

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

ELIANA FERRAZ DE BRITO

**EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA SOBRE A PERITONITE
POLIMICROBIANA INDUZIDA POR INOCULAÇÃO
INTRAPERITONEAL DE FEZES EM CAMUNDONGOS**

VITÓRIA

2010

ELIANA FERRAZ DE BRITO

**EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA SOBRE A PERITONITE
POLIMICROBIANA INDUZIDA POR INOCULAÇÃO
INTRAPERITONEAL DE FEZES EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Co-orientador: Dra. Regina Maria Araújo Coelho

VITÓRIA

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Brito, Eliana Ferraz de, 1959-
B862e Efeitos da eletroacupuntura sobre a peritonite polimicrobiana
induzida por inoculação intraperitoneal de fezes em
camundongos / Eliana Ferraz de Brito. – 2010.
49 f. : il.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.
Co-Orientadora: Regina Maria Araújo Coelho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Eletroacupuntura. 2. Peritonite. 3. Xilazina. 4. Ketamina. I.
Pereira, Fausto Edmundo Lima. II. Coelho, Regina Maria Araújo.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61



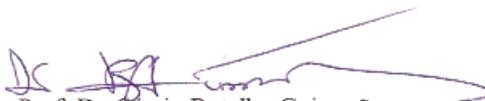
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

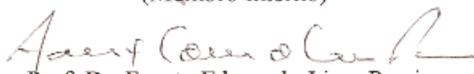
A mestranda ELIANA FERRAZ DE BRITO, apresentou dissertação intitulada: “EFEITOS DA ELETROACUPUNTURA SOBRE A PERITONITE POLIMICROBIANA INDUZIDA POR INOCULAÇÃO INTRAPERITONEAL DE FEZES EM CAMUNDONGOS” em sessão pública, no dia 03 de setembro de 2010, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **APROVAR SEM RESTRIÇÕES**, a dissertação e habilitar a médica ELIANA FERRAZ DE BRITO, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 03 de setembro de 2010


Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães
(Membro Externo)


Prof. Dr. Moises Palaci
(Membro Interno)


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Orientador)

Dedicatória

Aos meus pais, Nelson e Isadelfia, que me ensinaram valores essenciais da vida.

Aos meus filhos, Mariana e Tiago, por me trazerem alegrias e realizações.

“Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar.
A busca da excelência, não deveria ser um objetivo. E sim, um hábito.”

Aristóteles

Agradecimentos

A Deus, pela vida.

Ao Prof. Dr. Fausto, orientador experiente, criativo, incentivador, sempre presente em todas as etapas deste projeto, motivando e acreditando no sucesso deste trabalho. Exemplo de confiança, persistência, entusiasmo e dedicação. Sou muito grata por ter tido oportunidade de conviver com o seu brilhantismo, de um verdadeiro mestre, e aprender que na pesquisa é necessário ter coragem, acreditar, ousar, desafiar.

A minha co-orientadora, Dra. Regina, que me incentivou e acreditou neste projeto. Exemplo de inspiração, mestre que me introduziu na medicina chinesa, amiga sempre presente com paciência e carinho. Obrigada pela confiança.

Aos meus filhos, Mariana e Tiago, pela compreensão, paciência, incentivo e apoio efetivo durante todas as fases deste estudo.

A toda minha família, pela presença, apoio e incentivo.

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas - UFES, representado pelo Prof. Dr. Reynaldo Dietze, pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

Aos funcionários do Núcleo de Doenças Infecciosas, que direta ou indiretamente colaboraram para esta pesquisa. Sou grata ao Ledüç Mageski, que me ajudou na prática de laboratório.

Aos professores do Mestrado de Doenças Infecciosas, pelos ensinamentos durante nossa formação.

Aos colegas de mestrado e amigos: Carolina, Marco, Mayra, Mery, Priscila, Thais e Thiago, pelos momentos compartilhados durante estes dois anos, em especial, Marco André, que por tantas vezes me ensinou com paciência e dedicação.

Ao estudante de medicina, Hernandez Carreta, com quem dividi momentos na execução deste projeto.

Ao Prof. Fernando Bermudes, pela sua contribuição valorosa, enriquecendo os resultados desta pesquisa. Obrigada pela sua dedicação, gentileza e disponibilidade.

Aos colegas e amigos do HINSG, pelo companheirismo.

Aos funcionários do HINSG, Andréia e Márcio, pela contribuição dada a este trabalho.

À CST, que gentilmente, nos atendeu contribuindo para o reparo e aferição dos aparelhos de eletroestimulação.

Aos animais cobaias, que contribuíram para o avanço das pesquisas.

A todos aqueles que, de algum modo ajudaram na realização deste projeto.

RESUMO

Introdução. A acupuntura e a eletroacupuntura têm efeitos antiinflamatórios, demonstrados em modelos experimentais e em algumas observações em humanos, mas muito pouco se conhece sobre o seu impacto na evolução de infecções. Há uma observação sobre efeitos da acupuntura nas fases iniciais da sepse induzida por ligadura e punção do ceco em ratos, mostrando redução das bactérias nas primeiras 6 horas. **Objetivos.** Avaliar os efeitos da eletroacupuntura na evolução de uma peritonite polimicrobiana por inoculação intraperitoneal de fezes em camundongos. **Material e Métodos.** Camundongos suíços, machos, 6-8 semanas de idade, foram anestesiados com ketamina e xilazina e inoculados por via intraperitoneal com 4µl/g de peso corporal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol em salina). Imediatamente após, um grupo recebia as agulhas nos pontos E-36 e VB-30, bilateralmente, permanecendo sem qualquer manipulação; o outro grupo recebeu as agulhas nos mesmos pontos, com estimulação elétrica (2 Hz) durante 30 minutos. Em um experimento se avaliou o número de neutrófilos exsudados na cavidade peritoneal 24h após a indução da peritonite e em outro experimento os animais foram acompanhados por 14 dias, quando foram eutanasiados para contagem e medida dos abscessos intraperitoneais. **Resultados.** Houve aumento significativo do número de neutrófilos na cavidade peritoneal e redução do número e tamanho dos abscessos intraperitoneais nos animais que receberam a eletroacupuntura. **Conclusão.** A eletroacupuntura aumentou a resistência dos camundongos à peritonite polimicrobiana induzida por uma suspensão de fezes. Este dado foi indicado pela maior exsudação de neutrófilos nas primeiras 24 horas e pelo menor número e tamanho dos abscessos intraperitoneais avaliados 14 dias depois da indução da peritonite. Uma explicação possível para o resultado observado seria o efeito da EA liberando mediadores do simpático e endorfinas que potencializariam a imunidade inata agindo em receptores α adrenérgicos de macrófagos peritoneais e potencializando a ação de células citotóxicas naturais.

Palavras chaves: eletroacupuntura; peritonite fecal; ketamina; xilazina.

ABSTRACT

Introduction. Acupuncture and electroacupuncture have anti-inflammatory effects as demonstrated in experimental models and some observations in humans, but little is known about their impact on the evolution of infections. There is one observation on effects of acupuncture in the early stages of sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats, showing a reduction of bacteria in the first six hours. **Objectives.** To study the effects of electroacupuncture on the evolution of a polymicrobial peritonitis by intraperitoneal inoculation of feces in mice. **Material and Methods.** Male Swiss mice, 6-8 weeks old, were anesthetized with ketamine and xylazine and inoculated by intra-peritoneal route with 4 μ l / g body weight of a suspension of feces diluted to 1:9 (weight / vol in saline). Immediately after, a group received the needles in points E36 and VB-30, bilaterally, remaining without any manipulation, and other group received the needles on the same points with electrical stimulation (2 Hz) for 30 minutes. In one experiment the neutrophils in the peritoneal exudates were counted 24 h after induction of peritonitis and in another experiment the animals were followed up for 14 days when they were euthanized for counting and measurement of intraperitoneal abscesses. **Results.** Significant increase in the number of neutrophils in the peritoneal cavity and reduction in number and size of intraperitoneal abscesses were observed in the animals receiving electroacupuncture. **Conclusion.** Electroacupuncture increased the resistance of mice to polymicrobial peritonitis induced by a suspension of feces. This conclusion is supported by the higher exudation of neutrophils in the first 24 hours and the lower number and size of intraperitoneal abscesses evaluated 14 days after peritonitis induction. A possible explanation for the observed result would be the effect of EA releasing sympathetic mediators and endorphins enhancing the innate immunity by acting on α -adrenergic receptors of peritoneal macrophages and stimulating the activity of natural killer cells.

Key words: electroacupuncture; fecal peritonitis; ketamine; xylazine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Pontos onde as agulhas foram inseridas (E-36 e VB-30) no animal controle da agulha e no que foi submetido à eletroacupuntura.....255
- Figura 2 - Esquema resumindo o delineamento experimental..... 28
- Figura 3 - Curva de sobrevivência (Método de Kaplan-Meyer) dos camundongos anestesiados com ketamina e xilazina (ketamina) ou não anestesiados (controle), nos quais foi induzida uma peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina. Teste logrank, $p=0,561$300
- Figura 4 - Número (A) e escore (B) dos abscessos intraperitoneais observados 14 dias depois da indução de peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina, em camundongos anestesiados com ketamina e xilazina (ketamina) ou não anestesiados (controle). Teste de Mann-Whitney: número de abscessos: $p=0,003$; escore abscessos $p=0,001$311
- Figura 5 - Peso do fígado (A) e do baço (B) observados 14 dias depois da indução de peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina, em camundongos anestesiados com ketamina e xilazina (ketamina) ou não anestesiados (controle peritonite). O grupo controle salina representa animais que receberam salina i.p e não foram inoculados com a suspensão fecal. Teste de Mann-Whitney; fígado: cont. peritonite x ketamina, $p=0,265$; baço: cont. peritonite x ketamina, $p=0,431$; para fígado e baço, cont. salina x cont. peritonite ou x ketamina, $p<0,05$322
- Figura 6 - Contagem de neutrófilos na cavidade peritoneal, 24 horas após a inoculação de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em camundongos que receberam salina i.p (controle), ou anestesia com ketamina e xilazina (ketamina), ou anestesia com ketamina e xilazina, com inserção das agulhas nos pontos E-36 e VB-30, sem eletroestimulação (agulha) ou anestesia com inserção das agulhas nos pontos E-36 e VB-30, com eletroestimulação (eletroacupuntura) . Os experimentos foram pareados, (4 animais por experimento) com nove repetições. Teste t de Student pareado: controle x ketamina e controle x agulha, $p>0,05$; agulha x eletroacupuntura, $p=0,011$333
- Figura 7** - Número (A) e escore (B) dos abscessos intraperitoneais observados 14 dias depois da indução de peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina, em camundongos anestesiados com ketamina e xilazina que receberam inserção de agulhas nos pontos E-36 e VB-30 sem

eletroestimulação (controle agulha) ou que receberam a inserção das agulhas nos mesmos pontos, mas seguida de eletroestimulação 2 Hz (eletroacupuntura). Teste t de student pareado: número de abscessos, $p=0,042$; escore abscessos, $p=0,028$344

Figura 8 - Peso do fígado (A) e do baço (B) observados 14 dias depois da indução de peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina, em camundongos anestesiados com ketamina e xilazina que receberam inserção de agulhas nos pontos E-36 e VB-30 sem eletroestimulação (controle agulha) ou que receberam a inserção das agulhas nos mesmos pontos, mas seguida de eletroestimulação 2 Hz (eletroacupuntura). Animais que receberam salina intraperitoneal e não foram inoculados com a suspensão fecal, foram utilizados para avaliação do peso dos órgãos na ausência da peritonite. Teste de Mann-Whitney; peso do fígado: $p=0,233$; peso do baço, $p=0,616$355

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – Anafilaxia cutânea passiva
ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
B-13 – Bexiga 13
BL-18 – Bexiga 18
BP-6 – Baço-Pâncreas 6
Ca⁺² – Cálcio
Células NK (NKC) – Células natural killer
Cl⁻ - Cloro
CO₂ – Dióxido de carbono
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentos Animais
CRH – Hormônio liberador de corticotrofina
CV-17 – Vaso Conceção 17
E-25 – Estômago 25
E-36 – Estômago 36
E-37 – Estômago 37
EA – Eletroacupuntura
EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético
FMLP – N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
g – grama
GV-14 – Vaso Governador 14
h – horas
HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal
HSP60 – Proteína choque térmico 60
HSP72 – Proteína choque térmico 72
IG -11 – Intestino grosso 11
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL-1 – Interleucina 1
IL-10 – Interleucina 10
IL-18 – Interleucina18
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

INF- γ – Interferon γ

JAK2 – Proteína com atividade de tirosina quinase

K⁺ - Potássio

LPC – Ligadura e punção cecal

LPS – Lipopolissacáride

mg – miligrama

mm – milímetros

MTC – Medicina Tradicional Chinesa

NFkB – Fator de transcrição nuclear kappa-B

NO – Óxido nítrico

NOS – Sintetase óxido nítrico

P-1 – Pulmão 1

PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos

PBS – Solução salina tamponada

PMN – Polimorfonucleares

Rpm – Rotação por minuto

S PR – Receptor de Substância P

STAT3 – Sinal de tradução e ativação da transcrição três

TLR – Toll Like receptor 2

TLR – Toll like receptor 4

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

VB-30 – Vesícula biliar 30

α 7nAChR – Receptor colinérgico nicotínico α 7

μ l – microlitros

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 3. METODOLOGIA..... | 23 |
| 3.1. Animais utilizados nos experimentos..... | 23 |
| 3.2. Indução da peritonite fecal | 23 |
| 3.2.1. Obtenção das fezes | 23 |
| 3.2.2. Indução da infecção na cavidade peritoneal | 24 |
| 3.3. Estimulação com Eletroacupuntura..... | 24 |
| 3.3.1. Inserção das agulhas | 24 |
| 3.3.2. Eletroestimulação | 24 |
| 3.4. Avaliação da evolução da infecção..... | 25 |
| 3.4.1. Avaliação do exsudato inflamatório na cavidade peritoneal | 25 |
| 3.4.2. Avaliação dos abscessos intraperitoneais..... | 26 |
| 3.5. Delineamento experimental | 26 |
| 3.5.1. Experimento 1: Avaliação do efeito da anestesia com ketamina e xilazina na evolução da peritonite fecal em camundongos. | 26 |
| 3.5.2. Experimento 2: Avaliação do efeito da eletroacupuntura na evolução da peritonite fecal em camundongos..... | 27 |
| 3.6. Tratamento estatístico dos resultados | 29 |
| 4. RESULTADOS | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1. Efeitos da anestesia sobre a evolução da peritonite fecal | 30 |
| 4.2. Efeitos da eletroacupuntura na evolução da peritonite fecal no camundongo .. | 33 |
| 5. DISCUSSÃO | 36 |
| 5.1. Comentários sobre o modelo de peritonite polimicrobiana utilizado nos experimentos | 36 |
| 5.2. Efeitos da anestesia com ketamina e xilazina sobre a evolução da peritonite fecal em camundongos..... | 36 |
| 5.3. Efeitos da Eletroacupuntura na evolução da peritonite fecal no camundongo .. | 37 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 42 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 43 |

1. INTRODUÇÃO

Acupuntura é uma modalidade terapêutica da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) que tem sido usada há milhares de anos na China e em outros países asiáticos e, atualmente, vem se expandindo nos países ocidentais como tratamento principal ou como coadjuvante e na prevenção de várias doenças (CHENG, 1999; O'CONNOR e BENSKY, 1981; WEN, 1989). É um processo no qual se faz a inserção de agulhas em vários pontos específicos com diferentes profundidades na pele, seguida de estimulação manual ou aquecimento com incenso (moxabustão) ou por estimulação elétrica com corrente de baixa voltagem (eletroacupuntura) (KAVOUSSI e ROSSI, 2007).

A dor crônica representa uma das indicações mais comuns de seu uso terapêutico, mas tem sido aplicada também no tratamento de infecções, de doenças inflamatórias como artrite reumatóide, osteoartrite e fibromialgia, de disfunção autonômica, de doenças cardiovasculares (reabilitação de acidente vascular cerebral), de doenças neurológicas (migrânea), de doenças pulmonares (asma), de abuso de droga, de desordens psicológicas (ansiedade, depressão), entre outras (EISENBERG, 1998; KAVOUSSI e ROSSI, 2007; CABIOGLU E CETIN, 2008).

Os pontos de acupuntura correspondem a locais com aumento de capilares, terminações nervosas simpáticas, papilas dérmicas (CABIOGLU E CETIN, 2008), com alta densidade de receptores nociceptivos específicos e polimodais e com maior densidade de vasos linfáticos e maior número de mastócitos. (FUNG, 2009). Muitos correspondem aos “pontos-gatilho” (*Trigger Points*) os quais são pontos que estimulados produzem dor no músculo esquelético e aos “pontos motores” os quais, quando estimulados, produzem contração máxima nos músculos. Esses pontos são inativados durante o agulhamento pela acupuntura, através dos reflexos espinal e supra-espinal (CABIOGLU E CETIN, 2008).

Os pontos de acupuntura têm potencial elétrico diferente de outros pontos da pele. Têm sido demonstradas concentrações elevadas de NO e aumento na expressão de nNOS nesses pontos, o que se correlaciona com a sua baixa resistência elétrica. Estudos mostram que após a agulha ser retirada, um campo de potencial elétrico continua o estímulo por 72 horas devido à alta concentração de íons K⁺ no local da perfuração, mantendo uma estimulação prolongada (CABIOGLU

e CETIN, 2008). Admite-se que o agulhamento e a estimulação do ponto de acupuntura provocam um microtrauma o qual leva os mastócitos do derma e células ao redor da agulha a secretarem histamina, heparina, serotonina e proteases que levam a liberação de bradicinina, causando vasodilatação e edema local com migração de leucócitos e secreção de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1. Subsequentemente ocorre a estimulação do hipotálamo para secretar fator liberador de corticotrofina (CRH) e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (CABIOGLU e CETIN, 2008). A acupuntura aplicada no tecido conjuntivo, através de estímulo mecânico, causa remodelação do citoesqueleto de suas células ativando mecanismos de transdução de sinais (mecanotransdução) que interferem na regulação da expressão gênica. Também a estimulação na superfície da célula pode desencadear mobilização de Ca^{+2} , resultando em sinalização intra e inter celular. Além disso, as terminações nervosas interagem com os mastócitos, via neurotransmissores, induzindo sua degranulação e a liberação de várias biomoléculas necessárias para a homeostase, respostas imunitárias, cicatrização de feridas e regeneração tecidual (FUNG, 2009). Segundo Wang et al. (2010), os canais de Cl^- ativados pelo estiramento podem contribuir para a degranulação dos mastócitos causada pelo estímulo mecânico, ou acelerar a fusão de membrana durante o processo de degranulação. O mesmo autor demonstrou que os mastócitos do tecido conjuntivo abaixo da pele em ratos apresentam a propriedade mecanosensitiva e isto pode ter papel importante na interação entre estímulo físico e reações do corpo (WANG et al., 2009).

Dos efeitos da acupuntura, os analgésicos são os mais conhecidos. Demonstrou-se, a partir de 1976, em modelos experimentais, que a estimulação induz inibição da dor através da liberação de opióides endógenos (CHENG e POMERANZ, 1980; CHO et al., 2006; POMERANZ e CHIU, 1976). A eletroacupuntura (EA) com as frequências de 2 Hz e 100 Hz estimula a liberação de encefalina e dinorfina, respectivamente (CABIOGLU e CETIN, 2008).

Os efeitos antiinflamatórios da EA também têm sido investigados experimentalmente e estes estão relacionados aos efeitos imunomoduladores da acupuntura. Essa imunomodulação relaciona-se aos efeitos dos mediadores liberados pela acupuntura nas células do sistema imunitário (CABIOGLU e CETIN, 2008).

A via colinérgica pode justificar um mecanismo fisiológico para ação antiinflamatória da acupuntura. De fato existem muitas evidências de que a via colinérgica exerce profundos efeitos antiinflamatórios (CHO et al., 2006; KAVOUSSI e ROSSI, 2007). A origem parassimpática das ações antiinflamatórias da acupuntura é apoiada pela observação de que a estimulação elétrica do nervo vago, em camundongos desafiados com lipopolissacáride (LPS), inibe a síntese de TNF- α em órgãos ricos em células do sistema macrofágico mononuclear. O mecanismo molecular deste efeito antiinflamatório parece envolver a tirosina kinase Jak2 e o fator de transcrição STAT3, o qual é ativado via receptores da acetilcolina do tipo nicotínico $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$), presentes nos macrófagos. Demonstra a participação desses receptores, no efeito antiinflamatório do nervo vago, o fato de que a estimulação vagal em camundongos deficientes na expressão de $\alpha 7nAChR$ nos macrófagos, não desencadeia efeito antiinflamatório (KAVOUSSI e ROSSI, 2007). A estimulação do ponto E-36 simula uma estimulação vagal, pois induziu peristalse em íleo paralítico pós-operatório, em coelhos e humanos, bem como reduziu o aumento da peristalse do cólon após a administração de colecistoquinina. Também a estimulação do ponto E-36 em ratos anestesiados causou um aumento significativo da secreção ácida no estômago, o que não ocorria se os ratos eram submetidos à vagotomia (KAVOUSSI e ROSSI, 2007).

No modelo de inflamação produzida pela injeção de adjuvante completo de Freund na pata traseira do rato, a EA (10 Hz) no ponto VB-30, realizada imediatamente e 2 horas após o estímulo, reduziu significativamente o edema e a hiperalgesia e aumentou substancialmente os níveis de corticosterona no plasma, efeito não observado com a utilização de 100 Hz na EA. Outro experimento com este modelo demonstrou que a EA (10 Hz) aumentou significativamente os níveis plasmáticos de ACTH devido ativação dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (LI et al., 2007, 2008; ZHANG et al., 2005).

Na artrite induzida pelo colágeno tipo II em ratos a EA (2 Hz) no ponto E-36 reduziu a incidência da dor inflamatória. Em outro estudo com o mesmo modelo, a EA (2 Hz) no ponto E-36 mostrou redução da inflamação e dos níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α , INF- γ , anticorpo anti-colágeno II, IgG e IgM, bem como preveniu a erosão da articulação do joelho (BAEK et al., 2005; YIM et al., 2007).

Na inflamação neurogênica induzida pela injeção subcutânea de capsaicina na pata do rato, a acupuntura reduziu o edema neurogênico com eficácia equivalente à morfina. (CECCHERELLI et al., 1999, 2002; ZHAO e ZHU, 1992).

Em inflamação induzida pela injeção de zimosan em bolsa de ar subcutânea, em camundongos ou ratos, a EA (1 Hz) no ponto E-36 reduziu significativamente a migração de leucócitos para bolsa, e métodos imunohistoquímicos sugeriram ativação do sistema nervoso simpático. Outro estudo, utilizando o mesmo modelo em camundongos, com a EA (1 ou 120 Hz) realizada no ponto E-36, sugeriu que os efeitos antiinflamatórios são decorrentes de mecanismo opióide periférico, demonstrado pela sua reversão quando foi administrado naloxona via intraperitoneal, o que não aconteceu com a administração do inibidor pela via intratecal (KIM et al., 2006, 2007).

No modelo experimental de hipersensibilidade pulmonar, induzida pela instilação de ovoalbumina em aerosol, através de nebulização em ratos previamente sensibilizados (modelo que mimetiza asma em humanos), a EA (52 Hz) realizada em pontos específicos para tratar asma, em dias alternados, durante duas semanas, reduziu a inflamação brônquica, demonstrada histopatologicamente pela redução significativa de infiltrados inflamatórios perivasculares e peribrônquicos. Além disso, foi notada uma redução importante da contagem total de células e do percentual de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) no lavado bronco- alveolar (CARNEIRO et al., 2005). Outro estudo, realizado pelo mesmo grupo, utilizou ratos sensibilizados com ovoalbumina por via subcutânea e desafiados com ovoalbumina acoplada a partículas de sefarose, administrada intravenosamente. A acupuntura e eletroacupuntura foram realizadas nos pontos GV-14 e B-13, (acupuntura) e P-1, CV-17, E-36 e BP-6, (eletroacupuntura) duas vezes por semana, durante duas semanas do período de sensibilização, e durante uma semana após o desafio. Demonstraram redução do infiltrado inflamatório eosinofílico e da deposição de colágeno nos pulmões, em torno das partículas de sefarose-albumina. A dosagem de corticosterona no plasma não mostrou diferenças significativas (KATSUYA et al., 2009).

No modelo de pancreatite aguda pela colecistoquinina em ratos, a EA em frequências de 2 Hz e 100 Hz durante 7 dias, reduziu o peso do pâncreas, aumentou a expressão das proteínas do choque térmico (HSP60 e HSP72) e reduziu

significativamente os níveis de β amilase, lípase, IL-1. Além disso, houve redução nos níveis de TNF- α (CHO et al., 2006).

Em modelo de peritonite induzida por carragenina em ratos, a acupuntura manual realizada 10 minutos e 2 horas após o estímulo inflamatório, mostrou inibição de IL-1 β , porém não alterou os níveis de TNF- α e IL-10 no exsudato inflamatório (SCOGNAMILLO-SZABÓ, BECHARA e CUNHA, 2005).

Já os efeitos antiinflamatórios da acupuntura em doenças inflamatórias humanas são ainda questionáveis, não havendo estudos com metodologia adequada para a sua avaliação (BHATT-SANDERS, 1985; ZIJLSTRA et al., 2003).

Há, portanto, demonstração de que a EA induz redução da resposta inflamatória nos diferentes modelos experimentais estudados, ainda que em nenhum deles os mecanismos envolvidos tenham sido demonstrados com precisão. Admite-se que a EA estimule mecanismos antiinflamatórios ligados ao eixo hipotálamo-hipófise supra-renal, à liberação de opióides e à possível estimulação do sistema nervoso autônomo, todos conhecidos como tendo efeito antiinflamatório natural (AHLUWALIA, 1998; MORAND e LEECH, 2001).

Ao lado dos efeitos antiinflamatórios, tem sido demonstrado que a EA poderia influenciar a imunorreatividade em humanos e animais experimentais, aumentando a atividade fagocitária de leucócitos, melhorando a imunidade celular ou inibindo o choque anafilático (ZHOU et al., 1988; FUJIWARA et al., 1991; MOON et al., 2007; ROGERS, SCHOEN e LIMEHOUSE, 1992; KARST et al., 2003).

Moon et al (2007), utilizando modelo de anafilaxia cutânea passiva (ACP) em camundongos submetidos à EA (2 Hz ou 120 Hz) no ponto E-36, por 10 minutos, demonstraram inibição significativa da reação, bem como da atividade da β -hexosaminidase e IL-6 no tecido onde ela foi realizada. Demonstraram ainda, que houve redução da capacidade do NF κ B em se ligar ao DNA. Concluíram que a EA inibe efeitos anafiláticos, mediados por mastócitos e tem efeitos antiinflamatórios.

Em revisão recente, Cho et al (2006) comentaram trabalhos recentes de Tracey et al (2002), que relataram a interação entre o sistema nervoso autônomo e a função imune e mostraram como o cérebro comunica estes dois sistemas. Estes estudos proporcionaram importantes pistas para a formulação e compreensão dos mecanismos da acupuntura. Segundo as observações de Tracey et al (2002), a

estimulação do nervo vago e de nervo somático produz efeitos antiinflamatórios. Os autores da revisão, baseados nos conceitos estabelecidos nas observações de Tracey et al (2002), propuseram que os sinais aferentes visceral e somático proporcionados pela acupuntura podem ser transmitidos para o nível supra espinhal induzindo reflexos antiinflamatórios através de vias humoral e neural. A via humoral, originada do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (HPA), libera hormônios antiinflamatórios tais como glicocorticóides e β endorfina, e citocinas como IL-10, que agindo principalmente em macrófagos, reduzem a inflamação e a dor. A via neural, simpática, induz liberação de norepinefrina, com ativação de receptores β_2 adrenérgicos nas células do sistema imunitário, com redução nas citocinas pró inflamatórias TNF- α , IL-1beta, IL-6 e IL-18 e aumento de IL-10. A via neural parassimpática, pelo nervo vago, induz liberação de acetilcolina que age sobre macrófagos e células dendríticas, suprimindo a síntese de TNF- α e IL-1 β . Existe ainda a via neural a partir dos núcleos periventricular e arqueado do hipotálamo com projeção para área periaquedutal cinzenta, daí para núcleos da rafe e corno dorsal da medula espinhal, conhecida como a via inibitória de dor descendente central, bem demonstrada por métodos de neuroimagem durante a realização de acupuntura. Pode-se observar que os dados da literatura revistos por Cho et al. (2006) levam a admitir que os efeitos da acupuntura sejam explicados através da ativação do eixo HPA, cujas respostas têm componentes eminentemente antiinflamatórios.

Outro efeito antiinflamatório (imunomodulador) da acupuntura seria decorrente da estimulação da secreção de opióides (β endorfina) que encontram receptores nas células do sistema imune. Tais receptores, semelhantes aos receptores opióides do sistema nervoso central, têm sido encontrados em linfócitos B e linfócitos T, células NK, granulócitos, mastócitos, monócitos, e plaquetas. Há demonstrações que endorfina e encefalina aumentam a atividade de células natural killer, a geração de linfócitos T citotóxicos, a quimiotaxia de monócitos e a produção de INF γ , IL-1, IL-2, IL-4 e IL-6 (CABIOGLU e CETIN, 2008).

Vários estudos têm sido feitos em voluntários, com avaliação do comportamento de células do sistema imunitário após a ação da EA.

Um estudo em 40 voluntários jovens saudáveis, a EA realizada com 1 Hz, demonstrou mudança do padrão da contagem de leucócitos, caracterizada por uma

inversão no padrão quantitativo de granulócitos e linfócitos: indivíduos com maior número de granulócitos e menor número de linfócitos passaram a apresentar menor número de granulócitos e maior número de linfócitos e vice versa. Houve ainda após a EA uma redução da frequência cardíaca, atribuída à estimulação da atividade parassimpática. Os autores não apresentam uma explicação para as alterações observadas na leucometria, apenas concluindo que a acupuntura pode alterar parâmetros das células do sistema imunitário (MORI et al., 2002).

Outro estudo em voluntários sadios utilizou a acupuntura aplicada nos pontos BL-18, BL-20, BL-23 e E-36, em uma única vez, demonstrando um aumento significativo de células CD2, CD4, CD8, CD11b, CD16, CD19, CD56 no sangue periférico, assim como um aumento nos níveis de IL-1beta, IL-4, INF gama, sugerindo que acupuntura pode regular a imunidade celular, humoral e atividade de célula NK (YAMAGUCHI et al., 2007).

Estudo piloto, realizado em humanos, tentou avaliar o efeito da acupuntura na atividade fagocítica dos PMN, através da medida da explosão respiratória induzida por *E. coli*, TNF- α /FMLP e FMLP, 48 horas após a quarta e 48 horas após a oitava sessões de acupuntura realizadas no ponto IG-11 duas vezes por semana. O estudo foi feito com controle (agulha sem estimulação ou sem a penetração da agulha). No grupo onde foi realizada acupuntura real, a explosão respiratória dos PMN foi significativamente elevada. Os níveis de β endorfina diminuíram, porém sem significância estatística. No grupo controle, onde não houve penetração da agulha, a explosão respiratória aumentou após a oitava sessão, sugerindo efeitos psicológicos associados ao efeito placebo os quais podem ser mediados pelo sistema opióide endógeno. Em oposição a esses resultados, outro estudo realizado com 16 voluntários sadios, com o uso de acupuntura no ponto IG-11, bilateralmente, com permanência das agulhas por 30 minutos, que avaliou percentual de neutrófilos ativados por TNF- α /FMLP, FMLP e *E. coli* 30 minutos antes e 30 minutos após um único tratamento, não demonstrou nenhum efeito imediato na explosão respiratória de PMN (KARST et al., 2002., KARST et al., 2003).

Alterações na atividade de células do sistema imunitário têm sido também relatadas em estudos experimentais. Em ratos, a EA realizada no ponto E-36, mostrou um aumento de IL-2, INF γ e da atividade de células natural killer do baço e também dos níveis de β endorfina e INF γ no soro. Após o uso de naloxona, o

aumento da atividade de célula NK e INF γ foi menor, sugerindo que a EA aumenta a secreção de β endorfina no baço (MILLAR et al., 1990; JANKOVIC, 1994; citados por CABIOGLU e CETIN, 2008).

Em modelo de colite ulcerativa em ratos, usando mucosa colônica de humano como antígeno, EA ou moxabustão realizadas nos pontos Ren-6 e E-25 (2 Hz), por 20 minutos, uma vez ao dia, durante 14 dias, mostraram promoção da apoptose de neutrófilos e redução das concentrações de IL-1 beta, IL-6 e TNF- α , com evidência de melhora histológica da colite (WU et al., 2007).

Em estudo realizado com acupuntura aplicada no ponto E-36 em ratos, com estimulação manual, se observou importante efeito analgésico, bem como aumento significativo na densidade de mastócitos nos tecidos musculares e pele do acuponto e também aumento no grau de degranulação dos mastócitos. O uso de cromoglicato de sódio, injetado previamente no ponto E-36 inibiu a degranulação dos mastócitos induzida pela acupuntura e atenuou o seu efeito analgésico (ZHANG et al., 2008).

Em modelo experimental de síndrome do intestino irritável, em ratos, foi investigado o efeito da EA na substância P, receptor de substância P (SPR) e hormônio liberador de corticotrofina (CRH). EA foi realizada nos pontos E-25 e E-37 (2/50 Hz), por 15 minutos, uma vez ao dia, durante sete dias. O limiar de sensibilidade visceral foi significativamente menor no grupo com intestino irritável que o grupo normal e significativamente maior no grupo com EA em relação ao grupo experimental. Como também, ficou demonstrado que o número de mastócitos de mucosa foi maior no grupo experimental, em comparação com o grupo normal e significativamente menor no grupo com EA, em relação ao grupo com intestino irritável. O nível de CRH no hipotálamo foi significativamente mais alto no grupo experimental que o grupo normal, o qual foi marcadamente diminuído após a EA. A SP e a expressão de SPR no cólon estavam diminuídas após o tratamento com EA (MA et al., 2009).

Como podem ser observados nos dados da literatura, os estudos em humanos ou em animais de laboratório sobre a influência da acupuntura na resposta imunitária, são ainda incipientes e muitas vezes controversos, ainda que alguns dados apontem para aumento da atividade imunitária inata e adaptativa. Por outro lado os dados também apontam para uma ação antiinflamatória da acupuntura, o

que pode alterar a resistência a alguns agentes infecciosos, já que a inflamação representa a execução das respostas imunitárias inata e adaptativa.

Existe uma investigação sobre acupuntura e infecção, em modelo de peritonite induzida por ligadura e punção do ceco (LPC) em ratos. Acupuntura manual foi realizada imediatamente após LPC nos pontos para tratamento de doenças relacionadas à febre. Nesse modelo, acupuntura mostrou resultados favoráveis para o controle da infecção, evidenciados pelo aumento da migração de neutrófilos e redução do número de bactérias na cavidade peritoneal, observado 6 horas após a LPC. Esse resultado é em parte contraditório, pois mostrou a acupuntura potencializando a inflamação, fato demonstrado pelo aumento do exsudato de neutrófilos. É possível que os efeitos da acupuntura sobre inflamações estéreis sejam diferentes dos seus efeitos em inflamações produzidas por agentes infecciosos. Por essa razão foi planejada a presente investigação, com o intuito de verificar o efeito da acupuntura sobre um modelo de peritonite fecal no camundongo, induzido por injeção intraperitoneal de fezes. Esse modelo é de mais fácil controle, pois utiliza uma inoculação de uma quantidade conhecida de fezes, sem interferência de procedimentos cirúrgicos, como no modelo de ligadura e punção do ceco. (SCOGNAMILLO-SZABÓ et al., 2004).

A EA em animais de laboratório, na maioria das vezes, requer a utilização de anestésicos e estes podem alterar a resposta imunitária e como consequência a inflamação e a resistência a infecções (ADAMS et al., 2008; YU et al., 2007; SONG et al., 2006). Por esta razão, foram feitos experimentos prévios, paralelos, para verificar o efeito da anestesia a ser utilizada (ketamina + xilazina) na evolução da peritonite produzida pela inoculação de fezes na cavidade peritoneal de camundongos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar o efeito da acupuntura sobre a peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de uma suspensão de fezes em camundongos.

Objetivo secundário: Avaliar o efeito da anestesia com ketamina e xilazina na evolução da peritonite pela injeção intraperitoneal de uma suspensão de fezes em camundongos.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da UFES e foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentos Animais (COBEA). O modelo de peritonite produzido por *Staphylococcus aureus*, foi substituído por inoculação intraperitoneal de fezes em camundongos (Anexo A).

3.1. Animais utilizados nos experimentos

Foram utilizados 88 camundongos albinos, suíços, machos, não isogênicos, originados do biotério de Instituto Biológico do Espírito Santo, mantidos em armário biotério Alesco, com ventilação constante, ciclo claro escuro de 12h, temperatura ambiente de 24^o C e acesso livre a água e ração comercial apropriada para a espécie. O peso dos animais variou entre 27 e 32g.

3.2. Indução da peritonite fecal

O modelo de peritonite fecal utilizado foi o da injeção intraperitoneal de uma suspensão de fezes. Esse modelo é de fácil controle na sua indução (a quantidade de fezes) e no seu acompanhamento através da observação das manifestações sistêmicas nas primeiras 72 horas (resposta inflamatória sistêmica) quando a mortalidade pode ser alta e da formação de abscessos intraperitoneais que estão bem evidenciados na segunda semana após o inóculo das fezes. A utilização de suspensão de fezes menos diluídas (1:6) induz choque endotóxico com alta mortalidade nas primeiras 48 horas. Já a utilização de fezes mais diluídas (1:9) induz mortalidade mínima e formação de abscessos intraperitoneais de fácil observação nos sobreviventes (BERMUDES, 2007).

3.2.1. Obtenção das fezes

A amostra de fezes foi obtida do ceco e primeira porção do intestino grosso de camundongos saudáveis, adultos, eutanasiados com CO₂. As fezes pastosas

foram pesadas e diluídas a 1:9 em solução salina. A homogeneização da suspensão foi feita através de várias aspirações com pipeta de Pasteur (BERMUDES, 2007).

3.2.2. Indução da infecção na cavidade peritoneal

A suspensão de fezes foi inoculada na cavidade peritoneal em um volume de 4 μ l/ g de peso corporal, utilizando uma seringa de tuberculina armada com uma agulha 18 G1/2.

3.3. Estimulação com Eletroacupuntura

3.3.1. Inserção das agulhas

Os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (16mg/kg) por via intraperitoneal. A pele das patas foi limpa com álcool a 70%. As agulhas utilizadas foram de material inoxidável, com 0.25 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento, (Dangbang, Korea), devidamente esterilizadas. Foram inseridas bilateralmente nos pontos E-36 (correspondente ao Zusanli em humanos), em uma profundidade de 2 a 3 mm, e VB-30, em uma profundidade de 4 a 5 mm, contidas com adesivo, permanecendo no local por 30 minutos. Esses locais de inserção já foram utilizados nos trabalhos experimentais em camundongos para estudo do efeito da acupuntura na inflamação (CECCHERELLI et al., 2002).

3.3.2. Eletroestimulação

Foi feita com corrente elétrica alternada com 1 a 3 mA, aumentando-se gradualmente 1mA a cada 5 minutos (sendo com corrente de 3 mA durante 20 minutos), com uma frequência fixada em 2Hz e duração de 30 minutos. Foi utilizado aparelho de eletroestimulação modelo HANZ 202. Os aparelhos foram devidamente aferidos no laboratório de calibração da Companhia Siderúrgica do Tubarão.

A figura 1 mostra o aparelho utilizado para a eletroestimulação e os locais onde as agulhas foram inseridas no animal controle da agulha e no que foi submetido à eletroacupuntura.

3.4. Avaliação da evolução da infecção

A evolução da infecção foi feita pela contagem dos leucócitos na cavidade peritoneal 24 horas após o inóculo da suspensão fecal e pela avaliação dos abscessos intraperitoneais 14 dias após a indução da peritonite fecal.



Figura 1 - Pontos onde as agulhas foram inseridas (E-36 e VB-30) no animal controle da agulha e no que foi submetido à eletroacupuntura.

3.4.1. Avaliação do exsudato inflamatório na cavidade peritoneal

O exsudato inflamatório foi avaliado 24 horas após o inóculo das fezes. Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, e após desinfecção com álcool a 70%, a cavidade peritoneal foi lavada com solução salina estéril com 5 ml de PBS contendo 1 mM EDTA, e após uma leve massagem no abdome foi aspirado o exsudato.

O aspirado foi utilizado para contagem e caracterização das células do exsudato. A contagem global foi feita em câmara de Neubauer, após diluição em solução de Turk (violeto de genciana a 0,1% em ácido acético a 2%). A contagem diferencial foi feita após sedimentação em citocentrífuga, com a velocidade de 800 rpm, por 10 minutos. O sedimento foi fixado em álcool metílico e corado com corante

panótico rápido (Laborclin). Foram contadas 200 células por animal, separadamente os neutrófilos e mononucleares.

3.4.2. Avaliação dos abscessos intraperitoneais.

A avaliação dos abscessos intraperitoneais foi feita 14 dias após a indução da peritonite. Após eutanásia com CO₂ os animais eram submetidos à necropsia, e os abscessos foram contados e medidos (em mm), sendo classificados em três grupos para obtenção dos escores: grupo 1, até 2 mm, recebendo escore 1; grupo 2, entre 2 e 5 mm, recebendo escore 2 e grupo 3, acima de 5 mm, recebendo escore 3. O escore total para os abscessos contados em cada animal foi obtido pela soma dos valores obtidos pelo número de abscessos em cada grupo multiplicado pelo valor do escore.

De cada animal foram retirados o fígado e o baço, que eram pesados com precisão de três decimais. O peso do fígado e do baço foi expresso em miligrama de tecido por grama de peso corporal.

3.5. Delineamento experimental

3.5.1. Experimento 1: Avaliação do efeito da anestesia com ketamina e xilazina na evolução da peritonite fecal em camundongos.

O experimento foi realizado com 32 camundongos machos com seis a oito semanas de idade. Os animais foram separados em dois grupos de 16 camundongos por grupo. Um grupo recebeu anestesia com ketamina (80mg/kg) e xilazina (16mg/kg) por via intraperitoneal (grupo anestesia) e o outro recebeu igual volume de salina (grupo controle). Os dois grupos foram inoculados com a suspensão de fezes (1:9) no volume de 4 µl/g de peso corporal. Os animais foram acompanhados de 12 em 12 horas até 72 horas e diariamente até 14 dias, para verificação da mortalidade. Foi realizada a contagem de abscessos intraperitoneais 14 dias após a indução da peritonite.

3.5.2. Experimento 2: Avaliação do efeito da eletroacupuntura na evolução da peritonite fecal em camundongos.

Como o experimento com eletroacupuntura é demorado (30 a 40 minutos) e o laboratório só possuía um aparelho para realizá-lo, se decidiu por fazer experimentos pareados, ou seja, em cada dia era feito o experimento com um animal de cada grupo. Isso garantiu que todos os animais receberam fezes obtidas no mesmo dia, e com intervalo muito pequeno entre uma e outra inoculação. Desse modo, eram utilizados quatro animais por dia, cada um pertencendo a um grupo (um controle sem anestesia, um anestesiado, um controle da agulha e um eletroacupuntura), todos recebendo o inóculo intraperitoneal de fezes. Esse experimento com quatro animais simultaneamente, foi repetido nove vezes, havendo, portanto nove pares para comparação (36 animais ao todo, com nove animais em cada grupo). Os quatro animais de cada grupo eram eutanasiados 24 horas depois, para contagem das células na cavidade peritoneal.

Como os experimentos para verificar o efeito da anestesia sobre a evolução da peritonite mostraram que ela aumentou o número de abscessos na cavidade peritoneal, e como os animais para receberem as agulhas, com ou sem eletroestimulação, eram sempre anestesiados, os experimentos para a verificação da evolução da peritonite (contagem e tamanho dos abscessos) foram feitos apenas em um par de cada vez: um animal com agulha e outro com eletroacupuntura (ambos anestesiados). Na realidade o controle mais importante para o efeito da eletroacupuntura foi o animal que recebeu anestesia e a agulha, mas sem estimulação elétrica. Estes experimentos foram realizados com 10 repetições, sendo um par de cada vez, totalizando 10 animais com anestesia e agulha sem eletroestimulação (o grupo controle da agulha) e 10 animais que receberam a agulha e a eletroestimulação (grupo eletroacupuntura).

Nos experimentos pareados, quer com quatro ou com dois animais, os procedimentos eram os mais simultâneos possíveis. Todos receberam a anestesia no mesmo momento e foram inoculados também na mesma hora. Os experimentos foram sempre realizados pela manhã, no mesmo horário para cada grupo. A figura 2 resume o delineamento experimental.

3.6. Tratamento estatístico dos resultados

Para avaliação dos efeitos da anestesia sobre a evolução da peritonite fecal, foram utilizados testes estatísticos não paramétricos para comparar os resultados (teste de Mann Whitney e curvas de sobrevivência de Kaplan-Meyer, com o teste log-rank). Quando os experimentos foram pareados, foi utilizado o teste **t** de Student, pareado, para comparação de médias. Todos os testes foram bicaudais (pela hipótese, o tratamento poderia piorar, melhorar ou ainda não alterar o curso da infecção) e se considerou o valor de p menor do que 0,05 como valor crítico para significância.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da anestesia sobre a evolução da peritonite fecal

O número de células exsudadas na cavidade peritoneal 24 horas após a inoculação das fezes não diferiu significativamente entre o grupo que recebeu e o que não recebeu anestesia, embora com tendência a um aumento no grupo que recebeu anestesia (figura 6).

A mortalidade também não foi significativamente diferente. A figura 3 mostra a curva de sobrevivência (Kaplan-Meyer) na qual o teste logrank mostrou $p=0,561$.

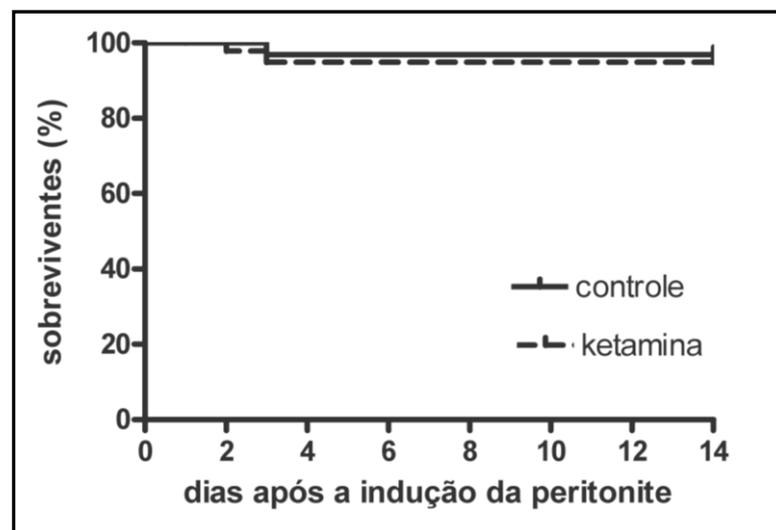


Figura 3 - Curva de sobrevivência (Kaplan-Meyer) dos camundongos anestesiados com ketamina e xilazina (ketamina) ou não anestesiados (controle), nos quais foi induzida uma peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina. Teste logrank, $p=0,561$.

Já o número de abscessos e o seu tamanho, indicado pelo escore, (relacionando número e tamanho) foi significativamente maior no grupo que recebeu anestesia em comparação com o grupo controle (Figura 4).

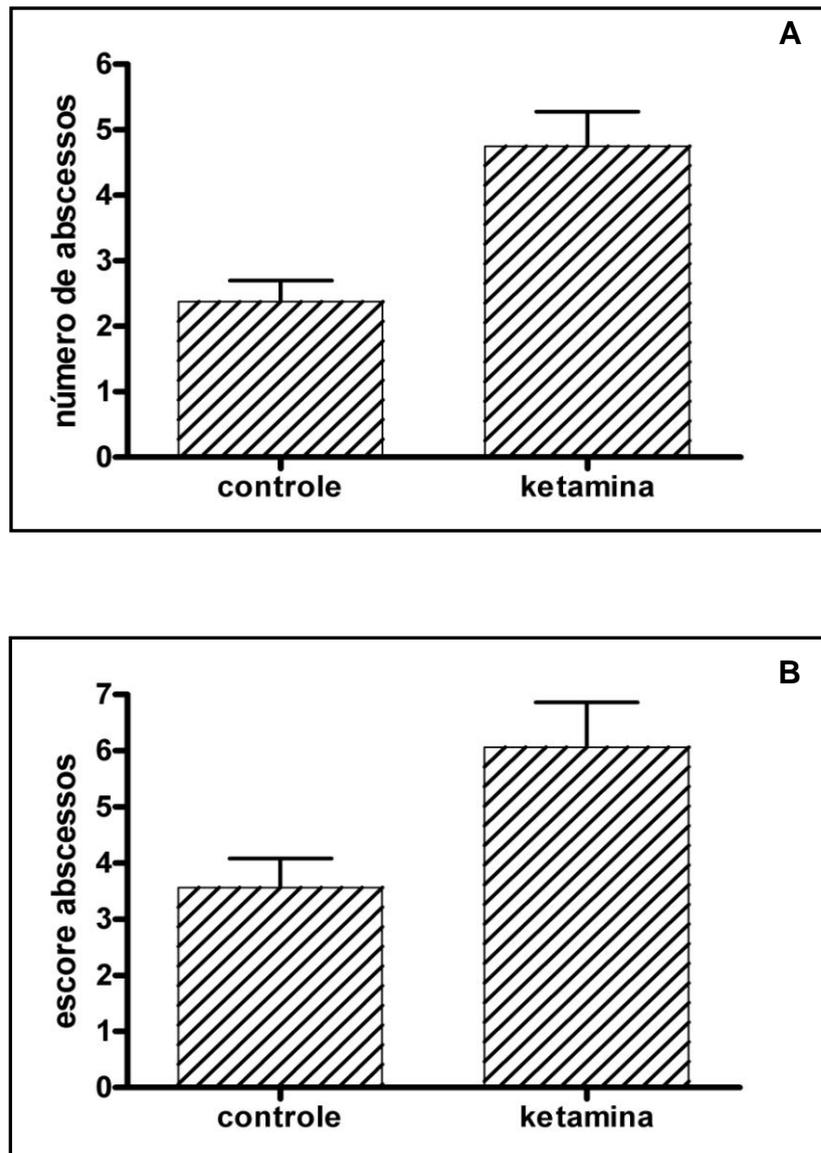


Figura 4 - Número (A) e escore (B) dos abscessos intraperitoneais observados 14 dias depois da indução de peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina, em camundongos anestesiados com ketamina e xilazina (ketamina) ou não anestesiados (controle). Teste de Mann-Whitney: número de abscessos: $p=0,003$; escore abscessos $p=0,001$.

O peso do fígado e do baço foi maior no grupo que recebeu anestesia, embora a diferença não tenha sido significativa (Figura 5).

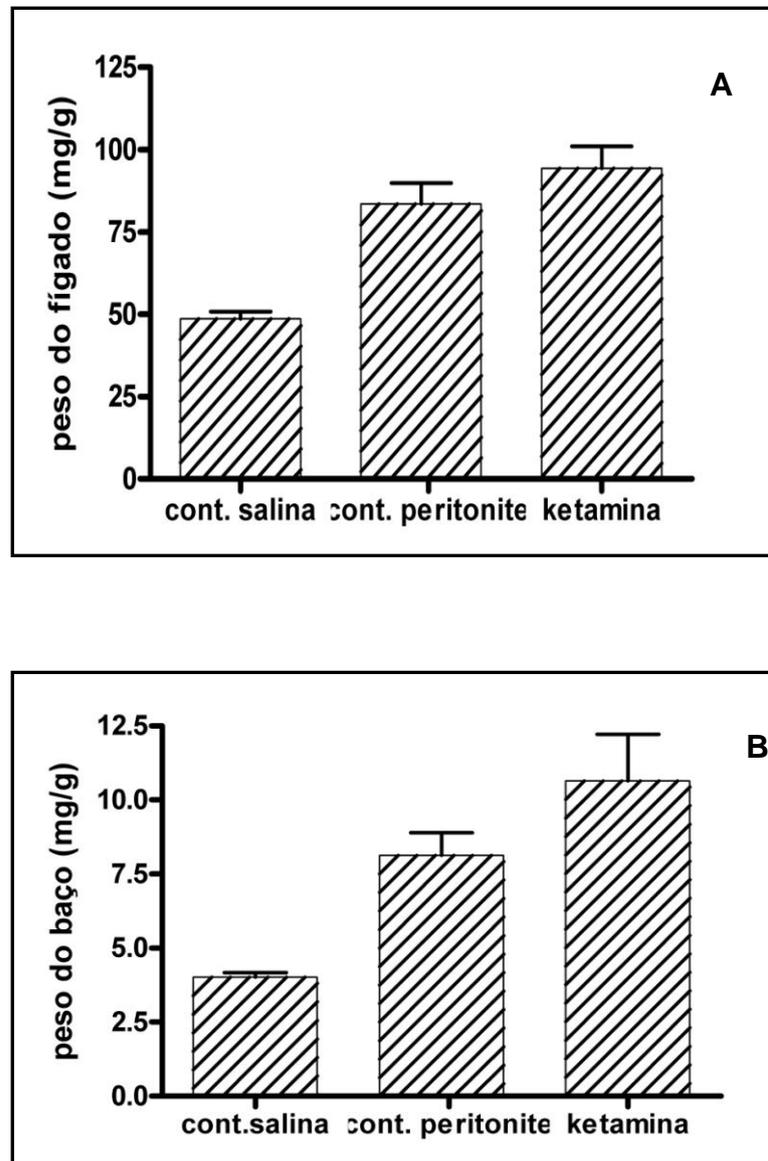


Figura 5 - Peso do fígado (A) e do baço (B) observados 14 dias depois da indução de peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina, em camundongos anestesiados com ketamina e xilazina (ketamina) ou não anestesiados (controle peritonite). O grupo controle salina representa animais que receberam salina i.p e não foram inoculados com a suspensão fecal. Teste de Mann-Whitney; fígado: cont. peritonite x ketamina, $p=0,265$; baço: cont. peritonite x ketamina, $p=0,431$; para fígado e baço, cont. salina x cont. peritonite ou x ketamina, $p<0,05$.

4.2. Efeitos da eletroacupuntura na evolução da peritonite fecal no camundongo

Quando se compara o número de neutrófilos exsudados 24h após a inoculação da suspensão fecal verifica-se que houve um aumento significativo no grupo que recebeu eletroacupuntura, quando comparado com o grupo que recebeu somente a agulha, sem eletroestimulação (Figura 6).

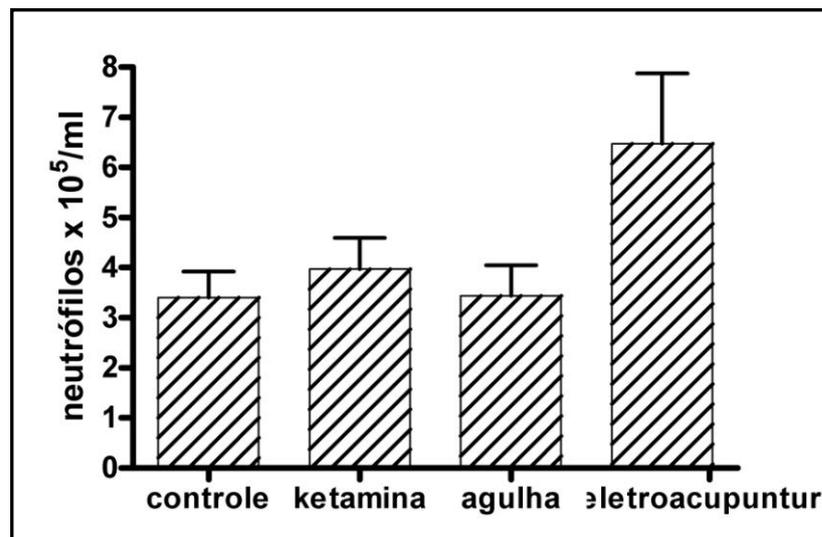


Figura 6 - Contagem de neutrófilos na cavidade peritoneal, 24 horas após a inoculação de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina, em camundongos que receberam salina i.p (controle) ou anestesia com ketamina e xilazina (ketamina), ou anestesia com ketamina e xilazina, com inserção das agulhas nos pontos E-36 e VB-30, sem eletroestimulação (agulha) ou anestesia com inserção das agulhas nos pontos E-36 e VB-30, com eletroestimulação (eletroacupuntura). Os experimentos foram pareados, (4 animais por experimento) com nove repetições. Teste t de Student pareado: controle x ketamina e controle x agulha, $p > 0,05$; agulha x eletroacupuntura, $p = 0,011$.

Os experimentos pareados mostraram que os animais que receberam a eletroacupuntura apresentaram maior número de leucócitos na cavidade peritoneal tanto em relação ao grupo controle da agulha como também em relação aos grupos que receberam somente anestesia ou que receberam somente solução salina intraperitoneal antes da indução da peritonite.

A evolução da peritonite também foi diferente nos animais que receberam a eletroacupuntura: o número e o tamanho dos abscessos (o escore relacionando

número e tamanho) foi significativamente menor em comparação com o grupo que recebeu somente a agulha, sem eletroestimulação (figura 7).

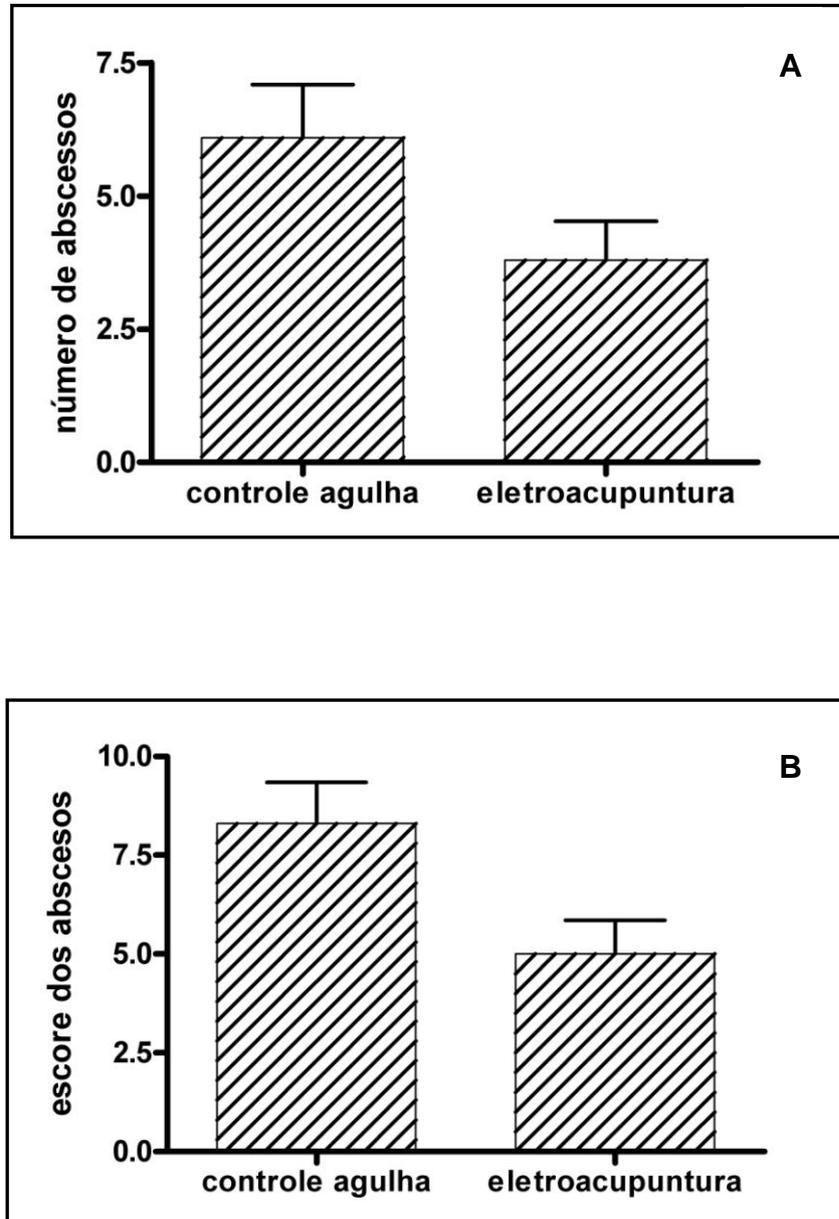


Figura 7 - Número (A) e escore (B) dos abscessos intraperitoneais observados 14 dias depois da indução de peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina, em camundongos anestesiados com ketamina e xilazina que receberam inserção de agulhas nos pontos E-36 e VB-30 sem eletroestimulação (controle agulha) ou que receberam a inserção da agulhas nos mesmos pontos, mas seguida de eletroestimulação 2 Hz (eletroacupuntura). Teste T de Student pareado: número de abscessos, $p=0,042$; escore abscessos, $p=0,028$.

Houve hepatomegalia e esplenomegalia, sem diferenças significativas entre os dois grupos (Figuras 8a e 8b).

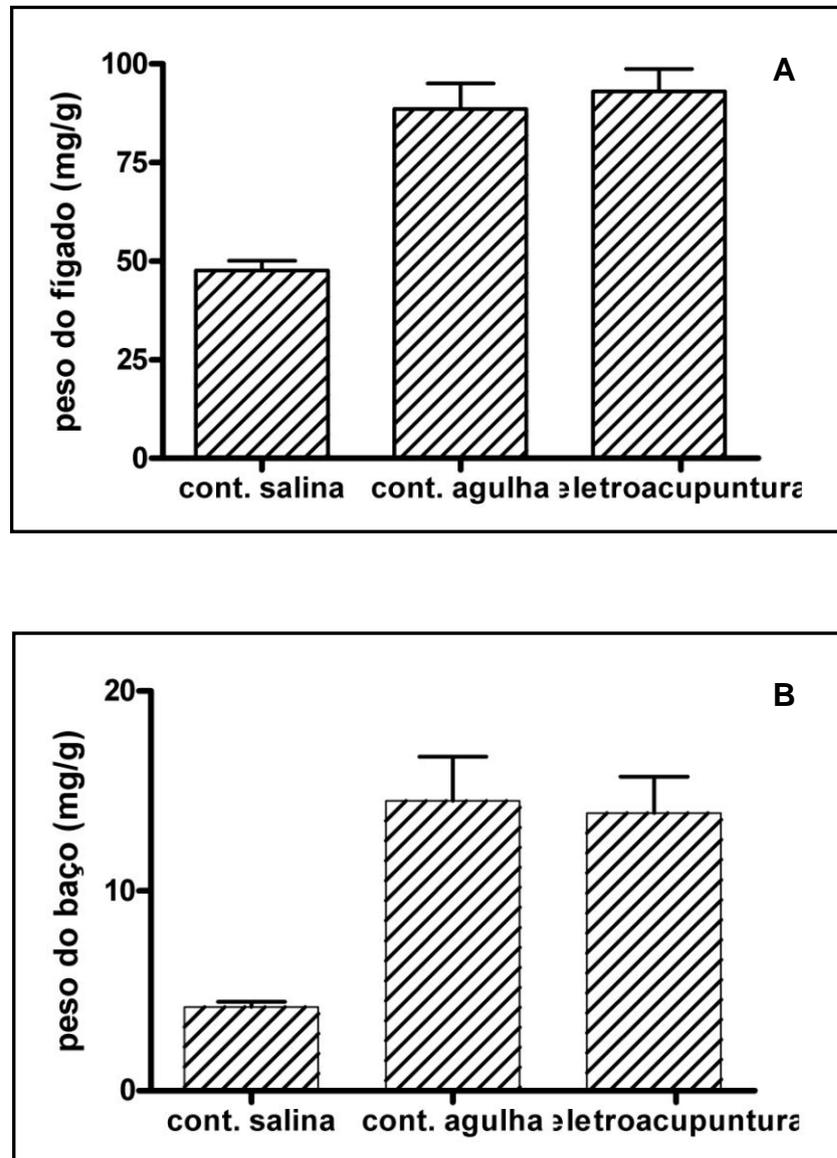


Figura 8 - Peso do fígado (A) e do baço (B) observados 14 dias depois da indução de peritonite fecal por inoculação intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 (peso/vol) em salina, em camundongos anestesiados com ketamina e xilazina que receberam inserção de agulhas nos pontos E-36 e VB-30 sem eletroestimulação (controle agulha) ou que receberam a inserção das agulhas nos mesmos pontos, mas seguida de eletroestimulação 2 Hz (eletroacupuntura). Animais que receberam salina intraperitoneal e não foram inoculados com a suspensão fecal, foram utilizados para avaliação do peso dos órgãos na ausência da peritonite. Teste de Mann-Whitney: peso do fígado: $p=0,233$; peso do baço, $p=0,616$.

5. DISCUSSÃO

5.1. Comentários sobre o modelo de peritonite polimicrobiana utilizado nos experimentos

A evolução da peritonite polimicrobiana por injeção intraperitoneal de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 foi a esperada: a mortalidade foi mínima e os animais desenvolveram abscessos intraperitoneais, que puderam ser facilmente observados no fim de duas semanas de evolução. Esse modelo tem a vantagem de ser mais facilmente controlável devido à inoculação da mesma suspensão de fezes, na mesma quantidade nos grupos controle e experimental. Os animais desenvolveram hepatomegalia e esplenomegalia reacionais à peritonite, com aumento da polpa vermelha e dos folículos linfáticos no baço e aumento do número de células de Kupffer nos sinusóides hepáticos.

5.2. Efeitos da anestesia com ketamina e xilazina sobre a evolução da peritonite fecal em camundongos

Os resultados mostraram que a anestesia com ketamina e xilazina, por via intraperitoneal, piorou a evolução da peritonite fecal, embora não tenha alterado significativamente a mortalidade. A pior evolução foi demonstrada pelo número e o escore dos abscessos, significativamente maiores no grupo que recebeu a anestesia, o que indica ter sido menor o poder microbicida da cavidade peritoneal nesse grupo. A hepatomegalia e a esplenomegalia, reacionais à peritonite, foram maiores no grupo que recebeu a anestesia, embora a diferença não tenha sido significativa, o que é explicado pela maior gravidade da peritonite no grupo que recebeu ketamina.

Esse efeito facilitador de uma infecção induzida pela ketamina associada à xilazina pode estar relacionado ao fato de a ketamina modular a resposta inflamatória, induzindo redução na síntese de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α , IL-1 e IL-6. Vários trabalhos experimentais em roedores, utilizando diferentes modelos de resposta inflamatória sistêmica induzida por injeção endovenosa ou endotraqueal de endotoxina (LPS) ou por peritonite polimicrobiana (ligadura e punção do ceco), demonstraram que nas primeiras horas após a indução

da agressão a ketamina reduz significativamente os níveis séricos de IL-1 TNF- α , IL-6 e IFN γ , mantendo normal a produção de IL-10 (HAITSMA et al., 2009; SONG et al., 2006; TANIGUCHI et al., 2003a, 2003b; YU et al., 2007; ADAMS et al., 2008). Induz ainda redução na expressão de TLR 2 e 4 (Toll Like Receptors) e CD11b nos leucócitos, importantes no reconhecimento e resposta a agressões microbianas (YU et al., 2007; SONG et al., 2006; ADAMS et al., 2008). Desse modo, a ketamina induz, durante o seu período de ação, um estado antiinflamatório que pode facilitar a invasão de micro-organismos e a diminuição dos efeitos da resposta inflamatória sistêmica. Por essa razão, embora tenha potencializado a infecção, fato demonstrado pelo maior número e tamanho dos abscessos, não alterou a mortalidade precoce. Não há na literatura nenhuma informação sobre o efeito da ketamina potencializando infecções, mas tal efeito foi demonstrado para anestésicos gasosos, também com efeito antiinflamatório (MOUDGIL, 1986).

5.3. Efeitos da Eletroacupuntura na evolução da peritonite fecal no camundongo

Nos experimentos aqui relatados a eletroacupuntura foi sempre realizada após anestesia e introdução da agulha perfurando a pele, seguido do estímulo elétrico. O melhor controle para verificar o efeito da eletroacupuntura na evolução da peritonite, é um grupo de camundongos que tenham recebido a anestesia e a mesma agulha (no mesmo local, mesma profundidade e durante o mesmo período), sem o estímulo elétrico. Por essa razão, toda avaliação do efeito da eletroacupuntura foi realizada comparando esses dois grupos: controle da agulha e eletroacupuntura.

Os resultados mostraram que a eletroacupuntura aumentou significativamente o exsudato de leucócitos na cavidade peritoneal nas primeiras 24 horas após o inóculo da suspensão fecal. E também, reduziu significativamente o número e o tamanho dos abscessos intraperitoneais observados no fim de duas semanas. Esses dados indicam que a eletroacupuntura aumentou a resistência dos animais à peritonite bacteriana. O maior número de leucócitos exsudados eliminou maior quantidade de bactérias nas primeiras horas do processo, resultando na formação de menor número de abscessos peritoneais nos dias subseqüentes.

Não há, com os dados colhidos da literatura, informações suficientes para tentar explicar os resultados observados. Aparentemente, são paradoxais, já que em diversos modelos experimentais, tem sido demonstrado que a acupuntura exerce efeitos predominantemente antiinflamatórios (ZHAO e ZHU, 1992; CECCHERELLI et al., 1999 e 2002; CARNEIRO et al., 2005; ZHANG et al., 2005; BAEK et al., 2005; KIM et al., 2006 e 2007; CHO et al., 2006; LI et al., 2007 e 2008; YIM et al., 2007; WU et al., 2007; KATSUYA et al., 2009). Alguns poucos estudos em humanos também observaram efeitos antiinflamatórios da acupuntura ou da eletroacupuntura (BHATT-SANDERS, 1985; ZIJLSTRA et al., 2003; MOON et al., 2007). Os efeitos antiinflamatórios da eletroacupuntura, associados aos efeitos antiinflamatórios do anestésico, seriam facilitadores da infecção.

Existem apenas dois relatos de observações experimentais sobre o efeito da acupuntura em peritonite, utilizando modelos diferentes. Scognamillo-Szabó e colaboradores (2004) estudaram o efeito da acupuntura sobre peritonite polimicrobiana produzida por ligadura e punção do ceco (LPC) em ratos. Produziram a peritonite em duas formas: uma letal (20 perfurações no ceco) e uma não letal (duas perfurações no ceco). Verificaram que no grupo que recebeu acupuntura (em dois esquemas: 0, 2 e 4h e 0, 1:30, 4:30, 6, 10 e 14 horas após a ligadura e punção do ceco), a migração de neutrófilos foi maior e a quantidade de bactérias foi menor no grupo com a forma letal, 6h após a LPC, fenômeno mais evidente nos animais submetidos ao primeiro esquema de acupuntura. Os autores admitiram que acupuntura reverteu a inibição da migração dos leucócitos para a cavidade peritoneal, induzida pela sepse grave decorrente da LPC, melhorando assim o poder microbicida da cavidade. Sugeriram, ainda, que esse efeito da acupuntura tenha sido mediado pela redução da produção de citocinas proinflamatórias, já que o efeito antiinflamatório da acupuntura é bem conhecido na literatura. No entanto, os autores não comentaram sobre os resultados observados na forma não letal da peritonite, induzida pela LPC e também não relatam os resultados observados mais tardiamente. Os resultados aqui apresentados corroboram os desses autores, no que se relaciona ao aumento da resistência à peritonite fecal, mas em um modelo com baixa letalidade.

O mesmo grupo que estudou o efeito da acupuntura sobre a peritonite produzida pela LPC (SCOGNAMILLO-SZABÓ, BECHARA e CUNHA, 2005),

investigou o efeito do mesmo tratamento na peritonite produzida pela injeção intraperitoneal de carragenina em ratos, avaliando a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no lavado peritoneal, 4 horas após a inoculação do irritante. Observaram que no grupo submetido à acupuntura houve redução na produção de IL-1 β , mas sem alteração na concentração de IL-10 e TNF- α . Embora tenham feito a contagem dos leucócitos no lavado peritoneal, os autores não relatam os resultados observados nem tecem comentários sobre esses achados. Desse modo, essas observações não contribuem para explicar os achados de aumento da exsudação de leucócitos e do poder microbicida observados no modelo de peritonite por LPC.

No modelo aqui estudado a injeção intraperitoneal de suspensão de fezes diluídas a 1:9, induz uma peritonite fecal, com um estado inflamatório sistêmico, geralmente de pequena intensidade: as manifestações da resposta inflamatória sistêmica foram discretas, caracterizadas por menor mobilidade, discreta hipotermia e arrepiamento de pelos apenas na cabeça. Manifestações de sepse grave como arrepiamento total dos pelos, diarreia, hipotermia grave, redução acentuada da movimentação e secreção ocular não foram observados. Portanto, foi um modelo de peritonite fecal com reação sistêmica leve, com os animais se recuperando rapidamente após os efeitos da anestesia. Provavelmente, o efeito inibidor da migração de leucócitos para o peritônio tenha sido pequeno, sendo pouco provável que a eletroacupuntura tenha agido revertendo essa migração.

Como os animais estavam sob o efeito da anestesia com a mistura de ketamina com xilazina, que tem efeitos antiinflamatórios, potencializadores da infecção com bactérias fecais, como demonstrado no experimento 1, é possível que a eletroacupuntura tenha reduzido os efeitos inibidores da exsudação leucocitária induzidos pelo anestésico, levando a maior atividade microbicida na cavidade peritoneal. No entanto, é difícil admitir essa explicação, levando em consideração o fato de que vários experimentos têm sistematicamente demonstrado um efeito antiinflamatório da acupuntura, embora por mecanismos ainda não bem esclarecidos. Admite-se que a acupuntura ativa o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal e os centros autonômicos parassimpáticos, ambos de ação antiinflamatória (TRACEY, 2002; CHO et al., 2006; KAVOUSSI e ROSS, 2007). Em alguns modelos demonstrou-se que a acupuntura reduziu o nível plasmático de citocinas proinflamatórias, entre elas IL-6, TNF- α e IFN γ (BAEK et al., 2005; WU et al., 2007),

assim como a ativação do NF κ B (MOON et al., 2007). Portanto, fica difícil explicar o aumento da exsudação dos leucócitos e do maior poder microbicida da cavidade peritoneal observados nos experimentos aqui relatados. Como todas as observações sobre efeitos antiinflamatórios da acupuntura ou eletroacupuntura foram obtidas com base em modelos que estudaram inflamações assépticas, produzidas por agentes químicos irritantes ou por agentes sensibilizantes, é possível que o seu efeito seja diferente em inflamações produzidas por agentes infecciosos, que através de PAMPs induzem forte ativação de TLRs em células do sistema imunitário, especialmente macrófagos. É possível que nesse modelo a EA tenha modulado a resposta imunitária, favorecendo a instalação de mecanismos microbicidas mais eficientes.

Existem poucas observações sobre efeitos da acupuntura potencializando a resposta imunitária. Em experimentos bem conduzidos, Fujiwara e colaboradores (1991) mostraram que acupuntura no ponto E36, realizada uma vez por dia, durante quatro dias, aumentou significativamente o número de células formadoras de placa de imunohemólise no baço de camundongos, imunizados com hemácias de carneiro. Demonstraram que esse aumento foi reduzido por inibidores simpáticos (fentolamina), pela secção do nervo ciático e por inibidores de opióides (naloxona). Concluindo, assim, que o efeito potencializador da resposta imunitária foi mediado através de mediadores simpáticos e encefalinas produzidos na supra-renal. Alguns autores mostraram que a EA aumentou a produção de IL-2 e IFN γ e a atividade de células NK, fenômenos considerados como mediados pelo aumento das endorfinas (MILAR et al., 1990; JANKOVIC, 1994, citados por CABIOGLU e CETIN, 2008). Há também uma observação sobre um possível efeito da acupuntura aumentando a explosão respiratória em neutrófilos humanos, embora os resultados sejam questionáveis devido à metodologia utilizada (KARST et al., 2002 e 2003). Outra observação em humanos mostrou que a acupuntura aumentou os níveis séricos de IL-1 β , IL-4 e INF γ (YAMAGUCHI et al., 2007).

Como se demonstra que a EA induz liberação de opióides endógenos, um efeito positivo do processo sobre a resposta imunitária inata e adaptativa pode ser decorrente do fato de que alguns desses opióides podem aumentar a atividade de NKC, de linfócitos T citotóxicos, a quimiotaxia de monócitos e a produção de citocinas como IFN γ , IL-1, IL-2, IL-6 (CABIOGLU E CETIN, 2008).

Um aspecto pouco discutido sobre o efeito da EA na resposta imunitária se relaciona com a frequência da eletroestimulação. Há algumas observações mostrando que resultados diferentes podem ser observados quando se utilizam frequências diferentes: por exemplo, baixa frequência (2 Hz) estimula a liberação de encefalina e frequências mais altas (100 Hz) estimulam liberação de dinorfina (CABIOLGLU e CETIN, 2008). Resultados opostos têm também sido relatados: eletroacupuntura com alta frequência (200 Hz) inibiu a resposta a eritrócitos de carneiro no camundongo (SAKIC et al., 1989), enquanto que a acupuntura sem estimulação potencializou essa resposta (FUJIWARA et al., 1991).

Levando em consideração as poucas observações sobre possíveis efeitos da acupuntura potencializando alguns aspectos da resposta imunitária comentados nos últimos parágrafos, é plausível se admitir que, no modelo aqui estudado, a EA com baixa frequência (2 Hz) nos pontos E-36 e VB-30, tenha produzido uma estimulação simpática, com liberação de mediadores que agiram em receptores α adrenérgicos em células da resposta imunitária inata, potencializando a produção de citocinas pró-inflamatórias. De fato, tem sido demonstrado que a ativação de receptores α adrenérgicos em macrófagos aumenta a produção de IL-1 e TNF- α e o poder microbicida dessas células (SPENGLER et al., 1990 e 1994; MILES et al., 2000). Essa ativação α adrenérgica dos macrófagos peritoneais, induzida pela EA, seria responsável pela indução de mediadores pró-inflamatórios que estimulariam o efeito microbicida dessas células e a sua capacidade em produzir quimiocinas para atrair neutrófilos. Endorfinas e encefalinas liberadas, também contribuiriam aumentando a atividade de células NKC, importantes nas fases iniciais da montagem da resposta imunitária inata. Estudos posteriores utilizando inibidores de receptores α adrenérgicos e de opióides e avaliando a produção de citocinas na cavidade peritoneal após a ação da EA, são necessários para testar a hipótese proposta.

6. CONCLUSÃO

a) A eletroacupuntura realizada durante 30 minutos, em camundongos anestesiados com ketamina e xilazina, nos pontos E-36 e VB-30, bilateralmente, no momento da inoculação de uma suspensão de fezes diluídas a 1:9 na cavidade peritoneal, aumenta a resistência à peritonite polimicrobiana (indicada pela maior exsudação de neutrófilos nas primeiras 24 horas e menor número e tamanho dos abscessos intraperitoneais avaliados 14 dias depois), em comparação com camundongos anestesiados que receberam somente a aplicação das agulhas, sem qualquer manipulação.

b) A anestesia com ketamina e xilazina por via intraperitoneal não altera a mortalidade, mas piora a evolução da peritonite fecal induzida por inoculação de fezes em camundongos, demonstrada por um aumento significativo no número e tamanho dos abscessos intraperitoneais avaliados 14 dias após a indução da peritonite.

7. REFERÊNCIAS

Adams SD, Radhakrishnan RS, Helmer KS, Mercer DW. Effects of Anesthesia on Lipopolysaccharide-induced Changes in Serum Cytokines. *J Trauma* 2008; 65:170-4.

Ahluwalia, A. Topical glucocorticoids and the skin-mechanisms of action: an update. *Mediators Inflamm*. 1998; 7(3):183-93.

Baek YH, Choi DY, Yang HI, Park DS. Analgesic effect of electroacupuncture on inflammation pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by cholinergic and serotonergic receptors. *Brain Res*. 2005; 1057(1-2):181-5.

Bermudes AM. Efeitos do jejum agudo ou do jejum intermitente na evolução da peritonite bacteriana induzida por ligadura e punção do ceco ou por injeção intraperitoneal de suspensão fecal em camundongos. UFES, 2007. (Dissertação).

Bhatt-Sanders, D. Acupuncture for rheumatoid arthritis: an analysis of the literature. *Semin Arthritis Rheum*. 1985; 14(4):225-31.

Cabioğlu MT, Cetin BE. Acupuncture and Immunomodulation. *Am J Chin Med*. 2008; 36(1):25-36.

Carneiro ER, Carneiro CR, Castro MA, Yamamura Y, Silveira VL. Effect of Electroacupuncture on bronchial asthma induced by ovalbumin in rats. *J Altern Complement Med*. 2005; 11(1):127-134.

Ceccherelli F, Gagliardi G, Ruzzante L, Giron G. Acupuncture modulation of capsaicin-induced inflammation: effect of intraperitoneal and local administration of naloxone in rats. A blinded controlled study. *J Altern Complement Med*. 2002; 8(3):341-9.

Ceccherelli F, Gagliardi G, Visentin R, Sandona F, Casale R, Giron G. The effects of parachlorophenylalanine and naloxone on acupuncture and electroacupuncture modulation of capsaicin-induced neurogenic edema in the rat hind paw. A controlled blind study. *Clin Exp Rheumatol*. 1999; 17(6):655-62.

Cheng RS, Pomeranz BH. Electroacupuncture analgesia is mediated by stereospecific opiate receptors and is reversed by antagonists of type I receptors. *Life Sci.* 1980; 26(8):631-8.

Cheng, X. Ed. *Chinese Acupuncture and Moxibustion*. Beijing: Foreign Languages Press, 1999.

Cho ZH, Hwang SC, Wong EK, Son YD, Kang CK, Park TS, Bai SJ, Kim YB, Lee YB, Sung KK, Lee BH, Shepp LA, Min KT. Neural substrates, experimental evidences and functional hypothesis of acupuncture mechanisms. *Acta Neurol Scand.* 2006; 113(6):370-7.

Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA.* 1998; 280(18):1569-75.

Fujiwara R, Tong ZG, Matsuoka H, Shibata H, Iwamoto M, Yokoyama MM. Effects of acupuncture on immune response in mice. *Int J Neurosci.* 1991; 57(1-2):141-50.

Fung PC. Probing the mystery of Chinese medicine meridian channels with special emphasis on the connective tissue interstitial fluid system, mechanotransduction, cells durotaxis and mast cell degranulation. *Chin Med.* 2009; 4:10.

Haitsma JJ, Lachmann B, Papadacos PJ. Additives in intravenous anesthesia modulate pulmonary inflammation in a model of LPS-induced respiratory distress. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009; 53(2):176-82.

Karst M, Scheinichen D, Rueckert T, Wagner T, Wiese B, Fink M. Acupuncture has no immediate treatment effect on the neutrophil respiratory burst: a randomized single-blinded two-period crossover study. *Brain Behav Immun.* 2002; 16(6):813-6.

Karst M, Scheinichen D, Rueckert T, Wagner T, Wiese B, Piepenbrock S, Fink M. Effect of acupuncture on the neutrophil respiratory burst: a placebo-controlled single-blinded study. *Complement Ther Med.* 2003; 11(1):4-10.

Katsuya EM, de Castro MA, Carneiro CR, Yamamura Y, Silveira VL. Acupuncture reduces immune-mediated pulmonary inflammatory lesions induced in rats. *Forsch Komplementmed*. 2009; 16(6):413-6.

Kavoussi B, Ross BE. The Neuroimmune Basis of Anti-inflammatory Acupuncture. *Integr Cancer Ther*. 2007; 6(3):251-7.

Kim HW, Kang SY, Yoon SY, Roh DH, Kwon YB, Han HJ, Lee HJ, Beitz AJ, Lee JH. Low-frequency electroacupuncture suppresses zymosan-induced peripheral inflammation via activation of sympathetic post-ganglionic neurons. *Brain Res*. 2007; 1148:69-75.

Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Kang SY, Kwon YB, Han HJ, Lee HJ, Choi SM, Ryu H, Beitz AJ, Lee JH. The anti-inflammatory effects of low- and high-frequency electroacupuncture are mediated by peripheral opioids in a mouse air pouch inflammation model. *J Altern Complement Med*. 2006; 12(1):39-44.

Li A, Lao L, Wang Y, Xin J, Ren K, Berman BM, Tan M, Zang R. Electroacupuncture activates corticotrophin-releasing hormone-containing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus to alleviate edema in a rat model of inflammation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2008; 8:20.

Li A, Zhang RX, Wang Y, Zhang H, Ren K, Berman BM, Tan M, Lao L. Corticosterone mediates electroacupuncture-produced anti-edema in a rat model of inflammation. *BMC Complement Altern Med*. 2007; 7:27

Ma XP, Tan LY, Yang Y, Wu HG, Jiang B, Liu HR, Yang L. Effect of electroacupuncture on substance P, its receptor and corticotropin-releasing hormone in rats with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(41):5211-7.

Miles BA, Lafuse WP, Zwilling BS. Binding of alpha-adrenergic receptors stimulates the anti-mycobacterial activity of murine peritoneal macrophages. *J Neuroimmunol* 1996; 71(1-2):19-24.

Moon PD, Jeong HJ, Kim SJ, An HJ, Lee HJ, Yang WM, Park SK, Hong SH, Kim HM, Um JY. Use of electroacupuncture at ST36 to inhibit anaphylactic and inflammatory reaction in mice. *Neuroimmunomodulation*. 2007; 14(1):24-31.

Morand EF, Leech M. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation of inflammation in rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79(4):395-9.

Mori H, Nishijo K, Kawamura H, Abo T. Unique immunomodulation by electroacupuncture in humans possibly via stimulation of the autonomic nervous system. *Neurosci Lett.* 2002; 320(1-2):21-4.

Moudgil GC. Update on anaesthesia and the immune response. *Can Anaesth Soc J.* 1986; 33(3 Pt 2):S54-60.

O'Connor, J., Bensky, D. Eds. *Acupuncture: A comprehensive Text.* Chicago: Eastland Press, 1981.

Pomeranz B, Chiu D. Naloxone blockade of acupuncture analgesia: endorphin implicated. *Life Sci.* 1976; 19(11):1757-62.

Rogers PA, Schoen AM, Limehouse J. Acupuncture for immune-mediated disorders. Literature review and clinical applications. *Probl Vet Med.* 1992; 4(1):162-93.

Scognamillo-Szabó MV, Bechara GH, Cunha FQ. Effect of acupuncture on TNF- α , IL-1 β and IL-10 concentrations in the peritoneal exsudates of carrageenan-induced peritonitis in rats. *Ciência Rural Santa Maria.* 2005; 35 (1):103-108

Scognamillo-Szabó MV, Bechara GH, Ferreira SH, Cunha FQ. Effect of various acupuncture treatment protocols upon sepsis in Wistar rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1026:251-6.

Song XM, Li JG, Wang YL, Zhou Q, Du ZH, Jia BH, Ke JJ. Effects of ketamine on proinflammatory cytokines and nuclear factor kappaB in polymicrobial sepsis rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12:7350-4.

Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990; 145(5):1430-4.

Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA, Blenk N, Kunkel SL. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *J Immunol.* 1994; 152(6):3024-31.

Taniguchi T, Kanakura H, Takemoto Y, Kidani Y, Yamamoto K. Effects of ketamine and propofol on the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 during endotoxemia in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2003; 200(2):85-92.

Taniguchi T, Takemoto Y, Kanakura H, Kidani Y, Yamamoto K. The dose-related effects of ketamine on mortality and cytokine responses to endotoxin-induced shock in rats. *Anesth Analg.* 2003; 97(6):1769-72

Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002; 19-26;420 (6917): 853-9.

Wang L, Ding G, Gu Q, Schwarz W. Single-channel properties of a stretch-sensitive chloride channel in the human mast cell line HMC-1. *Eur Biophys J.* 2010; 39(5):757-67.

Wang LN, Wolfgang S, Gu QB, Ding GH. Skin slice as a model for the investigation of acupuncture effects. *Acupunct Res Chin.* 2009; 34:291–296.

Wen, T.S. *Acupuntura Clássica Chinesa.* 2. Ed. São Paulo: Cultrix, 1989.

Wu HG, Liu HR, Tan LY, Gong YJ, Shi Y, Zhao TP, Yi Y, Yang Y. Electroacupuncture and moxibustion promote neutrophil apoptosis and improve ulcerative colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2007; 52(2):379-84.

Yamaguchi N, Takahashi T, Sakuma M, Sugita T, Uchikawa K, Sakaiharu S, Kanda T, Arai M, Kawakita K. Acupuncture Regulates Leukocyte Subpopulations in Human Peripheral Blood. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2007; 4(4):447-453.

Yim YK, Lee H, Hong KE, Kim YI, Lee BR, Son CG, Kim JE. Electro-acupuncture at acupoint ST36 reduces inflammation and regulates immune activity in Collagen-Induced Arthritic Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2007; 4(1):51-7.

Yu M, Shao D, Liu J, Zhu J, Zhang Z, Xu J. Effects of ketamine on levels of cytokines, NF- κ B and TLRs in rat intestine during CLP-induced sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2007; 7:1076-82.

Zhang D, Ding G, Shen X, Yao W, Zhang Z, Zhang Y, Lin J, Gu Q. Role of mast cells in acupuncture effect: a pilot study. *Explore (NY)*. 2008; 4(3):170-7.

Zhang RX, Lao L, Wang X, Fan A, Wang L, Ren K, Berman BM. Electroacupuncture attenuates inflammation in a rat model. *J Altern Complement Med*. 2005; 11(1):135-42.

Zhao F, Zhu L. Effect electroacupuncture on the neurogenic inflammation. *Zhen Ci Yan Jiu*. 1992; 17(3):207-11.

Zhou RX, Huang FL, Jiang SR, Jiang JC. The effect of acupuncture on the phagocytic activity of human leukocytes. *J Tradit Chin Med*. 1988; 8(2):83-4.

Zijlstra FJ, van den Berg-de Lange I, Huygen FJ, Klein J. Anti-inflammatory actions of acupuncture. *Mediators Inflamm*. 2003; 12(2):59-69.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

ANEXO 1

Certificamos que o Protocolo nº. 009/2008, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ELETROACUPUNTURA SOBRE UMA INFECÇÃO PRODUZIDA POR *Staphylococcus aureus* EM CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGO", que tem responsável o docente **Fausto Edmundo Lima Pereira**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 13/10/2008. Este certificado expira-se em 30/10/2013.


Prof.ª Dr.ª Margareth Ribeiro Maysés
Presidente da CEUA / UFES