim foi reduzido em ratos intoxicados com APAP com implicações na constrição de células tubulares renais (SABIU; O'NEILL; ASHAF, 2016). Por outro lado, Paul et al. (2016) observou o aumento no peso do rim dos animais no modelo de toxicidade hepatorenal por APAP. De forma semelhante, neste trabalho, o rim direito sofreu um aumento no peso no modelo pré-condicionamento, enquanto o rim esquerdo sofreu aumento no peso nos dois modelos de toxicidade por APAP.

Konopka (1998) observou em seu modelo de lesão renal, que o rim esquerdo diminuiu e o rim direito aumentou progressivamente, justamente por refletir a ocorrência da hipertrofia compensadora.

O aspecto macroscópico do rim dos animais do grupo Controle Negativo mostrou padrões adequados de normalidade, de cor marrom avermelhado brilhante. Por outro lado, o rim dos animais do grupo Controle Positivo apresentaram cor marrom esbranquiçado, opacidade, aumento da rigidez, menor viscosidade e tenacidade no rim.

A SLM parece atuar na regulação do peso do órgão afetado pela lesão. Ghaznavi et al. (2016), por exemplo, verificaram que o peso relativo do rim direito e esquerdo diminuiu com o pré-condicionamento com SLM nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP.

O papel da GLN parece não influenciar no peso do órgão afetado pela lesão. Assim como Wong et al. (2011), este trabalho não verificou alteração no peso dos rins nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP, embora evidenciasse uma tendência em diminuir o peso do órgão.

Parece que nenhuma pesquisa foi realizada com o objetivo de investigar o papel da ACP no peso do rim após a lesão. Contudo, este trabalho mostrou que ACP nos pontos E36, VB34, BP6 e R3 causou uma redução no peso dos rins no modelo pós-condicionamento na lesão renal por APAP. Este resultado amplia o conhecimento sobre o papel regulador de ACP no peso do rim após indução por APAP.

A EA parece exercer efeito na regulação do peso do rim de animais que sofreram lesão. Um estudo comparando os efeitos de EA (30Hz e 100Hz) em E36 e BP6 demonstrou que o peso da gordura ao redor do parênquima esquerdo do tecido renal e o volume da gordura na célula é menor na frequência maior. Já neste

trabalho, EA2 nos pontos E36, VB34, BP6 e R3 causou redução no peso dos rins de ratos nos modelos pré e pós-condicionamento por indução de APAP e EA100 produziu o mesmo efeito apenas na lesão subaguda, representada pelo modelo pós-condicionamento.

5.2.7 Efeito dos Tratamentos na Histopatologia do Tecido Renal

A nefrotoxicidade mediada por APAP têm sido bem documentada e é caracterizada por processos morfológicos e por evidência funcional, como inchaço do epitélio dos túbulos e degeneração vacuolar severa (ZHAO et al., 2011).

A observação histopatológica dos rins do grupo tratado com APAP em diversos experimentos mostrou alterações como: infiltração do interstício com células de inflamação, necrose tubular, necrose peritubular e atrofia dos glomérulos, manchas leves de cor marrom com característica textura irregular, arquitetura alterada, extensa destruição de glomérulos e túbulos, hipercelularidade, dilatação do espaço capsular de Bowman, atrofia glomerular, túbulos proximais dilatados com perda do limite celular da borda em escova, degeneração epitelial, necrose, vacuolização localizada e apoptose (SHANMUGASUNDARAM; VENKATARAMAN, 2006; BEKTUR et al., 2016; PAUL et al., 2016; SABIU; O'NEILL; ASHAFI, 2016).

A análise histopatológica do rim dos animais do grupo Controle Negativo mostrou uma morfologia normal do parênquima renal com glomérulos intactos, interstício e vasos sanguíneos normais, textura fina característica e aparência marrom escura e muita celularidade no glomérulo, enquanto alterações histológicas típicas causadas por lesão foi identificada nos grupos Controle Positivo dos modelos pré e pós-condicionamento. Curiosamente, o modelo pós-condicionamento apresentou alterações histopatológicas mais severas, como nefrite intersticial, congestão, tubulite com tumefação turva, acúmulo de material protéico dentro dos túbulos, eosinofilia e degeneração hidrópica tubular em relação ao modelo pré-condicionamento.

O efeito nefroprotetor da SLM é capaz neutralizar as mudanças comportamentais, inverter os índices bioquímicos de lesão do rim e aumentar a atividade antioxidante, além de conferir graus variáveis de proteção do tecido histológico, vulnerável de lesão de sobredosagem de APAP (ONAOAPO et al.,

2017). Várias pesquisas mostraram o efeito da SLM no pré-condicionamento na redução acentuada da necrose tubular, edema de células epiteliais tubulares (EL-SHITANY; EL-HAGGAR; EL-DESOKY, 2008; TURGUT et al., 2008; TAN et al., 2015) e no pós-condicionamento, na redução da infiltração de células inflamatórias, congestão vascular glomerular e peritubular, dilatação do espaço capsular de Bowman e dos capilares glomerulares, edema tubular e apoptose (DABAK; KOCAMAN, 2015; GHOSH et al., 2016; BEKTUR et al., 2016).

Neste trabalho, resultado semelhante com SLM foi observado pela microscopia nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP. Curiosamente, foi observada no modelo pré-condicionamento uma esteatose intensa em macro e microgotas bem como a arteríola aferente. No modelo pós-condicionamento, o destaque foi para esteatose intensa em microgotas e depósito de proteína na cápsula de Bowman.

De acordo com Sampey et al. (2003) nos estágios iniciais da lesão, pode ocorrer esteatose, indução de um membro do CYP450 e LPO, evidenciada pela imunodeteção de proteínas hepáticas agegadas com MDA. No entanto, neste trabalho foram encontrados níveis diminuídos de MDA e níveis acentuados de esteatose na avaliação histológica, sugerindo a possibilidade de outra rota autocatalítica na LPO.

Na pesquisa de Tsai et al. (2014) foi relatado que a gordura visceral predita MPO plasmática em pacientes com DRC, mas não em controles saudáveis, provavelmente causada por neutrófilos ativados pela gordura visceral. De forma contrária, essa esteatose renal observada no grupo SLM parece não se associar com os níveis diminuídos de MPO encontrados no tecido renal.

Mesmo que o mecanismo preciso da lesão renal por APAP não seja bem explicado, muitos pesquisadores afirmam que a toxicidade está relacionada à oxidação de lipídio nos tecidos renais (SHANMUGASUNDARAM; VENKATARAMAN, 2006). Portanto, SLM parece minimizar esse cenário pelo seu potencial de reduzir a dilatação, mostrando uma morfologia mais restaurada dos glomérulos.

GLN comprovadamente reduz os danos histológicos produzidos em modelos de lesão, como na diminuição de túbulos necróticos e cilindros tubulares, das células tubulares apoptóticas no córtex, medula e papila e por aumentar a expressão

intrarrenal HSP e diminuir as anormalidades tubulointersticiais (FULLER et al., 2007; ZHANG et al., 2009; KIM et al, 2015a).

De outro modo, Gouvêa Junior et al. (2011) mostraram na análise do estudo histológico que, tanto o grupo controle como o grupo GLN, tinham graus bastante semelhantes de dano, porém, sem significância estatística diferença entre eles.

A ação nefroprotetora da GLN foi questionada nesta pesquisa por aumentar os danos histológicos nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP. Apesar de corroborar os resultados de Gouvêa Junior et al. (2011), parecer não haver estudos que indiquem aumento de dano histopatológico provocado pela GLN. Dessa forma, este estudo indica um novo resultado no sentido de aprofundar as investigações sobre os efeitos benéfico da GLN no estresse oxidativo no tecido renal, mas prejudicados nos parâmetros histopatológicos.

Parece haver raros trabalhos investigando alterações histológicas no rim usando o tratamento com ACP. No entanto, o tratamento com ACP em E36 e R3 diminuiu a calcificação cortical com fibrose renal nos experimentos de Oh et al. (2012). Já neste trabalho, o tratamento com ACP revelou um resultado não muito otimista, por aumentar os danos histológicos nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP.

Trabalhos envolvendo EA têm sido razoavelmente documentados nos danos histológicos do tecido renal. EA (2Hz, 15Hz e 20Hz) em E36 e R3 foi capaz de diminuir a extensão do dano morfológico, no dano tubular, a vacuolização celular, edema intersticial, fibrose tubulointersticial e infiltração de células inflamatórias (GU et al., 2011; PATERNO et al., 2012; YU et al., 2015). No entanto, esses achados diferem dos resultados encontrados neste trabalho, em que EA (2Hz e 100Hz) nos pontos E36, VB34, BP6 e R3 aumentou os danos histológicos nos dois modelos de nefrotoxicidade por APAP. Diante deste resultado, o efeito da EA nas alterações morfológicas do rim merece mais investigação.

Através de colorações especiais utilizadas neste estudo, em ambos os modelos de toxicidade renal, não foi observada a presença de fibrose, através da formação de tecido conjuntivo, nem o colapso da trama de sustentação da fibra reticular. O tempo de experimento ou a dose administrada pode não ter sido suficiente para causar formação de fibra colágena e reticular após administração de APAP.

5.3 MARCADORES PLASMÁTICOS NO MODELO DE LESÃO POR APAP

5.3.1 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de MDA, Nitrito e GSH

No presente estudo, a administração de APAP não causou alteração nos níveis de Nitrito no plasma de ratos Wistar no modelo pré e pós-condicionamento. Curiosamente, no modelo pós-condicionamento foi observado uma redução nos níveis de MDA e a manutenção dos níveis de GSH.

Em vários modelos de lesão, marcadores de estresse oxidativo medidos no plasma, como MDA e TBARS, foram reduzidos com o tratamento com SLM e derivados (DAS; VASUDEVAN, 2006; TURGUT et al., 2008; PRAKASH et al., 2014).

Por outro lado, ACP em E36 reduziu a LPO plasmático em modelos de lesão (DAI et al., 2008), enquanto EA100 aumentou a peroxidação lipídica no plasma (LIMA et al. 2012).

GU et al. (2011) observaram que EA em E36 diminuiu os níveis de nitrito plasmático. Já Paterno et al. (2012), verificaram que o tratamento no seu modelo de lesão com EA20 em E36 e R3 causou aumento das concentrações séricas de NO.

Em relação ao status antioxidante no plasma, o tratamento com SLM e GLN aumentou o nível de GSH e GPx plasmático em modelos de lesão (TURGUT et al., 2008; KIM et al., 2009). Santos et al. (2013) com o estímulo por ACP e EA (2Hz e 100Hz) em E36 e BP6, promoveram um aumento nos níveis de GSH no plasma nos seus experimentos.

No presente estudo, a administração de SLM, GLN, ACP e EA (2Hz e 100Hz) foi capaz de diminuir a LPO no plasma de ratos Wistar nos modelos pré ou pós-condicionamento, confirmando o papel benéfico desses tratamentos no estresse oxidativo.

Em contrapartida, o tratamento com SLM e ACP não foi capaz de causar redução nos níveis de Nitrito nos modelos pré e pós-condicionamento da lesão por APAP. Já a GLN e EA100 não conseguiram impedir o aumento de nitrito no modelo pós-condicionamento. Nesse caso, é possível que o eletroestímulo em uma frequência mais alta promova uma vasodilatação, promovendo a passagem de substâncias vasoativas.

O tratamento com ACP, EA (2Hz e 100Hz) causou aumento nos níveis de GSH nos dois modelos de lesão por APAP. Fica evidente, através desses resultados que tratamento com ACP ou eletroestímulo em E36, VB34, BP6 e R3 possibilitam condições de proteção antioxidante no plasma em modelo de lesão por APAP.

5.3.2 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Colesterol Total, LDL-c e HDL-c

Os produtos de oxidação, como hidroperóxidos lipídicos, se acumulam nos rins fibróticos, bem como no plasma de pacientes com DRC, sugerindo que o estresse oxidativo se intensifica durante a progressão da doença renal (HIMMELFARB, 2009).

Além do aumento dos níveis séricos de marcadores bioquímicos, como AST, os níveis de colesterol também estão elevados (MAHESWARI; MARYAMMAL; VENKATANARAYNAN, 2008). Dessa forma, o colesterol também pode ser utilizado como índice de função hepática. O colesterol sérico é um dos principais indicadores da capacidade metabólica sintética e geral do fígado (TANAHASHI et al., 2011).

Estudos mostram que os níveis séricos de CT e LDL-c aumentam, enquanto os níveis de HDL-c diminuem nos ratos submetidos à lesão (YIM et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Os níveis séricos de CT aumentado afetam a permeabilidade da membrana celular do fígado. O excesso mitocondrial de CT prejudica o transporte de GSH, esgota as reservas de mGSH, promovendo a geração de EROs mitocondrial em resposta ao estímulos de morte celular por TNF- α , causando peroxidação, que desestabiliza o lipídio da bicamada da membrana mitocondrial. As consequências funcionais são sensibilização dos hepatócitos ao TNF- α , permeabilização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo c, necrose e apoptose de hepatócitos, que promovem inflamação hepática (MARÍ et al., 2006; MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2013). Os adipócitos hipertrofiados na obesidade caracterizados pela sobrecarga intracelular de colesterol têm uma diminuição na concentração de colesterol na membrana plasmática, devido a uma diluição do colesterol da membrana através de um aumento da superfície celular. A depleção relativa do colesterol da membrana ativa um fator de transcrição promovendo ainda mais o acúmulo de colesterol dentro da célula adiposa, prejudicando a sinalização

de insulina intracelular e translocação de GLUT-4 para a membrana (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2013).

A mitocôndria também sofre uma alteração na sua permeabilidade devido ao esgotamento do ATP subjacente à perda da fosforilação oxidativa mitocondrial, presente na necrose e também devido ao aumento na produção de EROs (JAESCHKE, 1990; RASOLA; BERNARDI, 2007; MARTIN-MURPHY; HOLT; JU, 2010; JAESCHKE et al., 2012; DU; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016).

O papel de SLM ainda parece ser controverso no metabolismo do colesterol. Ni e Wang (2016) observaram redução de CT e frações, Silva et al. (2017) observaram redução de CT e LDL-c e El-Shitany, El-Haggar e El-Desoky (2008) não observaram alteração na hiperlipidemia. No presente trabalho, o tratamento com SLM também foi inespecífico, reduzindo CT e HDL-c no pré-condicionamento, sem produzir alteração nos níveis de LDL-c nos modelos pré e pós-condicionamento na lesão por APAP.

Vários estudos apontam o efeito da GLN como regulador de colesterol plasmático. Em um modelo de disfunção hepática de Rodriguez et al. (1995), os ratos infundidos com GLN desenvolveram uma diminuição significativa nos níveis de CT plasmático. Yatzidis (2004) suplementaram pacientes urêmico com doença renal com 6 aminoácidos, entre eles, GLN, e verificaram leve redução de CT e LDL-c e leve aumento de HDL-c. Contradizendo esses achados, Mansour et al. (2015) não encontraram nenhuma diferença significativa entre os níveis de CT, LDL-c e HDL-c em pacientes com diabetes melitus tipo 2 (DMT2) suplementados com GLN.

O tratamento com GLN neste trabalho não alterou muito o perfil lipídico, reduzindo apenas o CT no modelo pré-condicionamento.

O efeito lipídico-regulador da ACP usando os pontos E36, VB34, BP6 e R3 foi demonstrado em alguns modelos de lesão por diminuir níveis de CT e LDL-c e aumentar os níveis de HDL-c (YIM et al., 2006; TANAHASHI et al., 2011; OH et al., 2012; WANG; LIU; XU, 2014; ISMAIL et al., 2015). Diferente dessas observações, neste trabalho, ACP em E36, VB34, BP6 e R3 não causou alteração no perfil lipídico dos ratos nos dois modelos de lesão por APAP.

De outro modo, os efeitos da EA no conteúdo de colesterol parecem ser conhecidos mais claramente. Em alguns experimentos, EA (2Hz ou 4Hz/20 Hz) em E36, BP6 ou R3 foi capaz efetivamente de regular os níveis de CT, HDL-C e LDL-C

e a função hepática (OH et al., 2012; ZHU et al., 2012; CHEN et al., 2014; ZHANG et al., 2015; YEOM et al., 2018).

Neste trabalho, EA2 nos acupontos E36, VB34, BP6 e R3 produziu o mesmo efeito no perfil lipídico nos dois modelos de lesão por APAP, reduzindo apenas os níveis de CT no modelo pré-condicionamento. O eletroestimulo parece ter uma função mais efetiva na redução de CT, principalmente no modelo pré-condicionamento, prejudicando a permeabilidade da membrana pela redução de CT e conseqüentemente prejudicando o transporte de mGSH.

5.3.3 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Triglicerídeos

Embora o aumento de triglicerídeos (TG) no plasma seja documentado em modelos de lesão (BUTTAR et al., 1976; ISHIDA et al., 1995; ÖZSOY; PABUÇCUOĞLU, 2007; PRAKASH et al., 2014, SILVA et al., 2017), neste estudo, administração de APAP causou aumento nos níveis de TG apenas no modelo pós-condicionamento.

De uma forma geral, SLM desempenha um papel vital na regulação do metabolismo lipídico, diminuindo os níveis de TG, conforme demonstrado em alguns experimentos (PRAKASH et al., 2014; NI; WANG, 2016). Neste trabalho, SLM diminuiu os níveis de TG nos modelos pré e pós-condicionamento por indução de APAP.

Muito se tem atribuído ao papel imunomodulador da GLN, no entanto, seu papel no metabolismo lipídico ainda encontra diversas contradições. Yatzidis (2004), por exemplo, verificaram redução dos níveis de TG no seu modelo de lesão, sem prevenir, portanto, o acúmulo de gordura no fígado. Mansour et al. (2015), por sua vez, não encontraram nenhuma diferença significativa entre os níveis de TG no plasma em pacientes com DMT2 suplementados com GLN. De um modo positivo, o tratamento com GLN diminuiu os níveis séricos de TG em ratos nos dois modelos de lesão por APAP, confirmando um papel importante da GLN no metabolismo lipídico.

A influência da ACP utilizando pontos como E36, BP6 ou R3 na regulação do metabolismo lipídico vêm sendo confirmado, conforme demonstrado em modelos de lesão (ZHANG et al., 2007; WANG; LIU; XU, 2014; ISMAIL et al., 2015). No entanto, ACP nos acupontos E36, VB34, BP6 e R3 neste modelo de lesão por APAP

promoveu um efeito anti-lipidogênico dos níveis séricos de TG apenas no modelo pós-condicionamento.

Os efeitos da EA parecem ser conhecidos mais claramente que ACP na regulação de TG no sangue. Modelos de lesão em que utilizaram EA (2Hz, 4 Hz/20 Hz, 30Hz e 100Hz) em E36 ou BP6, observaram níveis séricos de TG reduzidos (GE et al., 2007; ZHU et al., 2012; CHEN et al., 2014; ZHANG et al., 2015; YEOM et al., 2018). Corroborando esses resultados, nesta pesquisa, EA (2Hz e 100 Hz) nos acupontos E36, VB34, BP6 e R3 comprovou seu papel na redução dos níveis séricos de TG nos dois modelos de lesão por APAP.

5.3.4 Efeito dos Tratamentos nos Níveis de Glicose

Poucos estudos parecem investigar alterações plasmáticas de glicose em modelos de lesão. O modelo de lesão de Trumper et al. (1995) demonstrou alteração no metabolismo de carboidratos, com elevação dos níveis plasmáticos de glicose. No entanto, este efeito não foi observado neste estudo nos dois modelos de intoxicação de lesão por APAP.

O aumento dos níveis de beta-endorfina da glândula adrenal aumenta a secreção de insulina, reduzindo os níveis de glicose no plasma, e está parcialmente envolvido na estimulação de EA (LIN et al. 2004).

A estimulação por EA em E36 pode suprimir a regulação positiva induzida por NAFLD de açúcar no sangue, insulina sérica, índice de resistência à insulina e níveis séricos e hepáticos de IL-18 em ratos com fígado gorduroso, o que pode contribuir para o seu efeito na diminuição dos danos hepáticos induzidos pelo ataque de polissacarídeos (WANG et al. 2013).

Além de exercer efeito no metabolismo de lipídeos, SLM e ACP e EA (2Hz e 100Hz) em E36 BP6 ou R3 também tem papel regulador no metabolismo de carboidratos, normalizando a glicose e insulina plasmática (LIN et al., 2004; ZHANG et al., 2007; FENG; ZENG; ZHUO, 2008; CHEN et al., 2010; LI et al., 2011; WANG et al., 2013; PRAKASH et al., 2014; WANG; LIU; XU, 2014; ZHENG et al., 2015; LEUNG et al., 2016).

5.3.5 Considerações Finais

Neste trabalho, o efeito do tratamento com SLM, GLN, ACP e EA2 na redução da glicose plasmática foi observado apenas no modelo de pós-condicionamento da lesão por APAP. Esses resultados sugerem que o tratamento influenciou na redução dos níveis de glicose no modelo pós-condicionamento, por não ter sofrido a mesma gravidade que o modelo pré-condicionamento da lesão por APAP, podendo a glicose ser consumida como substrato energético mais eficientemente. O efeito hipoglicêmico pela EA100 foi observado nos dois modelos de lesão por APAP e teve um papel adicional reduzindo ainda mais os níveis de glicose plasmática em relação a EA2. Parece que EA em alta frequência é capaz de melhorar o metabolismo de carboidratos em relação à baixa frequência.

O resumo dos principais resultados dos grupos de intervenção utilizados neste trabalho por pré e pós-condicionamento (SLM, GLN, ACP, EA2 e EA 100) na toxicidade, estresse oxidativo no plasma, no tecido hepático e renal e a repercussão nas alterações histopatológicas está demonstrado compilados na TABELA 33.

Tabela 33 – Efeito dos Tratamentos Propostos sobre as Lesões Provocadas pelo Acetaminofeno.

	Fígado	Rim	Plasma
Pré- condicionamento			
Toxicidade	SLM EA2	SLM EA2 EA100	
Estresse oxidativo	SLM GLN ACP EA2 EA100	SLM GLN ACP EA2 EA100	SLM GLN ACP EA2 EA100
Alterações histopatológicas	GLN ACP EA2 EA100		

		Fígado	Rim	Plasma
Pós- condicionamento	Toxicidade	GLN ACP		
	Estresse oxidativo	SLM GLN ACP EA2 EA100	SLM GLN ACP EA2 EA100	ACP EA2 EA100
	Alterações histopatológicas	SLM ACP EA2 EA100	SLM	

SLM - Silimarina, GLN - Glutamina, ACP - Acupuntura, EA2 - Eletroacupuntura 2Hz, EA100 - Eletroacupuntura 100Hz.

Sumariamente, vale ressaltar que a administração de 3g/kg neste estudo baseou-se em doses já estudadas e convencionalmente consolidadas por causar lesão hepática. Diante o resultado obtido nos parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática (AST e ALT) e renal (Uréia e Creatinina), novos experimentos foram realizados (APÊNDICE C) com o objetivo de descartar erros metodológicos. Resultados semelhantes foram obtidos, confirmando a lesão hepática à constatação do número de morte dos animais. Nesse contexto, pode-se teoricamente inferir que modelos de lesão utilizando a mesma dose de APAP podem divergir entre si, mesmo em animais de uma mesma espécie, pois muitas vezes as condições fenotípicas e genéticas dos animais podem vir a ser diferentes. Desta forma, os resultados aqui demonstrados lançam uma nova luz sobre os efeitos em modelo murino de lesão por APAP. Contudo, os achados a respeito do uso terapêutico de ACP e EA em baixa e alta frequência valorizam seu efeito energético em detrimento do efeito químico de substâncias usadas na proteção contra a lesão hepática e renal.

Outro resultado observado neste trabalho que merece novas investigações relacionou as evidências do uso da GLN e o aparecimento de esteatose mapeada em balonismo, além de seu efeito no aumento dos níveis de nitrito, ao que parece ser controverso na literatura.

Novos estudos devem ser encorajados usando este mesmo modelo com o objetivo de aprofundar a investigação da fisiopatogenia das vias envolvidas na regeneração, como marcador da inflamação TNF- α .

Também é necessário compreender o dano causado pela dose de 3g/kg na função renal encontrado no tecido renal, através da taxa de filtração glomerular em um modelo *in vitro*, pois ao que parece, o rim foi sensível à alteração morfológica, mas sem repercussão no aspecto funcional. Esse achado já é evidenciado na síndrome hepatorenal, em que os prejuízos observados na lesão hepática não acompanham os prejuízos na lesão renal.

A partir desse novo modelo de lesão hepática por APAP, é importante avaliar o curso dose e resposta da toxicidade em doses experimentais diferentes com o objetivo de encontrar a dose limiar de toxicidade por APAP para causar lesão hepática e renal aguda e subaguda de ratos Wistar.

6. CONCLUSÃO

- A administração de APAP a ratos saudáveis induziu uma hepatite tóxica com destruição tissular irreversível;
- A Silimarina quando administrada em ratos antes da intoxicação por APAP reduziu os efeitos tóxicos e do estresse oxidativo no fígado, rim e no sangue do animal;
- A Silimarina quando administrada em ratos depois da intoxicação por APAP reduziu estresse oxidativo no fígado e no rim do animal e, atenuou as alterações histopatológicas;
- A Glutamina quando administrada em ratos antes da intoxicação por APAP reduziu os efeitos do estresse oxidativo no fígado, rim e no sangue do animal e, atenuou as alterações histopatológicas;
- A Glutamina quando administrada em ratos depois da intoxicação por APAP reduziu os efeitos tóxicos e do estresse oxidativo no fígado e no rim do animal;
- O tratamento com Acupuntura em ratos antes da intoxicação por APAP reduziu os efeitos do estresse oxidativo no fígado, rim e no sangue do animal e, atenuou as alterações histopatológicas;
- O tratamento com Acupuntura em ratos depois da intoxicação por APAP reduziu os efeitos tóxicos no fígado e do estresse oxidativo no fígado, rim e no sangue do animal e, atenuou as alterações histopatológicas;
- O tratamento com Eletroacupuntura 2Hz em ratos antes da intoxicação por APAP reduz os efeitos tóxicos e do estresse oxidativo no fígado, rim e no sangue do animal e, atenuou as alterações histopatológicas;
- O tratamento com Eletroacupuntura 2Hz em ratos depois da intoxicação por APAP reduziu os efeitos do estresse oxidativo no fígado, rim e no sangue do animal e, atenuou as alterações histopatológicas;
- O tratamento com Eletroacupuntura 100Hz em ratos antes da intoxicação por APAP reduziu os efeitos tóxicos no rim, do estresse oxidativo no fígado, rim e sangue do animal, mas causa aumento de nitrito no fígado e rim no animal e, atenuou as alterações histopatológicas;
- O tratamento com Eletroacupuntura 100Hz em ratos depois da intoxicação por APAP reduziu os efeitos do estresse oxidativo, mas causou aumento de nitrito no fígado, rim e no sangue do animal e, atenuou as alterações histopatológicas.

BIBLIOGRAFIA

ABDEL-ZAHER, A.O. *et al.* The potential protective role of alpha-lipoic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. **Toxicology**, v.243, n.3, p.261-70, Jan. 2008.

ABRANTES, D.C. *et al.* Diminished nitric oxide generation from neutrophils suppresses platelet activation in chronic renal failure. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 401, n. 1-2, p. 147-153, Mar. 2014.

AHMAD, S.T. *et al.* Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in Wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation. **Toxicol. Lett.**, v. 208, n. 2, p.149-61, Jan. 2012.

ANTUNES, L.M.; DARIN, J.D.; BIANCHI, M.D. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. **Pharmacol. Res.**, v. 41, n. 4, p. 405-11, Abr. 2000.

ARAÚJO JÚNIOR, R.J. *et al.* Preconditioning with L-alanyl-glutamine reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 26, Suppl. 1, p. 8-13, 2011

BARROS, M.A. *et al.* L-Alanyl-Glutamine Attenuates Oxidative Stress in Liver Transplantation Patients. **Transplant Proc.**, v. 47, n. 8, p. 2478-82, Out. 2015.

BASIGLIO, C.L. *et al.* Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. **Chem. Biol. Interact.**, v. 179, n. (2-3), p. 297-303, Mai. 2009.

BEKTUR, N.E. *et al.* Protective effects of silymarin against acetaminophen-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice. **Toxicol. Ind. Health.**, v. 32, n. 4), p. 89-600, Abr. 2016.

BELLOWS, C.F.; JAFFE, B.M. Glutamine is essential for nitric oxide synthesis by murine macrophages. **J. Surg. Res.**, v. 86, n. 2, p. 213-9, Out. 1999.

BERNAL, W. *et al.* Acute liver failure. **Lancet**, v. 376, n. 9736, p. 190-201, Jul. 2010.

BHUSHAN, B. *et al.* Pro-regenerative signaling after acetaminophen-induced acute liver injury in mice identified using a novel incremental dose model. **Am. J. Pathol.**, v. 184, n. 11, p. 3013-25, Nov. 2014.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, Set. 1982.

CAMPOS, R. *et al.* Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. **Planta Med.**, v. 55, n. 5, p. 417-419, Out. 1989.

CHEN, K.Z. *et al.* Effects of acupoint thread implantation and Chinese herb on PTH and TGF-beta1 in the rate of chronic renal failure. **Zhongguo Zhen Jiu.**, v. 26, n. 7, p. 511-4, Jul. 2006.

CHEN, X. *et al.* Effect of electro-acupuncture on hepatic Toll-like receptor 4 and nuclear factor κ B expressions in rats with non-alcoholic fatty liver disease. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.**, v. 34, n. 11, p. 1584-8, Nov. 2014.

CHEN, Q. *et al.* Treatment of acetaminophen-induced liver failure by blocking the death checkpoint protein TRAIL. **Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.**, Out. 2019.

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, n. 2, p. 143-9, Abr. 1992.

CHEN, Y.G. *et al.* Effect of acupuncture of "Taixi" (KI 3) on protein expression in the renal tissues of healthy rats. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 35, n. 3, p. 170-4, Jun. 2010.

CHTOUROU, Y. *et al.* Protective role of silymarin against manganese-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat. **Environ Toxicol.**, v. 29, n. 10, p. 1147-54, Out. 2014.

COSENTINO, F. *et al.* High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. **Circulation**, v. 96, n.1, p. 25-28, Jul. 1997.

CURI, R. *et al.* Molecular mechanisms of glutamine action. **J. Cell Physiol.**, v. 204, n. 2, p. 392-401, Ago. 2005.

DABAK, D.O.; KOCAMAN, N. Effects of silymarin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. **Renal Failure**, v. 37, n. 4, p. 734-739, Mai. 2015.

DAI, M. *et al.* Effect of Acupuncture on Serum SOD and MDA of Rats in Menopause. **J. Acupunct. Tuina. Sci.**, v. 6, n. 2, p. 79-82, Abr. 2008.

DAMBACH, D.M. *et al.* Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. **Hepatology**, v. 35, n. 5, p.1093-103, Mai. 2002.

DANCYGIER, H.; ROGART, J.N. Approach to the patient with abnormal liver enzymes. In: DANCYGIER, H. Clinical hepatology. *Verlag Berlin Heidelberg*: Springer, p. 533-547, 2010.

DAS, S. *et al.* Silymarin nanoparticle prevents paracetamol-induced hepatotoxicity. **Int. J. Nanomedicine**, v. 6, p. 1291-301, Jun. 2011.

DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M. Protective effects of silymarin, a milk thistle (*Silybium marianum*) derivative on ethanol-induced oxidative stress in liver. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 43, n. 5, p. 306-311, Out. 2006.

DÉCHELOTTE, P. *et al.* L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. **Crit. Care Med.**, v. 34, n. 3, p. 598-604, Mar. 2006.

DEHMLow, C.; ERHARD, J.; DE GROOT, H. Inhibition of kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin **Hepatology**, v. 23, n. 4, p. 749-54, Abr. 1996.

DEVARAJAN, P. *et al.* Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. **Mol. Genet. Metab.**, v. 80, n. 4, p. 365-376, Dez. 2003.

DRAPER, H.H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v.186, p. 421-431, 1990.

DU, K.; RAMACHANDRAN, A.; JAESCHKE, H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potencial. **Redox Biol.**, v.10, p. 148-156, Dez 2016.

EESHA, B.R. *et al.* Hepatoprotective activity of Terminalia paniculata against paracetamol induced hepatocellular damage in Wistar albino rats. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 4, n. 6, p. 466-9, Jun. 2011.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, n. 1, p. 70-7, Mai. 1959.

EL-SHAFFEY, M.M. *et al.* Quercetin protects against acetaminophen-induced hepatorenal toxicity by reducing reactive oxygen and nitrogen species. **Pathophysiology**, v. 22, n. 1, p. 49-55, Mar. 2015.

EL-SHITANY, N.A.; EL-HAGGAR, S.; EL-DESOKY, K. Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 7, p. 2422-2428, Jul. 2008.

EMMETT, M. Acute Renal Failure: A Companion to Brenner and Rector's The Kidney. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 39, n. 5, p. 1123, 2001.

ESPOSITO, E. *et al.* Glutamine contributes to ameliorate inflammation after renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 383, n. 5, p. 493-508, Mai. 2011.

FENG, W.Q.; ZENG, Z.H.; ZHUO, L.S. Influence of electroacupuncture on insulin-resistance in nonalcoholic fatty liver rats. **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 33, n. 2, p. 111-115, Abr. 2008.

FULLER, T.F. *et al.* Glutamine donor pretreatment in rat kidney transplants with severe preservation reperfusion injury. **J. Surg. Res.**, v. 140, n. 1, p. 77-83. 2007.

GALAL, R.M. *et al.* Potential protective effect of honey against paracetamol-induced hepatotoxicity. **Arch. Iran. Med.**, v. 15, n. 11, p. 674-80, Nov. 2012.

GARDNER, C.R. *et al.* Regulation of alternative macrophage activation in the liver following acetaminophen intoxication by stem cell-derived tyrosinekinase. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 262, n. 2, p. 139-48, Jul. 2012.

GARRETT-COX, R.G. *et al.* Glutamine decreases inflammation in infant rat endotoxemia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 44, n. 3, p. 523-9, Mar. 2009.

GE, J.J. *et al.* Effects of electroacupuncture of different frequencies on slimming effect in the rat of experimental obesity. **Zhongguo Zhen Jiu**, v. 27, n. 8, p. 598-600., Ago. 2007.

GHAZNAVI, H. *et al.* Comparison of the Protective Effects of Melatonin and Silymarin Against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.**, v. 21, n. 4, p. 49-55, Out. 2016.

GHOSH, S. *et al.* Silymarin protects mouse liver and kidney from thioacetamide induced toxicity by scavenging reactive oxygen species and activating PI3K-Akt pathway. **Front. Pharmacol.**, v. 7, p. 481, Dez. 2016.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ**, v. 172, n. 3, p. 367-379, Fev. 2005.

GONDIM, D.V. **Efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da eletroacupuntura na artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular de ratos: participação do sistema endocanabinóide**. 2012. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

GONG, Z.Y. *et al.* Glutamine with probiotics attenuates intestinal inflammation and oxidative stress in a rat burn injury model through altered iNOS gene aberrant methylation. **Am. J. Transl. Res.**, v. 9, n. 5, p. 2535-2547. Mai. 2017.

GOUVÊA JUNIOR, V.T. Effect of glutamine on the total antioxidant system of rats subjected to renal ischemia and reperfusion. **Acta Cir. Bras.**, v. 26, n. 6, p. 445-50, Dez. 2011.

GREEN, L.C. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, Out. 1982.

GU, G. *et al.* Effects of electroacupuncture pretreatment on inflammatory response and acute kidney injury in endotoxaemic rats. **J. Int. Med. Res.**, v. 39, n. 5, p. 1783-97, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. **Lancet**, v.1, n. 8391, p. 1396-7, Jun. 1984.

HARTMANN, R.M. *et al.* Protective effect of glutamine on the main and adjacent organs damaged by ischemia-reperfusion in rats. **Protoplasma**, v. 254, n. 6, p. 2155-2168, Nov. 2017.

HAU, D.K. *et al.* Novel use of silymarin as delayed therapy for acetaminophen-induced acute hepatic injury. **Forsch Komplementmed**, v. 17, n. 4, p. 209-13. Ago. 2010.

HAVASI, A.; BORKAN, S.C. Apoptosis and acute kidney injury. **Kidney Int.**, v. 80, n. 1, p. 29-40, Jul. 2011.

HE, Y. *et al.* Hepatic mitochondrial DNA/Toll-like receptor 9/MicroRNA-223 forms a negative feedback loop to limit neutrophil overactivation and acetaminophen hepatotoxicity in mice. **Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 220-234, Jul. 2017.

HILÁRIO, M.O.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **J. Pediatr.**, v. 82, Suppl 5, p. 206-12, Nov. 2006.

HIMMELFARB, J. Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 6, p. 636-643, Dez. 2009.

HOMSI, E.; DE BRITO, S.M.H.; JANINO, P. Silymarin exacerbates p53-mediated tubular apoptosis in glycerol-induced acute kidney injury in rats. **Ren. Fail.**, v. 32, n. 5, p. 623-32, Jun. 2010.

HONG, R.W. *et al.* Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. **Annals of Surgery**, v. 215, n. 2, p. 114-9, Fev. 1992.

HUANG, C.L. *et al.* Acupuncture stimulation of ST36 (Zusanli) attenuates acute renal but not hepatic injury in lipopolysaccharide-stimulated rats. **Anesth. Analg.**, v. 104, n. 3, p. 646-54, Mar. 2007.

ISHAK, K. *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. **Journal of Hepatology**, v. 22, n. 6, p. 696-699, Jun. 1995.

ISHIDA, K. *et al.* Effects of fructose-induced hypertriglyceridemia on hepatorenal toxicity of acetaminophen in rats. **Exp. Toxic. Pathol.**, v. 47, n. 6, p. 509-516., Dez. 1995.

ISMAIL, L.A. *et al.* Effect of Acupuncture on Body Weight Reduction and Inflammatory Mediators in Egyptian Obese Patients. **Open Access Maced. J. Med. Sci.** v. 3, n. 1, p. 85-90, Mar. 2015.

IWAKIRI, Y.; SHAH, V.; ROCKEY, D.C. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - Current status and future directions. *Journal of Hepatology*, v. 61, n. 4, p. 912-24, Out. 2014.

JAESCHKE, H. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 255, n. 3, p. 935-41, Dez. 1990.

JAESCHKE, H. *et al.* Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int.*, v. 32, n. 1, p. 8-20, Jan. 2012.

JAMES, L.P.; MAYEUX, P.R.; HINSON, J.A. Acetaminophen induced hepatotoxicity. *Drug. Metab. Dispos.*, v. 31, n. 12, p. 1499-506, Dez. 2003.

JEONG, D.H. *et al.* Alterations of mast cells and TGF-beta1 on the silymarin treatment for CCl(4)-induced hepatic fibrosis. *World J. Gastroenterol.*, v. 11, n. 8, p. 1141-1148, Fev. 2005.

JOSIELLI, C. **Efetividade da Eletroacupuntura versus Acupuntura manual em pacientes com dor lombar crônica não específica: um ensaio clínico randomizado.** 2016. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

KANDEMIR, F.M, *et al.* Chrysin Protects Rat Kidney from Paracetamol-Induced Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, and Autophagy: A Multi-Biomarker Approach. *Sci. Pharm.*, v. 85, n. 1, Jan. 2017.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 4, n. 6, p. 489- 499, Jun. 2005.

KENG, V.W. *et al.* A conditional transposon-based insertional mutagenesis screen for genes associated with mouse hepatocellular carcinoma. *Nat. Biotechnol.* v. 27, n. 3, p. 264-74, Mar. 2009.

KIM, H.W. *et al.* Low-frequency electroacupuncture suppresses carrageenan-induced paw inflammation in mice via sympathetic post-ganglionic neurons, while high-frequency EA suppression is mediated by the sympathoadrenal medullary axis. **Brain Res. Bull.**, v. 75, n. 5, p. 698-705, Mar. 2008.

KIM, Y.S. *et al.* Glutamine attenuates tubular cell apoptosis in acute kidney injury via inhibition of the c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of 14-3-3. **Crit. Care Med.**, v. 37, n. 6, p. 2033-44, Jun. 2009.

KIM, H.J. *et al.* Glutamine protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing cisplatin accumulation. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 127, n. 1, p. 117-26, Jan. 2015a.

KIM, D.S. *et al.* Anti-inflammatory effects of glutamine on LPS-stimulated human dental pulp cells correlate with activation of MKP-1 and attenuation of the MAPK and NF- κ B pathways. **Int. Endod. J.**, v. 48, n.3, p. 220-8, Mar. 2015b.

KISAUGLU, A. *et al.* Damage induced by paracetamol compared with N-acetylcystein. **J. Chin. Med. Assoc.**, v. 77, n. 9, p. 463-8, Set. 2014.

KISIC, B. *et al.* Role of Myeloperoxidase in Patients with Chronic Kidney Disease. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2016, Abr. 2016.

KONOPKA, C.L. **Modelo experimental em ratos para o estudo da isquemia renal crônica: análise das alterações funcionais, morfológicas e ultra-estruturais.** 1998. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Cardiovascular) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

KRENKEL, O.; MOSSANEN, J.C.; TACKE, F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. **Hepatobil. Surg. Nutr.**, v. 3, n. 6, 331-43. 2014

KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 48, n. 5, p. 439-446, Jul. 1996.

LARSEN, F.S.; WENDON, J. Understanding paracetamol induced liver failure. **Intensive Care Med.**, v. 40, n.6, p. 888-90, Jun. 2014.

LEE, Y. *et al.* Acupuncture stimulation at GB34 suppresses 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced oxidative stress in the striatum of mice. **J. Physiol. Sci.**, v. 68, n. 4, p. 455-462, Jul 2018.

LEUNG, S.B. *et al.* Attenuation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats by acupuncture was associated with reduction oxidative stress and improvement from endothelial dysfunction. **Chin. Med.**, v. 11, n. 1, p. 38, Ago. 2016.

LI, C.R. *et al.* Effects of Acupuncture at Taixi Acupoint (KI3) on Kidney Proteome. **Am. J. Chin. Med.**, v. 39, n. 4, p. 687-692, 2011.

LI, K. *et al.* Glutamine Reduces the Apoptosis of H9C2 Cells Treated with High-Glucose and Reperfusion through an Oxidation-Related Mechanism. **PLoS One**, v. 10, n. 7, Jul. 2015a.

LI, D. *et al.* Silymarin attenuates airway inflammation induced by cigarette smoke in mice. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 871-8. Abr. 2015b.

LIMA, L.P. *et al.* Electroacupuncture attenuates oxidative stress in random skin flaps in rats. **Aesthetic. Plast. Surg.**, v. 36, n. 5, p. 1230-5, Out. 2012.

LIN, J.G. *et al.* Multiple sources of endogenous opioid peptide involved in the hypoglycemic response to 15 Hz electroacupuncture at the Zhongwan acupoint in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 366, n. 1, p. 39-42, Ago. 2004.

LIN, Z. *et al.* Effects of glutamine on oxidative stress and nuclear factor- κ B expression in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver disease. **Exp. Ther. Med.**, v. 7, n. 2, p. 365-370, Fev. 2014.

LIU, H.J. *et al.* The effectiveness of Tsu-San-Li (St-36) and Tai-Chung (Li-3) acupoints for treatment of acute liver damage in rats. **Am. J. Chin. Med.**, v. 29, n. 2, p. 221-226, 2001.

LIU, H.W. *et al.* Electro-acupuncture at “Neiguan” (PC6) attenuates liver injury in endotoxaemic rats. **Acupunct. Med.**, v. 29, n. 4, p.284-8, Dez. 2011.

LOCHER, R. *et al.* Inhibitory action of silibinin on low density lipoprotein oxidation. **Arzneimittelforschung**, v. 48, n. 3, p. 236-239, Mar. 1998.

LUEDDE, T.; SCHWABE, R.F. NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. **Nat. Ver. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 8, n. 2, p. 108-18, Fev. 2011.

MAHESWARI, C.; MARYAMMAL, R.; VENKATANARAYANAN, R. Hepatoprotective activity of “Orthosiphon stamineus” on liver damage caused by paracetamol in rats. **Jordan J. Biol. Sci.**, v. 1, n. 3, p. 105-108, Mar. 2008.

MAJHI, C.R. *et al.* Effects of acetaminophen on reactive oxygen species and nitric oxide redox signaling in kidney of arsenic-exposed rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, n. 4, p. 974-82, Abr. 2011.

MANSOUR, A. *et al.* Effect of glutamine supplementation on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. **Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 119-26, Jan. 2015.

MARÍ, M. *et al.* Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF and Fas-mediated steatohepatitis. **Cell. Metab.**, v. 4, n. 3, p. 185-98, Set. 2006.

MARTIN-MURPHY, B.V.; HOLT, M.P.; JU, C. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. **Toxicol. Lett.**, v. 192, n. 3, p. 387-94, Fev. 2010.

MATHESON, P.J. *et al.* Glucose and glutamine gavage increase portal vein nitric oxide metabolite levels via adenosine A2b activation. **J. Surg. Res.**, v. 84, n. 1, p. 57-63, Jun.1999.

MEHENDALE, H.M. Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. **Toxicol. Pathol.**, v. 33, n. 1, p. 41-51, 2005.

METWALLY, M.A.A.; EL-GELLAL, A.M.; EL-SAWAISI, S.M. Effects of silymarin on lipid metabolism in rats. **WASJ**, v. 6, n. 12, p. 1634-1637, 2009.

MICHALOPOULOS, G.K. Liver regeneration. **J. Cell Physiol.**, v. 213, n. 12, p. 286-300. 2007.

MITCHELL, J.R. *et al.* Acetaminophen-induced hepatic necrosis: IV. Protective role of glutathione. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 187, n. 1, p. 211-217, Oct. 1973.

MITCHELL, J.R.; LAUTERBURG, B.H. Toxic doses of acetaminophen suppress hepatic glutathione synthesis in rats. **Hepatology**, v. 2, n. 1, p. 8-12, Jan-Feb. 1982.

MONTERO, J. *et al.* Cholesterol and peroxidized cardiolipin in mitochondrial membrane properties, permeabilization and cell death. **Biochim Biophys Acta**. v. 1797, n. (6-7), p. 1217-24, Jun-Jul. 2010.

MORA, L.O. *et al.* The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 47, n. 6, p. 517-22, Jun. 2003.

MORALES-GONZÁLEZ, J.A. *et al.* Protective effect of silymarin on liver damage by xenobiotics. In: Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants. *Rijeka: Croatia InTech*, 2013.

MORSY, M.A. *et al.* Curative effects of hydrogen sulfide against acetaminophen induced hepatotoxicity in mice. **Life Sci.**, v. 87, n. (23-26), p. 692-8, Dez. 2010.

MOUR, G. *et al.* Acute renal dysfunction in acetaminophen poisoning. **Renal Fail.**, v. 27, n. 4, p. 381-383. 2005.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Prog Lipid Res.**, v. 52, n. 1, p. 175-91, Jan. 2013.

NATHWANI, R.A. *et al.* Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. **Hepatology**, v. 41, n. 2, p. 380-382, Feb. 2005.

NAUTA, A.J. *et al.* Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. **Kidney Int.**, v. 67, n. 2, p. 543-53, Fev. 2005.

NAZIROGLU, M.; KARAOGU, A.; AKSOY, A.O. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. **Toxicology**, v. 195, n. (2-3), p. 221-30, Fev. 2004.

NENCINI, C.; GIORGI, G.; MICHELI, L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. **Phytomedicine**, v. 14, n. (2-3), p. 129-135, Fev. 2007.

NI, X.; WANG, H. Silymarin attenuated hepatic steatosis through regulation of lipid metabolism and oxidative stress in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Am. J. Transl. Res.**, v. 8, n. 2, p. 1073-1081, Fev. 2016.

OH, Y.I. *et al.* The effect of electroacupuncture on insulin-like growth factor-I and oxidative stress in an animal model of renal failure-induced hypertension. **Kidney Blood Press. Res.**, v. 35, n. 6, p. 634-43, Set. 2012.

ONAOLAPO, O.J. *et al.* L-Methionine and silymarin: A comparison of prophylactic protective capabilities in acetaminophen-induced injuries of the liver, kidney and cerebral cortex. **Biomed. Pharmacother.**, v. 85, p. 323-333, Jan. 2017.

ORLIĆ, L. *et al.* Chronic kidney disease and nonalcoholic fatty liver disease—is there a link? **Gastroent. Res. Pract.**, v. 2014, Mar. 2014.

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

PATERNO, JC. *et al.* Electroacupuncture and moxibustion decrease renal sympathetic nerve activity and retard progression of renal disease in rats. **Kidney Blood Press. Res.**, v. 35, n. 5, p. 355-64, Abr. 2012.

PATTERN, C.J. *et al.* Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 6, n. 4, p. 511-8, Jul.1993.

PATTISON, D.I.; DAVIES, M.J.; HAWKINS, CL. Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids. **Free Radic. Res.**, v. 46, n. 8, p. 975-95, Aug 2012.

PAUL, S. *et al.* Satkara (Citrus macroptera) Fruit Protects against Acetaminophen-Induced Hepatorenal Toxicity in Rats. **Evid. Based Complement Alternat. Med.**, v. 2016, p. 947-954, Fev. 2016.

PENG, Z.Y. *et al.* The anti-oxidant effects are not the main mechanism for glutamine's protective effects on acute kidney injury in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 705, n. (1-3), p. 11-19, Abr. 2013.

PORCEDDU, M. *et al.* In vitro assessment of mitochondrial toxicity to predict drug-induced liver injury. In: Chen, M., Will, Y. (Eds.), Drug-Induced Liver Toxicity. *Springer*. New-York, pp. 283-300, 2018.

PORTO, H.K.P. *et al.* Exposure to acetaminophen impairs vasodilation, increases oxidative stress and changes arterial morphology of rats. **Arch. Toxicol.**, v. 93, n. 7, p. 1955-1964, Jul. 2019.

PRAKASH, P. *et al.* Silymarin ameliorates fructose induced insulin resistance syndrome by reducing de novo hepatic lipogenesis in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 727, p. 15-28, Mar. 2014.

RANDLE, L.E. *et al.* Alpha(1)-adrenoceptor antagonists prevent paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, n. 4, p. 820-830, Fev. 2008.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 815-833, Mai. 2007.

RODRIGUEZ, J.A. *et al.* Jejunoileal bypass-induced liver dysfunction and bacterial translocation: effect of intraluminal glutamine-infusion. **Am. Surg.**, v. 61, n. 5, p. 397-402, Mai.1995.

ROGERS, P.A.; SCHOEN, A.M.; LIMEHOUSE, J. Acupuncture for immune-mediated disorders. Literature review and clinical applications. **Probl. Vet. Med.**, v. 4, n. 1, p. 162-93, Mar. 1992.

SABIU, S.; O'NEILL, F.H.; ASHAFI, A.O. Membrane stabilization and detoxification of acetaminophen-mediated oxidative onslaughts in the kidneys of Wistar rats by standardized fraction of *Zea mays* L. (Poaceae). **Evid. Based Complement Alternat. Med.**, v. 2016, Ago. 2016.

SALEMM, M.; IFTIKHAR, H. A rare case of acetaminophen toxicity leading to severe kidney injury. **Cureus.**, v. 11, n. 6, Jun. 2019.

SALOMÃO, A.B.A. *et al.* Intestinal intraluminal injection of glutamine increases total equivalent antioxidant capacity (TEAC) in hepatic ischemia-reperfusion. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, Suppl. 4, p. 69-73, 2006.

SAMPEY, B.P. *et al.* Immunohistochemical characterization of hepatic malondialdehyde and 4-hydroxynonenal modified proteins during early stages of ethanol-induced liver injury. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 27, n. 6, p.1015-22, Jun. 2003.

SANTOS, E.L.W. *et al.* 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, Ago. 2013.

SCHNELLMANN, R.G. Toxic response of the kidney. In: Klaassen, C.D., Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6. ed. *McGraw-Hill*: New York, 2001, p. 491-514.

SCHOEN, A.M. Introduction to veterinary acupuncture: scientific basis and clinical applications. In: Proceedings of the Annual Convention Of The American Association Of Equine Practicioners. *San Diego*: AAEP, 1993. p.39.

SENER, G.; SEHIRLI, A.O.; AYANOĞLU-DÜLGER, G. Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. **J Pineal Res.**, v. 35, n. 1, p. 61-8, Ago. 2003.

SHAKER, E.; MAHMOUD, H.; MNAA, S. Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, n. 3, p. 803-806, Mar. 2010.

SHANMUGASUNDARAM, P.; VENKATARAMAN, S. Hepatoprotective and antioxidant effects of Hygrophila auriculata (K. Schum) Heine Acanthaceae root extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 104, n. (1-2), p. 124-8, 2006.

SHI, X. *et al.* Study on protective action of electroacupuncture on endotoxin-induced hepatic injury in rats. **Zhongguo Zhen Jiu.**, v. 28, n. 4, p. 290-2, Abr. 2008.

SIDHU, S.S. *et al.* New paradigms in management of alcoholic hepatitis: a review. **Hepatol. Int.**, v. 11, n. 3, p. 255-267, Mai. 2017.

SILVA, A.H. *et al.* Electroacupuncture attenuates liver and kidney oxidative stress in anesthetized rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 26, Suppl 1, p. 60-65, 2011.

SILVA, J.B.D. *et al.* New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of Vernonia condensata Baker. **J. Ethnopharmacol.**, v. 23, n. 198, p. 399-406, Fev. 2017.

SIU, F.K.; LO, S.C.; LEUNG, M.C. Effectiveness of multiple pre-ischemia electroacupuncture on attenuating lipid peroxidation induced by cerebral ischemia in adult rats. **Life Sci.**, v. 75, n. 11, p. 1323-32, Jul. 2004.

SONG, X.J. *et al.* Investigation of hepatic blood perfusion by laser speckle imaging and changes of hepatic vasoactive substances in mice after electroacupuncture. **Evid. Based Complement Alternat. Med.**, v. 2014, 2014a.

SONG, Y. *et al.* Effect of acupuncture at different time points on kidney function and oxygen free radical metabolism in rats with simulated weightlessness. **Zhongguo Zhen Jiu.**, v. 34, n. 11, p. 1106-10, Nov. 2014b.

SÖZEN, S. *et al.* The effects of glutamine on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. **Hippokratia.**, v. 15, n. 2, p. 161-6, Abr. 2011.

SPICER, S. S. Histochemistry in pathologic diagnosis. *New York: Dekker*, 1987.

SUCIU, M. *et al.* Acetaminophen-induced liver injury: Implications for temporal homeostasis of lipid metabolism and eicosanoid signaling pathway. **Chem Biol Interact**, v. 242, p. 335-344, Dez. 2015.

SUGAI, G.C. *et al.* Serotonin involvement in the electroacupuncture- and moxibustion-induced gastric emptying in rats. **Physiol. Behav.**, v. 82, n. 5, p. 855-861, Out. 2004.

SUPAVEKIN, S. *et al.* Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. **Kidney Int.**, v. 63, n. 5, p. 1714-1724, Mai. 2003.

SZIJÁRTÓ, A. *et al.* Short-term alanyl- glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia-reperfusion model: effects on microcirculation and antioxidant status in rats. **Clin. Nutr.**, v. 26, p. 5, p. 640-8, Out. 2007.

TAN, J. *et al.* Protective role of silymarin in a mouse model of renal Ischemia-Reperfusion injury. **Diagn. Pathol.**, v. 10, n. 198, Out. 2015.

TANAHASHI, N. *et al.* Effects of Manual Acupuncture at GB34 on Carbon tetrachloride-induced Acute Liver Injury in Rats. **J. Acupunct. Meridian. Stud.**, v. 4, n. 4, p. 214-219, Dec. 2011.

TRUMPER, L. *et al.* Tubular effects of acetaminophen in the isolated perfused rat kidney. **Arch. Toxicol.**, v. 69, n. 4, p. 248-252, 1995.

TSAI, M.S. *et al.* Myeloperoxidase in chronic kidney disease: Role of visceral fat. **Nephrology**, v. 19, n. 3, p. 136-142, Mar. 2014.

TSAI, M.S. *et al.* Galangin Prevents Acute Hepatorenal Toxicity in Novel Propacetamol-Induced Acetaminophen-Overdosed Mice. **J. Med. Food.**, v. 18, n. 11, p. 1187-97, Nov. 2015.

TURGUT, F. *et al.* Antioxidant and protective effects of silymarin on ischemia and reperfusion injury in the kidney tissues of rats. **Int. Urol. Nephrol.**, v. 40, n. 2, p. 453-60, 2008.

TÜRKEZ, H.; GEYIKOGLU, F.; YOUSEF, M.I. Modulatory effect of L-glutamine on 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced liver injury in rats. **Toxicol. Ind. Health.**, v. 28, n. 7, p. 663-72, Ago. 2012.

Uysal, H.B. *et al.* Biochemical and Histological Effects of Thiamine Pyrophosphate against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 118, n. 1, p. 70-6, Jan. 2016.

WANG H. *et al.* The antioxidative effect of electro-acupuncture in a mouse model of Parkinson's disease. **PLoS ONE.**, v. 6, n. 5, 2011.

WANG, L *et al.* Influence of electroacupuncture stimulation on serum and hepatic interleukin-18 expression in nonalcoholic fatty liver rats. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 38, n. 3, p. 208-13, Jun. 2013.

WANG, M. *et al.* Randomized Controlled Clinical Trial for Analyzing Effect of "Spleen-Stomach Regulation Needling" on Oxidative Stress Level in Patients with Diabetic Nephropathy. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 40, n. 5, p. 409-14, Out. 2015a.

WANG, S.Y. *et al.* Effects of Electroacupuncture Stimulation at "Zusanli" Acupoint on Hepatic NO Release and Blood Perfusion in Mice. **Vid Based Complement Alternat Med.**, v. 2015, 2015b.

WANG, A.L. *et al.* Glutamine ameliorates intestinal ischemia-reperfusion Injury in rats by activating the Nrf2/ARE signaling pathway. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 7, p. 7896-904, Jul. 2015c.

WANG, L. *et al.* Protective effects of silymarin on triptolide-induced acute hepatotoxicity in rats. **Mol. Med. Rep.**, v. 17, n. 1, p. 789-800, Jan. 2018.

WEGENER, T.; FINTELMANN, V. Flavonoids and bioactivity. **Wein Med Wochem Sahr.**, v. 149, p. 241-247, 1999.

XIA, H.; GUAN, L.; YANG, Y. Effect of zusanli (ST 36) moxibustion on rat mesenteric microvascular system. **J. Tradit. Chin. Med.**, v. 34, n. 4, p. 491-497, Ago. 2014.

XU, F. *et al.* Preconditioning with glutamine protects against ischemia/reperfusion-induced hepatic injury in rats with obstructive jaundice. **Pharmacology**, v. 93, n. (3-4), p. 155-65, 2014

XU, N. Effect of electroacupuncture at 'taixi point on plasma thromboxane A2 and prostacyclin in the rabbit with renal ischemia. **Zhen Ci Yan**, v. 18, n. 3, p. 240-242, 1993.

YATZIDIS, H. Oral supplement of six selective amino acids arrest progression renal failure in uremic patients. **Int. Urol. Nephrol.**, v. 36, n. 4, p. 591-8, 2004.

YEOM, M. *et al.* Electroacupuncture ameliorates poloxamer 407-induced hyperlipidemia through suppressing hepatic SREBP-2 expression in rats. **Life Sci.**, v. 203, p. 20-26, Abr. 2018.

YIM, Y.K. *et al.* Hepatoprotective effect of manual acupuncture at acupoint GB34 against CCl4-induced chronic liver damage in rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 14, p. 2245-2249, Abr. 2006.

YIN, C.S. *et al.* A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Res.Vet. Sci.**, v. 84, n. 2, p. 159-65, Abr. 2008.

YU, Y.P. *et al.* Acupuncture inhibits oxidative stress and rotational behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rat. **Brain Res.**, v. 1336, p. 58-65, Jun. 2010.

YU, G.J., *et al.* Efficacy on analgesia with electric stimulation of long-term retaining needle after laparoscopic cholecystectomy. **Zhongguo Zhen Jiu.**, v. 34, n. 2, p. 169-172, Fev. 2014.

YU, J.B. *et al.* Electroacupuncture Ameliorates Acute Renal Injury in Lipopolysaccharide-Stimulated Rabbits via Induction of HO-1 through the PI3K/Akt/Nrf2 Pathways. **PLoS One**, v. 10, n. 11, Nov. 2015.

YU, J.S. *et al.* Acupuncture on Renal Function in Patients with Chronic Kidney Disease: A Single-Blinded, Randomized, Preliminary Controlled Study. **J Altern Complement Med.**, v. 23, n. 8, p. 624-631, Ago. 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Glutamine-induced heat shock protein protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. **Nephrology**, v. 14, n. 6, p. 573-80, Set. 2009.

ZHANG, C.N. *et al.* Effect of electroacupuncture intervention on renal function and expression of renal beta-catenin in rats with chronic renal failure. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 39, n. 5, p. 396-400, Out. 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Effects of Electroacupuncture Combined with Dietary Control on Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α , and Liver Fatty Acid-binding Protein Levels in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Rats. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 40, n. 5, p. 345-51, Out. 2015.

ZHAO Y.L. *et al.* Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, n. 8, p. 1705-10, Ago. 2011.

ZHENG, Y.H. *et al.* Effect of low-frequency electroacupuncture intervention on oxidative stress and glucose metabolism in rats with polycystic ovary syndrome. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 40, n. 2, p. 125-130, Abr. 2015.

ZHOU, J.; CHEN, Y. Effect of electroacupuncture preconditioning on nitric oxide, nitric oxide synthase and oxyradical during hepatic ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Zhen Ci Yan Jiu.**, v. 31, n. 2, p. 149-52, Fev. 2011.

ZHU, L.L. *et al.* Impact of electro-acupuncture on lipid metabolism in rats with non-alcoholic fatty liver disease. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.**, v. 43, n. 6, p. 847-50, Nov. 2012.

ZIGMOND, E. *et al.* Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. **J. Immunol.**, v. 193, n. 1, p. 344-53, Jul. 2014.

ZIJLSTRA, F.J. *et al.* Antiinflammatory actions of acupuncture. **Mediators Inflamm.**, v. 12, n. 2, p. 59-69, Abr. 2003.

ZIMMERMANN, H.W.; TRAUTWEIN, C.; TACKE, F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. **Front. Physiol.**, v. 3, n. 56, Out. 2012.

VARGAS-MENDOZA, N. *et al.* Hepatoprotective effect of silymarin. **World J. Hepatol.**, v. 6, n. 3, p. 144-149, Mar. 2014.

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



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


DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 44/2012, sobre o projeto intitulado: **“PRÉ-CONDICIONAMENTO COM GLUTAMINA, SILIMARINA, ACUPUNTURA E ELETROACUPUNTURA NA LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR PARACETAMOL EM RATOS.”**, de responsabilidade de Sergio Botelho Guimarães e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 28 de novembro de 2012.

Fortaleza, 29 de novembro de 2012


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

20/11/2012


APÊNDICE B

Coloração por Hematoxilina-Eosina

Preparação de Hematoxilina

Reagentes:

Hematoxilina	1 g
Álcool a 99,9% (100%).....	10 mL
Alúmen de potássio ou amoniacal.....	20 g
Água destilada	200 mL
Óxido de mercúrio	0,5 g
Ácido acético glacial.....	10 mL

Preparo da solução:

Dissolver a hematoxilina no álcool.

Dissolver o alúmen na água quente.

Misturar as duas soluções cuidadosamente e voltar a aquecer a mistura o mais rápido possível.

Quando em ebulição, retirar do calor e adicionar o óxido de mercúrio.

Levar de novo a solução ao calor até que o ponto de ebulição seja de novo alcançado e aguardar que adquira cor roxo escuro (2 a 3 minutos).

Arrefecer rapidamente em água corrente.

Filtrar depois de fria e adicionar o ácido acético glacial.

Armazenar em frasco escuro bem fechado.

Filtrar sempre antes de usar.

Preparação de Eosina

Reagentes:

Eosina a 1% (Solução Stock)

Eosina Y	1 g
----------------	-----

Água destilada	20 mL
Álcool etílico a 96%	80 mL

Eosina (Solução de trabalho)

Eosina a 1%	100 mL
Álcool etílico a 96%	400 mL
Ácido acético glacial	0.5 mL

Preparo da solução:

Na preparação da solução de trabalho, filtrar após adicionar a eosina ao álcool.

Adicionar o ácido acético glacial.

O ácido acético permite ajustar o pH da solução para valores próximos de 5.

APÊNDICE C

Tabela C1 - Efeito de APAP nos Níveis de AST (U/L).

ANÁLISE 1		
Grupo A	Grupo B	Grupo C
768,000	38,000	91,000
680,000	30,000	80,000
720,000	29,000	83,000
530,000	18,000	90,000
630,000	32,000	63,000
780,000	25,000	55,000
480,000	15,000	42,000
590,000	20,000	60,000
640,7 ± 36,26	25,88 ± 2,76	70,50 ± 6,36

ANÁLISE 2		
Grupo A	Grupo B	Grupo C
768,000	MORTE	MORTE
680,000	81,000	7,000
720,000	82,000	9,000
530,000	119,000	MORTE
630,000	MORTE	MORTE
780,000	MORTE	MORTE
480,000	MORTE	MORTE
590,000	96,000	MORTE
640,7 ± 36,26	94,50 ± 8,85	8,00 ± 1,00

Grupos: A - Controle Negativo, B - Controle Positivo (pré-condicionamento), C - Controle Positivo (pós-condicionamento). Resultados apresentam a média ± E.P.M. (n = 8). Fonte: elaborada pela autora (2019).

Tabela C2 - Efeito de APAP nos Níveis de ALT (U/L).

ANÁLISE 1		
Grupo A	Grupo B	Grupo C
279,000	34,000	37,000
270,000	21,000	27,000
320,000	27,000	21,000
190,000	15,000	30,000
280,000	22,000	33,000
390,000	19,000	47,000
273,000	12,000	29,000
300,000	15,000	50,000
287,8 ± 19,76	20,63 ± 2,54	34,25 ± 3,51
ANÁLISE 2		
Grupo A	Grupo B	Grupo C
279,000	MORTE	MORTE
270,000	32,000	3,000
320,000	66,000	2,000
190,000	73,000	MORTE
280,000	MORTE	MORTE
390,000	MORTE	MORTE
273,000	MORTE	MORTE
300,000	15,000	50,000
287,8 ± 19,76	68,75 ± 14,77	2,50 ± 0,50

Grupos: A - Controle Negativo, B - Controle Positivo (pré-condicionamento), C - Controle Positivo (pós-condicionamento). Resultados apresentam a média ± E.P.M. (n = 8). Fonte: elaborada pela autora (2019).

Tabela C3 - Efeito de APAP nos Níveis de Uréia (mg/dL).

ANÁLISE 1		
Grupo A	Grupo B	Grupo C
49	48	47
39	50	52
45	35	41
45	43	40
45	38	38
47	40	47
42	35	51
40	55	50
44,00 ± 1,21	43,00 ± 2,60	45,75 ± 1,90
ANÁLISE 2		
Grupo A	Grupo B	Grupo C
49	MORTE	MORTE
39	55	56
45	54	58
45	62	MORTE
45	MORTE	MORTE
47	MORTE	MORTE
42	MORTE	MORTE
40	46	MORTE
44,00 ± 1,21	54,25 ± 3,27	57,00 ± 1,00

Grupos: A - Controle Negativo, B - Controle Positivo (pré-condicionamento), C - Controle Positivo (pós-condicionamento). Resultados apresentam a média ± E.P.M. (n = 8). Fonte: elaborada pela autora (2019).

Tabela C4 - Efeito de APAP nos Níveis de Creatinina (mg/dL).

ANÁLISE 1		
Grupo A	Grupo B	Grupo C
0,430	0,310	0,360
0,440	0,330	0,300
0,300	0,290	0,290
0,380	0,280	0,280
0,290	0,310	0,220
0,200	0,300	0,300
0,300	0,320	0,320
0,310	0,200	0,350
0,33 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01
ANÁLISE 2		
Grupo A	Grupo B	Grupo C
0,430	MORTE	MORTE
0,440	0,370	0,500
0,300	0,340	0,620
0,380	0,300	MORTE
0,290	MORTE	MORTE
0,200	MORTE	MORTE
0,300	MORTE	MORTE
0,310	0,340	MORTE
0,33 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,56 ± 0,06

Grupos: A - Controle Negativo, B - Controle Positivo (pré-condicionamento), C - Controle Positivo (pós-condicionamento). Resultados apresentam a média ± E.P.M. (n = 8). Fonte: elaborada pela autora (2019).