



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

ISAAC BEVILAQUA DE ALBUQUERQUE GUIMARÃES

**PÓS-CONDICIONAMENTO COM CURCUMA E ELETROACUPUNTURA: EFEITOS
SISTÊMICOS E LOCAIS SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDOS POR GENTAMICINA NO FÍGADO EM RATOS WISTAR**

FORTALEZA

2022

ISAAC BEVILAQUA DE ALBUQUERQUE GUIMARÃES

PÓS-CONDICIONAMENTO COM CURCUMA E ELETROACUPUNTURA: EFEITOS SISTÊMICOS E LOCAIS SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR GENTAMICINA NO FÍGADO EM RATOS WISTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

G978p Guimarães, Isaac Bevilaqua de Albuquerque.
Pós-condicionamento com cúrcuma e eletroacupuntura: efeitos sistêmicos e locais sobre a inflamação e o estresse oxidativo induzidos por gentamicina no fígado em ratos Wistar / Isaac Bevilaqua de Albuquerque Guimarães. – 2022.
80 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos .

Coorientação: Prof. Dr. Sergio Botelho Guimarães.

1. Gentamicinas. 2. Estresse Oxidativo. 3. Lesão hepática induzida por droga. 4. Curcuma . 5. Eletroacupuntura. I. Título.

ISAAC BEVILAQUA DE ALBUQUERQUE GUIMARÃES

PÓS-CONDICIONAMENTO COM CURCUMA E ELETROACUPUNTURA: EFEITOS SISTÊMICOS E LOCAIS SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR GENTAMICINA NO FÍGADO EM RATOS WISTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães

Aprovada em: 01/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

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

Prof. Dr. Orleancio Gomes Ripardo de Azevedo
Faculdade de Medicina IDOMED de Canindé

Prof. Dra. Meyssa Quezado de Figueiredo Cavalcante Casadevall
IVEPESP/ USP – Ribeirão Preto

A Deus, toda honra e toda glória

Aos meus pais, Sergio e Tereza Cristina

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, PROF. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, pelo estímulo e confiança na realização deste trabalho de pesquisa mesmo diante de barreiras praticamente intransponíveis, como a pandemia do Covid-19 que comprometeu sua saúde.

Ao meu co-orientador, PROF. DR. SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES, pelo incentivo, ensinamentos, acolhimento, confiança e paciência, tornando possível a realização deste projeto .

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

Às Sras. MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVIERA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE secretárias do Programa de Pós-graduação *strictu sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da U.F.C. por seu inestimável apoio no cumprimento das normas administrativas do Programa.

À jovem KARINA GATTI DE ABREU, estudante de Veterinária e estagiária do Biotério Setorial da Faculdade de Medicina, por sua participação efetiva no cuidado dos animais usados no estudo e na fase de pós-condicionamento (administração das gavagens).

Ao DR. WESLEY LYEVERTON CORREIA RIBEIRO, veterinário coordenador do Biotério Setorial da Faculdade de Medicina, por sua acolhida e suporte material para a efetiva realização dos experimentos.

Ao SR. FRANCISCO EVANIR GONÇALVES DE LIMA, técnico da Unidade de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pela disponibilidade e contribuição na coleta e análise laboratorial das amostras.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação *strictu sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da U.F.C. pela sua dedicação e amor à ciência.

Aos professores ORLEANCIO GOMES RIPARDO DE AZEVEDO, MEYSSA QUEZADO DE FIGUEIREDO CAVALCANTE CASADEVALL E FRANCISCO DAS CHAGAS MEDEIROS, integrantes da banca de qualificação pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Ceará (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O fígado atua no controle e prevenção dos efeitos tóxicos dos antibióticos administrados para tratamento de infecções. A gentamicina (GM) pode promover o aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio, resultando em estresse oxidativo. A cúrcuma apresenta atividade antioxidante e anti-inflamatória. A aplicação da EAc em determinados pontos do organismo pode reduzir o estresse oxidativo e a inflamação do fígado. Para avaliação da atividade antioxidante e anti-inflamatória da cúrcuma (CCM) e da EAc 56 ratos machos, com peso médio inicial de 126,8 g foram aleatoriamente distribuídos em sete grupos de oito animais: G1–Controle Salino, G2- Controle diluente, G3-CCM 100mg, G4-CCM 200mg, G5-EAc100 (Eletoacupuntura 100 Hz), G6 – CCM 100mg+EAc 100Hz e G7-CCM 200mg+EAC. Para a indução da hepatotoxicidade todos os animais receberam GM (100mg/Kg ip.) durante 5 dias consecutivos. A partir do 7º dia os ratos foram tratados com CCM e EAc. A CCM foi administrada por gavagem, em dias alternados durante 12 dias. A EAc foi administrada em dias alternados, durante 12 dias. As sessões duraram 20 minutos. Os ratos dos G1 e G2 receberam salina (1,0ml) ou diluente. Amostras de sangue arterial e o fígado foram coletados 48 horas após o término do experimento, sob anestesia com ketamina+xilazina via i.p. Parâmetros analisados incluíram a) Indicadores de lesão hepática: aspartato amino transferase (AST) alanina amino transferase (ALT), gamaglutamil transferase (GGT), glicemia; b) indicadores de estresse oxidativo e peroxidação lipídica: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutathiona reduzida (GSH) e nitritos (NO₂); c) indicador de inflamação: mieloperoxidase (MPO). A lesão hepática oxidativa foi confirmada pelo aumento da razão AST:ALT e do nitrito. Houve aumento significativo dos níveis de GSH, redução dos níveis de TBARS e da atividade da MPO. Conclui-se que a GM administrada em altas doses (100mg/Kg) promove alterações oxidativas e inflamatórias no fígado de ratos saudáveis e que a cúrcuma e a EAc exercem um efeito protetor sobre o estresse oxidativo e a inflamação no fígado e no plasma de ratos tratados com altas doses de GM.

Descritores: Gentamicinas; Estresse Oxidativo; Lesão Hepática Induzida por Droga; Curcuma; Electroacupuntura.

SUMMARY

The liver acts to control and prevent the toxic effects of antibiotics administered to treat infections. Gentamicin (GM) can promote increased concentrations of reactive oxygen species, resulting in oxidative stress. Turmeric has antioxidant and anti-inflammatory activity. The application of EAc to certain points in the body can reduce oxidative stress and inflammation in the liver. To evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activity of turmeric (CCM) and EAc, 56 male rats, with a mean initial weight of 126.8 g, were randomly assigned to seven groups of eight animals. G1- Saline Control, G2- Diluent Control, G3-CCM 100mg, G4-CCM 200mg, G5-EAc100 (Electroacupuncture 100 Hz), G6 – CCM 100mg+EAc 100Hz and G7-CCM 200mg+EAC. For the induction of hepatotoxicity, all animals received GM (100mg/Kg ip.) for 5 consecutive days. From the 7th day, the rats were treated with CCM and EAc. CCM was administered by gavage, every other day for 12 days. EAc was administered every other day for 12 days. The sessions lasted 20 minutes. Rats from G1 and G2 received saline (1.0ml) or diluent. Arterial blood and liver samples were collected 48 hours after the end of the experiment, under anesthesia with ketamine+xylazine via i.p. Parameters analyzed included a) Indicators of liver damage: aspartate amino transferase (AST), alanine amino transferase (ALT), gammaglutamyl transferase (GGT), blood glucose; b) indicators of oxidative stress and lipid peroxidation: substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), reduced glutathione (GSH) and nitrites (NO₂); c) indicator of inflammation: myeloperoxidase (MPO). Oxidative liver injury was confirmed by increased AST:ALT ratio and nitrite concentrations. There was a significant increase in GSH levels, reduction in TBARS levels and MPO activity. It is concluded that GM administered at high doses (100mg/Kg) promotes oxidative and inflammatory changes in the liver of healthy rats and that turmeric and EAc exert a protective effect on oxidative stress and inflammation in the liver and plasma of rats treated with high doses of GM.

Descriptors: Gentamicins; Oxidative Stress; Chemical and Drug Induce Liver Injury; Curcuma; Electroacupuncture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fórmula molecular da curcumina	28
Figura 2	Cúrcuma longa – folhas, rizoma, pó.....	28
Figura 3	Aplicação da EAc no rato (dispositivo de contenção).....	29
Figura 4	Eletro-estimulador EL-608.....	30
Figura 5	Pulso não polarizado.....	31
Figura 6	Localização dos acupontos utilizados no rato	32
Figura 7	Distribuição dos grupos.....	33
Figura 8	Fluxograma de execução do experimento	35
Figura 9	Analisador automático Labmax Plenno	36
Gráfico 1	Peso inicial / final dos ratos	43
Gráfico 2	Variação de peso do lobo esquerdo do fígado no 19º dia	44
Gráfico 3	Concentrações plasmáticas de ALT	45
Gráfico 4	Concentrações plasmáticas de AST	46
Gráfico 5	Concentrações plasmáticas de GGT	48
Gráfico 6	Concentrações plasmáticas de Glicose	49
Gráfico 7	Concentrações de NO ₂ no tecido hepático.....	50
Gráfico 8	Concentrações de GSH no tecido hepático	51
Gráfico 9	Concentrações plasmáticas de GSH	52
Gráfico 10	Concentrações plasmáticas de TBARS	53
Gráfico 11	Concentrações de TBARS no tecido hepático.....	54
Gráfico 12	Atividade da MPO no tecido hepático	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso médio dos ratos.....	43
Tabela 2	Peso do lobo esquerdo do fígado.....	44
Tabela 3	Concentrações plasmáticas de ALT.....	45
Tabela 4	Concentrações plasmáticas de AST.....	46
Tabela 5	Razão AST:ALT.....	47
Tabela 6	Concentrações plasmáticas de GGT.....	47
Tabela 7	Concentrações plasmáticas de Glicose.....	48
Tabela 8	Concentrações de NO ₂ no tecido hepático.....	49
Tabela 9	Concentrações de GSH no tecido hepático.....	50
Tabela 10	Concentrações plasmáticas de GSH.....	51
Tabela 11	Concentrações plasmáticas de TBARS.....	52
Tabela 12	Concentrações de TBARS no tecido hepático.....	53
Tabela 13	Atividade da MPO no tecido hepático.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Aminoglicosídeo
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CCM	Cúrcuma
CEUA	Comissão de ética no uso de animais (UFC)
CMC_Na	Carboximetilcelulose
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
E-36	Acuponto Estômago 36
EAc	Eletroacupuntura
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ER	Espécies reativas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Gama-GT	γ -glutamil transferase
GM	Gentamicina
GPx	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
iNOS	NOS induzida
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malonaldeído
MPO	Mieloperoxidase
MTC	Medicina tradicional chinesa
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
NADP	Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo fosfato
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada (ANVISA)
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral
VB-34	Acuponto Vesícula Biliar 34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Estresse oxidativo	16
1.2 O aminoglicosídeo gentamicina	19
1.3 A cúrcuma	20
1.4 A Eletroacupuntura.....	21
1.5 Justificativa e Relevância	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MÉTODO	26
3.1 Aspectos éticos	26
3.2 Tipo de estudo.....	26
3.3 A amostra	26
3.4 Tratamentos	27
3.4.1 Cúrcuma.....	27
3.4.2 Eletroacupuntura	29
3.4.2.1 <i>Equipamento usado na eletro-estimulação</i>	29
3.4.2.2 <i>Técnica de aplicação da eletroacupuntura</i>	31
3.5 Desenho do experimento	33
3.6 Cronograma de execução do experimento.....	34
3.7 Indução da lesão hepática.....	35
3.8 Coleta de amostras para análise.....	35
3.9 Análises bioquímicas	36
3.9.1 Determinação das concentrações plasmáticas de AST e ALT.....	36
3.9.2 Determinação das concentrações plasmáticas de Gama-GT	37
3.9.3 Determinação das concentrações plasmáticas de glicose	37
3.9.4 Determinação das concentrações de nitritos no tecido hepático.....	38
3.9.5 Determinação das concentrações de GSH no plasma e no fígado	39
3.9.6 Determinação das concentrações de TBARS no plasma e no fígado.	40
3.9.7 Determinação da atividade da MPO no tecido hepático.....	41
3.10 Análise estatística	42

4 RESULTADOS	43
4.1 Peso dos ratos	43
4.2 Peso do lobo esquerdo do fígado.....	44
4.3 Efeito do tratamento nas concentrações de ALT no plasma	45
4.4 Efeito do tratamento nas concentrações de AST no plasma.....	46
4.5 Efeito do tratamento na razão AST:ALT.....	47
4.6 Efeito do tratamento nas concentrações de GGT no plasma.....	47
4.7 Efeito do tratamento nas concentrações de glicose no plasma.....	48
4.8 Efeito do tratamento nas concentrações de NO ₂ no fígado.....	49
4.9 Efeito do tratamento nas concentrações de GSH no fígado.....	50
4.10 Efeito do tratamento nas concentrações de GSH no plasma.....	51
4.11 Efeito do tratamento nas concentrações de TBARS no plasma.....	52
4.12 Efeito do tratamento nas concentrações de TBARS no fígado	53
4.13 Efeito do tratamento nas concentrações de MPO no fígado	54
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	64
REFERENCIAS	65
APÊNDICES	74
APÊNDICE A – Peso inicial / peso final dos ratos.....	74
APÊNDICE B – Peso do lobo esquerdo do fígado	75
APÊNDICE C - Curva para cálculo da concentração de GSH no plasma.	76
APÊNDICE D - Curva para cálculo da concentração de GSH no tecido hepático	77
APÊNDICE E - Curva para cálculo da atividade da MPO no tecido hepático	78
ANEXOS	79
ANEXO A – Certificado de aprovação (Comité de ética)	79
ANEXO B – Composição da ração dos ratos	80

1. INTRODUÇÃO

O papel do fígado no controle e prevenção dos efeitos tóxicos dos antibióticos é fundamental e decorre de sua posição privilegiada entre o local de absorção e a eliminação de toxinas (RUSSMAN; KULLAK-UBLICK; GRATAGLIANO, 2009)

A toxicidade mitocondrial é desencadeada por fármacos que podem atuar em diferentes fases do metabolismo, inibindo a cadeia respiratória mitocondrial, reduzindo a fosforilação oxidativa, causando a depleção de ATP intracelular e aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio que, posteriormente, podem causar a morte celular (SHANNAN; FONTANA; 2011; LOZANO-LANAGRAM *et al.*, 2011).

A hepatotoxicidade produzida por fármacos pode ser classificada em intrínseca (alérgica ou não alérgica) ou idiopática. A primeira é dose-dependente e a idiopática ocorre de modo imprevisível, sem dependência de dose. Há uma segunda classificação baseada na relação entre as enzimas alanina-transferase (ALT) e a fosfatase alcalina (FA), que classifica a lesão hepática em citolítica ou hepatocelular (ALT:FA >5), colestática (ALT:FA <2) e mista (ALT:FA 2-5) (RUSSMAN; KULLAK-UBLICK; GRATAGLIANO, 2009; LOZANO-LANAGRAM *et al.*, 2011).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular, resultando na formação de radicais livres, no decorrer dos processos fisiológicos ou por disfunção biológica. A característica básica dos radicais livres é a presença de um elétron desemparelhado nos átomos de oxigênio e de nitrogênio, constituindo as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), respectivamente. Fundamentais para a vida, os radicais livres estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade e defesa celular e síntese de substâncias biológicas (BARREIROS; DAVID; DAVID; 2006; OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

1.1 O estresse oxidativo

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos. Os radicais livres podem agir como aceptores ou doadores de elétrons, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor. Os compostos não radicalares não possuem elétrons livres, sendo

consequentemente menos instáveis que os radicais livres, embora também possam reagir com moléculas próximas (MAGDER, 2006; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

As espécies reativas são átomos, moléculas, ou íons derivados do oxigênio, que em sua grande maioria possuem alta reatividade e constituem três classes de compostos: espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Didaticamente pode-se agrupar as espécies reativas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares (MAGDER, 2006; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Espécies reativas de oxigênio são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Intermediários reativos radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH^{\cdot}), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são formados durante esse processo (COHEN, 1989).

As ERO são classificadas em radicalares: hidroxila (HO^{\cdot}), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peroxila (ROO^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot}) e não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Embora todos os componentes celulares sejam susceptíveis à ação dos ERO, é a membrana celular a estrutura mais vulnerável, em decorrência de um processo denominado de peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas. Com a peroxidação lipídica há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas e a formação de produtos citotóxicos, culminando em morte celular (OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

O hidroxil (OH^{\cdot}) é o radical mais reativo conhecido *in vivo* e é formado quando o peróxido de hidrogênio reage com um metal de transição (Fe^{2+} ou Cu^+) formando dois hidróxidos (reação de Fenton), sendo um deles um radical e o outro apenas um íon. O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é ao mesmo tempo um radical e um ânion e se forma quando um elétron é adicionado à molécula de O_2 , podendo ser encontrado, principalmente na mitocôndria. O óxido nítrico (NO) é produzido em mamíferos pela oxidação da L-arginina catalisada pela óxido nítrico sintase e tem uma meia-vida de apenas alguns segundos (GUTTERIDGE; HALIWELL, 2018).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma ER não radicalar, formada principalmente na dismutação do superóxido. Ao reagir com metais de transição, forma o radical hidroxil através da reação de Fenton. (GUTTERIDGE; HALIWELL,

2018).

As principais ERN são o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), o óxido nitroso (N_2O_3), o ácido nitroso (HNO_2), os nitritos (NO_2), nitratos (NO_3) e peroxinitritos (ONOO^-). O radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintetase a partir de arginina, oxigênio e NADPH, gerando também NADP^+ e citrulina. O nitrato (NO_3) pode transformar-se em nitrito (NO_2^-), que reage com os ácidos gástricos gerando o ácido nitroso (HNO_2). O óxido nitroso (N_2O_3) também é precursor do HNO_2 através de sua reação com a água. O ácido nitroso promove a desaminação das bases do DNA que contêm o grupo $-\text{NH}_2$ livre, que são citosina, adenina e guanina, formando-se uracila, hipoxantina e xantina (BARREIROS; DAVID; DAVID; 2006).

Em condições celulares normais, há um equilíbrio entre a produção de radicais livres e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes. Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a sua oxidação (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000).

Estresse oxidativo é um distúrbio no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e as defesas antioxidantes do organismo (HALLIWELL, 1994). O estresse oxidativo induz alterações dos componentes celulares, tais como a peroxidação dos lipídeos de membrana, a oxidação de receptores hormonais e enzimas (MAGDER, 2006; LEONARDUZZI; SOTTERO; POLI, 2010) e lesões no material genético, como oxidações de bases do DNA que podem culminar em processos mutagênicos e tumorais (SVILAR *et al.*, 2011).

Segundo Gutteridge e Halliwell (2018), as espécies reativas podem agir como mensageiros celulares, mas podem também ser extremamente lesivas aos componentes celulares podendo alterar a permeabilidade da membrana, promover alterações do DNA levando a erros de transcrição ou de tradução. Para combater esses distúrbios os organismos desenvolveram defesas, denominadas antioxidantes

Os sistemas antioxidantes atuam em duas linhas. A primeira é detoxificadora, bloqueando o agente tóxico antes que ele ocasione lesão. Seus constituintes são a glutathiona reduzida (GSH), a superóxido-desmutase (SOD), a catalase, a glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e a vitamina E. A segunda linha tem a função de reparar a lesão ocorrida e é constituída basicamente pela glutathiona-redutase (GSH-Rd), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e pelo ácido ascórbico. Excluindo a vitamina E, um

antioxidante estrutural da membrana, a maioria dos oxidantes são encontrados no meio intracelular (HEBBEL, 1985; ROSS; MOLDEUS, 1991),

A glutathiona reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (MEISTER; ANDERSON, 1983). A GSH é considerada extremamente importante no sistema de defesa antioxidante, sendo capaz de proteger a célula contra a lesão resultante da exposição ao oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação luz violeta (DENEKE; FANBURG, 1989) e ions ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995)

1.2 O aminoglicosídeo gentamicina

O oficial médico inglês Alexander Fleming voltou da Primeira Guerra Mundial com um sonho: descobrir uma forma de reduzir o sofrimento dos soldados que tinham suas feridas infectadas, levando-os à morte em muitas ocasiões. Um descuido do pesquisador, ao deixar destampado um frasco de cultura de *Staphylococcus aureus* permitiu o desenvolvimento de mofo da própria atmosfera. O curioso era que onde crescia o mofo não havia proliferação bacteriana. Ao examinar o material, o pesquisador concluiu que o mofo, oriundo do fungo *Penicillium*, agia secretando uma substância que destruía a bactéria. Estava descoberto, há quase 100 anos (1928) o primeiro antibiótico com aplicação clínica, a penicilina. (NOSSA CAPA, 2009). Muitos anos depois, por volta de 1944, pesquisadores descobriram um aminoglicosídeo (AG) extremamente potente contra bactérias Gram-negativas, a estreptomicina. Desde então vários outros aminoglicosídeos foram descobertos, onde os principais AG aprovados para uso clínico no Brasil são: estreptomicina, gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina, paramomicina e espectinomicina.

A busca pela compreensão do mecanismo de ação dos AG tem motivado inúmeras pesquisas. Os resultados revelaram um conjunto notável de efeitos pleiotrópicos sendo quatro especialmente importantes: bloqueio ribossômico, leitura incorreta na tradução, dano à membrana e absorção irreversível do antibiótico (DAVIS, 1987).

Os AG são formados por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica do núcleo de hexose que normalmente se encontra numa posição central. Esta hexose ou aminociclitol é a estreptidina ou a 2-desaxiestreptamina (BUSSE; WOSTMANN; BAKKER, 1992). Os AG inibem a síntese proteica através

de sua ligação na subunidade ribossômica 30s induzindo a leituras incorretas e interrupção prematura da tradução do RNA mensageiro (RNAm) (CHAMBERS, 2006). Apresentam também alta solubilidade em água, são estáveis em pH 6 a 8 e possuem estrutura polar catiônica, o que impede a sua absorção oral e dificulta sua penetração no espaço intracelular ou através da barreira hematoencefálica (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

1.3 A cúrcuma

Diversos são os efeitos terapêuticos da curcumina, mas somente dois deles são destacados neste estudo, as propriedades antioxidantes (SAHEBKAR *et al.*, 2015) e antiinflamatórias (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009). Diferentes mecanismos são ativados para que o efeito antioxidante ocorra. A cúrcuma (CCM) pode eliminar diferentes formas de radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) enquanto modula a atividade da glutathione reduzida (GSH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) na neutralização de radicais livres (LIN *et al.*, 2007; MARCHIANI *et al.*, 2014).

Enzimas geradoras de radicais livres, tais como a lipoxigenase/ciclooxigenase e a xantina hidrogenase/oxidase são inibidas pela CCM (LIN *et al.*, 2007). Finalmente, por ser um composto lipofílico, a CCM é um eficiente limpador de radicais peroxila (PRIYADARSINI *et al.*, 2003). Hewlings e Kalman (2017) afirmam, baseados no trabalho de Biswas (2016), que há uma associação entre o estresse oxidativo e o processo inflamatório, uma vez que as células inflamatórias liberam uma série de espécies reativas no local da inflamação, desencadeando o estresse oxidativo.

Os mecanismos de ação da curcumina foram objeto de vários estudos. A curcumina age inibindo a via do NF- κ B, cuja ativação está relacionada a presença de ERO decorrentes das lesões, processos inflamatórios e estresse oxidativo (KATSORI *et al.*, 2015). A proteção antioxidante da CCM se deve a sua capacidade de capturar radicais livres, inibir a óxido nítrico sintase e a ligação do fator de transcrição c-jun/AP-1 no DNA (TAKANASHI *et al.*, 2013; GHORBANI; MIRMIRAN; PARVIN, 2014; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). Outra via sub-regulada pela curcumina é a janus quinase/sinal transdutor e ativador da transcrição proteica (JAK/STAT), resultando na redução da produção de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12,

TNF- α e da proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1). Atua ainda inibindo a fosforilação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) ao diminuir a atividade das enzimas lipoxigenase, xantina oxidase, e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (GHORBANI; MIRMIRAN; PARVIN, 2014).

Pesquisas publicadas sobre os efeitos da curcumina mostram alívio do estresse oxidativo e da inflamação, regulando as vias inflamatórias e pró-inflamatórias relacionadas com a maioria das doenças crônicas (HE *et al.*, 2015). Segundo He *et al.* (2015), nas últimas duas décadas, mais de 7.000 artigos discutiram a base molecular das atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antiapoptose, anticancerígenas e afins atribuídas à curcumina.

O uso intensivo da curcumina no tratamento e prevenção de várias doenças é prejudicado por suas características: pouca absorção, rápido metabolismo, baixa meia-vida biológica e baixa disponibilidade oral. No rato a sua disponibilidade oral é de apenas 1% (ANAND *et al.*, 2007; YANG, *et al.*, 2007; SHEHZAD; WAHID; LEE, 2010) sendo necessárias altas doses (>3,6 g/dia em humanos) para produzir efeitos medicinais (SHARMA *et al.*, 2004).

1.4 A eletroacupuntura (EAc)

A dor tem sido um desafio para a Medicina. Não há dúvida que o homem sempre percebeu, talvez por instinto, que é possível aliviar uma dor pela aplicação de um estímulo doloroso no corpo. Ao longo dos séculos surgiu a percepção que a dor moderada e breve tende a abolir a dor intensa e prolongada. Assim foram utilizadas ventosas, a escarificação, a cauterização, e a aplicação de substâncias irritantes, como o cantáride, usado por Hipócrates (BALDRY, 2007).

Acupuntura, termo cunhado no século XVII por jesuítas, deriva dos radicais latinos *acus* e *pungere*, que significam agulha e puncionar (SCHOEN; 2006; MACIOCIA, 2007). Eletroacupuntura é uma modalidade terapêutica neuromodulatória, que utiliza pequenos estímulos elétricos aplicados a duas ou mais agulhas inseridas em pontos de Acupuntura. O fluxo da corrente elétrica através de um meio condutor biológico desencadeia efeitos fisiológicos, envolvendo fenômenos eletroquímicos, eletrofísicos e eletrotérmicos (CAMERON, 2003).

A aplicação de estímulos elétricos para aliviar a dor tem sua origem na antiguidade. Esculturas de pedra que remontam à Quinta Dinastia Egípcia (cerca de 2500 anos a.C. mostram o emprego de um peixe elétrico (*Malapterurus electricus*) no

tratamento da dor. Dois mil anos depois, os gregos utilizaram outro peixe elétrico (peixe-torpedo) para aliviar dores de cabeça e articulares (BALDRY, 2007).

Na metade do século XVIII o cientista Pieter van Musschenbroek demonstrou ao mundo que era possível armazenar a eletricidade para uso posterior em estruturas conhecidas como frascos de Leyden, possibilitando o tratamento de doenças pela eletricidade. Nessa mesma época, os missionários jesuítas retornaram do extremo oriente, trazendo informações valiosas sobre o uso da acupuntura e a aplicação de estímulos manuais cuja finalidade era aumentar os estímulos nocivos. Na ocasião, o médico francês Salandière, filho do compositor Berlioz decidiu aplicar a estimulação elétrica para o tratamento da gota, dos reumatismos e das afecções nervosas (BALDRY, 2007). Por tratar-se de corrente galvânica ocorreram efeitos eletrolíticos indesejáveis, tais como necrose do tecido. Dezoito anos depois, Duchenne (1849), utilizou correntes alternadas, descobertas por Faraday, para uso terapêutico (BALDRY, 2007).

A analgesia por acupuntura foi usada inicialmente para suprimir a dor pós-operatória, pelos médicos do *First Shanghai People Hospital*, em um paciente que acusava dor intensa após uma amigdalectomia. O resultado foi surpreendente, o que levou aqueles profissionais a usar novamente a acupuntura antes da realização do procedimento cirúrgico, surgindo assim a anestesia por acupuntura (BALDRY, 2007).

Havia um problema: para suprimir a dor evocada cirurgicamente era preciso estimular vigorosamente as terminações nervosas periféricas. A estimulação manual era muito cansativa, o que levou os chineses a usarem a eletroestimulação para promoverem a analgesia (BALDRY, 2007).

A comprovação científica, por meio de evidências médicas, surgiu em 1973, com o trabalho publicado por Chiang *et al.* Um ano depois, o *Peking Medical College Research Group of Acupuncture Anaesthesia* demonstrou que a analgesia por acupuntura estaria relacionada a liberação de substâncias químicas no sistema nervoso central (BALDRY, 2007).

O trabalho de Han *et al.* (1984) demonstrou que o tipo de peptídeo liberado no sistema nervoso depende da frequência da estimulação aplicada. Assim, baixas frequências (2 Hz) liberam metaencefalina, 100 Hz liberam dinorfina e 15 Hz liberam uma mistura encefalinas e dinorfinas (HAN *et al.*, 1989).

Para Baldry (2007) o efeito antiinflamatório da EAc estaria relacionado a

liberação de ACTH pela pituitária, promovendo a liberação do cortisol do córtex adrenal.

Hu *et al.* (2013) estudaram os efeitos da EAc, usando duas diferentes frequências alternadamente (2 e 100Hz) durante 30 minutos, aplicadas no acuponto Zusanli (E-36) em ratos submetidos a isquemia-reperfusão intestinal. No estudo a EAc demonstrou um efeito protetor, reduzindo significativamente a inflamação intestinal e a quebra da barreira intestinal ao ativar um mecanismo colinérgico e antiinflamatório, com redução dos níveis do TNF- α no plasma e tecidos orgânicos. Houve ainda redução dos níveis de citocinas no intestino e dos níveis hepáticos de TNF-alfa e IL-8 (HU *et al.*, 2013).

1.5 Justificativa e relevância

O fígado desempenha um papel fundamental no controle e prevenção dos efeitos tóxicos de substâncias administradas com finalidade terapêutica (RUSSMAN; KULLAK-UBLICK; GRATAGLIANO, 2009)

O sucesso do profissional de saúde no tratamento de processos infecciosos depende da ação de substâncias que podem exercer efeitos tóxicos ao serem administrados com a finalidade de controlar os agentes bacterianos invasores. A descoberta do antibiótico penicilina por Alexandre Fleming em 1928 foi fundamental no tratamento de soldados feridos na guerra, preservando vidas humanas. A descoberta de novos antibióticos, entre os quais os aminoglicosídeos, trouxe novas esperanças para os profissionais de saúde. Entretanto, seus efeitos tóxicos limitaram o seu uso. Restou aos pesquisadores a necessidade da busca de substâncias ou métodos terapêuticos capazes de eliminar ou atenuar essas lesões. Esta pesquisa torna-se relevante por buscar alternativas para a prevenção dos efeitos lesivos do aminoglicosídeo gentamicina. Estudos demonstraram que a aplicação da EAc em determinados pontos do organismo pode reduzir o estresse oxidativo e a inflamação do fígado. Por outro lado, fitoterápicos também têm sido utilizados com esse propósito, com destaque para a cúrcuma. O emprego da combinação EAc + cúrcuma, utilizada na presente pesquisa mostrou eficácia na atenuação do processo inflamatório e do estresse oxidativo, o que justifica sua relevância, permitindo a utilização do antibiótico nas situações onde o uso de um potente antibiótico se faz necessário. Não foram encontrados na literatura médica

trabalhos semelhantes, o que confere ineditismo à presente pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da cúrcuma e da eletroacupuntura em modelo de lesão hepática induzida por gentamicina.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a toxicidade hepática por parâmetros bioquímicos em ratos Wistar submetidos ao modelo de lesão por gentamicina;
2. Avaliar o estresse oxidativo e a inflamação no tecido hepático e no plasma em ratos Wistar submetidos ao modelo de lesão por gentamicina;
3. Avaliar o efeito antioxidante e anti-inflamatório da cúrcuma em ratos Wistar submetidos ao modelo de lesão por gentamicina;
4. Avaliar o efeito antioxidante e antiinflamatório da EAc 100 Hz em ratos Wistar submetidos ao modelo de lesão por gentamicina;
5. Avaliar o efeito antioxidante e antinflamatorio da associação cúrcuma – EAC 100 Hz em ratos Wistar submetidos ao modelo de lesão por gentamicina.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

A utilização de animais neste experimento está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) visando proporcionar maior bem-estar aos animais em uso. O projeto foi protocolado sob o nº CEUA 5060011220 (ID 001850) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 30/03/2021 (ANEXO 1).

3.2 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, controlado e comparativo entre sete grupos de ratos Wistar pré-tratados com doses tóxicas do aminoglicosídeo gentamicina durante cinco dias consecutivos para desenvolvimento de um quadro de lesão hepática inflamatória e de estresse oxidativo, seguido do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura para avaliação dos seus possíveis efeitos antioxidantes e antiinflamatórios.

3.3 A Amostra

O rato foi o animal selecionado para a realização do experimento. Algumas de suas características motivaram esta escolha: tamanho reduzido, ciclo reprodutivo curto, prole numerosa, nutrição variada, fácil domesticação, adaptação a ambientes variados e sociabilidade (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2002).

Foram utilizados 56 ratos, com idade de 8-10 semanas, machos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*) com massa corporal variando de 160 a 280g da linhagem Wistar, saudáveis e eutróficos, provenientes do Biotério Central da UFC. Os animais foram mantidos no Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED) em gaiolas de polipropileno, medindo 50x 60x 22 cm, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável em número de dois por caixa. As caixas foram acondicionadas em estantes ventiladas com exaustão de gases e redução de

ruídos. Durante toda execução do protocolo, os animais tiveram livre acesso a água filtrada e ração irradiada (Nuvilab, Quimtia, Paraná) (ANEXO 2).

Segundo a legislação brasileira em vigor, a RDC nº 21 de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – a irradiação de alimentos refere-se ao: “processo físico de tratamento que consiste em submeter o alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com a finalidade sanitária, fitossanitária e/ou tecnológica”.

A cama dos animais era constituída de maravalhas de pinus, irradiadas (Granja RG, São Paulo). Em relação às condições do macro ambiente, os animais foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12 horas, à temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 55 a 60%. O sistema de exaustão promovia renovação total do ar cerca de 10 vezes a cada hora.

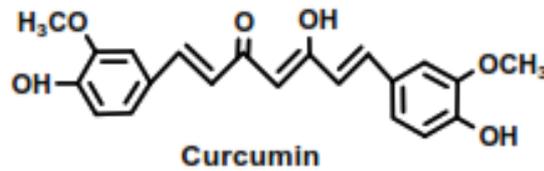
3.4 Tratamentos

3.4.1 *Curcuma*

A cúrcuma, conhecida no Brasil como açafrão, é o rizoma de uma planta herbácea perene da família do gengibre. Quando cozido o rizoma, após secagem, dá origem a um pó amarelo-laranja, muito utilizado como tempero na Ásia. O maior produtor mundial é Índia, que responde por 90% da produção mundial.

A curcumina, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ (**Figura 1**) e peso molecular $368,38 \text{ g.mol}^{-1}$ (**Figura 2**) é um pó de cor amarelada a vermelho alaranjada e praticamente insolúvel em água (LI *et al.*, 2011). Os principais fitoconstituintes da cúrcuma são os diarilheptanoides, que ocorrem em uma mistura denominada curcuminoides. São eles: a curcumina [1, (1E,6E) -1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona, o mais abundante (60-70% de um extrato bruto] (**Figura XX**), demetoxicurcumina (3, 20-27%) e bisdemetoxicurcumina (4, 10-15%), juntamente com metabólitos secundários numerosos e menos abundantes (PRIYADARSINI, 2014)

Figura 1 – Formula molecular da curcumina (- [1, (1E,6E) -1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona)



Fonte: Priyadarsini, 2014

Figura 2 – *Cúrcuma longa* – folhas, rizomas e pó extraído dos rizomas.



Imagem disponível em: <https://wormsargentina.com/wp-content/uploads/2018/02/C%C3%BArcuma-planta-1024x576.jpg>. Acesso em 07 nov 2021

Extrato seco de *Curcuma longa*, armazenado em capsulas contendo cada 250 mg de pó avermelhado (equivalente a 50 mg de curcuminoides), comercializado por Aché Laboratórios Farmacêuticos, Guarulhos, São Paulo, foi administrado por gavagem em doses de 100 e 200mg/Kg, diluídas em 1,0 ml de carboximetilcelulose de sódio (CMC_Na) a 0,5% (A Formula – Farmácias de Manipulação, Fortaleza-CE). Como a substancia é insolúvel em água, as gavagens foram realizadas após diluição em CMC_Na a 0,5%. A utilização da solução de CMC_Na teve como base o trabalho de CAI *et al.*, 2017. Outros pesquisadores utilizaram carboximetilcelulose a 1% para diluição da CCM (ALHUSAINI; *et al.*, 2019). Soluções frescas foram preparadas diariamente e estocadas em ambiente refrigerado a 3° C.

3.4.2 A Eletroacupuntura

Para a utilização da EAc, os animais foram previamente colocados em redes de contenção (Figura 2) durante 20 minutos, conforme utilizado em pesquisa realizada na Universidade Federal do Ceará (GONDIM, 2012). Essa técnica de imobilização foi idealizada e desenvolvida pela Prof.^a Dr.^a. Mariana Lima Vale do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA – UFC).

Figura 3 – Aplicação da EAc com o animal posicionado no dispositivo de contenção



Fonte: o autor (2021)

3.4.2.1 Equipamento usado para eletroestimulação (NKL EL 608)

O EL 608 é um equipamento eletrônico, fabricado por NKL Produtos Eletrônicos Ltda., Brusque, Santa Catarina, Brasil, para uso na técnica de Eletro-Acupuntura, que gera estímulos elétricos pulsados de baixa intensidade. O estímulo gerado pelo EL-608 é similar ao dos equipamentos convencionais do tipo “TENS” (estimulação elétrica transcutânea), porém com intensidade menor de pulso, estímulo controlado por fonte de corrente e controles diferenciados para a técnica. Sua interface de comunicação com o usuário foi aprimorada em comparação aos equipamentos convencionais. Quatro tipos de estímulo estão disponíveis: contínuo,

intermitente (*BURST*), misto (onda densa / dispersa) e avançado (permite um controle maior dos parâmetros da forma de onda). O formato dos estímulos (pulsos) pode ser polarizado, não polarizado, bifásico ou bifásico alternado. Estão disponíveis para uso uma vasta gama de frequências, variando de 1 Hz a 2,5kHz (**Figura 4**).

Figura 4 – EL-608 Eletro-estimulador



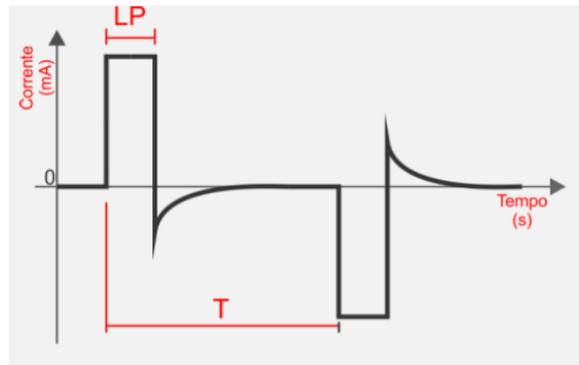
Fonte: o autor (2021)

Outras características do equipamento incluem largura de pulso ajustável e programação do tempo total de aplicação do estímulo (duração da seção de estimulação). O EL 608 armazena todas as informações da programação utilizada, em memória não volátil, permitindo um controle rigoroso do processo e uma uniformidade do tratamento aplicado. Assim, ao ser ligado, informações tais como corrente máxima de fundo de escala utilizada, aqui ajustada para 10 mA, quais as saídas ativadas (o aparelho é dotado de oito saídas, em grupos de quatro, comportando-se como dois aparelhos independentes. Por ser dotado de bateria interna, o aparelho pode ser utilizado desconectado da fonte externa de energia elétrica, o que lhe confere maior segurança contra possíveis choques elétricos. A duração da bateria interna em condições de uso normal pode chegar a 15 horas contínuas ou intermitentes.

O tipo de pulso gerado no EL-608 é balanceado (não possui componente DC) e é desacoplado por transformador de pulso. O formato do pulso em circuito aberto é

descrito basicamente por um estágio retangular associado a um estágio exponencial invertido (**Figura 5**).

Figura 5 – Pulso não polarizado



Legendas:

LP: largura do pulso, T: tempo de aplicação do estímulo elétrico

Fonte: NKL Produtos Eletrônicos Ltda., Brusque, Santa Catarina, Brasil

O tempo indicado por T, na figura Figura 4, é o intervalo de aplicação do estímulo unitário. Comumente, costuma-se representar este tipo de intervalo em uma unidade chamada de frequência, que nada mais é do que a quantidade de repetições de pulsos durante um segundo. Na mesma figura, o tempo indicado por LP (largura de pulso) representa o intervalo dentro do ciclo de estimulação onde efetivamente existe aplicação de corrente elétrica aos eletrodos.

O aparelho utilizado é novo, sem uso, e calibrado pela fábrica. Os parâmetros utilizados no presente estudo foram os seguintes:

Duração do tempo de estimulação: 15 minutos

Corrente de estimulação: 0,3 mA

Frequência de estimulação: 100 Hz

Tipo de estímulo: *Burst*

Pulso: não polarizado

Largura de pulso:

Tempo de aplicação do estímulo elétrico:

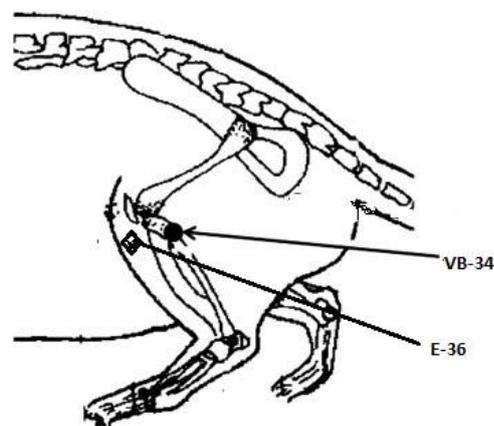
3.4.2.2– Técnica de aplicação da eletroacupuntura

Para a aplicação das agulhas os animais foram imobilizados utilizando-se uma rede de contenção especialmente elaborada para essa finalidade, conforme já

mencionado. No dispositivo, o animal têm seus membros colocados através de aberturas no tecido (rede), de modo que ficam suspensos do solo, quando a rede é fixada no arco de sustentação (Figura 2). O membro pélvico foi exposto através de uma das aberturas, permitindo a inserção de micro agulhas nos dois acupontos previamente selecionados, correspondentes aos acupontos humanos vesícula biliar 34 (VB-34) e estômago 36 (E-36), O primeiro (VB34) está localizado na depressão anterior e inferior à cabeça da fíbula (YIN et al., 2008) e o segundo (E-36) se localiza em região intensamente enervada, 5 mm abaixo da cabeça fibular e 2 mm lateral ao tubérculo anterior da fíbula (ramos laterais do nervo sural cutâneo, ramo cutâneo do nervo safeno e o ramo profundo do nervo peroneal (Figura 5) (YIN et al., 2008). Quando um ponto de acupuntura é puncionado, ocorre sensação de parestesia elétrica ou calor. Essa sensação é denominada *De Qi*. Os animais demonstram essa sensação com um leve repuxo de pele, uma discreta sonolência ou um breve tremor de cauda (HWANG, EGERBACHER, 2006).

As agulhas foram inseridas unilateralmente, iniciando-se pelo membro pélvico direito (Figura 6). Na sessão seguinte as agulhas foram inseridas no membro pélvico esquerdo, alternando-se a lateralidade a cada nova aplicação. Após a inserção das agulhas, foram conectados eletrodos dotados de micro-garras tipo jacaré. O tempo de estimulação foi de 15 minutos, frequência de 100 Hz, intensidade de 0,3 mA, pulsos quadrados tipo *BURST*, conforme estabelecido no protocolo de utilização do aparelho. A intensidade elétrica aplicada era forte o suficiente para induzir leves contrações musculares nos membros pélvicos dos animais.

Figura 6 – Localização dos acupontos no rato



Legendas: VB-34: ponto vesícula biliar 34; E-36: ponto Estômago 36
(Adaptado de Tanahashi et al., 2011)

3.5 Desenho do experimento

Cinquenta e seis ratos foram distribuídos de forma aleatória em sete grupos, cada um contendo oito animais. Todos os grupos receberam injeções intraperitoneais de GM (100mg/Kg, diluída em salina, 1,0 ml) durante 5 dias consecutivos. Os tratamentos foram iniciados no sétimo dia do estudo, 48 horas após a última injeção de GM.

Figura 7 - Distribuição dos grupos



Grupos:

G-1 – Salina G-2 - CMC_Na G-3 – CCM 100mg

G-4- CCM 200mg G-5 – EAc 100 Hz G-6 CCM 100mg/Kg + EAc 100Hz

G-7 – CCM 20mg/Kg + EAc 100 Hz.

As gavagens e sessões de EAc foram aplicadas em dias alternados, durante 12 dias. Dois grupos (16 animais), usados como controles (G1 e G2) foram tratados com salina 1,0 ml ou carboximetilcelulose de sódio (CMC-Na) a 0,5% (1,0 ml), respectivamente. Como a CCM não se dissolve em água, utilizou-se o CMC_Na como diluente. Os demais grupos foram tratados conforme descrito a seguir: ratos do Grupo G3 receberam CCM 100 mg/Kg; animais do Grupo G4 receberam CCM 200 mg/Kg; ratos do Grupo G5 foram tratados com Eac 100 Hz, durante 15 minutos, em dias alternados, durante 12 dias; os demais grupos foram tratados com CCM 100 mg/Kg (Grupo G6) ou CCM 200 mg/Kg (Grupo G7). Uma hora após o término da gavagem, animais dos grupos G6 e G7 foram submetidos a sessões de Eletroacupuntura (EAc), utilizando uma frequência de 100 Hz, durante 15 minutos (dias alternados, durante 12 dias). Para padronização dos procedimentos os ratos que não foram submetidos à estimulação elétrica foram imobilizados durante 15 minutos nas redes de contenção, uma hora após o término da gavagem. Ao término das sessões os animais foram reconduzidos as suas respectivas gaiolas, e levados

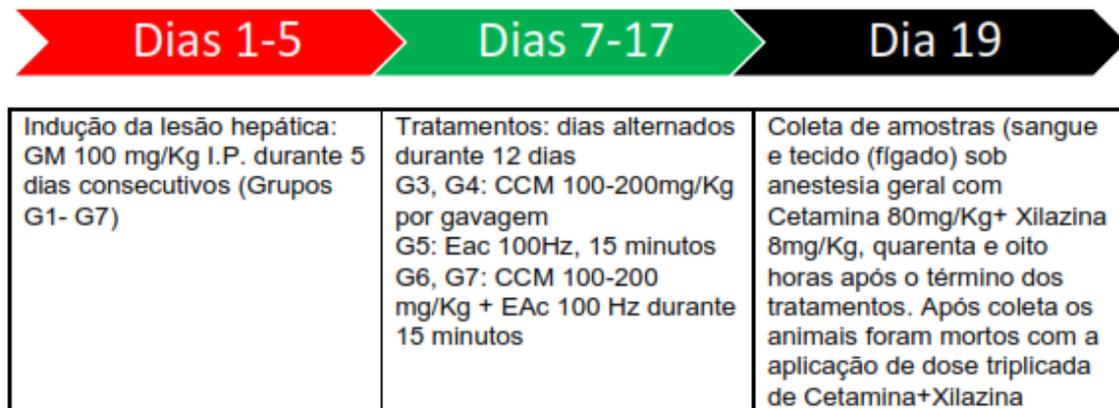
de volta aos seus alojamentos. Para realização dos procedimentos de EAc sem a utilização de anestésicos, os animais foram colocados em dispositivos de contenção semelhantes as redes, com aberturas para a saída dos membros, suspensas em um arco metálico confeccionado para tal finalidade. Os animais passaram por períodos de aclimação durante sete dias consecutivos anteriores aos tratamentos. Quarenta e oito horas após o término dos experimentos os animais foram anestesiados com Cetamina 80 mg/kg +Xilazina 8mg/kg via i.p. para coleta de sangue arterial por punção da aorta abdominal e do fígado. Terminada a coleta os animais foram mortos utilizando uma dose triplicada de anestésicos.

3.6 Cronograma de execução do experimento

Quadro 1 – Cronograma de execução do experimento

Dia 1	Início do processo de intoxicação dos animais com Gentamicina 100mg/Kg, via intraperitoneal, dissolvida em 1,0ml de soro fisiológico, diariamente, durante cinco dias (Todos os grupos: G1- G7)
Dia 7	Após 48 horas, foi iniciado o tratamento com cúrcuma 100mg/Kg dissolvida em CMC_Na a 0,5% (G3) ou 200mg/Kg dissolvida em CMC_Na a 0,5% (G-4), durante 12 dias (dias alternados). Os volumes administrados por gavagem foram ajustados em 1,0 ml com a adição de CMC_Na quando necessário. Os ratos do grupo G-5 foram tratados com estimulação elétrica (Eletroacupuntura, 100Hz, durante 15 minutos, em dias alternados, durante 12 dias (seis aplicações). Após 48 horas os animais do grupo G-6 e G7 foram tratados com cúrcuma 100mg/Kg (G6) ou 200mg/Kg (G-7), durante 12 dias (dias alternados), seguindo-se a aplicação da estimulação elétrica (Eletroacupuntura, 100 Hz, durante 15 minutos, em dias alternados, durante 12 dias (seis aplicações).
Dia 17	Último dia de aplicação dos tratamentos (gavagens e Eletroacupuntura)
Dia 19	Coleta das amostras (sangue arterial e fígado) sob anestesia intraperitorial com Cetamina 80mg /Kg+ Xilazina 8mg/Kg. Após coleta, os animais foram mortos com a aplicação de dose triplicada de Cetamina + Xilazina.

Figura 8 – Fluxograma de execução do experimento



Fonte: O autor (2022)

3.7 Indução da lesão hepática

Para a indução da lesão hepática, todos os animais (Grupos G1-G7) receberam gentamicina injetável, 80 mg/2ml, (Fresenius Kabi Brasil Ltda, Anápolis, GO.) durante 5 dias consecutivos. O aminoglicosídeo foi aplicado por via intraperitonal (IP) na dose de 100mg/Kg de peso do animal, acrescentando-se soro fisiológico (SF) até completar 1,0ml. A dose de GM foi selecionada tendo por base o trabalho de Ademiluyi *et al.* (2013). A aplicação da GM por via i.p. teve como base trabalhos científicos publicados (NARAYANA, 2008, ALY, 2019).

3.8 Coleta de amostras para análise

O sangue arterial coletado por punção da aorta abdominal foi centrifugado (2500 rpm /15 min); o soro obtido e armazenado em temperatura de -70° para posterior análise de parâmetros bioquímicos (TGO/ALT, TGP/AST, Gama-GT, Glicose, TBARS (Malonaldeído - MDA), Glutathiona reduzida (GSH).

O lóbulo esquerdo do fígado foi dividido em duas partes. A primeira foi fragmentada e posteriormente utilizada para a dosagem de mieloperoxidase (MPO). A segunda parte foi homogeneizada em tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0). O homogeneizado foi centrifugado a 700 rotações /min durante 10 minutos a 4 ° C e

o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de Nitritos (NO_2), TBARS (MDA) e de GSH.

3.9 Análises Bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos foram determinados utilizando-se kits comerciais e o Analisador Automático Labmax Pleno (Figura 8) do laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM/UFC).

Para a verificação dos efeitos hepatotóxicos da GM e do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura foram realizadas as seguintes dosagens: Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Gama-GT e Glicose. Para avaliação do estresse oxidativo e da inflamação foram verificados as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), nitritos (NO_2), glutatona reduzida (GSH) e a atividade da mieloperoxidase (MPO).

Figura 9 - Analisador Automático Labmax Pleno



Fonte: o autor (2021)

3.9.1 Determinação das concentrações de Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) no plasma

As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) estão presentes nas células do fígado (hepatócitos) e são liberadas no sangue em consequência de lesões hepáticas de naturezas diversas. Assim, a elevação dos níveis plasmáticos dessas enzimas pode refletir graus variáveis de lesão hepática. Para a determinação da atividade de AST e ALT foram utilizados os kits ALT/GPT LIQUIFORM VET Ref.1008 e AST/GOT LIQUIFORM Ref. 105 (Labtest Diagnóstica

S.A. Lagoa Santa, M.G.).

A ALT catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD.

A redução da absorvância em 340 nm, consequente a oxidação da coenzima NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.

A AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. O oxaloacetato é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada à NAD. A redução da absorvância em 340 nm, consequente a oxidação da coenzima NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da AST na amostra.

3.9.2 Determinação da atividade da γ -glutamil transferase (Gama GT) no plasma

A determinação da atividade de Gama GT no plasma foi efetuada por fotometria em modo cinético, utilizando-se o kit Gama GT LIQUIFORM, Ref. 105 (Labtest Diagnóstica S.A. Lagoa Santa, M.G.). O princípio do exame é o seguinte: a Gama GT catalisa a transferência do grupamento glutamil da L-y-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para glicilglicina, formando L-y-glutamilglicilglicina e p-nitroanilina.

A quantidade formada de p-nitroanilina, que apresenta elevada absorvância em 405 nm, é diretamente proporcional à atividade da Gama GT na amostra. Os resultados são expressos em UI/L.

3.9.3 Determinação da concentração de glicose no plasma

A determinação da concentração de glicose plasmática foi realizada por sistema enzimático, utilizando-se o Kit GLICOSE LIQUIFORM, Ref. 133 (Labtest Diagnóstica S.A. Lagoa Santa, M.G.). A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose.

O peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento

formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.

O método pode ser utilizado em técnica manual e é facilmente aplicável em analisadores semiautomáticos e automáticos capazes de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm.

3.9.4 Determinação da concentração de nitritos no fígado

Amostras de fígado foram analisadas para determinação das concentrações de nitrito no tecido hepático pelo método de Griess (GREEN et al., 2982). Em condições ácidas o nitrito reage com a sulfonamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Em seguida este sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com o pico de absorvância em 540nm.

Preparo das soluções reagentes:

Colocar lentamente 5mL de ac. Fosfórico 5% no balão volumétrico de 100mL e completar com H₂O destilada;

Pesar 0,1g da sulfonamida (p-Aminobenzenesulfonamide - Sigma S 9251) e completar volume até 10mL com ácido fosfórico 5%;

Pesar 10mg do NEED - Dicloridrato de N- (1-naftil) -etilenodiamina) 2% e completar volume até 10mL com água destilada, preparado no dia da utilização.

REAGENTE DE GRIESS:

1 volume de ácido fosfórico 5%

1 volume de sulfonamida 1% em ac. fosfórico 5%

1 volume de NEED 0,1% (C₁₀H₁₄N₂·2HCL)

1 volume de água destilada.

Preparação da Curva-Padrão

Foi pesado 6,9 mg de NaNO₂ e dissolvido em 10 mL de água bidestilada (estoque-10mM). Em seguida foram feitas as diluições em série (10 e 20x). Para o cálculo das concentrações do teste utilizou-se uma equação da reta (GREEN et al., 1981). De modo resumido, para a confecção da curva padrão utilizou-se uma solução de nitrito de sódio em crescentes diluições, conforme descrito abaixo:

DILUIÇÕES PARA A CURVA PADRÃO:

- Ponto 1 (1mM): Retirar 100 μ L da solução mãe (10mM) + 900 μ L do tampão utilizado para fazer o homogenato;
- Ponto 2 (100mM): Retirar 100 μ L da solução anterior (1mM) +900 μ L do tampão utilizado para fazer o homogenato;
- Ponto 3 (50 mM): Retirar 500 μ L da solução anterior (100mM) +500 μ L do tampão utilizado para fazer o homogenato;
- Ponto 4 (25mM): Retirar 500 μ L da solução anterior (50mM) +500 μ L do tampão utilizado para fazer o homogenato;
- Ponto 5 (12,5mM): Retirar 500 μ L da solução anterior (25mM) +500 μ L do tampão utilizado para fazer o homogenato;
- Ponto 6 (6,25mM): Retirar 500 μ L da solução anterior (12,5mM) +500 μ L do tampão utilizado para fazer o homogenato;
- Ponto 7 (3,12mM): Retirar 500 μ L da solução anterior (6,25mM) +500 μ L do tampão utilizado para fazer o homogenato;

Amostras:

Para homogenato (amostras turvas): descongelar e centrifugar (15 min, 11000g, 4°C). O sobrenadante é utilizado para dosagem de nitrito.

Procedimento Experimental

Adicionou-se 100 μ L do reagente de Griess à amostra ou tampão (branco) nos poços de uma placa de ELISA de 96 poços (Beckman Coulter DTX Multimode Detector, USA). Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz foi realizada a leitura a 540nm no espectrofotômetro. Os valores obtidos foram expressos em μ M/g de tecido.

3.9.5 Determinação da concentração de GSH no tecido hepático e no plasma

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman (1959). Para realização da análise foi preparado um homogenato com tecido a 10% em EDTA 0,02M; retirou-se 400 μ L desse homogenato e adicionou-se 320 μ L de água destilada e 80 μ L de ácido tricloroacético a 50% (no eppendorff). A seguir o material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Finalmente, foi

recolhido 400µL do sobrenadante e acrescido 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 µL de 5,5'- ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 0,01 M (ordem de adição: tampão – sobrenadante – DTNB). Após um minuto é feita a leitura no aparelho e os valores obtidos foram expressos em ng de GSH/g de tecido.

Para a determinação dos grupamentos sulfidril (GSH) totais utilizou-se uma alíquota de 50 µl do plasma 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 (leitura A2). O branco (B) continha somente DTNB e tampão Tris-EDTA. A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de GSH, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão. Os valores obtidos foram expressos em µM GSH/ml plasma.

3.9.6 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido hepático e no plasma

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um ensaio amplamente utilizado para medir a oxidação lipídica e a atividade antioxidante em alimentos e sistemas fisiológicos. (GHANI *et al.*, 2017).

O método, segundo Draper e Hadely (1990) é baseado na medida espectrofotométrica da cor roxa gerada pela reação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Procedimento (tecido hepático):

A determinação dos níveis de MDA no tecido hepático foi realizada segundo o método de Mihara e Uchiyama (1978). De modo resumido, o procedimento tem início com a colocação de 250µL do homogenato a 10% nos eppendorf, seguindo-se um banho a 37° C durante uma hora. A seguir o material é precipitado com 400µL de ácido perclórico 35% e centrifugado (14.000 rpm) durante 15 minutos, na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf; Adicionou-se 200µL de ácido tiobarbitúrico 1,2% e colocou-se o eppendorf em banho de 95-100° C durante 30 minutos. Deixou-se esfriar até o material ficar turvo e após nova centrifugação foi feita a leitura do sobrenadante a 535 nm. Os valores foram

expressos em $\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido.

Procedimento (plasma):

Os níveis de TBARS foram estimados de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Em resumo, foram acrescentados a cada tubo de ensaio 0,5 ml de plasma, 0,5 ml de solução salina normal, 1,0 ml de ácido tricloroacético a 20% (TCA) e 0,25 ml de reagente TBA (200 mg de ácido tiobacbitúrico em 30 ml de água destilada e 30 ml de ácido acético). Os tubos foram mantidos em fervura de 95° durante uma hora. A seguir foi adicionado a cada tubo de ensaio, 3,0ml de n-butanol, seguindo-se centrifugação (3000 rpm) durante 10 minutos. A camada de butanol separada foi coletada e lida em um espectrofotômetro contra reagente em branco a 535 nm. A concentração de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico foi expressa em de nmol de malondialdeído por mililitro de plasma (nmol MDA/ml de plasma)

3.9.7 Determinação da atividade da mieloperoxidase no tecido hepático

Segundo Kettle e Winterbourn (1997) os neutrófilos constituem uma das principais fontes de superóxido do corpo. Embora o superóxido seja absolutamente necessário para o processo de eliminação de microorganismos, sua presença pode ocasionar dano tecidual, em decorrência do estresse oxidativo.

A mieloperoxidase é a proteína mais abundante nos neutrófilos, representando até 5% do seu peso seco, e é armazenada em seus grânulos azurofílicos (AGNER, 1941; SCHULTZ, KARNINKER, 1962). É um tetrâmero formado por dois dímeros unidos por uma ponte dissulfeto (NAUSEEF; MALECH, 1966).

A atividade bactericida da MPO resulta da geração de HOCl (o principal componente ativo do alvejante doméstico bem como de outras espécies oxidantes (KLEBANOFF et al., 2013) O HOCl é altamente tóxico e pode induzir sinalização aberrante e dano e disfunção celular por inúmeras vias de relevância para o desenvolvimento de doença inflamatória (RAYNER, LOVE, HAWKINS, 2014).

A avaliação da atividade da MPO possibilita demonstrar de forma quantitativa a intensidade do recrutamento de neutrófilos no processo inflamatório (CRUZ; CAMPA, 2009).

Procedimento:

Amostras de tecido hepático foram mantidas no gelo durante todo o tempo do ensaio. A amostra (50 mg) foi colocada em tampão potássio-fosfato pH = 6,0 contendo 0,5% do tampão HTAB (1,0 ml de tampão para cada 50 mg de tecido), pulverizada em nitrogênio líquido e congelada três vezes a -70° C. Após cada ciclo de congelamento o material foi sonicado e a seguir centrifugado por 15 minutos a 3.000 rpm, 4° C. Adicionou-se 30µL do sobrenadante da amostra e 200µL de o-dianisidina em cada cubeta de ensaio. A atividade da enzima por medida da absorbância nos tempos 0, 1 e 3 minutos, no comprimento de onda 460nm. O branco das amostras é o tampão fosfato com o-dianisidina. Os resultados foram expressos como µMol/g de tecido.

3. 10 Análise Estatística

Os dados obtidos no estudo foram submetidos a análise estatística, avaliando-se a sua normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov e posteriormente calculando-se a média amostral e o desvio padrão (DP). Para os testes comparativos entre os grupos-controle (G1 e G2) e os grupos 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% ($p < 0,05$). Os dados do estudo foram analisados utilizando-se o software *Graphpad Prism versão 5.0 para Windows*, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A.

4 RESULTADOS

4.1 Peso dos ratos

Os pesos médios dos ratos, aferidos no início e no fim do experimento, estão discriminados na Tabela 1. Observou-se uma variação de peso inicial dos animais entre 110,9 e 179,7 (peso médio: 156,8) no dia 1 e 247,0 e 275,0 (peso médio: 253,3) no dia 19 do experimento.

Tabela 1 – Peso médio dos ratos utilizados no estudo

Grupos	n	Peso Médio		
		Dia 1	Dia 19	% aumento
G1 – Controle Salino	8	110,9	248,0	44,7
G2 – Controle CMC_Na	8	134,0	264,0	50,7
G3 – Cúrcuma 100	8	168,5	247,0	68,2
G4 – Cúrcuma 200	7*	165,1	239,0	69,0
G5 – Eletroacupuntura 10 Hz	8	166,1	247,0	67,2
G6 - Cúrcuma 100+EAc 100 Hz	8	179,7	253,0	71,0
G7 – Cúrcuma200+EAc 100 Hz	8	173,8	275,0	63,2

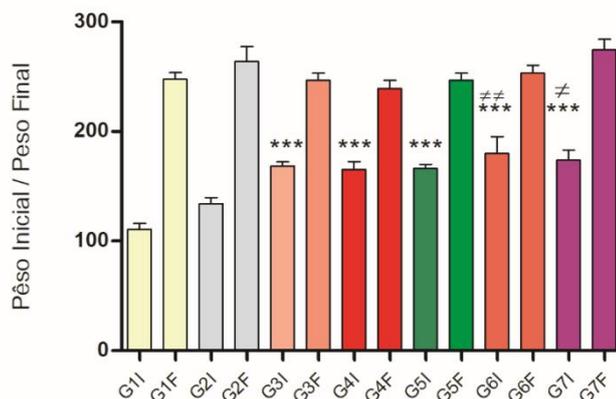
(*) Ocorreu um óbito no terceiro dia do experimento (G4, rato 8), causa indeterminada. n = número de ratos em cada grupo

Dia 1 – peso do animal no primeiro dia do experimento, antes do início da indução da hepatotoxicidade

Dia 19 – peso do animal quarenta e oito horas após a conclusão dos tratamentos.

Fonte: Elaborada pelo autor

Gráfico 1 – Peso inicial (I) e final (F) dos ratos usados no estudo



G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200

G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc

*** $p < 0,001$ comparado a G1 $\neq p < 0,05$ $\neq p < 001$ comparado a G2

Teste ANOVA / TUKEY Fonte: elaborado pelo autor (2022)

4.2 Peso do lobo esquerdo do fígado dos ratos utilizados no estudo ao término do experimento (19° dia)

Não foram observadas diferenças significantes no peso do lobo esquerdo do fígado dos ratos utilizados no estudo, ao fim do experimento (19° dia)

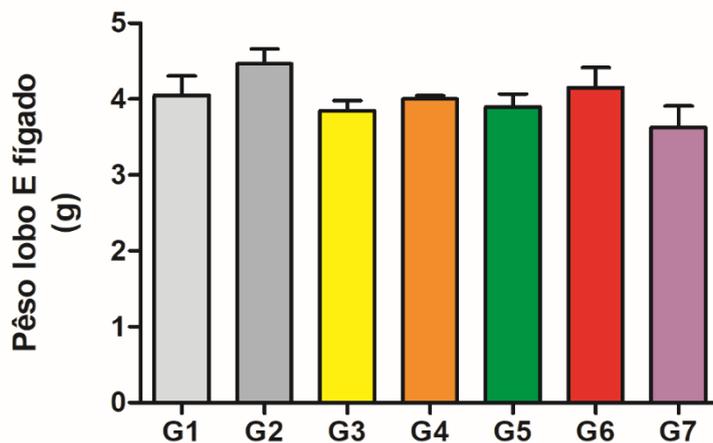
Tabela 2 – Peso do lobo esquerdo do fígado no 19° dia do experimento

Grupo	Peso (lobo Esquerdo)
G-1 - Salina	4,05 ± 0,26
G-2 - Diluente (CMC_Na)	4,46 ± 9,56
G-3 – CCM 100 mg	3,85 ± 9,37
G-4 – CCM 200 mg	4,00 ± 0,12
G-5 – EAc 100 Hz	3,90 ± 0,48
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	4,15 ± 0,75
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	3,63 ± 0,81

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 – Eletro-Acupuntura G6 – Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 2 - Variação de peso do lobo esquerdo do fígado no 19° dia do experimento



G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200

G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc

Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2022)

4.3 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nas concentrações de ALT no plasma

Houve redução significativa das concentrações de ALT plasmático nos animais dos grupos G2 ($p < 0,01$) e G3, G4, G5, G7 ($p < 0,001$), comparados ao controle G1. Houve redução significativa dos níveis de ALT plasmático nos animais dos grupos G3 ($p < 0,01$) e G4, G5 e G7 ($p < 0,001$), comparados ao G2. Não se observaram diferenças significantes nas concentrações de ALT plasmático do grupo G6, comparados aos controles G1/G2.

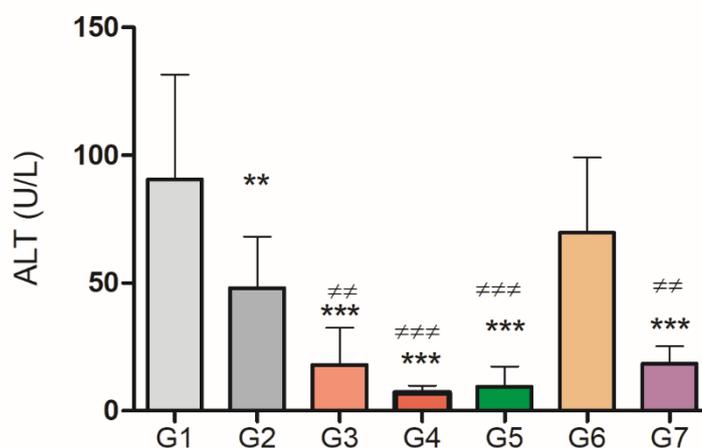
Tabela 3- Concentrações de ALT no plasma (U/L)

Grupo	ALT (U/L)
G-1 - Salina	90,50 ± 41,07
G-2 - Diluente (CMC_Na)	48,00 ± 20,17
G-3 – CCM 100 mg	18,00 ± 14,50
G-4 – CCM 200 mg	7,00 ± 2,89
G-5 – EAc 100 Hz	9,50 ± 7,98
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	58,38 ± 31,61
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	18,38 ± 6,97

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 – Eletro-Acupuntura G6 – Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 3 – Concentrações de ALT (U/L) no plasma



G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200 G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc
 ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao G1 ### $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado ao G2
 Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2021)

4.4 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nas concentrações de AST no plasma

Houve aumento significativo das concentrações de AST nos ratos do grupo G7 comparado ao controle G2 ($p < 0,01$).

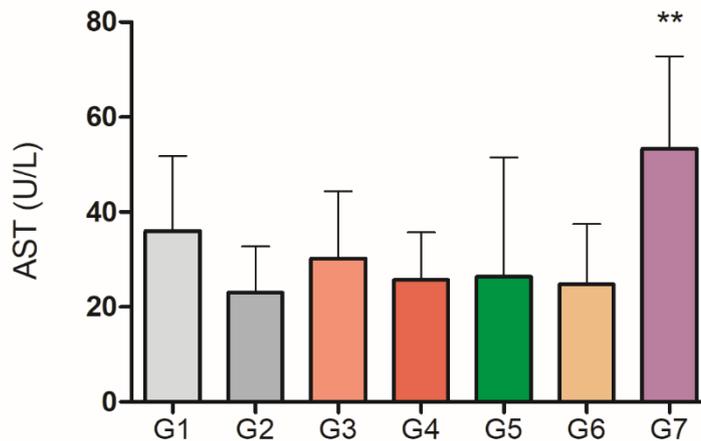
Tabela 4 - Concentrações de AST no plasma (U/L)

Grupo	AST (U/L)
G-1 - Salina	36,0 ± 15,9
G-2 - Diluente (CMC_Na)	23,0 ± 9,74
G-3 - CCM 100 mg	30,3 ± 14,2
G-4 - CCM 200 mg	25,7 ± 10,0
G-5 - EAc 100 Hz	26,4 ± 25,2
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	24,8 ± 12,7
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	53,4 ± 19,4

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 - Eletro-Acupuntura G6 - Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 4 – Concentrações de AST (U/L) no plasma



G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200 G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc

** $p < 0,01$ comparado ao G2

Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2021)

4.5 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura na razão AST:ALT

A razão AST:ALT foi > 1, nos grupos G3 (1,68), G4(3,67), G5 (2,78) e G7 (2,91).

Tabela 5 - Razão AST:ALT

Grupo	AST (U/L)	AST (U/L)	AST:ALT
G-1 - Salina	36,0	90,0	0,40
G-2 - Diluente (CMC_Na)	23,0	48,0	0,48
G-3 – CCM 100 mg	30,3	18,0	1,68
G-4 – CCM 200 mg	25,7	7,0	3,67
G-5 – EAc 100 Hz	26,4	8,50	2,78
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	24,6	69,63	0,36
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	53,4	18,38	2,91

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 – Eletro-Acupuntura G6 – Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

4.6 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nas concentrações de GGT no plasma

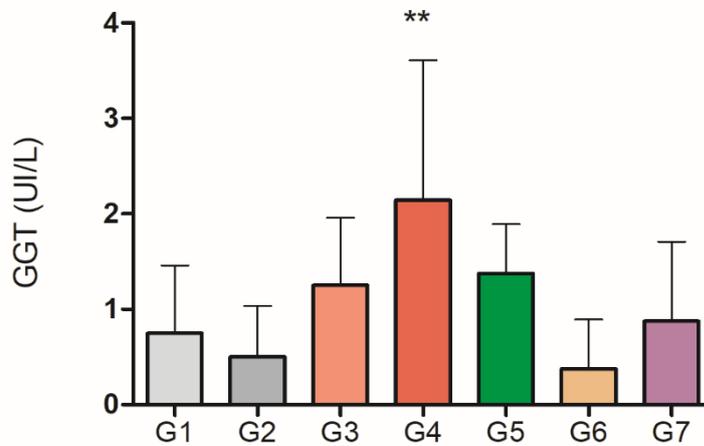
Houve aumento significativo das concentrações de GGT nos animais do grupo G4.

Tabela 6 - Concentrações de GGT (U/L) no plasma

Grupo	GGT (U/L)
G-1 - Salina	0,750 ± 0,707
G-2 - Diluente (CMC_Na)	0,500 ± 0,534
G-3 – CCM 100 mg	1,250 ± 0,707
G-4 – CCM 200 mg	2,143 ± 1,464
G-5 – EAc 100 Hz	1,375 ± 0,517
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	0,375 ± 0,517
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	0,875 ± 0,834

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 – Eletro-Acupuntura G6 – Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 5 – Concentrações de GGT (U/L) no plasma

G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200
 G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc
 ** $p < 0,01$ comparado ao G1/G2
 Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2021)

4.7 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nas concentrações de glicose no plasma

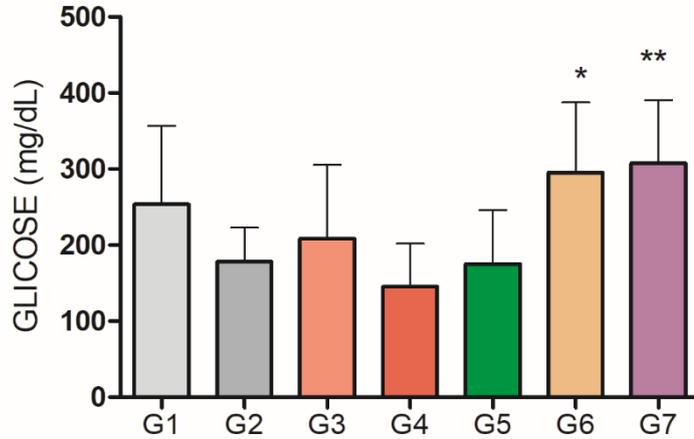
A concentração de glicose aumentou significativamente nos ratos dos grupos G6 ($p < 0,05$) e G7 ($p < 0,01$), quando comparados ao grupo G2.

Tabela 7 - Concentrações de Glicose no plasma (mg/dL)

Grupo	Glicose (mg/dL)
G-1 - Salina	253,5 ± 102,90
G-2 - Diluente (CMC_Na)	178,0 ± 45,00
G-3 - CCM 100 mg	208,5 ± 96,79
G-4 - CCM 200 mg	145,0 ± 57,03
G-5 - EAc 100 Hz	175,0 ± 70,97
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	295,4 ± 92,36
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	307,7 ± 82,82

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 - Eletro-Acupuntura G6 - Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 6– Concentrações de Glicose no plasma (mg/dL)

G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200
 G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado ao G2

Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2021)

4.8 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nas concentrações de NO_2 no fígado

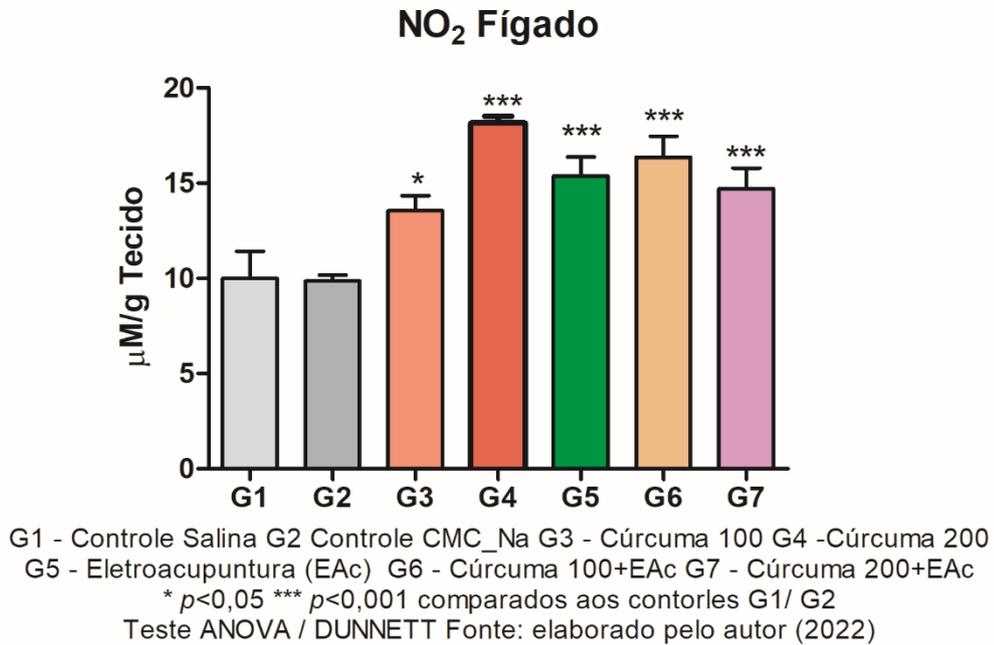
Houve aumento significativo das concentrações de NO_2 no tecido hepático nos grupos G3 ($p < 0,05$) e G4, G5, G6, G7 ($p < 0,001$), comparados aos controles G1 e G2. Não houve diferenças significativas entre os grupos controle G1 e G2.

Tabela 8 - Concentrações de NO_2 no fígado (μM)

Grupo	NO_2 (fígado) μM
G-1 - Salina	10,00 \pm 1,41
G-2 - Diluente (CMC_Na)	9,86 \pm 0,86
G-3 – CCM 100 mg	13,60 \pm 2,24
G-4 – CCM 200 mg	18,20 \pm 0,96
G-5 – EAc 100 Hz	15,40 \pm 2,82
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	16,40 \pm 3,10
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	14,70 \pm 3,04

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 – Eletro-Acupuntura G6 – Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 7 – Concentrações de NO₂ no tecido hepático (mg/dL)

4.9 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nas concentrações de GSH no fígado

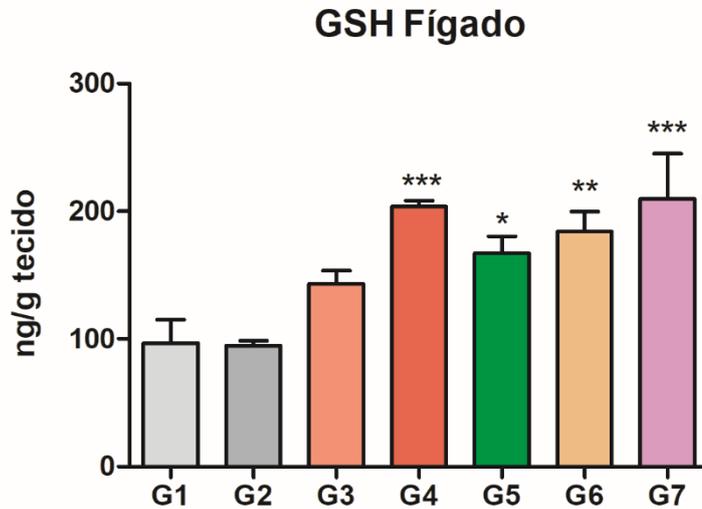
Houve aumento significativo das concentrações de GSH no tecido hepático dos grupos G4, G5, G6 e G7 comparados aos controles G1 e G2. . Não houve diferenças significativas entre os grupos controle G1 e G2.

Tabela 9 - Concentrações de GSH no fígado (µMol/g)

Grupo	GSH (µMol GSH/g)
G-1 - Salina	96,70 ± 18,50
G-2 - Diluente (CMC_Na)	94,70 ± 11,30
G-3 – CCM 100 mg	143,00 ± 29,50
G-4 – CCM 200 mg	204,00 ± 12,60
G-5 – EAc 100 Hz	167,00 ± 37,10
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	184,00 ± 44,70
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	210,00 ± 100,00

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 – Eletro-Acupuntura G6 – Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 8 – Concentrações de GSH no tecido hepático ($\mu\text{M/g}$)

G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200
 G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc
 * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ comparados aos controles G1/ G2
 Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2022)

4.10 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nas concentrações plasmáticas de GSH

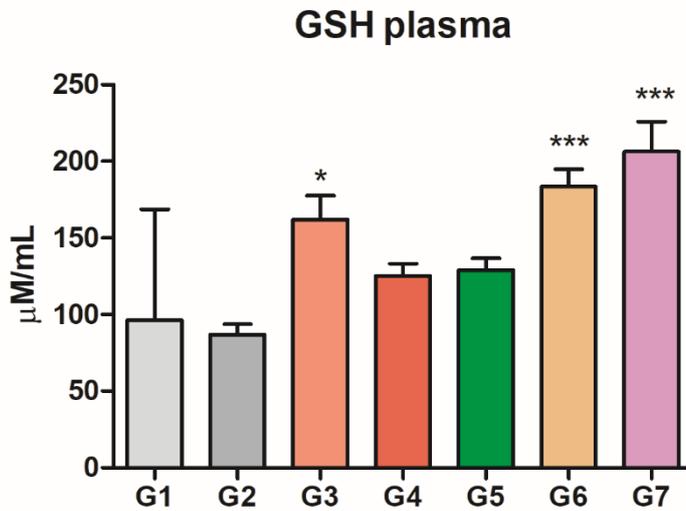
Houve aumento significativo nas concentrações plasmáticas de GSH nos grupos G3 ($p < 0,05$) e G6, G7 ($p < 0,001$) comparados ao G1 e G2.

Tabela 10 - Concentrações de GSH no plasma ($\mu\text{Mol GSH/mL}$)

Grupo	GSH ($\mu\text{Mol GSH/mL}$)
G-1 - Salina	96,3 \pm 72,4
G-2 - Diluente (CMC_Na)	86,8 \pm 19,3
G-3 – CCM 100 mg	162,0 \pm 44,4
G-4 – CCM 200 mg	125,0 \pm 20,7
G-5 – EAc 100 Hz	125,0 \pm 20,7
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	183,0 \pm 32,7
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	206,0 \pm 55,5

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 – Eletro-Acupuntura G6 – Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 9 – Concentrações de GSH no plasma ($\mu\text{M/ml}$)

G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200
 G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc
 * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ comparados aos controles G1/ G2
 Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2022)

4.11 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nas concentrações plasmáticas de TBARS

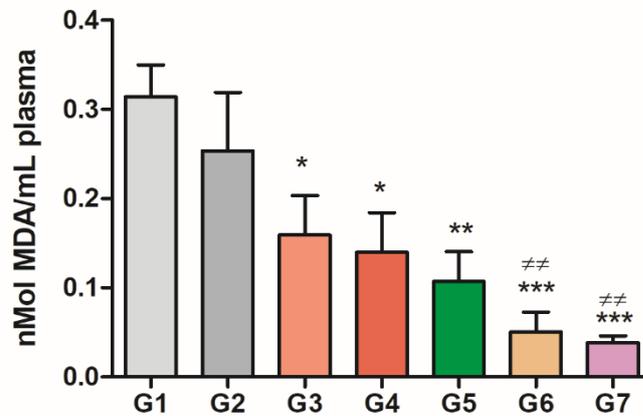
Houve diminuição significativa das concentrações plasmáticas de TBARS nos grupos G3 e G4 ($p < 0,04$), G5 ($p < 0,01$) e G6, G7 ($p < 0,001$) comparados ao controle G1 e nos grupos G6, G7 ($p < 0,01$) comparados ao controle G2.

Tabela 11 - Concentrações de TBARS no plasma ($\mu\text{Mol MDA/mL}$)

Grupo	TBARS ($\mu\text{Mol MDA/mL}$)
G-1 - Salina	0,31 \pm 0,10
G-2 - Diluente (CMC_Na)	0,25 \pm 0,18
G-3 – CCM 100 mg	0,16 \pm 0,13
G-4 – CCM 200 mg	0,14 \pm 0,12
G-5 – EAc 100 Hz	0,11 \pm 0,95
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	0,051 \pm 0,06
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	0,039 \pm 0,02

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 – Eletro-Acupuntura G6 – Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 10 - Concentrações de TBARS no plasma

G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200

G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ comparados ao controle G1 ≠ $p < 0,01$ comparado ao controle G2
 Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2022)

4.12 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nas concentrações hepáticas de TBARS

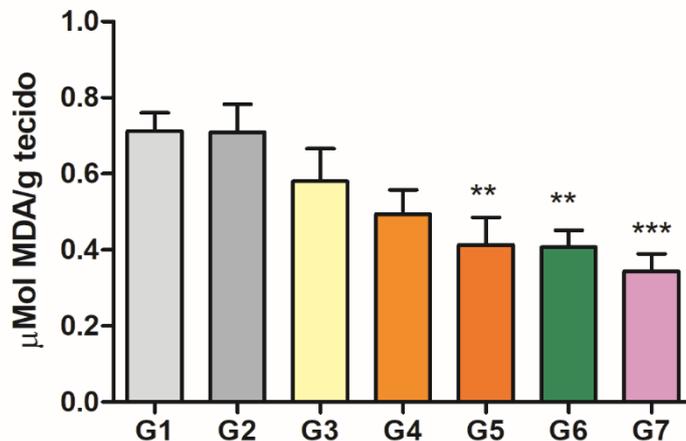
Houve diminuição significativa das concentrações hepáticas de TBARS nos grupos G5, G6 ($p < 0,01$) e G7 ($p < 0,001$) comparados aos controles G1 e G2.

Tabela 12 - Concentrações de TBARS no fígado ($\mu\text{Mol MDA/g}$)

Grupo	TBARS ($\mu\text{Mol MDA/g}$)
G-1 - Salina	0,712 \pm 0,14
G-2 - Diluente (CMC_Na)	0,709 \pm 0,21
G-3 – CCM 100 mg	0,581 \pm 0,24
G-4 – CCM 200 mg	0,494 \pm 0,17
G-5 – EAc 100 Hz	0,413 \pm 0,21
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	0,407 \pm 0,12
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	0,344 \pm 0,13

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 – Eletro-Acupuntura G6 – Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 11 - Concentrações de TBARS no fígado ($\mu\text{Mol MDA/g tecido}$)

G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200
 G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc
 ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ comparados aos controles G1 e G2
 Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2022)

4.13 Efeitos do tratamento com cúrcuma e eletroacupuntura nos níveis de atividade da MPO no fígado

Houve redução significativa da atividade da MPO no fígado dos ratos dos grupos G3 ($p < 0,05$), G4, G5, G6, G7 ($p < 0,001$) comparados ao controle G1 e nos grupos G4, G5, G6 ($p < 0,05$) e G7 ($p < 0,001$), comparados ao controle G2.

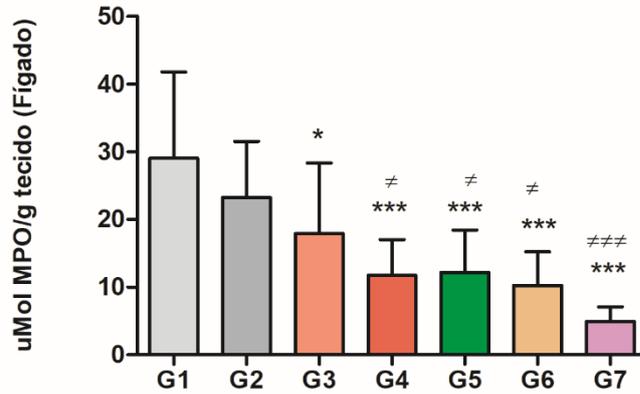
Tabela 13- Atividade de MPO no fígado ($\mu\text{Mol MPO/g}$)

Grupo	MPO ($\mu\text{Mol MPO/g}$)
G-1 - Salina	29,1 \pm 12,7
G-2 - Diluente (CMC_Na)	23,3 \pm 8,28
G-3 - CCM 100 mg	17,9 \pm 10,5
G-4 - CCM 200 mg	11,7 \pm 5,28
G-5 - EAc 100 Hz	12,2 \pm 6,25
G-6 -CCM 100mg+EAc 100 Hz	10,3 \pm 4,94
G-7 -CCM 200mg+EAc 100 Hz	4,94 \pm 2,14

G1 - Controle Salina G2 - Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 - Cúrcuma 200 G5 - Eletro-Acupuntura G6 - Cúrcuma 100 + Eletroacupuntura 100 Hz G7 - Cúrcuma 200 + Eletroacupuntura 100 Hz.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Gráfico 12 - Atividade de MPO no fígado ($\mu\text{Mol MPO/g tecido}$)



G1 - Controle Salina G2 Controle CMC_Na G3 - Cúrcuma 100 G4 -Cúrcuma 200

G5 - Eletroacupuntura (EAc) G6 - Cúrcuma 100+EAc G7 - Cúrcuma 200+EAc

* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ comparados ao controle G1 $\neq p < 0,05$ $\neq\neq p < 0,001$ comparados ao controle G2

Teste ANOVA / DUNNETT Fonte: elaborado pelo autor (2022)

5 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os possíveis efeitos protetores da curcumina administrada por via oral em doses crescentes (100 e 200 mg/Kg), isoladamente, ou combinada com a aplicação da EAc de alta frequência (100 Hz) nos acupontos E-36 e VB-34, usados na MTC para tratamento de distúrbios hepáticos.

O rato foi o animal selecionado para a realização do experimento. Animais aparentemente saudáveis foram tratados com altas doses de GM, um aminoglicosídeo capaz de produzir efeitos tóxicos em vários órgãos, notadamente, no fígado, no rim, no testículo e no ouvido e ainda hoje usado no tratamento de infecções por bactérias gram-negativas. Um dos animais (Grupo 3) teve morte súbita ao ser selecionado para receber a terceira dose de gentamicina. O antibiótico não foi aplicado. Acredita-se que possa ter sido decorrente do nível de estresse.

Durante o estudo os animais não exibiram sinais visíveis de intoxicação, mas dois ratos apresentaram diarreia passageira após a terceira dose de GM.

Ali, Abdel Gayoum e Bashir (1992) examinaram o efeito do tratamento de ratos com doses graduadas de GM sobre o peso corporal de ratos tratados com doses crescentes de GM (20, 40 e 80 mg/kg/dia por 6 dias) e constataram que houve redução do peso de maneira dose-dependente. As reduções de peso foram mais acentuadas nos dias 4, 5 e 6 do tratamento. Os pesos corporais se recuperaram gradualmente com a retirada da droga e, no dia 14, não eram significativamente diferentes dos controles.

Neste estudo, o peso médio dos ratos aumentou ao longo do experimento variando de 156,8 (dia 1) a 253,3 (dia 19). A análise dos valores obtidos na pesagem dos animais mostrou diferenças significantes ($p < 0,001$) entre os grupos tratamento e o G1 e nos grupos G6 e G7 quando comparados ao grupo controle G2. Ao final do experimento não foram verificadas diferenças significantes entre os pesos médios de cada grupo, denotando uniformidade da amostra.

O fígado, por ser o órgão central de desintoxicação no processo de remoção de toxinas e resíduos metabólicos, é extremamente sensível ao estresse oxidativo e a inflamação produzidos por essas substâncias (LI *et al.*, 2015). O estresse oxidativo promove alterações das moléculas biológicas (DNA, proteínas e lipídios) modulando vias biológicas associadas à transcrição de genes, expressão de proteínas, apoptose celular e ativação de células estreladas hepáticas (LI *et al.*, 2015). O

processo inflamatório, por sua vez, é um componente essencial da resposta imune e se manifesta pela infiltração de células inflamatórias no fígado. Por outro lado, quando esses estímulos são persistentes instala-se a lesão celular e acúmulo de lipídios, resultando em doenças hepáticas graves (ANDRADE *et al.*, 2015; ECKERT *et al.*, 2015; SEKI; SCHWABE, 2015)

Estudos experimentais, utilizando a GM têm sido usados para investigar seus efeitos hepatóxicos. A GM e outros aminoglicosídeos são altamente polares, não são absorvidos no trato intestinal, mas são rapidamente absorvidos após injeção intramuscular ou subcutânea. No presente estudo usou-se a via intraperitoneal. Essa via já foi utilizada por outros pesquisadores (NARAYANA, 2008; ALY, 2019).

A GM não atravessa a placenta nem a barreira hematoencefálica. Sua meia-vida é de 2-3 horas. Não há metabólitos conhecidos da GM (ALI, 1995) e a sua eliminação ocorre por filtração glomerular no rim (BENNETT, 1989).

Muitas plantas utilizadas como alimento e na medicina tradicional são capazes de produzir antioxidantes e compostos farmacologicamente ativos (BISWAS *et al.*, 2005; SUNDARAM; MITRA, 2007; VENKATANARAYANA *et al.*, 2012).

Palmatina é um alcalóide isoquinolina da classe das protoberberinas, muito utilizado na medicina tradicional da Ásia no tratamento de icterícia e doenças relacionadas ao fígado, hipertensão, inflamação e disenteria (TARABASZ; KUKULAKOCH, 2020).

Khaksari *et al.* (2021) investigaram os efeitos protetores da palmitina administrada a ratos intoxicados com GM e observaram redução da hepatotoxicidade e nefrotoxicidade pela inibição do estresse oxidativo e da apoptose nos animais tratados com a palmatina.

A timoquinona, o ingrediente ativo da *Nigella sativa*, é um potente anti-inflamatório (HOUGHTON *et al.*, 1995) e antioxidante (NAGI; MANSOUR, 2000). Outro estudo demonstrou seu efeito protetor na hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em camundongos (NAGI; MANSOUR, 2000).

Samuhasaneeto *et al.* (2009) estudaram os efeitos protetores da administração de curcumina em altas doses (400 ou 1.200 mg/kg) a ratos com hepatite alcoólica e verificaram que houve diminuição significativa do estresse oxidativo (redução dos níveis de MDA) e inibição da ativação de NF-kappa B.

Hegazy *et al.* (2018) estudaram os efeitos protetores do alecrim (*Rosmarinus*

officinalis) e do tomilho (*Thymus vulgaris*) em ratos intoxicados com GM aplicada por via intraperitoneal durante 10 dias, Os pesquisadores concluíram que o extrato aquoso desses vegetais produziu efeitos hepatoprotetores, com normalização das enzimas hepáticas plasmáticas (AST e ALT), nível de bilirrubina e concentração de proteína total em comparação ao grupo que recebeu apenas GM (HEGAZY *et al.*, 2018).

A curcumina é o principal pigmento amarelo encontrado no rizoma da *Curcuma longa* Linn., muito utilizado como um tempero e corante em vários alimentos, tais como curry e mostarda e batata frita bem como em cosméticos e medicamentos (AMMON; WAHL, 1991; JOE; VIJAYKUMAR; LOKESH, 2004). Entre seus efeitos farmacológicos destacam-se o anti-inflamatório (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009) e o antioxidante (OKADA *et al.*, 2001; MARCHIANI *et al.*, 2014). Diferentes mecanismos são ativados para que o efeito antioxidante ocorra. Segundo Menon e Sudheer (2007) a CCM pode eliminar radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), enquanto modula a atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxidodismutase (SOD) na neutralização de radicais livres (LIN *et al.*, 2007; MARCHIANI *et al.*, 2014). Enzimas geradoras de radicais livres, tais como a lipoxigenase/ciclooxygenase e a xantina hidrogenase/oxidase são inibidas pela CCM (LIN, 2007). O efeito antiinflamatório da curcumina é obtido, provavelmente, pela inibição da atividade da ciclooxygenase-2 (COX-2), da lipoxigenase (LOX) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), enzimas que medeiam os processos inflamatórios (MENON; SUDHEER, 2007). Finalmente, por ser um composto lipofílico, a CCM é um eficiente limpador de radicais peroxila (PRIYADARSINI *et al.*, 2003).

Serairi-Beji *et al.* (2018) investigaram os efeitos protetores da raiz de *Curcuma longa* em pó na hepatotoxicidade induzida por CCL₄ em ratos. Ratos intoxicados foram tratados com pó da raiz de *C. longa* duas vezes por semana, durante 4 semanas, administradas por gavagem. Houve redução do estresse oxidativo e das lesões celulares com diminuição da fibrose hepática.

Vários estudos mostraram que a EAc produz resultados mais consistentes e reprodutíveis que a acupuntura em estudos clínicos e de pesquisa e é eficaz para o controle da dor (BURNSTOCK, 2009), recuperação funcional do tecido (DING *et al.*, 2009) e imunomodulação (LIU *et al.*, 2013).

Segundo Sugai *et al.* (2004) a EAc pode ser utilizada no tratamento de

inúmeras doenças e para melhorar o funcionamento visceral autonômico. Baixas frequências (2 Hz) promovem a liberação de meta-encefalina, altas frequências (100 Hz) liberam dinorfina e frequências intermediárias (15 Hz) liberam uma mistura encefalinas e dinorfinas (ULETT; HAN, S.; HAN, J.S.,1998). Os efeitos produzidos pela EAc de baixa frequência são mediados por neurônios pós-ganglionares simpáticos, enquanto que os efeitos modulados pela EAc de alta frequência trafegam pelo eixo medular simpático-adrenal (KIM *et al.*, 2008).

A necrose hepatocelular pode ser avaliada pelos níveis de AST e ALT. Tanahashi *et al.* (2011) encontraram altos níveis de AST e ALT em ratos intoxicados com CCL₄. Quando os animais foram tratados, após intoxicação, com acupuntura no acuponto VB34 ocorreu uma redução significativa dos níveis de AST e ALT, comparados aos controles.

Goodarzi *et al.* (2019) realizaram uma metaanálise para avaliar a eficácia da suplementação da curcumina na alimentação de pacientes portadores de doença hepática não alcoólica e concluíram que essa substância tem efeitos protetores sobre a lesão hepática, com redução das concentrações séricas de ALT e AST.

No presente estudo, houve redução das concentrações plasmáticas de ALT em todos os grupos tratados com cúrcuma isoladamente ou combinada com EAc, exceto no G6, comparados aos controles G1 e G2, o que corrobora os resultados obtidos por outros pesquisadores (TANAHASHI *et al.*, 2011; GOODARZI *et al.* (2019). Por outro lado, houve aumento significativo das concentrações de AST no grupo G7 comparado ao controle G2 (53,40±19,40 vs. 23,00±9,74) demonstrando a presença de lesão hepática. Não foram observadas diferenças nos demais grupos. A razão AST:ALT foi > 1, nos grupos G3 (1,68), G4(3,67), G5 (2,78) e G7 (2,91), demonstrando a presença de lesões hepatocelulares.

O dano da membrana do hepatócito decorrente da ação tóxica da GM com aumento da permeabilidade provoca a liberação das enzimas hepáticas em grande quantidade. Enzimas hepáticas podem ser encontradas no citoplasma; após a lesão hepática há elevação dos níveis plasmáticos de ALT e AST em decorrência de alterações da permeabilidade da membrana dos hepatócitos (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005). Segundo Paknejad *et al.* (2006) e necrose da membrana não é condição necessária para que ocorram alterações nos níveis das enzimas hepáticas sugerindo que pode haver uma baixa correlação entre a necrose e o nível de aminotransferases.

O acuponto E-36 tem indicação terapêutica no tratamento das doenças digestivas (SONG *et al.*, 2014). Shi *et al.* (2008) estudaram os efeitos da EAc de baixa e alta frequências sobre os níveis de ALT e AST em ratos com lesão hepática provocada por endotoxina e verificaram que houve diminuição dos níveis das enzimas nos animais tratados com 2 e 100 Hz. No presente estudo, o uso da EAc combinada com a administração de cúrcuma após a indução da lesão, foi incapaz de reduzir os níveis de AST ($53,40 \pm 19,40$ vs. $23,00 \pm 9,74$), comparado ao controle G2. Com exceção do grupo G6, todos os demais apresentaram uma redução dos níveis de ALT quando comparados aos controles, demonstrando uma ação hepatoprotetora da cúrcuma e da EAc.

Whitfield (2001) realizou uma extensa revisão sobre o papel da enzima Gamaglutamil transferase (GGT) como um marcador de disfunção hepática e de consumo de álcool. Além disso, o pesquisador descreveu as consequências da elevação dos níveis de GGT em associação com risco de doença cardíaca coronária, diabetes tipo II e acidente vascular cerebral. Níveis elevados de GGT contribuem para a atividade pró-oxidante, particularmente na presença de ferro ou cobre (CORTI *et al.*, 2009). Segundo Kornig e Seneff (2015) defesas antioxidantes baixas (níveis reduzidos de GSH) estão correlacionadas com GGT, níveis particularmente reduzidos de glutathiona. A presença de GGT é necessária para metabolizar xenobióticos glutathionilados no fígado e vários outros tecidos e vários outros tecidos, incluindo os pulmões.

No presente estudo, os níveis de GGT permaneceram estáveis, exceto no grupo G4, onde se constatou aumento significativo, comparado aos controles G1 e G2. Esta estabilidade, com controle do nível de GGT na maior parte dos grupos, sugere um efeito protetor da terapêutica utilizada (cúrcuma associada ou não com a EAc).

Leung *et al.* (2016) trataram ratos naturalmente hipertensivos com eletroacupuntura 2 Hz aplicada nos acupontos E-36 e LR-3 durante 5 dias por semana, durante 6 semanas, e observaram redução da pressão arterial e do estresse oxidativo com aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico.

Villegas-Bastida *et al.* (2014) trataram ratos em modelo de sepse induzida por ligadura e punção do ceco. A estimulação elétrica foi aplicada bilateralmente no acuponto E36, utilizando uma corrente de 40 Ma e frequência de 30Hz e concluíram que este procedimento reduz a inflamação sistêmica. Houve redução significativa

das concentrações séricas de TNF, IL-6 e nitrito nos ratos tratados, quando a integridade do nervo vago foi preservada. Esses resultados não foram observados em ratos submetidos a vagotomia infradiafragmática.

Costa (2019) tratou ratos intoxicados com altas doses de acetaminofeno e posteriormente os submeteu ao tratamento com eletroacupuntura 100 Hz (agulhas aplicadas nos acupontos VB-34, E-36, BP-6 e R-3) durante 8 dias, constatando aumento significativo das concentrações de NO₂, comparado aos controles, efeito que não foi observado nos ratos tratados com eletroacupuntura de baixa frequência (2 Hz).

No presente estudo utilizou-se a EAc 100 Hz e os resultados foram semelhantes aos encontrados por Costa (2019), com aumento significativo dos níveis de NO₂ nos ratos tratados com EAc (Grupos G5, G6 e G7). Embora a cúrcuma tenha um poderoso efeito antioxidante, a dose de 100mg/kg não foi capaz de impedir o aumento do NO₂.

O tratamento com cúrcuma (200mg/Kg) isoladamente ou combinado com EAc 100 Hz (Grupos G4 e G7) induziu aumento significativo das concentrações de GSH no tecido hepático e no plasma dos ratos intoxicados com GM. Em termos percentuais o aumento da concentração tecidual do GSH variou de 73% (G-4) até 117% (G-7). O mesmo efeito foi observado nos animais tratados com menores doses de cúrcuma (100mg/Kg) combinado com a EAc 100 Hz. Semelhante resultado foi observado no plasma, com aumento dos níveis de GSH nos mesmos animais e ainda no grupo G3, onde os animais foram tratados com cúrcuma 100mg/Kg, ocorrendo um aumento dos níveis de GSH (68% em relação ao controle G-1), comprovando o efeito protetor, antioxidante, da cúrcuma e da EAc. Observa-se que o efeito protetor foi maior nos ratos que receberam maior dose de cúrcuma. O uso da EAc ou da cúrcuma também promoveu ação antioxidante, embora em menor proporção.

Resultado semelhante foi obtido por Lima *et al.* (2012) que estudaram os efeitos da EAc em retalhos cutâneos de ratos submetidos a isquemia-reperfusão. A aplicação de estímulos elétricos (EAc) no dorso dos animais, em apenas duas sessões, nos dias 3 e 7 do experimento, proporcionou redução do estresse oxidativo com aumento dos níveis de GSH e diminuição da atividade da MPO. Houve ainda aumento dos níveis de MDA apenas no grupo 4, tratado com EAc 100 hz. Santos *et al.* (2014) utilizaram estímulos elétricos de 2 e 100 Hz em ratas com estresse

oxidativo e encontraram aumento do nível de GSH no plasma dos animais.

No presente estudo, em relação aos níveis plasmáticos de TBARS, observou-se diferença significativa nos grupos G3-G7 comparados ao controle G1 e nos grupos G-6 e G-7 comparados ao controle G-2. Verificou-se que o tratamento com cúrcuma isoladamente ou combinada com a EAc promoveu redução significativa do estresse oxidativo em percentuais variando de 48% (G-3) a 87% (G-7) no tecido hepático. Resultado ainda mais marcante foi observado no plasma onde os percentuais de redução variaram de 23% (G-3) a 107% (G-7). A combinação cúrcuma 200mg+EAc foi a mais eficiente na redução do estresse oxidativo no tecido hepático e no plasma.

Estudo apresentado por Silva *et al.* (2011) onde os ratos foram eletroestimulados com 100 Hz, em sessão única, durante 30 minutos, foi observado um aumento significativo da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo. A explicação para esse resultado diametralmente oposto, parece ter relação com o tempo de estimulação, vez que durou 30 minutos, o dobro do tempo de aplicação usado no presente estudo. O acuponto E-36 é tradicionalmente utilizado para diminuir a inflamação (XIA; GUAN; YANG, 2014). Várias pesquisas em modelos animais de inflamação confirmam os efeitos anti-inflamatórios da EAc aplicada no acuponto E-36. Yim *et al* (2007) observou diminuição de TNF- α e níveis de interleucina-6 em modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos. Gu *et al.* (2011) demonstraram que a aplicação de EAC no acuponto E-36 teria efeito nefroprotetor decorrente da diminuição os níveis de TNF- α e interleucina-1 em modelo de nefrite aguda induzida por lipopolissacarideo diminuía a expressão de citocinas inflamatórias em modelo animal de inflamação induzida por carragenina.

Níveis elevados de MPO no plasma e nos tecidos foram detectados em muitos distúrbios inflamatórios. Segundo Rehring *et al.* (2021) evidências emergentes indicam que a MPO pode modular diretamente a função celular e as respostas imunes, tornando-a um biomarcador de doenças atraente e um alvo terapêutico. A inflamação pode ser também avaliada pelos níveis de citocinas. Shi *et al.* (2008) usando EAc (2 e 100 Hz) em E-36 e Yu *et al.* (2014), usando frequências mais baixas (2Hz e 15Hz) reduziram o conteúdo de TNF-a e IL-6 no tecido em seus modelos de lesão. Uma redução significativa da atividade de MPO foi observada usando EAc em E-36 e BP-6 em ratos (SILVA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2014). Costa (2019) estudou os efeitos da intoxicação por altas doses de paracetamol em

ratos tratados com acupuntura nos acupontos E-36, VB-34 e outros e constatou diminuição da inflamação no fígado nos modelos de pre e pos-condicionamento.

Aktas e Yildiran (2020) estudaram os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios da curcumina em ratos sépticos. A curcumina foi administrada por gavagem 3 horas antes da indução da sepse por punção e ligadura do ceco. Após 24 horas houve redução significativa dos níveis de MDA e MPO nos ratos tratados com curcumina, confirmando o efeito antioxidante. O efeito antiinflamatório foi verificado pela redução do nível de iNOS no pulmão dos animais.

No presente estudo houve redução significativa dos níveis de MPO em todos os grupos estudados, confirmando o efeito anti-inflamatório da cúrcuma e da EAc.

6 CONCLUSÃO

1. A administração de altas doses de gentamicina por via intraperitoneal durante cinco dias promove alterações oxidativas e inflamatórias no fígado de ratos sadios.
2. A GM administrada durante 5 dias por via intraperitoneal promove alterações oxidativas no plasma de ratos sadios.
3. A cúrcuma administrada por gavagem a ratos previamente sadios promove a redução do estresse oxidativo e da inflamação induzidos por gentamicina.
4. A EAc promove a redução do estresse oxidativo e da inflamação induzidos por gentamicina no fígado e plasma de ratos.
5. A associação da cúrcuma com EAc 100 Hz promove uma redução do estresse oxidativo e da inflamação no fígado e no plasma de ratos Wistar submetidos ao modelo de lesão por gentamicina.

REFERENCIAS

- ADEMILUYI, Adedayo O. *et al.* Modulatory effects of dietary inclusion of garlic (*Allium sativum*) on gentamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats, **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.3, n.6, p. 470-5, Jun 2013.
- AGGARWAL, Bharat B.;HARIKUMAR, Kuzhuvelil, B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemical Cell Biology**, v.41, n.41, p.40-59, Jan 2009.
- AGNER, K. Verdoperoxidase: A ferment isolated from leucocytes. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 2, p.1-64, 1941.
- AKTAS, E.; YILDIRAN, E. Antioxidant and antiinflammatory efficacy of curcumin on lung tissue in rats with sepsis. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v.40, n.5, p. 820-826, Oct 2020.
- ALHUSAINI, Ahlam *et al.* Curcumin Ameliorates Lead-Induced Hepatotoxicity by Suppressing Oxidative Stress and Inflammation and Modulating Akt/GSK-3_β Signaling Pathway. **Biomolecules**. v.9, p.703-720, 2019.
- ALY, Haa. Testicular toxicity of gentamicin in adult rats: Ameliorative effect of lycopene. **Human & Experimental Toxicology**, v.38, n.11, p.1302-1313, Nov 2019.
- ALI, B.H.; ABDEL-GAYOUM, A.A.; BASHIR, A.A. Gentamicin Nephrotoxicity in Rat: Some Biochemical Correlates. **Pharmacology & Toxicology**, v.70, n.6, p.419-23, Jun 1992.
- ALI, B.H. Gentamicin Nephrotoxicity in Humans and Animals: Some Recent Research. **General Pharmacology**, v.26, n.7, p. 1477-1487, 1995.
- AMMON, H.P., WAHL, M.A. Pharmacology of *Curcuma longa*. **Planta Medica**, v.57, p.: 1- 7,1991.
- ANAND, Preetha *et al.* Bioavailability of curcumin: Problems and promises. **Molecular Pharmacology**, v. 4, p. 807–818, 2007.
- ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Disponível em: SciELO Books <http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-03.pdf>
- ANDRADE, Kivia Queiroz de *et al.* Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 30269–30308, 2015.
- BALDRY, Peter E. **Acupuntura, pontos-gatilho e dor musculoesquelética: enfoque científico da acupuntura para ser usado por médicos e fisioterapeutas no diagnóstico e controle da dor de ponto-gatilho miofascial**. São Paulo: Roca, 2007.

486 p.

BARREIROS, André, L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENNETT, W.M. Mechanisms of aminoglycoside nephrotoxicity. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.16, p. 1-6, 1989.

BISWAS, Subrata Kumar. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.p.5698931, 2016.

BISWAS, Subrata Kumar *et al.* Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NFkappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.7, p. 32-41, 2005.

BURNSTOCK, Geoffrey. Acupuncture: a novel hypothesis for the involvement of purinergic signalling, **Medical Hypotheses**,v.4f, n.1, p. 140–142, 2009.

BUSSE, Hans-Jürgen; WÖSTMANN, Claudia; BARKER, Evert P. The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins. **Journal of General Microbiology**,v.138, n.3, p.551-61, Mar 1992.

CAI, Y. *et al.* Curcumin Protects Against Intestinal Origin Endotoxemia in Rat Liver Cirrhosis by Targeting PCSK9. **Journal of Food Sciences**, v. 82, n.3, p. 771-80, 2017.

CAROCHO, Marcio; FERREIRA, Isabel. C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15. 2013.

CAMERON, Michelle H. **Physical Agents in Rehabilitation**: from research to practice. 2^a ed. St. Louis: Saunders-Elsevier; 2003.

CHAMBERS, Henry F. **Aminoglicosídeos**. In: Brunton, Larence L, Lazo J.S., Parker K.L, organizadores. Goodman E. Gilman. As bases farmacológicas de terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill 2006; p.1039-54.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**., v.111, n.11, p. 918-31, Dec.1989.

COSTA, G. T. **Modelo murino de lesão hepática e renal induzida por acetaminofeno**: efeitos da silimarina, glutamina, acupuntura e eletroacupuntura. 2019. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de

Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

CRUZ, Wilton A. Silva; CAMPA, Adriana. **Atividade de mieloperoxidase e formação de oxigênio singlete em monócitos, macrófagos e células dendríticas: localização versus atividade.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF). Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, Brasil, Ago 2009.

DAVIS, Brian D. Mechanism of Bactericidal Action of Aminoglycosides. **Microbiological Reviews.** v.51, n.3 p. 341-350, Sep 1987.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology;** v.257: p. L163-73. 1989.

DING, Ying *et al.* Electro-acupuncture promotes survival, differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells as well as functional recovery in the spinal cord transected rats. **BMC Neuroscience**, v.10, article f5, Jul. 2009.

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

ECKERT, Christoph *et al.* The complex myeloid network of the liver with diverse functional capacity at steady state and in inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, article 179, Apr 2015.

ELLMAN, G.L, Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.82. n.1. p.70-7, Mai 1959.

SHANNAN, Tujios; FONTANA, Robert J. Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. **Nature Reviews – Gastroenterology and Hepatology**, v.8, p.202-11, 2011.

GHANI, Ahsan, *et al.* Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry** , v.230, p. 195-207, Feb 2017.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.127, n.2-3, p. 321-6, 1995.

GHORBANI, Zeinab; HEKMATDOOST, Azita; MIRMIRAN, Parvin. Anti-Hyperglycemic and Insulin Sensitizer Effects of Turmeric and Its Principle Constituent Curcumin. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, Irã, v. 12, n.4, p. 1- 9, 2014.

GIANNINI, Edoardo G.;TESTA, Roberto; SAVARINO, Vincenzo. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ**, v.172, n.3, p.367-79, 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.

GOODARZI, Reza *et al.* Does turmeric/curcumin supplementation improve serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Phytotherapy Research**, v.33, n.3, p. 561-570, Mar 2019.

GREEN, L.C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. v.126, n.1, p.131-138, 1982.

GUTTERIDGE, John M.C.; HALLIWELL Barry. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.502, n.2, p. 183-186, Jul 2018.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidantes and human disease: Curiosity, cause or consequence. **Lancet**, v.344, p.721-24, 1994.

HALLIWELL, Barry.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.

HAN J.S, *et al.* High and low frequency electroacupuncture analgesia are mediated by different opioids peptides. **Sheng Li Xue Bao**, v.41, n.4, p.416-20, Aug. 1989.

HE, Y.*et al.* Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked? **Molecules**, v.20, p. 9183-9213, 2015.

HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.107, p.40, 1986.

HEGAZY, A.M. *et al.* Hypolipidemic and hepatoprotective activities of rosemary and thyme in gentamicin-treated rats. **Human and Experimental Toxicology**, v.37, n.4, p. 420-430, Apr 2018.

HEWLINGS, Susan J.; KALMAN, Douglas S. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, v.6, n.92, 2017.

HOUGHTON, P.J. *et al.* Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. **Planta Medica** 1995; v.61, p. 33-36, 1995.

HU, Sen *et al.* Electroacupuncture at Zusanli (ST36) Prevents Intestinal Barrier and Remote Organ Dysfunction following Gut Ischemia through Activating the Cholinergic Anti-Inflammatory-Dependent Mechanism **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 2013-04-04, v.2013, p.592127-10, 2013.

HWANG, Y.C; EGERBACHER, M. Anatomia e classificação dos acupontos. In: SHOEN, Allen M. **Acupuntura veterinária**. Da arte antiga à medicina moderna 2.ed. São Paulo: Roca, 2006. p.17-23.

JOE, B.; VIJAYKUMAR, M.; LOKESH, B.R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. **Critical Review in Food Sciences and**

Nutrition,v.44,n. 2,p. 97-111, 2004.

KATSORI, Anna-Maria *et al.* Inhibition of NF-kB signaling pathway by a Novel Heterocyclic curcumin Analogue. **Molecules**, v.20, n.1, p. 863-878, Jan 2015.

KETTLE, Anthony J.; WINTERBOURN, Cristine C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production, **Redox Report**, v.3, n. 1, p. 3-15, 1997.

KHAKSARI, Mehdi *et al.* Palmatine ameliorates nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by gentamicin in rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v.127,n.3,p.273-278, Jun 2021.

KIM, Hyun-Woo *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 Research Bulletin.**, v. 75, n. 5, p. 698-705, Mar. 2008.

KLEBANOFF, Seymour J. *et al.* Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms, **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n.2, p.185-198, 2013.

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

LIMA, Lorena Picanço *et al.* Electroacupuncture attenuates oxidative stress in random skin flaps in rats. **Aesthetic Plastic Surgery.**, v.36, n.5, p.1230-35, Out. 2012.

LOZANO-LANAGRÁN, Marta. *et al.* Hepatotoxicity in 2011 – advancing resolutely. **Revista española de enfermedades digestivas.** v.103, n.9, p.472-79, 2011.

LEONARDUZZI Gabriella; SOTTERO, Barbara; POLI, Giuseppe. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. **Pharmacology and Therapeutics**, v.128, p. 336, 2010.

LI, R. *et al.* Metabolic and pharmacokinetic studies of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in mice tumor after intragastric administration of nanoparticle formulations by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.879, p.2751–2758, 2011.

LI, Sha *et al.* The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n.11, p.26087-124, Nov 2015.

LI, Yesheng *et al.* Protective effect of electro-acupuncture on liver ischemia-reperfusion injury in rats. **Experimental And Therapeutic Medicine.** v.16, p.1373-80, 2018.

LIN, Jen-Kun. Molecular targets of curcumin. **Advances in Experimental Medicine**

and Biology, v.595, p.227-43, 2007.

LIN, Yvonne G. et al. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor- κ B pathway. **Clinical Cancer Research.**, v.13, p. 3423-3430, 2007.

LIU, Yumei *et al.* The mechanism of effective electroacupuncture on T cell response in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. **PLoS ONE**, v.8, n.1, Article ID e5154f, 2013.

MACIOCIA, Giovanni. **Os fundamentos da medicina chinesa**: um texto abrangente para acupunturistas e fisioterapeutas. São Paulo: Roca, 2007. 1000 p.

MAGDER, Sheldon. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical Care**, v.10, p. 208, 2006.

MARCHIANI, A. *et al.* Curcumin and curcumin-like molecules: From spice to drugs. **Current Medicinal Chemistry**. v.21, p. 204-222, 2014.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, p. 711-60, 1983.

MENON, Venugopal P.; SUDHEER, Adluri Ram. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.595, p.105-25, 2007.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86, n.1, p. 271-8, May 1978.

NAGI, M.N.; MANSOUR, M.A. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. **Pharmacological Research**, v.41, p. 283-289, Mar 2000.

NARAYANA, Kilarkaje. An aminoglycoside antibiotic gentamicin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. **Journal of Toxicological Sciences**, v.33, n.1. p.85-96, 2008.

NAUSEEF, W. M.; MALECH, H. L. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. **Blood**, v.67, p.1504-1507, 1966.

Nossa Capa: Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **Jornal de Patologia Brasileira e Medicina Laboratorial**, v.45, n.5, Out 2009.

OHKAWA. H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p.351-8. Jun 1979.

OKADA, K. *et al.* Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.2090-2095, Aug. 2001.

OLIVEIRA, João Fernando Picollo; CIPULLO, José; BURDMANN, Emmanuel A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v.21, n.4, p. 444-452, 2006.

OLIVEIRA, Monique Cristine de; SCHOFFEN, João Paulo Ferreira. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

PAKNEJAD, Mojgan *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.

PRIYADARSINI, Indira K. *et al.* Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. **Free radical biology & medicine**, v.35, p.475-484, 2003.

PRIYADARSINI, Kavirayani Indira. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v.19, p. 20091-20112, 2014.

RAYNER, Benjamin S.; LOVE, Dominic T.; HAWKINS, Clare L. Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells, **Free Radical Biology and Medicine**, v.71, p. 240-255, 2014.

REHRING, Jacob F. *et al.* Released Myeloperoxidase Attenuates Neutrophil Migration and Accumulation in Inflamed Tissue. **Frontiers of Immunology**, v.20, n.12, p.654259, Apr 2021.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 1991;151-70.

RUSSMANN, Stefan; KULLAK-UBLICK Gerd A; GRATAGLIANO, Ignazio. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p.3041-53, 2009.

SAHEBKAR, Amirhossein *et al.* Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Functional Foods**, v.18, p. 898-909, 2015.

SAMUHASANEETO, Suchitra *et al.* Curcumin decreased oxidative stress, inhibited NF-kappa B activation, and improved liver pathology in ethanol-induced liver injury in rats. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, p.981963. Jul 2009.

SANTOS, Elba L. *et al.* Effects of acupuncture and electroacupuncture on estradiol-induced inflammation and oxidative stress in health rodents. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 28, n. 8, p.582-8, Aug 2013.

SCHOEN, Allen M. **Acupuntura veterinária: da arte antiga à medicina moderna**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2006, p.91-108.

SCHULTZ.; KARNINKER, K. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. I. Content and localization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 96, p. 465-7, Mar 1962.

SEKI, Ekihiro; SCHWABE, Robert F. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. **Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 1066–1079, 2015.

SERAIRI-BEJI, Raja *et al.* Does *Curcuma longa* root powder have an effect against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats: a protective and curative approach. **Food Science Biotechnology**, v.28, n.1, p.181-189, Aug. 2018.

SHARMA, Ricky A. *et al.* Phase I clinical trial of oral curcumin: Biomarkers of systemic activity and compliance. **Clinical Cancer Research**., v.10, p. 6847–6854, 2004.

SHEHZAD, Adeeb; WAHID, Fazli.; LEE, Young Sup. Curcumin in cancer chemoprevention: Molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. **Archiv der Pharmazie**. v.343, p.489–499, 2010.

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.

SILVA Agamenon Honório *et al.* Electroacupuncture attenuates liver and kidney oxidative stress in anesthetized rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.26 Suppl 1, p.60-5. 2011.

SONG, Xiao-Jing, *et al.* Investigation of hepatic blood perfusion by laser speckle imaging and changes of hepatic vasoactive substances in mice after electroacupuncture. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

SUETH-SANTIAGO, Vitor *et al.* Curcumina, o pó dourado do açafão-da-terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, Seropédica, v.38, n.4, 2015.

SUGAI, Gisele C.M. *et al.* Serotonin involvement in the electroacupuncture- and moxibustion-induced gastric emptying in rats. **Physiology & Behavior**, v. 82, n. 5, p. 855861, Out. 2004.

SUNDARAM, R.; MITRA, S.K. Antioxidant activity of ethyl ether acetate soluble fraction of *Acacia Arabica* bark in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v.39, p. 33-38, 2007.

SVILAR, David *et al.* Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. **Antioxidantes & Redox Signaling**, v.14, n.12, p.2491-507, Jun 2011.

TAKAHASHI, Mao *et al.* Effects of Curcumin Supplementation on Exercise Induced Oxidative Stress in Humans. **International Journal of Sports Medicine**, Germany, v.5, n.5, p. 469-475, 2013.

TANAHASHI, N. *et al.* Effects of manual acupuncture at GB34 on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**. v.4, n.4, p.214-9, Dec 2011.

TARABASZ, Dominik; KUKULA-KOCH, Wirginia. Palmatine: A review of pharmacological properties and pharmacokinetics. **Phytotherapy Research**, v.34, n.1, p.33-50, Jan. 2020.

ULETT, G.A.; HAN, S.; HAN, J.S. Electroacupuncture: mechanisms and clinical application. **Biological Psychiatry**, v.44, n.2, p.129-38. Jul 1998.

VENKATANARAYANA, G. *et al.* Protective effects of curcumin and vitamin E on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats. **EXCLI Journal**, v.11, p. 641-650, 2012.

VILLEGAS-BASTIDA, Albino *et al.* Electrical Stimulation at the ST36 Acupoint Protects against Sepsis Lethality and Reduces Serum TNF Levels through Vagus Nerve- and Catecholamine-Dependent Mechanisms. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, p.451674, 2014.

WHITFIELD, John B. Gamma glutamyl transferase. **Critical Review of Clinical Laboratory Science**, v.38, n.4, p. 263,355, Aug. 2001.

YANG Kuo-Yi *et al.* Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 853, n.1-2, p. 183-189, Mar 2007.

YIN, Chang Shik *et al.* A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research in Veterinary Science**. v. 84, p.159–165, 2008.

APÊNDICE A DADOS BRUTOS

PESO INICIAL DOS RATOS (dia 1 do experimento)

GRUPOS

Animais	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Rato 1	136,5	117,3	169,2	182,7	162,1	208,0	201,8
Rato 2	134,0	119,4	170,1	180,4	179,3	193,5	193,7
Rato 3	101,3	150,0	155,6	178,7	168,2	118,5	149,0
Rato 4	105,2	157,0	150,8	179,5	159,7	115,2	131,8
Rato 5	102,8	113,8	168,2	135,3	174,9	240,3	184,3
Rato 6	108,0	140,4	178,3	152,1	178,2	163,1	204,0
Rato 7	96,9	131,0	173,7	147,0	151,1	195,7	158,7
Rato 8	102,1	142,7	182,4	(*)	155,4	203,2	166,9

G1=Salina, G2=CMC_Na, G3=CCM100 G4=CC200 G5=EE100 G6=CCM100EE G7=CCM200EE

(*) Morte súbita, no terceiro dia do experimento, antes da aplicação da terceira dose de Gentamicina

PESO FINAL DOS RATOS (dia 19 do experimento)

GRUPOS

Animais	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Rato 1	260,0	242,8	227,0	252,0	227,0	267,7	280,4
Rato 2	261,0	239,5	254,0	257,0	254,0	243,4	271,5
Rato 3	249,3	274,0	249,0	246,0	249,0	247,0	285,5
Rato 4	247,0	313,7	241,0	260,0	241,0	230,7	262,5
Rato 5	233,8	227,4	266,0	217,0	266,0	238,6	328,3
Rato 6	266,0	281,4	276,0	231,0	276,0	260,0	276,2
Rato 7	214,0	216,7	222,0	210,0	222,0	295,6	256,1
Rato 8	250,0	316,7	238,0	(*)	238,0	242,5	236,3

G1=Salina, G2=CMC_Na, G3=CCM100 G4=CC200 G5=EE100 G6=CCM100EE G7=CCM200EE

(*) Morte súbita, no terceiro dia do experimento, antes da aplicação da terceira dose de Gentamicina

APÊNDICE B

PESO DOS ÓRGÃOS (**LOBO ESQUERDO DO FÍGADO**) DOS RATOS NO DIA 19 DO EXPERIMENTO

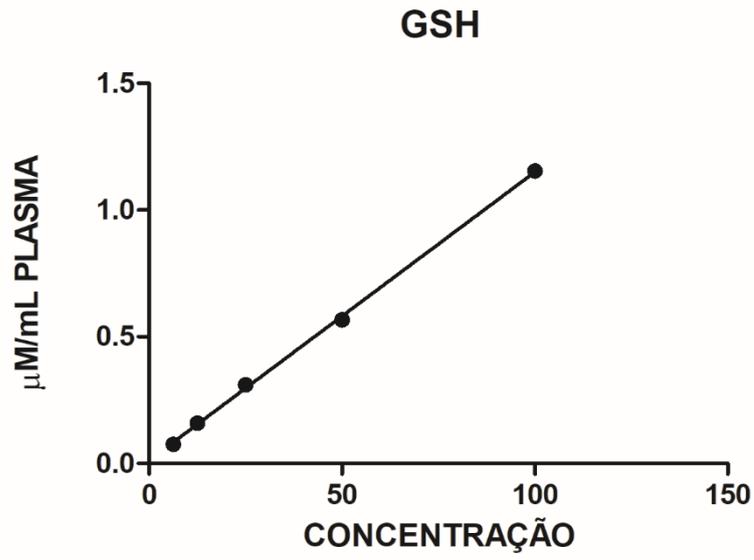
Animais	GRUPOS						
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Rato 1	4,2	4,5	4,5	4,1	3,3	4,9	2,9
Rato 2	4,2	3,9	3,5	4	3,7	4,9	3,9
Rato 3	4,2	4,4	4	3,9	4,2	3,6	3,7
Rato 4	3,5	5,2	4	4	3,8	3,5	2,8
Rato 5	4,1	4,9	3,6	3,8	4,6	3,5	5,3
Rato 6	4,3	4,2	3,3	4,1	4,5	5,3	3,9
Rato 7	3,9	3,6	3,9	4,1	3,6	3,7	3,5
Rato 8	4	5	4	(*)	3,5	3,8	3

G1=Salina, G2=CMC_Na, G3=CCM100 G4=CC200 G5=EE100 G6=CCM100EE G7=CCM200EE

(*) Morte súbita, no terceiro dia do experimento, antes da aplicação da terceira dose de Gentamicina

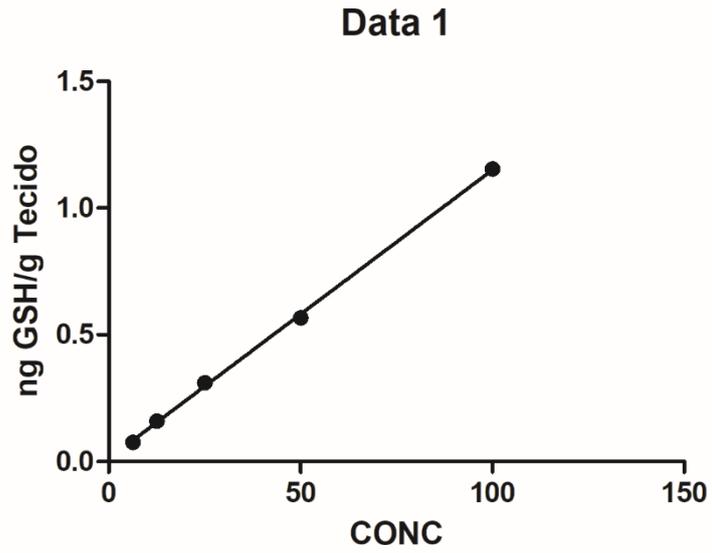
APÊNDICE C

Curva para cálculo da concentração de GSH no plasma



APENDICE D

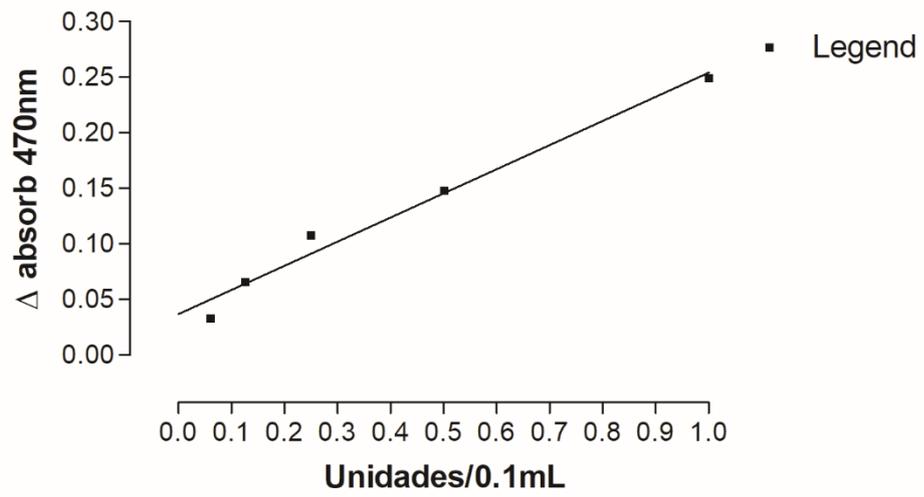
Curva para cálculo da concentração de GSH no tecido hepático



APÊNDICE E

Curva para cálculo da atividade da MPO no tecido hepático

Data Table-1



ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PÓS-CONDICIONAMENTO COM CURCUMINA E ELETROACUPUNTURA: EFEITOS SISTÊMICOS E LOCAIS SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR GENTAMICINA EM RATOS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 5060011220 (ID 001850), sob a responsabilidade de **Sérgio Botelho Guimarães e equipe; Mariana Rodrigues de Souza ; Isaac Bevilaqua de Albuquerque Guimarães ; André Brito Bastos Guimarães ; PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS; FRANCISCO DAS CHAGAS MEDEIROS** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 30/03/2021.

We certify that the proposal "POS-CONDITIONING WITH CURCUMIN AND ELECTROACUPUNCTURE: SYSTEMIC AND LOCAL EFFECTS ON INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN WISTAR RATS", utilizing 56 Heterogenics rats (56 males), protocol number CEUA 5060011220 (ID 001850), under the responsibility of **Sérgio Botelho Guimarães and team; Mariana Rodrigues de Souza ; Isaac Bevilaqua de Albuquerque Guimarães ; André Brito Bastos Guimarães ; PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS; FRANCISCO DAS CHAGAS MEDEIROS** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 03/30/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2021 a 10/2021** Área: **Departamento de Cirurgia**

Origem: **Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 12 semanas**

N: **56**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **150 a 200 g**

Local do experimento: Tendo em vista que o LABCEX - Laboratorio de cirurgia Experimental do Programa de Pos-graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas encontra-se bloqueado para reformas os experimentos serão realizados no laboratório setorial da FAMED.

Fortaleza, 15 de agosto de 2021

Prof. Dra. Camilla Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

ANEXO B

COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA RAÇÃO NUVILAB CR-1 IRRADIADA (*)

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, óleo vegetal, vitamina a, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodeto de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO: umidade (máx): 125g/kg proteína bruta (min): 220g/kg extrato etéreo (min): 50g/kg material mineral (máx): 90g/kg fibra bruta (máx): 70g/kg cálcio (mín-máx): 10-14 g/kg fósforo; 6.000 mg/kg.

VITAMINAS: A (min) 13.000 ui/kg; vitamina D3 (min) 2.000 ui/kg, vitamina E (min) 34 ui/kg, vitamina K3 (min) 3mg/kg, vitamina B1 (min) 5 mg/kg, vitamina B2 (min) 6mg/kg, vitamina B6 (min) 7 mg/kg, vitamina B12 (min) 22 mcg/kg, niacina (min) 60 mg/kg, pantoteno de cálcio (min) 21 mg/kg, ácido fólico (min) 1 mg/kg, biotina (min) 0,05 mg/kg, colina 1.900 mg/kg. minerais: sódio (min) 2700 mg/kg; ferro (min) 50 mg/kg; manganês (min) 60mg/kg; zinco (min) 60 mg/kg; cobre (min) 10 mg/kg; iodo (min) 2mg/kg; selênio (min) 0,05 mg/kg; cobalto (min) 1,5 mg/kg, flúor (máx) 60 mg/kg.

AMINOÁCIDOS: lisina (min) 12g/kg, metionina (min) 4.000 mg/kg, aditivos bht 100,00 mg/kg.

INDICAÇÃO: ração irradiada para camundongos e ratos de laboratório.

USO: Administração a vontade em comedouros suspensos.

CONSERVAÇÃO: Conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando luz e calor excessivos.

ATENÇÃO: O produto deve ser armazenado afastado da parede e longe de focos de contaminação. Manter uma higienização eficiente do local, com métodos legais de Controles de Pragas (empresas terceirizadas que sejam registradas no Ministério). Evitar que o produto permaneça exposto ao ambiente, mantendo-o sempre fechado. O empilhamento dos produtos não deve comprometer seu manuseio.

(*) Informações fornecidas pelo fabricante Quimtia (Curitiba, Paraná).