



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

ELBA LÚCIA WANDERLEY DOS SANTOS

**EFEITOS DA ACUPUNTURA, ELETROACUPUNTURA E METFORMINA SOBRE
O ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E GLICEMIA EM RATAS SADIAS
SUBMETIDAS A ESTÍMULO ESTROGÊNICO**

**FORTALEZA-CE
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S234e Santos, Elba Lúcia Wanderley dos.
Efeitos da acupuntura, eletroacupuntura e metformina sobre o estresse oxidativo, inflamação e glicemia, em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico/ Elba Lúcia Wanderley dos Santos. – 2012.
105 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós- Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Prof Dr Sergio Botelho Guimarães
Coorientação: Prof Dr Francisco das Chagas Medeiros
1. Estrogênios 2. Estresse oxidativo 3. Inflamação 4. Acupuntura 5. Eletroacupuntura I.Título.
CDD 615.89
-

ELBA LÚCIA WANDERLEY DOS SANTOS

**EFEITOS DA ACUPUNTURA, ELETROACUPUNTURA E METFORMINA
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E GLICEMIA EM RATAS
SADIAS SUBMETIDAS A ESTÍMULO ESTROGÊNICO.**

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

Orientador: Prof Dr Sérgio Botelho Guimarães
Coorientador: Prof Dr Francisco das Chagas Medeiros

**FORTALEZA-CE
2012**

ELBA LÚCIA WANDERLEY DOS SANTOS

**EFEITOS DA ACUPUNTURA, ELETROACUPUNTURA E
METFORMINASOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E
GLICEMIA, EM RATAS SADIAS SUBMETIDAS A ESTÍMULO
ESTROGÊNICO**

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

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof Dra Maria Luzete Costa Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Aos meus pais, em memória póstuma, Idália Wanderley e Jonas Santos, por terem me conduzido com seus ensinamentos e incentivos no início da minha trajetória de vida. A meu esposo, Dirceu Sales, e filhos, Alana e Igor Sales, por me manterem caminhando apaixonada pela vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof Dr Sérgio Botelho Guimarães, pelo incentivo, ensinamentos, acolhimento, confiança e paciência, tornando, assim, possível alcançar o meu objetivo. A ele, exemplo de sabedoria e humildade, minha eterna gratidão pela realização de mais um sonho em minha carreira médica.

Ao meu coorientador, Prof Dr Francisco das Chagas Medeiros, pelo acolhimento, entusiasmo e alegria com os quais conduziu os experimentos, deixando marcas de sua prática em pesquisa.

Ao Prof Dr Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, da Universidade Federal do Ceará e ao Prof. Dr. Dalgimar Bezerra de Menezes do Serviço de Patologia da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio, ensinamentos e pela grande dedicação em busca do conhecimento científico.

Serei eternamente grata à Dra Jocelene Tenório Albuquerque M. Godoi, chefe do Departamento de Terapêutica Clínica, e ao Dr Dirceu de Lavor Sales, coordenador da Residência Médica em Acupuntura da Universidade Federal de Pernambuco, que facilitaram e compensaram, compreensivamente, minhas ausências no Hospital das Clínicas, durante o período do curso de mestrado.

Ao Dr Givaldo Barbosa dos Santos, diretor Médico do CISAM (Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros - Universidade de Pernambuco), pela confiança e apoio.

À Dra Dênia Palmeira Fitipaldi Duarte e à Dra Desterro Leiros da Costa, colegas, que me forneceram subsídios técnicos e incentivos, quando nas dúvidas e dificuldades para conclusão deste trabalho.

Aos alunos da Faculdade de Medicina do Ceará, Bruno Meneses, Carol Andrade, Angélica Pascoal e Eugênio Vasconcelos, que estão ingressando neste deslumbrante caminho da pesquisa, agradeço pelo acolhimento, responsabilidade e dedicação com que participaram deste experimento.

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

Às Sra Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Fontenele, do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela eficiência, atenção e dedicação sempre dispensadas aos alunos da pós-graduação.

A todos os colegas da pós-graduação por fazerem-me sentir tão integrada a esse grupo, e, juntos, compartilharem comigo essa jornada de anseios e expectativas para a realização deste Curso de Mestrado.

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

RESUMO

EFEITOS DA ACUPUNTURA, ELETROACUPUNTURA E METFORMINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E GLICEMIA EM RATAS SADIAS SUBMETIDAS A ESTÍMULO ESTROGÊNICO. ELBA LÚCIA WANDERLEY DOS SANTOS. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação (*Stricto Sensu*) em Cirurgia. Universidade Federal Ceará. Professor: Dr.Sérgio Botelho Guimarães.

O desempenho fisiológico da atividade celular requer um equilíbrio entre a produção de espécies de radicais livres e a sua desativação por agentes reguladores e protetores. Quando esse equilíbrio é quebrado, surge o estresse oxidativo. Diversos estudos experimentais utilizando estrógenos para a indução de distúrbios ovarianos e metabólicos, com destaque para a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), estão disponíveis na literatura científica. A Metformina (MTF) é um anti-hiperglicemiante, frequentemente utilizado para tratamento da SOP, permitindo a restauração da ciclicidade menstrual, indução da ovulação e o aumento da ocorrência de gestação. Na Medicina Tradicional Chinesa, a Acupuntura (Ac) e a Eletroacupuntura (EAc) são utilizadas na promoção do equilíbrio orgânico, mediante estímulo de vias nervosas produtoras de neurotransmissores específicos, resultando em uma resposta anti-inflamatória, analgésica e reguladora autonômica. Neste estudo, objetivou-se avaliar os efeitos da MTF, da Ac e da EAc aplicadas nos acupontos Zusanli (E36) e Sanyjiao (BP6), sobre o estresse oxidativo sistêmico e local, inflamação e glicemia em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico. No experimento, 42 ratas foram distribuídas aleatoriamente em sete grupos. Em 30 ratas (grupos G1C+, G2M, G3Ac, G4EAc2, G5EAc100) administrou-se estrogênio (valerato de estradiol, 4mg, dose única). Os dois grupos restantes serviram como controles negativos (G6M, G7) e não receberam estímulo estrogênico. Após 60 dias, iniciou-se a segunda fase do estudo, compreendendo um período de dez dias. A Ac e EAc (2/100Hz), foram aplicadas, sob anestesia, em dias alternados, por 20 minutos, durante nove dias nos grupos G3Ac, G4EAc2, G5EAc100; MTF foi administrada diariamente, por gavagem, durante nove dias aos grupos G2M e G6M. No 10º dia desta fase, todas as ratas foram submetidas ao teste de tolerância oral a glicose, e avaliadas em três ocasiões: antes do início do teste e após 60/120 minutos; seguiu-se a laparotomia, sob anestesia, para coleta de sangue na artéria aorta abdominal e exérese do útero e ovários para exames a seguir: dosagem de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), da Glutathiona (GSH) reduzida, da Mieloperoxidase (MPO) e da histopatologia ovariana. Os resultados mostraram um aumento significativo das concentrações plasmáticas de GSH nos grupos G3Ac, G4EAc2 e G5EAc100 comparados ao G1 ($24,50 \pm 1,59$ vs $20,30 \pm 0,43$, $p < 0,05$; $30,80 \pm 3,22$ e $40,30 \pm 3,48$ vs $20,30 \pm 0,43$, $p < 0,0001$), respectivamente. Houve aumento significativo das concentrações de GSH no tecido ovariano das ratas tratadas com EAc2/100 ($47,00 \pm 17,60$ vs $25,70 \pm 2,33$, $p < 0,05$ e $63,00 \pm 12,40$ vs $25,70 \pm 2,33$, $p < 0,0001$). A EAc2/100 promoveu aumento significativo nas concentrações plasmáticas de TBARS ($0,231 \pm 0,09$ vs $0,054 \pm 0,07$, $p < 0,05$ e $0,296 \pm 0,09$ vs $0,054 \pm 0,07$, $p < 0,001$). Houve redução significativa na atividade da MPO ovariana nos grupos G4EAc2 e G5EAc100 ($0,59 \pm 0,21$ vs $1,76 \pm 0,31$, $p < 0,05$ e $0,65 \pm 0,05$ vs $1,76 \pm 0,31$, $p < 0,0001$). A administração de MTF não promoveu alterações nos marcadores oxidativos ou inflamatórios. Não mostrou alteração da glicemia em nenhum dos grupos estudados. No estudo do número de folículos, corpos lúteos e cistos foliculares não houve diferença significativa entre todos os grupos estudados, ao exame histopatológico. Conclui-se que a aplicação de EAc2/100Hz promove proteção local e sistêmica sobre o estresse oxidativo por aumento das concentrações de GSH, além de reduzir o estado inflamatório no ovário de ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.

Palavras chaves: estrogênio; estresse oxidativo; inflamação; acupuntura; eletroacupuntura.

ABSTRACT

EFFECTS OF ACUPUNCTURE, ELETRACUPUNCTURE AND METFORMIN ON OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND BLOOD GLUCOSE IN HEALTHY RATS SUBMITTED TO ESTROGENIC STIMULATION. ELBA LÚCIA WANDERLEY DOS SANTOS. Master's degree. Post-graduation Program (*Stricto Sensu*) in Surgery. Federal University of Ceará. Professor: Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

The physiological performance of cellular activity requires a balance between the production of free radicals and their deactivation by regulators and surge protectors. When this balance is broken, the oxidative stress takes place. Several experimental studies using estrogens to induction of ovarian and metabolic disorders, with emphasis on the polycystic ovary syndrome (PCOS), are available in the scientific literature. The Metformin (MTF) is a medication used for diabetic patients, and is often used for treatment of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), allowing restoration of cyclicity, induction of ovulation and menstruation. Acupuncture (Ac) and Electroacupuncture (EAc) are used in Traditional Chinese Medicine for the promotion of organic equilibrium, through stimulation of nerve pathways producing specific neurotransmitters, resulting in an antiinflammatory, analgesic and autonomic regulatory response. This study aimed at evaluating the effects of MTF and Ac and EAc, applied on Zusanli (E36) and Sanyjiao (BP6) acupoints on the local and systemic oxidative stress, inflammation and blood glucose levels in healthy rats submitted to estrogenic stimulation. In the experiment, 42 rats were distributed randomly assigned into seven groups. In the experiment, 42 rats were randomly assigned into seven groups. Thirty rats (groups G1C, G2M, G3Ac, G4EAc2, G5EAc100) were administered estrogen (estradiol valerate, 4mg, single dose). The two remaining groups served as negative controls (G6M, G7) and received no estrogenic stimulation. After 60 days, began the second phase of the study, comprising a ten-day period. Ac and EAc (2/100Hz), were applied for 20 minutes, under anesthesia, in alternated days during nine days, to groups G3Ac, G4EAc2, and G5EAc100. MTF was given daily during nine days by gavage to G2M and G6M groups. On the 10th day, all rats were subjected to the oral glucose tolerance test, and evaluated on three occasions: before the beginning of the test and after 60/120 minutes. Next, followed laparotomy, under anesthesia, for collection of blood from the abdominal aorta artery and harvesting of uterus and ovary for examination. Parameters analysed included the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), reduced Glutathione (GSH), Myeloperoxidase (MPO), and ovarian histopathology. At the end of the experiment plasma concentrations of GSH increased significantly in G3Ac, G4EAc2 and G5EAc100 groups compared to G1 (24.50 ± 1.59 vs 20.30 ± 0.43 , $p < 0.05$; 30.80 ± 3.22 and 40.30 ± 3.48 vs 20.30 ± 0.43 , $p < 0.0001$) respectively. There has been a significant increase in concentrations of GSH in ovarian tissue of rats treated with EAc2/100 (47.00 ± 17.60 vs 25.70 ± 2.33 , $p < .005$ and 63.00 ± 12.40 vs 25.70 ± 2.33 , $p < 0.0001$). There was a significant reduction in ovarian MPO activity in groups G4EAc2 and G5EAc100 (0.59 ± 0.21 vs 1.76 ± 0.31 , $p < 0.05$ and 0.65 ± 0.05 vs 1.76 ± 0.31 , $p < 0.001$). MTF did not promote changes in oxidative or inflammatory markers. There was no change in blood glucose levels in any of the groups studied. Corpus luteum and follicular cysts number were not different in all groups. It is concluded that EAc2/100Hz treatments promote systemic and local protection on oxidative stress by increasing GSH concentrations and by reducing the inflammatory status in the ovary of healthy rats submitted to estrogenic stimulation.

Keywords: estrogen; oxidative stress; inflammation; acupuncture; eletroacupuncture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Mecanismo periférico na acupuntura.....	28
Figura 02	Mecanismo segmentar da acupuntura.....	28
Figura 03	Mecanismo suprasegmentar da acupuntura.....	29
Figura 04	Mecanismo segmentar somato-visceral da acupuntura.....	30
Figura 05	Agulhamento do ponto E36.....	43
Figura 06	Agulhamento do ponto BP6.....	43
Figura 07	Rata anestesiada submetendo-se à acupuntura nos pontos E36 e BP6.....	44
Figura 08	Rata anestesiada submetendo-se à eletroacupuntura nos pontos E36 e BP6.....	44
Figura 09	Rata anestesiada submetendo-se à eletroacupuntura mostrando a conexão com aparelho NKL portátil.....	44
Figura 10	Aparelho NKL 608 portátil.....	45
Figura 11	Administrando a metformina por gavagem.....	45
Figura 12	Coletando sangue no segmento distal da cauda da rata.....	46
Figura 13	Dosando a glicemia com o glicosímetro ACCU-CHEK®.....	46
Figura 14	Puncionando a aorta abdominal para coleta de sangue e dosagem bioquímica.....	46
Figura 15	Peças coletadas: ovário direito, hemiútero direito e ovário esquerdo.....	47
Figura 16	Efeitos da acupuntura e da eletro-acupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de GSH tecidual em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	52
Figura 17	Efeitos da acupuntura e da eletro-acupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de GSH plasmático em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	53
Figura 18	Efeitos da acupuntura e da eletro-acupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de TBARS no tecido ovariano em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	54
Figura 19	Efeitos da acupuntura e da eletro-acupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de TBARS plasmático em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	55
Figura 20	Efeitos da acupuntura e da eletro-acupuntura (2Hz e 100Hz) sobre a atividade da MPO em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	56
Figura 21	Efeitos da metformina sobre as concentrações de GSH plasmático em ratas sadias submetidas a estímulo Estrogênico.....	57
Figura 22	Efeitos da metformina sobre as concentrações de GSH tecidual em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	58

Figura 23	Efeitos da metformina sobre as concentrações de TBARS plasmático em ratas sadias submetidas a estímuloestrogênico.....	58
Figura 24	Efeitos da metformina sobre as concentrações de TBARS tecidual em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	59
Figura 25	Efeitos da metformina sobre a atividade da MPO no ovário de ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	59
Figura 26	Valores da glicemia nos diversos tempos estudados, nas ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle.....	60
Figura 27	Número de corpos lúteos no ovário de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle.....	61
Figura 28	Número de folículos císticos no ovário de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle.....	62
Figura 29	Número de folículos em desenvolvimento no ovário de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle.....	62
Figura 30	Resultado da histopatologia dos ovários direitos no grupo controle negativo.....	63
Figura 31	Resultado da histopatologia dos ovários direitos no grupo controle positivo.....	63
Figura 32	Pesos úmidos do hemiútero direito de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle positivo e negativo.	64
Figura 33	Pesos úmidos do ovário direito de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle positivo e negativo.....	65
Figura 34	Efeitos da estimulação estrogênica sobre as concentrações de GSH plasmático em ratas sadias.....	100
Figura 35	Efeitos da estimulação estrogênica sobre as concentrações de GSH tecidual em ratas sadias.....	101
Figura 36	Efeitos da estimulação estrogênica sobre as concentrações de MDA plasmático em ratas sadias.....	101
Figura 37	Efeitos da estimulação estrogênica sobre as concentrações de MDA tecidual em ratas sadias.....	102
Figura 38	Efeitos da estimulação estrogênica sobre a atividade da MPO no tecido ovariano de em ratas sadias.....	102
Figura 39	Integrantes da equipe de pesquisa.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de GSH no tecido ovariano ($\mu\text{mol/g}$ tecido) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	52
Tabela 2	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de GSH no plasma ($\mu\text{mol/mL}$) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Grupos G3-G5) comparadas ao grupo controle positivo (G1) no 10 ^o dia do estudo.....	53
Tabela 3	Efeitos da acupuntura e da eletro-acupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de TBARS no tecido ovariano ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Grupos G3-G5) comparadas ao grupo controle positivo (G1) no 10 ^o dia do estudo.....	54
Tabela 4	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de TBARS no plasma ($\mu\text{mol MDA/mL}$) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Grupos G3-G5) comparadas ao grupo controle positivo (G1) no 10 ^o dia do estudo.....	55
Tabela 5	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre a atividade da MPO no tecido ovariano ($\mu\text{mol/g}$ tecido) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Grupos G3-G5) comparadas ao grupo controle positivo (G1) no 10 ^o dia do estudo.....	56
Tabela 6	Efeitos da metformina sobre o estresse oxidativo e a inflamação em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	57
Tabela 7	Valores da glicemia nos diversos tempos estudados, nas ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina acupuntura eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle.....	60
Tabela 8	Número de corpos lúteos, Folículos císticos e folículos em desenvolvimento no ovário de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100 Hz) e nos grupos controle.....	61
Tabela 9	Pesos úmidos do hemiútero e ovário direito de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle positivo e negativo.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Acupuntura
ADP	Adenosina difosfato
Akt/PKB	Proteína cinase B
AMPK	Adenosina monofosfato-proteína cinase ativada
ATP	Adenosina trifosfato
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BP6	Baço-Pâncreas 6
B23	Bexiga 23
°C	Graus centígrados
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
cm³	Centímetro cúbico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DHT	Dehidrotosterona
DM2	Diabetes mellitus tipo dois
DP	Desvio Padrão
EDTA	Acido etilenodiamino tetra-acético
EAc	Eletroacupuntura
E36	Estômago 36
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH	Dinucleotídio de flavina e adenina
CRF	Fator de liberação da corticotrofina
G1C+	Grupo controle positivo
G2M	Grupo metformina
G3Ac	Grupo acupuntura
GEAc2	Grupo eletroacupuntura 2 hertz
GEAc100	Grupo eletroacupuntura 100 hertz
G6M	Grupo controle metformina
G7C	Grupo controle negativo
GnRH	Hormônio liberador das gonadotrofinas
GLU-4	Transportador de glicose
GSH	Glutaciona reduzida

GSH-Px	Glutathiona peroxidase
g	Gramas
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂O	Água
H⁺	Íon hidrogênio
Hz	Hertz
IL6	Interleucina 6
ip	Intraperitoneal
IRS-1,IRS-2	Substrato 1 e 2 do receptor de insulina
mA	Miliampére
MDA	Melondialdeído
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/mL	Miligramas por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
M	Mol
μmol/L	Micro mol por litro
μmol/g	Micro mol por grama
μm	Micrómetro
MPO	Mieloperoxidase
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
MTF	Metformina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NF-κB	Fator nuclear Kappa B
NGF	Fator de crescimento neural
NO	Óxido nítrico
O₂	Oxigênio
PI3-quinase	Fosfatidil- inositol3-quinase
PCR	Proteína C reativa
LPO	Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
Reα e β	Receptores estrogênicos alfa e beta
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RM12	Ren Mai 12

r.p.m.	Rotações por minuto
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TTOG	Teste de tolerância oral à glicose
UFC	Universidade Federal do Ceará
VE	Valerato de estradiol

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	37
3	MÉTODO	38
3.1	Aspectos éticos.....	38
3.2	Amostra e distribuição.....	38
3.3	Procedimento anestésico.....	39
3.4	Delineamento do estudo.....	40
3.5	Desenho do estudo.....	42
3.6	O estudo.....	42
3.7	Coleta de sangue e tecidos.....	47
3.8	Técnica e análise laboratorial.....	48
3.9	Análise histológica.....	51
3.10	Análise estatística.....	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico.....	52
4.1.1	Efeitos sobre as concentrações de GSH no tecido ovariano.....	52
4.1.2	Efeitos sobre as concentrações de GSH no plasma.....	53
4.1.3	Efeitos sobre as concentrações de TBARS no tecido ovariano.....	54
4.1.4	Efeitos sobre as concentrações de TBARS no plasma.....	55
4.1.5	Efeitos sobre as concentrações de MPO no tecido ovariano.....	56
4.2	Efeitos da metformina sobre o estresse oxidativo e a inflamação em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico.....	57
4.2.1	Efeitos sobre as concentrações de GSH no plasma.....	57
4.2.2	Efeitos sobre as concentrações de GSH no tecido ovariano.....	58
4.2.3	Efeitos sobre as concentrações do TBARS no plasma.....	58
4.2.4	Efeitos sobre as concentrações do TBARS no tecido ovariano.....	59
4.2.5	Efeitos sobre as concentrações de MPO no tecido ovariano.....	59
4.3	Efeitos da metformina, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a glicemia em ratas saudáveis submetidas estímulo estrogênico.....	60

4.4	Efeitos da metformina, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a histologia do tecido ovariano em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.....	61
4.4.1	Efeitos sobre o número de corpos lúteos.....	61
4.4.2	Efeitos sobre o número de folículos císticos.....	62
4.4.3	Efeitos sobre o número de folículos em desenvolvimento.....	62
4.5	Resultado histopatológico do ovário de ratas sadias submetidas ao estímulo estrogênico.....	63
4.6	Efeitos do estímulo estrogênico sobre os pesos do útero e ovário em ratas sadias.....	64
4.6.1	Efeitos sobre os pesos úmidos dos hemiúteros direito.....	64
4.6.2	Efeitos sobre os pesos úmidos dos ovários direito.....	65
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÃO.....	78
7	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICES.....	91
	ANEXOS.....	103

1 INTRODUÇÃO

Os esteroides sexuais desempenham papel muito importante tanto no sistema reprodutor feminino como no masculino, por meio de seu efeito regulador nas diversas funções endócrinas, reprodutivas e sexuais. Desses hormônios esteroides, particularmente, os estrogênios são importantes para o desenvolvimento do fenótipo sexual, para morfologia do trato reprodutivo e diferenciação sexual do sistema nervoso central. Em mamíferos, desempenham papel fundamental na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, na foliculogênese ovariana, ovulação e na implantação embrionária (SHIRWALKAR *et al*, 2007).

Fisiologicamente, a ação celular dos estrógenos é exercida de forma genômica ou não. A genômica é mediada através de três receptores intracelulares estrogênicos: Receptores Estrogênicos (RE) alfa, beta e gama (RE α , RE β e RE γ), os quais são fatores de transcrição (GIGUERE *et al*, 1988; MATHEWS, 2003). Esses receptores apresentam diferentes expressões, dependentemente do tipo de tecido alvo, da espécie envolvida e com a fase da vida do indivíduo. Por exemplo, o receptor de estrogênio alfa é expresso no útero, no fígado (KUIPER *et al*, 1997), nos rins (BRUNETTE e LECLERC, 2002), no sistema cardiovascular, nas glândulas mamárias (SHEARMAN *et al*, 2003). Esse hormônio atravessa a membrana celular e, no citoplasma das células alvos, interage com seus receptores intracelulares específicos, formando complexos hormônio-receptores específicos. Deslocam-se e penetram no núcleo, por meios de poros, para atuarem como cofatores de transcrição, através de ligação a regiões específicas do Ácido Desoxirribonucléico (DNA), chamados de elementos responsivos ao estrogênio, e, por fim, promoverem a regulação da expressão de genes-alvo tecido dependentes (SILBERGER e MAGLEBY, 1999; NORMAN A. W. *et al*, 2004).

A observação de modelos animais, com ausência genética para os receptores estrogênicos (*Knockouts* para RE α e RE β), compromete a função reprodutiva, tais como: na foliculogênese, falha na ovulação e na formação do corpo lúteo (COUSE *et al*, 2003). Enfatiza-se assim a importância dos receptores estrogênicos na fisiopatologia ovariana (COUSE *et al*, 2005).

Interferências multifatoriais, iniciadas na vida intrauterina, de caráter genético, hereditário e ambiental (exposição a compostos estrogênicos clinicamente, dieta,

exercícios) (CARMINA *et al*, 2006), determinam alterações desse controle, levando a modificações fisiopatológicas complexas e desencadeando endocrinopatias metabólicas e reprodutivas, em pacientes jovens. Uma das mais estudadas, no intuito de esclarecer a sua etiopatogenia, é a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), que tem a prevalência de 5% a 10% (KNOCHENHAUER *et al*, 1998) na população em geral. Porém em adolescentes, na faixa de 15 anos, em fase de maturação do eixo neuroendócrino (FRANKS, 1995) essa prevalência chega a 26%. Dessa maneira, estima-se o acometimento de 105 milhões de mulheres no mundo, gerando um custo anual, para a política de saúde, de 4,36 bilhões de dólares, relacionado às complicações futuras dessa endocrinopatia presentes nessas pacientes, segundo avaliação realizada nos Estados Unidos (AZZIZ *et al*, 2005). Essa disfunção é responsável por aproximadamente 75% de infertilidade e 80% de hipertensão nas mulheres (FRANKS, 1995). O hiperandrogenismo apresenta-se como um aspecto fundamental e de grande frequência, associando-se à infertilidade por anovulação, resistência insulínica, síndrome metabólica (glicemia alterada, dislipidemia, hipertensão e obesidade central) e a Diabetes Mellitus tipo2 (DM2) (COVIELLO *et al*, 2006), tendo como conseqüentes complicações as cardiovasculares, a maior incidência de câncer de endométrio, aumento do índice de abortamentos e complicações da gravidez (BOULMAN *et al*, 2004; GLUECK *et al*, 2001, 2002).

A partir dessa realidade, ensaios experimentais e clínicos estão sendo cada vez mais realizados. As evidências mostram que a exposição de animais experimentais na fase adulta e, mais recentemente, em fases críticas do desenvolvimento intrauterino (pré-natal) ou neonatal, com doses baixas, tanto do estrogênio propriamente dito como dos androgênios, esse, possivelmente por via da aromatização, provoca disfunções e anomalias do desenvolvimento do sistema reprodutor. Resultando, assim, em um *imprinting* nessas fases cruciais, com repercussão a longo prazo, incluindo hipoesteroidogênese, anovulação e supressão das gonadotrofinas e desenvolvimento de císticos foliculares na idade adulta (PINILLA *et al*, 1993; DESHPANDE *et al*, 2000; JEFFERSON *et al*, 2002). Esses efeitos de estrogenização neonatal são irreversíveis no ovário.

Possivelmente, essas conseqüências à exposição hormonal no indivíduo adulto ou em fases precoces do desenvolvimento não são iguais, devido à diferença

da dinâmica reguladora do eixo endócrino nesses dois períodos (SHIRWALKAR *et al*, 2007). Enquanto, na fase neonatal, o estímulo estrogênico leva à anovulação na idade adulta, com baixos níveis de estradiol e gonadotrofina (PINILLA *et al*, 1993; DESHPANDE *et al*, 2000), a exposição na vida adulta mostra luteinização precoce dos folículos, redução do número de corpos lúteos, desenvolvimento de cistos foliculares juntamente com depleção nos números de folículo (BRAWER *et al*, 1986) e, ainda, degeneração do núcleo arqueado hipotalâmico e do eixo hipotálamo-hipofisário (BRAWER *et al*, 1978). No entanto, existem informações limitadas sobre a ontogênese da patologia ovariana e das características dos cistos foliculares que ocorrem como resultado da estrogenização em animais adultos.

Vários modelos em ratas adultas, submetidas a estímulo de uma única dose estrogênica, de Valerato de Estradiol (VE), foram estudados por vários pesquisadores (STENER-VICTORIN *et al*, 2000, 2003, 2004, 2006; MANNI *et al*, 2005) para o esclarecimento da etiopatogenia, como também do tratamento dessa doença complexa com base anovulatória e na cistogênese ovariana. Mostrou-se o envolvimento da hiperatividade autonômica simpática, na manutenção dos ovários policísticos, por níveis aumentados de endotelina-1 ovariana, potente vasoconstrictor envolvido na função ovariana, como também de alto nível de Fator de Crescimento Neural (NGF), da expressão do NGF RNAm ovariano e da suprarrenal e Fator de Liberação da Corticotrofina (CRF) na eminência média hipotalâmica. Esses fatores estão envolvidos na formação de cistos, anovulação e complicações cardiovasculares da SOP, demonstradas, também, em ensaios clínicos em humanos (LARA *et al*, 2000).

A homeostase é uma condição orgânica, sinônimo de equilíbrio e saúde. O limite entre essa condição e o adoecimento sempre foi motivo de especulações científicas na intenção de se conhecer os subsídios necessários para mantê-la e prevenir enfermidades, proporcionando, conseqüentemente, uma melhora na qualidade de vida do indivíduo. Esses estudos tiveram seu início no século XIX, por Fenton (BARBUSINSKI, 2009), com a descoberta de substâncias produzidas pelo metabolismo celular, as quais influenciavam decisivamente nesse processo homeostático, denominadas de radicais livres. Em 1960, com a descoberta de agentes reguladores desses produtos do metabolismo celular, por Mc Cord e Fridovich, presentes, na sua maioria, em tecido orgânico, ficou claro que a profilaxia

de morbidades e comorbidades dependia do desempenho fisiológico em manter um balanceamento entre a produção desses radicais livres e sua desativação por esses agentes reguladores e protetores. É notório que o oxigênio é essencial na manutenção do processo natural do desenvolvimento, envelhecimento e condições patológicas dos seres vivos, por meio da produção desses radicais livres no metabolismo e respiração celular (HERMES e ZENTERO/, 2002).

Todos os sistemas orgânicos executam suas ações fisiológicas, às custas do gasto e produção de energia celular, fornecida pelo Trifosfato de Adenosina (ATP) mitocondrial, para alcançar seus objetivos modulatórios dentro da integração dos vários sistemas. Assim, o sistema reprodutivo, na sua função principal ovulatória, recebe influência em nível da sinalização molecular hormonal por parte destas reações oxidativas, as quais poderão manter uma regularidade funcional ou serem responsáveis por danos teciduais e possíveis doenças, como as disfunções ovulatórias e hormonais (AGARWAL *et al*, 2008), bem demonstrada na SOP, já citada anteriormente.

Para um melhor esclarecimento sobre essas reações do metabolismo oxidativo celular, é importante definir que qualquer átomo, molécula ou íon possuidor de um ou mais elétrons livres, em sua órbita externa, resultante desse processo oxidativo, é denominado de radical livre. Essas partículas têm uma instabilidade elétrica muito grande, com meia vida muito curta, e apresentam grande capacidade reativa, ligando-se a qualquer composto próximo, captando um elétron para sua estabilização, independentemente de ser uma molécula, uma célula, ou tecido do organismo; por isso são referidos como substâncias oxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989, p. 502).

A formação de radicais livres tem origem no metabolismo celular aeróbico, na produção de ATP. Normalmente, aproximadamente, de 95% a 98% do oxigênio absorvido é reduzido, formando água na cadeia respiratória por meio do transporte de elétrons na mitocôndria, bem como no retículo endoplasmático. O sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede, então, à redução tetravalente do O_2 pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo, simultaneamente, quatro elétrons para o oxigênio, que se reduz diretamente à água: $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$. As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, o NADH, o FADH e a ubiquinona ou coenzima Q.

Porém, 2% a 5% do O₂ é reduzido univalentemente, recebendo apenas um elétron, que ocupa a órbita externa, ao mesmo tempo em que o outro continua não pareado, produzindo compostos altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), e que, algumas vezes, constituem os radicais livres. Forma-se, então, a primeira espécie tóxica reativa de oxigênio, o superóxido, conforme esquema: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$. Além da superóxido, são exemplos de EROs: radical hidroxila (OH•), considerado esse um dos mais deletérios de todos, Radical Alcoxil (RO•), Radical Peroxil (ROO•), Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), Óxido Nítrico (NO), entre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989, p. 502).

O estado de Estresse Oxidativo (EO) ocorre quando é quebrado o equilíbrio entre o nível de EROs e os agentes antioxidantes, culminando com dano e/ou apoptose celular, implicando na patogênese de muitas enfermidades, dependentemente da resposta individual de cada indivíduo, de hábitos alimentares e de estilo de vida (AGARWAL *et al*, 2005; LEE *et al*, 2010; VICTOR *et al*, 2009).

Os agentes antioxidantes ajudam a criar um equilíbrio entre a geração de oxidantes benéficos, que, frequentemente, agem como moléculas de sinalização celular, e os prejudiciais, os quais levam ao EO. Existem duas categorias de antioxidantes: enzimáticos e não enzimáticos. Antioxidantes enzimáticos incluem: a Superóxido Desmutase (SOD), catalase, Glutathione Peroxidase (GPx) e as proteínas ligadas aos metais. Não enzimáticas incluem: Glutathione (GSH), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, licopeno, ascorbato (vitamina C), coenzima Q10, ácido úrico, etc. (AGARWAL *et al*, 2005)

A GSH é um tripeptídeo, não enzimático, principal componente sulfidril em células de mamíferos. Desempenha um papel fundamental na neutralização de peróxidos e na proteção celular contra o estresse oxidativo. É um marcador da saúde celular, e sua queda é indicativa de lesão oxidante. Mudanças no nível sérico desse antioxidante e no fluido peritoneal têm desempenhado um papel importante na avaliação da integridade funcional do sistema reprodutivo e na patogênese da infertilidade idiopática (LEE *et al*, 2010). Está presente no oócito, no fluido tubário, e participa dos processos de maturação oocitária, descondensação espermática, ativação oocitária, além de desempenhar importante função permissiva para o desenvolvimento embrionário pré-implantação (AGARWAL *et al*, 2005).

A Lipoperoxidação (LPO) ou peroxidação lipídica pode ser definida como uma deterioração oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados, detentores de ligações

duplas carbono-carbono, presentes em grande quantidade nas membranas e nas organelas intracelulares (mitocôndrias e peroxissomas) por ação desses radicais oxidativos (LLESUY, 2002). As EROs atacam os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos das membranas de células e organelas, desintegrando-as e permitindo, dessa forma, a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares. Formado esses hidroperóxidos lipídicos, desencadeiam, além da ruptura das membranas celulares, mutações do DNA, formação de resíduo químico, como o malondialdeído, comprometimento dos componentes da matriz extracelular, proteoglicanos, colágeno e elastina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Eles possuem poder de ação maior do que as outras espécies tóxicas primárias de $O_2(O_2^{\cdot -}, H_2O_2, OH^{\cdot}, O_2)$, atingindo facilmente alvos mais distantes.

A formação de hidroperóxidos lipídicos e os aldeídos, tais como o malondialdeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas, são utilizados para se avaliar LPO no estresse oxidativo (LIMA, S. E. e ABDALLA, 2001). Assim como na formação das EROs, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracídico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo.

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima liberada, a partir de grânulos citoplasmáticos de neutrófilos e monócitos, por um processo de degranulação. Reage com o H_2O_2 , produzido pela cadeia respiratória, para formar um complexo que pode oxidar uma grande variedade de substâncias. Entre esses, está o cloreto, que é oxidado a ácido hipocloroso, inicialmente, com a subsequente formação de cloro e cloraminas. Estes produtos do sistema de cloreto de H_2O_2 -MPO são oxidantes poderosos que podem ter profundos efeitos biológicos. A principal função dos neutrófilos é a fagocitose, destruição de microorganismos, e a liberação de MPO e H_2O_2 no fagossomo que contenha o micro-organismo ingerido, levando, geralmente, a um rápido efeito microbicida. MPO e H_2O_2 também podem ser liberados para o exterior da célula, nesse local, uma reação com cloreto pode induzir danos aos tecidos adjacentes e, assim, contribuir para a patogênese de doenças. A MPO são libertadas mediante estímulo de imunocomplexos formados pelas catecolaminas ou durante a morte celular. Tem sido sugerido que a lesão pulmonar,

dano glomerular renal, e o início das lesões ateroscleróticas, isquêmicas possam ser causados pelo sistema de MPO (KLEBANOFF, 1999).

Estudos controlados mais recentes sugerem que a mieloperoxidase pode ser um bom marcador da atividade inflamatória, como no caso da cirrose hepática e em outras doenças pró-inflamatórias (PEDRO *et al*, 2003)

As EROs têm um papel fisiológico e patológico no trato reprodutor feminino. Numerosos estudos em seres humanos e animais têm demonstrado a presença desses radicais em várias estruturas do sistema genital feminino, ovários, trompas uterinas e, também, em embriões. Elas estão envolvidas na modulação de todos os espectros fisiológicos reprodutivos, funções como: maturação oocitária, esteroidogênese ovariana, ovulação, formação e função do corpo lúteo e luteólise. Em consequência, exercem um importante papel na etiopatogênese dos distúrbios ginecológicos, ligados principalmente à infertilidade (AGARWAL *et al*, 2005).

Sabe-se que existe uma íntima relação entre o EO e condições pró-inflamatórias. Dentro desse contexto, enfatiza-se o conhecimento amplamente aceito de que as mulheres, independentemente da idade, apresentam de maneira significativa menor incidência de infecção e, em consequência, menor mortalidade do que os homens. Essa diferença significativa no aumento da resposta inflamatória das mulheres, em comparação com a dos homens, é vantajosa na defesa contra a infecção e a sepse, mas é desfavorável, quando se torna excessiva, revertendo contra seus próprios sistemas, conduzindo a uma maior taxa de doenças autoimunes em relação ao gênero masculino (OLSEN *et al*, 1996). Evidências epidemiológicas e imunológicas sugerem que os hormônios sexuais femininos desempenham um papel na etiologia e curso de doenças crônicas inflamatórias, porque o ciclo menstrual, gravidez e a presença da menopausa são importantes fatores que influenciam nas respostas a esses processos (SCHRÖDER *et al*, 1998).

Esse controle das células ovarianas do estroma e a função das células germinativas não estão bem esclarecidos. Todavia o estresse oxidativo pode ser um dos moduladores da fisiologia ovariana agindo nesse compartimento estromal e germinativo, juntamente com os esteroides e gonadotrofinas. Uma série de fatores autócrinos e parácrinos afeta essa modulação esteroidogênica (AGARWAL *et al*, 2005). É importante saber que as citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas secretadas no compartimento extracelular pelos leucócitos (TSAFRIRI e REICH, 1999). Estudos propuseram que a ovulação em mamíferos ou ruptura folicular é o

resultado das alterações vasculares e da cascata proteolítica dessa lesão tecidual. A comunicação cruzada entre esses dois processos é mediada por citocinas, entre elas, o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e EROs (ambos radicais reativos do nitrogênio e oxigênio) (BEDAIWY *et al*, 2003). As evidências mostram que o estresse oxidativo e as citocinas são interligadas e atuam como mensageiros intercelulares e intracelulares no ovário (VAN VOORHIS *et al*, 1994).

O superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e peróxidos lipídicos são gerados no tecido luteal natural em ratos, ou expostos a ação hormonal. Espécies reativas de oxigênio desacoplam o receptor do hormônio luteinizante da adenilato ciclase e inibe a esteroidogênese por meio da interrupção do transporte de colesterol transmitocondrial. A origem celular de radicais de oxigênio em regressão de corpo lúteo é predominantemente dos leucócitos neutrófilos, existentes e infiltrados. Também são produzidos dentro do folículo na ovulação e, no corpo lúteo, onde os leucócitos são a principal fonte desses produtos. Apesar de radicais de oxigênio poderem exercer importantes papéis fisiológicos dentro do ovário, a produção cíclica desses agentes nocivos ao longo dos anos pode levar, nesse caso, a um aumento do risco cumulativo de doenças, que, provavelmente, seria agravada em condições de estado antioxidante reduzido (BEHRMAN *et al*, 2001).

Existe uma correlação observada entre os níveis de malondialdeído, marcador da peroxidação lipídica, e o nível do 17-beta estradiol no plasma, expressando, assim, o EO. Sabe-se que a deprivação de estrogênio e progesterona leva à estimulação da prostaglandina $F2\alpha$ induzida por EROs (peróxidos lipídicos), decorrente da ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF κ B) e produção do TNF α , dessa forma, ficando claro, ser esse fator nuclear uma peça-chave para o mecanismo fisiológico da menstruação (SUGINO *et al*, 2004).

Na SOP, o tecido adiposo visceral é responsável pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: Interleucina 6 (IL-6), a leptina e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), que participam na gênese da resistência à insulina, e, conseqüentemente, leva à hiperglicemia, DM2. O TNF- α determina hiperfosforilação pós-transcricional dos resíduos de serina, tanto do substrato do receptor insulínico (IRS-1) como da enzima esteroidogênica P450c17, relacionada com o hiperandrogenismo (FERNÁNDEZ-REAL e RICART, 2003).

Além disso, o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células mononucleares, presentes no compartimento estromal vascular do tecido

adiposo visceral dessas pacientes, em resposta à hiperglicemia fisiológica pós-prandial, pode desempenhar, também, um papel importante no desenvolvimento do hiperandrogenismo e da resistência à insulina, por meio da ativação do NF- κ B, aumentando a sua transcrição e a produção do TNF- α , caracterizando a SOP como um estado pró-inflamatório (GONZÁLEZ *et al*, 2005, 2006). Esse processo leva à produção de marcadores plasmáticos, como o Inibidor da Ativação do Plasminogênio1 (PAI1) e da Proteína C Reativa (PCR), entre outros, os quais aumentam ou predizem o risco de aterosclerose e trombose vascular nessas pacientes, independentemente da obesidade (GONZÁLEZ, 2009).

Victor *et al* (2009) reforçaram esse estado pró-inflamatório, em estudo controlado nos leucócitos de mulheres com SOP, pelo achado da diminuição na função mitocondrial, com aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), PCR e TNF α e diminuição da glutathiona (GSH), enzima antioxidante.

Na resistência insulínica e hiperinsulinemia, os níveis altos de ácidos graxos levam ao aumento da formação de EROs e implicam uma possível diminuição de antioxidantes e aumento de hidroperóxido lipídico, demonstrados pela correlação negativa dos níveis de Melondialdeído (MDA), marcador indireto do EO, e a diminuição da glutathiona (LEE *et al*, 2010).

A abordagem terapêutica da SOP compreende desde a orientação dietética, associada à atividade física, como o uso de terapêuticas farmacológicas específicas de agentes sensibilizadores da atividade insulínica e, também, não farmacológicas, entre elas a acupuntura (PALOMBA *et al*, 2008).

Na SOP, a associação dessas medidas apresentou um nível maior de eficácia, em relação às suas práticas isoladas, melhorando a obesidade central, diminuindo os níveis de insulina e hiperandrogenemia e conduzindo a melhores índices de ovulação, gravidez e regularização dos ciclos menstruais, conseqüentemente, com diminuição do EO (PASQUALI *et al*, 2000).

A Acupuntura (Ac) é uma modalidade terapêutica, originada na China, vindo há muitos séculos, juntamente com outras vertentes da Medicina Tradicional Chinesa, destacando-se na manutenção da saúde e prevenção das doenças de uma das maiores populações do mundo, levando, assim, a especulações científicas do seu papel sobre esse equilíbrio oxidativo.

Sua propagação no ocidente, em meados do século XVII, se deve à sua divulgação no continente Europeu, por padres jesuítas. Posteriormente, na América, principalmente na comunidade médica científica, teve seu marco em 1912, através da publicação de um livro intitulado: *The Principles and Practice of Medicine*, escrito por um médico e professor da Universidade de Oxford, William Osler (BALDRY, 2008, p. 33), despertando, desse modo, grande interesse no esclarecimento do seu mecanismo de ação, por meio de estudos e pesquisas no campo da neurociência. Essas pesquisas tiveram grande impulso, com importantes estudos no esclarecimento da analgesia, dependência e tolerância aos opioides. Destacou-se, então, a revelação de Hughes *et al* (1975), por meio do isolamento de uma substância no cérebro de porcos, com ação igual à morfina e com grande afinidade por receptores opioides, tendo sido denominada de encefalina. Essa descoberta foi um marco para a compreensão e estudos das respostas induzidas por essa terapêutica, que tem como alicerce a homeostase do doente, e não apenas a cura da doença.

No Brasil, foi reconhecida como especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina, em 1995, resolução nº 1.455/95 (Anexo A), acontecimento que alavancou sua prática médica em nível público e privado, bem como incrementou as pesquisas em importantes Universidades do país.

Na teoria clássica chinesa, o mecanismo de ação da acupuntura se alicerça em dois pilares básicos: 1) os meridianos, canais onde circula o Qi, (traduzido como energia, ou, na visão contemporânea, trifosfato de adenosina). Não havendo, no entanto, evidências científicas dessas estruturas, acredita-se que falavam do sistema nervoso periférico, canais esses não conhecidos em tempos remotos; 2) os pontos de acupuntura, localizados nesses canais, segundo estudos baseados em evidências, têm se revelado bastante consistentes. Mostrou-se que um estímulo, através da pele, em pontos específicos de acupuntura, evoca uma resposta com a liberação de substâncias neuroquímicas, com efeitos analgésicos e/ou anti-inflamatórios, miorelaxantes e reguladores de várias funções orgânicas. Desses efeitos, o alívio da dor e a atenuação do processo inflamatório de diversas enfermidades são os mais conhecidos e estudados (STUX e HAMMERSCHLAG, 2005, p. 5).

Esses pontos de acupuntura são áreas onde histologicamente existem maiores quantidades de receptores nervosos, como: terminações livres, fusos musculares, órgão tendinoso de Golgi, mastócitos e capilares, quando comparadas com áreas circunjacentes (DORNETTE, 1975). Gunn *et al* (1976), descreveu-os, de acordo com suas relações com o sistema nervoso periférico, anatômico e funcionalmente, como: pontos motores musculares, grupos nociceptores em diferentes tecidos e nervos, ou nervos nos planos sagitais e nervos ou plexos superficiais. Por intermédio do bloqueio no suprimento nervoso com anestesia local, o efeito da acupuntura foi ineficaz, mostrando-se, assim, ser conduzido por fibras nervosas (CHIANG *et al*, 1973).

Os neurotransmissores envolvidos na sua ação analgésica são os peptídeos opioides. O uso de antagonista desses peptídeos, a naloxona e a injeção Intracerebroventricular de Colecistoquinina Octapeptídeo (CCK-8) bloqueia ou reverte esse efeito (CHENG, R. e POMERANZ, 1980; HAN *et al*, 1986). Os opioides mais importantes envolvidos são: as encefalinas, β -endorfina e dinorfina (CLEMENTS-JONES *et al*, 1980), além de substâncias não opioides, como as monoaminas: a serotonina e a noradrenalina (CHENG, R. e POMERANZ, 1981).

Em nível periférico, o estímulo da agulha ao penetrar na pele e músculo ativa receptores aferentes (mecanorreceptores III), desencadeando a despolarização da membrana celular de fibras finas A delta ($A\delta$) (KAWAKITA e FUNAKOSHI, 1982) e, em menor proporção, as fibras C (mecanoreceptor IV), deflagrando um potencial de ação e provocando a liberação de várias substâncias pró-inflamatórias. Entre elas, as mais estudadas são: o Peptídeo Geneticamente Relacionado à Calcitonina (CGRP), substância P, bradicinina, interleucinas, $TNF\alpha$ e, mais recentemente, o óxido nítrico, (TSUCHIYA *et al*, 2007), que desencadeiam vasodilatação local, objetivando reparar o dano tecidual.

Essas citocinas, em particular o $TNF\alpha$, são reguladas por vias anti-inflamatórias colinérgicas, por meio de redes cerebrais, mediadas por receptores muscarínicos tipo1, via não opioide, promovendo uma diminuição de sua produção, e conduzindo ao equilíbrio do processo inflamatório local e, possivelmente, oxidativo (TRACEY, 2007). Recentemente, esse mecanismo local anti-inflamatório tem sido muito estudado e denominado reflexo neural anti-inflamatório da acupuntura. Esse

estímulo periférico da agulha é percebido clinicamente como uma sensação de ferroadá, distensão e peso, chamada DeQi pela medicina chinesa (WANG *et al*,1985) (figura 1)

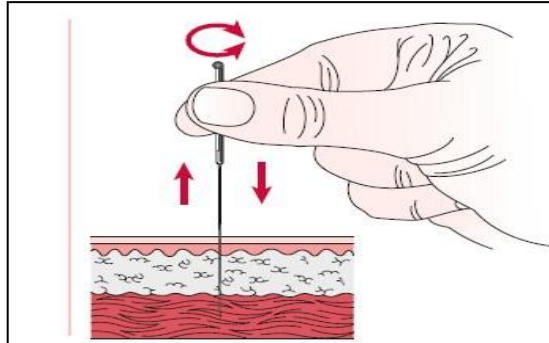


Figura 1 - Mecanismo periférico da acupuntura (WHITE *et al*, 2008, p24)

Com a propagação desse potencial de ação ao longo da fibra A δ , alcança-se o corno posterior medular (lâmina I de Rexed) (KUMAZAWA e PERL, 1978), no qual, em nível da substância gelatinosa (lâmina II de Rexed), ocorre a inibição da passagem do estímulo nociceptivo da fibra C, pela ação de interneurônios, com a liberação de neurotransmissores inibitórios, a encefalina (HASHIMOTO e AIKAMA, 1993), conhecido como o efeito segmentar da acupuntura. Nessa região, funciona o portão da dor, descoberto por Melzack e Wall (1965), que muito contribuiu para esclarecimento inicial da modulação da dor (figura 2)

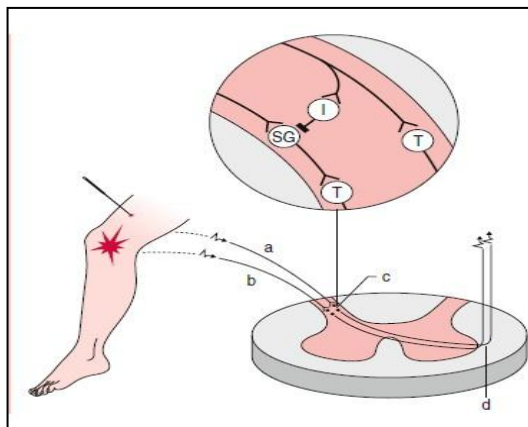


Figura 2 - Mecanismo segmentar da acupuntura

a- Fibra A delta; **b-** Fibra C; **c-** SG substância gelatinosa, I- interneurônio, T- neurônios transmissores; **d-** Vias ascendentes (WHITE *et al*, 2008, p28)

Essas vias somáticas-sensoriais ascendem, via tronco cerebral, tálamo, hipotálamo, hipófise e córtex cerebral. No hipotálamo e hipófise, ocorre a liberação da β -endorfina e do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), os quais se originam do mesmo precursor molecular (CLEMENT-JONES *et al*, 1980). Esses neuro-hormônios são liberados no líquido céfalo-raquidiano e sangue, para proporcionar ação sistêmica analgésica e anti-inflamatória sobre vários tecidos alvos. No tronco encefálico, esse neurotransmissor desinibe o sistema descendente inibidor da dor. Assim, a substância cinzenta periaquedutal, desinibida, libera neurotensina, que desencadeia um estímulo descendente à região do bulbo rostro ventral, provocando a liberação da serotonina (HAN, C. S. *et al*, 1979; GUNN *et al*, 1984) pelo núcleo magno da rafe, e da noradrenalina, pelo locus ceruleus, reforçando, em nível medular, na substância gelatinosa, a ação inibitória dos interneurônios sobre o estímulo doloroso propagado pela fibra C (TAKESHIGE, 1992).

Sabe-se, também, que ocorre um forte efeito desses neurotransmissores em várias estruturas do sistema límbico, envolvidos no aspecto emocional da dor e de muitos outros processos mórbidos crônicos (figura 3).

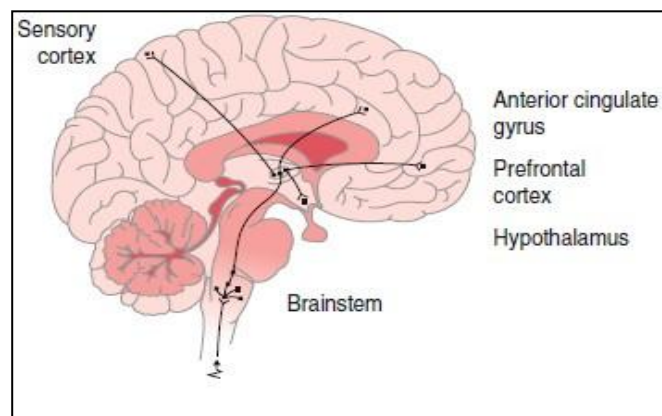


Figura 3 - Mecanismo suprasegmentar da acupuntura (WHITE *et al*, 2008, p29)

Evidências atuais mostram a interação anatomofuncional do sistema nervoso somático e autônomo, bem ilustrada através da interrelação dos dermatômos, miotômos, esclerôtomos e viscerôtomos (FILSHIER *et al*, 2002, p.130). Essa integração segmentar somático-visceral se faz por arco reflexo em nível do corno medular lateral, por sinapses entre as fibras dos receptores somáticos envolvidos na ação da acupuntura e interneurônios, conectados aos neurônios autonômicos pré-

ganglionares, entre os segmentos T1 e L2, e por intermédio de fibras pós-ganglionares, alcançam as vísceras internas e vasos sanguíneos. A influência no sentido inverso do estímulo é percebido na manifestação da dor referida de origem visceral, em um determinado dermatomo (YAMAMURA e TABOSA, 1995).

O arco reflexo somato-visceral é um dos meios através do qual a acupuntura regula as várias funções autonômicas, e resulta em ações não analgésicas (SATO, 1997). O primeiro relato que envolve o sistema simpático com o efeito da acupuntura, por Matsumoto e Hayes em 1973, foi demonstrado pela queda da pressão arterial e vasodilatação intestinal em coelhos, após estímulo com acupuntura. Estudos em ratos anestesiados mostraram que os efeitos da estimulação aferente somática são dependentes dos órgãos particulares e dos segmentos aferentes da coluna vertebral. Algumas funções como fluxo sanguíneo cortical cerebral, função hormonal da medula adrenal e esplênicas têm ação geral; outras, porém, como contratibilidade vesical e motilidade gástrica, são fortemente segmentares. Se a resposta obtida for eferente simpática ou parassimpática, ficará na dependência do órgão estimulado (SATO, 1997) (figura 4)

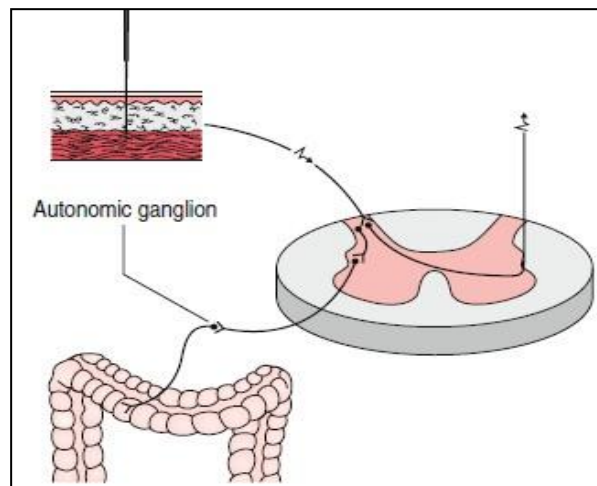


Figura 4- Mecanismo segmentar somato-visceral da acupuntura (WHITE *et al*, 2008, p34)

Zhou, W. *et al* (2007) estudando a modulação da EAc sobre o nervo mediano no reflexo simpático-visceral cardiovascular, observaram a atenuação da resposta excitatória, induzida pela bradicinina, por inibição mediada por opioides sobre a ação do glutamato, dos neurônios ventrais latero-medial rostrais, para onde convergem as fibras somáticas e viscerais aferentes.

A EAc foi introduzida com a intenção de substituir a técnica de manipulação das agulhas, feita com o objetivo de potencializar a resposta terapêutica e analgésica. As pesquisas em gerais utilizam esse tipo de estimulação, haja vista o melhor controle dos estímulos gerados por modernos aparelhos digitais da atualidade. A agulha de acupuntura, inserida em pontos específicos do corpo, é conectada a uma corrente elétrica com intensidades que variam entre 0,5 e 50 mA, voltagem até 20V, suficiente para vencer a resistência da agulha de acupuntura e despolarizar a fibra nervosa; a amplitude de pulso fica entre 0,05–0,5ms. Não são usados valores maiores do que 0,5ms, pois serão recrutadas as fibras C e não as fibras A δ (WOOLF, 1983). As ondas são sempre quadradas bifásicas, propiciando uma menor intensidade de corrente, uma vez que atingem mais rapidamente o limiar de disparo do receptor. São bifásicas para evitar eletrólise e necrose tecidual. As frequências usadas podem ser: baixa, alta ou combinadas, com interferência na resposta obtida (FILSHIER e WHITE, 2002, p. 189).

O mecanismo de ação da eletroacupuntura se processa pelas mesmas vias nervosas da acupuntura clássica (referida também como manual), diferenciando-se, no entanto, em relação à liberação de tipos diferentes de neurotransmissores, dependentes da frequência de corrente elétrica transmitida ao ponto de Ac (CHEN e HAN, 1992). Pesquisas em ratos, com administração de doses suficientes de nalorexona para bloquear os receptores opioides, seguida por aplicação de estímulo com EAc de 2Hz, baixa intensidade, na fibra A δ - mostraram reversibilidade do efeito analgésico. O mesmo não aconteceu, quando aplicado esse estímulo com frequência de 100Hz, alta intensidade. Sabendo-se que essa droga tem grande afinidade pelos receptores mu e delta opioides, e fracamente pelos receptores kappa, chegou-se à conclusão de que a baixa frequência medeia a liberação de encefalinas e β -endorfina, as quais têm afinidade pelos receptores mu e delta, no nível cerebral. Enquanto isso, estímulos de alta frequência medeiam a liberação de dinorfina, que tem afinidade pelo receptores kappa no nível medular (HAN, J. S. *et al* 1984; CHEN e HAN 1992).

Atualmente, a partir desses e de outras importantes evidências, ficou aceito como baixa frequência o estímulo de até 10Hz, e alta frequência a partir de 100Hz. Com o uso alternado das duas frequências, com duração de três segundos cada, obtém-se o estímulo dos três receptores opioides μ (mu), δ (delta) e κ (Kappa),

simultaneamente, propiciando a liberação desses três neurotransmissores e potencializando o efeito analgésico (CHEN e HAN, 1992).

Na EAc, é visível, no local de aplicação, uma contração muscular dependente da intensidade do estímulo transmitido, caracterizando clinicamente uma resposta reflexa somato-somática (HIGASHIMURA *et al*, 2009)

Andersson, (1993) já traçava um paralelismo entre a EAc e o exercício muscular vigoroso. Ambos liberam β -endorfina, produzem analgesia com melhora do humor e têm efeito acumulativo, com aplicação de estímulos sucessivos. Resultados de estudos recentes mostram a forte ligação entre sensibilidade a insulina e exercícios. As contrações musculares que ocorrem durante a eletroacupuntura funcionam como um tipo de exercício e estimulam a liberação de peptídeos opioides endógenos, melhorando provavelmente essa resistência insulínica (CHANG *et al*, 1999; LIN, J. G. *et al*, 2002).

Stener-Victorin *et al* (2003) evidenciavam, em ratas anestesiadas, a modulação neuroendócrina ovariana pela EAc (2Hz), por meio do estímulo de pontos nos músculos que correspondiam à inervação ovariana (T10-T12), sendo eles: os músculos eretores da coluna vertebral e os músculos quadríceps femural, semelhante à modulação exercida pela inervação autonômica simpática, sendo essa inervação, possivelmente, responsável pela manutenção da SOP induzida. Com esse tratamento, houve a diminuição do nível alto de endotelina-1 ovariana, potente vasoconstrictor envolvido na função ovariana, como também do alto nível de NGF, da expressão do NGF RNAm ovariano e da suprarrenal e CRF na eminência média hipotalâmica.

A influência de diferentes frequências e diferentes intensidades do estímulo com EAc, na resposta obtida, ficou clara, em um experimento com modelos animais, por indução estrogênica, em que foi detectado um aumento do fluxo sanguíneo ovariano e alteração do ciclo estral, com uso de frequência de 2Hz e intensidades de 1,5 e 3mA. Porém, 6mA de intensidade e com frequência de 80Hz, houve redução desse fluxo. O mesmo aconteceu após a lesão da inervação simpática ovariana, reforçando ser o fluxo sanguíneo ovariano dependente desse estímulo simpático, por meio do qual, possivelmente, com baixa frequência e baixa intensidade, atua a EAc (STENER-VICTORIN *et al*, 2004, 2006). Tudo indica que essa ação se dá através da modulação nos receptores $\alpha 1$ e $\beta 2$ adrenérgicos e no p75NTR (Receptor neurotrófico) (MANNI *et al*, 2005).

Ainda em modelos experimentais de SOP, agora induzidos por estímulo da Dehidrotestosterona (DHT), foi observada a hiperatividade do pulso de GnRH, com a descoberta de maior expressão no número de receptores androgênicos, no nível das células hipotalâmicas, como também consequente alteração da ciclicidade do estro. Estímulo frequente de EAc, com frequência de 2Hz, normalizou a ciclicidade do estro e restaurou a expressão de receptores androgênicos e do GnRH (FENG *et al*, 2009) .

Todos esses achados conduzem ao papel que a EAc desempenha na regulação da ovulação dentro do contexto profilático e terapêutico das disfunções anovulatórias, tanto em modelos experimentais, como em humanos, muito citados, também, na literatura científica .

Pontos clássicos da medicina tradicional chinesa, com indicação ampla em modular funções orgânicas específicas, tornaram-se muito estudados na regulação metabólica da glicose. Os pontos E36 (Zusanli), RM12 (Zonghwan) e BP6 (Sanyjiao) são os mais investigados para o tratamento e prevenção da resistência insulínica e hiperglicemia, como também de outras disfunções ginecológicas .

Foi mostrado em experimentos com ratos e camundongos que a hiperglicemia nesses animais saudáveis, induzida por drogas anestésicas, como anestésicos voláteis e a mistura cetamina-xilazina, quando submetidos à EAc por 30 e 60 min, com baixa (10Hz) e alta frequência (100Hz), nos pontos Zusanli (E36) e Zonghwan (RM12), apresentava uma queda significativa em seus níveis plasmáticos, por possível predominância do metabolismo aeróbico celular (FIGUEREDO, 2009).

Lin, J. G. *et al* (2002) já demonstravam o envolvimento do efeito hipoglicemiante da EAc, no ponto RM12 (Zonghwan), com os receptores μ opioides, pelo aumento da liberação de β -endorfinas na glândula adrenal e bloqueio desse efeito, com administração da naloxana. Porém, nos grupos dos animais adrenalectomizados, esse efeito era abolido, atribuindo-se, portanto, à adrenal a responsabilidade por esse mecanismo opioidérgico.

Chang *et al* (2005) investigando o mecanismo pelo qual a EAc desencadearia um efeito hipoglicemiante, não só reforçou a descoberta do envolvimento e aumento da liberação de β -endorfinas pela glândula adrenal, bem como mostrou a participação da serotonina nesse processo, em ratos normais.

Em ratas wistar pré-púbere, expostas a estímulo da Dehidrotestosterona (DHT), foi observado que estímulos de baixa frequência (2Hz) de EAc, com

intensidade de 0,5 a 1mA, em um total de 20 aplicações por cinco dias consecutivos na semana, nos músculos retos abdominais, soleus e gastrocnêmio; correspondendo aos dermatômos de T10 - L2 e nervos sacrais, restauraram a sensibilidade à insulina normal, aumentaram a expressão de proteínas de GLUT4 nos vários compartimentos das células do músculo esquelético soleus, melhorando o perfil lipídico. Assim, o tratamento de EAc de baixa frequência tem efeitos sistêmicos e locais, envolvendo caminhos na sinalização intracelular em músculos, que podem ser responsáveis pela melhora da sensibilidade insulínica (JOHANSSON *et al*, 2010).

Os ensaios clínicos realizados na investigação do estresse oxidativo sobre o sistema reprodutor feminino, por meio da Ac e EAc, estão em fase inicial, haja vista o caminho ainda a percorrer no esclarecimento do aspecto inflamatório da fisiologia e fisiopatologia na função ovariana.

A avaliação do estresse oxidativo em ratas saudáveis, no plasma e tecido hepático e renal, com uma única aplicação de Ac e EAc (10 e 100Hz) no E36 e RM12, mostrou um aumento no MDA e peroxidação lipídica, principalmente com a EAc. Contudo, houve um efeito protetor do estresse oxidativo com o aumento da GSH (SILVA *et al*, 2011).

Níveis séricos de TNF α e a expressão do seu RNAm são aumentados, significativamente, em ratos com reto colite ulcerativa induzida em correlação com a gravidade da doença. Esse fato retrata que o TNF- α está intimamente envolvido nas alterações imunológicas e com as respostas inflamatórias na retocolite ulcerativa, parecendo, assim, estar implicado na sua patogênese. O tratamento com EAc aplicada no ponto E36 teve efeito terapêutico, por *downregulating*, nos níveis de TNF- α sérico e em tecido do cólon, bem como na expressão de seu RNAm (TIAN *et al*, 2003).

Dai *et al* (2008) estudaram os efeitos da acupuntura em ratas jovens e menopausadas cirurgicamente, nas quais foram encontradas baixas concentrações séricas de Superóxido Dismutase (SOD) e alta de MDA. Após a aplicação da acupuntura nos acupontos E-36, B-23 (*Shenshu*) localizado na depressão lateral da segunda vértebra lombar e BP6, houve aumento das concentrações de SOD e redução significativa das concentrações de MDA.

Modelos de camundongos com doença de Parkinson, MPTP (toxina neuroquímica 1-meil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), tratados com EAc na

frequência de 100Hz, nos pontos E36 e BP6, evidenciaram proteção do sistema Nigro-estrial, por vários mecanismos, incluindo o efeito antioxidante, com diminuição da peroxidação lipídica e do MDA, como também aumento da concentração da glutatona e da atividade total da superóxido dismutase e do efeito antiapoptose (WANG, H. *et al*, 2011).

A recuperação isquêmica e inflamatória após trauma cirúrgico, em modelos experimentais de retalhos cutâneos, foram avaliadas por meio das concentrações de biomarcadores oxidativos (TBARS/MDA), inflamatório (MPO) e pelo tripeptídeo antioxidante (GSH). Após aplicação de Ac e EAc em pontos específicos, circulando os retalhos, houve uma atenuação da resposta inflamatória mostrada pela diminuição da MPO nesses retalhos ,e, também, redução do estresse oxidativo sistêmico e local, detectada pela promoção do aumento das concentrações plasmáticas e teciduais de GSH. Por outro lado, a EAc exerceu efeito pró-oxidativo evidenciado pelo aumento no plasma e nos retalhos cutâneos de TBARS desses ratos saudáveis, submetidos ao estresse cirúrgico (LIMA, P. L., 2011)

A MTF tem efeito anti-hiperglicemiante, administrado por via oral. É uma biguanida, usada inicialmente para tratar DM2. Atualmente, é um dos agentes mais prescritos no tratamento da SOP. Seu mecanismo, em nível molecular, ainda, não está completamente esclarecido. Sua ação fundamental, porém, decorre da redução da produção hepática de glicose, mediante a diminuição da gliconeogênese e, em menor grau, pelo aumento de sua captação na célula muscular (MATA *et al*, 2008; ZHOU, G. *et al*, 2001). Essa substância leva ao incremento da sensibilidade hepática da insulina e facilita o transporte da glicose. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que sua ação parece ser no próprio receptor da insulina, regulando os processos de sinalização pós-receptor (KUMAR e DEY, 2002). Uma proteína cinase dependente da 5 Adenosina Monofosfato - Proteína Cinase (AMPK) é um possível alvo intracelular da metformina. A AMPK, é o maior regulador celular do metabolismo da glicose e lipídios, por meio da fosforilação de proteínas chaves, controlando, assim, a energia celular.

A ativação da AMPK, pela metformina ou um análogo da adenosina, suprime a expressão de SREBP-1, um fator de transcrição chave lipogênico. Em ratos tratados com metformina, a expressão hepática de SREBP-1 RNAm é reduzida (ZHOU, G. *et al*, 2001).

Observou-se que tratamento com MTF foi capaz de melhorar a estrutura e função do endotélio de pacientes com SOP jovens e não obesas, sugerindo que esse agente poderia ser eficaz para reduzir o risco cardiovascular a longo prazo (ORIO *et al*, 2005). A MTF pode restaurar a ciclicidade menstrual e é altamente eficaz na indução da ovulação e no aumento da ocorrência de gestação (NORMAN, R. J., 2004). Glueck *et al* (2002), mostraram uma redução em 30% de diabetes gestacional, em pacientes grávidas com SOP, usando MTF, versus 3% do grupo controle. Ela, também, influencia diretamente a esteroidogênese ovariana *in vitro*, em cultura de células de tumores tecais, por inibição do gen *CYP17*, com diminuição da expressão de seu RNA mensageiro. Atenua, por sua vez, a produção androgênica decorrente, predominantemente, da menor concentração de insulina plasmática secundária à inibição da gliconeogênese hepática (ATTIA *et al*, 2001).

Na tentativa de esclarecer a anovulação e a cistogênese ovariana presentes em várias disfunções ginecológicas, bem como as diversas alterações orgânicas consequentes a esses processos, vários modelos experimentais foram criados para melhor retratar essa realidade. Nenhum, porém, contempla esse objetivo (SZUKIEWICZ, 1998). Pesquisas têm fornecido grandes subsídios científicos no seu tratamento, mesmo assim, ainda, são escassos os trabalhos que investigam o efeito da Ac e EAc, no aspecto inflamatório e oxidativo dessas disfunções. Essa lacuna nos motivou a realizar esta pesquisa, em ratas submetidas ao estímulo estrogênico, na intenção de agregar mais informações no efeito da Ac e EAc sobre a anovulação e a glicemia, e, possivelmente, prosseguir com as iniciais investigações de sua influência no processo oxidativo e inflamatório. Ressalte-se, também, o ineditismo da investigação da ação da metformina sobre o estresse oxidativo e inflamatório nesse tipo de experimento.

2 OBJETIVO

Geral:

Avaliar os efeitos da acupuntura, eletroacupuntura e metformina no estresse oxidativo, no processo inflamatório e na glicemia em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico.

Específicos:

- 1- Avaliar os efeitos da Ac e EAc, com frequências de 2 e 100Hz, sobre as concentrações de GSH e TBARS no plasma e tecido ovariano em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico.
- 2- Avaliar os efeitos da Ac e EAc, 2/100 Hz, sobre as concentrações da MPO no tecido ovariano em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico.
- 3- Avaliar os efeitos da Ac e EAc, 2/100 Hz, sobre a glicemia após teste de tolerância oral à glicose, em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico.
- 4- Avaliar os efeitos da MTF sobre a concentração de GSH, TBARS no plasma e tecido ovariano em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico.
- 5- Avaliar os efeitos da MTF sobre a concentração da MPO no tecido ovariano em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico.
- 6- Avaliar o efeito da MTF sobre a glicemia após teste de tolerância oral à glicose em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O estudo foi previamente submetido e aprovado pela Comissão do Comitê de Ética e Pesquisa (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais, em dezembro de 2009, nº do protocolo 107/09 (Anexo B), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal nº 6.638, de 08 de maio de 1979.

3.2 A amostra e distribuição

3.2.1 Amostra

Foram utilizados 42 ratos, com idade de oito semanas, fêmeas (*Rattus norvegicus*: variedade albinus, Rodentia, Mammalia), com peso variando de 150 a 220g (Apêndice B) da linhagem Wistar, saudáveis e bem nutridas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina, criadas e mantidas sob condições ambientais e alimentares semelhantes.

Os animais ficaram hospedados em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$). Observou-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (Guabi Nutrilabor®, Mogiana Alimentos, São Paulo) foram ofertadas *ad libitum* até 12 horas antes do experimento. A higienização das gaiolas e o exame dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável

As ratas foram previamente aclimatadas por um período de sete dias antes da realização do experimento para minimizar o estresse. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

3.2.2 Distribuição da amostra

As ratas foram distribuídas aleatoriamente em sete grupos (G), a saber:

G1C+: Grupo Controle Positivo (Valerato de Estradiol- VE)

G2M: Grupo Metformina- VE + metformina

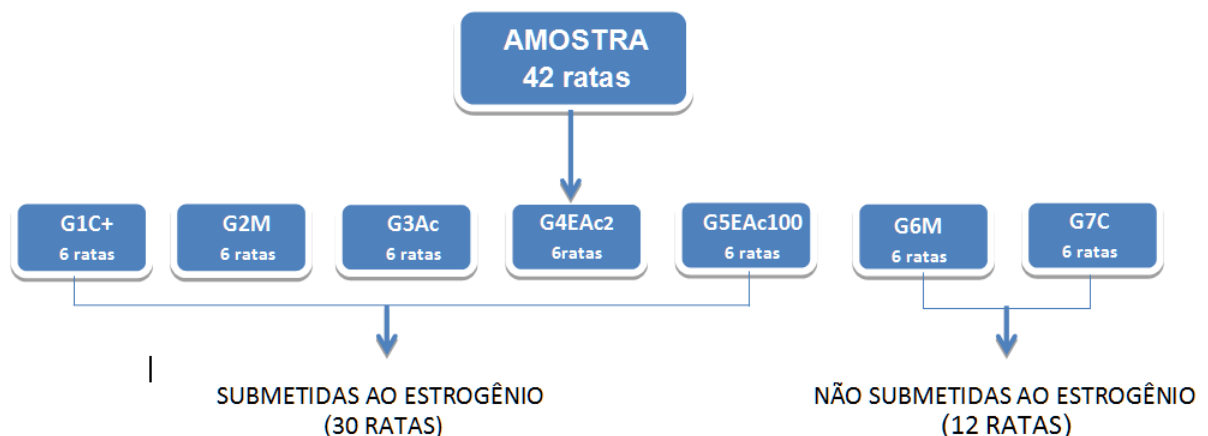
G3Ac: Grupo acupuntura - VE + acupuntura

G4EAc2: Grupo eletroacupuntura - VE + eletroacupuntura com frequência 2Hz

G5EAc100: Grupo eletroacupuntura - VE + eletroacupuntura com frequência 100Hz

G6M: Grupo Metformina Controle negativo - sem VE

G7C: Grupo Controle Negativo - sem VE



3.3 Procedimento anestésico

A anestesia foi obtida pela aplicação, por via Intraperitoneal (IP) de uma solução anestésica, contendo hidrato de cloral a 10% (AUDAZ Reagentes Tecnológicos), na dose de 0,1mL da solução, para cada 30g de peso do animal, produzido pelo laboratório. Após cinco minutos, tempo necessário para se obter o nível anestésico adequado, o animal foi colocado na mesa operatória, em decúbito dorsal. A profundidade anestésica foi avaliada por parâmetros clínicos, como: a frequência respiratória e cardíaca, reflexo da córnea e palpebral, movimentos das narinas e ou de outros grupos musculares. De acordo com esses parâmetros, 13 animais necessitaram de mais anestésico para iniciar os tratamentos com Ac e EAc,

e, também, alguns para a realização adequada da intervenção cirúrgica no final do experimento, sendo aplicada metade da dose inicial (Apêndice A).

3.4 Delineamento do estudo

42 ratas saudáveis, com oito semanas de idade (adultas), foram distribuídas aleatoriamente em sete grupos, numericamente idênticos (n=6). Cinco grupos, foram submetidos a estímulo estrogênico, com valerato de estradiol, enquanto dois grupos controles, não foram expostos a este estímulo, durante um período de 60 dias, que foi denominado de primeira fase do estudo. Transcorrido este tempo, realizou-se dez dias de procedimentos, que foi denominado segunda fase do estudo, como discriminado a seguir:

Grupo controle positivo (G1C+): submeteu-se no 10^o dia do experimento, ao teste de tolerância oral à glicose (TTOG). Em seguida, realizada a indução anestésica com hidrato de cloral a 10%, conforme descrito anteriormente, para a realização da laparotomia com coleta dos ovários, útero e 3,0mL de sangue arterial, por punção da aorta abdominal. Logo depois, os animais foram mortos, ainda sob os efeitos da anestesia, por dessangramento e deslocamento cervical;

Grupo metformina (G2M): recebeu metformina, diariamente, por nove dias do experimento. No 10^o dia, foi realizada a TTOG, seguida de indução anestésica, para realização da laparotomia, com coleta dos ovários, útero e de 3,0mL de sangue arterial, por punção da aorta abdominal. Logo depois, os animais foram mortos, ainda sob os efeitos da anestesia, por dessangramento e deslocamento cervical;

Grupo acupuntura (G3Ac): as ratas desse grupo foram anestesiadas nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 do experimento com hidrato de cloral a 10%, conforme descrito. Após indução da anestesia, as agulhas de acupuntura foram inseridas, bilateralmente, nos pontos BP6 (SANYINJIAO) e no ponto E36 (ZUSANLI), numa profundidade suficiente para atingir o tecido muscular. Mantidas por 20 minutos, posteriormente removidas. No 10^o dia, foi realizada a TTOG, seguida de indução anestésica, para realização da laparotomia, com

coleta dos ovários, útero e de 3,0mL de sangue arterial, por punção da aorta abdominal. Logo depois, os animais foram mortos, ainda sob os efeitos da anestesia, por dessangramento e deslocamento cervical;

Grupo eletroacupuntura 2Hz (G4EAc2): as ratas foram anestesiadas nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 do experimento com hidrato de cloral a 10%, conforme descrito. Após a indução anestésica, agulhas de acupuntura foram inseridas nos pontos, BP6 e E36, bilateralmente. Eletrodos foram conectados às agulhas de acupuntura, aplicando-se uma corrente elétrica com frequência de 2Hz, durante 20 minutos, e então removidas. No 10^o dia, foi realizada a TTOG, seguida de indução anestésica para realização da laparotomia, com coleta dos ovários, útero e de 3,0mL de sangue arterial, por punção da aorta abdominal. Logo depois, os animais foram mortos, ainda sob os efeitos da anestesia, por dessangramento e deslocamento cervical;

Grupo eletroacupuntura 100Hz (G5EAc100): as ratas foram anestesiadas nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 do experimento com hidrato de cloral a 10%, conforme descrito. Após indução da anestesia, as agulhas de acupuntura foram inseridas nos pontos BP6 e E36. Eletrodos foram acoplados às agulhas de acupuntura, aplicando-se uma corrente elétrica com 100Hz de frequência, por 20 minutos, e então removidas. No 10^o dia, foi realizada a TTOG, seguida de indução anestésica, para realização da laparotomia, com coleta dos ovários, do útero e de 3,0mL de sangue arterial, por punção da aorta abdominal. Logo depois, os animais foram mortos, ainda sob os efeitos da anestesia, por dessangramento e deslocamento cervical;

Grupo controle metformina (G6M): as ratas receberam metformina, 2mL por gavagem, diariamente, durante os nove dias do experimento. No 10^o dia, foi realizada a TTOG, seguida de indução anestésica, para realização da laparotomia, com coleta dos ovários, do útero e de 3,0mL de sangue arterial, por punção da aorta abdominal. Logo depois, os animais foram mortos, ainda sob os efeitos da anestesia, por dessangramento e deslocamento cervical;

Grupo controle negativo (G7): apenas no 10^o dia, foram as ratas submetidas à TTOG, seguida de indução anestésica, para realização da laparotomia, com coleta dos ovários, útero e de 3,0mL de sangue arterial, por

punção da aorta abdominal. Logo depois, os animais foram mortos, ainda sob os efeitos da anestesia, por dessangramento e deslocamento cervical.

3.5 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, controlado e comparativo entre diferentes grupos de ratas Wistar, submetidas a estímulo estrogênico para avaliação dos efeitos da metformina, acupuntura e eletroacupuntura, utilizando-se diferentes frequências (2 e 100Hz), na glicemia, processos oxidativos e inflamatórios.

3.6 Estudo

Na primeira fase do experimento, após sete dias de aclimatação, nas ratas dos grupos: G1C+, G2M, G3Ac, G4EAc2 e G5EAc100, foi administrada uma única aplicação intramuscular, de Valerato de Estradiol (4,0mg), laboratório Sigma-Aldrich Brasil Ltda., dissolvido em 0,2mL de óleo de oliva, no músculo quadríceps. Essa dose induz estro persistente, com ausência de corpos lúteos recentes, regressão dos corpos lúteos antigos e folículos atrésicos (BRAWER *et al*, 1986; STENER-VICTORIN *et al*, 2000). Para se evitar variações circadianas, as injeções intramusculares foram todas administradas às 08:00 horas, independentemente do ciclo estral. Porém, nas ratas dos grupos controles: GM6 e G7C, não foi administrada a dose hormonal.

Após 60 dias, ao iniciar-se a segunda fase do experimento com duração de dez dias, todas as ratas foram pesadas individualmente para o cálculo das seguintes doses a serem administradas: dose anestésica, de metformina e de glicose, usadas neste período (Apêndice A). A anestesia foi aplicada para realização do tratamento com acupuntura e eletroacupuntura, como, também, para todos os grupos no momento da laparotomia, objetivando a coleta de sangue na artéria aorta abdominal e exéreses das peças para o estudo.

Os animais receberam água e ração *ad libitum*, durante as duas fases do experimento.

Tendo em vista a uniformidade do procedimento nesse segundo momento, foi aplicado um protocolo relacionando as várias etapas do experimento, conforme descrição detalhada que se segue:

- Indução anestésica e colocação do animal em decúbito dorsal, não sendo necessária a fixação das patas, devido à constatação prévia, do aprofundamento anestésico, conforme já descrito. Esse procedimento foi repetido em dias alternados, para cada aplicação da Ac e EAc, assim como no fim do experimento, para a realização das laparotomias;
- A Ac foi realizada no grupo G3Ac, inserindo-se agulhas metálicas de aço inoxidável, descartáveis, de 0,25mm de diâmetro/15mm de comprimento (modelo Hansol. distribuídas no Brasil por Xu Li Comércio, Importação e Exportação Ltda, São Caetano do Sul – SP), bilateralmente, no ponto E-36, localizado a 5mm da depressão patelar, anterior à prega do tornozelo. Também, no ponto BP6, localizado a 5mm acima do maléolo medial, sobre uma linha imaginária que liga esse ponto a um outro ponto situado na depressão inferior ao côndilo medial da tíbia (ponto BP9) (YIN *et al*, 2008). Assim, cada agulha foi introduzida aproximadamente 8mm na massa muscular do tibial anterior e 5mm no músculo flexor profundo dos dedos, onde estão localizados os pontos escolhidos, respectivamente. As agulhas permaneceram por um período de 20 minutos, sendo posteriormente retiradas. Esse procedimento foi repetido em dias alternados, no período da manhã, perfazendo-se um total de cinco aplicações, realizadas nos dias 1, 3, 5, 7, 9 do experimento (figuras 5, 6 e 7);



Figura 5 - Agulhamento do ponto E36



Figura 6 - Agulhamento do ponto BP6



Figura 7 - Rata anestesiada submetendo-se à acupuntura nos pontos E36 e BP6

- Nos grupos de EAc (G4EAc2 e G5EAc100), eletrodos com garras de jacaré foram conectados às agulhas de acupuntura, inseridas no ponto E36 com o BP6 do lado direito e nos mesmos pontos do lado esquerdo. No grupo EAc2, foi aplicada uma corrente elétrica com 2Hz de frequência, intensidade de 1,0mA, pulsos quadrados com duração de 2 segundos, ondas tipo Burst, com intervalo (repouso) de 2 segundos. O estímulo elétrico foi mantido por 20 minutos, utilizando o eletroestimulador modelo 608, portátil (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil) enquanto no grupo EAc100, a corrente elétrica aplicada, aos pontos já citados, os parâmetros foram idênticos, alterando apenas a sua frequência, passando para 100Hz. Transcorrido os 20 minutos de estímulo, foram retiradas as agulhas e eletrodos. Este procedimento foi repetido em ambos os grupos, no mesmo horário, em dias alternados, perfazendo um total de cinco aplicações, realizadas nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 do experimento (figuras 8 e 9).

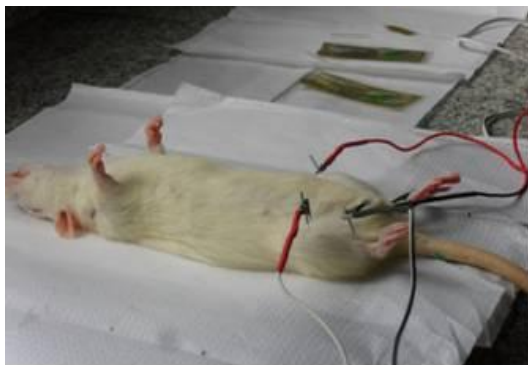


Figura 8 - Rata anestesiada submetendo-se à eletroacupuntura nos pontos E36 e BP6



Figura 9 - Rata anestesiada submetendo-se a eletroacupuntura conectada ao aparelho NKL portátil

Antes de ser utilizado, o aparelho de EAc foi programado conforme frequências e potências supracitadas, sob confirmação anterior no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (figura 10);



Figura 10 - Aparelho NKL 608 portátil

- A MTF (cloridrato de metformina, laboratório Neo Química), administrado 2mL as ratas dos grupos G2M e GM6, na concentração de 5mg/mL, 50mg/Kg de peso, diariamente até o nono dia, por gavagem no período da tarde (figura 11).

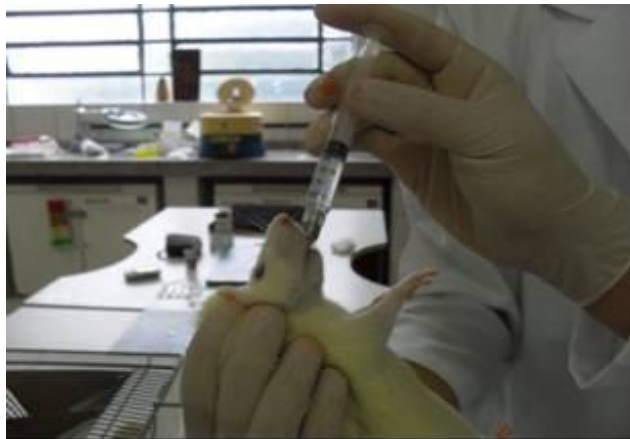


Figura 11 - Administrando a metformina por gavagem

- No 10^o dia, após 12 horas de jejum, em todos os grupos, foi dosada a glicemia, denominada glicemia tempo zero (T0), seguindo-se a administração de 2,0mL de solução de glicose, 0,2g/mL (D-(+)-glucose, laboratório Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), 2g/Kg de peso, por gavagem. A glicemia foi avaliada após intervalo de 60 minutos, denominada glicemia tempo 1 (T1), como também após intervalo 120 minutos, denominada glicemia tempo 2 (T2), para

verificação da tolerância oral à glicose (LICY *et al*, 2011) e construção de curva glicêmica. A amostra de sangue foi coletada, por corte mínimo, com lâmina de bisturi sobre a extremidade distal da cauda de todas as ratas, com posterior registro da glicemia, na gota obtida, por meio de glicosímetro marca ACCU-CHEK® Performa Laboratório ROCHE, nos tempos já citados (figuras 12 e 13);



Figura 12 - Coletando sangue no segmento distal da cauda



Figura 13 - Dosando a glicemia com o glicosímetro ACCU-CHEK®

- Logo após a última dosagem da glicemia (T2), no 10^o dia, todas as ratas foram anestesiadas. Realizou-se, então, a laparotomia, para punção da artéria aorta abdominal e obtenção de 3,0mL de sangue destinados à dosagens bioquímicas; em seguida, procedeu-se a exérese dos ovários e hemiúteros direito (o útero de rato é bicorno) (figura 14).



Figura 14 - Puncionando a aorta abdominal para coleta de sangue e dosagem bioquímica

O ovário esquerdo foi encaminhado para dosagem bioquímica, enquanto o direito foi pesado em balança analítica (Eletronic Balance, FA 2104N Bioprecisa) e preparado para estudo histopatológico. Porém, o hemicorno direito foi apenas pesado (peso úmido) em balança analítica, para avaliação do estímulo estrogênico (figura 15, Apêndice B);

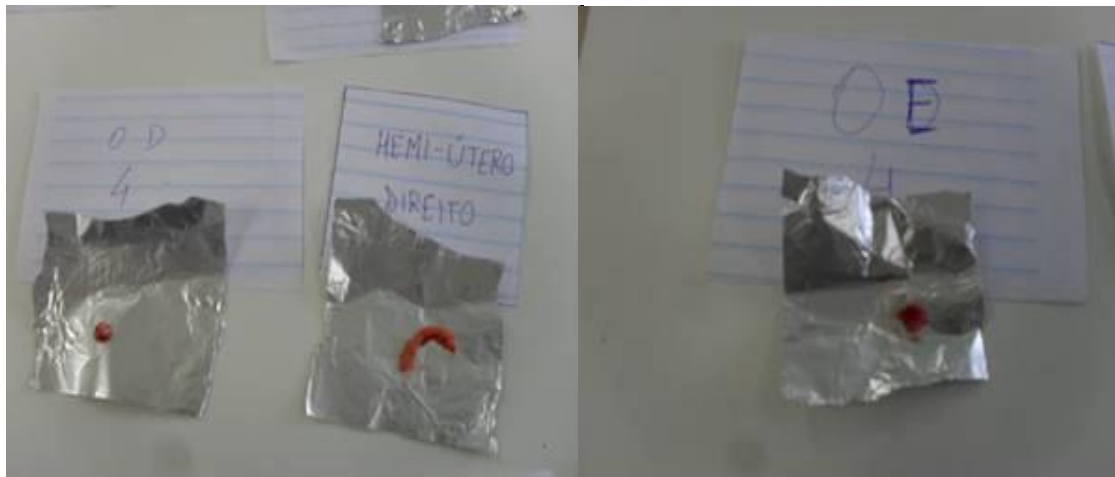


Figura 15 - Peças coletadas: ovário direito, hemiútero direito e ovário esquerdo

- Após as coletas, ainda sob efeito anestésico adequado, os animais foram sacrificados por dessangramento ou deslocamento cervical.

3.7 Coleta de sangue e material

A laparotomia foi realizada sob efeito anestésico, no último dia do experimento, com bisturi de lâmina 15, respeitando-se a técnica asséptica. Em seguida, procedeu-se à punção da artéria aorta abdominal com seringas de 3mL e agulhas 25x8, previamente heparinizadas. Esses sangues arteriais heparinizados foram colocados em centrífuga refrigerada (Beckman Coulter, modelo Allegra X-12R centrifuge) e centrifugados a 4.000r.p.m. durante dez minutos, mantendo-se a temperatura interna em 10^oC. O plasma obtido foi dividido em alíquotas e imediatamente armazenado a -70^oC, para posteriores dosagens bioquímicas.

A coleta de tecidos foi realizada imediatamente após a coleta de sangue de cada animal. Foram excisados os ovários e os dois cornos uterinos. O ovário

esquerdo foi lavado com soro fisiológico gelado (4°C) para remoção dos resquícios de sangue e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido a cerca de -90°C. Após o congelamento, procedeu-se à fragmentação do material utilizando-se grau e pistilo de porcelana. Os fragmentos, em número variável (4 a 6), foram colocados em tubos de ensaio e armazenados a -70°C até sua utilização para dosagens bioquímicas.

Quanto ao ovário direito, após excisão, foi limpo do tecido conjuntivo aderente, pesado e fixado em formaldeído tamponado a 4%, e encaminhado para estudo histológico.

3.8 Técnica e Análise laboratorial

Os efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em ratas submetidas a estímulo do valerato de estradiol, foram avaliados através das dosagens de concentrações teciduais no ovário esquerdo, TBARS, GSH e MPO, (PEDRO *et al.*, 2003) como também através de dosagem séricas para TBARS e GSH.

3.8.1 Determinação de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico

O teste com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido) foi introduzido por Kwon e Watts (1964). É um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica.

A técnica tem por objetivo quantificar o MDA formado na peroxidação lipídica. O MDA é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) originando composto de cor rosa. Esse composto, quando extraído da solução por um solvente orgânico (n-butanol), tem sua concentração determinada e expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica é de fácil execução, baixo custo e pode ser empregada para determinação das TBARS para posterior dosagem de MDA em diferentes materiais biológicos, especialmente em tecidos, utilizado para estimar a peroxidação lipídica.

A amostra de tecido (ovário esquerdo) foi homogeneizada (Homogeneizador Virtis Company, modelo Virtis 23, teflon) em 2mL de tampão fosfato, pH 7,0 e, posteriormente, centrifugados por cinco minutos a 1000rpm (Centrífuga refrigerada

Beckman Coulter, modelo Allegra X-12R centrifuge). Colheram-se 200µL do sobrenadante do homogenato centrifugado e a ele foram adicionados: 1mL de ácido tricloroacético 20% e 400µL de ácido tiobarbitúrico a 1,6%, sendo essa mistura incubada por 30 minutos a 95 graus Celsius. Os lípidos foram extraídos através da mistura com n-butanol (1,6mL), de vigorosa agitação, e nova centrifugação por 10 minutos a 3000rpm. A absorvância de camada orgânica foi medida em espectrofotômetro (530nm) (Espectrofotômetro Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, UV/Visible Spectrophotometer). Os níveis de malondialdeído foram expressos em valores de absorvância em µmol MDA/g de tecido fresco (BUEGE e AUST, 1978; MIHARA e UCHIYAMA, 1978; OKHAWA, 1979) (Apêndice C).

As diferenças entre os valores obtidos nas duas leituras foram utilizadas para calcular a concentração de TBARS, usando-se a regressão linear a partir de uma curva padrão, preparada (Apêndice D).

3.8.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não proteicos (glutathiona-GSH)

A determinação dos grupos sulfidrílicos foi realizada pelo método de Sedlak e Lindsay (1968). Todos os cálculos foram baseados em diferentes densidades ópticas, medidas a 412nm em espectrofotômetro (Beckman Du-640, Fullerton, Califórnia). Comparando a diferença de absorvância das amostras antes e depois que as reações bioquímicas ocorressem, as concentrações de glutathiona foram calculadas como µmol/g de tecido.

As drogas reagentes foram etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido tricloroacético (ATC, 50%), tampão TRIS 0,4M pH 8,9; 5,5'- ditiobis (2-ácido nitrobenzoico (DTNB), 0,5M, metanol, glutathiona (GSH, 1mg/mL). A reação $[2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$, $2\text{GSH} + \text{Ácido Graxo} - \text{OOH} = \text{GSSG} + \text{Ácido Graxo} - \text{OH} + \text{H}_2\text{O}]$.

O procedimento deu-se através da pesagem e homogeneização em 5mL de EDTA 0,002M gelado. Em seguida, mistura-se o homogenato com 3,2mL de água destilada e 0,8mL de ácido tricloroacético 50%. O tubo é centrifugado a 3000g por 15 minutos, misturado com 4mL de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1mL de DTNB 0,01mol/mL. Subsequentemente, agita-se para ser homogeneizado e serem lidas as absorvâncias no espectrofotômetro, à 412nm, dentro de cinco minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH foi obtida comparando-se o valor da

absorvância com uma tabela padrão de GSH, previamente estipulada. As concentrações de GSH foram expressas em $\mu\text{mol} / \text{g}$ de tecido (Apêndices C e D).

3.8.3 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

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

O acúmulo de neutrófilos no tecido foi medido pelo método de dosagem de mieloperoxidase. Após coleta, a amostra foi acondicionada em *ependorf* com buffer gelado (NaCl 0,1M, NaPO_4 0,02 M, Na EDTA 0,015 M, pH 4,7). O tecido ovariano foi pesado e em seguida homogeneizado em Polytron[®] PT 3100 a 13000rpm. No *pellet* foi feito lise hipotônica com solução de NaCl 0,2% e após 30 segundos adição de NaCl 1,6% com glicose 5%. Após centrifugação, o *pellet*, foi ressuspenso em buffer NaPO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% *hexadecyltrimethylammonium bromide* e rehomogeneizado.

Após centrifugação a 13000r.p.m., 5mL do sobrenadante foram utilizados para a dosagem em placas de 96 wells diluídos em 45WL de NaPO_4 0,08M. A atividade da mieloperoxidase; no sobrenadante, foi dosada usando-se *tetramethylbenzidine* (TMB) 1,6mM e H_2O_2 (0,5mM) e lida no leitor de placas de 96 wells à 450nm. Obteve-se a concentração final de MPO comparando-se o valor da absorvância com uma tabela padrão de MPO, preparada previamente. As concentrações de MPO foram expressas em unidade/mg de tecido (Apêndices C e D).

3.8.4 Avaliação de Tolerância Oral à Glicose (TTOG)

A avaliação do metabolismo da glicose neste experimento, foi mensurada através do teste de tolerância oral à glicose, curva glicêmica, construída com os resultados obtidos a intervalos de 60 e 120 minutos, após glicemia de jejum, respeitando às 12h sem ingestão de alimentos, conforme descrito anteriormente. Matsuda e De Fronzo (1999), após estudos comparativos com outros métodos para avaliação da sensibilidade insulínica, mostraram ser o TTOG, uma modalidade

simples e eficaz para retratar a homeostase glicêmica, dependente da atividade insulínica normal (Apêndice E).

3.9 Análise histológica

Os ovários direitos fixados em formaldeído tamponado a 4%, foram parcialmente seccionados, em cortes longitudinais de 4µm de espessura, montados em lâminas de vidro, corados com hematoxilina e eosina. Encaminhados para estudo histológico, um patologista experiente, cego para os grupos, observou o número de folículos em desenvolvimento, corpos lúteos e cistos foliculares sob microscópio ótico. Os cistos foliculares seguiram a descrição prévia de Brawer *et al* (1986); Stener-Victorin *et al* (2000); Lara *et al* (2000), caracterizados como folículos que não tinham oócitos e exibindo uma grande cavidade antral, que, mais frequentemente contendo uma monocamada de células da granulosa.

3.10 Análise estatística

Para todas as variáveis, realizou-se uma análise descritiva dos dados. Então, foram determinadas as curvas de normalidade aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e calculados a média amostral e o Desvio Padrão (DP).

As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando-se o t-teste bicaudal, Mann-Whitney e o teste de Dunnett (ANOVA).

Para os cálculos estatísticos, utilizou-se o programa de análise estatística *GraphPad Prism*[®] versão 5.00 para *Windows*, *GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A., www.graphpad.com*. Os gráficos também foram gerados com o mesmo programa estatístico.

Os resultados foram apresentados sob forma de tabelas e gráficos. A significância estatística foi fixada em 0,05% ($p < 0,05$), assinalando-se com os símbolos [*], [**] e [***] os valores significantes nas comparações intergrupais.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico

4.1.1- Efeitos sobre as concentrações de GSH no tecido ovariano

A eletroacupuntura (2 e 100Hz) promoveu aumento significativo nas concentrações de GSH no tecido ovariano das ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (grupos G4-G5), comparados ao controle positivo G1. A acupuntura não alterou significativamente as concentrações de GSH no grupo G3 comparado ao G1 (tabela 1, figuras 16).

Tabela 1 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de GSH no tecido ovariano ($\mu\text{mol/g}$ tecido) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Grupos G3-G5) comparadas ao grupo controle positivo (G1) no 10^o dia do estudo.

GRUPOS (n=6)			
G1 - Controle (+)	G3 – Acupuntura	G4 - EAc 2 Hz	G5 - EAc 100Hz
25,70 \pm 2,33	38,80 \pm 10,20	47,00 \pm 17,60*	63,00 \pm 12,40***

Teste: Dunnett (ANOVA) Valores expressos como Média \pm DP
 * $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1) *** $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1)

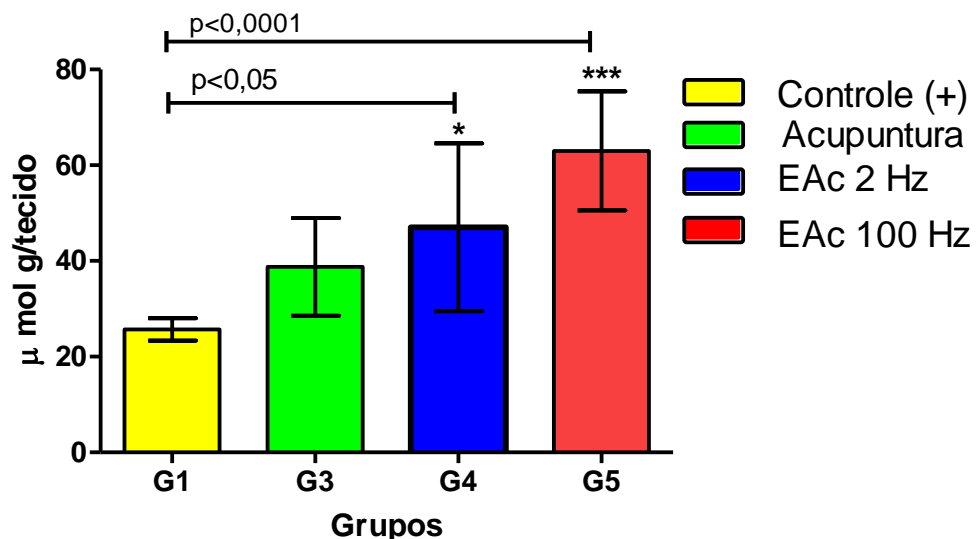


Figura 16 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de GSH tecidual em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Média \pm DP). Teste: Dunnett (ANOVA)* $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1) *** $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1)

4.1.2 – Efeitos sobre as concentrações de GSH no plasma

A acupuntura e a eletroacupuntura promoveram aumento significativo das concentrações de GSH no plasma das sadias submetidas a estímulo estrogênico (grupos G3-G5), comparadas ao controle positivo G1 (tabela 2, figura 17)

Tabela 2 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de GSH no plasma ($\mu\text{mol/mL}$) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Grupos G3-G5) comparadas ao grupo controle positivo (G1) no 10^o dia do estudo.

GRUPOS			
G1 - Controle (+)	G3 – Acupuntura	G4 - EAc 2Hz	G5 - EAc 100Hz
20,30 \pm 0,43	24,50 \pm 1,59*	30,80 \pm 3,22***	40,30 \pm 3,48***

Teste: Dunnett (ANOVA) Valores expressos como Média \pm DP
 * $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1) *** $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1)

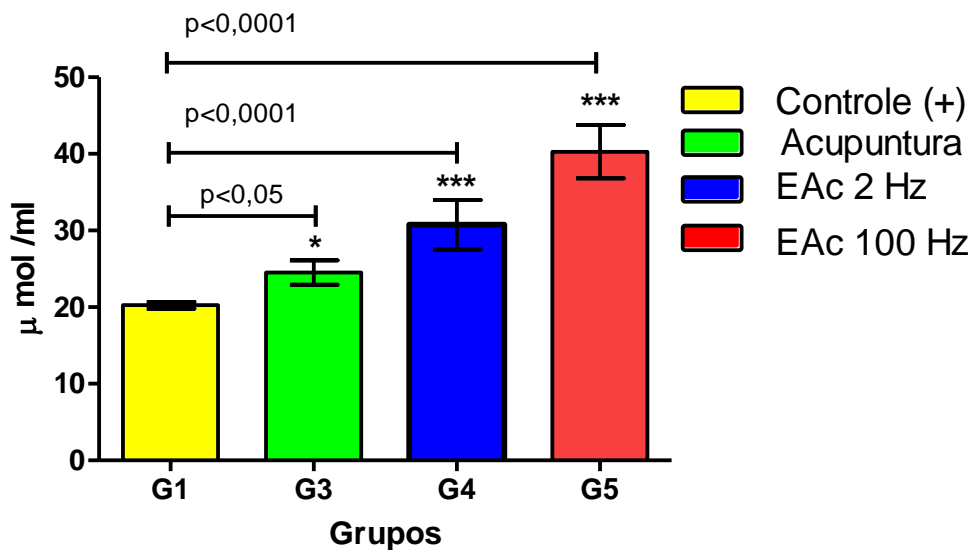


Figura 17 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de GSH plasmático em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Média \pm DP). Teste: Dunnett (ANOVA)* $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1) *** $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1)

4.1.3- Efeitos sobre as concentrações de TBARS no tecido ovariano

A *eletoacupuntura* (2Hz e 100Hz) promoveu aumento significativo nas concentrações de TBARS no tecido ovariano das sadias submetidas a estímulo estrogênico (grupos G3-G5), comparados ao controle positivo G1. A acupuntura não alterou significativamente as concentrações de TBARS no grupo G3 comparado ao G1 (tabela 3, figura 18)

Tabela 3 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de TBARS no tecido ovariano ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Grupos G3-G5) comparadas ao grupo controle positivo (G1) no 10^o dia do estudo.

GRUPOS (n=6)			
G1 - Controle (+)	G3 - Acupuntura	G4 - EAc 2Hz	G5 - EAc 100Hz
0,073 \pm 0,07	0,179 \pm 0,11	0,255 \pm 0,03**	0,338 \pm 0,11***

Teste: Dunnett (ANOVA) Valores expressos como Média \pm DP
 ** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1) *** $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1)

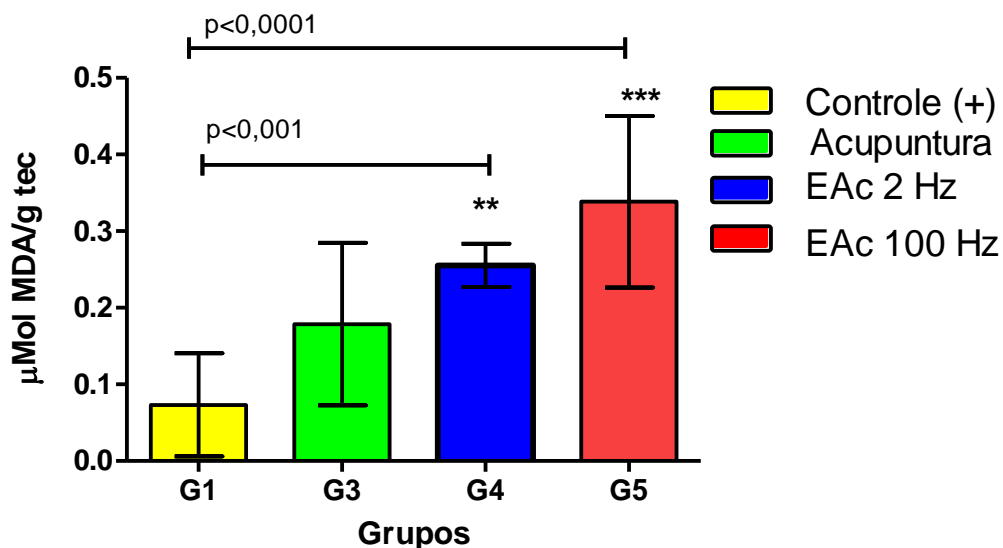


Figura 18 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de TBARS no tecido ovariano em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Média \pm DP). Teste: Dunnett (ANOVA) ** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1) * $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1)**

4.1.4- Efeitos sobre as concentrações de TBARS no plasma

A *eletro-acupuntura* (2Hz e 100Hz) promoveu aumento significativo nas concentrações de TBARS no plasma das ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (grupos G3-G5), comparados ao controle positivo G1. A acupuntura não alterou significativamente as concentrações de TBARS no grupo G3 comparado ao G1 (tabela 4, figura 19)

Tabela 4 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de TBARS no plasma ($\mu\text{mol MDA/ml}$) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Grupos G3-G5) comparadas ao grupo controle positivo (G1) no 10^o dia do estudo.

GRUPOS (n=6)			
G1 - Controle (+)	G3 – Acupuntura	G4 - EAc 2Hz	G5 - EAc 100Hz
0,054 \pm 0,07	0,146 \pm 0,17	0,231 \pm 0,09*	0,296 \pm 0,09**

Teste: Dunnett (ANOVA) Valores expressos como Média \pm DP
 * $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1) ** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

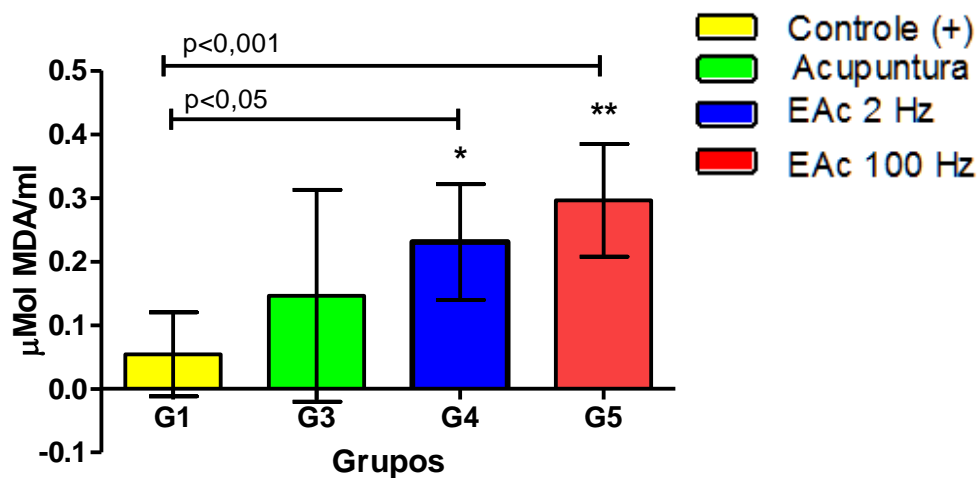


Figura 19 -Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre as concentrações de TBARS plasmático em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Média \pm DP). Teste: Dunnett (ANOVA) * $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1) ** $p < 0,001$ - comparado ao controle (G1)

4.1.5 – Efeitos sobre as concentrações de MPO no tecido ovariano

A *eletroacupuntura* (2Hz e 100Hz) diminuiu significativamente a atividade da MPO no tecido ovariano das ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (grupos G3-G5), comparados ao controle positivo G1. A acupuntura não alterou significativamente a atividade da MPO no grupo G3 comparado ao G1 (tabela 5, figura 20)

Tabela 5 - Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre a atividade da MPO no tecido ovariano ($\mu\text{mol/g}$ tecido) em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Grupos G3-G5) comparadas ao grupo controle positivo (G1) no 10^o dia do estudo.

GRUPOS (n=6)			
G1 - Controle (+)	G3 – Acupuntura	G4b - EAc 2Hz	G5 - Eac 100Hz
1,76 \pm 0,31	1,21 \pm 0,59	0,59 \pm 0,21*	0,65 \pm 0,05***

Teste: Dunnett (ANOVA) Valores expressos como Média \pm DP
 * $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1) *** $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1)

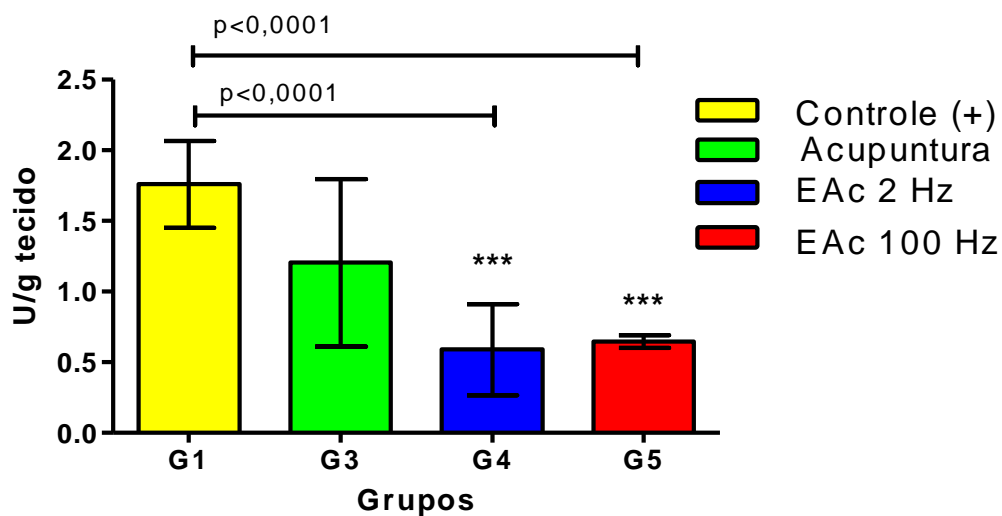


Figura 20 -Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) sobre a atividade da MPO em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico(Média \pm DP). Teste: Dunnett (ANOVA) $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1) * $p < 0,0001$ - comparado ao controle (G1)**

4.2 Efeitos da metformina sobre o estresse oxidativo e a inflamação em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico

A administração de metformina às ratas submetidas a estímulo estrogênico (G2) não alterou significativamente as concentrações de GSH, TBARS e MPO, comparadas ao controle positivo G1 (tabela 6, figuras 21, 22, 23, 24 e 25).

Tabela 6 - Efeitos da metformina sobre o estresse oxidativo e a inflamação em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico (Média ± Desvio padrão)

Variável	Grupos (n=6)		Teste Valor de p
	G1 – Controle (+)	G2 – Metformina	
GSH – plasma	20,30 ± 0,43	20,50 ± 2,93	T teste – ns
GSH – tecido	25,70 ± 2,33	27,00 ± 5,98	Mann-Whitney – ns
TBARS – plasma	0,054 ± 0,07	0,060 ± 0,02	T teste – ns
TBARS – tecido	0,073 ± 0,07	0,093 ± 0,06	T teste – ns
MPO	1,760 ± 0,31	1,830 ± 0,22	T teste – ns

ns = não significante

4.2.1 Efeitos sobre as concentrações de GSH plasmático

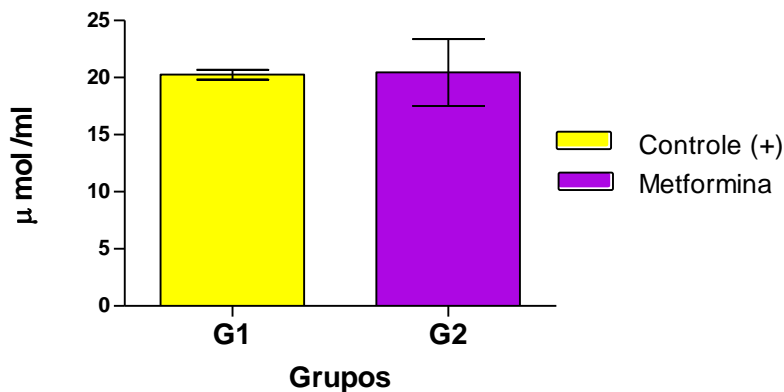


Figura 21 - Efeitos da metformina sobre as concentrações de GSH plasmático em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico (Média ± DP). T teste para amostras não pareadas

4.2.2 Efeitos sobre as concentrações de GSH no tecido ovariano

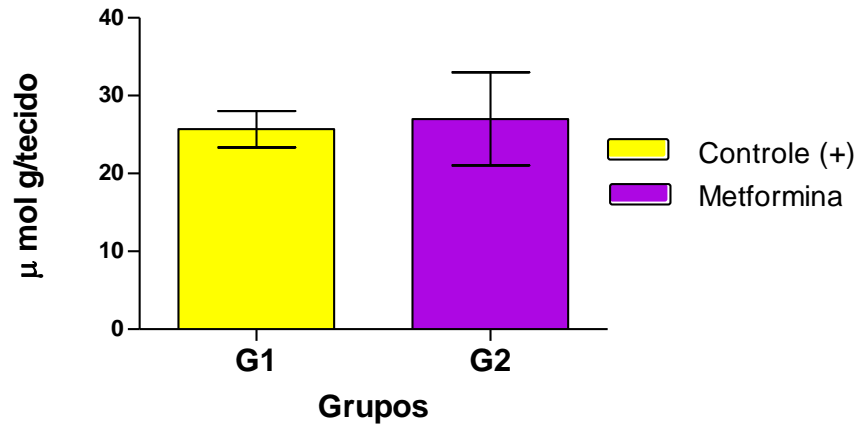


Figura 22 - Efeitos da metformina sobre as concentrações de GSH tecidual em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Média ± DP). Teste Mann-Whitney

4.2.3 Efeitos sobre as concentrações de TBARS plasmático

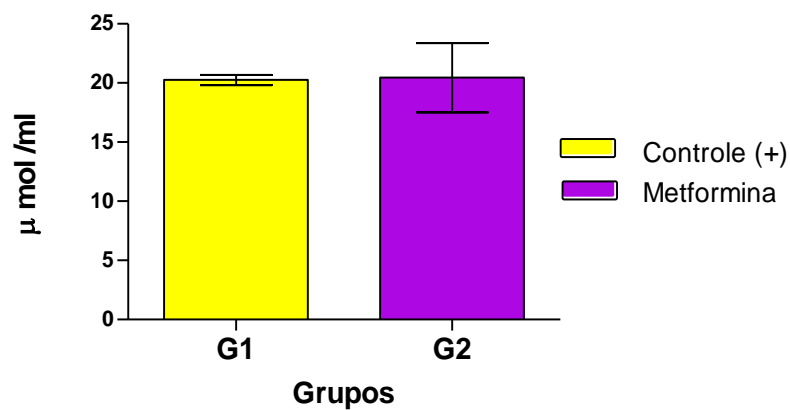


Figura 23 - Efeitos da metformina sobre as concentrações de TBARS plasmático em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (Média ± DP). T teste para amostras não pareadas

4.2.4 Efeitos sobre as concentrações de TBARS no tecido ovariano

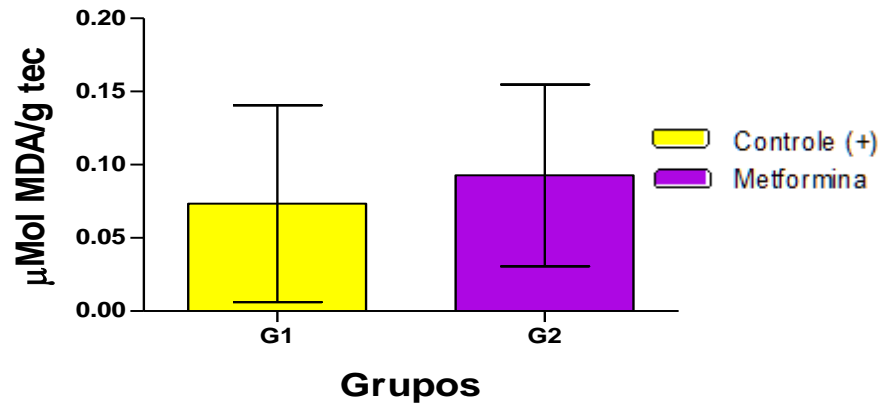


Figura 24 - Efeitos da metformina sobre as concentrações de TBARS tecidual em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico (Média ± DP). T teste para amostras não pareadas

4.2.5 Efeitos sobre as concentrações de MPO no tecido ovariano

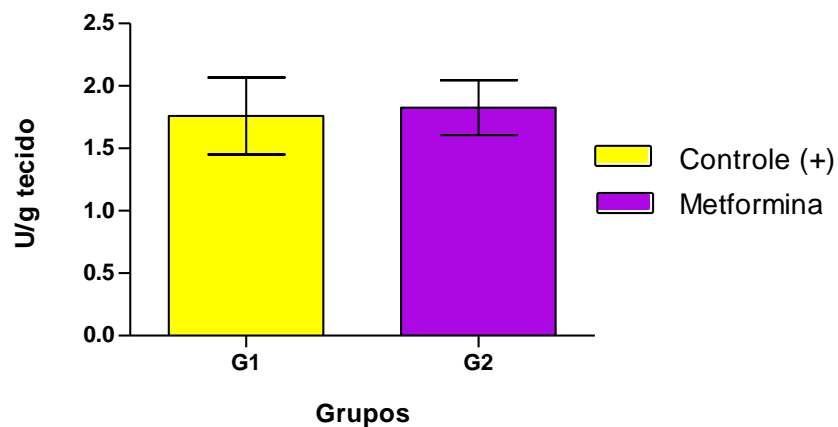


Figura 25 - Efeitos da metformina sobre a atividade da MPO no ovário de ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico (Média ± DP). T teste para amostras não pareadas

4.3 Efeitos da metformina, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a glicemia em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico

Não foram encontradas diferenças significantes na glicemia, comparando-se todos os grupos estudados (tabela 7, figura 26)

Tabela 7 – Valores da glicemia nos diversos tempos estudados, nas ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle

Grupos	T-0	T-1	T-2	Média ±DP
G-1	62,00	95,00	72,00	76,33±16,92
G-2	81,00	109,00	99,00	96,33±14,19
G-3	64,00	112,00	77,00	84,33±24,83
G-4	58,00	95,00	87,00	80,00±19,47
G-5	55,00	97,00	70,00	74,34±21,28
G-6	81,00	95,00	83,00	89,67± 7.57
G-7	65,00	113,00	82,00	86,67±24,34

Ausência de diferenças significantes, comparando todos os grupos. Teste: Dunnett (ANOVA)

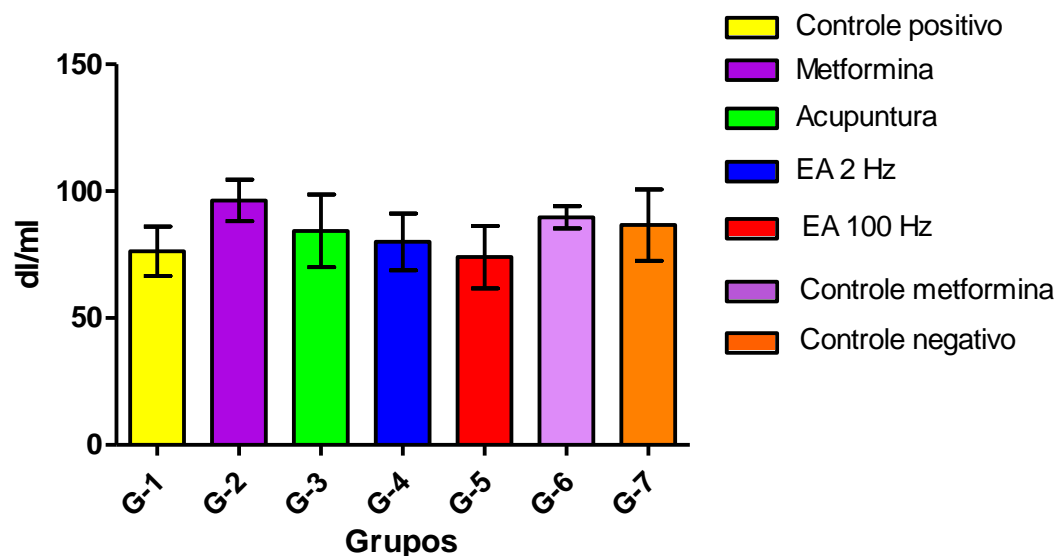


Figura 26 – Valores da glicemia nos diversos tempos estudados, nas ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle

4.4 Efeitos da metformina, da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a histologia do tecido ovariano em ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico

Não foram encontradas diferenças significantes no número de corpos lúteos, folículos císticos e folículos em desenvolvimento, no tecido ovariano de ratas saudáveis submetidas a estímulo estrogênico, comparando-se todos os grupos ao grupo valores basais (G7- controle negativo) (tabela 8, figuras 27, 28 e 29).

Tabela 8 – Número de corpos lúteos, Folículos císticos e folículos em desenvolvimento no ovário de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle

Grupos	Corpos lúteos	Folículos císticos	Folículos em desenvolvimento
G-1	2,67±1,03	0,67±0,82	3,83±2,32
G-2	5,40±2,41	0,60±0,89	2,33±2,25
G-3	5,00±2,00	1,50±1,87	4,50±1,05
G-4	3,00±3,35	1,33±1,21	6,67±5,28
G-5	3,80±1,92	2,00±1,41	5,17±4,62
G-6	4,67±1,21	0,50±0,84	3,17±1,47
G-7	4,17±0,41	1,17±1,17	3,83±1,33

Ausência de diferenças significantes, comparando todos os grupos. Teste: Dunnett (ANOVA)

4.4.1 – Efeitos sobre o número de corpos lúteos

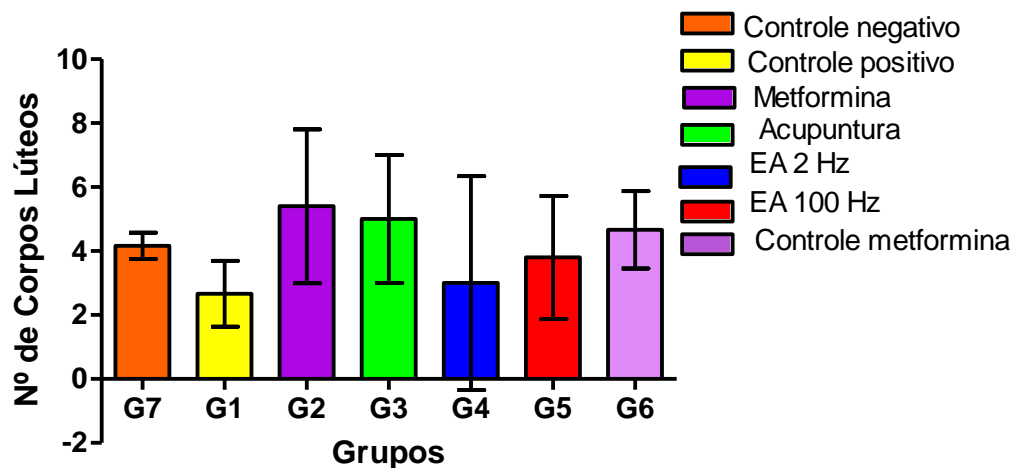


Figura 27 – Número de corpos lúteos no ovário de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2 e 100 Hz) e nos grupos controle. Ausência de diferenças significantes, comparando todos os grupos. Teste: Dunnett (ANOVA)

4.4.2 – Efeitos sobre o número de folículos císticos

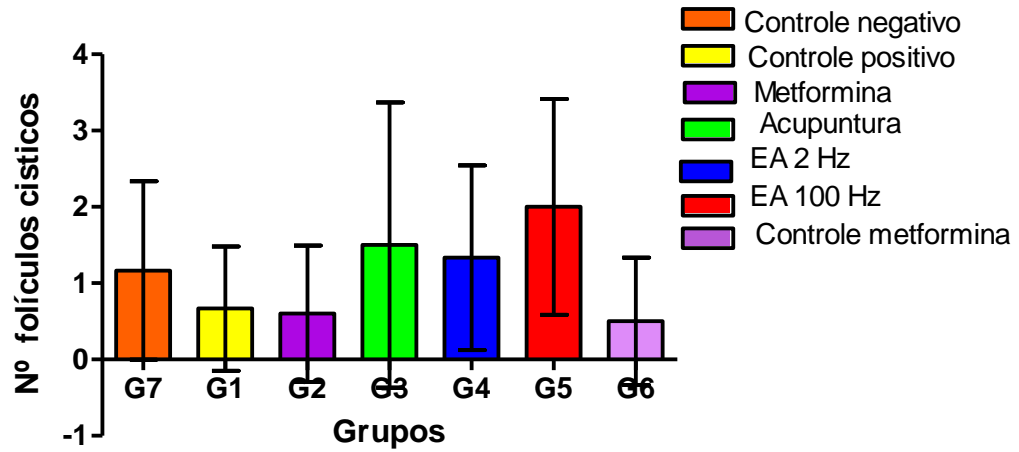


Figura 28 – Número de folículos císticos no ovário de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com *metformina*, *acupuntura*, *eletoacupuntura* (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle. Ausência de diferenças significantes, comparando todos os grupos. Teste: Dunnett (ANOVA)

4.4.3 – Efeitos sobre o número de folículos em desenvolvimento

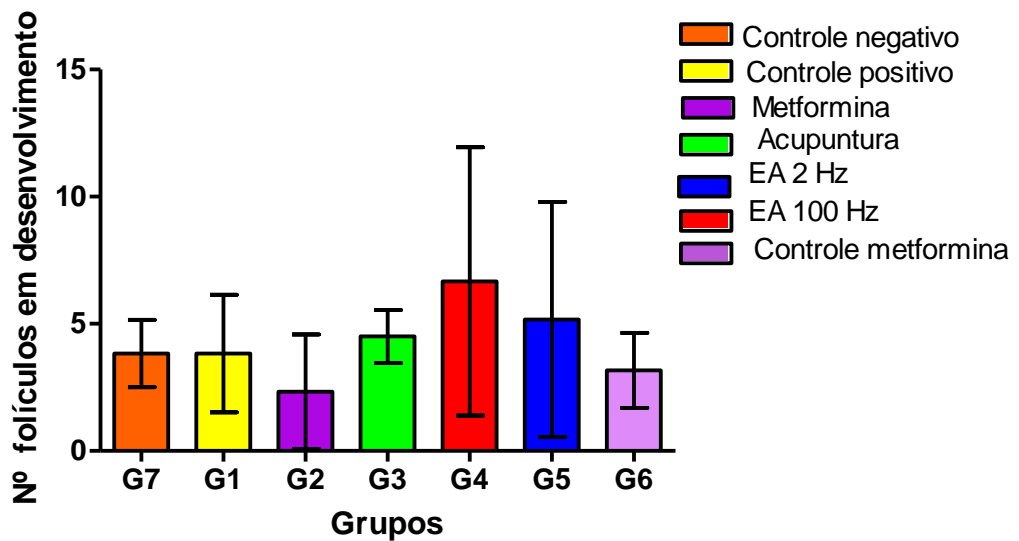


Figura 29 – Número de folículos em desenvolvimento no ovário de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com *metformina*, *acupuntura*, *eletoacupuntura* (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle. Ausência de diferenças significantes, comparando todos os grupos. Teste: Dunnett (ANOVA)

4.5 Resultado histopatológico do ovário D de ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico (figuras 30 e 31).

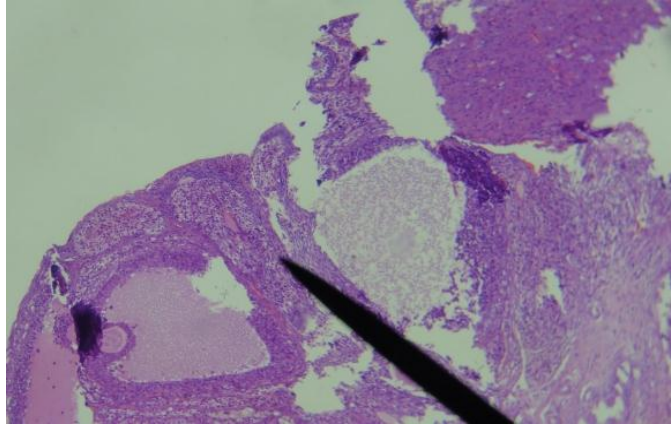


Figura 30 – Corte de ovário do grupo controle negativo G7, corado com Hematoxilina-Eosina, aumento 40x, mostrando aspecto normal.

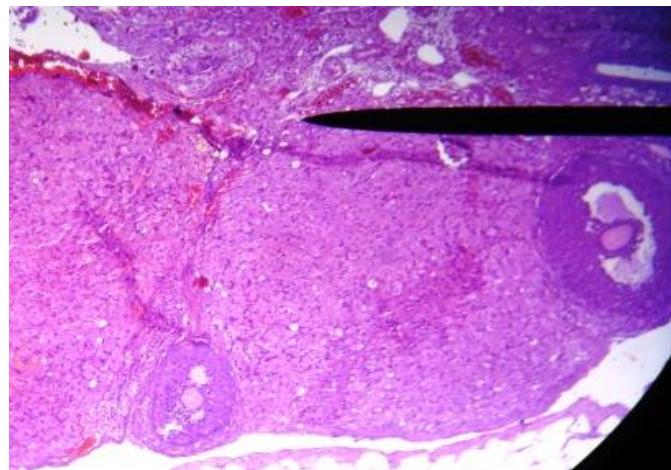


Figura 31 – Corte de ovário do grupo controle positivo G1, corado com Hematoxilina-Eosina, aumento 40x, mostrando aspecto normal .

4.6 Efeitos do estímulo estrogênico sobre o peso do hemiútero e ovário em ratas sadias

Não foram encontradas diferenças significantes nos pesos do útero e ovário direitos de ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico, comparando-se todos os grupos ao grupo valores basais (G7 - controle negativo).

Tabela 9 – Pesos úmidos do útero e ovários direitos de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com *metformina*, *acupuntura*, *eletoacupuntura* (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle positivo e negativo

Grupos	Peso do útero D	Peso do ovario D
G-1	2,67±1,03	0,67±0,82
G-2	5,40±2,41	0,60±0,89
G-3	5,00±2,00	1,50±1,87
G-4	3,00±3,35	1,33±1,21
G-5	3,80±1,92	2,00±1,41
G-7	4,17±0,41	1,17±1,17

Ausência de diferenças significantes, comparando todos os grupos. Teste: Dunnett (ANOVA) Valores expressos em miligramas (mg)

4.6.1 – Efeitos sobre os pesos úmidos do hemiútero direito

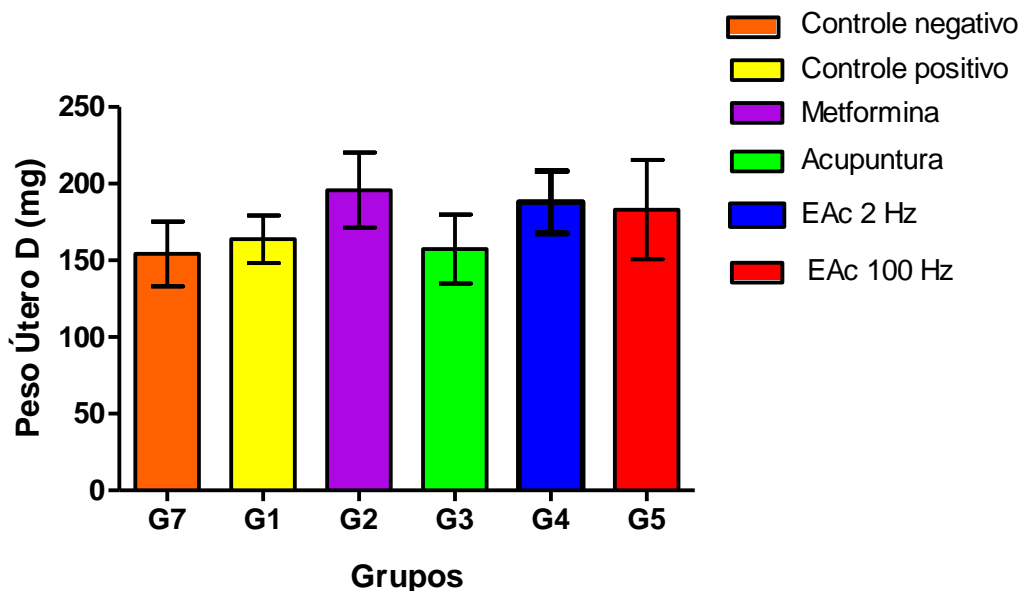


Figura 32 – Pesos do hemiútero direito de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com *metformina*, *acupuntura*, *eletoacupuntura* (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle positivo e negativo. Teste: Dunnett (ANOVA)

4.6.2 – Efeitos sobre os pesos úmidos do ovários direito

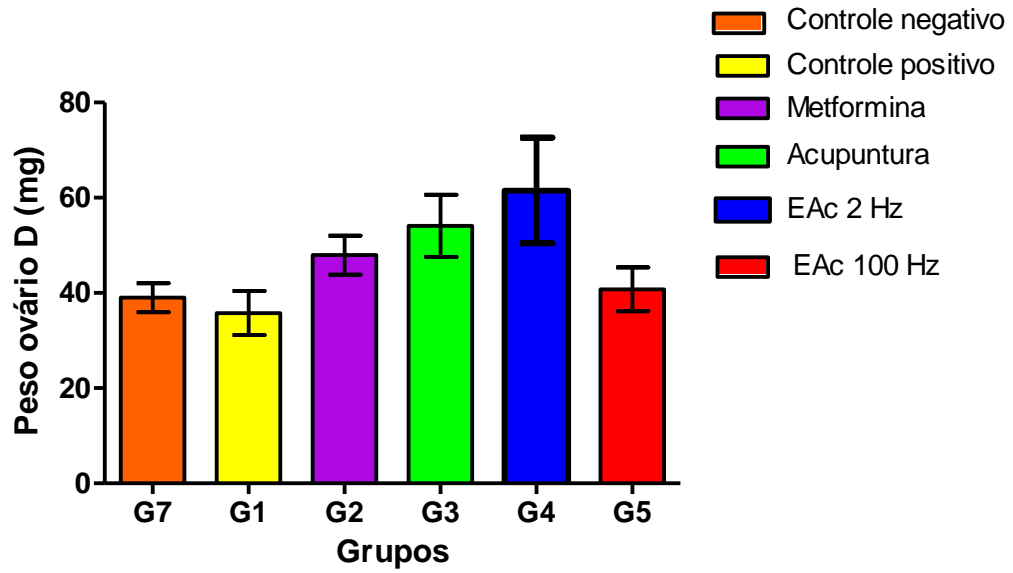


Figura 33 – Pesos do ovário direito de ratas submetidas a estímulo estrogênico e tratadas com metformina, acupuntura, eletroacupuntura (2Hz e 100Hz) e nos grupos controle positivo e negativo. Teste: Dunnett (ANOVA)

5 DISCUSSÃO

Estímulos hormonais, utilizando-se diferentes tipos de esteroides, com a finalidade de promover a citogênese ovariana, apresentam resultados característicos individuais. Porém, a promoção da anovulação é um objetivo comum desses experimentos, que é caracterizada pelos ovários policísticos, por meio de caminhos fisiopatológicos diferentes, avaliados pelas alterações morfológicas gonadais ou por níveis hormonais séricos. O animal geralmente submetido a esses experimentos é o rato ou camundongo, porque seu curto ciclo reprodutivo, composto de quatro a cinco dias, é representado por quatro fases: proestro (ovulatória), estro (pós-ovulatória), metaestro (ou diestro I /pré-ovulatória) e diestro (ou diestro II /pré-ovulatória), torna-se mais rápido e fácil estudar as alterações nesses ciclos, ressaltando-se, ainda, o baixo custo desse animal (SINGH, 2008).

Ensaio experimentais com animais submetidos à exposição de luz artificial constante, promovem alteração do ciclo circadiano, como, também, a administração de estrogênios, androgênios, anti-progestagênicos, inibidores da aromatase, lesões eletrolíticas no sistema límbico, e até a exposição constante a ruído ambiental, podem causar disfunções ovulatórias. O estresse auditivo, por um período de um mês, pode conduzir a estro persistente em ratos, semelhante ao estresse luminoso constante (SINGH, 2008, 1970). Essas pesquisas têm como finalidade o esclarecimento das síndromes anovulatórias em humanos, que fornecem informações úteis sobre os distúrbios morfológicos e hormonais envolvidos na patogênese dessas enfermidades.

Eisner *et al* (2000), realizando estudo em macacos Rhesus fêmeas, com exposição durante a gestação, independentemente da idade gestacional, a um estímulo de excesso androgênico, observaram uma diminuição da sensibilidade insulínica e, do seu *clearance*, em nível pancreático. É provável que isso tenha ocorrido por disfunção das células β pancreáticas, onde já se percebia uma correlação entre o hiperandrogenismo e sensibilidade insulínica, quando submetido a esse tipo de esteroide. Recentemente, modelos experimentais, com o objetivo de esclarecimento da fenotipia metabólica da síndrome em humanos, foram estudados em ratas pré-púberes, com 21 dias de idade, expostas a doses diferentes de testosterona, como o propionato de testosterona injetável ou a dehidrotestosterona

(implantes subcutâneos). Submetidas à sua ação, por mais de 35 dias (em média 90 dias), induziu-se a síndrome dos ovários policístico, com anovulação, disfunções morfológicas ovarianas (cistos antrais e sem corpo lúteo) e resistência insulínica (MANNERAS *et al*, 2008; JOHANSSON *et al*, 2010).

Neste trabalho, os animais foram submetidos à estimulação estrogênica, de acordo com a investigação de Stener-Victorin *et al* (2000), em que a dose de valerato de estradiol foi o dobro da preconizada por Brawer, (1986), de 4mg para animais com o peso médio de 200g, como também um maior tempo de exposição ao estímulo, por 60 dias para iniciar o experimento. Segundo a pesquisadora, essa dose administrada e esse tempo de exposição apresentavam maior efetividade anovulatória, com a morfologia ovariana mostrando uma maior predominância cística. Foi considerado, também, o fato de ser esse esteroide o mais estudado nessa modalidade de pesquisa, apesar de se saber das suas limitações quanto à modificação da glicemia, consequente à resistência insulínica.

Para demonstração da ação estrogênica no trato reprodutor feminino, utilizaram-se os pesos dos úteros, ovários e histologia ovariana. Surpreendentemente, não houve a anovulação, sem a formação do número de cistos ovarianos e corpos lúteos esperados (figuras 27, 28, 29, 30 e 31; tabela 8), não provocando, conseqüentemente, o aumento de peso do ovário e do peso do hemiútero direito, pela falta ou por fraca estrogenização, que se caracteriza, no útero, pelo aumento do edema celular endometrial, na fase proliferativa do ciclo estral (figuras 32 e 33; tabela 9). Não foi possível a correlação satisfatória de algum fator determinante, envolvido na falta de resposta ovariana à dose suprafisiológica de estrogênio administrada. Talvez, uma técnica de avaliação mais sensível quantitativamente, para mensuração e contagem dos cistos e folículos, com a utilização de métodos mais sofisticados, morfohistométricos, mostrasse algum resultado significativo quanto a esse aspecto

A geração de espécies reativas de oxigênio é um fator pró-inflamatório, importante evolutivamente, na superação de infecção, como também, na sua produção, dependendo da situação avaliada. Vários estudos com diferentes tipos de células ou espécies constataram que os níveis baixos de estrogênio em indivíduos ovariectomizados aumentaram a produção de EROs, enquanto a exposição ao

estrogênio em nível gravídico diminuiu essas espécies reativas de O₂ (AYRES *et al*, 1998; WANG, X. *et al*, 2006). Evidências mostram que esses níveis altos compatíveis com estado gravídico influenciam na diminuição da expressão da NADPH oxidase, melhorando, conseqüentemente, o EO (WAGNER *et al*, 2001).

Outro fator importante na geração de radicais de oxigênio é a mieloperoxidase, em que o estrogênio em níveis altos bloqueia sua expressão (BEKESI *et al*, 2001)

A maioria dos estudos demonstra que o estrogênio em proestro para níveis de gravidez inibe a formação de EROs. Essa atividade inibidora, contudo, pode ser revertida, conforme o tipo de célula e do microambiente, os quais levam à sua produção (CHEN, Z. H. *et al*, 2005).

As EROs exercem um papel de balanceamento entre o estado fisiológico e patológico no trato reprodutor feminino. Numerosos estudos em seres humanos e animais têm demonstrado a presença desses radicais em várias estruturas do sistema genital feminino, como: ovários, trompas uterinas e embriões. Elas estão envolvidas na modulação de todo o espectro fisiológico reprodutivo. Funções como maturação oocitária, esteroidogênese ovariana, ovulação, formação e função do corpo lúteo e luteólise, conseqüentemente, exercem um importante papel na etiopatogênese dos distúrbios ginecológicos, ligados principalmente à infertilidade (AGARWAL *et al*, 2005).

A expressão dos biomarcadores do estresse oxidativo, como a superóxido dismutase, superóxido dismutase ligada ao cobre e magnésio, glutathiona peroxidase, peróxidos lipídicos e mieloperoxidase, têm sido investigados por imuno-histoquímica, localização, expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e método de avaliação indireta, de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (SUGINO *et al*, 2000) com o objetivo de avaliar as influências desses radicais sobre os ciclos ovarianos em animais e humanos (BEHRMAN *et al*, 2001; SUZUKI *et al*, 1999).

Nesta pesquisa desenvolvida, foi observado e comparado o efeito da metformina, acupuntura e eletroacupuntura, no estresse oxidativo ovariano e sistêmico, por meios indiretos de níveis plasmáticos e teciduais de TARBS/MDA e dosagem de antioxidantes, GSH; no processo inflamatório ovariano, através de

biomarcadores inflamatórios diretos a MPO, e a glicemia, pelo teste de tolerância oral à glicose.

Nas ratas normais submetidas a estrogenização (G1), com dose alta de valerato de VE, não foram observadas alterações consideráveis dos biomarcadores oxidativo-inflamatórios (MDA/MPO), como também do antioxidante a glutathiona em comparação com o grupo controle não estimulado (G7) (figuras 34, 35, 36, 37 e 38, Apêndice F). Possivelmente, as condições microambientais ovarianas não apresentaram um estado patológico, e, sim, uma condição fisiológica normal, havendo um possível equilíbrio entre EROs, citocinas e antioxidantes. Considerando-se, todavia, a condição de alto nível de estradiol, seria esperada a ocorrência na diminuição desses marcadores oxidativos e inflamatórios (CHEN, Z. H. *et al*, 2005), ressaltando-se estar a função ovulatória, possivelmente, preservada nesses animais. Teoricamente, talvez, um estrogênio esterificado como o VE desencadeie diferentes reações oxidativas na função gonadal, comparada com o hormônio natural, o 17β estradiol. Por outro lado, estímulo em ratas, realizado com letrozole oral por 28 dias (um inibidor da enzima aromatase, que é responsável pela transformação de androgênio em estrogênios), mostra estado pró-inflamatório, com aumento desses marcadores, por indução de modelo anovulatório (SOP) em ratas. (SASIKALA *et al*, 2010)

O hidrato de cloral, administrado para realização do experimento, é um agente sedativo-hipnótico, frequentemente usado em pesquisas experimentais e intervenções de pouca complexidade em crianças, no ambiente hospitalar. Seu efeito aparece de 15 a 60 minutos, com pico máximo em 30 minutos. Seus principais metabólitos ativos são o tricloroetanol e o tricloroacético, produzidos nas células hepáticas e eritrócitos, em que 98% são compostos pelo tricloroetanol responsável por seu efeito sedativo.

Como transtornos adversos, vários experimentos em ratos mostram que doses altas (100mg/Kg) e repetidas, por um longo tempo (cinco vezes/sem, por 105 semanas), comprometem a função de conjugação hepática, efeitos gástricos e genotoxicidade. Essa última é atribuída a seus metabólitos finais, principalmente ao tricloroetanol, podendo causar a produção de tumores hepáticos por meio de aneuploidia cromossômica em células somáticas. Parece que esses metabólitos

geram radicais livres em nível leucocitário e, assim, induzem a peroxidação lipídica, que leva a danos genéticos e celulares (MARTINBIANCHO, 2008).

Neste experimento, esse anestésico foi administrado em doses de 300 mg/kg de peso, de acordo com vários experimentos realizados, por um período curto de dez dias, em cinco aplicações, com o objetivo de sedação leve para evitar o estresse nos animais submetidos ao tratamento com acupuntura, como, também, para a realização das laparotomias. No momento desse último procedimento, a dose usada foi um pouco mais alta, para melhor aprofundamento anestésico em todas as ratas.

De acordo com os estudos anteriormente citados, questiona-se uma possível influência do hidrato de cloral no estresse oxidativo desses animais, considerando-se: a repetição necessária das doses para sua realização e a sua maior concentração sanguínea diária, porém atenuados por um menor tempo de exposição. Contudo, o grupo de acupuntura (G3Ac) submetido a doses repetidas desse anestésico, não apresentou aumento da peroxidação lipídica (TBARS aumentado) plasmática ou ovariana, comparado com o grupo controle positivo G1 (G3Ac $0,146 \pm 0,17$ vs G1 $0,073 \pm 0,07$ plasmático e G3Ac $0,179 \pm 0,11$ vs G1 $0,073 \pm 0,07$ tecidual). Diferentemente, os grupos de eletroacupuntura G4EAc2 e G5EAc100 comparados a G1 (G4EAc2 $0,231 \pm 0,09$ vs G1 $0,073 \pm 0,07$ $p < 0,05$; G5EAc100 $0,296 \pm 0,09$ vs G1 $0,073 \pm 0,07$ $p < 0,001$ plasmático e G4EAc2 $0,255 \pm 0,03$ vs G1 $0,073 \pm 0,07$ $p < 0,05$; G5EAc100 $0,338 \pm 0,11$ vs G1 $0,073 \pm 0,07$ $p < 0,0001$ tecidual) (figuras 18 e 19; tabelas 3 e 4) mostraram, nitidamente, o aumento dos TBARS, comprovando a não interferência do hidrato de cloral no estado oxidativo plasmático e do tecido ovariano. Mesmo assim, existe necessidade de mais subsídios futuros na investigação quanto a essa real influência.

Para a realização das aplicações da Ac e EAc os pontos selecionados foram o E36 (Zusanli) e o BP6 (Sanyinjiao), devido à sua vasta e constante aplicação na Medicina tradicional Chinesa, para disfunções digestivas ou metabólicas, e ovarianas respectivamente. Assim como, serem esses amplamente estudados quanto ao esclarecimento de sua ação hipoglicemiante e reguladora da ovulação, em modelos experimentais e em humanos (MANNERAS *et al*, 2008; STENER-VICTORIN *et al*, 2000, 2004, 2006). Sabe-se que o estímulo com acupuntura ou EAc nesses pontos, ao serem penetrados através da pele, tecido subcutâneo e músculo,

irá provocar uma resposta, por meio das vias nervosas somáticas-sensoriais e autonômicas viscerais, um reflexo somático-somático e somático-visceral (SATO, 1997; ZHOU, W. *et al*, 2007), que desencadeará vários efeitos, como: analgésico, anti-inflamatório e regulador autonômico. O ponto Zusanli e o Sanyinjiao são localizados sobre o músculo quadríceps femural (no ventre do músculo tibial anterior) e músculo flexor profundo dos dedos, respectivamente, inervados por ramos das raízes nervosas emergentes de L4 a S1, estando relacionados aos segmentos somáticos e autonômicos da inervação pélvica, responsáveis pela a regulação de suas diversas funções sensitivas e neuroendócrinas (MARTINS, 2003).

AI-HUI LI *et al* (2005) ao mapearem os territórios das fibras C dos nervos peroneal superficial, tibial, sural e safeno de ratos de ambos os sexos, utilizando um método especial de coloração com Azul de Evans, verificaram que as patas traseiras de ratos são anatomicamente idênticas aos membros inferiores de seres humanos, justificando, assim, a identificação dos pontos de acupuntura no roedor, que ocupariam posição e ação semelhante aos pontos em humanos.

As frequências usadas para o estímulo com a EAc, foram de baixa frequência 2Hz e alta frequência 100Hz, com intensidade de 1mA. A ação hipoglicemiante, provocada pelo estímulo do ponto E36 (Zusanli) com baixas frequências 2Hz, e também com altas frequências 15hZ ou 100Hz intensidade de 10mA ou recentemente 0,5 a 1mA, tanto em ratos normais (CHANG *et al* 2005, 2006; FIGUEIRÊDO, 2009) como, também, em modelos experimentais para diabetes e para modelos de SOP (JOHANSSON, *et al*, 2010), são vastamente demonstradas na literatura científica. Por outro lado, o efeito desses pontos sobre o estresse oxidativo, em ratos saudáveis ou em modelos de enfermidades pró-inflamatórias, são escassos. Todos os trabalhos, entretanto, concordam em afirmar a promoção de uma ação protetora da EAc no processo inflamatório e oxidativo, mesmo quando aplicada com diferentes frequências e intensidades. (TIAN *et al.*, 2003; DAI *et al*, 2008; SILVA *et al*, 2011; WANG, H. *et al*, 2011; LIMA, P. L., 2011).

Nesta pesquisa, de acordo com os resultados encontrados por meio dos testes de tolerância oral à glicose, para observação quanto ao efeito hipoglicemiante e comparação entre a metformina, acupuntura e EAc, não foram encontradas diferenças significativas entre todos os grupo estudados (figura 26; tabela 7).

Verifica-se, assim, que a hiperestimulação estrogênica não desenvolveu, nas condições deste estudo, alteração no metabolismo da glicose. Esse resultado está em concordância e reforça a conclusão da pesquisa realizada por Stener-Victorin (2005). A autora concluiu que ratas estimuladas com valerato de estradiol desenvolvem hipertensão e aumento da atividade simpática e do eixo HPA, sem alteração, porém, da sensibilidade à insulina, obesidade ou hiperandrogenismo.

Curiosamente, modelos experimentais para ovários policísticos, desenvolvidos pela indução com Dehidrotestosterona (DHT) em ratas pré-púberes, conduzem a um estado de hiperinsulinemia por resistência insulínica. É provável que esse fato esteja relacionado ao hiperandrogenismo (MANNERAS *et al*, 2008), o qual é fundamental nessa situação e está presente em 80% das pacientes com SOP (FRANKS, 1995; COVIELLO *et al*, 2006).

Johansson, *et al*, (2010), também em modelos de SOP, por indução androgênica, ao usar a EAc com estímulo de baixa intensidade 0,5 a 1mA, associado à baixa frequência de 2Hz, aplicados nos músculos retos abdominais, gastrocnêmio e solear, que correspondem à inervação do segmento de T12-L2, nervos sacrais e inervação autonômica interligadas, restauraram a sensibilidade normal à insulina, aumentaram a expressão de proteínas de GLUT4 nos vários compartimentos das células do músculo esquelético solear, melhorando, também, o perfil lipídico nesses ratos.

Tudo indica que esse efeito hipoglicemiante, com baixas frequências e intensidades variando até 10mA, processa-se por meio de vias opioidérgicas pela liberação de β endorfinas na glândula suprarrenal (CHANG *et al* 2005), agindo nos receptores μ 1 opioides, localizados, também, em tecidos periféricos. Isso proporciona, conseqüentemente, uma melhora da expressão do gene GLUT-4 e uma atenuação da expressão de gene da fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) hepática. (CHENG, J. T. *et al*, 2006; CHANG *et al*, 2006; LIN, J. G. *et al*, 2002).

Outra possível via seria por uma *upregulation* da sinalização das proteínas IRS1 e AKT2 (via fosfatidilinositol 3 cinase), por estímulos dos nervos colinérgicos, pois o uso de atropina bloqueia esse efeito (LEE, C. Y. *et al*, 2011). Trabalhos mais recentes relatam, também, o envolvimento da enzima óxido nítrico sintetase, nesse mecanismo colinérgico (LIN, R. T. *et al*, 2011), ressaltando, que não só a contração

muscular desencadeada pelo reflexo somático provocado pelo estímulo da EAc, caracteriza um exercício muscular (HIGASHIMURA *et al*, 2009; LIN, J. G. *et al*, 2002), mas, também, o exercício físico propriamente dito, proporcionam a liberação de β endorfina, que segue os caminhos moleculares citados anteriormente, e assim contribuem, também, para seu efeito hipoglicemiante (SU *et al*, 2005; MANNERAS *et al*, 2008).

Quanto ao estresse oxidativo e inflamatório, a administração da metformina não alterou significativamente as concentrações plasmática e teciduais de GSH, TBARS e tecidual da MPO, comparadas ao grupo controle positivo (G1) (figuras 21, 22, 23, 24 e 25; tabela 6). É sugerido, dessa forma, que a metformina não exerceu ação sobre o controle das EROs produzidas na peroxidação lipídica (MDA) (LIMA, S. E. *et al*, 2001) ou no complexo MPO, indicador de processo inflamatório tecidual (KLEBANOFF, 1999; PEDRO *et al*, 2003), independentemente da etiologia do desequilíbrio oxidativo, metabólico ou traumático, nesses animais.

Ficou claro, também, através dos artigos citados, que a ação estrogênica não caracteriza a fenotipia metabólica da anovulação ovariana (SOP) e, dessa maneira, não ocorre diminuição da sensibilidade insulínica. Sabendo-se que existe uma relação entre as vias moleculares de sinalização da insulina com as ocitocinas pró-inflamatórias (FERNÁNDEZ-REAL *et al*, 2003), e, também, que esse fármaco age, possivelmente, propiciando o incremento dessa sensibilidade hepática e facilitando o transporte da glicose, por meio da regulação dos processos de sinalização pós-receptor (KUMAR *et al*, 2002), e na regulação a produção androgênica tecal (ATTIA, 2001), dessa maneira, talvez, o modelo hiperandrogênico pudesse fornecer melhores resultados e esclarecimentos. Não foi, contudo, encontrado em bancos de dados ensaios clínicos experimentais na investigação da ação da metformina no estresse oxidativo e inflamatório nesses modelos androgênicos, para melhor comparação e compreensão dos mecanismos envolvidos.

No presente trabalho, a aplicação de acupuntura e eletroacupuntura (2 e 100Hz), usando baixa intensidade 1mA por 20 minutos, apresentou efeito antioxidante sistêmico e ovariano. Esses efeitos foram evidenciados pelo aumento significativo no nível de GSH plasmático (figura 17, tabela 2), ressaltando-se ser esse tripeptídeo um marcador da saúde celular, e sua queda é indicativa de lesão

oxidante. Mudanças no nível sérico desse antioxidante e no fluido peritoneal têm desempenhado um papel importante na avaliação da integridade funcional do sistema reprodutivo e na patogênese da infertilidade idiopática (LEE, Y. J. *et al*, 2010).

Em uma observação direcionada, especificamente, aos resultados com a eletroacupuntura sobre o nível da GSH, no plasma e em tecido ovariano, ela desencadeou um aumento significativo nas suas concentrações, promovendo uma potencialização dos efeitos antioxidante, principalmente com a alta frequência, tanto em nível plasmático (G4EA2 $30,80 \pm 3,22$ vs G1 $20,30 \pm 0,43$ $p < 0,0001$ e G5EA100 $40,30 \pm 3,48$ vs G1 $20,30 \pm 0,43$ $p < 0,0001$) (figura 17; tabela 2), como tecidual (G4EA2 $47,00 \pm 17,60$ vs G1 $25,70 \pm 2,33$ $p < 0,05$ e G5EA100 $63,00 \pm 12,40$ vs G1 $25,70 \pm 2,33$ $p < 0,0001$) (figura 16; tabela 1)

Esses resultados, quanto a essa ação da EAc, são concordantes com os descritos por Lima, P. L. *et al* (2011) na investigação em modelos experimentais de retalhos cutâneos para avaliação da recuperação isquêmica e inflamatória, após trauma cirúrgico, utilizando a aplicação de EAc de baixa e alta frequências (3 e 100Hz) na intensidade de 10mA por 30 minutos, em outros pontos específicos, circulando os retalhos. O mesmo ocorre, com os resultados de Silva *et al* (2011), em investigação realizada em ratos machos normais submetidos também à EAc de alta e baixa frequência (10 e 100Hz), nos pontos E36 (Sunzali) e Ren12 (Zonghwan), intensidade 10mA, em apenas uma única aplicação.

Ainda em nível tecidual, modelo de camundongos com doença de Parkinson, MPTP (toxina neuroquímica 1-meil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), tratados com EAc, apenas na frequência de 100Hz, com intensidade (1,2 a 1,5mA) nos mesmos pontos E36 e BP6 (Sanyinjao), semelhantemente, mostrou um aumento da concentração da glutatona na substância nigra mesencefálica, como também na atividade total da superóxido dismutase e do efeito antiapoptótico (WANG, H. *et al*, 2011), reforçando e estando de acordo com esta pesquisa. Esses resultados levam-nos à reflexão de que esses efeitos, potencializados com frequências diferentes, parecem depender de tipos diferentes de neurotransmissores, possivelmente, opioidérgicos envolvidos. Lembre-se que baixas e altas frequências estimulam diferentes tipos de neurotransmissores opioides (HAN, J. S. *et al*, 1984; CHEN e HAN 1992).

A ação anti-inflamatória da acupuntura sistêmica acontece por via opioidérgica por liberação simultânea de β endorfina e ACTH (CLEMENT-JONES *et al*, 1980), assim como por controle de novos mecanismos periféricos colinérgicos, envolvendo o NO (TSUCHIYA *et al*, 2007; TRACEY, 2007), que tem relação com a função ovulatória pela inibição da esteroidogênese no corpo lúteo. Essa ação é mediada por aumento de prostaglandinas luteolíticas e por apoptose, devido à geração de EROs, resultante da interação do NO com radicais superóxido (BEDAIWY *et al*, 2004).

Na avaliação do efeito da acupuntura sem estímulo elétrico nos níveis de GSH, com a exposição do estímulo por 20 minutos, demonstrou-se, também, um efeito antioxidante sistêmico (G3Ac $24,50 \pm 1,59$ vs G1 $20,30 \pm 0,43$ $p < 0,05$) (figura 17, tabela 2), mas sem efeito local no tecido ovariano, onde não foi evidenciado existir uma alteração significativa nas concentrações desse antioxidante (G3Ac $38,80 \pm 10,20$ vs G1 $25,70 \pm 2,33$) (figura 16, tabela 1).

Esse estudo é semelhante ao realizado em modelos experimentais de ratas menopausadas, em que foi objetivado uma investigação apenas em nível sérico, por Dai *et al* (2008) usando os mesmos pontos estimulados nessa pesquisa, com acréscimo do ponto B23 (Shenshu, localizado na depressão lateral da segunda vértebra lombar) (YIN *et al.*, 2008), com a mesma duração do estímulo. Mostrou-se, então, um aumento no nível de uma enzima antioxidante, a superóxido dismutase (SOD), sabendo-se que, na menopausa, há um acréscimo natural do estado oxidativo, devido à diminuição estrogênica, assim como reduzida expressão de genes antioxidantes (KITAGAWA *et al*, 2004), provocando diminuição intracelular dos níveis de ATP e dano mitocondrial em nível ovariano.

Silva *et al* (2011) em investigação do estresse oxidativo, realizada em tecido hepático e renal de ratos machos normais, submetidos a acupuntura sem o estímulo elétrico, por 30 minutos, nos pontos E36 e Ren12, obteve elevação da GSH, tanto em tecido hepático e renal, como plasmático.

Uma avaliação objetiva desses resultados, comparados sobre a concentração de glutatona, sugere que a acupuntura sem estímulo elétrico apresenta, também, um efeito protetor local. Curiosamente, talvez, exija-se um maior tempo de estímulo, mais do que 20 minutos, onde 10 minutos possam fazer diferença na resposta local

tecidual obtida nos ensaios experimentais comparados. São necessários mais experimentos, quanto à duração do estímulo sobre a fibra nervosa, para melhor esclarecimento do efeito antioxidante da acupuntura em tecido ovariano submetido ao estresse oxidativo. Lembre-se, ainda, que o tecido estudado influencia na resposta obtida sobre o efeito da acupuntura, haja vista as diferentes capacidades oxidantes dos tecidos orgânicos. Modelos experimentais, utilizando ratos, comprovaram que o fígado é o órgão dotado de maior capacidade antioxidante, seguido pelo sangue, coração e músculo (DI MEO *et al*, 1996).

Os marcadores inflamatórios e oxidativos estudado, a MPO (PEDRO *et al*, 2003) e o MDA (LIMA, S. E. e ABDALLA, 2001), este último avaliado indiretamente por meio dos TBARS, apresentaram resultados opostos em relação a EAc (2 e 100Hz), enquanto houve decréscimo da MPO (G4 $0,59 \pm 0,21$ vs G1 $1,76 \pm 0,31$ $p < 0,05$; G5 $0,65 \pm 0,05$ vs G1 $1,76 \pm 0,31$ $p < 0,0001$) (figura 20, tabela 5), a TBARS/MDA ascendeu (G4 $0,231 \pm 0,09$ vs G1 $0,054 \pm 0,07$ $p < 0,05$ e G5 $0,296 \pm 0,09$ vs G1 $0,054 \pm 0,07$ $p < 0,001$) (figura 18, tabela 3). Na acupuntura sem estímulo elétrico, porém, não ocorreu alteração nos resultados desses dois marcadores, tanto em nível tecidual, para ambos, como também em nível plasmático, em relação ao MDA (TBARS).

Os resultados encontrados, no entanto, foram divergentes em relação a algumas pesquisas anteriormente citadas, utilizando-se tecidos e doenças experimentais diferentes, como na doença degenerativa de Parkinson submetida à EAc (WANG, H. *et al*, 2011) e em ratas menopausadas por castração (DAI *et al*, 2008) submetidas à acupuntura sem estímulo. Foi referida por esses autores, uma diminuição, e, não, um aumento no nível de TBARS/MDA, diminuição essa que implica em uma menor peroxidação lipídica celular, e, conseqüentemente, em um menor estresse oxidativo, mesmo quando submetidos a acupuntura sem estímulo elétrico. Por outro lado, Silva *et al* (2011) e Lima, P. L. (2011) obtiveram resultados concordantes com os dessa pesquisa, um aumento no nível de MDA/TBARS, em ratos normais e em retalhos cutâneos, respectivamente, submetidos a Ac e EAc, com intensidade do estímulo dez vezes maior, porém com frequências e alguns pontos semelhantes ao deste estudo.

Lima, P. L. (2011), no mesmo experimento avaliou, também, a enzima MPO biomarcador inflamatório, nos retalhos cutâneos, mostrando seu decréscimo não

apenas com EAc, dado semelhante ao resultado desta pesquisa, mas, também, na aplicação de acupuntura sem estímulo elétrico.

Através dessas observações, pode-se deduzir que acupuntura promove uma proteção ao estresse oxidativo e a estados inflamatórios nas diversas situações de agressão à homeostase do indivíduo, seja isquêmica, por trauma cirúrgico, metabólica e/ou anovulatória, e, principalmente, quando potencializada por estímulo elétrico, mesmo com corrente de pequena intensidade (1mA). Existem, no entanto, algumas divergências quanto à regulação da peroxidação lipídica. Certamente, mais investigações, quanto ao aspecto oxidativo-inflamatório em animais experimentais, precisam ser realizadas para melhores esclarecimentos dos mecanismos envolvidos, principalmente, sob estímulo dos esteroides, os quais podem apresentar ações opostas, protetoras ou pró-inflamatórias, dependendo da espécie e do microambiente considerado.

Pesquisas com maior amostragem, mais idênticas quanto ao tipo de modelo selecionado, de órgão estudado, da duração da aplicação do estímulo, dos números de aplicações, dos pontos escolhidos, da intensidade e da frequência do estímulo elétrico aplicado, podem levar ao esclarecimento dessa divergência encontrada no efeito da Ac e EAc sobre a peroxidação celular, enfatizando não apenas a complexidade desse processo, na manutenção do equilíbrio orgânico, mas também os passos iniciais nesse campo de pesquisa.

6 CONCLUSÃO

A acupuntura e eletroacupuntura com frequência de 2hz e 100hz promovem uma ação protetora contra o estresse oxidativo sistêmico em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico;

O estímulo de eletroacupuntura com frequência de 2 e 100Hz promove, também, uma ação protetora contra o estresse oxidativo local, em tecido ovariano de ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico;

O estado inflamatório dos ovários de ratas sadias, submetidas a estímulo estrogênico, diminui com a aplicação de eletroacupuntura com frequência de 2 e 100Hz;

A eletroacupuntura induz uma resposta pró-peroxidativa lipídica, em nível sistêmico e ovariano em ratas estimuladas com estrogênio;

A metformina não apresenta influência no estresse oxidativo sistêmico e local; tampouco no processo inflamatório ovariano de ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico;

A acupuntura, eletroacupuntura e metformina não apresentam efeito na glicemia em ratas submetidas ao estímulo estrogênico.

7 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SEKHON, L.; SHAH, R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: From molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal** 2008;10(8):1375-1403.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S. and SHARMA, K.R. Review, e Role of oxidative stress in female reproduction, **Reproductive Biology and Endocrinolog** 2005;3:28.
- AI-HUI, L. I.; JUN-MING, ZHANG; YI-KUAN, XIE. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin-nerve complexes with enriched nerve endings. **Brain Research** 2005;1012:154-159.
- ANDERSSON, S. The functional background in acupuncture effects. **Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine** 1993;29(sup):31-60.
- ATTIA, G. R.; RAINAY, W. E. and CARR, B. R. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells, **Fertil Steril** 2001;76:517-524.
- AYRES, S.; ABPLANALP, W; LIU, J. H.; SUBBIAH, M. T. Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17 β on lipid peroxidation and DNA damage. **Am J Physiol** 1998;274:E1002-E1008.
- AZZIZ, R.; MARIN, C.; HOQ, L.; BADAMGARAV, E.; SONG, P. Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. **J. Clin. Endocrinol Metab** 2005; 90:4650-4658.
- BALDRY, P. Acupuntura, Pontos-gatilhos e Dor Musculoesquelética. São Paulo: Roca, 2008;486p.
- BARBUSINSKI, K. Henry John Horstman Fenton - Short Biography and Brief History of Fenton Reagent Discovery. **Chemia, Dydaktyka, Ekologia, Metrologia** 2009:101-105.
- BEDAIWY, M. A; FALCONE, T.; Mohamed, M. S.; Aleem, A. A.; Sharma, R.K.; Worley, S. E.; Thornton, J.; Agarwal, A. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. **Fertil Steril** 2004;82:593-600.
- BEDAIWY, M. A.; FALCONE, T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinico pathological implications. **Minerva Ginecol** 2003;55:333-345.
- BEHRMAN, H. R; KODAMAN, P. H.; PRESTON, S.L; GAO, S. Oxidative stress and the ovary. **J Soc Gynecol Investig** 2001;8:40-42.
- BEKESI, G.; Kakucs, R; Varbiro, S; Feher, J; Pazmany, T; Magyar, Z; Sprintz. D; Szekacs, B. Induced myeloperoxidase activity and relateds uperoxide inhibition during hormone replacement therapy. **B JOG** 2001;108:474–481.
- BOULMAN, N.; LEVY, Y.; LEIBA, R.; SHACHAR, S.; LINN, R.; ZINDER, O., *et al.* Increased C-reactive protein levels in the polycystic ovary syndrome: a marker of cardiovascular disease. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89:2160-2165.

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

BRAWER, R. J.; MUNOZ, M. and FAROOKHI, R. Development of the Polycystic Ovarian Condition (PCO) in the Estradiol Valerate-Treated Rat. **Biology of Reproduction** 1986;35:647-655.

BRAWER, R. J.; NAFTOLIN F.; MARTIN, J.; SONNENCHEIN, C. Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. **Endocrinology** 1978;103(2):501-512.

BRUNETTE, M. G.; LECLERC, M. Renal action of progesterone: effect on calcium reabsorption. **Mol Cell Endocrinol** 2002;30(194):183-190.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology** 1978;52:302-310.

CARMINA, E.; ROSATO, F.; JANNI, A.; RIZZO, M.; LONGO, R.A. Relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. **J Clin Endocrinol Metab** 2006;91:2-6.

CHANG, S. L.; LIN, K. J.; LIN, R. T.; HUNG, P. H.; LIN, J. G.; CHENG, J. T. Enhanced insulin sensitivity using electroacupuncture on bilateral Zusanli acupoints (ST 36) in rats. **Life Sciences** 2006;79:967-971.

CHANG, S. L.; TSAI, C. C.; LIN, J. G.; HSIEH, C. L.; LIN, R. T.; CHENG, J. T. Involvement of serotonin in the hypoglycemic response to 2 Hz electroacupuncture of Zusanli acupoint (ST 36) in rats. **Neuroscience Letters** 2005;379:69-73.

CHANG, S. L.; LIN, J.G.; CHI, T.C.; LIU, I.M.; CHENG, J. T. An insulin-dependently hypoglycaemia induced by electroacupuncture at the Zhongwan (CV12) acupoint in diabetic rats. **Diabetologia** 1999;42(2):250-255.

CHENG, J. T.; HUANG, C. C.; LIU, M.; TZENG, T. F.; CHANG, J. C. Novel Mechanism for Plasma Glucose-Lowering Action of Metformin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Diabetes** 2006;55:819-825.

CHEN, Z. H.; NA, H. K.; HURH, Y. J.; SURH, Y. J. 4-Hydroxyestradiol induces oxidative stress and apoptosis in human mammary epithelial cells: possible protection by NF- κ B and ERK/MAPK. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 2005;208:46-56.

CHEN, X. H.; HAN, J. S. Analgesia induced by electroacupuncture of different frequencies is mediated by different types of opioid receptors: another cross tolerance study. **Behav. Brain Res** 1992;47:143-149.

CHENG, R.; POMERANZ, B. Monoaminergic mechanisms of electroacupuncture analgesia. **Brain Res** 1981;215:77-92.

CHENG, R.; POMERANZ, B. H. Electroacupuncture analgesia is mediated by stereospecific opiate receptors and is reversed by antagonists of Type I receptors. **Life Sciences** 1980;26:631-638.

CHIANG, C. Y.; CHANG, C. T.; CHU, H. L.; YANG, L. F. Peripheral afferent pathway for acupuncture analgesia **Scientia Sinica** 1973;16:210-217.

CLEMENT-JONES, V.; MCLOUGHLIN, L.; TOMLIN, S.; BESSER, G. M.; REES, L. H.; WEN, H. Increased beta-endorphin but not met-enkephalin levels in human cerebrospinal fluid after acupuncture for recurrent pain. **Lancet** 1980;2:946-949.

Colégio Médico Brasileiro de Acupuntura, site: www.cmba.org.br

COUSE, J. F.; YATES, M. M.; DEROO, B. J.; KORACK, K. S. Estrogen Receptor β is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. **Endocrinology** 2005;146(8):3247-3262.

COUSE, J. F.; YATES, M. M.; WALKER, V. R.; KORACH, K. S. Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in female mice lacking ER- α & not ER. **Mol Endocrinol** 2003;17(6):1039-1053.

COVIELLO, D.; LEGRO, R. S.; and DUNAIF, A. Adolescent Girls with Polycystic Ovary Syndrome Have an Increased Risk of the Metabolic Syndrome Associated with Increasing Androgen Levels Independent of Obesity and Insulin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 2006;91(2):492-497.

DAI, M.; MA, X.-P.; SHI, Z.; WU, H.-G.; ZHAO, T. P.; JIANG, G. N. Effect of Acupuncture on Serum SOD and MDA of Rats in Menopause. **J Acupunct Tuina Sci** 2008;6:79-82.

DESHPANDE, R.R.; CHANG, M.Y.; CHAPMAN, J.C.; MICHEAL, S.D. Alteration of cytokine production in follicular cystic ovaries induced in mice by neonatal estradiol injection. **Am J Reprod Immunol** 2000;44:80-88.

DI MEO, S.; VENDITT, P.; De LEO, T. Tissue protection against oxidative stress. **Experientia**, 1996;52(8):786-794.

DORNETTE, W. H. L. The anatomy of acupuncture. **N Y Acad Med** 1975;51(8):895-902.

EISNER, J. R.; DUMESIC, D. A.; KEMNITZ, J.W.; ABBOTT, D. H.; Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys, **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:1206-1210.

FENG, Y.; JOHANSSON, J.; SHAO, R.; MANNERA, L.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J.; BILLIG, K. H.; VICTORIN, S. E. Hypothalamic Neuroendocrine Functions in Rats with Dihydrotestosterone-Induced Polycystic Ovary Syndrome: Effects of Low-Frequency Electro-Acupuncture, **PLoS ONE** 2009 4(8): e6638.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocr Rev** 2003;24:278-301.

FIGUEIRÊDO, M. L. **Efeito da Acupuntura e da Eletroacupuntura sobre a glicemia, lactacemia e as concentrações de lactato no fígado e rim em ratos saudáveis.** Dissertação 87f. (Mestrado em Cirurgia), Universidade Federal do Ceará, 2009.

FILSHIER, J.; WHITE, A. Acupuntura Médica, um enfoque científico do ponto de vista Ocidental. São Paulo. Ed **Roca** 2002:554p.

FRANKS, S. Polycystic ovary syndrome. **N Engl J Med** 1995;333:853-861.

GIGUÈRE, V.; YANG, N.; SEGUI P.; EVANS, R.M. Identification of a new class of steroid hormone receptors. **Nature**, 1988;331:919–948.

GLAZER, E. J.; BASBAUM, A. I. Axons which take up serotonin are presynaptic to enkephalin immunoreactive neurons in cat dorsal horn. **Brain Research** 1984;289:389-391.

GLUECK, C. J.; PHILLIPS, H.; KOBAYASHI, S.; SIEVE-SMITH, L.; WANG, P. Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril** 2002;77(3):520-252.

GLUECK, C.J.; PHILLIPS, H.; CAMERON, D.; SIEVE-SMITH, L.; WANG, P. Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. **Fertil Steril** 2001;75:46-52.

GONZÁLEZ, F.; ROTE, N. S.; MINIUM, J. and KIRWN, P.J. Evidence of Proatherogenic Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome, **Metabolism July** 2009;58(7):954-962.

GONZÁLEZ, F; ROTE, N. S.; MINIUM, J; KIRWAN, J. P. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2006;91:336-340

GONZÁLEZ, F; MINIUM, J; ROTE, N. S.; KIRWAN, J. P. Hyperglycemia alters tumor necrosis factor- α release from mononuclear cells in women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2005;90:5336-5342.

GUNN, C. C.; DITCHBURN, F.G.; RENWICH, G. J. Acupuncture loci: a proposal for their classification according to their relationship to known neural structure. **Am j Chin Med** 1976;4:85-183.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** 1990;186:1-85.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine.** Oxford: Clarendon Press 1989:543p.

HAN, C. S.; CHOU, P. H.; LU, C.C.; LU, L. H. *et al.* The role of central 5-HT in acupuncture analgesia. **Sci Sin** 1979;22:91-104.

HAN, J. S.; DING, X. Z.; FAN, S. G. Cholecystiquin octapeptide (CCK8): Antagonism to electroacupuncture analgesia and a possible role in electroacupuncture tolerance. **Pain** 1986;27:101-115.

HAN, J. S.; XIE, G. X.; FAN, S. G. High and low frequency electroacupuncture analgesia are mediated by different opioid peptides. **Pain** 1984;369(sup):543.

HASHIMOTO, T; AIKAWA, T. Needling effects on nociceptive neurons in rats spinal cord. **Proceedings of World Congress on Pain IASF, Seattle** 1993:428.

HERMES, L. M; ZENTERO, S.T. Anormal response to drastic changes in oxygen availability and Physiological oxidative stress. **Comp Biochem physiol C Toxicol pharmacol** 2002;133(4):537-556

HERMES, L. M.; WILMORE WG; STOREY, K.B. Quantification of lipid in tissue extracts based on Fe(III) xilenol orange complex formation. **Free Rad Biol and Med** 1995;19(3):271-280.

HIGASHIMURA, Y.; SHIMOJU, R.; MARUYAMA, H., KUROSAWA, M. Electroacupuncture improves responsiveness to insulin via excitation of somatic afferent fibers in diabetic rats. **Auton.Neurosci** 2009;150(1-2):100-103.

HUGHES, J.; SMITH, T.W.; KOSTERLITZ, H .W.; FOTHERGILL, L. A.; MORGAN, B. A.; MORRIS, H. R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature** 1975;258:577-579.

JEFFERSON, W. N.; COUSE, J. F.; BAMKS, E. P.; KORACH, K. S.;NEWBOLD, R. R. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor -alpha (ER α) expression and multioocyte follicle in the maturing mouse ovary: evidence for estrogen receptor- beta (ER β) mediated and nonestrogenic actions. **Biol Reprod** 2002;67:1285-1296.

JOHANSSON, J.; FENG, Y; SHAO, R.; MALIN LÖNN, M.; HA KAN BILLIG, K. H. and STENER-VICTORIN, E. Intense electroacupuncture n,ormalizes insulin sensitivity, increases muscle GLUT4 content, and improves lipid profile in a rat model of polycystic ovary syndrome. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2010;299:E551-559.

KAWAKITA, K.; FUNAKOSHI, M..Supression of the jawopening reflex by conditioning A-delta fiber stimulation and electroacupuncture in the rat. **Experimental Neurology** 1982;78:461-465.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T.; Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology** 2004;62:1186-1197.

KLEBANOFF, S. J. Mieloperoxidase, **Proc Am Assoc Physicians** 1999;111 (5):383-389.

KNOCHENHAUER, E.S.; KEY, T.J.; KAHSAR-MILLER, M.; WAGGONER, W.; BOOTS, L.R.; AZZIZ, R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. **J Clin Endocrin Metab** 1998;83:3078-82.

KWON, T.W., WATTS, B.M. Malondialdehyde in aqueous solution and its role as a measure of lipid oxidation in food. **Journal of Food Science**, 1964; 29: 294-302,

KUMAR, N.; DEY, C. S. Metformin enhances insulin signaling in insulin independent and -independent pathways in insulin resistant muscle cells. **Br J Pharmacol** 2002;137:329-336.

KUMAZAWA, T.; PERL, E. R. Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. **Journal of Comparative Neurology** 1978;177:417-434.

KUIPER, G.G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HÄGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology** 1997;138:863-870.

LARA, E. H.; DISSEN, A. G.; LEYTON, V.; PAREDES, A.; FUENZALIDA, H.; FIEDLER L. J. and OJEDA R. S. An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and Its Low Affinity Receptor Is a Principal Component of Steroid-Induced Polycystic Ovary in the Rat, **Endocrinology** 2000;141:1059-1072.

LEE, C. Y.; LI, M. T.; TZENG CHUNG-YUH; CHENG YU-WEN; CHEN YING-I, H. O.; WAI-JANE; LIN, G. J. and CHANG, S. L. Electroacupuncture-Induced Cholinergic Nerve Activation Enhances the Hypoglycemic Effect of Exogenous Insulin in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetes, **Experimental Diabetes Research**, 2011;7:201.

LEE Y, J.; BAW, C.; GUPTA, S.; AZZIZ, N. and AGARWAL, A. Role of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome. **Current Women's Health Reviews** 2010;6:96-107.

LIMA, P. L. **Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo e a inflamação em modelo experimental de retalhos cutâneos**, Dissertação 56f. (Mestrado em cirurgia) Universidade Federal do Ceará, 2011.

LIMA, S. E. ; ABDALLA, P. S. D. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** 2001;37(3).

LIN, R.T.; TZENG, C.Y.; LEE, Y.C.; CHENG, Y.W.; CHEN, Y. I.; HO, W.J.; CHENG, J.T.; LIN, J. G.; CHANG, S. L. Electroacupuncture improves glucose tolerance through cholinergic nerve and nitric oxide synthase effects in rats. **Neurosci Lett** 2011;494(2):114-118.

LIN, J. G.; CHANG, S. L.; CHENG, J. T. Release of beta-endorphin from adrenal gland to lower plasma glucose by the electroacupuncture at Zhongwan acupoint in rats. **Neuroscience Letters** 2002;326(1):17-20.

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

LICY, L.; YANES L. L.; ROMERO, G. D.; MOULANA M.; LIMA, R.; DAVIS, D. D.; ZHANG, H.; LOCKHART, R.; RACUSEN C. L. and RECKELHOFF, F. J. Cardiovascular-Renal and Metabolic Characterization of a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome **Gender Medicine** 2011;8(2).

MANNERÅS, L.; JONSDOTTIR, I. H.; HOLMANG, A.; LONN, M.; VICTORIN, S.E. Low-Frequency Electro-Acupuncture and Physical Exercise Improve Metabolic Disturbances and Modulate Gene Expression in Adipose Tissue in Rats with Dihydrotestosterone- Induced Polycystic Ovary Syndrome., **Endocrinology** 2008;149:3559–3568.

MANNI L.; LUDENBERG, T.; HOLMÄNG, A.; ALOE, L. and STENER-VICTORIN, E. Effect of electro-acupuncture on ovarian expression of $\alpha(1)$ - and $\beta(2)$ -drenoceptors, and p75 neurotrophin receptors in rats withsteroid-induced polycystic ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2005;3:21.

MARTINBIANCHO, J. **Uso do hidrato de cloral para sedação em unidade de tratamento intensivo pediátrica: indicações, efeitos adversos e fatores de riscos associados**. Dissertação 73f. (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

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

MATA, C. M. Formation continuada -Metformina y diabetes mellitus tipo 2. **Aten Primaria** 2008;40(3):147-53.

MATHEWS, J.; GUSTAFFSON, A. E2 signaling: a subtle balance between ER α and ER β . **Mol Interv** 2003;3:281-292.

MATSUDA, M.; DE FRONZO, R. A. Insulin Sensitivity Indices Obtained From Oral Glucose Tolerance Testing Comparison with the euglycemic insulin clamp, **Diabetes Care** 1999; 22:1462–1470.

MATSUMOTO, T.; HAYES, M. F. Acupuncture , electric phenomenon of the sKin, and post-vagotomy gastrointestinal atony. **American Journal of Surgery** 1976;125:176-180.

- MC. CORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocytorein (hemocytorein). **J Biol Chem** 1969; 25(22):6049-6055.
- MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain Mechanisms. A new theory. **Science** 1965;150:971-979.
- MIHARA, M; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem** 1978;86(1):271-278.
- NORMAN, A. W.; MATHEW T.MIZWICKI, T. M.; AND NORMAN P.G. D. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nature Rev** 2004;3:27-40.
- NORMAN, R. J. Editorial: Metformin—Comparison with Other Therapies in Ovulation Induction in Polycystic Ovary Syndrome, **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89(10):4797-4800.
- OHKAWA, J. Lipid peroxidation in erythrocytes of patients with type 2 diabetes mellitus. **Indian Journal of Clinical Biochemistry** 1979;18(1):71-74.
- OLSEN N. J.; KOVACS, W. J. Gonadal steroids and immunity. **Endocr Rev** 1996;17:369-384.
- ORIO JR, F.; PALOMBA, S.; CASCELLA, T.; DE SIMONE, B.; MANGUSO, F.; SAVASTANO, S.; RUSSO, T.; TOLINO, A.; ZULLO, F.; LOMBARDI, G.; AZZIZ, R. and COLAO, A. Improvement in Endothelial Structure and Function after Metformin Treatment in Young Normal-Weight Women with Polycystic Ovary Syndrome: Results of a 6-Month Study, **J Clin Endocrinol Metab** 2005;90:6072-6076.
- PALOMBA, S.; GIALLAURIA, F.; FALBO, A.; RUSSO, T.; OPPEDISANO, R.; TOLINO, A.; COLAO, A.; VIGORI, C.; ZULLO, F. and ORIO, F. Structured exercise training programme versus hypocaloric hyperproteic diet in obese polycystic ovary syndrome patients with anovulatory infertility: a 24-week pilot study. **Human Reproduction** 2008;23(3):642-650.
- PASQUALI, R.; GAMBINERI, A.; BISCOTTI, D.; VICENNATI, V.; GAGLIARDI, L.; COLITTA, D.; FIORINI, F.; COGNIGNI, G.; FILICORI, M. and MORSELLI-LABATE, A. Effect of Long-Term Treatment with Metformin Added to Hypocaloric Diet on Body Composition, Fat Distribution, and Androgen and Insulin Levels in Abdominally Obese Women with and without the Polycystic Ovary Syndrome; **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:2767-2774.
- PEDRO, S. J.; SIQUEIRA, M. C.; SILVA, M.; SILVA, Z.; FONTES, G.; GARD-BRITO, B.; ROCHA, P.; GRIMA, N.; PINTO, H. C.; BICHO, M.; RAMALHO, F.; CARNEIRO DE, M, M. Mieloperoxidase como marcador de stress oxidativo na cirrose hepática. **J Port Gastrenterol** 2003;10:209-214.

PINILLA, L.; TRIMINO, E.; GARNELO, P.; BELLIDO, G.; AGUILAR, R.; GAYTAN, F.; AGUILAR, E. Changes in pituitary secretion during the early post natal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen and androgens in rats. **J Reprod Fertil** 1993;97:13-20.

SASIKALA, S. L.; SHAMILA, S.; NAGARA JAN, S.; NISHA, J. C.; GEETHA, P. and KISHORRA, J. S. A. Comparative study of Ashokarishtam and clomiphene citrate in combating polycystic ovary syndrome induced oxidative stress in rat. **Journal of Cell and Tissue Research**, 2010;10(1):2105-2108.

SATO, A. Neural mechanisms of autonomic responses. Elicited by somatic sensory stimulation, *Neuroscience and Behavioral Physiology* 1997;27(5): 610-621.

SCHRÖDER, J.; Kahlke, V.; Karl-Hermann, S; Zabel, P. MD; Frank Stüber, MD. Gender Differences in Human Sepsis. **Arch Surg** 1998;133:1200-1205.

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

SHEARMAN, A.M.; CUPPLES, L.A.; DEMISSIE, S.; PETER, I.; SCHMID, C.H.; KARAS, R.H.; MENDELSON, M.E.; HOUSMAN, D.E.; LEVY D. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. **JAMA** 2003;290:2263-2270.

SHIRWALKAR, H.; MODI D.; MAITRA, A. Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology** 2007;272:22-37.

SILBERGER, S. D.; MAGLEBY, K. L. Betting the odds with big K. **Science** 1999;285:1859-1860.

SILVA, A.; FIGUEREDO, M. L.; DIAS, A. P.; XIMENES DO PRADO, N. A.; LEITÃO, R. P.; GUIMARAES, B. S. Electroacupuncture attenuates liver and kidney oxidative stress in anesthetized rats, **Acta Cirúrgica Brasileira** 2011;26(1):60-5

SINGH, K. Rat models of polycystic ovary syndrome. **Sourcebook of Models for Biomedical Research (P. M. Conn, ed.)**, Chapter 2008;43:404-410.

SINGH, K.; RAO, P. S. Studies on the polycystic ovaries of rats under continuous auditory stress. **Am J Obstet Gynecol** 1970;108:557-564.

STENER-VICTORIN, E.; FUJISAWA, S. and KUROSAWA, M. Ovarian blood flow responses to electroacupuncture stimulation depend on estrous cycle and on site and frequency of stimulation in anesthetized rats. **J Appl Physio** 2006;101:84-91.

STENER-VICTORIN, E.; KOBAYASHI, R.; WATANABE, O.; LUNDEBERG, T. and KUROSAWA, M. Effect of electro-acupuncture stimulation of different frequencies and intensities on ovarian blood flow in anaesthetized rats with steroid-induced polycystic ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2004;2:16.

STENER-VICTORIN, E.; LUDENBERG, T.; CAJANDER, S.; ALOE, L.; MANNI, L., WALDENSTRÖM, U. and JANSON, O. P. Steroid-induced polycystic ovaries in rats: effect of electro-acupuncture on concentrations of endothelin-1 and nerve growth factor (NGF), and expression of NGF mRNA in the ovaries, the adrenal glands, and the central nervous system. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2003;1:33.

STENER-VICTORIN E.; LUDENBERG, T.; WALDENSTRO, U.; MANNI, L.; ALOE, L., ;GUNNARSSON, S. and JANSON O. P. Effects of Electro-Acupuncture on Nerve Growth Factor and Ovarian Morphology in Rats with Experimentally Induced Polycystic Ovaries. **Biology of Reproduction** 2000;63:1497-1503.

STUX, G. R.; HAMMERSCHLAG, R. Acupuntura Clínica: bases científicas. São Paulo. **Manole** ,2005: 249p.

SU, C.F.; CHANG, Y.Y.; PAI, H.H.; LIU, I.M.; LO, C.Y.; CHENG, J. T. Mediation of beta-endorphin in exercise-induced improvement in insulin resistance in obese Zucker rats. **Diabetes Metabolism Research and Reviews** 2005;21(2):175-183.

SUGINO, N; KARUBE-HARADA, A.; TAKETANI, T; SAKATA, A; NAKAMURA, Y. Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F₂α production through nuclear factor-kappaB activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. **J Reprod Dev** 2004;50(2):215-225.

SUGINO, N.; TAKIGUCHI, S.; KASHIDA, S.; KARUBE, A.; NAKAMURA, Y.; KATO, H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. **Mol Hum Reprod** 2000;6:19-25.

SUZUKI, T.; SUGINO, N.; FUKAYA, T.; SUGIYAMA, S.; UDA, T.; TAKAYA, R.; YAJIMA, A.; SASANO, H. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. **Fertil Steril** 1999;72:720-726.

SZUKIEWICZ, D.; UILENBROEK, J. T. Polycystic ovary syndrome searching for an animal model. **J Med** 1998;29(5-6):259-275.

TAKESHIGE, C.; SATO, T.; HISAMITSU, T.; FANG, J. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. *Brain Research Bulletin* 1992;29:617-634.

TIAN, L.; HUANG, Y. X.; TIAN, M.; GAO, W.; *et al.* Downregulation of electroacupuncture at ST36 on TNF-α in rats with ulcerative colitis. **World J Gastroenterol** 2003;9:1028-1033.

TRACEY, J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway, *Review*. **J Clin Invest**. 2007;117:289-296.

TSAFRIRI, A.; REICH, R. Molecular aspects of mammalian ovulation. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 1999;107:1-11.

TSUCHIYA, M.; SATO, F. E.; INOUE, M.; ASADA, A. Acupuncture Enhances Generation of Nitric Oxide and Increases Local Circulation. **Anesth Analg** 2007;104:301-7.

VAN VOORHIS, B. J; DUNN, M. S., SNYDER, G. D.; WEINER, C.P: Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. **Endocrinology** 1994;135:1799-1806.

VICTOR, M. V.; ROCHA, M.; BANULS, C.; SANCHEZ-SERRANO, M.; SOLA, E.; GOMEZ, M. and HERNANDEZ-MIJARES, A. Mitochondrial Complex I Impairment in Leukocytes from Polycystic Ovary Syndrome Patients with Insulin Resistance; **J Clin Endocrinol Metab** 2009;94(9):3505–3512.

YAMAMURA, Y.; TABOSA, A. Aspectos integrativos das medicinas occidental e chinesa. **Rev Paul Acupunt** 1995 :1(1): 26-32.

YIN, S. C. ; JEONG, S. A.; HI-JOON; YOON, B. Y.; CHOI CHI-BON; KOH, G. H. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research. in Veterinary Science** 2008;84:159–165.

WAGNER, H.; SCHROETER, M. R.; HECKER, M. 17 β -Estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. **FASEB J** 2001;15:2121-2130.

WANG, H.; PAN, Y.; XUE, B.; ZHAO, F.; JIA, J.; LIANG, X.; WANG, X. The antioxidative effect of electro-acupuncture in a mouse model of Parkinson's disease. **PLoS One** 2011;6(5):190-197.

WANG, K. M.; YAO, S. M.; XIAN, Y. L.; HOU, Z. A study on the receptive field of acupoints and the relationship between characteristics of needle sensation and groups of afferent fibers. **Sientia Sinica** 1985;28:963-961.

WANG, X.; DYKENS, J. A.; PEREZ, E.; LIU, R; YANG, S.; COVEY, D. F.; SIMPKINS, J. W .Neuroprotective effects of 17 β -estradiol and nonfeminizing estrogens against H₂O₂ toxicity in human neuroblastoma SKN- SH cells. **Mol Pharmacol** 2006;70:395-404.

WHITE, A.; CUMMINGS, M.; FILSHIER, J. An Introduction to Western Medical Acupuncture, **Elsevier**, 2008, 229p.

WOOLF, C. J. Segmental afferent fibre-induced analgesia: transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) and vibration. In: Wall P. D. Melzack R.(eds) Textbook of Pain. **Churchill Livingstone, New York** 1983:884- 896.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in the mechanism of action of metformin. **J Clin Invest** 2001;108:1167-1174.

ZHOU, W.; FU, LIANG-WU; GUO, ZHI-LING and LONGHURS, C. J. Role of glutamate in the rostral ventrolateral medulla in **Am J Physiol Heart Circ Physiol** acupuncture-related modulation of visceral reflex sympathoexcitation 2007;292:H1868-H1875.

APÊNDICES

APÊNDICE A

PESO DAS RATAS (g)

Início do estudo

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
215	190	225*	180**	180****	178	186
170	205	170*	170	175*	191	195
175	196	180*	160**	185	192	189
165	195	195	185**	190	178	194
190	175	175*	170*	145*	196	187
155	190	180	176**	175*	221	190

*Re-anestesias com metade da dose, antes de iniciar os tratamentos com Ac e EAc

Término do estudo

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
223	186	200	200	200	200	200
179	197	165	165	199	199	199
186	183	202	202	213	213	213
162	188	189	189	206	206	206
193	167	194	194	164	164	164
167	182	209	209	195	195	195

Término do estudo (Média)

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
219,0	188,0	212,5	190,0	190,0	189,0	193,0
174,5	201,0	167,5	167,5	187,0	195,0	197,0
180,5	189,5	191,0	181,0	199,0	202,5	201,0
163,5	191,5	192,0	187,0	198,0	192,0	200,0
191,5	171,0	184,5	182,0	154,5	180,0	175,5
161,0	186,0	194,5	192,5	185,0	208,0	192,5

APÊNDICE B**PESO DOS OVÁRIOS E HEMIÚTERO DIREITO DAS RATAS****Ovário Direito**

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
4,22	4,18	4,06	5,04	5,17	3,12	3,64
2,26	4,57	5,54	7,99	2,48	3,51	4,56
3,72	6,82	6,02	5,14	4,40	5,54	3,56
3,93	4,32	3,76	10,68	5,27	3,87	2,73
5,12	4,28	4,91	3,05	3,05	5,13	4,15
2,23	4,60	8,16	5,01	4,10	3,09	4,76

Ovário Esquerdo

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
4,10	5,08	3,84	9,71	5,27	3,04	2,89
1,81	4,50	4,22	6,10	2,70	3,45	4,44
4,77	7,69	8,11	2,65	3,80	2,45	4,52
3,54	5,24	5,13	7,02	4,34	3,23	3,72
4,96	4,88	5,37	5,46	4,15	2,08	3,89
2,87	5,08	8,39	6,80	4,85	4,19	3,52

Ovários (Direito + Esquerdo) - Média

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
4,16	4,63	3,95	7,38	5,22	3,08	3,27
2,04	4,54	4,88	7,05	2,59	3,48	4,50
4,25	7,26	7,07	3,90	4,10	4,00	4,04
3,74	4,78	4,45	8,85	4,81	3,55	3,23
5,04	4,58	5,14	4,26	3,60	3,61	4,02
2,55	4,84	8,28	5,91	4,48	3,64	4,14

PESO DOS ÚTEROS DAS RATAS

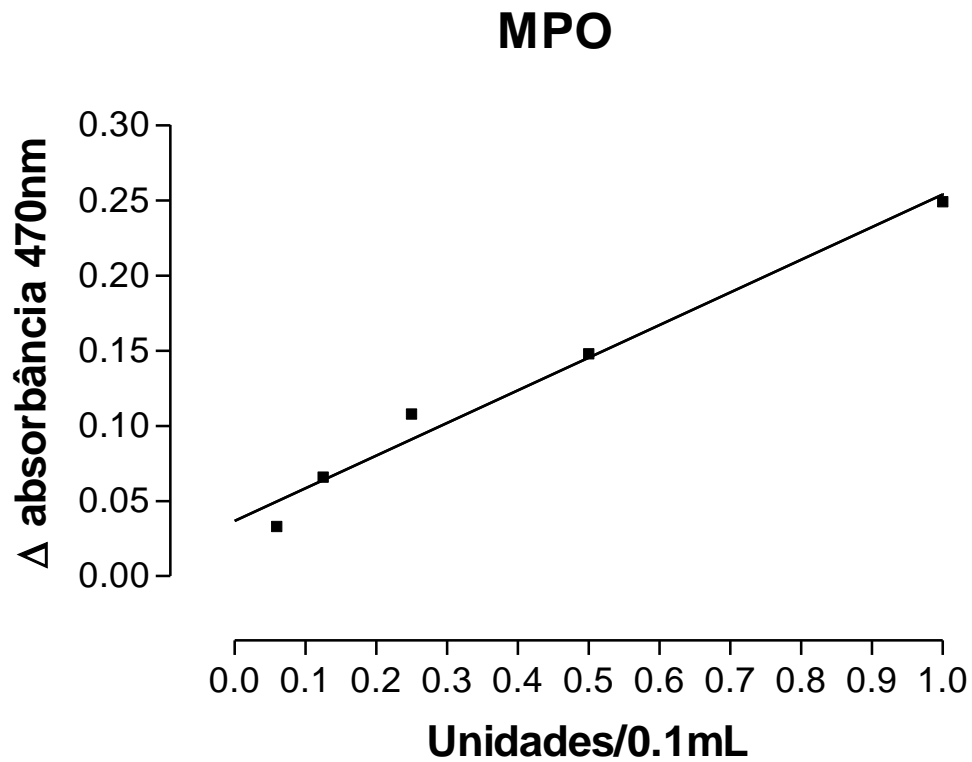
Útero Direito

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
1,44	1,43	1,03	2,18	1,41	0,81	0,97
1,32	2,17	2,63	2,11	2,58	1,99	1,89
1,86	2,31	1,59	2,29	1,68	1,52	2,27
1,16	1,56	1,46	2,20	1,03	1,81	1,04
1,93	1,39	1,47	1,13	3,02	1,07	1,32
2,10	2,89	1,27	1,37	1,26	1,49	1,76

APENDICE C

CURVAS PADRÕES

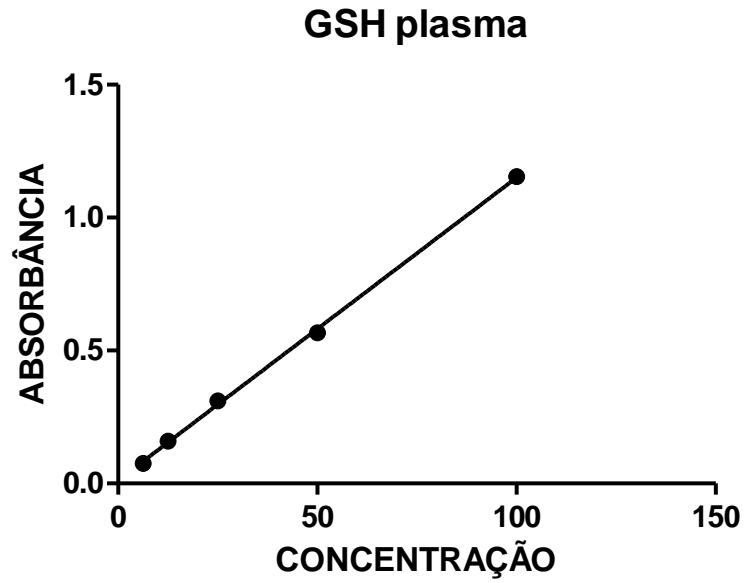
Curva padrão para cálculo da atividade da enzima de mieloperoxidase (MPO), em tecido



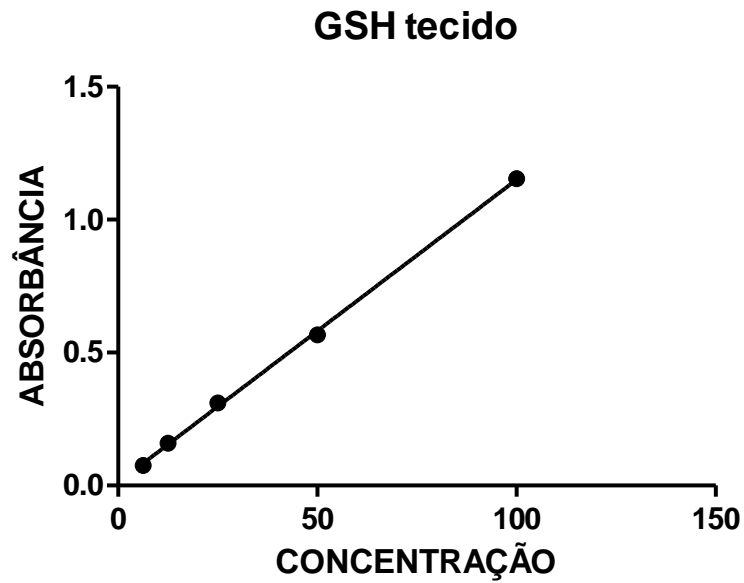
Curva padrão para cálculo da atividade da enzima de mieloperoxidase (MPO)

Best-fit values	
Slope	0.01138 ± 0.0001684
Y-intercept when X=0.0	0.01246 ± 0.008693
X-intercept when Y=0.0	-1,095
1/slope	87,88
95% Confidence Intervals	
Slope	0.01084 to 0.01192
Y-intercept when X=0.0	-0.01520 to 0.04012
X-intercept when Y=0.0	-3.658 to 1.291
Goodness of Fit	
r ²	0,9993
Sy.x	0,01284
Is slope significantly non-zero?	
F	4564
DFn, DFd	1.000, 3.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0
Runs test	
Points above line	3
Points below line	2
Number of runs	4
P value (runs test)	0,9000
Deviation from linearity	Not Significant

Curva padrão para cálculo da concentração de glutatona (GSH) no plasma



Curva padrão para cálculo da concentração de glutatona (GSH) no tecido ovariano



APENDICE D**DADOS BRUTOS****Dados brutos de GSH, MDA e MPO no tecido ovariano
TECIDO****CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA (GSH)**

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
21,541	22,127	30,914	31,207	63,427	44,095	13,632
24,470	25,056	58,155	40,580	66,942	18,905	31,793
26,520	24,763	30,621	31,500	38,237	13,339	41,459
26,813	26,813	39,994	40,873	71,043	15,975	15,097
27,985	24,470	38,237	67,528	68,114	48,196	13,632
26,813	38,823	34,722	70,457	70,164	55,811	40,580

CONCENTRAÇÕES DE MALONALDEIDO(MDA)

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
0,013	0,075	0,181	0,249	0,225	0,179	0,195
0,100	0,127	0,272	0,254	0,249	0,097	0,077
0,005	0,134	0,016	0,244	0,522	0,098	0,104
0,114	0,043	0,315	0,241	0,273	0,085	0,152
0,175	0,171	0,152	0,233	0,378	0,086	0,108
0,033	0,006	0,136	0,311	0,383	0,072	0,108

CONCENTRAÇÕES DE MIELOPEROXIDASE(MPO)
--

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
1,378	1,836	1,311	1,217	0,657	1,355	1,519
1,864	1,515	0,678	0,392	0,670	1,979	1,409
1,426	1,664	1,034	0,344	0,601	1,391	1,376
1,778	1,853	2,056	0,624	0,723	0,506	1,419
2,175	2,150	1,659	0,437	0,610	0,405	1,620
1,941	1,934	0,497	0,528	0,629	0,542	0,781

Dados brutos de GSH e MDA no plasma

PLASMA

CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA (GSH)
--

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
19,783	17,967	22,302	29,127	38,823	15,975	17,733
20,281	20,047	23,533	29,069	35,893	20,633	15,038
19,725	26,227	23,620	26,608	42,630	12,109	15,682
20,691	19,402	25,876	31,793	38,823	32,671	16,268
20,340	20,047	25,583	32,086	45,852	6,016	6,016
20,721	19,051	26,227	35,893	39,701	3,966	32,378

CONCENTRAÇÕES DE MALONALDEIDO(MDA)

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
0,036	0,030	0,472	0,294	0,261	0,196	0,091
0,012	0,063	0,064	0,188	0,206	0,081	0,204
0,176	0,080	0,054	0,151	0,250	0,082	0,004
0,083	0,033	0,093	0,120	0,389	0,123	0,092
0,007	0,060	0,028	0,282	0,425	0,023	0,108
0,011	0,091	0,167	0,350	0,246	0,090	0,108

APÊNDICE E

Dados Brutos da glicemia

GLICEMIA

G-1			G-2			G-3			G-4		
T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
71	114	72	84	115	195	90	112	107	74	124	99
75	114	86	87	175	136	74	137	99	67	159	101
67	117	84	93	110	99	109	121	102	66	123	111
62	95	79	81	157	141	72	112	77	71	94	87
62	155	80	81	109	140	64	115	83	71	109	93
70	122	103	87	130	153	66	125	108	58	122	99

GLICEMIA

G-5			G-6			G-7		
T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
92	133	112	87	95	119	65	122	109
75	117	70	81	133	123	114	121	100
83	100	86	85	117	102	80	142	100
75	126	92	98	140	93	74	118	82
55	108	85	96	145	135	131	118	92
87	97	94	102	142	131	70	113	83

APÊNDICE F

Efeitos da administração de valerato de estradiol a ratas sadias

A administração de valerato de estradiol a ratas sadias (G1 - controle positivo) não alterou significativamente as concentrações de GSH, TBARS e MPO, comparadas ao controle negativo (G7 - valores basais) (Figuras x1-x5)

- Efeitos sobre as concentrações de GSH plasmático

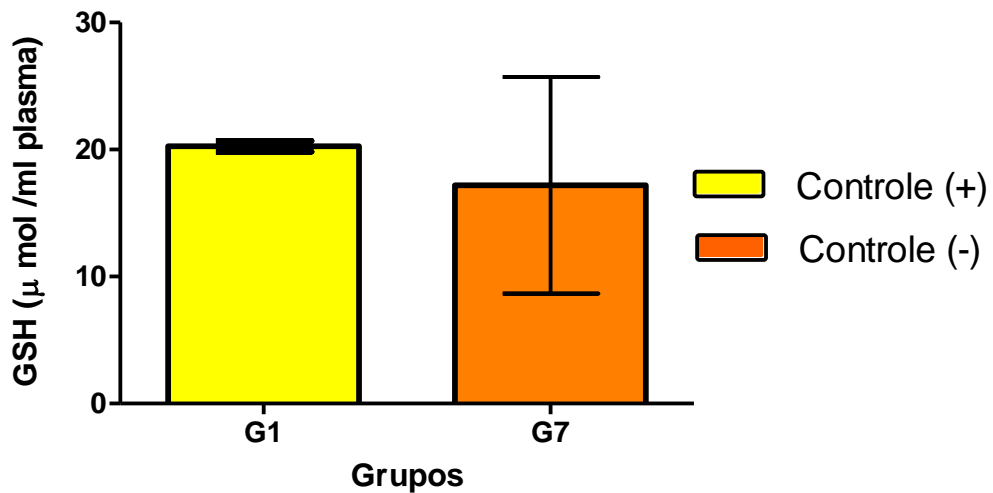


Figura 34- Efeitos da estimulação estrogênica sobre as concentrações de GSH plasmático em ratas sadias (Média \pm DP). T teste para amostras não pareadas

- Efeitos sobre as concentrações de GSH no tecido ovariano

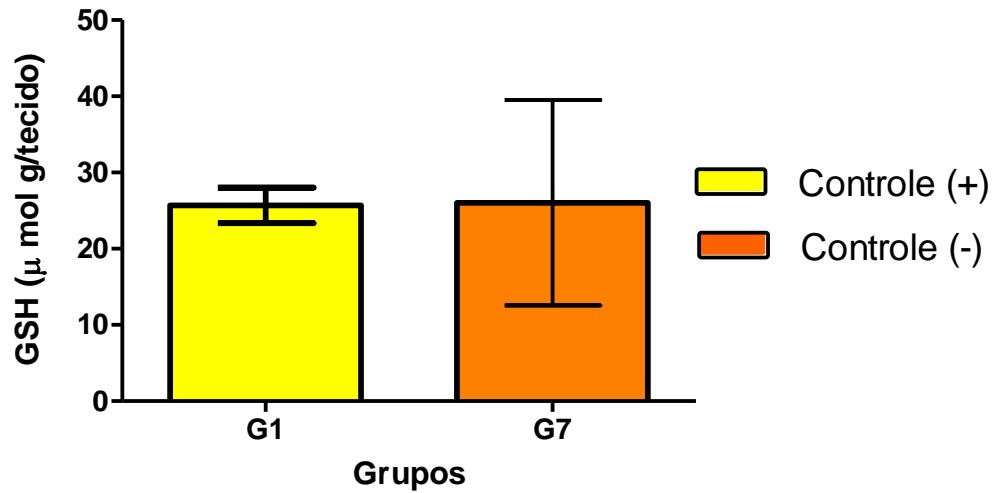


Figura 35 - Efeitos da estimulação estrogênica sobre as concentrações de GSH tecidual em ratas sadias (Média \pm DP). T teste para amostras não pareadas

- Efeitos sobre as concentrações no TBARS plasmático

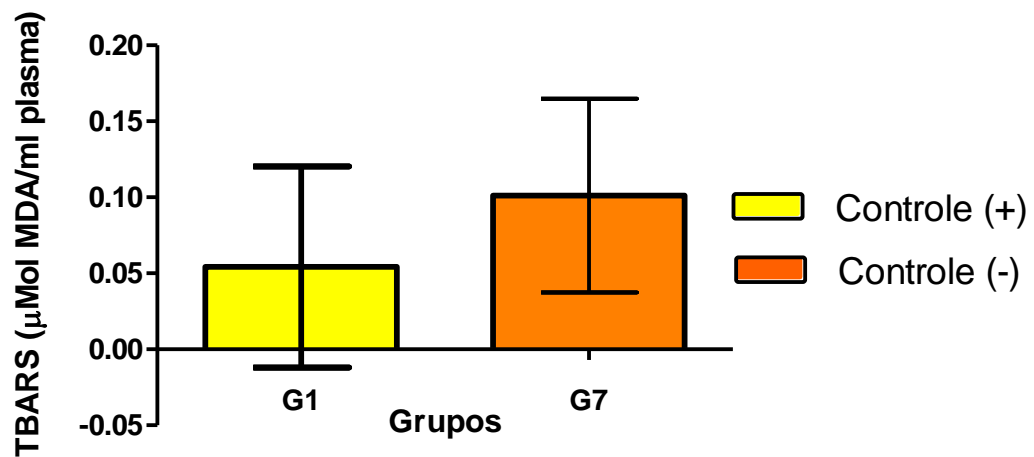


Figura 36 - Efeitos da estimulação estrogênica sobre as concentrações de MDA plasmático em ratas sadias (Média \pm DP). T teste para amostras não pareadas

- Efeitos sobre as concentrações de TBARS no tecido ovariano

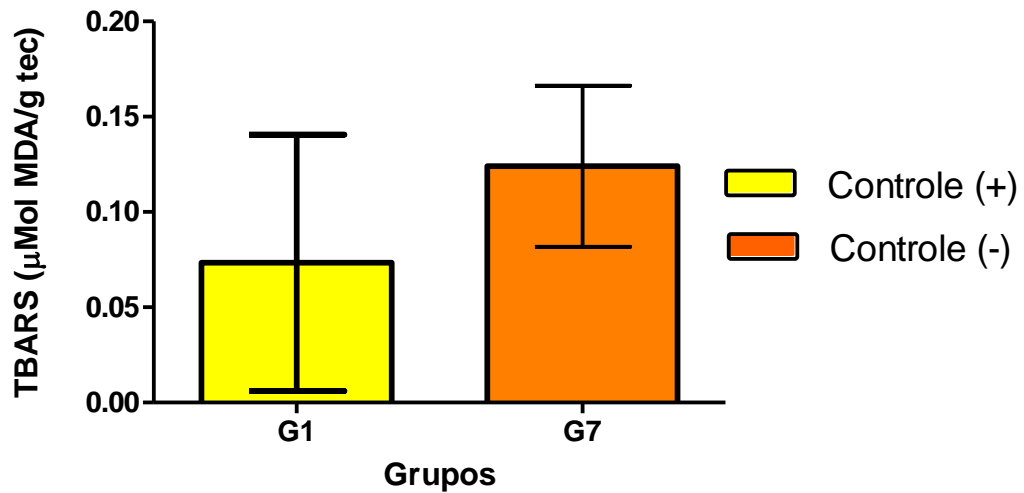


Figura 37 - Efeitos da estimulação estrogênica sobre as concentrações de MDA tecidual em ratas sadias (Média \pm DP). T teste para amostras não pareadas

- Efeitos sobre as concentrações de MPO no tecido ovariano

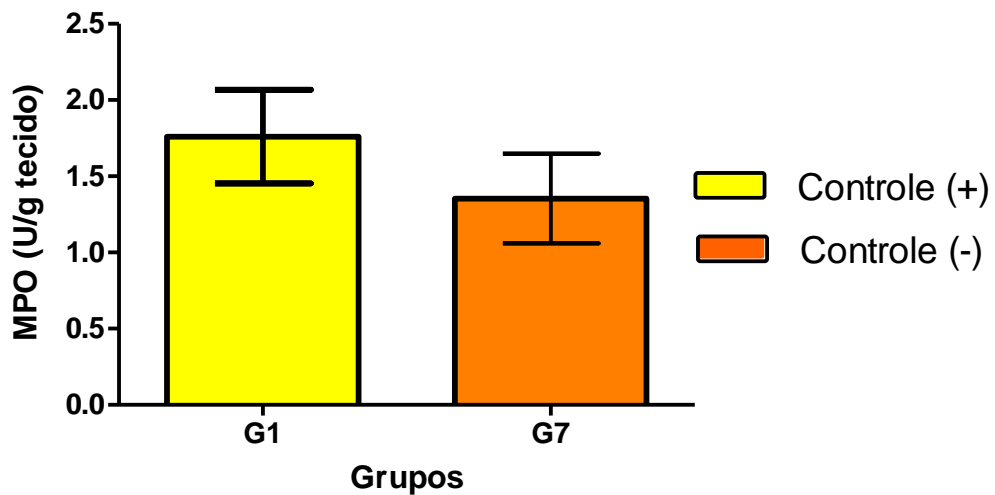


Figura 38 - Efeitos da estimulação estrogênica sobre a atividade da MPO no tecido ovariano de em ratas sadias (Média \pm DP). T teste para amos

ANEXOS

Anexo A

 CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA

RESOLUÇÃO CFM Nº 1.455/95

O Conselho Federal de Medicina, no uso da atribuição que lhe confere a Lei nº 3.268, de 30 de setembro de 1957, regulamentada pelo Decreto nº 44.045, de 19 de julho de 1958, e

CONSIDERANDO anteriores pareceres do CFM, mais especialmente o Parecer nº 22/92, de 14 de agosto de 1992, que entende ser a Acupuntura ato médico;

CONSIDERANDO a necessidade do avanço acadêmico da Acupuntura inclusive com sua inserção nos cursos de graduação e pós-graduação das escolas médicas;

CONSIDERANDO a necessidade do diagnóstico clínico e específico do prognóstico, de instituição terapêutica peculiar.


CONSIDERANDO o fato de não encontrar paralelo entre este ato médico e outras especialidades médicas.


CONSIDERANDO o parecer CFM nº 028/95, aprovado em 11 de agosto de 1995;


CONSIDERANDO, finalmente, a decisão acatada pelo Plenário deste Conselho Federal de Medicina, em Sessão realizada no dia 11 de agosto de 1995, resolve:

RECONHECER a Acupuntura como especialidade médica.

Brasília-DF, 11 de agosto de 1995.



WALDIR PAIVA MESQUITA
Presidente


ANTÔNIO HENRIQUE PEDROSA NETO
Secretário-Geral

APROVADO EM SESSÃO PLENÁRIA
em 11 de agosto de 1995

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA

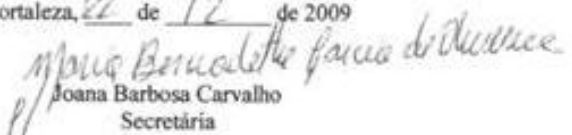
BRASIL, 11 de agosto de 1995
CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA
Publicada em 11 de agosto de 1995
De 18109/95. Vol. 12695.

Anexo B


 Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo.
 CEP: 60430-970 Fortaleza-CE
 Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Projeto Intitulado? Efeitos da melformina e da eletracupuntura sobre o metabolismo
investigativo em modelo experimental de diabetes poliestre em Wistar.
 responsabilidade do Pesquisador SERGIO BOMALITO JUNIOR deu entrada
 para ser avaliado pelo a Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), no
 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, recebendo o protocolo n° 107/09 no dia
22/12/2009.

Fortaleza, 22 de 12 de 2009

 Joana Barbosa Carvalho
 Secretária

Anexo C

Figura 39 - Integrantes da equipe de pesquisa