



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

ANNYA COSTA ARAÚJO DE MACEDO GOES

**A ELETROACUPUNTURA ATENUA A COLITE EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR TNBS VIA ATIVAÇÃO DE INTERLEUCINA 10 E
INIBIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA**

FORTALEZA-CE

2014

ANNYA COSTA ARAÚJO DE MACEDO GOES

**A ELETROACUPUNTURA ATENUA A COLITE EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR TNBS VIA ATIVAÇÃO DE INTERLEUCINA 10 E
INIBIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Área de concentração: Inflamação

Orientador:

Professor Titular Lusmar Veras Rodrigues

Co-Orientadores:

Professor Titular Ronaldo Albuquerque Ribeiro

Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães

FORTALEZA-CE

2014

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

-
- G543e Goes, Annya Costa Araújo de Macedo.
 A eletroacupuntura atenua a colite experimental induzida por tnbs via ativação de interleucina 10 e inibição de óxido nítrico sintase induzida. / Annya Costa Araújo de Macedo Goes. – 2014.
 111 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Doutorado em Cirurgia, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Cirurgia.
 Orientação: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.

1. Colite. 2. Inflamação. 3. Citocinas. 4. Acupuntura. I. Título.

CDD 616.3447

ANNYA COSTA ARAÚJO DE MACEDO GOES

**A ELETROACUPUNTURA ATENUA A COLITE EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR TNBS VIA ATIVAÇÃO DE INTERLEUCINA 10 E
INIBIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Área de concentração: Inflamação

Orientador:

Professor Titular Lusmar Veras Rodrigues

Co-Orientadores:

Professor Titular Ronaldo Albuquerque Ribeiro

Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães

Aprovada em :

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Titular Lusmar Veras Rodrigues
Universidade Federal do Ceará
(Orientador)**

**Prof. Doutor Sérgio Botelho Guimarães
Universidade Federal do Ceará**

**Prof. Doutor Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará**

**Prof. Doutora Catarina Brasil D'Alva
Faculdade de Medicina Unichristus**

**Prof. Doutor Marcelo Leite Vieira Costa
Doutorado Interinstitucional Hospital A. C. Camargo/
ECO- Instituto do Câncer**

**Dedico este trabalho à
meus pais Ivan e Ângela,
ao meu marido Assis,
aos meus avós Lineu e Zaíra,
Oscar e Palmira
e aos meus Professores de Cirurgia**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Titular, PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por sua dedicação aos cursos de Mestrado e Doutorado em Cirurgia.

Ao Professor Titular, LUSMAR VERAS RODRIGUES, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio incondicional em todos os momentos da elaboração desse trabalho, e pela sua excepcional contribuição como orientador.

Ao Professor Titular, RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela confiança e ensinamentos fundamentais à realização desse trabalho e por ter co-orientado esse trabalho.

Ao Professor, Doutor SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelos ensinamentos sobre a técnica de acupuntura, por ter co-orientado esse trabalho, pela suas observações relevantes no exame de qualificação, ajuda na elaboração do artigo para publicação e participação da banca defesa de tese.

Ao Professor, Doutor ROBERTO CÉSAR PEREIRA LIMA JÚNIOR, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio na elaboração do delineamento do estudo, e por todos os ensinamentos durante a fase experimental desse projeto e por sua participação no exame de qualificação e banca de defesa de tese.

Ao Professor, Doutor MARCELO LEITE VIEIRA COSTA, do Programa de Doutorado Interinstitucional Hospital A. C. Camargo/ ECO - Instituto do Câncer do Ceará, por participação na banca de defesa de tese e por ter me cedido seus arquivos de formatação.

À Professora, Doutora CATARINA BRASIL D'ALVA, da Faculdade de Medicina do Centro Universitário Christus do Ceará, por sua participação na banca de defesa e por sua ajuda na confecção do artigo para publicação.

À Professora, Doutora CHRISTIANE ARAÚJO CHAVES LEITE, do Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela amizade, por sua minuciosa revisão do trabalho e por ter participado do exame de qualificação.

À Professora Titular, GERLY ANNE DE CASTRO BRITO, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade, presteza e indispensáveis análises histopatológicas realizadas nesse trabalho.

Às Doutoradas KAROLINE SABÓIA ARAGÃO e DEYSI VIVIANA TENAZOA WONG pela amizade, disponibilidade na execução das dosagens de citocinas e imunohistoquímica.

Ao colega CARLOS WAGNER, por sua constante gentileza e ajuda fundamental na confecção dos gráficos e análise estatística.

À grande amiga EMANUELA SANTOS CORREIA, por sua ajuda imprescindível na etapa de formatação do manuscrito e grande apoio.

À amiga TICIANA AUTRAN CAVALCANTI ARAÚJO, por sua disponibilidade na implantação do modelo de anestesia.

Aos alunos FRANCISCO MAXWELL MARTINS PINTO, GUILHERME CARDOSO FERNANDES e JÉSSICA SALES BARBOSA, pela amizade, colaboração e interesse científico.

Às técnicas MARIA SILVANDIRA FRANÇA PINHEIRO do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) pela competência e organização do laboratório, e SOCORRO FRANÇA e MICHELLE do Departamento de Morfologia

da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará pela confecção das lâminas; e ainda pelas excelentes profissionais que são.

Às secretárias MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará pela atenção e gentileza com que sempre me atenderam junto à Pós-Graduação.

Ao funcionário BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA do Biotério de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo cuidado na manutenção e dedicação aos animais e por sua amizade.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* dos Departamentos de Cirurgia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela qualidade das disciplinas ministradas.

Ao Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Câncer (LAFICA) pela excelente estrutura física e por todos àqueles que o compõe, pessoas de alto nível técnico e comprometidos, além de extremamente disponíveis.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela infraestrutura dos programas de Pós-Graduação.

À CAPES, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

“A marcha da ciência é como a planície do deserto: o horizonte foge sempre.”

(Graça Aranha)

RESUMO

A etiopatogenia das doenças inflamatórias intestinais idiopáticas (DII) envolve fatores genéticos, ambientais e imunológicos. Há relatos do uso da acupuntura no tratamento da DII, porém seus mecanismos ainda são incertos. A proposta deste trabalho é estudar a ação antiinflamatória e analgésica da eletroacupuntura em modelo de colite experimental. Utilizaram-se camundongos machos Swiss, distribuídos em seis grupos (n=6-9), submetidos a indução de colite por TNBS em etanol a 50%. Os controles do modelo foram salina (SAL) e etanol (ETNL). Os animais com colite foram tratados com eletroacupuntura (EAC) no acuponto ST-36, 100Hz, falsa-eletroacupuntura (FEAC) 100Hz e dexametasona (DEXA) 1mg/Kg/dia. A hiperalgesia visceral foi avaliada pelo teste de Von Frey. Após três dias, foi coletado segmento de cólon para análises macroscópicas, histopatológicas (H-E), dosagem da atividade de mieloperoxidase, imunistoquímicas para iNOS e dosagem de malonaldeído, e citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10). Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA/teste de Tukey ou teste T e os dados não paramétricos por Kruskal-Wallis/teste de Dunn. Houve aumento do peso úmido dos cólons no grupo TNBS e prevenção desse evento no grupo EAC. Os grupos TNBS e EAC apresentaram aumento na infiltração de neutrófilos no cólon em relação aos demais grupos. O grupo TNBS apresentou aumento na pontuação dos escores microscópicos em relação aos grupos tratados. Os grupos TNBS e EAC apresentaram aumento na concentração de IL-1 β no cólon. O grupo TNBS apresentou supressão na concentração de IL-10 no cólon, prevenido pelo tratamento com EAC. O grupo EAC apresentou diminuição na concentração de MDA no cólon em relação ao grupo TNBS. O grupo EAC apresentou diminuição na expressão de iNOS no conjuntivo em relação ao grupo TNBS. O grupo TNBS não apresentou alteração da hipernocicepção, avaliada pelo Von Frey, nos tempos 24 e 72 horas. Conclui-se que eletroacupuntura, a 100Hz no acuponto ST-36, apresentou ação antiinflamatória na colite por TNBS em etanol a 50% através do aumento na concentração de IL-10 e redução na expressão de iNOS.

Palavras-chave: acupuntura, colite, inflamação.

ABSTRACT

The etiology of inflammatory bowel disease (IBD) involves genetic, environmental and immunological factors. There are clinical reports of the use of acupuncture on IBD, however its therapeutic mechanisms are still uncertain. The purpose of this work is to study the anti-inflammatory and analgesic actions of electroacupuncture on a experimental colitis model. Male Swiss rats, divided in six groups (n=6-9), were subjected to induction of colitis by TNBS in 50% ethanol. The controls were saline (SAL) and ethanol (ETNL). The animals with colitis were treated with electroacupuncture (EAC) at the ST-36 acupoint, 100Hz, false electroacupuncture (FEAC), 100Hz, and dexamethasone (DEXA), 1 mg/Kg/day. Visceral hyperalgesia was evaluated by means of the Von Frey test. After three days, a colon segment was obtained for macroscopic and histopathological analysis, quantification of the activity of myeloperoxidase, Immunohistochemistry for iNOS, and quantification of malondialdehyde and cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-10). The parametric data were analyzed with ANOVA/Tukey test or test T, and the non-parametric data with Kruskal-Wallis/Dunn test. There was an increase on the wet weight of the colons on group TNBS, and prevention of this event on group EAC. The groups TNBS and EAC showed an increase on neutrophil infiltration, as compared to the other groups. The group TNBS showed increased values for the microscopic scores, as compared to the treated groups. The groups TNBS and EAC showed an increase on the concentration of IL-1 β in the colon. The group TNBS showed suppression of the concentration of IL-10 in the colon, prevented by treatment with EAC. The group EAC showed decrease on the concentration of MDA in the colon, as compared to the other groups. The group EAC showed decrease on the expression of iNOS in the connective, as compared to the treated groups. The group TNBS did not show any alterations of hypernociception, as evaluated with Von Frey, at 24 and 72 hours. It can be therefore concluded that electroacupuncture, at the acupoint ST-36, 100Hz, showed anti-inflammatory action on the colitis induced by TNBS in 50% ethanol, by means of increase of IL-10 concentration and decrease on the expression of iNOS.

Keywords: acupuncture, colitis, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Analgesímetro digital – Von Frey eletrônico	37
Figura 2 –	Indução da colite – camundongo suspenso pela cauda	38
Figura 3 –	Técnica anestésica – Sistema de anestesia inalatória semi-artesanal	40
Quadro 1 –	Nível anestésico baseado em achados clínicos, conforme White, Johnston e Eger (1974)	40
Figura 4 –	Técnica de Eletroacupuntura – Aparelho de quatro canais.	41
Figura 5 –	Representação dos graus de Diarréia pós indução da colite por TNBS.	43
Quadro 2 –	Escores de inflamação macroscópicos, segundo Morris.	43
Figura 6 –	Preparo do segmento intestinal	44
Figura 7 –	Delineamento dos experimentos	44
Quadro 3 –	Escores de inflamação microscópicos, segundo Appleyard e Wallace.	45
Figura 8 –	Avaliação da Massa Corpórea.	49

Figura 9 –	Avaliação do limiar de nocicepção abdominal.	51
Figura 10 –	Avaliação do peso intestinal úmido no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	52
Figura 11 –	Achados macroscópicos.	53
Figura 12 –	Achados microscópicos.	56
Figura 13 –	Atividade da MPO no intestino no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	59
Figura 14 –	Avaliação da concentração de IL-1 β no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	60
Figura 15 –	Avaliação da concentração de TNF- α no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	61
Figura 16 –	Avaliação da concentração de IL-10 no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	62
Figura 17 –	Concentração de MDA no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	63
Figura 18 –	Achados da expressão de iNOS.	66
Figura 19 –	Modelo hipotético das ações imunológicas da acupuntura	74
Figura 20 –	Modelo hipotético do mecanismo antiinflamatório da eletroacupuntura na colite	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Escores de diarreia conforme Kurita e colaboradores (2000).	50
Tabela 2 –	Escores macroscópicos conforme Morris e colaboradores (1989), no intestino, no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	54
Tabela 3 –	Escores microscópicos conforme Appleyard e Wallace (1995), no intestino, no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	57
Tabela 4 –	Imunoexpressão de iNOS no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ASA	Ácido 5-Aminossalicílico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CA	Califórnia
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
CXCL1	Quimiocina ligante 1
DC	Doença de Crohn
DEXA	Dexametasona
DII	Doença inflamatória intestinal
EAC	Eletroacupuntura
EDTA	Ácido etilenodiaminotetrácetico
eNOS	Óxido-nítrico sintases endotelial
E.P.M.	Erro padrão da média
ETNL	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FEAC	Falsa eletroacupuntura
H-E	Hematoxilina-eosina
HO-1	Heme-oxigenase 1
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KCl	Cloreto de potássio

LTDA	Limitada
Mín	Mínimo
Máx	Máximo
MDA	Malonaldeído
MPO	Enzima Mieloperoxidase
MS	Ministério da Saúde
MTC	Medicina tradicional chinesa
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NK	Células <i>natural Killer</i>
nNOS	Óxido-nítrico sintase neuronal
OPD	o-fenilenediamina diidrocloreto
PMN	Polimorfonucleares
q.s.p	Quantidade suficiente para
RCUI	Retocolite ulcerativa idiopática
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SAL	Salina
SC	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
ST	<i>Stomach</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	<i>T helper</i>
TMB	3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine
TNBS	Ácido 2,4,6 trinitrobenzeno-sulfônico
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T reguladores

TTO	Tratamento
U.S.A	<i>United States of America</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

mg	Miligramas
α	Alfa
IL	Interleucina
β	Beta
γ	Gama
NO	Óxido nítrico
Hz	Hertz
g	Gramas
°C	Grau Celsius
h	Horas
μ L	Microlitro
mg	Miligramas
mA	Miliampere
min	Minuto
Kg	Quilograma
NaCl	Cloreto de sódio
M	Molar
mL	Mililitro
KH_2PO_4	Hidrogenofosfato de potássio
g	Gramas
L	Litros
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
Kg	Quilograma
mm^2	Milímetro quadrado
cm	Centímetros
mm	Milímetros
Fr	French
s	Segundos
NaPO_4	Fosfato de sódio
rpm	Rotações por minuto
mM	Milimolar

min	Minuto
nm	Nanômetros
mg	Miligrama
KCl	Cloreto de potássio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
nmol	Nanomol
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
DAB-H ₂ O ₂	Diaminobenzidina-peróxido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Acupuntura	28
1.2	Justificativa	32
2	OBJETIVO	34
2.1	Objetivo Geral	34
2.2	Objetivos específicos	34
3	MÉTODO	35
3.1	Amostra	35
3.1.1	Grupos experimentais	35
3.2	Experimentos	36
3.2.1	Teste de Von Frey para hiperalgesia visceral	36
3.2.2	Preparação do cólon.....	37
3.2.3	Modelo Animal: indução da colite	38
3.3	Anestesia	39
3.4	Eletroacupuntura	41
3.5	Avaliação clínica	42
3.6	Eutanásia	43
3.7	Delineamento	44
3.8	Avaliação histológica	45
3.8.1	Avaliação morfológica	45
3.9	Avaliação da atividade da MPO	46
3.10	Ensaio para dosagem de MDA	46

3.11	Dosagem de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no tecido intestinal	47
3.12	Imunoistoquímica para expressão de iNOS	47
3.13	Análise estatística	48
4	RESULTADOS	49
4.1	Curva de variação ponderal	49
4.2	Escores de diarreia	50
4.3	Efeito nociceptivo abdominal	51
4.4	Peso intestinal úmido	52
4.5	Escores macroscópicos de Morris nos segmentos cólicos	53
4.6	Escores histopatológicos de Appleyard e Wallace (1995)	55
4.7	Infiltração neutrofílica no cólon – Atividade da MPO	58
4.8	Dosagem de citocina - IL-1 β	60
4.9	Dosagem de citocina - TNF- α	61
4.10	Dosagem de citocina - IL-10	62
4.11	Concentração de MDA no intestino	63
4.12	Expressão imunoistoquímica para iNOS	64
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE A – SOLUÇÕES E REAGENTES	85
	APÊNDICE B – EQUIPAMENTOS	87
	APÊNDICE C – DROGAS E SUBSTÂNCIAS	88
	APÊNDICE D – PROTOCOLOS	89

APÊNCICE E – DADOS BRUTOS.....	95
---------------------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais idiopáticas (DII) compreendem uma série de afecções que produzem inflamação crônica do trato gastrointestinal, com surtos recidivantes de agudização. Embora existam várias doenças intestinais que produzam inflamação crônica, o termo é comumente usado para designar duas em especial: a retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) e a doença de Crohn (DC) (XAVIER, PODOLSKY, 2007).

Algumas vezes não é possível diferenciar RCUI da DC. O diagnóstico é dado a partir de aspectos clínicos, endoscópicos e histopatológicos. A clínica e epidemiologia sugerem que ambas tenham mecanismos desencadeantes comuns, apesar de manifestarem diferenças na forma de apresentação, na resposta ao tratamento e no prognóstico (SCHROEDER, TREMAINE e ILSTRUP, 1987).

Acredita-se que a RCUI tenha sido inicialmente descrita por Samuel Wilks (1859), como “colite idiopática”, diferenciando-a das outras formas de diarreia bacilar (WOLTERS et al., 2006). Já a DC foi descrita como “ileíte regional” por Crohn, Ginzburg e Oppenheimer (1932) (CROHN, GINZBURG e OPPENHEIMER, 1984).

Muitos esforços têm sido feitos, desde então, para que se conheçam os mecanismos biológicos que levam ao desenvolvimento de ambas as doenças. Sua etiologia ainda não é totalmente compreendida, mas envolve fatores genéticos, ambientais e imunológicos. Acredita-se que ocorra um desequilíbrio da resposta imune a bactérias geralmente inofensivas da flora intestinal, em indivíduos geneticamente susceptíveis, com múltiplos fatores ambientais predisponentes (CAMELO et al., 2012; PUTHOOR, ZOETEN e DE, 2013).

A incidência e prevalência da DII variam segundo a localização geográfica. Os índices mais altos são registrados entre judeus do norte do continente americano e na Europa (LOFTUS, 2004). A DII acomete cerca de 3,6 milhões de pessoas na Europa e nos EUA (ENGEL e NEURATH, 2010). A incidência anual de RCUI na América do Norte varia de 2,2 a 19,2 casos por 100.000 pessoas/ano e de DC de 3,1 a 20 casos por 100.000 pessoas/ano, com uma prevalência de 238 por 100.000 pessoas/ano para RCUI e 201 por 100.000 pessoas/ano para DC (KAPPELMAN et al., 2007). Incide principalmente em jovens, de 15 a 30 anos, havendo ainda um segundo pico por volta dos 60 anos, em especial para DC (EKBOM et al., 1991).

Atualmente, há a impressão de que a incidência global da DC vem aumentando enquanto a de RCUI, mantém-se estável. O melhor conhecimento de seus mecanismos e a maior disponibilidade de métodos diagnósticos, especialmente a colonoscopia, contribuíram para um melhor registro. Ainda assim, acredita-se que a incidência real da DII seja subestimada, principalmente nos países mais pobres e emergentes (LOFTUS, 2004).

Pacientes com DII apresentam quadro clínico recorrente de diarréia, dor abdominal em cólica, tenesmo, sangue e muco nas fezes, febre e perda de peso. A diarréia é consequência da inflamação que acelera a motilidade cólica. A presença de sangue e muco nas fezes é consequência das ulcerações da mucosa intestinal (YANG, WANG e AN, 2005).

Não há achados endoscópicos patognomônicos para DII. A localização e o padrão de distribuição das lesões ao longo do trato digestivo é fundamental no diagnóstico (ODZE, 2003).

Na RCUI a dor abdominal é comumente referida no quadrante inferior esquerdo e se manifesta desde uma colite quiescente a uma colite fulminante. O sangramento está diretamente relacionado ao estágio, extensão e intensidade do processo inflamatório. Caracteristicamente o acometimento é distal, desde o reto, distribuindo-se de forma contínua e circunferencial no sentido proximal, podendo atingir todo o cólon na colite difusa. A lesão inicial consiste na perda de padrão vascular, seguindo-se de enantema difuso, devido ao aumento do fluxo sanguíneo. Com a piora da inflamação, surge edema e friabilidade de mucosa. A seguir, surgem úlceras cercadas por mucosa inflamada ou úlceras contínuas. Na forma crônica, podem surgir áreas de regeneração mucosa em locais de ulceração prévia, os chamados pseudopólipos ou pólipos inflamatórios (ENGEL e NEURATH, 2010).

As alterações histológicas estão confinadas às camadas superficiais, mucosa e submucosa. Os achados incluem: inflamação de mucosa, distorção e abscessos de criptas e depleção de células caliciformes; além de sinais de regeneração, como: perda de mucina, aumento do número de mitoses na superfície das criptas, presença de células com citoplasma basofílico e núcleo hiper cromático arredondado (PUTHOOR, ZOETEN e DE, 2013).

A DC se caracteriza por dor abdominal, diarréia e perda de peso (HANAUER e MEYERS, 1997). O acometimento é mais proximal, no íleo terminal e cólon direito, poupando o reto com frequência. As lesões inflamatórias são

entremeadas por mucosa normal. Observam-se úlceras aftóides e mucosa de aspecto nodular, descrita como “pedra de calçamento”. A inflamação é transmural, predominantemente de submucosa (LEE e COHEN, 2002). Os achados incluem: edema de submucosa, agregado linfóide, infiltrado linfoplasmocítico e fibrose. O achado patognomônico é a presença de granuloma epitelióide, que representa o melhor critério histológico para diferenciar a DC de outras DII. No entanto, incidência desses granulomas, em biópsias, varia de 15% a 36% (TANAKA e RIDDELL, 1990).

A necessidade de esclarecer os mecanismos das colites levou vários pesquisadores a estudá-las sob a forma de modelos experimentais. Comparando os achados clínicos e patológicos dos modelos de DII, Satoh e colaboradores (1997) citou mecanismos etiopatogênicos da DII, chamando a atenção para as citocinas, estímulos microbianos, influências genéticas e respostas a terapias determinadas. E concluiu que há um aspecto de heterogeneidade genética ou defeito primário na barreira da mucosa, como fatores iniciais na etiopatogenia das DII, e que necessitam ser provados no ser humano (SATOH et al., 1997).

Estímulos ambientais parecem ser capazes de desencadear uma reação imune aberrante em pacientes geneticamente suscetíveis (MAYER, 2010). Alguns fatores podem estar implicados, como: aumento no consumo de açúcar, dieta pobre em fibras, conservantes alimentares e agentes infecciosos (SONNENBERG, 1986).

Assim, diversos modelos de colite experimental foram desenvolvidos: por irradiação, por isquemia (KIRSNER, 1961; MACPHERSON e PFEIFFER, 1978; MARSTON et al., 1969), por estímulos imunológicos (COOKE, FILIPE e DAWSON, 1968; KIRSNER et al., 1959; PERLMANN et al., 1965; ZWEIBAUM, MORARD e HALPERN, 1968), por estresse a estímulos elétricos (KIRSNER, 1961) e por substâncias, como caolim (GARDINER et al., 1993), carragenina (MARCUS e WATT, 1970), ácido acético (MACPHERSON e PFEIFFER, 1978), formalina (ELSON et al., 1995), indometacina (YAMADA et al., 1993), ciclosporina (HESS e FISCHER, 1989), ácido 2,4,6 trinitrobenzeno-sulfônico (TNBS) (MORRIS et al., 1989; ELSON et al., 1995).

Morris e colaboradores (1989) desenvolveram um modelo de colite em ratas Sprague-Dawley, utilizando TNBS em solução de etanol, induziram a colite instilando 0,25mL da solução de 30mg de TNBS em etanol a 50%, por enema. Eles analisaram a inflamação cólica, observando as alterações na mucosa em microscópio de luz, aplicando escore de zero a cinco, quantificaram o peso úmido do

cólon e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Todos os animais que receberam o TNBS desenvolveram inflamação, úlceras e espessamento da parede do cólon. Ocorreu diarreia em mais de 90% dos animais até a terceira semana de indução. Houve perda de peso de 8% a 10%, recuperando após a primeira semana do experimento. À análise histológica, foi observada agressão extensa da mucosa com edema, hemorragia, infiltração de neutrófilos (PMN), granuloma na submucosa e serosa. E concluíram que o modelo descrito preenche os critérios ideais para o estudo da fisiopatologia e tratamento da DII (MORRIS et al., 1989).

O não conhecimento da etiopatogenia e a ausência de tratamento clínico específico direcionaram as pesquisas no sentido de estudar os mais diversos aspectos da DII (ENGEL e NEURATH, 2010).

Acredita-se que o início e a manutenção do processo inflamatório envolvido na DII, sejam resultantes de um desequilíbrio na resposta imune, através do aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL) (1 β , IL-6 e IL-8). Ao mesmo tempo em que há deficiência de citocinas antiinflamatórias: IL-10 e IL-4 (SZKARADKIEWICZ et al., 2009).

Os PNM, monócitos e macrófagos e os linfócitos T são as principais fontes dessas citocinas (SZKARADKIEWICZ et al., 2009).

Os PMN são importantes contribuintes para indução e manutenção da inflamação da mucosa, por secretar TNF- α e IL-1 β . Eles são os tipos celulares mais abundantes em colites ulcerativas (CARLSON et al., 2002).

No cólon saudável, macrófagos intestinais podem ser encontrados na mucosa, próximo à membrana basal da camada epitelial. Na DII, o número de macrófagos está aumentado e subpopulações destes, aparecem na lâmina própria, indicando recrutamento para o intestino inflamado. Essas células podem contribuir para os danos intestinais, ao liberar radicais livres, citocinas e outros mediadores inflamatórios, ao fagocitar antígenos ou agindo como células apresentadoras de antígenos (STEVCEVA et al., 2001).

Os mastócitos estão distribuídos no tecido conjuntivo, especialmente na submucosa (PUTHOOR, ZOETEN e DE, 2013). Eles agem pela degranulação e liberação de mediadores ativos, como: serotonina, histamina, substância P, heparina e leucotrieno (SHI et al., 2011).

A DC é caracterizada por uma inflamação transmural e descontínua mediada pela ação de linfócitos T-*helper* (Th1/Th17), que produzem IL-6, IL-12 e IL-17. Enquanto na RCUI, o acometimento das camadas mucosa e submucosa do cólon, é mediado por linfócitos Th2 (MAYER, 2010; CAMELO et al., 2012) (PUTHOOR, ZOETEN e DE, 2013). O número de linfócitos T está aumentado em amostras de tecidos cólicos acometido por DII. Tendo uma predominância de linfócitos T CD8 na DC (STEVCEVA et al., 2001). Estes liberam grandes quantidades de IL-4, IL-5 e IL-13, capazes de induzir macrófagos, monócitos, neutrófilos, células T e células *natural Killer* (NK) a liberar TNF- α , IL-1 e IL-6 (MAYER, 2010; CAMELO et al., 2012; PUTHOOR, ZOETEN e DE, 2013).

A mucosa intestinal é constantemente exposta a microrganismos e xenobióticos. No intestino normal, a IL-10 é a citocina antiinflamatória responsável por manter o ambiente em equilíbrio por sua ação supressora sobre as citocinas pró-inflamatórias (GLOCKER et al., 2009). Ela é produzida principalmente por linfócitos T-reguladores (Treg), exerce um papel supressivo na produção de citocinas pró-inflamatórias e um papel regulador em reações imunes mediadas por linfócitos Th (SZKARADKIEWICZ et al., 2009). Além de inibir citocinas do tipo Th1, como IL-2 e interferon- γ (PAUL, KHARE e GASCHÉ, 2012).

Quando esse equilíbrio é quebrado, os linfócitos e macrófagos ativados liberam mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e quimiocina ligante 1 (CXCL1). CXCL1 é um quimiotático de neutrófilos e indutor de inflamação, e sua expressão gênica está aumentada em pacientes com DII (SZALAI et al., 2014).

As citocinas pró-inflamatórias promovem reações do tipo hospedeiro em resposta a vários agentes nocivos, incluindo agentes microbianos (SZKARADKIEWICZ et al., 2009). Os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α), são fatores preponderantes na colite ulcerativa, por promover a degradação da matriz de colágeno pelos fibroblastos intestinais, com consequente perda da integridade mucosa e ulceração. A concentração dessas citocinas e a expressão dos RNAm correspondentes estão aumentados na mucosa cólica, fluidos intestinais, baço, soro de pacientes com RCUI. Há uma correlação significativa entre a atividade dessas citocinas e a intensidade da colite (MACDONALD, MONTELEONE e PENDER, 2000).

Monócitos, macrófagos, células NK, linfócitos T e mastócitos produzem TNF- α . O TNF- α é mediador da indução e manutenção da inflamação intestinal na

RCUI. O TNF- α ativa leucócitos, inibe a apoptose de células inflamatórias e inibe a proliferação de células T ativas. Ele aumenta a permeabilidade vascular. Pode causar inflamação diretamente e indiretamente ao promover a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, pois regulam genes que controlam a expressão de citocinas, moléculas de adesão celular, moléculas imunorreguladoras e mediadores pró-inflamatórios. O TNF- α e a IL-1 β tem efeitos sinérgicos e parecem induzir um ao outro (BINGHAM, 2002). O TNF- α também participa da produção de óxido nítrico (NO) e óxido-nítrico sintase induzida (iNOS), que por sua vez promovem mais inflamação que a IL-1 β (TIAN et al., 2003). Esse conhecimento permitiu o uso de medicações anti-TNF- α para controle e remissão de formas moderadas e graves de DII (ENGEL e NEURATH, 2010).

As óxido-nítrico sintases neuronal e endotelial (nNOS e eNOS) são enzimas, presentes na mucosa gastrintestinal, que regulam a microvasculatura, a permeabilidade e manutenção da perfusão tecidual. Citocinas podem inibir a expressão de nNOS, aumentar a de iNOS, que, exerce atividade inflamatória pelo aumento da liberação de NO. O NO pode ser benéfico ou deletério a depender da sua concentração, duração e sítio de síntese. Na mucosa intestinal, em concentração aumentada, promove maior lesão tecidual, hipomotilidade e a proliferação bacteriana (PORRAS et al., 2006; SZALAI et al., 2014).

O estresse oxidativo exerce ação importante nesse contexto, através da liberação da Heme-oxigenase 1 (HO-1). Enzima que quando induzida por citocinas e outras moléculas, exerce ação protetora dos tecidos durante o estresse oxidativo e inflamação. O resultado desse estímulo é a inibição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . A IL-10 exerce ação antiinflamatória através dessa via (SZALAI et al., 2014).

Não há tratamento clínico específico para a DII. O objetivo do tratamento é reduzir a inflamação intestinal, promover alívio dos sintomas, além de corrigir os distúrbios nutricionais e minimizar as complicações da doença. O tratamento clínico consiste no uso de corticosteroides, salicilatos, antibióticos, imunossupressores e imunomoduladores (ENGEL e NEURATH, 2010).

Os corticosteroides são a principal opção no tratamento da DII em atividade, embora tenha sido estabelecido que não promovam a cicatrização da mucosa (PUTHOOR, ZOETEN e DE, 2013). Sua ação antiinflamatória e imunossupressora permite uma boa resposta inicial ao tratamento em 75% a 90%

dos pacientes. São efetivos quando administrados por vias oral, parenteral e por enema (local). Eles inibem os mediadores inflamatórios, a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos e a imunidade celular (FEAGAN, 1996; HANAUER, 1996). A toxicidade dos corticosteroides está relacionada à dose e duração do tratamento, e incluem: retardo de crescimento em crianças, osteonecrose, perfuração intestinal, artralgias, doenças do metabolismo ósseo, e síndrome de Cushing (HANAUER, 1996)

A Sulfassalazina e os análogos do Ácido 5-Aminossalicílico (5-ASA) são mais comumente usados para tratar a DII ativa leve a moderada e na terapia de manutenção da remissão da DII. A Sulfassalazina tem sido utilizada para tratamento das colites desde 1950. Seu componente terapêutico, com ação tópica, o 5-ASA tem propriedades antiinflamatórias na mucosa cólica inflamada. Age inibindo a ciclooxigenase (COX) e a 5-lipooxigenase, que por sua vez inibem a síntese de prostaglandinas e leucotrienos (SINGLETON et al., 1979; HANAUER, 1996). Ele atua induzindo e ativando a HO-1, daí seus efeitos inibidores da inflamação (SZALAI et al., 2014). São menos efetivos que os glicocorticóides na remissão e no tratamento das formas graves da doença (ENGEL e NEURATH, 2010).

Os antibióticos são utilizados nas exacerbações agudas da doença de Crohn, porém não são efetivos no tratamento da colite ulcerativa. Sua utilização baseia-se no seu efeito em reduzir a concentração bacteriana na luz intestinal, a invasão tecidual secundária e os micro-abscessos que ocorrem na doença de Crohn, bem como a disseminação e a translocação bacteriana. Experiências clínicas sugerem que o metronidazol e/ou ciprofloxacina podem tratar colite e ileocolite de Crohn (SARTOR, 1995).

Os agentes imunossupressores, tais como 6-mercaptopurina e azatioprina e ciclosporinas são frequentemente usados em pacientes com DII, sendo indicados na manutenção da remissão da doença. O mecanismo de ação é pouco conhecido, mas pode envolver uma inibição da ativação de linfócitos T. Agem deprimindo a função das células *natural killer* e linfócitos T-*helper*, inibindo IL-2 (HANAUER, 1996; FREEMAN e FLAK, 2005). Algumas reações adversas são atribuídas a esse tratamento, como hepatotoxicidade, mielossupressão, reações alérgicas e malignidades (PUTHOOR, ZOETEN e DE, 2013).

Os anticorpos monoclonais anti-TNF- α são imunoglobulinas quiméricas recombinante, capazes de neutralizar a atividade biológica do fator de necrose

tumoral solúvel e ligado à membrana celular (FASANMADE et al., 2009). O tratamento com esses anticorpos, como Infliximabe, está associado a menor taxa de complicações, internamentos e cirurgias na DII (COSTA et al., 2013). A terapia é efetiva para indução e manutenção da remissão clínica (MOSS e FARRELL, 2006).

Alguns pacientes têm um curso de doença grave, sem remissão, apesar de tratamentos fortemente imunossupressores. A evidência atual, ainda não é capaz de prever a extensão e o curso de atividade da doença completamente. Espera-se no futuro, diferenciar os grupos de risco e melhorar a capacidade de escolher a melhor forma de tratar a DII (JI et al., 2013). Portanto, é necessário, que a comunidade científica conheça as diversas opções de cuidados da saúde, para que esses tratamentos sejam mais eficazes e possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores de DII.

1.1. Acupuntura

Na China, há cerca de 5000 anos, a acupuntura tem sido usada para tratamento de várias doenças (KAVOUSSI e ROSS, 2007). O termo acupuntura deriva dos radicais latinos *acus* (agulha) e *pungere* (espetar). Essa prática da medicina tradicional chinesa (MTC) fundamenta-se na estimulação, feita com agulhas, em pontos específicos do corpo, com o objetivo de atingir efeito terapêutico ou homeostático, baseando-se no princípio de que o estímulo de uma região corporal age sobre outras de forma reflexa (PYNE e SHENKER, 2008)

A acupuntura promove efeitos analgésico, antidepressivo, cicatrizante, antiinflamatório e relaxante muscular, além de promover resposta imune e agir na reabilitação das sequelas, características que fazem com que seja indicada no tratamento de diversas doenças agudas e crônicas (FARIA, 2008).

Na MTC, o conceito de saúde consiste em uma energia vital do corpo, o *Qi*, que permeia órgãos e tecidos e está por trás de todo o processo fisiológico. Ele circula de forma unidirecional através de uma rede de doze canais (meridianos) logo abaixo da pele, e também dentro dos vasos sanguíneos. Os meridianos conectam 360 acupontos principais (KAVOUSSI e ROSS, 2007). A saúde é o fluxo harmonioso e ininterrupto dessa energia, já a doença ocorre quando há uma ruptura deste fluxo. Segundo os conceitos da MTC, alguns fatores podem afetar esse equilíbrio, como: estados emocionais, nutricionais, condições climáticas, fatores hereditários,

infecções e trauma. A inserção de agulhas tenta restaurar o equilíbrio por aumentar a qualidade e o fluxo dessa energia (ZIJLSTRA et al., 2003).

No Ocidente, essa parte da MTC vem conquistando visibilidade, mas sua utilidade tem sido questionada. Um número cada vez maior de pacientes principalmente aqueles com doenças crônicas tem buscado complementação dos seus tratamentos nessa modalidade, mesmo sem garantia de efeitos benéficos (ZIJLSTRA et al., 2003). A acupuntura ocidental é uma adaptação da medicina chinesa, usando conhecimentos atuais de anatomia, fisiologia, patologia e os princípios de medicina baseada em evidências (LANGMEAD e RAMPTON, 2006).

A acupuntura não tem um modo único de ação. Seu efeito terapêutico é alcançado através da estimulação transcutânea do sistema nervoso (sensorial) e da estimulação da medula espinhal. No local, os efeitos se devem a reflexos axônicos antidrômicos, liberando neuropeptídeos, como calcitonina, e aumentando o fluxo sanguíneo. Na medula espinhal e no cérebro, a acupuntura causa liberação de peptídeos opióides e serotonina (WHITE, 2009).

Os efeitos clínicos na dor ocorrem pela inibição da nocicepção no corno dorsal da medula espinhal pela ativação das vias inibitórias descendentes e, possivelmente, pelos efeitos locais nos “pontos de gatilho” miofasciais. Estudos de imagem utilizando ressonância nuclear magnética e Tomografia por emissão de pósitrons comprovam suas ações também no sistema nervoso central (SNC). As áreas do SNC associadas à acupuntura incluem o trato anterolateral medular, núcleo retículo-gigantocelular, núcleo magno da rafe, substância periaquedutal, hipotálamo posterior e anterior, núcleo centromediano do tálamo e as vias medular talâmicas dorsais (MEDEIROS e SAAD, 2009).

A analgesia por acupuntura envolve a estimulação de nervos de pequeno diâmetro e limiar diferenciado. Esses nervos mandam mensagens à medula espinhal, o que ativa neurônios do tronco cerebral (área cinzenta peri-aquedutal) e do hipotálamo, disparando mecanismos de opióides endógenos. A resposta inclui mudança no nível plasmático ou liquórico de endorfinas, encefalinas e hormônios relacionados a estresse (ACTH). Um outro mecanismo de ação da acupuntura pode ser uma forma de estimular a expressão genética de neuropeptídeos. O aumento de β -endorfina foi proposto para explicar o efeito analgésico da acupuntura, embora isso não explique a ação da acupuntura em outras condições clínicas. Endorfinas podem estar interagindo com citocinas, algumas das quais modulam o componente

inflamatório de doenças nas quais a acupuntura pode ser útil. Especula-se que a acupuntura possa amplificar a interação entre neuropeptídeos e citocinas (KIM et al., 2007)

A inserção de uma agulha induz mudanças aos tecidos penetrados. Estes eventos periféricos através da vasodilatação da pele, e dos reflexos axônicos, provocam uma reação imediata exacerbada. A liberação local de peptídeos opióides endógenos deve ser responsável pelo efeito analgésico de curto prazo (ZIJLSTRA et al., 2003).

A acupuntura aumenta a densidade local dos mastócitos e ativa a degranulação destes, gerando efeitos inibitórios de vias imunológicas celulares. Enquanto que a liberação de citocinas antiinflamatórias pode ser mediada por linfócitos ou de forma secundária à ação de macrófagos. O efeito vasodilatador pode ser causado pela liberação de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), através estimulação de fibras C e A- δ . Usualmente o CGRP tem ação pró-inflamatória, porém, em baixas doses, apresenta potente ação antiinflamatória. Outras substâncias, incluindo serotoninas, catecolaminas, glutamato e ácido gama-aminobutírico podem estar associadas a efeitos analgésicos e cardiovasculares da acupuntura. A acupuntura também inibe a permeabilidade vascular, limita a aderência leucocitária ao endotélio vascular e suprime a reação exsudativa de modo similar a antiinflamatórios (ZIJLSTRA et al., 2003).

Os acupontos são considerados portas de entrada e saída de energia de um organismo. São estruturas complexas, compostos de terminações nervosas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo, onde é possível a manipulação da energia para restaurar o equilíbrio. Eles estão distribuídos através de canais de energia que se interligam e por onde circula, o *Qi*, responsável por associar, regular e controlar as atividades funcionais do corpo (FARIA, 2008).

No oriente, os pontos têm nomes chineses tradicionais, que se referem a sua localização e/ou função, mas no Ocidente, são identificados por código que especifica o canal sobre o qual está localizado, e o número do acuponto (p.ex. B40 refere-se ao quadragésimo ponto do canal da Bexiga). De certa forma, este sistema facilita o aprendizado e a comunicação, além de evitar equívocos com a tradução dos nomes orientais. A inserção da agulha provoca injúria ao tecido do acuponto e ao endotélio de pequenos vasos e capilares, liberando vários produtos de lesão tecidual. Estes produtos ativam a cascata de coagulação e a via alternativa do

sistema complemento. O efeito inicial é uma vasodilatação arteriolar e aumento de permeabilidade dos vasos da microcirculação. Há constrição de veias e vênulas e dilatação de vasos linfáticos, aumentando o afluxo de células imunocompetentes e de substâncias de dano e reparo no tecido circundante ao acuponto. Esta reação pode ser resumida em: vasodilatação, excitação nociceptiva, quimiotaxia, solubilização e reparo tecidual. A intensidade de estimulação ou manipulação da agulha e o tempo de permanência da mesma, são importantes para produzir tipos específicos de reação. A fase inicial da resposta ao agulhamento é vasodilatatória e imune estimulante, enquanto a última fase é antiinflamatória. A retenção da agulha por um período longo favorece a fase final de controle, enquanto a permanência por um período curto com intensa estimulação manual, gera mais produtos de lesão tecidual, e tende a intensificar a fase inicial da reação (FARIA, 2008).

Existem diferentes métodos para estimulação dos acupontos: Acupressão: realizada com os dedos na forma de massagem ou em pontos determinados; Agulhamento Simples: localização e profundidade de inserção da agulha variam conforme o órgão alvo; Eletroacupuntura (EAC): que consiste na transmissão de energia elétrica sob diferentes intensidades e frequências aos pontos de acupuntura. Com este método, o nível de analgesia pode ser aumentado e o efeito da acupuntura prolongado pela estimulação do ponto tratado; Implantes: vários materiais podem ser implantados no tecido próximo ao ponto de acupuntura para obter um estímulo mais prolongado; Injeção no acuponto: opção para acupuntura em animais, pois requer um curto período para tratamento e poucos materiais; Entre estas: solução salina, glicose, vitaminas, sangue e fármacos (FARIA, 2008).

O acuponto ST-36, Zusanli, é considerado um imunomodulador e é um importante acuponto na MTC na manutenção das alterações do trato gastrointestinal. Ou e colaboradores (2001) mostraram que a estimulação do acuponto ST-36 regula uma rede imunoneuroendócrina, influenciando a produção e expressão de neurotransmissores, hormônios e citocinas. A estimulação desse ponto aumenta a função imune por induzir a produção de IL-2 e interferon- γ em linfócitos esplênicos de ratos com injúria cerebral, além de suprimir a elevação de IL-1 induzido pelo trauma ou por outras doenças (OU et al., 2001).

A EAC é um marco no desenvolvimento da acupuntura tradicional em que o estímulo manual dos acupontos já não é uma manipulação empírica, mas algo

quantificável. Ela é um método reprodutível que permite estudos científicos em acupuntura. A EAC ativa a ação de glicocorticóides com potentes propriedades antiinflamatórias. Também modula a secreção de catecolaminas pela medula adrenal ao influenciar a atividade simpática. As catecolaminas induzem resposta antiinflamatória através da ativação β -adrenérgica. A ligação de catecolaminas aos receptores β -2 adrenérgicos expressos em células imunes levam a uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-8) e a um aumento de citocinas antiinflamatórias (IL-10), controlando assim, a resposta inflamatória. A EAC em baixas frequências (2Hz) pode induzir a ativação de receptores δ -opióides através da liberação de adenosina e encefalina que acontece pelo estímulo das fibras mielínicas aferentes de largo diâmetro. Enquanto que a EAC em altas frequências (100Hz) pode estimular esses mesmos receptores através da liberação de dimorfina, o que acontece pela estimulação de fibras mielínicas aferentes de menor calibre, assim como fibras amielínicas do tipo C, o que causaria uma analgesia mais potente (NIU et al., 2011).

Os mecanismos antiinflamatórios da acupuntura já foram estudados em diversas afecções: asma, rinite, DII, artrite reumatoide, epicondilite e doenças vasculares (ZIJLSTRA et al., 2003). Porém, seus mecanismos de ação na DII ainda não são totalmente compreendidos.

1.2. Justificativa

Os tratamentos de DII com fármacos tem efeitos que limitam a aceitação do paciente. Os diversos métodos de tratamento, a longo prazo, apresentam inúmeras reações adversas, e por sua ação imunossupressora, podem resultar em complicações, tais como aumento da incidência de neoplasias e de doenças infecciosas (MAJEWSKA-SZCZEPANIK et al., 2012).

A acupuntura é uma técnica característica da medicina tradicional oriental, que tem um sistema teórico único, experiência clínica rica e efeitos clínicos excelentes. Ela tem função de regulação neuro-endócrino-imunológica e pode regular fatores pró-inflamatórios e antiinflamatórios na DII com bons efeitos terapêuticos. Ela modula a produção e expressão de muitas citocinas. Tem sido aceita pelos pacientes pelo seu efeito clínico terapêutico, e poucos efeitos colaterais em muitas doenças, incluindo a DII (KANG et al., 2004).

A Organização Mundial da Saúde reconheceu a acupuntura como técnica terapêutica e elencou diversas indicações de uso, dentre elas para fins analgésicos. Há muitos relatos clínicos da acupuntura sobre a colite ulcerativa mas poucos estudos experimentais. Portanto, seus mecanismos terapêuticos na DII ainda é incerto. A proposta deste trabalho é avaliar evidência da eficácia da acupuntura no tratamento das DII (KANG et al., 2004).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Estudar a ação antiinflamatória e analgésica da eletroacupuntura na colite induzida por TNBS em camundongos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ação da eletroacupuntura sobre a nocicepção visceral em modelo de colite induzida por TNBS em camundongos;
- Avaliar o efeito da eletroacupuntura sobre o processo inflamatório no modelo de colite induzida por TNBS em camundongos, mediante parâmetros clínicos, macroscópicos, histopatológicos, imunoistoquímicos e dosagens de citocinas no tecido cólico dos camundongos.

3. MÉTODO

Este é um estudo experimental que foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do departamento de Farmacologia e Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética para Experimentação Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará e seguiu estritamente as regras do NIH para o cuidado e uso de animais em laboratório.

3.1. Amostra

No presente estudo, foram utilizados camundongos machos do tipo Swiss Webster (*Outbred*), peso médio de 30g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Cirurgia Experimental da UFC.

Os animais foram distribuídos em grupos experimentais (n=6-9) e acomodados em caixas apropriadas, em ambiente com temperatura controlada variando entre $26 \pm 2^\circ\text{C}$, e ciclos de 12h de luz/ 12h escuro. Os animais tinham livre acesso à alimentação (Labina[®], Ração para Ratos, Camundongos e Hamsters – Ralston Purina do Brasil LTDA. – Paulínia – SP) e água.

Após jejum de 12 horas, recebendo somente água *ad libitum*, os animais foram pesados e identificados na cauda com marcador para retroprojeter (Pilot[®], São Paulo - SP), cores de acordo com os grupos.

3.1.1. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos de forma aleatória nos seguintes grupos:

- **Grupo Salina (SAL) (n=8)** – animais submetidos a clister de 80µL de salina
- **Grupo Etanol (ETNL) (n=7)**– animais submetidos a clister de 80µL de etanol
- **Grupo Colite (TNBS) (n=9)**– animais submetidos a clister de 80µL de solução de TNBS em etanol a 50% (2mg).

- **Grupo Colite com Eletroacupuntura (EAC) (n=6)** – animais submetidos a clister de solução de TNBS (2mg/80µL) em etanol a 50% e tratados com eletroacupuntura uma hora antes da indução da colite, 24 e 48 horas depois da indução da colite. Foi utilizada frequência de 100Hz, 1mA, por 20 min, no acuponto ST-36.
- **Grupo Colite com Falsa Eletroacupuntura (FEAC) (n=9)**- animais submetidos a clister de solução de TNBS (2mg/80µL) em etanol a 50% e tratados com eletroacupuntura uma hora antes da indução da colite, 24 e 48 horas depois da indução da colite. Foi utilizada frequência de 100Hz, 1mA, por 20 min, em não-acuponto (*sham*) no dorso do animal.
- **Grupo Colite com Dexametasona (DEXA) (n=8)**– animais submetidos a clister de solução de TNBS (2mg/80µL) em etanol a 50% e tratados com dexametasona (1mg/Kg), SC, uma hora antes da indução da colite, 24 e 48 horas depois da indução da colite.

3.2. Experimentos

3.2.1. Teste de Von Frey para Hiperálgia Visceral

O teste de Von Frey foi executado nos camundongos antes dos tratamentos com eletroacupuntura ou dexametasona e nos grupos controle; e repetido 24h e 72h após a indução da colite. O experimentador inicialmente fez uma ambientação dos animais um dia antes do experimento.

O Von Frey eletrônico é um analgesímetro digital composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor é adaptado a uma ponteira descartável 0,5 mm² que estimula diretamente o abdome do animal. O experimentador foi treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da parede abdominal do animal, com uma pressão gradualmente crescente, até que provoque uma das seguintes reações: retração abdominal, flexão da pata ou lambadura do abdome. O estímulo é então interrompido e a força exercida para promover a resposta característica é registrada. Cuidado deve ser tomado para não estimular o mesmo ponto duas vezes sucessivamente para evitar aprendizagem ou sensibilização dos animais.

Foram realizadas de três a cinco aplicações distintas para cada animal, antes e após os tratamentos já citados, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação da força em gramas (Δ da força em gramas), que é o valor mensurado do tempo zero subtraído do valor mensurado nas horas após os tratamentos dos animais.

Durante a aferição, os animais foram mantidos em caixas acrílicas medindo 12 x 20 x 17 cm, com assoalho formado por uma rede e malhas medindo cerca de 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de diâmetro. Antes do início do teste, os animais permaneceram nestas caixas por 30 minutos para adaptação (LAIRD et al., 2001) (Figura 1).

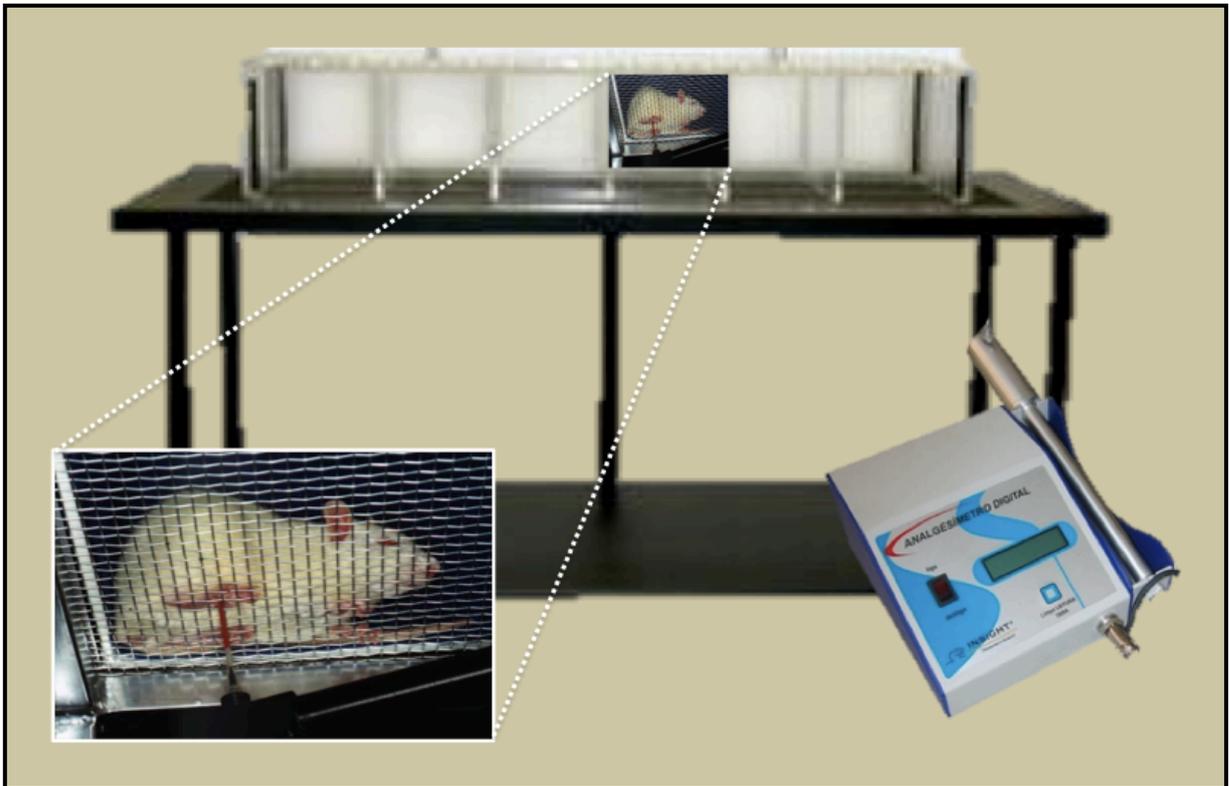


Figura 1 – Analgesímetro digital – Von Frey eletrônico

3.2.2. Preparação do Cólon

Após jejum de 12 horas, os animais foram submetidos à sedação com anestesia inalatória sob campânula para preparo intestinal e indução da colite. A limpeza mecânica dos cólons foi realizada por enema de 5 mL de solução salina a 0,9% aplicado por cinco segundos, através de cateter de polietileno 4 Fr. O cateter

foi introduzido até 4 cm da borda anal e era acoplado a seringa descartável de 10 mL.

3.2.3. Modelo Animal: Indução da Colite

O modelo utilizado foi baseado no modelo de colite induzida por TNBS descrito por Morris e colaboradores (1989).

Após a limpeza dos cólons, os animais foram novamente sedados e posicionados em decúbito ventral.

Para a indução da colite, um cateter de polietileno 4Fr foi introduzido até 4cm da borda anal para a injeção de 80 μ L de solução de TNBS (5%) diluído em solução de álcool a 50% (2mg). Após a administração da substância, o animal foi suspenso pela cauda, por 30 segundos para evitar o retorno da solução permitindo maior tempo de contato com a mucosa cólica (Figura 2).



Figura 2 – Indução da colite – camundongo suspenso pela cauda

Os grupos TNBS, EAC, FEAC e DEXA foram submetidos a indução da colite por esse modelo. Os grupos, SAL e ETNL passaram pelo mesmo método porém receberam salina ou etanol, através de enema.

3.3. Anestesia

A técnica anestésica utilizada foi anestesia geral inalatória por administração de isoflurano 2% em sistema semiaberto com vaporizador universal. A anestesia foi dividida em três etapas: indução em câmara anestésica, manutenção com máscara e recuperação em câmara de oxigênio.

A indução da anestesia foi em câmara conectada a sistema de fluxo com ar saturado em isoflurano e oxigênio por cerca de 5 minutos, ou até o animal adormecer. Após adormecerem na câmara de indução anestésica, os animais foram posicionados em decúbito ventral e mantidos anestesiados por máscara em sistema aberto. Durante a manutenção com máscara, a concentração de anestésico foi diminuída. Os animais são mantidos adormecidos sem a necessidade de contenção, durante a sessão de eletroacupuntura (20min).

O sistema de anestesia foi elaborado de forma semi-artesanal onde o oxigênio em cilindro foi conectado a um fluxômetro e a um umidificador de ar com água. A oxigênio umidificado passava, através de um tubo flexível de látex, para um vaporizador universal (Takaoka), contendo o anestésico volátil (isoflurano). O vaporizador possui uma válvula que permite aumentar ou diminuir a concentração do anestésico no oxigênio. A mistura de gases passa então por um tubo flexível de látex conectado a uma conexão "Y". Cada saída da conexão por sua vez, é conectada a uma nova conexão "Y", determinando quatro saídas. Cada saída é conectada a uma seringa de 10mL, tamanho ideal para envolver a boca e as vias aéreas do camundongo. Esse sistema permite anestésiar quatro animais por vez (Figura 3).

Todos os animais dos demais grupos foram submetidos aos mesmos procedimentos anestésicos.

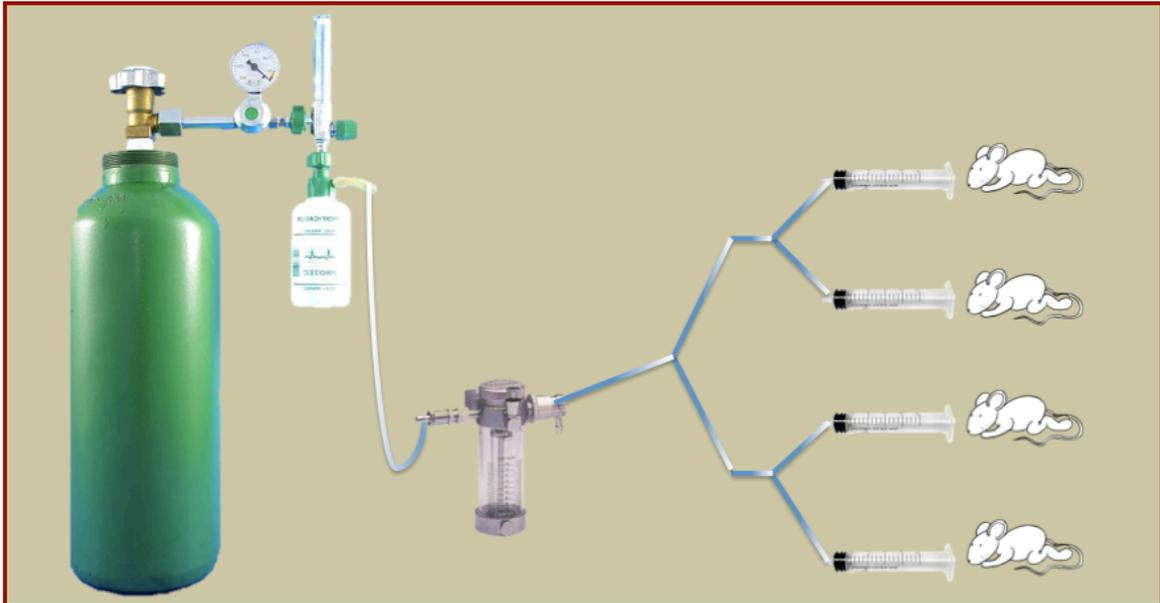


Figura 3 – Técnica anestésica – Sistema de anestesia inalatória semi-artesanal

A avaliação do nível da profundidade anestésica foi descrito por White, Johnston e Eger (1974) através do pinçamento do terço distal da cauda por 15 segundos, até atingir o nível 3, conforme Quadro 1. Além do teste de pinçamento da cauda, métodos clínicos foram monitorados, como, grau de relaxamento muscular, movimentos respiratórios e coloração das mucosas (WHITE, JOHNSTON e EGER, 1974).

Quadro 1 – Nível anestésico baseado em achados clínicos, conforme White, Johnston e Eger (1974)

Classe	Nível	Resposta Clínica
I	Não anestesiado	Movimentos grosseiros da cabeça ou corpo
II	Anestesia superficial	Contrações musculatura facial, reflexo da deglutição, da mastigação, movimento rápido da cauda, respiração espasmódica
III	Anestesia cirúrgica	Nenhum movimento de cabeça, extremidades ou corpo, respiração normal, extremidades rosadas
IV	Anestesia profunda	Sem movimentos, respiração deprimida ou morte, extremidades pálidas ou cianóticas

3.4. Eletroacupuntura

Sob anestesia geral inalatória, os animais foram submetidos a tratamento com eletroacupuntura conforme protocolo descrito, para os grupos EAC e FEAC, uma hora antes da indução da colite, 24 e 48 horas após a indução da colite. As sessões tiveram duração de 20 minutos.

As agulhas esterilizadas descartáveis (Ting) 0,18 x 8mm, de aço inoxidável foram introduzidas nos acupontos ST-36 bilateralmente, a uma profundidade de 3mm, nos animais do grupo EAC. O mesmo protocolo foi seguido para os animais do grupo FEAC, porém a aplicação das agulhas foram em um não-acuponto (Sham) localizado no dorso, paravertebral do animal, bilateralmente. Para posicionamento da agulha e padronização da profundidade da inserção foi utilizado um introdutor para agulhas de acupuntura Ting. O ponto ST-36 é localizado abaixo da cabeça da fíbula na pata traseira do camundongo (YIN et al., 2008).

Após agulhamento, eletrodos foram conectados às agulhas com mini jacarés e estes, ao eletro-estimulador modelo Sikuro DS-100. O eletroestimulador, foi configurado para aplicar ondas quadradas pulsantes por 20 minutos, na frequência de 100Hz e intensidade de 1mA e 1s (Figura 4).

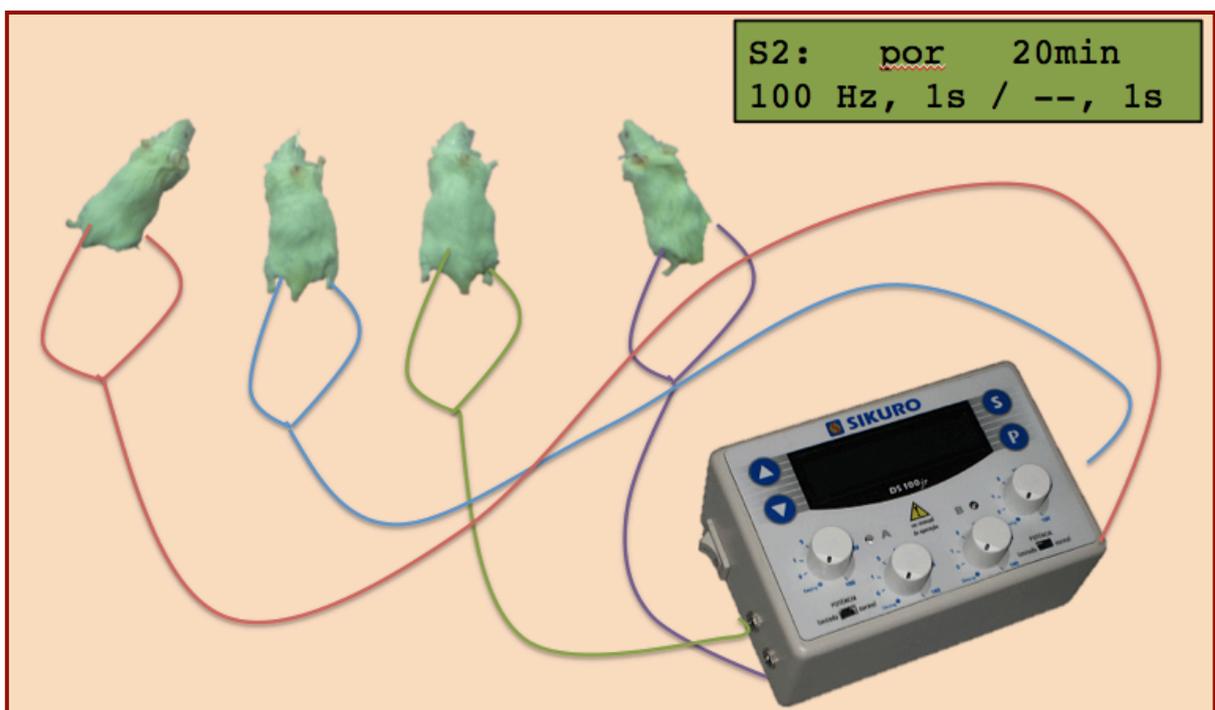


Figura 4 – Técnica de Eletroacupuntura – Aparelho de quatro canais.

Antes de ser utilizado, o eletroestimulador foi programado conforme frequência e potência supracitada e calibrado no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

3.5. Avaliação clínica

Após a recuperação anestésica, os animais foram postos em caixas apropriadas, com água e ração à vontade.

Diariamente, os camundongos eram pesados e observados quanto à presença de adinamia, diarreia, sangramento, sinais de infecção, perda de peso e mortalidade.

A diarreia representa um indicativo de indução da colite, tendo em vista que é um sintoma comumente associado a essa afecção. A esses eventos foram atribuídos escores, (Figura 5) (KURITA et al., 2000).

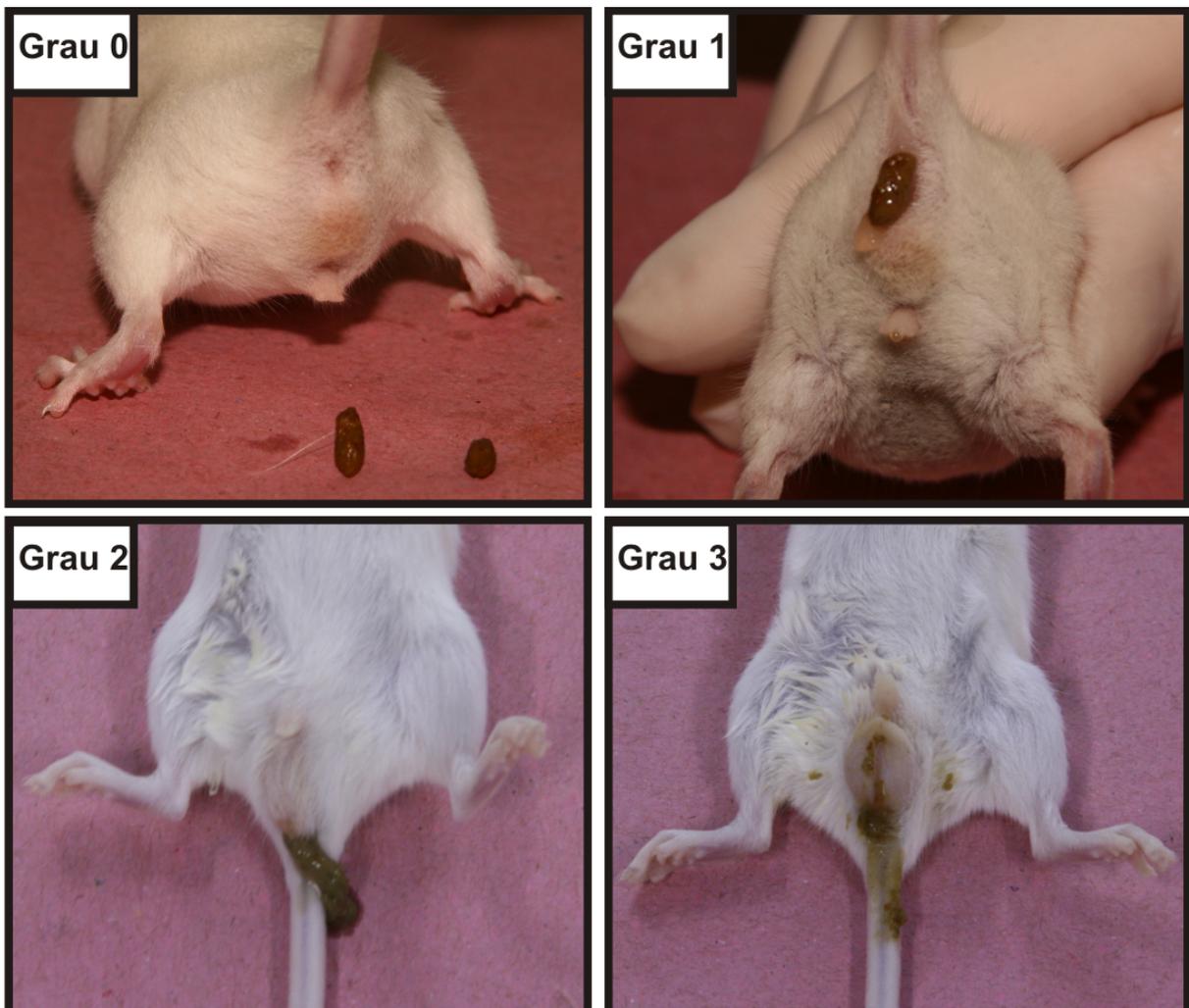


Figura 5 – Representação dos graus de Diarréia pós indução da colite por TNBS. Grau 0: Normal, fezes com aspecto normal ou ausentes; Grau 1: Diarréia leve, fezes levemente alteradas, pouco umedecidas; Grau 2: Diarréia moderada, fezes úmidas não formadas, com moderada sujidade perianal; Grau 3: Diarréia profusa, fezes líquidas com bastante sujidade perianal (Foto gentilmente cedida por Helano Carioca Freitas/ Dissertação de Mestrado)(LIMA-JÚNIOR et al., 2014).

3.6. Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia 3 dias após a indução das colites por deslocamento cervical. Em seguida, submetidos a laparotomia por incisão mediana. Após a identificação do cólon descendente, foi isolado uma extensão de 5 cm. A peça foi aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e estendida sobre uma superfície plana para uma avaliação do escore macroscópico seguindo a técnica descrita no Quadro 2 (MORRIS et al., 1989).

Quadro 2 – Escores de inflamação macroscópicos, segundo Morris.

Achado	Escores Macroscópicos (MORRIS et al., 1989)
Aparência normal	0
Hiperemia local sem úlceras	1
Ulceração sem hiperemia ou espessamento da parede cólica	2
Ulceração com inflamação em um sítio	3
Ulceração / inflamação em dois ou mais sítios	4
Lesão principal estendendo-se por 1 cm ao longo do cólon	5
Área de lesão > 2 cm ao longo do comprimento do cólon. A quantificação é aumentando em 1 para cada centímetro adicional.	6 - 10

Um segmento de 5 cm de intestino contendo área de inflamação, foi seccionado longitudinalmente, e subdividido em amostras de tecido conforme Figura 6, para análises histopatológicas (1), imunoistoquímicas (1) e bioquímicas (2), (3), (4) e (5).

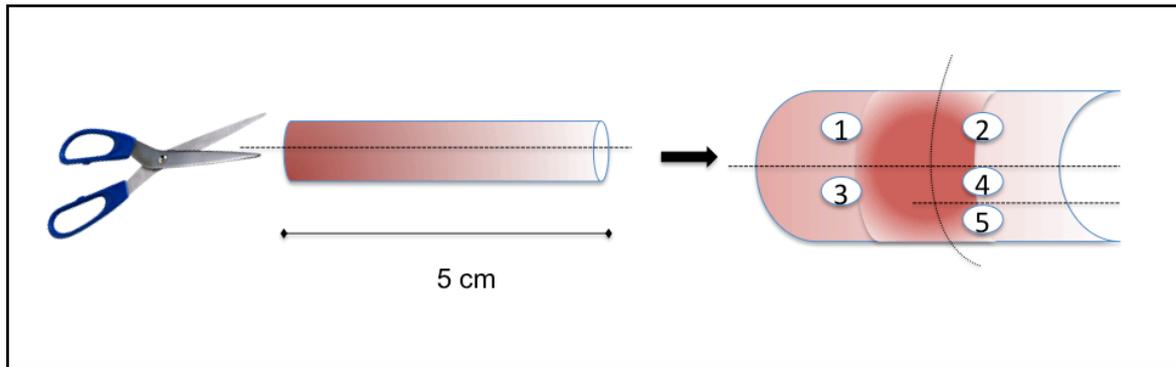


Figura 6 – Preparo do segmento intestinal

3.7. Delineamento

O trabalho foi desenvolvido conforme o seguinte delineamento (Figura 7).

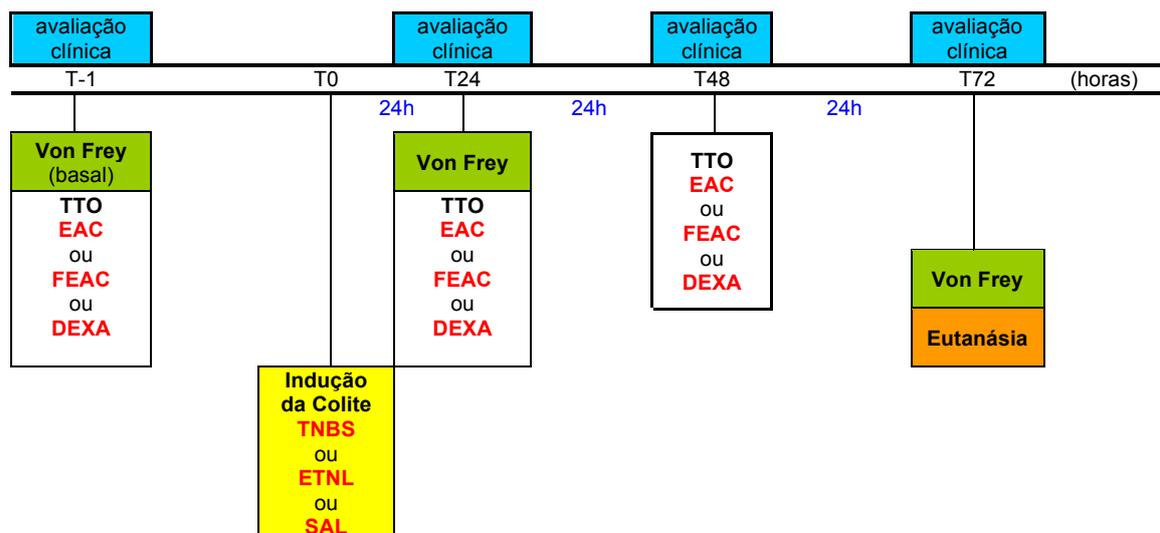


Figura 7 – Delineamento dos experimentos: No tempo menos uma hora (T-1), todos os grupos eram submetidos a avaliação clínica, e Teste Von Frey basal. Em seguida, animais dos grupos EAC, FEAC e DEXA eram submetidos a seus tratamentos específicos. No tempo zero (T0), os animais dos grupos TNBS, EAC, FEAC e DEXA foram submetidos à indução de colite com TNBS, os animais do grupo ETNL foram submetidos à enema de etanol a 50% e os animais do grupo SAL foram submetidos à enema de salina à 0,9%. No tempo 24 horas (T24), todos os animais eram avaliados clinicamente, seguida de teste Von Frey e tratamentos específicos para cada grupo. No tempo 48 horas (T48), os animais eram novamente avaliados clinicamente, seguido de tratamentos. Por fim, no tempo 72 horas (T72) os camundongos de todos os grupos eram submetidos a nova avaliação clínica, seguida de teste Von Frey e então, todos eram submetidos à eutanásia.

3.8. Avaliação Histológica

Todos os espécimes, foram fixados com solução de formalina tamponada a 10%, desidratadas em álcool 70%, imersas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos foram enviados para o Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Universidade Federal do Ceará, para a rotina de preparo de cortes histológicos na espessura de 5 micrômetros, e de coloração pela hematoxilina-eosina (H-E).

A avaliação histológica consistiu na observação de toda a espessura da parede intestinal feita em microscópio óptico (Leica DFC-295), à magnitude de 40, 100 e 400x para avaliar a morfologia da resposta inflamatória da parede intestinal, por histologista experiente que desconhecia a que grupo pertencia o animal estudado.

3.8.1. Avaliação Morfológica

As secções cólicas foram examinadas através da microscopia e graduadas de forma semiquantitativa para determinação do grau de inflamação aguda conforme escore proposto no Quadro 3.

Quadro 3 – Escores de inflamação microscópicos, segundo Appleyard e Wallace (1995).

Achado	Escores Microscópicos (APPLEYARD e WALLACE, 1995)
Perda da arquitetura da mucosa	0 - 3
Infiltração celular	0 - 3
Espessamento da camada muscular	0 - 3
Formação de abscesso em cripta	0 - 1
Ausência de células caliciformes	0 - 1

3.9. Avaliação da Atividade da MPO

A MPO é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Uma porção do intestino foi coletada e incubada em 200 μ L de tampão gelado (NaCl 0,1M, NaPO₄ 0,02M, NaEDTA 0,012M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000rpm por 15 minutos a 4°C. Realizou-se, um choque hipotônico no sedimento celular (pellet) com 1000 μ L de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000rpm por 15 minutos a 4°C, o “pellet” foi ressuspenso em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000rpm por 15min a 4°C. Após centrifugação, 50 μ L do sobrenadante do homogenato do intestino foi distribuído em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 μ L de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6mM) e 100 μ L de H₂O₂ (0,5mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5min a 37°C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M. Realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1x10⁵ neutrófilos/ poço/ 50 μ L). Determinou-se a absorbância em leitor de placas no comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos como n^o. de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO et al., 2006).

3.10. Ensaio para dosagem de MDA

Os níveis de MDA na mucosa intestinal foram determinados pelo método de Mihara o qual se baseia na determinação do precursor de MDA pelo teste do tiobarbitúrico. As amostras do tecido intestinal foram homogeneizadas em 100mg por 1mL de KCl 0,15M (homogenato 10%). Uma alíquota de 250 μ L do homogenato foi transferida para um tubo de ensaio e adicionados 1,5mL de H₃PO₄ 1% e 500 μ L de ácido tiobarbitúrico 0,6% (TBA). Essa mistura foi fervida em banho-maria por 45min e, em seguida, resfriada em água gelada, adicionados 2mL de n-butanol, agitada em vortex por 1min e centrifugado a 1200rpm/15min. Utilizou-se a fase butanólica para leitura em espectrofotômetro a 520 e 535nm. A diferença obtida

entre as duas leituras foi utilizada para calcular o MDA, baseada no coeficiente de extinção molar de 13700M/cm. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido a partir de uma curva-padrão (MIHARA e UCHIYAMA, 1978).

3.11. Dosagem de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no tecido intestinal

Os animais tiveram amostras de intestino retirados 72 horas após a indução da colite para dosagem de citocinas e estocadas em freezer -70°C até o momento do ensaio. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito por Safieh-Garabedian e colaboradores (1995). A detecção das concentrações de TNF- α , IL-1 e IL-10 foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA), protocolo descrito a seguir: Incubação com 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticorpo anti-TNF- α , anti IL-1 β e anti IL-10 (anticorpo de captura) diluído em tampão fosfato (pH 8.2) – 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ (placa de 96 poços) por 16-24h a 4°C ; lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v; bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ por 2h à temperatura ambiente; lavagem da placa (3x); incubação com a curva padrão de TNF- α ou IL-1 β ou IL-10 diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ por 16-24h à 4°C); lavagem da placa (3x); incubação com anticorpo biotilado (anticorpo de detecção) diluído 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1 h à temperatura ambiente; lavagem da placa (3x); incubação com avidina-peroxidase diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ por 15 min à temperatura ambiente; lavagem da placa (3x); incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$, cobrir a placa e deixar no escuro por 5-20 min à temperatura ambiente; a reação é interrompida com 150 $\mu\text{l}/\text{poço}$ de H_2SO_4 1M; leitura em leitor de ELISA a 490nm. Os resultados são expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$ como a curva padrão (CUNHA et al., 1993).

3.12. Imunoistoquímica para expressão de iNOS

As secções dos tecidos foram montadas em lâminas especiais para imunoistoquímica. O ensaio de imunoistoquímica foi realizado na seguinte sequência: desparafinização e hidratação dos cortes, seguida da ativação antigênica

(98°C por 15 min) no microondas, inibição da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 10 min. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpos primários *rabbit* policlonal (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) para iNOS. O controle negativo não recebeu anticorpo primário. No dia seguinte, foi realizada a incubação com anticorpo secundário biotilado universal (1:1000) (LSAB-DAKO) durante 30 min, e incubação com complexo strepto-avidina-peroxidase (LSAB-DAKO) durante 30 min. A coloração foi realizada através de adição do diaminobenzidina-peróxido (DAB-H₂O₂), e realizada a contra-coloração com hematoxilina de Meyer. Seguida da desidratação e montagem das lâminas (HSU e RAINE, 1981).

3.13. Análise Estatística

Os dados paramétricos foram expressos como Média ± Erro Padrão da Média (E.P.M.) e foram analisados através do teste de análise de variância ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo teste de Tukey ou teste T. Os dados não paramétricos (escores de diarreia, macroscópicos, histológicos e imunoistoquímicos para iNOS) foram expressos na forma de mediana (mínimo - máximo) e sua análise foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A significância estatística foi aceita quando $P < 0,05$. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 6.01, assinalando com um asterisco (*) os valores significantes quando comparados ao grupo salina e uma cerquilha (#) quando comparados ao grupo TNBS.

4. RESULTADOS

4.1. Curva de variação ponderal

Os animais foram pesados diariamente para determinar a variação da massa corpórea. Não houve variação com significância estatística ($p>0,05$) da massa corpórea entre os grupos estudados no período de três dias de observação (Figura 8).

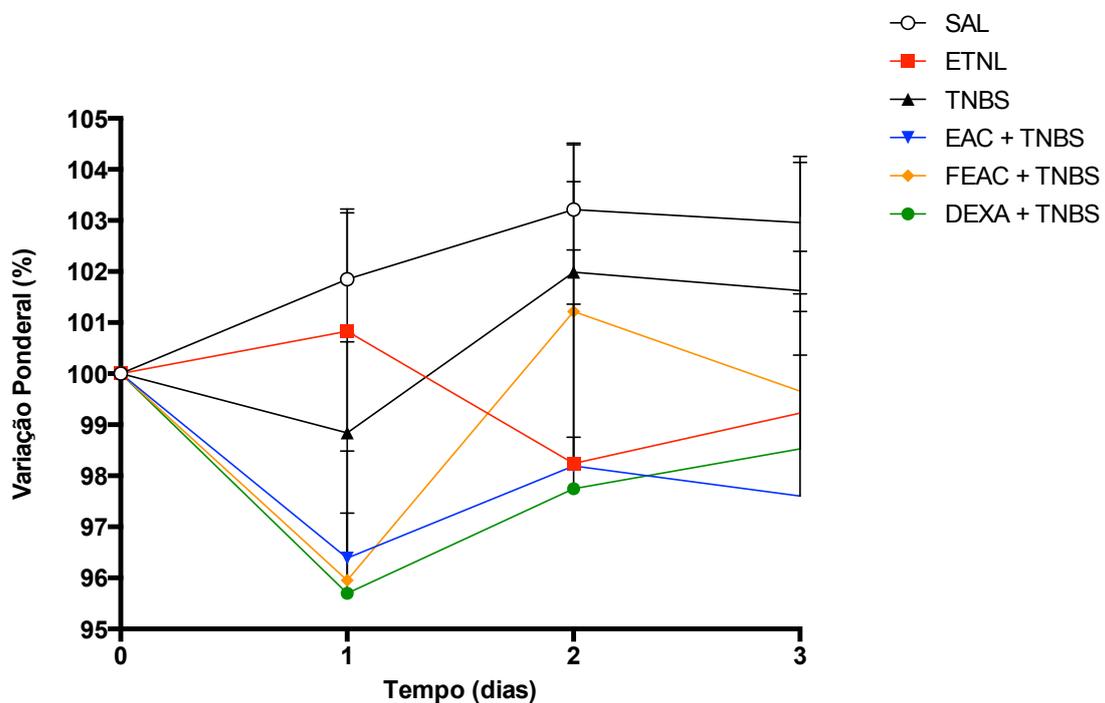


Figura 8 – Avaliação da Massa Corpórea. Os animais com colite induzida (TNBS em etanol a 50%, 2mg/80 μ L, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral, por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto bilateral, por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80 μ L, por enema) e Etanol 50% (ETNL) (80 μ L, por enema). Os animais foram pesados diariamente para determinar a variação da massa corpórea. Não houve diferença com significância estatística ($p>0,05$) entre os grupos em relação a variação ponderal (2-way ANOVA/Tukey).

4.2. Escores de diarreia

Os animais foram avaliados diariamente para determinar e classificar a consistência das fezes, segundo critérios de Kurita e colaboradores (2000) Não houve significância estatística ($p>0,05$) na variação da consistência das fezes entre os grupos estudados no período de três dias de observação (Tabela 1).

Tabela 1 – Escores de diarreia conforme Kurita e colaboradores (2000). Os animais com colite induzida (TNBS em etanol a 50%, 2mg/80 μ L, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral, por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto bilateral, por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80 μ L, por enema) e Etanol 50% (ETNL) (80 μ L, por enema). Diariamente a consistência das fezes foi avaliada para determinação do escore, conforme Kurita e colaboradores (2000), e não houve diferença com significância estatística ($p>0,05$) entre os grupos. Os dados estão expressos como medianas (min-máx) * $p<0.05$ vs salina # $p<0,05$ vs TNBS (Kruskal-Wallis/Teste de Dunn)

GRUPOS	Diarreia (0-3)			
	DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3
SAL (N=8)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)
ETNL (N=7)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-1)
TNBS (N=9)	0 (0-0)	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)	0 (0-1)
TNBS + EAC (N=6)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
TNBS + FEAC (N=9)	0 (0-0)	0 (0-1)	1 (0-3)	0 (0-0)
TNBS + DEXA (N=8)	0 (0-0)	0 (0-1)	0,5 (0-3)	0 (0-3)

4.3. Efeito nociceptivo abdominal

Os animais submetidos à indução de colite por TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema), não apresentaram alteração da hipernocicepção avaliada pelo delta (Δ) do limiar nociceptivo quando comparados aos animais do grupo salina ao longo de três dias ($p>0,05$). Os animais do grupo falsa eletroacupuntura (FEAC) (100Hz, 1mA, em não-acuponto bilateral, por 20min, 3d) apresentaram aumento expressivo da intensidade da hipernocicepção avaliada pelo delta (Δ) do limiar nociceptivo quando comparados aos animais dos grupos salina ($p<0,05$) e TNBS ($p<0,05$), em todos os tempos avaliados (Figura 9).

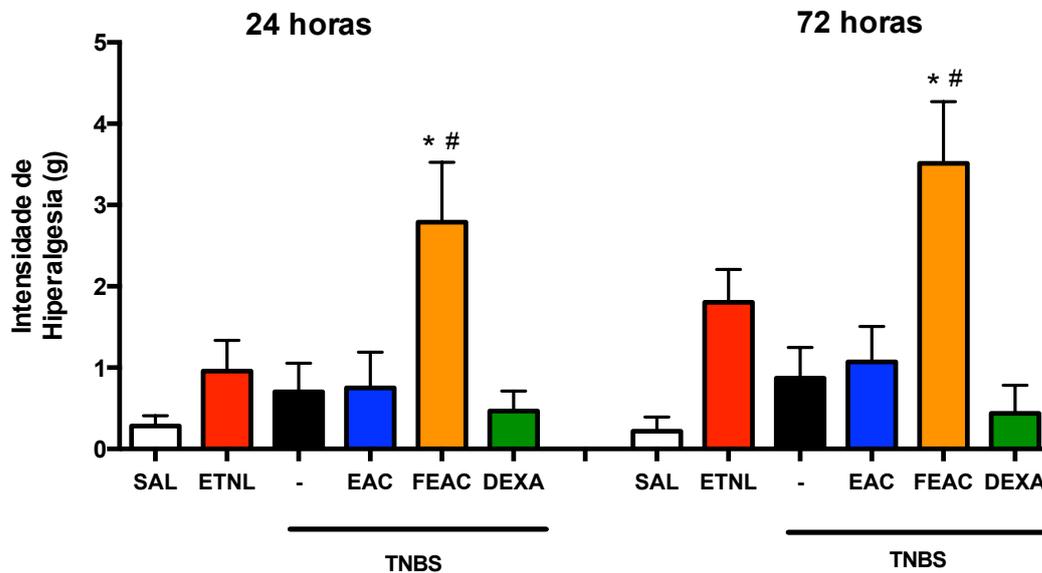


Figura 9 – Avaliação do limiar de nocicepção abdominal. Após a indução da colite com TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema) ou etanol (ETNL) ou administração de salina (SAL) por enema, a atividade antinociceptiva das colites foi avaliada após 24 e 72 horas, aplicada por meio de um analgesímetro digital. Os animais do grupo TNBS e ETNL não apresentaram aumento da intensidade da hipernocicepção em relação ao grupo salina. Os animais tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz, 1mA, acuponto ST-36 bilateral, por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas, por três dias, não apresentaram aumento da intensidade da hipernocicepção em relação ao grupo salina ($p>0,05$). Os animais do grupo falsa eletroacupuntura (FEAC) (100Hz, 1mA, não-acuponto bilateral, por 20min) apresentaram aumento com significância estatística da intensidade da hipernocicepção em relação ao grupo salina, nos tempos 24 e 72 horas ($p<0,05$). As barras representam a média \pm E.P.M., força expressa em gramas (g). * $p<0,05$ vs salina # $p<0,05$ vs TNBS (ANOVA/Tukey)

4.4. Peso intestinal úmido

Observou-se aumento com significância estatística do peso úmido dos cólons 72 horas após a indução de colite com TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema) quando comparado ao grupo salina ($p<0.05$). Houve prevenção desse aumento nos animais tratados, uma hora antes da indução da colite, 24 e 48 horas após a indução da colite, com EAC (100Hz, 1mA, nos acupontos ST-36 bilateral, por 3d) e DEXA (1mg/Kg, SC, 3d) quando comparados ao grupo TNBS ($p<0.05$). Os animais tratados, uma hora antes da indução da colite, 24 e 48 horas após a indução da colite, com FEAC (100Hz, 1mA, não-acupontos bilateral, por 3d) apresentaram aumento significativo peso úmido dos cólons dos animais, após 72 horas, quando comparado ao grupo salina ($p<0.05$) (Figura 10).

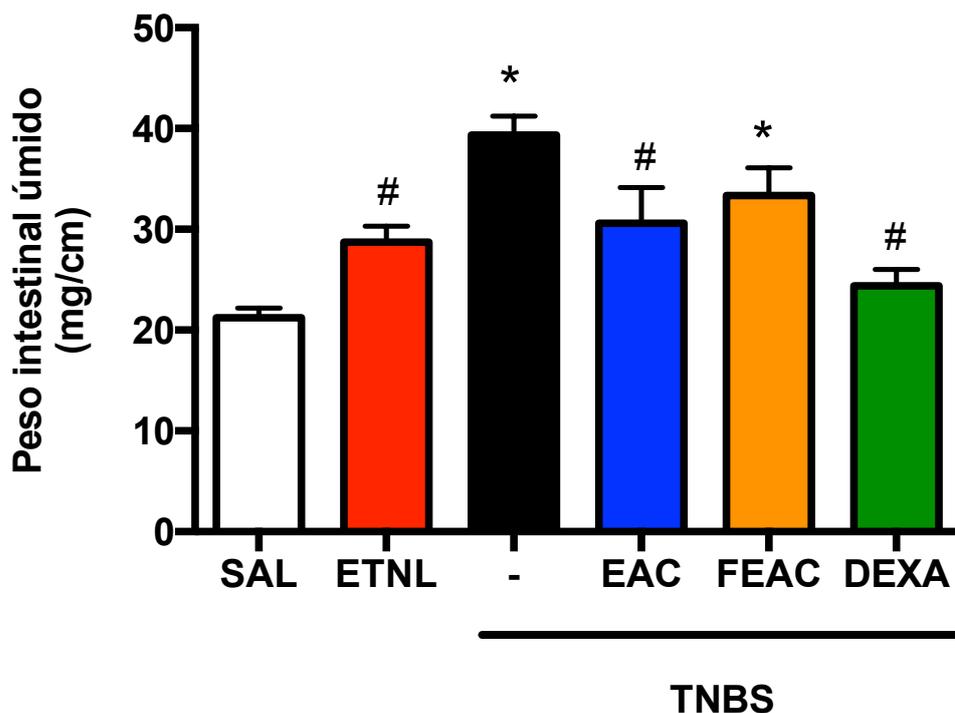


Figura 10 – Avaliação do peso intestinal úmido no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida com TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral, por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto bilateral por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC), a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80µL, por enema) e Etanol 50% (ETNL) (80µL, por enema). Ao fim do terceiro dia, os animais foram submetidos a eutanásia e tiveram 5 cm da porção distal do seu intestino grosso coletado para aferição do peso úmido. Camundongos tratados com TNBS tiveram elevação significativa do peso úmido intestinal quando comparado ao grupo salina, efeito este, prevenido pelo tratamento com EAC e DEXA e não pelo tratamento com FEAC. Os dados estão demonstrados em peso intestinal líquido/cm de extensão intestinal (mg/cm), como valores da mediana ± EPM (Erro padrão da Média). * $p<0.05$ vs salina # $p<0,05$ vs TNBS (ANOVA/Tukey).

4.5. Escores macroscópicos de Morris nos segmentos cólicos

O escore macroscópico de atividade inflamatória segundo Morris e colaboradores (1989) foi aplicado nas amostras de intestino coletadas após três dias de indução da colite. Os animais submetidos à colite por TNBS e ETNL apresentaram aumento na pontuação desses escores em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). Os animais com colite induzida tratados com EAC e FEAC não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS. Os animais com colite induzida tratados com dexametasona não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo salina (Tabela 2) (Figura 11).

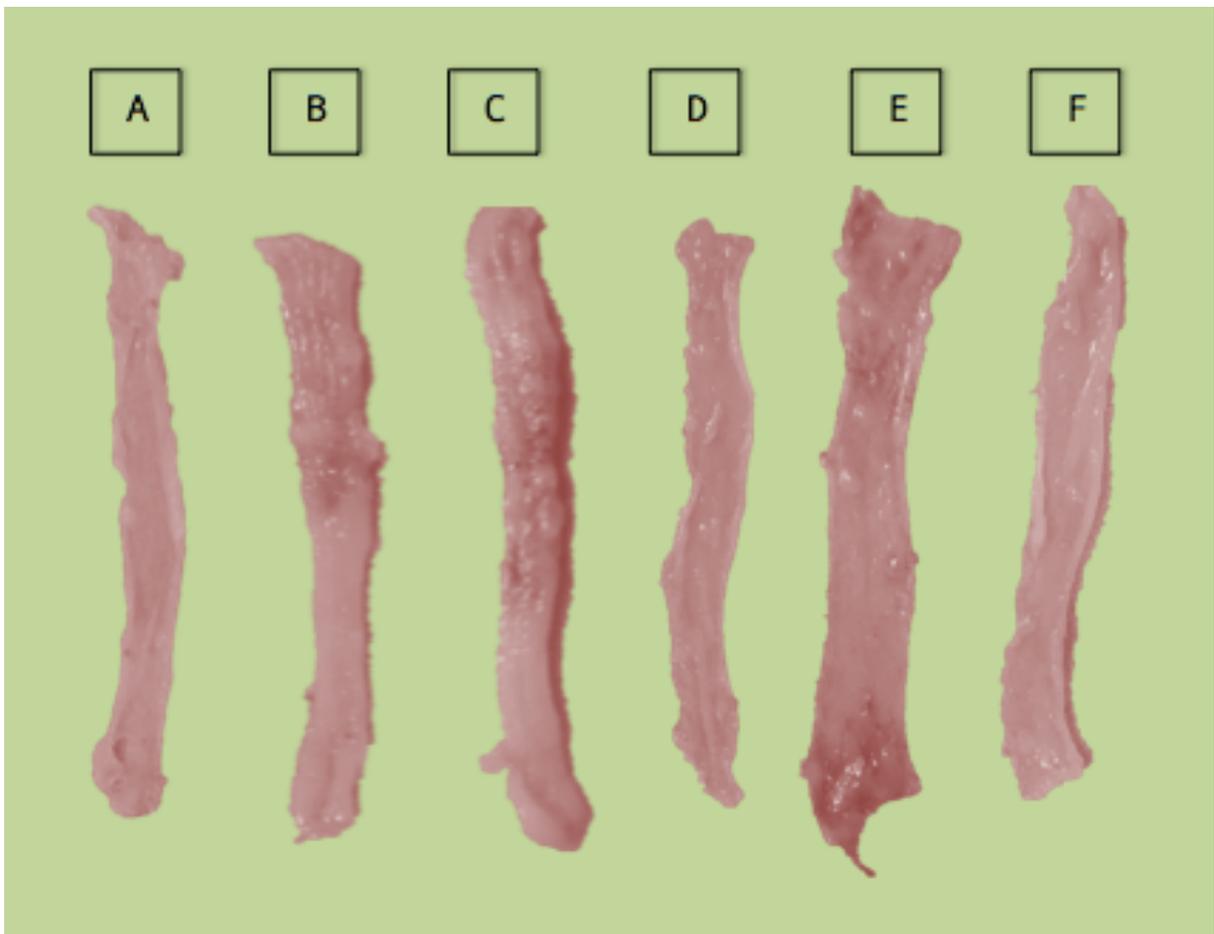


Figura 11 – Achados macroscópicos. (A) Grupo SAL: mucosa de aspecto normal; (B) Grupo ETNL: hiperemia com espessamento < 1cm; (C) Grupo TNBS: ulceração com inflamação; (D) Grupo EAC: mucosa de aspecto normal (E) Grupo FEAC: hiperemia com espessamento < 1cm; (F) Grupo DEXA: mucosa de aspecto normal.

Tabela 2 – Escores macroscópicos conforme Morris e colaboradores (1989), no intestino, no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida com TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral, por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto bilateral por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC), a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80µL, por enema) e Etanol 50% (ETNL) (80µL, por enema). Ao fim do terceiro dia, os animais foram submetidos a eutanásia e tiveram 5 cm da porção distal do seu intestino grosso coletado para avaliação macroscópica, conforme Morris e colaboradores (1989). Os animais submetidos a indução de colites (TNBS e ETNL) apresentaram diferença estatística com elevação dos escores de Morris em comparação ao grupo salina (* $p < 0,05$). Os animais com colite induzida tratados com EAC e FEAC não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS. Os animais com colite induzida tratados com dexametasona não apresentaram diferença estatística nos escores de Morris em relação ao grupo salina. Os dados estão expressos como medianas (mín-máx) * $p < 0.05$ vs salina; (Kruskal-Wallis/Teste de Dunn)

GRUPOS	Parâmetros Macroscópicos
	MORRIS e colaboradores (1989)
SAL (N=8)	0 (0-0)
ETNL (N=7)	1 (0-1) *
TNBS (N=9)	1 (1-1) *
TNBS + EAC (N=6)	1 (0-3) *
TNBS + FEAC (N=9)	1 (0-1) *
TNBS + DEXA (N=8)	1 (0-1)

4.6. Escores histopatológicos de Appleyard e Wallace (1995)

O escore microscópico de atividade inflamatória segundo Appleyard e Wallace (1995) foi aplicado às lâminas de intestino coradas pelo método H-E. Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (2mg/80 μ L, por enema) apresentaram aumento na pontuação desses escores em relação ao grupo salina ($p<0,05$), essa significância deveu-se principalmente à perda de arquitetura mucosa e ao infiltrado celular (camadas mais superficiais) (Figura 12C) (Figura 12A). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com eletroacupuntura (100Hz, 1mA, nos acupontos ST-36 bilateralmente), 20min, ou dexametasona (1mg/Kg) por três dias, apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS ($p<0,05$), em valores semelhantes ao grupo salina.(Figura 12D) (Figura 12F) (Figura 12C). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com falsa eletroacupuntura (FEAC)(100Hz, 1mA, não-acupontos bilateralmente), 20min, por três dias, apresentaram diferença estatística em relação ao grupo salina ($p<0,05$) (Figura 12F). Essa diferença ocorreu por perda de arquitetura mucosa, infiltrado celular (camadas mais superficiais) e ausência de células caliciformes ($p<0,05$) (Tabela 3).

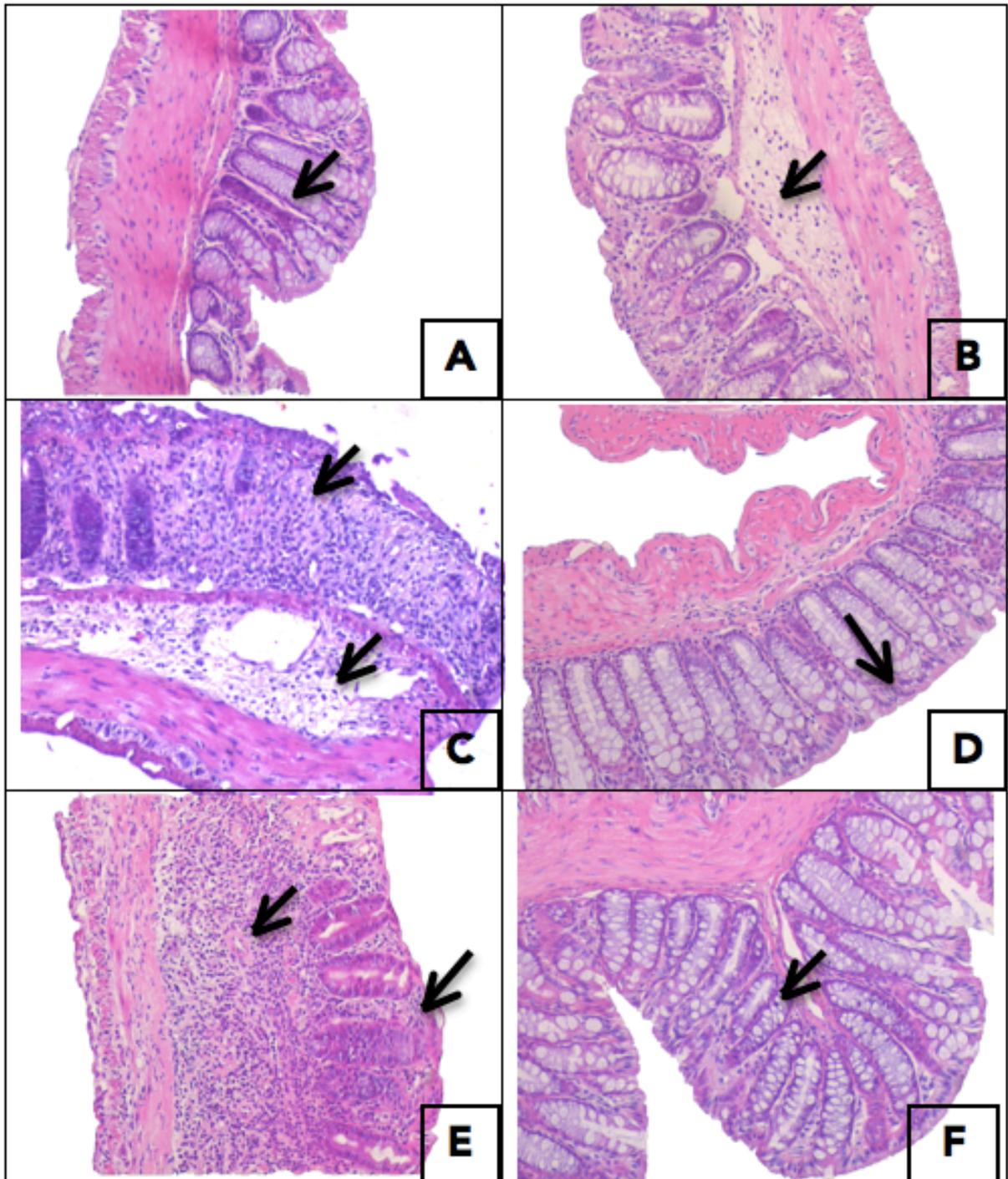


Figura 12 – Achados microscópicos. (A) Grupo SAL: fotomicrografia do intestino com aspecto normal; (B) Grupo ETNL: fotomicrografia do intestino com edema (+) e infiltrado de neutrófilos na submucosa (seta); (C) Grupo TNBS: fotomicrografia do intestino com edema (++) e infiltrado de neutrófilos na submucosa (++) e criptite intensa, ausência de células caliciformes, com abscesso (setas); (D) Grupo EAC: fotomicrografia do intestino com aspecto normal (E) Grupo FEAC: fotomicrografia do intestino com edema (+++) e infiltrado de neutrófilos na submucosa (+++) e criptite intensa, com abscesso (setas); (F) Grupo DEXA: fotomicrografia do intestino com aspecto normal.

Tabela 3 – Escores microscópicos conforme Appleyard e Wallace (1995), no intestino, no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto bilateral por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80µL, por enema) ou Etanol 50% (ETNL) (80µL, por enema). Na avaliação das lâminas coradas pelo método H-E, foi realizado análise microscópica, conforme Appleyard e Wallace (1995). Os animais dos grupos EAC ou DEXA, apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS. Os animais do grupo FEAC apresentaram diferença estatística em relação ao grupo SAL. Essa diferença ocorreu por perda de arquitetura mucosa, infiltrado celular (camadas mais superficiais) e ausência de células caliciformes. Os dados estão expressos como medianas (mín-máx) *p<0.05 vs salina; #p<0,05 vs TNBS (Kruskal-Wallis/Teste de Dunn)

GRUPOS	Parâmetros histológicos					Escore Final (0-11)
	Perda de epitélio (0-3)	Infiltração celular (0-3)	Espessamento da muscular (0-3)	Abscesso de cripta (0-1)	Células Caliciformes (0-1)	
SAL (N=8)	0,5 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,5 (0-3)
ETNL (N=7)	0,5 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,5 (0-4)
TNBS (N=9)	2 (1-3) *	2 (1-3) *	0 (0-3)	0 (0-1)	0 (0-1)	4 (2-11) *
TNBS + EAC (N=6)	0,5 (0-2) #	0 (0-2) #	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0,5 (0-5) #
TNBS + FEAC (N=9)	2 (1-3) *	2 (1-3) *	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-1) *	6 (2-9) *
TNBS + DEXA (N=8)	1 (0-2)	0,5 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1,5 (0-4) #

4.7. Infiltração neutrofílica no cólon – Atividade da MPO

A avaliação da infiltração neutrofílica foi mensurada a partir da atividade da MPO. Após três dias de indução da colite, amostras dos cólons foram submetidas a ensaio para determinação da atividade de MPO. Os animais submetidos à colite por TNBS apresentaram aumento na infiltração de neutrófilos no cólon em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). Os animais submetidos a enema de etanol a 50% (80 μ L) não apresentaram diferença estatística na infiltração de neutrófilos no cólon em relação ao grupo salina. Os animais com colite induzida por TNBS tratados com eletroacupuntura (100Hz, 1mA, nos acupontos ST-36 bilateral), 20min, por três dias, não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS tratados com falsa eletroacupuntura (FEAC) (100Hz, 1mA, não-acupontos bilateral), 20min, ou dexametasona (1mg/Kg) por três dias, apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS ($p < 0,05$) na infiltração de neutrófilos (Figura 13).

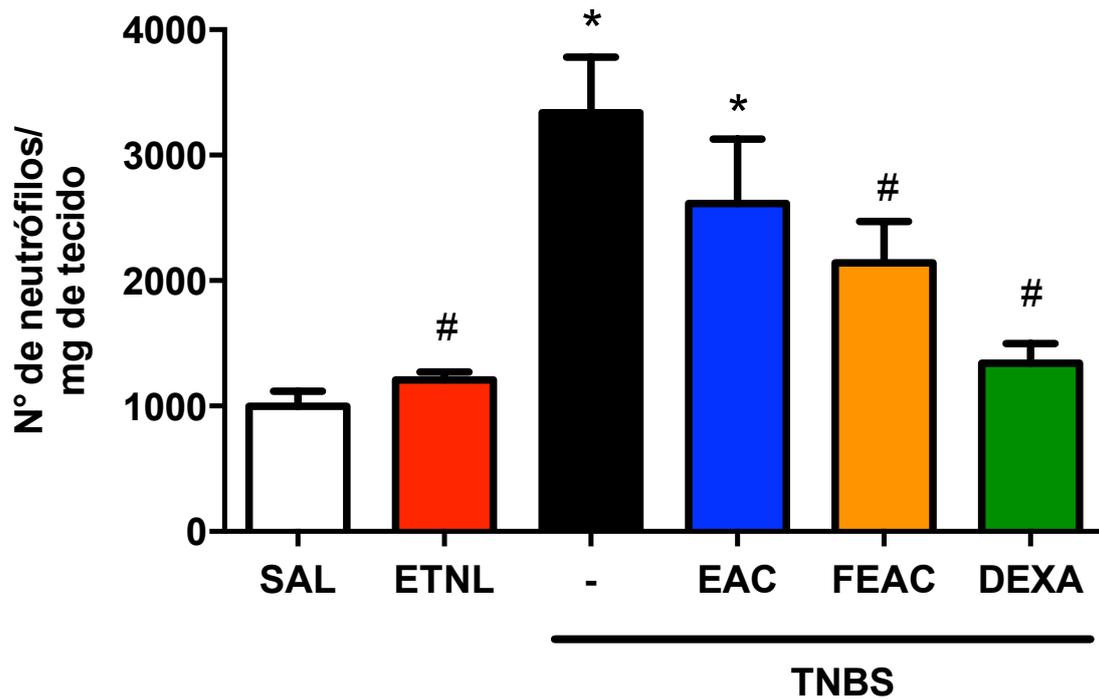


Figura 13 – Atividade da MPO no intestino no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80µL, por enema) e Etanol 50% (ETNL) (80µL, por enema). Amostras dos cólons foram submetidas a ensaio para determinação da atividade de MPO. Os animais do grupo TNBS apresentaram aumento na infiltração de neutrófilos para o cólon em relação ao grupo SAL ($*p<0,05$). Os animais ETNL não apresentaram diferença estatística na infiltração de neutrófilos para o cólon em relação ao grupo SAL. Os animais do grupo EAC (100Hz, 1mA, nos acupontos ST-36 bilateral), 20min, por três dias, não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS. Os animais dos grupos FEAC e DEXA, apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS. Os dados estão expressos como médias \pm E.P.M. $*p<0.05$ vs salina; $\#p<0,05$ vs TNBS (ANOVA/Tukey)

4.8. Dosagem de citocina - IL-1 β

A concentração de IL-1 β foi mensurada, após três dias de indução da colite, nas amostras dos cólons. Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (2mg/80 μ L, por enema) apresentaram aumento na concentração de IL-1 β no cólon em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com falsa eletroacupuntura (FEAC) (frequência de 100Hz, intensidade de 1mA, não-acupontos bilateralmente), 20min, ou dexametasona (1mg/Kg) por três dias, apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS ($p < 0,05$). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com eletroacupuntura (EAC) (100Hz, 1mA, acuponto ST-36 bilateralmente), 20min, não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo TNBS (Figura 14).

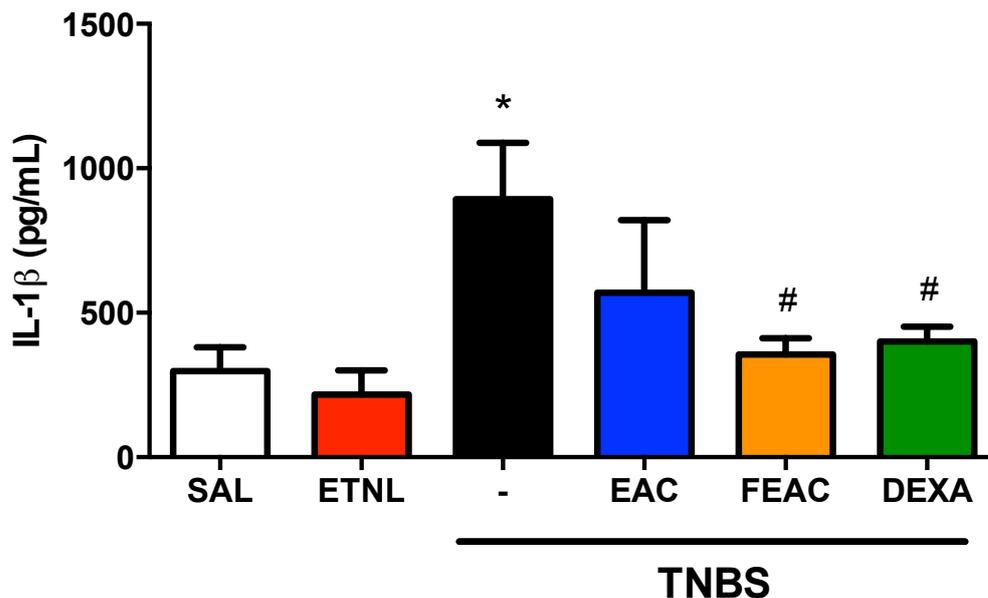


Figura 14 – Avaliação da concentração de IL-1 β no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol 50% (2mg/80 μ L, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80 μ L, por enema) e Etanol 50% (ETNL) (80 μ L, por enema). A concentração de IL-1 β foi avaliada em amostras do tecido intestinal ao final do terceiro dia de indução da colite e comparadas com os controles. Camundongos tratados com TNBS aumentam significativamente a concentração de IL-1 β , comparado ao grupo salina, esse efeito foi inibido pela ação de FEAC e DEXA. Os dados estão expressos como médias \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs salina; # $p < 0,05$ vs TNBS (ANOVA/Tukey).

4.9. Dosagem de citocina - TNF- α

A concentração de TNF- α foi mensurada, após três dias de indução da colite, nas amostras dos cólons. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados (Figura 15).

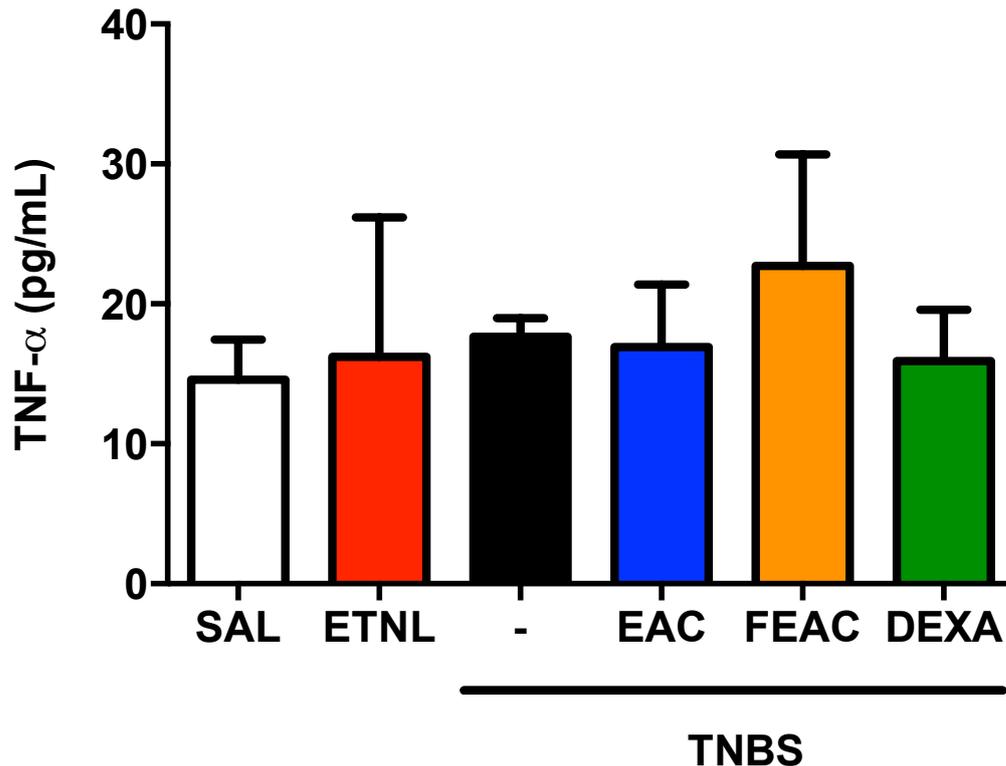


Figura 15 – Avaliação da concentração de TNF- α no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS a 50% (2mg/80 μ L, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80 μ L, por enema) ou Etanol 50% (ETNL) (80 μ L, por enema). A concentração de TNF- α foi avaliada em amostras do tecido intestinal ao final do terceiro dia de indução da colite e comparadas com os controles, não havendo diferença estatística entre os grupos pelo método avaliado. Os dados estão expressos como médias \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs salina; # $p < 0,05$ vs TNBS (ANOVA/ Tukey).

4.10. Dosagem de citocina - IL-10

A concentração de IL-10 foi mensurada, após três dias de indução da colite, nas amostras dos cólons. Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema) apresentaram supressão na concentração de IL-10 no cólon em relação ao grupo salina ($p<0,05$), esse efeito foi prevenido pelo tratamento com EAC($p<0,05$). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com falsa eletroacupuntura (FEAC)(100Hz, 1mA, não-acupontos bilateral), 20min, ou dexametasona (1mg/Kg) por três dias, apresentaram diferença estatística em relação ao grupo salina ($p<0,05$) (Figura 16).

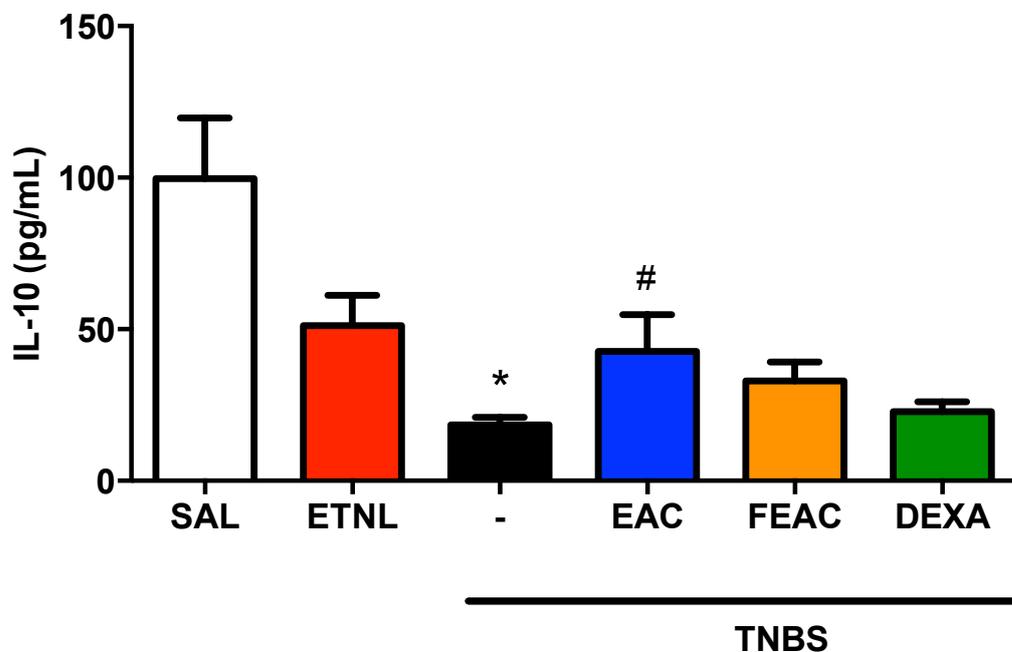


Figura 16 – Avaliação da concentração de IL-10 no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS a 50% (2mg/80µL, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80µL, por enema) e Etanol 50% (ETNL) (80µL, por enema). A concentração de IL-10 foi suprimida, no terceiro dia, em camundongos do grupo TNBS ($^{\#}p<0,05$), esse efeito foi prevenido pelo tratamento com EAC e não, pelos tratamentos com FEAC e DEXA. Os dados estão expressos como médias \pm E.P.M. $^*p<0.05$ vs salina; $^{\#}p<0,05$ vs TNBS (ANOVA/Teste de Tukey).

4.11. Concentração de MDA no intestino

Após três dias de indução da colite, a concentração de MDA foi mensurada nas amostras dos intestinos. Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema) apresentaram aumento na concentração de MDA no cólon em relação ao grupo salina ($p<0,05$). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com eletroacupuntura (100Hz, 1mA, nos acupontos ST-36 bilateral), 20min, ou falsa eletroacupuntura (FEAC)(100Hz, 1mA, não-acupontos bilateral), 20min, ou dexametasona (1mg/Kg) por três dias, apresentaram diferença com significância estatística em relação ao grupo TNBS ($p<0,05$) (Figura 18).

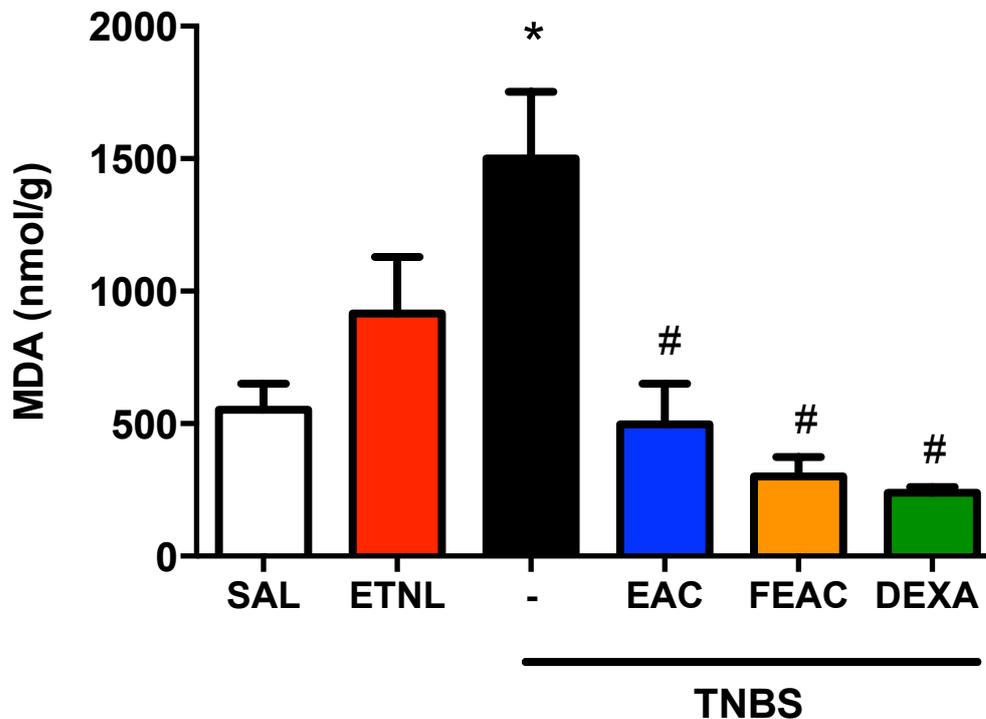


Figura 18 – Concentração de MDA no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral por 20min) ou Falsa eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (80µL, por enema) e Etanol 50% (ETNL) (80µL, por enema). A concentração de MDA foi avaliada em amostras do tecido intestinal ao final do terceiro dia e comparadas com os controles. Camundongos tratados com TNBS aumentam significativamente a concentração de MDA, comparado ao grupo salina, esse efeito foi inibido pela ação de EAC, FEAC e DEXA. Os dados estão expressos como médias \pm E.P.M. * $p<0,05$ vs salina; # $p<0,05$ vs TNBS (ANOVA/ Tukey).

4.12. Expressão imunohistoquímicas para iNOS

Os animais submetidos à colite por TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema) apresentaram aumento na expressão de iNOS no epitélio e no conjuntivo em relação ao grupo salina ($p < 0,05$). Os animais submetidos a enema de ETNL a 50% (80µL, por enema) apresentaram aumento na expressão de iNOS no conjuntivo em relação ao grupo salina ($p < 0,05$) (Tabela 5) (Figura 19). Os animais com colite induzida por TNBS tratados com eletroacupuntura (100Hz, 1mA, nos acupontos ST-36 bilateral) ou falsa-eletroacupuntura (100Hz, 1mA, nos não-acupontos bilateral) por 20min, apresentaram diferença com significância estatística em relação ao grupo TNBS ($p < 0,05$), com menor expressão de iNOS no conjuntivo. Os animais com colite induzida por TNBS tratados com dexametasona (1mg/Kg,SC), por três dias, apresentaram diferença com significância estatística em relação ao grupo TNBS ($p < 0,05$), com menor expressão de iNOS no epitélio e no conjuntivo.

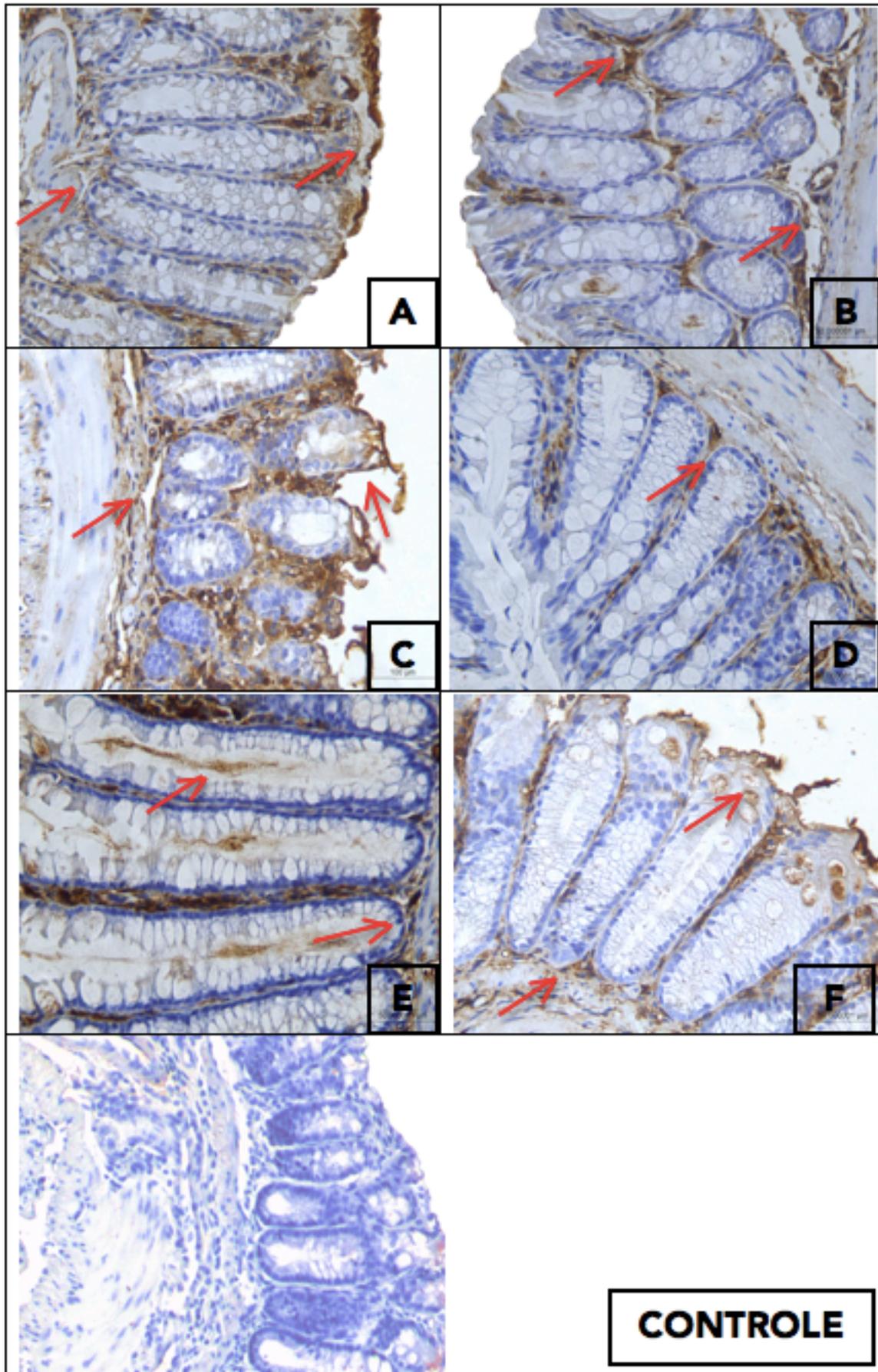


Figura 19 – Achados da expressão de iNOS. (A) Grupo SAL: fotomicrografia do intestino com expressão de iNOS no epitélio (+) e no conjuntivo (+) (setas); (B) Grupo ETNL: fotomicrografia do intestino com expressão de iNOS no epitélio (+) e no conjuntivo (+) (setas); (C) Grupo TNBS: fotomicrografia do intestino com expressão de iNOS no epitélio (++) e no conjuntivo (++) (setas); (D) Grupo EAC: fotomicrografia do intestino com expressão de iNOS no conjuntivo (+) (setas); (E) Grupo FEAC: fotomicrografia do intestino com expressão de iNOS no epitélio (++) e no conjuntivo (++) (setas); (F) Grupo DEXA: fotomicrografia do intestino com expressão de iNOS no epitélio (+) e no conjuntivo (+) (setas).

Tabela 4 – imunoexpressão de iNOS no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS. Os animais com colite induzida por TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema), foram tratados com Eletroacupuntura (EAC) (100Hz,1mA, acuponto ST-36 bilateral por 20min) ou Falsa-eletroacupuntura (FEAC) (100Hz,1mA, não-acuponto por 20min) ou Dexametasona (DEXA) (1mg/kg, SC) a cada 24 horas por três dias. Os controles utilizados foram salina (SAL) (0,8µL, por enema) e Etanol 50% (ETNL) (0,8µL, por enema). Ao fim do terceiro dia, fragmentos intestinais foram processados para quantificar a expressão de iNOS. Os animais do grupo TNBS apresentaram maior expressão de iNOS no epitélio e no conjuntivo. Essa expressão foi prevenida no conjuntivo pelo tratamento com EAC e FEAC no conjuntivo. E foi também prevenida no epitélio e no conjuntivo pelo tratamento com DEXA. Os dados estão expressos como medianas (mín-máx)*p<0.05 vs salina; #p<0,05 vs TNBS (Kruskal-Wallis/Teste de Dunn)

GRUPOS	Escores Imunoistoquímicos iNOS	
	epitélio (0-3)	conjuntivo (0-3)
SAL (N=8)	0 (0-0)	1 (1-1)
ETNL (N=7)	0 (0-1) #	2 (2-3) *
TNBS (N=9)	3 (1-3) *	3 (3-3) *
TNBS + EAC (N=6)	2 (1-2) *	1 (1-2) #
TNBS + FEAC (N=9)	1 (1-1)	1 (1-1) #
TNBS + DEXA (N=8)	0 (0-0) #	1 (1-1) #

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a aplicação de eletroacupuntura nos acupontos ST-36 bilateralmente, na frequência de 100Hz, intensidade de 1mA, por 20 minutos, durante três dias, atenua a colite induzida por TNBS em etanol a 50% (2mg/80µL, por enema) em camundongos Swiss, conforme mostrado através de exames clínicos e histopatológicos. Isto confirma os efeitos antiinflamatórios deste método de acupuntura em outros modelos de doenças inflamatórias. Estes efeitos foram acompanhados por uma modulação de ambos os parâmetros, estresse oxidativo e inflamatório.

A fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais idiopática envolve múltiplos fatores: infecciosos, ambientais e respostas imunológicas anormais. Há fortes evidências que, nessa situação, a resposta inflamatória na mucosa intestinal se caracteriza por aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias, com incapacidade de controlar a ativação imune. Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias na mucosa levam à produção excessiva de enzimas de degradação da matriz pelos fibroblastos do intestino, à perda da integridade mucosa e à formação de úlceras (TIAN et al., 2003).

O estudo dos mecanismos da DII gerou mais de 50 modelos animais diferentes de inflamação intestinal aguda ou crônica. Esses modelos de colite experimental servem como ferramentas para a avaliação pré-clínica da eficácia de novos tratamentos. Eles exibem algumas, mas não todas, as características fenotípicas e fisiopatológicas da DII humana. No presente estudo, foi utilizado o modelo de colite induzida pela administração de solução de TNBS em etanol a 50% em camundongos da espécie Swiss. Pois de acordo com Morris e colaboradores (1989), indução de colite feita a partir da administração cólica de TNBS em solução de etanol é um modelo de fácil indução, baixo custo, razoavelmente reprodutível e pode ser aplicado em ratos, coelhos e camundongos. Nesse modelo, o etanol quebra a integridade epitelial permitindo a penetração do TNBS, com consequente desenvolvimento da colite com características semelhante às DII (MORRIS et al., 1989).

Segundo Elson e colaboradores (1995), esse modelo apresenta imprecisão na determinação de volume e concentração necessários para induzir a colite em diferentes espécies (ELSON et al., 1995). O estabelecimento da

concentração de TNBS foi baseado em um estudo piloto utilizando diferentes concentrações: 2mg/80µL, 3mg/120µL e 4mg/160µL de TNBS em etanol a 50%. Os grupos controles receberam apenas salina (0,9%) ou veículo (etanol a 50%) nos mesmos volumes. Decorridas 72 horas após a administração do TNBS, os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical e os cólons foram retirados e abertos longitudinalmente. A avaliação das lesões da mucosa intestinal foi realizada depois do órgão ser estendido, para avaliação macroscópica em escores de Morris (MORRIS et al., 1989). Em seguida, o fragmento intestinal foi congelado em freezer a - 70°C para ensaio de dosagem de MPO. A dose de 2mg/80µL de TNBS apresentou elevação de MPO e dos escores macroscópicos, em relação ao grupo salina, com significância estatística. Nesse mesmo volume, o grupo ETNL não apresentou diferença estatística em relação ao grupo salina. Isso significa que o grupo TNBS induziu colite e o grupo ETNL não induziu colite importante nesse volume. Nas demais concentrações/volume (3mg/120µL e 4mg/160µL) as colites por TNBS e ETNL foram semelhantes e portanto o grupo ETNL não seria um bom controle.

Após a validação do modelo de DII e a padronização da dose de TNBS necessária para indução da colite, em 2mg em 80µL, através de enema, foi realizado o estudo para investigar as reações dessa colite sob os aspectos hipernociceptivos e inflamatórios agudos, assim como a resposta desses eventos ao tratamento com eletroacupuntura (100Hz, 1mA, ST-36 bilateralmente, 20min, três dias). Os controles para o modelo utilizados foram salina e etanol a 50% aplicados por meio de enema, e os controles do grupo EAC foram dexametasona (1mg/Kg, SC, três dias) e falsa eletroacupuntura (100Hz, 1mA, não-acuponto bilateralmente, 20min, três dias).

Nesse estudo não foi observada variação ponderal entre os grupos provavelmente devido ao fato de que o estudo se deu em três dias. Nesse período não houve desenvolvimento de diarreia.

Os resultados desse estudo, mostraram que os animais do grupo TNBS tiveram um aumento significativo do peso úmido de seus cólons quando comparados com os animais que receberam somente salina, por enema, três dias após a indução das colites experimentais. O peso úmido do tecido do cólon inflamado é considerado um indicador macroscópico da gravidade e a da extensão da resposta inflamatória. Ele reflete a magnitude do edema e infiltrado celular no tecido estudado (BUSSEROLLES et al., 2005).

Os grupos ETNL e TNBS tiveram também aumento significativo dos escores macroscópicos de lesão e aumento da atividade de MPO no colón após o terceiro dia da indução das colites. De acordo com Carlson e colaboradores (2002), a MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, tem sido usada como um índice quantitativo de inflamação em vários tecidos, inclusive no intestino. Ela reflete o influxo de PMN no local estudado (CARLSON et al., 2002). A partir desses resultados, foi possível confirmar a eficácia do método em estudo na indução da colite experimental. Dados estes foram confirmados pelos estudos de Appleyard e Wallace que demonstraram aumento na atividade de MPO no cólon e elevação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão no intestino de ratos com colite induzida por TNBS (APPLEYARD e WALLACE, 1995).

A escolha do tratamento com acupuntura se baseou no fato de que ela ativa os sistemas de defesa, a proliferação e o influxo celular e regula as células envolvidas na liberação de mediadores: substância P, bradicinina, calcitonina, peptídeo intestinal vasoativo, neurocinina A, neuropeptídeo Y, β -endorfina, citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , óxido nítrico, eicosanoides e outras substâncias vasoativas (ZIJLSTRA et al., 2003).

Ensaio clínico sobre a eficácia da acupuntura sofrem grandes limitações metodológicas. Entre os problemas relacionados à pesquisa utilizando acupuntura incluem-se a falta de informações suficientemente válidas que determinem a dose adequada de estímulo em uma condição específica e a escolha dos pontos de estímulo para que o método apresente o efeito desejado (MEDEIROS e SAAD, 2009).

Nesse estudo, optou-se por utilizar agulhamento em não-acuponto (falsa eletroacupuntura), mantendo a eletroacupuntura na frequência, potência e tempo pré-determinados para o grupo EAC. Segundo Medeiros e Saad, em intervenções como acupuntura, é difícil o estabelecimento de controles ideais. Eles analisaram “grupos controles” de 47 ensaios randomizados de acupuntura para dor e outras condições e observaram que em dois ensaios usaram agulhamento superficial de acupontos, quatro usaram acupontos não indicados para a condição estudada, 27 usaram agulhamento em não-acupontos, cinco usaram agulhas placebo e nove usaram pseudo-intervenções, como acupuntura laser com aparelho desligado (MEDEIROS e SAAD, 2009).

A forma de aplicação da acupuntura escolhida foi a eletroacupuntura. A eletroacupuntura consiste na transmissão de energia elétrica sob diferentes intensidades e frequências aos pontos de acupuntura. Com este método, o nível de analgesia pode ser aumentado e o efeito da acupuntura prolongado pelo aumento da estimulação do ponto tratado (FARIA, 2008). Segundo Niu e colaboradores (2011), na eletroacupuntura o estímulo aplicado aos acupontos deixa de ser uma manipulação empírica e passa a ser uma corrente elétrica quantificável (NIU et al., 2011).

O presente estudo experimental objetivou avaliar a eficácia da acupuntura eliminando o efeito placebo, já que animais não são susceptíveis a este efeito, e que experimentos realizados em laboratório são mais fielmente mensuráveis e replicáveis conforme já descrito na literatura (VALATAS, VAKAS e KOLIOS, 2013).

O método de transposição de localização de acupontos na superfície da pele de animais correspondentes aos acupontos anatômicos humano adotado nesse estudo foi proposto por Yin e colaboradores (2008). Esse método foi considerado reprodutível e de fácil aplicação (YIN et al., 2008).

Nesse experimento, foi utilizado o acuponto ST-36 que apresentou modulação de vários aspectos do processo inflamatório descritos a seguir. De acordo com Maeda e colaboradores (2013), o acuponto ST-36 (Zusanli) é o ponto de acupuntura mais usado com a finalidade imunoreguladora e é usado para tratar doenças auto-imunes, principalmente afecções do trato gastrointestinal. Porém seus mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos (MAEDA et al., 2013).

O uso de anestesia geral inalatória com Isoflurano foi justificada pelas observações de Tabosa e colaboradores (2002). De acordo com seus estudos, em contraste com os seres humanos, os animais submetidos a acupuntura devem ser anestesiados pois, seria praticamente impossível manter a agulha posicionada, por um período de tempo prolongado, no animal de laboratório, sem que ele a removesse (TABOSA et al., 2002).

Wang, Yang e Xu (2012) observaram inibição da hipersensibilidade cólica induzida por Zymosan em ratos tratados com eletroacupuntura, e que a eficácia dessa analgesia é cumulativa ao número de aplicações de acupuntura, quando comparada com uma única aplicação. O sistema nervoso central e periférico parecem estar envolvidos neste processo. Estes resultados apontam que a EAC é terapêutica na dor abdominal ou desconforto visceral (WANG, YANG e XU, 2012).

Baseado nesses achados, foi proposto estudar a hiperalgesia na colite induzida por TNBS e sua resposta aos tratamentos com EAC, FEAC e DEXA. A avaliação da dor visceral foi realizada através da utilização de um analgesímetro digital Von Frey com aplicação do *probe* na parede abdominal dos camundongos. A escolha da frequência de 100Hz se baseou nos achados de Almeida e Duarte que demonstraram que a estimulação do acuponto ST-36 produziu um significativo aumento no limiar nociceptivo quando utilizada a frequência de 100Hz, em estudo de dor orofacial em ratos (ALMEIDA e DUARTE, 2008).

No presente estudo, animais do grupo TNBS, inesperadamente, não apresentaram hiperalgesia em 24 e 72 horas após a indução da colite em relação aos grupos controles. Portanto, o tratamento com EAC não pôde ser avaliado. Por outro lado, a aplicação da FEAC gerou uma hiperalgesia nas aferições de 24 e 72 horas, sugerindo que a eletroacupuntura aplicada à distância não é inócua e pode ser prejudicial quando aplicada de forma errada. A explicação para este evento foi justificada pelos estudos de Tabosa e colaboradores (2002). Eles observaram que a estimulação por si, independentemente de ser aplicada a um acuponto errado, região vizinha ou não-acuponto, pode induzir efeitos fisiológicos. Porém, as ações provocadas pelo estímulo correto nos acupontos verdadeiros são maiores e mais significativas, diferente daquelas obtidas a partir do estímulo dos não-acupontos. Essa diferença parece estar relacionada a uma maior concentração de vasos capilares, receptores sensitivos e mastócitos abaixo da pele dos acupontos verdadeiros (TABOSA et al., 2002).

Kim e colaboradores (2007) estudaram a nocicepção visceral cólica em ratos submetidos a indução de colite por TNBS, utilizando o método Von Frey. Ele se baseou no princípio da “dor referida”. A dor referida é bem definida e localizada, muitas vezes com hiperalgesia ou hipersensibilidade cutânea caracterizada por um aumento da sensibilidade a estímulos mecânicos locais. Portanto, como a dor da colite e da distensão colorretal frequentemente são referidas em regiões somáticas, o *probe* foi localizado no acuponto GV01 (próximo ao ânus) e não na parede abdominal. A aferição foi 24 horas após a indução da colite. Em situações de dor aguda do cólon ou colite crônica, a dor é referida nos dermatômos lombossacrais: região lateral da perna, base da cauda e região perianal. Através do seu estudo foi demonstrado que a pele no acuponto GV01 apresentou-se dolorosa, com hipersensibilidade marcante aos estímulos mecânicos viscerais em estados de

inflamação cólica (KIM et al., 2006). Esses achados não foram confirmados no presente experimento ao posicionar o *probe* diretamente na parede abdominal.

Efeitos protetores da eletroacupuntura já foram demonstrados em alguns modelos experimentais de processos inflamatórios incluindo-se artrite, asma, pancreatite aguda e peritonite (ZIJLSTRA et al., 2003). Há, entretanto, uma escassez de dados relativos aos mecanismos através dos quais ocorrem os efeitos atenuadores das lesões inflamatórias no curso do tratamento com eletroacupuntura.

Segundo Camacho-Barquero e colaboradores (2007) a colite induzida por TNBS é um modelo experimental caracterizado por apresentar grandes quantidades de citocinas Th1 (TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-1) porém, baixos níveis de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) (CAMACHO-BARQUERO et al., 2007). Nesse contexto, no presente estudo, nos animais tratados com eletroacupuntura observou-se elevação de IL-10, uma citocina de perfil Th2 que está associada a uma resposta antiinflamatória, o que poderia, pelo menos em parte, explicar a proteção ocorrida. Por outro lado, os níveis aumentados de IL-1 β observados nos animais com colite induzida por TNBS, não sofreram modificações com o tratamento com eletroacupuntura quando esta foi aplicada no acuponto ST-36.

Achados semelhantes foram descritos por Yan e colaboradores (2009). Eles demonstraram que a aplicação de eletroacupuntura no acuponto ST-37 apresentou efeitos terapêuticos na colite por TNBS, pois modulou a lesão tecidual, diminuindo a concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1) e aumentando a concentração de citocinas antiinflamatórias (IL-4) (YAN et al., 2009). De forma surpreendente, neste experimento observou-se uma diminuição de IL-1 β e uma não alteração de IL-10 nos animais tratados com FEAC. Este achado reforça que a eletroacupuntura quando aplicada em um não-acuponto exerce ação imunológica mesmo que de forma imprevisível.

A IL-10 tem um papel central na regulação da homeostase da mucosa intestinal e prevenção da doença da DII. Polimorfismos no locus da IL-10 conferem risco para a doença de Crohn e colite ulcerativa, e os ratos e os seres humanos deficientes em IL-10 ou receptores de IL-10 (IL-10R) apresentam inflamação intestinal grave e pronunciada secreção de citocinas proinflamatórias (Glocker et al., 2009). A IL-10 tem papel imunomodulador nas funções do macrófago intestinal. No entanto, IL-10 não é simplesmente um inibidor da função de macrófagos. Ela, sozinha ou combinada com lipopolissacarídeos, mantém o controle da gravidade da

resposta imunológica e inflamatória no intestino, promove a remodelação da matriz extracelular e a função de células B (MANTOVANI e MARCHESI, 2014). Provavelmente a inibição do processo inflamatório observada a partir dos escores inflamatórios microscópicos de Appleyard e Wallace, nesse estudo, foi intermediada pela ação da IL-10.

Já é bem conhecido que as citocinas antiinflamatórias são sintetizadas principalmente por linfócitos *Treg* e tem ação imunoregulatória sobre linfócitos e macrófagos. Elas inibem a liberação de mediadores inflamatórios, exercendo uma forte ação antiinflamatória e modulando a expressão e a atividade da iNOS, e conseqüentemente, regulando a produção de NO (YAN et al., 2009).

Coerentemente na presente investigação, a eletroacupuntura diminuiu significativamente a expressão de iNOS no tecido conjuntivo da parede cólica. A esta altura questionou-se se o óxido nítrico gerando intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio não seria um dos mediadores finais da lesão inflamatória observada na colite.

Sabe-se que a indução de iNOS no epitélio do cólon humano inflamado está associada com a formação de peroxinitrito e a nitração celular. Ademais, é conhecido que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio desempenham um papel chave na DII. Estas espécies são agentes citotóxicos, que induzem a lipoperoxidação e estresse oxidativo celular por proteínas de ligação, lipídeos e ácidos nucléicos, que causam morte, dano e, eventualmente, disfunção celular (ZINGARELLI, SZABÓ e SALZMAN, 1999).

Zingarelli, Szabó e Salzman (1999) propuseram que o aumento da produção de NO pela enzima iNOS parece ser responsável pelo surgimento de lesões no tecido cólico em vários modelos experimentais de colite. Em pacientes com RCUI, onde a atividade da iNOS é elevada, há aumento da concentração de nitrito detectada em lavado retal e em amostras de biópsia (ZINGARELLI, SZABÓ e SALZMAN, 1999).

No presente estudo, foi ainda evidenciado um expressivo aumento nos níveis intestinais de malonaldeído naqueles animais com colite induzida por TNBS. De forma também coerente, este produto da peroxidação lipídica teve seus níveis significativamente diminuídos por ocasião do tratamento com a eletroacupuntura aplicada no acuponto ST-36 assim como no falso acuponto.

Já que o tratamento com eletroacupuntura elevou IL-10, suprimiu a expressão de iNOS e diminuiu a concentração de MDA nos segmentos intestinais, torna-se plausível sugerir que a ação antiinflamatória da eletroacupuntura se deva, em parte, a propriedades antioxidantes.

Há evidência suficiente do valor da acupuntura para expandir seu uso e encorajar mais estudos de sua fisiologia e potencial clínico.

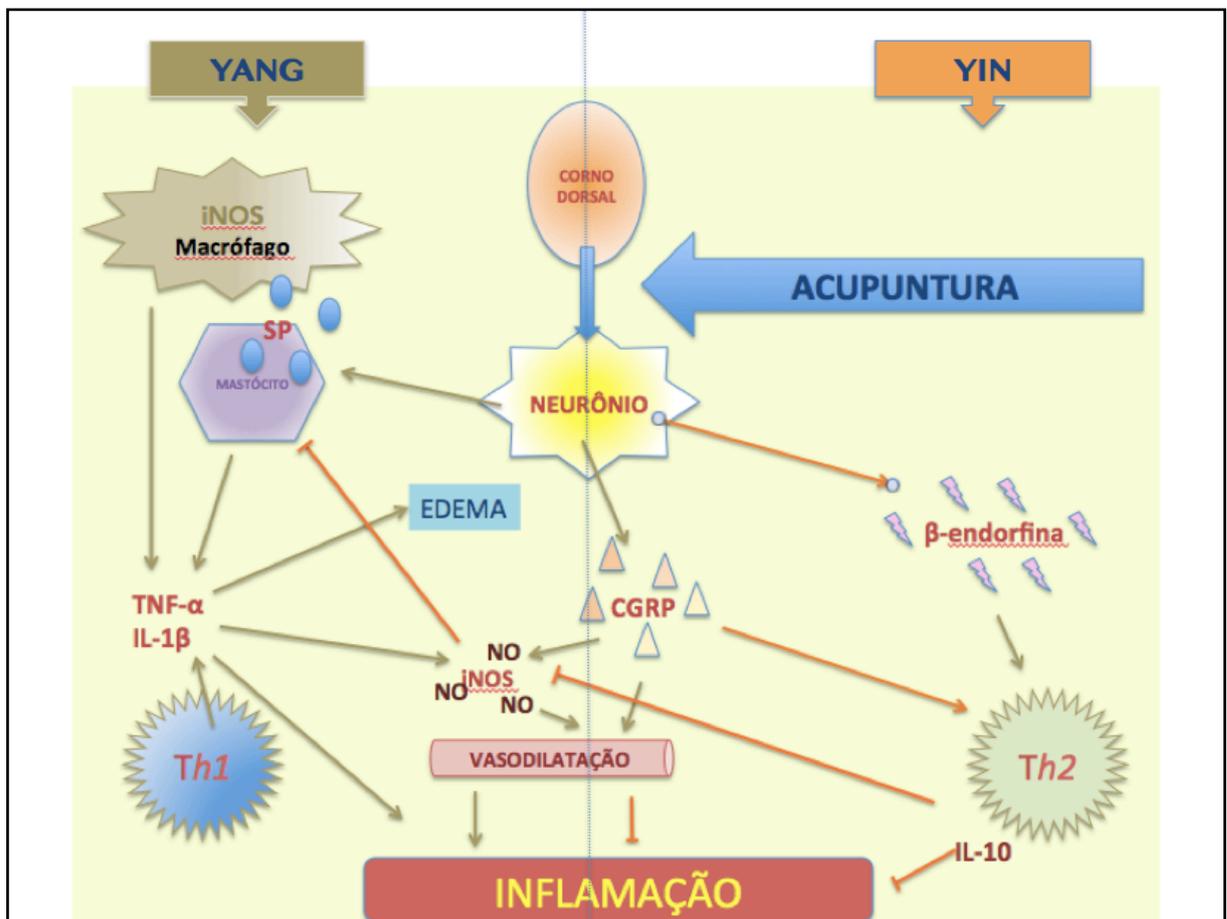


Figura 19 – Modelo hipotético das ações imunológicas da acupuntura.

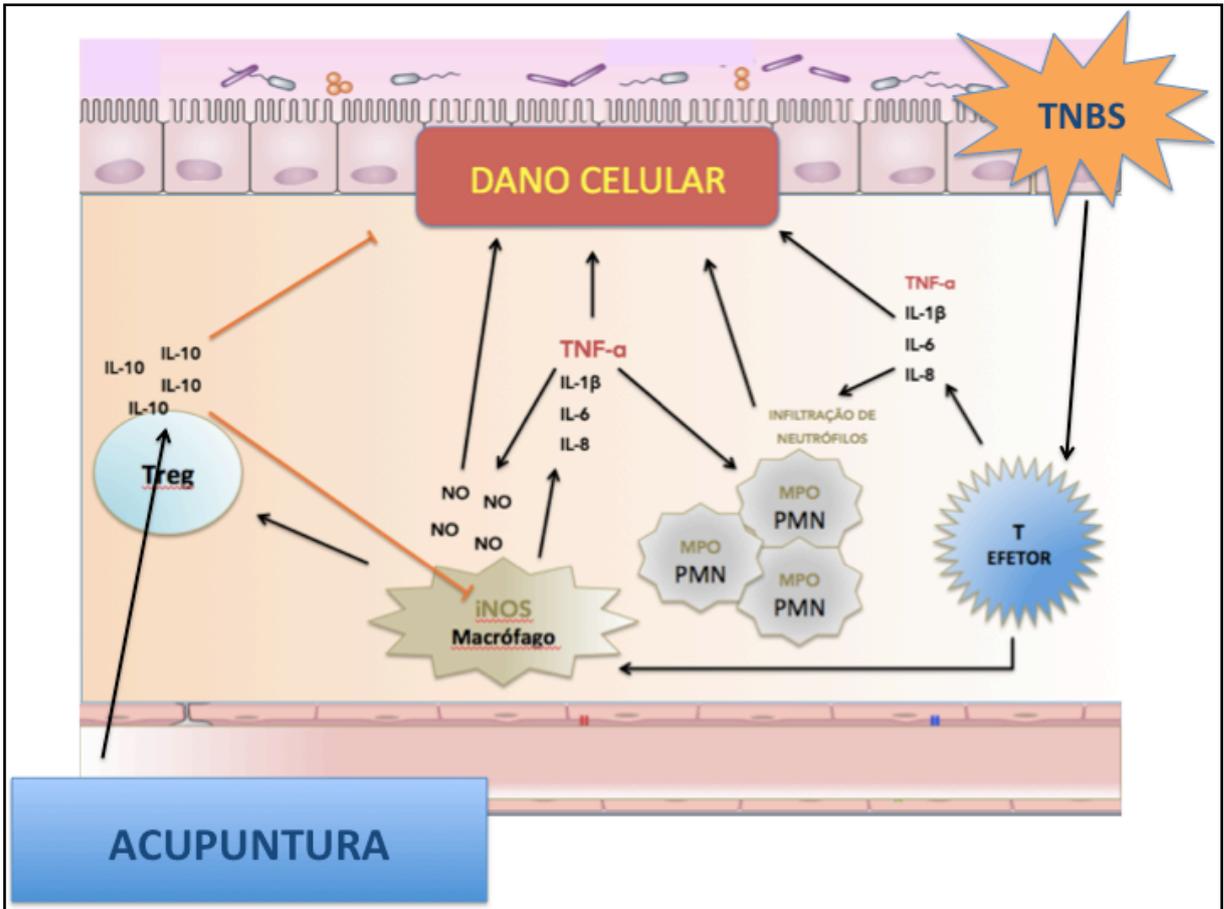


Figura 20 – Modelo hipotético do mecanismo antiinflamatório da eletroacupuntura na colite.

6. CONCLUSÃO

A eletroacupuntura, a 100Hz no acuponto ST-36, apresenta ação protetora contra o desenvolvimento da colite experimental induzida por TNBS em etanol a 50%, em camundongos, possivelmente por ativar IL-10 e reduzir a expressão de iNOS.

A ação da eletroacupuntura sobre a nocicepção não pôde ser demonstrada nesse modelo experimental.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. T.; DUARTE, I. D. G. Nitric oxide/cGMP pathway mediates orofacial antinociception induced by electroacupuncture at the St36 acupoint. **Brain research**, v. 1188, p. 54–60, doi:10.1016/j.brainres.2007.10.060, 2008.
- ALVES-FILHO JC; DE FREITAS A; RUSSO M; CUNHA FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Critical care medicine**, v. 34, n. 2, p. 461–70, 2006.
- APPLEYARD, C. B.; WALLACE, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **The American journal of physiology**, v. 269, n. 1 Pt 1, p. G119–25, 1995.
- BINGHAM, C. O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 65, p. 3–9, 2002.
- BUSSEROLLES, J; PAYÁ, M; D'AURIA, MV; GOMEZ-PALOMA, L; ALCARAZ, MJ; Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide M. **Biochemical pharmacology**, v. 69, n. 10, p. 1433–40, doi:10.1016/j.bcp.2005.01.020, 2005.
- CAMACHO-BARQUERO, L; VILLEGAS, I; SÁNCHEZ-CALVO, JM; TALERO, E; SÁNCHEZ-FIDALGO, S; MOTILVA, V; ALARCÓN, DE; LA LASTRA, C. Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. **International immunopharmacology**, v. 7, n. 3, p. 333–42, doi:10.1016/j.intimp.2006.11.006, 2007.
- CAMELO, A; BARLOW, JL; DRYNAN, LF; NEILL, DR; BALLANTYNE, SJ; WONG, SH; PANNELL, R; GAO, W; WRIGLEY, K; SPREngle, J; MCKENZIE, AN. Blocking IL-25 signalling protects against gut inflammation in a type-2 model of colitis by suppressing nuocyte and NKT derived IL-13. **Journal of gastroenterology**, v. 47, n. 11, p. 1198–211, doi:10.1007/s00535-012-0591-2, 2012.
- CARLSON, M; RAAB, Y; SEVÉUS, L; XU, S; HÄLLGREN, R; VENGE P. Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis. **Gut**, v. 50, n. 4, p. 501–6, 2002.
- COOKE, E. M.; FILIPE, M. I.; DAWSON, I. M. The production of colonic auto-antibodies in rabbits by immunisation with Escherichia coli. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 96, n. 1, p. 125–30, doi:10.1002/path.1700960113, 1968.
- COSTA, J; MAGRO, F; CALDEIRA, D; ALARCÃO, J; SOUSA, R; VAZ-CARNEIRO, A. Infliximab reduces hospitalizations and surgery interventions in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **Inflammatory**

bowel diseases, v. 19, n. 10, p. 2098–110, doi:10.1097/MIB.0b013e31829936c2, 2013.

CROHN, B. B.; GINZBURG, L.; OPPENHEIMER, G. D. Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 251, n. 1, p. 73–9, 1984.

CUNHA, FQ; BOUKILI, MA, DA; MOTTA, JI; VARGAFTIG, BB; FERREIRA, SH. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **European journal of pharmacology**, v. 238, n. 1, p. 47–52, 1993.

EKBOM, A; HELMICK, C; ZACK, M; ADAMI, HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. **Gastroenterology**, v. 100, n. 2, p. 350–8, 1991.

ELSON, CO; SARTOR, RB; TENNYSON, GS; RIDDELL, RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, p. 1344–1367, 1995.

ENGEL, M. A ; NEURATH, M. F. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. **Journal of gastroenterology**, v. 45, n. 6, p. 571–83, doi:10.1007/s00535-010-0219-3, 2010.

FARIA, A. B. ACUPUNTURA VETERINÁRIA : CONCEITOS E TÉCNICAS – REVISÃO. p. 83–91, 2008.

FASANMADE, AA; ADEDOKUN, OJ; FORD, J; HERNANDEZ, D; JOHANNIS, J; HU, C; DAVIS, HM; ZHOU, H. Population pharmacokinetic analysis of infliximab in patients with ulcerative colitis. **European journal of clinical pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 1211–28, doi:10.1007/s00228-009-0718-4, 2009.

FEAGAN, B. G. Oral budesonide therapy for ulcerative colitis: a topical tale. **Gastroenterology**, v. 110, n. 6, p. 2000–2, 1996.

FREEMAN, H. J; FLAK, B. Demyelination-like syndrome in Crohn's disease after infliximab therapy. **Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie**, v. 19, n. 5, p. 313–6, 2005.

GARDINER, KR; ANDERSON, NH; MCCAIGUE, MD; ERWIN, PJ; HALLIDAY, MI; ROWLANDS, BJ. Adsorbents as antiendotoxin agents in experimental colitis. **Gut**, v. 34, n. 1, p. 51–5, 1993.

GLOCKER, EO; KOTLARZ, D; BOZTUG, K; GERTZ, EM; SCHÄFFER, AA; NOYAN, F; PERRO, M; DIESTELHORST, J; ALLROTH, A; MURUGAN, D; HÄTSCHER, N; PFEIFER, D; SYKORA, KW; SAUER, M; KREIPE, H; LACHER, M; NUSTEDE, R; WOELLNER, C; BAUMANN, U; SALZER, U; KOLETZKO, S; SHAH, N; SEGAL, AW; SAUERBREY, A; BUDERUS, S; SNAPPER, SB; GRIMBACHER, B; KLEIN, C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 21, p. 2033–45, doi:10.1056/NEJMoa0907206, 2009.

HANAUER, S. B. Inflammatory Bowel Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 13, p. 841–848, doi:10.1056/NEJM199603283341307, 1996.

HANAUER, S. B; MEYERS, S. Management of Crohn's disease in adults. **The American journal of gastroenterology**, v. 92, n. 4, p. 559–66, 1997.

HESS, A. D.; FISCHER, A. C. Immune mechanisms in cyclosporine-induced syngeneic graft-versus-host disease. **Transplantation**, v. 48, n. 6, p. 895–900, 1989.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 1349–1353, doi:10.1177/29.11.6172466, 1981.

JI, J; LU, Y; LIU, H; FENG, H; ZHANG, F; WU, L; CUI, Y; WU, H. Acupuncture and moxibustion for inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2013, p. 158352, doi:10.1155/2013/158352, 2013.

YAN, J; ZHANG, H; CHEN, CT; YANG, QY; LIAO, WF; CHEN, PG. β Effects of Electroacupuncture at Shangjuxu (ST 37) on Interleukin-1 and Interleukin-4 in the Ulcerative Colitis Model Rats. v. 29, n. 1, p. 60–63, 2009.

KANG, JW; KIM, TW; LA, JH; SUNG, TS; KIM, HJ; KWON, YB; KIM, JY; YANG, IS. Electroacupuncture ameliorates experimental colitis induced by acetic acid in rat. **Journal of veterinary science**, v. 5, n. 3, p. 189–95, 2004.

KAPPELMAN, MD; RIFAS-SHIMAN, SL; KLEINMAN, K; OLLENDORF, D; BOUSVAROS, A; GRAND, RJ; FINKELSTEIN, JA. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 5, n. 12, p. 1424–9, doi:10.1016/j.cgh.2007.07.012, 2007.

KAVOUSSI, B.; ROSS, B. E. The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. **Integrative cancer therapies**, v. 6, n. 3, p. 251–7, doi:10.1177/1534735407305892, 2007.

KIM, HY; HAHM, DH; SOHN, BY; CHOI, Y; PYUN, KH; LEE, HJ; SHIM, I.. Skin on GV01 acupoint in colonic inflammatory states: tenderness and neurogenic inflammation. **The journal of physiological sciences : JPS**, v. 56, n. 4, p. 317–20, doi:10.2170/physiolsci.SC001606, 2006.

KIM, HY; HAHM, DH; CHAE, Y; AN, K; PYUN, KH; LEE, H; SHIM, I.. Acupuncture at GV01 relieves somatic pain referred by colitis in rats. **The journal of physiological sciences : JPS**, v. 57, n. 4, p. 253–8, doi:10.2170/physiolsci.SC001607, 2007.

KIRSNER, JB; ELCHLEPP, JG; GOLDGRABER, MB; ABLAZA, J; FORD, H. Production of an experimental ulcerative "colitis" in rabbits. **Archives of pathology**, v. 68, p. 392–408, 1959.

KIRSNER, J. B. Experimental “colitis” with particular reference to hypersensitivity reactions in the colon. **Gastroenterology**, v. 40, p. 307–12, 1961.

KURITA, A; KADO, S; KANEDA, N; ONOUE, M; HASHIMOTO, S; YOKOKURA, T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 211–20, doi:10.1007/s002800000151, 2000.

LAIRD, JM; MARTINEZ-CARO, L; GARCIA-NICAS, E; CERVERO F.. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. **Pain**, v. 92, n. 3, p. 335–42, 2001.

LANGMEAD, L.; RAMPTON, D. S. Review article: complementary and alternative therapies for inflammatory bowel disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 341–9, doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02761.x, 2006.

LEE, S. D.; COHEN, R. D. Endoscopy in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 31, n. 1, p. 119–32, 2002.

LIMA-JÚNIOR, RC; FREITAS, HC; WONG, DV; WANDERLEY, CW; NUNES, LG; LEITE, LL; MIRANDA, SP; SOUZA, MH; BRITO, GA; MAGALHÃES, PJ; TEIXEIRA, MM; CUNHA, FQ; RIBEIRO, RA.. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 9, p. 2335–50, doi:10.1111/bph.12584, 2014.

LOFTUS, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, n. 6, p. 1504–1517, doi:10.1053/j.gastro.2004.01.063, 2004.

MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G.; PENDER, S. L. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. **Scandinavian journal of immunology**, v. 51, n. 1, p. 2–9, 2000.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, n. 2, p. 135–50, 1978.

MAEDA, T; TANIGUCHI, M; MATSUZAKI, S; SHINGAKI, K; KANAZAWA, S; MIYATA, S. Anti-inflammatory effect of electroacupuncture in the C3H/HeJ mouse model of alopecia areata. **Acupuncture in medicine : journal of the British Medical Acupuncture Society**, v. 31, n. 1, p. 117–9, doi:10.1136/acupmed-2012-010240, 2013.

MAJEWSKA-SZCZEPANIK, M; GÓRALSKA, M; MARCIŃSKA, K; ZEMELKA-WIĄCEK, M; STRZĘPA, A; DOROŻYŃSKA, I; SZCZEPANIK, M. Epicutaneous immunization with protein antigen TNP-Ig alleviates TNBS-induced colitis in mice. **Pharmacological reports : PR**, v. 64, n. 6, p. 1497–504, 2012.

MANTOVANI, A.; MARCHESI, F. IL-10 and macrophages orchestrate gut homeostasis. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 637–9, doi:10.1016/j.immuni.2014.04.015, 2014.

MARCUS, R.; WATT, J. Carrageenan: effects in animals. **Lancet**, v. 2, n. 7677, p. 828–9, 1970.

MARSTON, A; MARCUSON, RW; CHAPMAN, M; ARTHUR, JF. Experimental study of devascularization of the colon. **Gut**, v. 10, n. 2, p. 121–30, 1969.

MAYER, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. **Journal of gastroenterology**, v. 45, n. 1, p. 9–16, doi:10.1007/s00535-009-0138-3, 2010.

MEDEIROS, R. De; SAAD, M. Acupuntura : efeitos fisiológicos além do efeito placebo Acupuncture : physiological effect beyond the placebo effect Acupuntura : efecto fisiológico más allá del efecto placebo. v. 33, n. 1, p. 69–72, 2009.

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

MORRIS, GP; BECK, PL; HERRIDGE, MS; DEPEW, WT; SZEWCZUK, MR; WALLACE, JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 795–803, 1989.

MOSS, A. C.; FARRELL, R. J. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 131, n. 5, p. 1649–51; discussion 1651, doi:10.1053/j.gastro.2006.09.039, 2006.

NIU, C; HAO, H; LU, J; LI, L; HAN, Z; TU, Y. A novel uni-acupoint electroacupuncture stimulation method for pain relief. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2011, p. 209879, doi:10.1093/ecam/nep104, 2011.

ODZE, R. Diagnostic problems and advances in inflammatory bowel disease. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 16, n. 4, p. 347–58, doi:10.1097/01.MP.0000064746.82024.D1, 2003.

OU, YW; HAN, L; DA, CD; HUANG, YL; CHENG, JS. Influence of acupuncture upon expressing levels of basic fibroblast growth factor in rat brain following focal cerebral ischemia--evaluated by time-resolved fluorescence immunoassay. **Neurological research**, v. 23, n. 1, p. 47–50, doi:10.1179/016164101101198271, 2001.

PAUL, G.; KHARE, V. e GASCHÉ, C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. **European journal of clinical investigation**, v. 42, n. 1, p. 95–109, doi:10.1111/j.1365-2362.2011.02552.x, 2012.

PERLMANN, P; HAMMARSTRÖM, S; LAGERCRANTZ, R; GUSTAFSSON, BE. Antigen from colon of germfree rats and antibodies in human ulcerative colitis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 124, n. 1, p. 377–94, 1965.

PORRAS, M; MARTÍN, MT; TORRES, R; VERGARA, P. Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD. p. 423–430, doi:10.1152/ajpgi.00323.2005., 2006.

PUTHOOR, P. R.; ZOETEN, E. F. DE. Pediatric Ulcerative Colitis: The Therapeutic Road to Infliximab. **Biologics in therapy**, v. 3, p. 1–14, doi:10.1007/s13554-012-0006-1, 2013.

PYNE, D.; SHENKER, N. G. Demystifying acupuncture. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 47, n. 8, p. 1132–6, doi:10.1093/rheumatology/ken161, 2008.

SAFIEH-GARABEDIAN, B; POOLE, S; ALLCHORNE, A; WINTER, J; WOOLF, CJ.. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, v. 115, n. 7, p. 1265–75, 1995.

SARTOR, R. B. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 475–507, 1995.

SATOH, H; SATO, F; TAKAMI, K; SZABO S. New Ulcerative and Colitis Model Induced by Sulfhydryl Drugs Blockers on the Colitis in Rats the Effects of Antiinflammatory. **Jpn J Pharmacol**, v. 73, p. 299–309, 1997.

SCHROEDER, K. W.; TREMAINE, W. J.; ILSTRUP, D. M. Coated Oral 5-Aminosalicylic Acid Therapy for Mildly to Moderately Active Ulcerative Colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 317, n. 26, p. 1625–1629, doi:10.1056/NEJM198712243172603, 1987.

SHI, Y; QI, L; WANG, J; XU, MS; ZHANG, D; WU, LY; WU, HG. Moxibustion activates mast cell degranulation at the ST25 in rats with colitis. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 17, n. 32, p. 3733–8, doi:10.3748/wjg.v17.i32.3733, 2011.

SINGLETON, JW; SUMMERS, RW; KERN, F JR; BECKTEL, JM; BEST, WR; HANSEN, RN; WINSHIP, DH. A trial of sulfasalazine as adjunctive therapy in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 77, n. 4 Pt 2, p. 887–97, 1979.

SONNENBERG, A. Geographic variation in the incidence of and mortality from inflammatory bowel disease. **Diseases of the colon and rectum**, v. 29, n. 12, p. 854–61, 1986.

STEVCEVA, L; PAVLI, P; HUSBAND, AJ; DOE, WF. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. **BMC clinical pathology**, v. 1, n. 1, p. 3, 2001.

SZALAI, Z; SZÁSZ, A; NAGY, I; PUSKÁS, LG; KUPAI, K; KIRÁLY, A; BERKÓ, AM; PÓSA, A; STRIFLER, G; BARÁTH NAGY, LI; SZABÓ, R; PÁVÓ, I; MURLASITS, Z; GYÖNGYÖSI, M; VARGA, C. Anti-Inflammatory Effect of Recreational Exercise in

TNBS-Induced Colitis in Rats: Role of NOS/HO/MPO System. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 925981, doi:10.1155/2014/925981, 2014.

SZKARADKIEWICZ, A; MARCINIAK, R; CHUDZICKA-STRUGAŁA, I; WASILEWSKA, A; DREWS, M; MAJEWSKI, P; KARPIŃSKI, T; ZWOŹDZIAK, B. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 57, n. 4, p. 291–4, doi:10.1007/s00005-009-0031-z, 2009.

TABOSA, A; YAMAMURA, Y; FORNO, ER; MELLO, LE.. Effect of the acupoints ST-36 (Zusanli) and SP-6 (Sanyinjiao) on intestinal myoelectric activity of Wistar rats. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 35, n. 6, p. 731–9, 2002.

TANAKA, M.; RIDDELL, R. H. The pathological diagnosis and differential diagnosis of Crohn's disease. **Hepato-gastroenterology**, v. 37, n. 1, p. 18–31, 1990.

TIAN, L; HUANG, YX; TIAN, M; GAO, W; CHANG, Q. Downregulation of electroacupuncture at ST36 on TNF-alpha in rats with ulcerative colitis. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 9, n. 5, p. 1028–33, 2003.

VALATAS, V.; VAKAS, M.; KOLIOS, G. The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 305, n. 11, p. G763–85, doi:10.1152/ajpgi.00004.2013, 2013.

WANG, S.-J.; YANG, H.-Y.; XU, G.-S. Acupuncture Alleviates Colorectal Hypersensitivity and Correlates with the Regulatory Mechanism of TrpV1 and p-ERK. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2012, p. 483123, doi:10.1155/2012/483123, 2012.

WHITE, A. Western medical acupuncture: a definition. **Acupuncture in medicine : journal of the British Medical Acupuncture Society**, v. 27, n. 1, p. 33–5, doi:10.1136/aim.2008.000372, 2009.

WHITE, P. F.; JOHNSTON, R. R.; EGER, E. I. Determination of anesthetic requirement in rats. **Anesthesiology**, v. 40, n. 1, p. 52–7, 1974.

WOLTERS, FL; RUSSEL, MG; SIJBRANDIJ, J; SCHOUTEN, LJ; ODES, S; RIIS, L; MUNKHOLM, P; BODINI, P; O'MORAIN, C; MOUZAS, IA; TSIANOS, E; VERMEIRE, S; MONTEIRO, E; LIMONARD, C; VATN, M; FORNACIARI, G; PEREIRA, S; MOUM B; STOCKBRÜGGER, RW. Crohn's disease: increased mortality 10 years after diagnosis in a Europe-wide population based cohort. **Gut**, v. 55, n. 4, p. 510–8, doi:10.1136/gut.2005.072793, 2006.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427–34, doi:10.1038/nature06005, 2007.

YAMADA, T; DEITCH, E; SPECIAN, RD; PERRY, MA; SARTOR, RB; GRISHAM, MB. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 641–62, 1993.

YANG, P.-C.; WANG, C.-S.; AN, Z.-Y. A murine model of ulcerative colitis: induced with sinusitis-derived superantigen and food allergen. **BMC gastroenterology**, v. 5, p. 6, doi:10.1186/1471-230X-5-6, 2005.

YIN, CS; JEONG, HS; PARK, HJ; BAIK, Y; YOON, MH; CHOI, CB; KOH, HG.. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research in veterinary science**, v. 84, n. 2, p. 159–65, doi:10.1016/j.rvsc.2007.04.004, 2008.

ZIJLSTRA, FJ; VAN DEN BERG-DE LANGE, I; HUYGEN, FJ; KLEIN, J. Anti-inflammatory actions of acupuncture. **Mediators of inflammation**, v. 12, n. 2, p. 59–69, doi:10.1080/0962935031000114943, 2003.

ZINGARELLI, B.; SZABÓ, C.; SALZMAN, A L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Gut**, v. 45, n. 2, p. 199–209, 1999.

ZWEIBAUM, A.; MORARD, J. C.; HALPERN, B. [Experimental hemorrhagic ulcerative colitis induced by bacterial immunization]. **Pathologie et biologie**, v. 16, n. 19, p. 813–23, 1968.

APÊNDICE A – SOLUÇÕES E REAGENTES

- Água destilada
- Álcool etílico 100% (Reagen)
- Anticorpo primário policlonal de carneiro anti-TNF- α (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo secundário produzido em caprinos anti os anticorpos primários anti-TNF- α e anti-IL-1 β produzido em coelhos (R&D systems)
- Avidina-Peroxidase (Dako)
- Diaminobenzidina - DAB (Dako)
- Eosina (Merck)
- Formaldeído 40% (Reagen)
- Hematoxilina (Reagen)
- Peróxido de hidrogênio (0,1%)
 - Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec)..... 1 mL
 - Água destilada.....q.s.p. 30 mL
- Salina tamponada com fosfato (PBS)
- Solução de o-dianisidina
 - O-dianisidina (Sigma) 16,7 mL
 - Tampão fosfato de potássio..... 10 mL
 - H₂O₂..... 50 μ L
 - Água destilada..... 90 mL
- Solução salina: cloreto de NaCl a 0,9% (15M): frasco de 500mL (Tayuyna)
- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)
 - HTAB (Sigma)..... 5g
 - Tampão fosfato de potássio..... 1L
- Tampão fosfato de potássio: solução A – 988mL + solução B – 12mL
 - Solução A:
 - KH₂PO₄ (Synth)..... 6,8 g

- Água destiladaq.s.p. 1 L
- Solução B:
 - KH₂PO₄ (Synth)..... 8,7g
 - Água destiladaq.s.p. 1L
- Tripsina - EDTA 0,25% (Sigma)

APÊNDICE B – EQUIPAMENTOS

- Agitador de tubos tipo Vortex – Phoenix – Araraquara – São Paulo – Brasil
- Agulha para Acupuntura (Ting) 0,18x8mm – Dong Bang (Coreana)
- Analgesímetro – Von Frey
- Aplicadores Ting para agulha de acupuntura
- Autoclave modelo digital horizontal – Stermax – Paraná – Brasil
- Balança analítica – Sartorius BL 210S
- Balança digital modelo MF6/ 1- Filizola – São Paulo – Brasil
- Centrífuga Eppendorf – 5804R – Hamburgo – Alemanha
- Deionizador de água – Milipore – São Paulo – Brasil
- Eletroestimulador Sikuro DS-100JR – 04 saidas (Sikuro Sistemas e Equipamentos Eletrônicos Ltda – Indústria brasileira)(Conf. Técnica n.º 4835/08; Registro ANVISA/MS n.º 80470920001
- Freezer a -70⁰C Revco Elite Plus – Thermoscientific – EUA
- Homogenizador de amostras – Polytron PT10-35 – Kinematica – Suíça
- Leitor de placas modelo (ELISA) ELX 800 – Bio Tek instruments – EUA
- Máquina de gelo – Everest – Rio de Janeiro – Brasil
- Material cirúrgico
- Micropipetas Gilson de 2, 20, 200 e 1000µL
- Micropipeta Multicanal Gilson 200µL
- Microscópico óptico Leica DFC-295, acoplado a computador
- Placa estéril de 24 e 96 poços
- PHmetro modelo MR 10 – Denver instrument – EUA
- Sonicador de amostras – Thornton – São Paulo – Brasil
- Tubos de Falcon 15 e 50mL

APÊNDICE C – DROGAS E SUBSTÂNCIAS

Imediatamente antes da administração, as drogas foram dissolvidas e diluídas.

- Preparo do TNBS: O TNBS (5% - SIGMA-P2297) foi diluído em veículo de etanol em solução a 50%, em 1:1. A dose aplicada por animal foi de 2mg, volume de 80 μ L/cólon por enema.
- Dexametasona: A dexametasona (100mg/1mL - Decadron®, Aché Laboratórios farmacêuticos SA) foi diluída em 9mL de solução salina a 0,9%, solução de 10mg/mL. A dose aplicada por animal foi de 1mg/kg de peso do animal, caculada por regra de três. A primeira aplicação foi 1h antes da indução da colite e a cada 24 e 48 horas após a indução da colite.

APÊNCICE D – PROTOCOLOS

Caixa	Cor		Peso			
			Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Caixa 1		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
Caixa 2		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				

Diarréia:

Caixa	Cor		Diarréia			
			Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Caixa 1		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
Caixa 2		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
		1				
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				

Cego:
Caixas:

Caixa	Cor	Grupo
Caixa 1	Preto	
	Verde	
	Vermelho	
	Azul	
Caixa 2	Azul	
	Preto	

Cego:
Soluções:

Solução	Substância
Solução 1	
Solução 2	
Solução 3	
Solução 4	

VON FREY:

Caixa	Cor	No	Von Frey								
			Dia 0			Dia 1			Dia 3		
Caixa 1		1									
		2									
		3									
		4									
		5									
		6									
		1									
		2									
		3									
		4									
		5									
		6									
		1									
		2									
		3									
		4									
		5									
		6									
Caixa 2		1									
		2									
		3									
		4									
		5									
		6									
		1									
		2									
		3									
		4									
		5									
		6									

Eutanásia:

Caixa	Cor	No.	Eutanásia	
			Peso intestino (g)	Classificação macroscópica
Caixa 1		1		
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		1		
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		1		
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
Caixa 2		1		
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		1		
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		

Freezer -80

2ª. prateleira, 3ª. fileira, 1ª. coluna

CITOCINAS:

Grupo	Ependorf + amostra	ependorf
SALN1		
SALN2		
SALN3		
SALN4		
SALN5		
SALN6		
ETNL1		
ETNL2		
ETNL3		
ETNL4		
TNBS2		
TNBS3		
TNBS4		
TNBS5		
TNBS6		
EAC1		
EAC4		
EAC5		
EAC6		
FEAC1		
FEAC2		
FEAC3		
FEAC4		
FEAC6		
DEXA1		
DEXA2		
DEXA3		
DEXA4		
DEXA5		
DEXA6		

APÊNDICE E – DADOS BRUTOS

Experimento 1:

Caixa	Cor		Peso			
			Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Caixa 1	Preto DEXA	1	38	36	36	35
		2	31	30	30	30
		3	32	30	31	31
		4	32	31	30	30
		5	34	32	33	32
		6	29	28	29	28
	Verde SLNA	1	30	30	31	31
		2	35	36	36	35
		3	25	24	26	26
		4	44	45	45	44
		5	27	29	26	30
		6	32	33	32	33
	Vermelho EAC	1	32	31	33	31
		2	30	31		
		3	37	30		
		4	35	32	34	34
		5	33	28	28	28
		6	33	28	27	29
	Azul FEAC	1	33	31	31	32
		2	30	27	29	29
		3	36	34	37	36
		4	29	27	29	28
		5	29	25	28	
		6	33	29	29	27
Caixa 2	Azul ETNL	1	32	32	33	34
		2	31	31	28	31
		3	33	29	28	28
		4	28	28	28	29
		5	31	29	28	
		6	30	27	25	
	Preto TNBS	1	30	27		
		2	30	28	30	32
		3	26	24	25	27
		4	32	33	31	31
		5	29	30	32	31
		6	30	25	24	23

Diarréia:

Caixa	Cor		Diarréia			
			Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Caixa 1	Preto DEXA	1	0	1	1	0
		2	0	0	1	0
		3	0	0	1	0
		4	0	0	0	0
		5	0	1	3	3
		6	0	0	2	1
	Verde SLNA	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
		4	0	0	0	0
		5	0	0	0	0
		6	0	0	0	0
	Vermelho EAC	1	0	0	0	0
		2	0	1		
		3	0	0		
		4	0	1	0	0
		5	0	0	0	0
		6	0	0	0	0
	Azul FEAC	1	0	1	0	0
		2	0	0	1	0
		3	0	0	1	0
		4	0	1	1	0
		5	0	1	3	0
		6	0	1	0	0
Caixa 2	Azul ETNL	1	0	0	0	1
		2	0	0	2	1
		3	0	0	0	1
		4	0	0	0	0
		5	0	0	2	
		6	0	0	3	
	Preto TNBS	1	0	0		
		2	0	0	0	1
		3	0	0	1	0
		4	0	0	0	0
		5	0	0	0	0
		6	0	0	1	1

Cego:
Caixas:

Caixa	Cor	Grupo
Caixa 1	Preto	DEXA+TNBS
	Verde	SALN
	Vermelho	TNBS+EAC
	Azul	FEAC+TNBS
Caixa 2	Azul	ETNL
	Preto	TNBS

Cego:
Soluções:

Solução	Substância
Solução 1	TNBS
Solução 2	Dexametasona
Solução 3	Salina
Solução 4	Álcool

VON FREY:

Caixa	Cor	No	Von Frey								
			Dia 0			Dia 1			Dia 3		
Caixa 1	Preto DEXA	1	12,5	12	12,4	12,4	12,1	12	13,7	13,7	
		2	13,3	13,5	13,2	13,2	13,6	13,2	13,2	13,7	13,7
		3	10,6	10,2	10,6	9,4	9,7	9,6	12,5	12,5	
		4	12	12,4	12,1	13,7	13,5	13,6	15,4	15,7	15,5
		5	11,5	11,6	11,5	12,2	12,5	12,8	12,5	12,7	12,7
		6	12,5	12,7	12,4	10,6	10,5	10,4	13,2	13,5	13
	Verde SLNA	1	10,3	10,5	10,7	10,7	10,7	10,5	13,5	13,7	13,5
		2	12,7	12,5	12,2	12,5	12,4	12,4	15,4	15,3	15,5
		3	11,5	11,4	11,6	12,2	12,5	12,8	14,1	14,2	14,5
		4	12,5	12,7	12,7	12,7	12,5	12,2	12,5	12,3	12,5
		5	13,7	13,3	13,6	12,6	12,6	12,5	13,1	13,6	13,4
		6	12,4	12,5	12,3	11,5	11,5		11,1	10,6	10,7
	Vermelho EAC	1	12,7	12,7	12,4	12,7	12,5	12,7	12,4	12,7	12,3
		2	12,4	12,2	12,4	12,4	12,4	12,5			
		3	13,4	13	13	13,3	13,2	13,2			
		4	12	11,5	11,5	8,6	8,5	8,5	9,7	9,6	9,4
		5	10,5	10,7	10,7	14,5	14,1	14,3	12,2	12,7	12,7
		6	10,5	10,6	10,8	10,5	10,6	10,6	11,4	11,4	
	Azul FEAC	1	11,4	11,5	11,4	9,4	9,7	9,4	9,4	9,4	9,5
		2	15,8	15,4	15,5	11,5	11,6	11,5	10,5	10,4	10,4
		3	15,9	15,6	15,3	12,4	12,7	12,2	9,1	8,6	8,8
		4	14,2	14,2		9,4	9,7	9,6	8,8	8,5	8,7
		5	11,4	11,8	11,5	11,2	11,6	11,4			
		6	12,7	13,1	13,2	11,2	11,6	11,4	10,5	10,2	10,7
Caixa 2	Azul ETNL	1	13,7	13,7		14,2	14,5	14,3	12,4	12,5	12,6
		2	12	11,5	11,7	10,6	10,2	10,7	10,7	10,4	10,5
		3	12,4	12,4		12,5	12,2	12,7	8,5	8,7	8,6
		4	8,7	8,3	8,7	7,7	7,3	7,4	8,8	8,5	8,4
		5	10,5	10,6	10,3	12,5	12,7	12,5			
		6	11,4	11,1	11,4	14,3	14,5	14,5			
	Preto TNBS	1	9,3	9,3	9,7	5,6	5,7	5,5			
		2	12,4	12,3	12	12,5	12,5	12,6	11,1	11,5	11,4
		3	11,4	11,2	11,6	11,4	11,7	11,7	12,5	12,5	
		4	12	12,7	12,2	10,7	10,4	10,2	12,2	12,3	12,2
		5	10,4	10,1	10,6	10,5	10,5		10,5	10,7	10,4
		6	9,7	9,5	9,4	9,4	9,3	9,7	10,6	10,4	10,3

Eutanásia:

Caixa	Cor	No.	Eutanásia	
			Peso intestino (g)	Classificação macroscópica
Caixa 1	Preto DEXA	1	0,116	0
		2	1,173	1
		3	0,135	0
		4	0,121	1
		5	0,122	1
		6	0,125	0
	Verde SLNA	1	0,110	0
		2	0,088	0
		3	0,105	0
		4	0,133	0
		5	0,098	0
		6	0,089	0
	Vermelho EAC	1	0,089	0
		2	-	-
		3	-	-
		4	0,150	0
		5	0,281	3
		6	0,295	3
	Azul FEAC	1	0,207	1
		2	0,145	1
		3	0,143	0
		4	0,128	1
		5	-	-
		6	0,257	1
Caixa 2	Preto ETNL	1	0,148	1
		2	0,184	1
		3	0,279	6
		4	0,121	0
		5	-	-
		6	-	-
	Azul TNBS	1	-	-
		2	0,182	1
		3	0,168	1
		4	0,233	1
		5	0,149	1
		6	0,234	1

Freezer -80

2ª. prateleira, 3ª. fileira, 1ª. coluna

CITOCINAS:

Grupo	Ependorf + amostra	ependorf
SALN1	1,1442	1,1181
SALN2	1,1165	1,1107
SALN3	1,1405	1,1179
SALN4	1,1494	1,1128
SALN5	1,1334	1,1135
SALN6	1,1291	1,1165
ETNL1	1,1505	1,1140
ETNL2	1,1633	1,1145
ETNL3	1,1717	1,1098
ETNL4	1,1290	1,1134
TNBS2	1,1602	1,1189
TNBS3	1,1497	1,1171
TNBS4	1,1691	1,1139
TNBS5	1,1417	1,1133
TNBS6	1,1815	1,1122
EAC1	1,1317	1,1142
EAC4	1,1466	1,1134
EAC5	1,1646	1,1176
EAC6	1,1734	1,1134
FEAC1	1,1584	1,1112
FEAC2	1,1419	1,1138
FEAC3	1,1362	1,1124
FEAC4	1,1404	1,1146
FEAC6	1,1504	1,1084
DEXA1	1,1254	1,1072
DEXA2	1,1447	1,1143
DEXA3	1,1284	1,1142
DEXA4	1,1241	1,1018
DEXA5	1,1323	1,1029
DEXA6	1,1454	1,1180

Experimento 2:

Caixa	Cor		Peso			
			Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Caixa 1	PRETO DEXA	1	26,6	28	27	28
		2	25,3	22	26	27
		3	23,9	23	23	25
	AZUL FEAC	1	22,2	22	25	24
		2	25,4	23	27	26
		3	27,4	28	28	29
		4	26,7	30	29	29
	VERMELHO EAC	1	27,2	-	-	-
		2	25,9	25	29	28
		3	26,1	27	28	29
		4	25,7	30	26	25
	Caixa 2	PRETO SLNA	1	26,7	28	28
2			26,3	25	29	27
3			23,8	25	25	25
AZUL ETNL		1	26,9	28	27	27
		2	26	29	27	26
		3	23	23	21	22
		4	22,3	23	25	23
VERMELHO TNBS		1	24,5	26	27	26
		2	26,9	28	27	28
		3	27	-	-	-
		4*	26	26	29	28
		5		28	31	30
TNBS		1				26
		2				24
		3				26
	4				31	
	5				26	

*vazou tnbs

Diarréia:

Caixa	Cor		Diarréia			
			Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Caixa 1	PRETO DEXA	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
	AZUL FEAC	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	1	0
		4	0	0	0	0
	VERMELHO EAC	1	0	-	-	-
		2	0	0	1	1
		3	0	0	0	0
		4	0	0	0	0
	Caixa 2	PRETO SLNA	1	0	0	0
2			0	0	1	0
3			0	0	0	0
AZUL ETNL		1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	1	0	0
		4	0	0	0	0
VERMELHO TNBS		1	0	0	0	0
		2	0	1	0	1
		3	0	0	-	-
		4	0	1	0	0
		5	0	0	0	0
TNBS		1				0
		2				0
		3				0
		4				1
		5				1

Cego:
Caixas:

Caixa	Cor	Grupo
Caixa 1	PRETO	DEXA
	AZUL	FEAC
	VERMELHO	EAC
Caixa 2	PRETO	SALN
	AZUL	ETNL
	VERMELHO	TNBS
CX 2	AZUL CAB	

Cego:
Soluções:

Solução	Substância
Solução 1	TNBS
Solução 2	Etanol
Solução 3	Salina
Solução 4	Dexametasona

VON FREY:

Caixa	Cor	No.	Von Frey								
			Dia 0			Dia 1			Dia 4		
Caixa 1	DEXA	1	10,4	10,6	10,7	11,4	11,4		10,2	10,7	10,4
		2	11,2	11,4	11,6	12,4	12,4		10,7	10,7	11,2
		3	12,3	12,5	12,6	11,2	11,4	11,4	12,2	12,4	12,5
	FEAC	1	11,4	11,5	11,6	13,2	13,4	13,5	10,6	10,6	
		2	14,2	14,4	14,5	11,2	11,4	11,7	9,3	9,3	9,7
		3	14,2	14,5	14,5	11,4	11,4		10,5	10,6	10,7
		4	10,2	10,4	10,6	11,5	11,7	11,8	12,5	12,7	12,7
	EAC	1	12,5	12,7	12,8						
		2	12,2	12,7	12,6	11,4	11,4		9,3	9,5	9,7
		3	12,2	12,5	12,4	11,4	11,4		11	11,2	11,5
		4	11,1	11,4	11,5	11,2	11,3	11,7	10,2	10,2	
	Caixa 2	SLNA	1	10,7	10,7		13,5	13,5		14	14,4
2			11,6	11,7	11,7	11,3	11,6	11,7	13,3	13	12,8
3			10,7	10,7	11,2	10,5	10,5	10,6	11,4	11,4	11,6
ETNL		1	12,4	12,5	12,7	12	12,2	12,4	10,5	10,5	
		2	13,2	13,2		13,2	13,5	13,7	10,6	10,5	10,7
		3	12,7	12,7		9,7	10	10,7	10,4	10,4	
		4	13,7	13,7		11,2	11,3	11,3	12,4	12,4	
TNBS		1	13,2	13,2	13,5	11,8	11,5	11,6	10,5	10,5	
		2	14,4	14,4	14,7	10,2	10,7	10,7	10,2	10,7	10,6
		3				10,4	10,5	10,6	10,6	10,6	
		4	12,4	12,5	12,7	12,2	11,7	12,2	11,3	11,2	10,8
		5				10,5	10,6	10,7	9,6	9,6	
		6				11,2	11,6	11,8	12,4	12,4	
		7				10,3	10,4	10,5	10,4	10,7	10,5

Eutanásia:

Caixa	Cor	No.	Eutanásia	
			Peso intestino (g)	Classificação macroscópica
Caixa 1	PRETO DEXA	1	0,0815	0
		2	0,1085	1
		3	0,1167	1
	AZUL FEAC	1	0,1722	0
		2	0,1545	1
		3	0,1608	
		4	0,1339	
	VERMELHO EAC	1	-	
		2	0,1943	1
		3	0,1736	1
		4	0,1584	1
	Caixa 2	PRETO SLNA	1	0,1033
2			0,1165	0
3			0,1134	0
AZUL ETNL		1	0,1445	1
		2	0,1415	1
		3	0,1450	1
		4	0,1208	1
VERMELHO TNBS		1	0,1437	1
		2	0,1687	1
		3	-	-
		4	0,1941	1
		5	0,1486	1
TNBS		5Tn bs3	0,1815	1
		3Tn bs6	0,1483	1
		4Tn bs7	0,2126	1

Freezer -80

2ª. prateleira, 3ª. fileira, 2ª. coluna 1ª.

Ependorfs:

Caixa	Cor		Epedorfs		
			A	B	C
Caixa 1	DEXA	1	1,1114	1,1159	1,1103
		2	1,1124	1,1162	1,1128
		3	1,1100	1,1098	1,1116
	FEAC	1	1,1111	1,1122	1,1158
		2	1,1100	1,1127	1,1152
		3	1,1144	1,1114	1,1111
		4	1,1121	1,1103	1,1122
	EAC	1			
		2	1,1095	1,1114	1,1143
		3	1,1111	1,1121	1,1103
		4	1,1125	1,1106	1,1115
	Caixa 2	SALN	1	1,1114	1,1093
2			1,1124	1,1076	1,1137
3			1,1143	1,1122	1,1071
ETNL		1	1,1096	1,1087	1,1099
		2	1,1089	1,1137	1,1073
		3	1,1094	1,1141	1,1133
		4	1,1134	1,1095	1,1114
TNBS		1	1,1116	1,1117	1,1093
		2	1,1105	1,1080	1,1160
		3			
		4*	1,1113	1,1104	1,1121
		5	1,1139	1,1139	1,1123

MPO:

Caixa	Cor		Epedorfs		
			A	A + a	
Caixa 1	DEXA	1	1,1114	1,1418	
		2	1,1124	1,1402	
		3	1,1100	1,1407	
	FEAC	1	1,1111	1,1574	
		2	1,1100	1,1466	
		3	1,1144	1,1702	
		4	1,1121	1,1410	
	EAC	1			
		2	1,1095	1,1566	
		3	1,1111	1,1511	
		4	1,1125	1,1516	
	Caixa 2	SALN	1	1,1114	1,1550
2			1,1124	1,1554	
3			1,1143	1,1490	
ETNL		1	1,1096	1,1472	
		2	1,1089	1,1491	
		3	1,1094	1,1429	
		4	1,1134	1,1550	
TNBS		1	1,1116	1,1418	
		2	1,1105	1,1469	
		3	1,1130	1,1540	
		4*	1,1113	1,1582	
		5	1,1139	1,1441	
		6	1,1110	1,1330	
	7	1,1110	1,1570		

Amostras:
Freezer -80
2ª. prateleira
1ª. fileira
2ª. coluna
3º. lugar

MACROSCOPIA

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
	SAL	ETNL	-	EAC	FEAC	DEXA
	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	0	1	1	0	1	0
2	0	1	1	0	1	1
3	0	0	1	3	0	0
4	0	1	1	3	1	1
5	0	1	1	1	1	1
6	0	1	1	1	0	0
7	0	1	1	1	1	0
8	0		1			1
9	0		1			1

PESO INTESTINAL

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
	SAL	ETNL	-	EAC	FEAC	DEXA
	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	1091.4860	1229.2230	2549.1550	1032.9380	2121.3020	732.2719
2	651.2342	1299.2840	2271.9340	494.4409	1335.3020	1693.3770
3	488.2328	1026.8840	3027.5200	3105.0110	1015.2910	1459.7380
4	727.6333	923.7278	2254.7750	3256.5640	2547.3230	905.7703
5	1168.3570	1390.2130	4027.6910	3750.0080	1520.3710	1317.4590
6	1376.7300	1338.7910	6228.0030	2607.4790	4050.4740	1581.7760
7	1439.6920	1251.9740	2842.5010	4056.4330	2099.2320	665.2997
8	1034.6620		4451.7220		1361.9310	1923.0840
9			2380.9790		3221.2750	1799.9820

MPO

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
	SAL	ETNL	-	EAC	FEAC	DEXA
	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	1091.4860	1229.2230	2549.1550	1032.9380	2121.3020	732.2719
2	651.2342	1299.2840	2271.9340	494.4409	1335.3020	1693.3770
3	488.2328	1026.8840	3027.5200	3105.0110	1015.2910	1459.7380
4	727.6333	923.7278	2254.7750	3256.5640	2547.3230	905.7703
5	1168.3570	1390.2130	4027.6910	3750.0080	1520.3710	1317.4590
6	1376.7300	1338.7910	6228.0030	2607.4790	4050.4740	1581.7760
7	1439.6920	1251.9740	2842.5010	4056.4330	2099.2320	665.2997
8	1034.6620		4451.7220		1361.9310	1923.0840
9			2380.9790		3221.2750	1799.9820

HISTOLOGIA

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
	SALN	ETNL	-	EAC	FEAC	DEXA
	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	0.000000	4.000000	3.0	0	3.000000	1
2	3.000000	3.000000	2.0	0	8.000000	0
3	0.000000	0.000000	4.0	0	8.000000	1
4	2.000000	2.000000	5.0	5	9.000000	3
5	0.000000	0.000000	3.0	1	2.000000	4
6	1.000000	1.000000	4.0	1	4.000000	3
7	1.000000		3.0		6.000000	2
8	0.000000		6.0		7.000000	0
9			11.0		3.000000	

IMUNOISTOQUÍMICA

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
	SAL	ETNL	-	EAC	FEAC	DEXA
	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	1	3	3	1	1	1
2	1	2	3	2	1	1
3	1	2	3	1	1	1
4	1	3	3	1	1	1
5	1	2	3	2	1	1
6	1	2	3		1	1

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F	Group G
	SAL	ETNL	-	EAC	FEAC	DEXA	Data Set-G
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	1	3	3	1	1	1	
2	1	2	3	2	1	1	
3	1	2	3	1	1	1	
4	1	3	3	1	1	1	
5	1	2	3	2	1	1	
6	1	2	3		1	1	

MDA

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
	SAL	ETNL	-	EAC	FEAC	DEXA
	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	373.23	1388.53	2067.78	1224.08	509.08	244.53
2	723.58	1388.53	2067.78	373.23	251.68	244.53
3	723.58	1095.38	1931.93	523.38	258.83	330.33
4	387.53	1889.03	1931.93	430.43	466.18	173.03
5		351.78	2582.58	280.28	730.73	223.08
6		408.98	745.03	151.58	122.98	223.08
7		516.23	737.88		108.68	
8		287.43	723.58		130.13	
9			723.58		130.13	

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
	SAL	ETNL	-	EAC	FEAC	DEXA
	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	1.933333	0.133333
2	0.033333	1.233333	0.000000	3.133333	4.033333	0.000000
3	0.000000	0.000000	1.866667	0.000000	3.166667	0.900000
4	0.166667	1.100000	0.000000	0.066667	4.633333	0.000000
5	0.966667	0.333333	0.066667	1.100000	1.600000	0.000000
6	0.900000	0.000000	1.666667	0.966667	0.000000	2.033333
7	0.000000	2.566667	3.966667	0.000000	2.933333	0.000000
8	0.133333	2.433333	0.000000		6.800000	0.000000
9	0.333333		0.500000		0.000000	1.133333
10			0.200000			
11			0.000000			
12			0.166667			
	Group H	Group I	Group J	Group K	Group L	Group M
	SAL	ETNL	-	EAC	FEAC	DEXA
	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	0.000000	1.200000	0.900000	0.133333	2.000000	3.166667
2	0.000000	1.200000	0.000000	2.100000	5.133333	0.000000
3	0.000000	3.800000	0.066667	0.000000	6.766667	0.000000
4	0.200000	0.000000	0.000000	0.000000	5.533333	0.000000
5	0.166667	2.033333	0.000000	3.000000	2.533333	0.000000
6	1.600000	2.600000	2.800000	1.133333	0.900000	0.000000
7	0.000000	2.300000	4.000000	1.133333	4.933333	0.133333
8	0.000000	1.300000	0.000000		3.800000	0.533333
9	0.000000		1.433333		0.000000	0.100000
10			1.200000			
11			0.000000			
12			0.033333			