

ALEXANDRO DOS SANTOS RODRIGUES

A influência dos pontos de acupuntura *Zusanli* (E36) e *Sanyinjiao* (BP6) no desenvolvimento de lesões hepáticas induzidas por Tioacetamida, em ratos Wistar

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor.

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Francisco Javier H. Blázquez

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ângela M. F. Tabosa

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2223
FMVZ

Rodrigues, Alexandro dos Santos

A influência dos pontos de acupuntura *Zusanli* (E36) e *Sanyinjiao* (BP6) no desenvolvimento de lesões hepáticas induzidas por Tioacetamida, em ratos Wistar / Alexandro dos Santos Rodrigues. -- 2009.

112 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier H. Blázquez

Co-orientador: Profa. Dra. Ângela M. F. Tabosa.

1. Eletroacupuntura. 2. Lesões hepáticas. 3. Tioacetamida. 4. Ratos Wistar. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

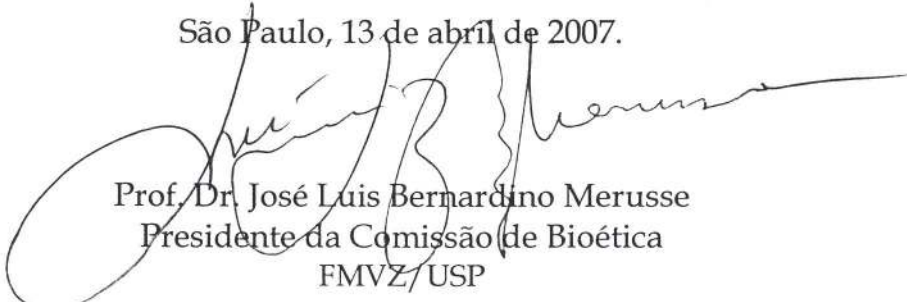
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "O uso dos pontos de acupuntura Zusanli (E36) e Sanyinjiao (BP6) no retardamento de lesões hepáticas", protocolo nº1046/2007, utilizando 90 (noventa) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Brazquez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Use of the points of acupuncture Zusanli (St-36) and Sanyinjiao (Sp-6) in retardation of hepatic injuries", protocol number 1046/2007, utilizing 90 (nineteen) rats, under the responsibility of Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Brazquez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 13 de abril de 2007.



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Nome: RODRIGUES, Alexandro dos Santos

Título: A Influência dos Pontos de Acupuntura *Zusanli* (E36) e *Sanyinjiao* (BP6) no Desenvolvimento de Lesões Hepáticas Induzidas por Tioacetamida, em ratos Wistar

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

A ti, meu **DEUS**, pela iluminação e guia dos meus caminhos ainda que muitas vezes eu não visse a luz diante dos meus olhos.

As duas maiores guerreiras que conheci em minha vida:

MARLENE e SILVIA,

Uma luta pela vida e a outra é a própria vida.

Ambas me mantêm de pé me ensinando a olhar a vida de uma outra forma, seja aprendendo com o amor ou convivendo com a dor.

Uma me deu a vida e a outra é a minha própria vida.

À VOCÊS MANIFESTO MINHA ETERNA GRATIDÃO.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A você ,

FERNANDA,

“Quando você fez das minhas lágrimas as suas lágrimas e

Das minhas batalhas as suas batalhas,

Você ganhou a minha admiração eterna”

OBRIGADO PELO ESFORÇO, PELA PACIÊNCIA E PELA DEDICAÇÃO.

QUE DEUS TE ABENÇOE

E TE ILUMINE,

SEMPRE.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS II

Ao meu **PAI** pela ajuda, apoio e compreensão nos tantos momentos difíceis que passei nesta jornada.

Que O “Grande Arquiteto do Universo” sempre seja com você.

Aos meus familiares e Amigos:

Nelson e Eulália, pelo apoio e a grande ajuda que me deram não só a mim, mas também à minha mãe, sem os quais este trabalho não seria concluído.

Vó e Tio Brito, por toda a torcida neste e outras batalhas.

As colaboradoras, Tereza, Claudete e Val, por toda a compreensão e carinho que vocês têm com uma das coisas mais preciosas da minha vida: minha mãe.

Sheila (Sheilinha), pela sua amizade.

Família Casale (Ana, Antônio, Marco, Rhandia, Claudia), a qual me desculpo pela minha ausência neste doutorado e também eu parablenizo pela nova luz que Deus trouxe à família de vocês, que através dela vocês sejam muito felizes.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS III

**A minha co-orientadora:
Dra. ANGELA TABOSA**

Pela sua paciência e pelo exemplo a serem seguidos.

Ao meu fiel escudeiro AMÉRICO pela sua dedicação, auxílio e amizade nesta caminhada.

As grandes pessoas que tanto me ajudaram
nesta etapa final:

IVONE, BRUNO, TEREZA, MARGUITE,
BUGA, CLÁUDIO ARROIO, MAURICIO e
ELIZANGELA

AGRADECIMENTOS IV

Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez, pela sua competente orientação, seu exemplo profissional.

Profa. Titular Maria Lúcia Zaidan Dagli, por toda a sua ajuda e compreensão da minha estadia no departamento de patologia.

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, por sua competência profissional e pela compreensão com os prazos..

Prof. Dr. Eduardo Cunha Farias, pelo seu exemplo e pela admiração que manifesta à todos que estão a sua volta, seja pelo seu carisma ou pelo seu conhecimento.

Aos Profs. do Departamento de Anatomia, Dr. Pedro, Dra. Paula e Dr. Augusto pela convivência harmoniosa no departamento.

Meus companheiros de laboratório: Diogo, Tiago, Tânia, Paulinha, Ricardo, Fernanda, Joana (Bruna !), e a todos que contribuem de alguma forma para que o laboratório do prof. Francisco seja um bom lugar para trabalhar.

Esta é a parte mais difícil deste trabalho, não por apresentar algum grau de complexidade, mas por correr o risco de esquecer alguém que de alguma maneira, tenha contribuído para a conclusão deste trabalho, por isto, desde já, aqueles que não inclui nestas listas, não foi por ingratidão. A eles peço o meu perdão.

Este texto ilustra claramente que cultura não é sinônimo de sabedoria. O Código dos Indígenas Americanos é um grande exemplo disso. Que ele te inspire da mesma maneira que me inspirou para que sejamos um elo forte unindo a teoria, a prática e o autoconhecimento, buscando motivar e inspirar a fazer a diferença.

Alexandro S. Rodrigues

Código dos Indígenas Americanos

1. Levante com o Sol para orar. Ore sozinho. Ore com frequência. O Grande Espírito o escutará se você ao menos falar.
2. Seja tolerante com aqueles que estão perdidos no caminho. A ignorância o convencimento, a raiva, o ciúme e a avareza originam-se de uma alma perdida. Ore para que eles encontrem o caminho do Grande Espírito.
3. Procure conhecer-se, por si próprio. Não permita que outros façam seu caminho por você. É sua estrada, e somente sua. Outros podem andar ao seu lado, mas ninguém pode andar por você.
4. Trate os convidados em seu lar com muita consideração. Sirva-os o melhor alimento, a melhor cama e trate-os com respeito e honra.
5. Não tome o que não é seu. Seja uma pessoa, da comunidade, da natureza, ou da cultura. Se não ganhou nem foi dado, não é seu.
6. Respeite todas as coisas que foram colocadas sobre a Terra. Sejam elas pessoas, plantas ou animais.
7. Respeite os pensamentos, os desejos e as palavras das pessoas. Nunca interrompa os outros nem ridicularize, nem rudemente os imites. Permita a cada pessoa o direito da expressão pessoal.
8. Nunca fale dos outros de uma maneira má. A energia negativa que você coloca para fora, no Universo, voltará multiplicada a você.
9. Todas as pessoas comentem erros. E todos os erros podem ser perdoados.
10. Pensamentos maus causam doenças da mente, do corpo e do espírito. Pratique o otimismo.
11. A natureza não é para nós, ela é parte de nós. Toda a natureza faz parte da nossa família Terrena.
12. As crianças são as sementes do nosso futuro. Plante amor nos seus corações e água com sabedoria e lição de vida. Quando forem crescidos, dê-lhes espaço para que cresçam.
13. Evite machucar os corações das pessoas. O veneno da dor causada a outros, retornará a você.
14. Seja sincero e verdadeiro em todas as situações. A honestidade é o grande teste para a nossa herança do Universo.
15. Mantenha-se equilibrado. Seu mental, seu espiritual, seu emocional e seu físico, todos necessitam ser fortes, puros e o seu saudáveis. Trabalhe o seu físico para fortalecer o seu mental. Enriqueça o seu espiritual para curar o seu emocional.

16. Tome decisões conscientes de como você será e como reagirá. Seja responsável por suas ações.
17. Respeite a privacidade e o espaço pessoal dos outros. Não toque as propriedades pessoais de outras pessoas, especialmente objetos religiosos e sagrados. Isso é proibido.
18. Comece sendo verdadeiro consigo mesmo. Se você não puder nutrir e ajudar a si mesmo, você poderá nutrir e ajudar os outros.
19. Respeite outras crenças religiosas. Não force suas crenças sobre os outros.
20. Compartilhe sua boa fortuna com os outros Participe com caridade.

Fonte desconhecida

Lista das abreviaturas

ALB	Albumina.
ALKP	Fosfatase Alcalina.
ALT	Alanina Aminotransferase.
AST	Aspartato Aminotransferase.
CAEF/C	Classificação de alterações estruturais ocorridas em fibrose e/ou cirrose
GGT	γ -Glutamil Transferase.
HE	Coloração Hematoxilina e Eosina
IAH	Índice de atividade histológica
MSLH	Marcadores sanguíneos de lesões hepáticas
PS	Coloração de Picrossírius
TAA	Tioacetamida.
TBIL	Bilirrubinas Totais.
TP	Proteína Total.

Lista das abreviaturas II - LOTES USADOS NO EXPERIMENTO

CI	Lote Controle de Isoflurano, usado para testar a atuação do anestésico isoflurano no experimento.
CP	Lote Controle de Parâmetros, usado para determinar os parâmetros hepáticos de animais sadios.
CT	Lote Controle de Tioacetamida, usado para determinar a os parâmetros hepáticos de animais sadios.
LE36	Lote usado para analisar a atuação do ponto de acupuntura-verdadeiro, <i>Zusanli</i> (E-36).
LE36s	Lote usado para analisar a atuação do “Não-ponto” ponto de acupuntura- falsoacupuntura (Shan), equivalente ao ponto de acupuntura-verdadeiro <i>Zusanli</i> (E-36).
LBP6	Lote usado para analisar a atuação do ponto de acupuntura-verdadeiro, <i>Sanyinjiao</i> (BP-6).
LBP6s	Lote usado para analisar a atuação do “Não-ponto” de acupuntura (Shan), equivalente ao ponto de acupuntura-verdadeiro <i>Sanyinjiao</i> (BP-6).

RESUMO

RODRIGUES, A. S. A influência dos pontos de acupuntura *Zusanli* (E36) e *Sanyinjiao* (BP6) no desenvolvimento de lesões hepáticas induzidas por tioacetamida em ratos Wistar. [The influence of the acupuncture points *Zusanli* (ST36) and *Sanyinjiao* (SP6) in the development of hepatic lesions induced by thioacetamide in Wistar rats]. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O fato da acupuntura ser atualmente considerada eficaz no tratamento de muitos processos patológicos e do fígado ser um órgão alvo de muitas enfermidades tanto em animais como em seres humanos, motivou a realização deste estudo que tem por objetivo verificar o efeito da eletroacupuntura durante a progressão de lesões hepáticas e o seu relacionamento com o funcionamento do órgão através da análise concomitante de marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH). O trabalho foi realizado em ratos albinos (Wistar), machos, com um peso aproximado de 250g, identificados e distribuídos em 7 lotes (CP, CT, CI, E36, E36s, BP6, BP6s), N= 10. Os animais dos lotes: CP, CT e CI foram usados como controle; CP na determinação dos MSLH: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALPK), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubina total; CT cujos animais receberam apenas o agente hepatotóxico tioacetamida (25 mg/100g) por via intraperitoneal três vezes por semana, durante 7 semanas e o lote CI, no qual os animais, além dos mesmos procedimentos de CT, também foram submetidos ao anestésico usado no experimento (isoflurano) pelo tempo de 20 minutos, objetivando analisar se esse anestésico teve alguma influência nos resultados do trabalho. Quanto aos demais grupos, E36 recebeu os mesmos procedimentos de CI e seus componentes foram tratados com eletroacupuntura no ponto *Zusanli* (E-36). E36s recebeu procedimentos similares aos de E36, porém a eletroestimulação foi aplicada em um “não-ponto” de acupuntura (E36 Sham) localizado próximo ao E36 verdadeiro. Os animais de BP6 tiveram os mesmos procedimentos de E36 diferindo somente na eletroacupuntura, que foi aplicada no ponto *Sanyinjiao* (BP-6). No lote BP6s os procedimentos foram os mesmos realizados em BP6, porém a eletroestimulação foi realizada em um “não-ponto” de acupuntura (BP6 Sham) localizado próximo ao ponto BP6 verdadeiro.

Numa etapa seguinte, os animais dos nove grupos, tiveram seus fígados coletados para estudo histológico, tendo sido comparado os parâmetros bioquímicos obtidos, com objetivo de analisar se as alterações morfológicas e funcionais dos fígados tiveram influência da eletroacupuntura. Resultados: Os MSLH apresentaram como resultados: marcador ALB nos lotes: CP ($2,97 \pm 0,3529$) com CI ($2,46 \pm 0,3134$) e marcador TP nos lotes CP ($6,53 \pm 0,2452$) com CI ($5,73 \pm 0,4057$) provando haver interferência do isoflurano; marcador ALB nos lotes CI com BP6 ($2,84 \pm 0,2675$) e BP6 com E36s ($2,4 \pm 0,2828$), marcador ALT nos lotes CI com BP6 e BP6 com E36s e marcador AST nos lotes BP6 com E36s, todos provando a eficácia do ponto de acupuntura BP6. Os resultados histológicos confirmaram a atuação da tioacetamida (TAA) nos animais (exceto os do lote CP), através das seguintes lesões: inflamação focal, apoptose, necrose em saca-bocado (Piecemeal-necrosis), necrose e inflamação portal, para as análises em Hematoxilina-Eosina e expansão fibrosa e pontes de colágeno para as colorações em Picrossirius. Essas lesões foram achadas nos lotes: CT, CI, E36s, BP6s, E36 e BP6, porém, nos dois últimos ocorreram em menor grau indicando a atuação de eletroacupuntura sobre a morfologia hepática.

Palavras Chave: Eletroacupuntura, lesões hepáticas, tioacetamida, ratos Wistar.

ABSTRACT

RODRIGUES, A. S. **The influence of the acupuncture points *Zusanli (ST36)* and *Sanyinjiao (SP6)* in the development of hepatic lesions induced by thioacetamide in Wistar rats.** 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The fact o acupuncture have being considered an efficient method to treat lots of diseases and, being the liver, in men and animals, a common susceptible organ, this research was inspired to verify the electroacupuncture effect in hepatic lesion progression and its relationship with the liver performance at the same time that sanguinenous hepatic lesions markers (MSLH) was analysed. Each one identified, male wistar rats arround 250g was ditribucted in 7 (seven) groups, N=10: CP, CT, CI, ST36, ST36s, SP6 and SP6s. The first three was control-groups: CP to be these MSLH reference: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase (ALKP), albumin.(ALB), total protein (TP) and total bilirubin (TB); CT had the animals receiving only the hepatotoxic agent thioacetamide (25mg/100g) interperitoneal pathway, 3 (three) a week, for 7 (seven) weeks and CI had the same last proceedment increased for 20 minutes in isoflurane anesthetic to verify if interferences occures or not. About the others groups, we had ST36 receiving the same CI proceedments and treated by Zusanli (St-36) electroacupuncture point; ST36s again, but in a “false-point” (Sham ST36) next the real one. Groups SP6 and SP6s had the analogous treatment to points *Sanyinjiao (SP-6)* and its “no-point”. The next step was collect the nine groups livers and study them histologically. They was compared with CP references to mesuere some probable electroacupuncture influence in morphological and functional hepatic processes. MSLH results was: ALB in groups CP ($2,97\pm 0,3529$) with CI ($2,46\pm 0,3134$) and sanguinenous marker TP in groups CP ($6,53\pm 0,2452$) with CI ($5,73\pm 0,4057$), proving isoflurane interference; ALB in gropus CI with SP6 ($2,84\pm 0,2675$) and in gropus SP6 with ST36s ($2,4\pm 0,2828$), sanguinenous marker ALT in groups CI with SP6 and in groups SP6 with ST36 and

sanguineous marker AST in groups SP6 with ST36s, all of them proving the SP6 electroacupuncture point efficacy. The histological results confirmed thioacetamide (TAA) actuation in animals (except group CP), through these lesions: focalized inflammation, apoptosis, piecemeal-necrosis, necrosis and portal-inflammation to hematoxylin and eosin analysis and fibrosis expansion and collagen bridges to Picrosirius colorations. These lesions was discovered in groups CT, CI, ST36s, SP6s, ST36 and SP6s. However, in the last two group was discovered less then the others, indicating electroacupuncture efficiency in hepatic morphology.

Key words: Electroacupuncture, Hepatic lesions, Thiocetamide, Wistar rats

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	25
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3.1	O FÍGADO.....	27
3.1.1)	A importância do Órgão Fígado.....	27
3.1.2)	As Funções do Fígado e a sua Importância como Glândula.....	28
3.1.3)	A Histologia Hepática.....	30
3.2	A FIBROSE (OU FIBROPLASIA) HEPÁTICA.....	33
3.2.1)	As Fibras do Tecido Conjuntivo.....	33
3.2.2)	A Inflamação Crônica na Fibroplasia Hepática.....	35
3.2.3)	A Importância das Células Estreladas.....	36
3.2.4)	O Mecanismo da Fibrose Hepática.....	37
3.2.5)	Fibrose e Cirrose.....	40
3.2.6)	A Importância das Moléstias Hepáticas na Saúde Pública.....	42
3.3	A ACUPUNTURA.....	43
3.3.1)	O Crescimento da Acupuntura.....	45
3.3.2)	A agulha usada na Acupuntura.....	46
3.3.3)	O Ponto de Acupuntura.....	48
3.3.4)	Acupuntura e o Fígado.....	50
3.3.4.1)	A importância do Acuponto <i>Zusanli</i> para o Fígado.....	51
3.3.4.2)	A importância do Acuponto <i>Sanyinjiao</i> para o Fígado.....	53
4	MATERIAL E MÉTODO.....	56
4.1	ANIMAIS.....	56
4.1.1)	Manejo dos Animais.....	56
4.1.1.1)	Sedação.....	57
4.2	ELETROACUPUNTURA.....	57
4.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	58
4.3.1)	Processamento do Material para a Histologia.....	62
4.3.1.1)	Fixação e Inclusão para Microscopia de Luz.....	62
4.3.1.2)	Colorações para Microscopia de Luz.....	63
4.3.1.2a)	Coloração em Hematoxilina e Eosina (HE).....	63
4.3.1.2a1)	Classificação das Lesões Obtidas em Hematoxilina e Eosina (HE).....	63
4.3.1.2b)	Coloração em Picro-Sirius (PS).....	65
4.3.1.2a2)	Classificação das Lesões Obtidas em Picro-Sirius (PS).....	65
4.3.2)	PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA ANÁLISE DOS MARCADORES SANGUÍNEOS DE LESÕES HEPÁTICAS.....	66
4.4	DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	67
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
4.5.1)	Testes Paramétricos.....	68
4.5.2)	Testes Não-paramétricos.....	69

5	RESULTADOS	71
5.1	RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS MARCADORES SANGUÍNEOS DE LESÕES HEPÁTICAS	71
5.1.1)	Resultados dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas do LOTE CP	72
5.1.2)	Comparação dos resultados dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas dos lotes: CP, CT e CI.....	73
5.2	RESULTADOS DAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS	83
5.2.1)	Resultados das análises em Hematoxilina e Eosina (HE)	83
5.2.1.1)	Documentação fotográfica das análises em Hematoxilina e Eosina_(HE).....	85
5.2.2)	Resultados das análise em Picrossirius (PS)	90
5.2.2.1)	Documentação fotográfica das análises em Picrossirius (PS).....	92
6	DISCUSSÃO	96
6.1	O USO DA ELETROACUPUNTURA	96
6.2	COMPARAÇÃO DO PESO E DOS MARCADORES SANGUÍNEOS DE LESÕES HEPÁTICAS DOS GRUPOS: CONTROLE DE PARÂMETROS (CP), CONTROLE DE TIOACETAMIDA (CT) E CONTROLE DE ISOFLURANO (CI) ...	97
6.2a)	Comparação dos marcadores Albumina (ALB) e Proteína Total (PT) dos lotes: CP, CT e C	99
6.2.1	COMPARAÇÃO DO PESO E DOS MARCADORES SANGUÍNEOS DE LESÕES HEPÁTICAS DOS GRUPOS: CONTROLE DE ISOFLURANO, PONTO DE ACUPUNTURA E36 (E36), “NÃO-PONTO” DE ACUPUNTURA E36S (E36S), PONTO DE ACUPUNTURA BP6 (BP6) E “NÃO-PONTO” DE ACUPUNTURA BP6S (BP6S).....	100
6.2.1b)	Comparação do marcador Alanina Aminotransferase (ALT) dos lotes: Controle de isoflurano, Ponto de Acupuntura E36 (E36), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), Ponto de Acupuntura BP6 (BP6) e “Não-Ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s)	102
6.2.1c)	Comparação do marcador Aspartato Aminotransferase (AST) dos lotes: Controle de isoflurano, Ponto de Acupuntura E36 (E36), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), Ponto de Acupuntura BP6 (BP6) e “Não-Ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s)	103
6.3	O USO DA TIOACETAMIDA (TAA).....	104
6.4	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS FEITAS EM HEMATOXILINA E EOSINA (HE).....	105
6.4.1	O ÍNDICE DE ATIVIDADE HISTOLÓGICA (IAH).....	105
6.4.2	AS LESÕES OBSERVADAS EM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)	107
6.5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS FEITAS EM PICROSSIRIUS (PS).....	110
6.5.1	O ÍNDICE DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS OCORRIDAS EM FIBROSE E/OU CIRROSE (CAEF/C).....	110
6.5.2	AS LESÕES OBSERVADAS EM PICROSSIRIUS (PS)	111
7	CONCLUSÕES	97
8	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

-
- ✓ Texto de acordo com a 4ª Reforma Ortográfica, elaborada em 1990 e em vigor a partir de janeiro de 2009.

1 INTRODUÇÃO

As lesões hepáticas que resultam no quadro cirrótico fazem da cirrose um quadro preocupante tanto em animais quanto em seres humanos.

Em seres humanos esta enfermidade hepática pode ser decorrente de diversos fatores como: episódios crônicos ou repetidos de lesão hepática (JOHNSON, 1998).

Vários são os processos degenerativos do fígado cuja progressão pode conduzir à cirrose. Definida como uma inflamação crônica, progressiva e difusa, a cirrose hepática causa a substituição das áreas afetadas do fígado por tecido conjuntivo fibroso, interferindo desta forma no funcionamento hepático, acarretando na diminuição da produção de bile, da excreção de pigmentos biliares e da produção de fatores da coagulação sanguínea da albumina (ALB) e do plasma, podendo também reduzir a capacidade hepática de desintoxicar o sangue, levando ao acúmulo de toxinas (SPENCE, 1991).

Embora os mecanismos perpetuadores das lesões hepáticas que culminam no quadro cirrótico impeçam a recuperação completa do paciente, vários métodos terapêuticos têm sido empregados, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos enfermos. Dentre estes se pode citar a acupuntura, cujas bases têm sido revistas e colocadas de acordo com os princípios da medicina ocidental através de pesquisas, estudos clínicos e casos estudados (DUMITRESCU, 1996).

Hong Jin Pai (2005) relata a importância da acupuntura no tratamento de diversas patologias, como a insuficiência hepática. A acupuntura também se mostrou efetiva na prevenção e reversão de lesões hepáticas causadas pelo agente hepatotóxico tetracloreto de carbono (HSU-JAN LIU et al., 2001). Estes mesmos

autores também relatam uma significativa diminuição das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) nos animais que receberam a referida droga e foram tratados com a acupuntura aplicada nos pontos *Zusanli* (E-36) e *Taichong* (F3). Efeitos benéficos semelhantes foram demonstrados no tratamento por acupuntura de injúrias hepáticas causadas por tetracloreto de carbono (WATARI et al., 1977).

O modelo de desenvolvimento da cirrose em ratos por tioacetamida (TAA) também pode ser usado para induzir lesões hepáticas (JEONG et al., 2001; LI et al., 2002). Além disso, a tioacetamida (TAA) causa alterações da função hepática que podem ser avaliadas pela evolução dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas.

Embora existam alguns relatos de que a acupuntura possa ter efeitos positivos no tratamento de lesões hepáticas induzidas por agentes químicos, não foi encontrado na literatura nenhum estudo que adotasse uma metodologia científica sobre este tema, exceto o artigo publicado por Hsu-Jan Liu et al. (2001), aqui citado. Contudo, estes autores investigaram os efeitos da acupuntura com estimulação manual, sobre o padrão de comportamento dos marcadores sanguíneos alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em lesões hepáticas agudas.

No estudo proposto neste trabalho, foi feita a opção de usar a eletroacupuntura em vez da acupuntura manual, a fim de estabelecer padrões de estímulo (relativos à intensidade, amperagem e frequência) definidos e constantes para todos os animais, considerando que esses fatores são importantes variáveis no mecanismo de ação da acupuntura, em relação aos tipos de neurotransmissores liberados (HAN, 2003). Este trabalho também inclui a abrangência de mais

marcadores hepáticos. Além da ALT e AST, foram estudados: γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL). Também foi utilizado um modelo experimental de lesões hepáticas crônicas baseado no trabalho de AL-BADER et al. (2000). Com isto, esta proposta visa contribuir de uma forma significativa e real no estudo dos efeitos da eletroacupuntura em importantes processos patológicos que acometem o fígado tanto de seres humanos como de animais, pois se considera que a abordagem utilizada neste estudo, poderá trazer informações mais abrangentes que as disponíveis até o momento.

Tendo em vista conceder sua contribuição para a abordagem científica da acupuntura, este trabalho visa à indução de danos hepáticos em ratos, através da droga tioacetamida (TAA) assim como a análise histopatológica e a avaliação do grau de fibrose pela classificação do colágeno nos cortes histológicos, além da verificação dos seguintes parâmetros hepáticos: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL), cujas alterações, denotam lesões hepatocelulares em curso (SHAW; IHLE, 1999; CENTER, 1997). Estes quatro aspectos foram confrontados em cada um dos grupos, visando avaliar os efeitos da acupuntura através da eletroestimulação (eletroacupuntura).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo:

- a) Investigar se a eletroacupuntura reduz a evolução das lesões histopatológicas no modelo da tioacetamida (TAA);

- b) Investigar se a eletroacupuntura tem influência sobre o teor de colágeno nos fígados lesionados;

- c) Verificar se os marcadores sanguíneos de lesões hepáticas [(alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL)], nas lesões hepáticas provocadas pela tioacetamida (TAA) tem alguma variação perante os tratamentos com a eletroacupuntura.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O FÍGADO

3.1.1) A importância do Órgão Fígado

O segundo maior órgão do corpo (perdendo apenas para a pele), o fígado é o órgão, onde os nutrientes absorvidos no trato digestório são processados e armazenados para utilização em outros órgãos sendo, portanto, uma interface entre o sistema digestório e o sangue (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004b). Esse órgão tem algumas particularidades ímpares, como o fato de receber sangue de duas fontes diferentes, a saber: 80% da veia porta (que transporta sangue desoxigenado do trato digestório, pâncreas e do baço, cujo conteúdo é de nutrientes recém-absorvidos, fármacos e possivelmente micróbios e toxinas provenientes do trato gastrointestinal) e 20% restantes da artéria hepática (que fornece sangue rico em oxigênio) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SPENCE, 1991; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

A importância do fígado para o desenvolvimento dos processos vitais é tão significativa que, a sua retirada pode ocasionar a morte rapidamente. Os mamíferos morrem algumas horas após a hepatectomia total. As aves morrem entre 24-36 h. A letalidade decorre da queda brusca da glicemia e do aparecimento de substâncias tóxicas no sangue que normalmente são metabolizadas no fígado (KOLB, 1984). Ainda com relação à importância do fígado perante as espécies, Kolb (1984) cita que uma vaca que tenha uma produção de leite de 20 litros diários, precisa que seu fígado sintetize e secrete 1500-1800g de glicose, 300-350g de proteínas plasmáticas, 300-600g de gorduras e 180-200g de uréia. Nas aves, durante o

período de postura, o fígado de uma galinha forma diversas proteínas transportadoras que têm importância, no transporte de cálcio, fosfato, ácidos graxos e gorduras no ovário e no oviducto. Além do fato das gorduras e lipoproteínas da gema ser, em sua maioria, produzidas no fígado. Em cães e gatos, existe uma grande casuística de enfermidades hepáticas, que são razoavelmente comuns principalmente por deficiências alimentares (proteínas, metionina, colina, entre outras), por parasitoses (larvas migratórias de ascarídeos no porco, fasciolose em ruminantes), por intoxicações e por infecções (como a tuberculose e a leucose) (KOLB, 1984; CORNELIUS, 1996; CENTER, 1997; SHAW; IHLE, 1999).

3.1.2) As Funções do Fígado e a sua Importância como Glândula

Sendo a glândula mais pesada do corpo, (GANONG, 1989). E considerado, por muitos autores, o laboratório central do corpo, o fígado realiza inúmeras funções no organismo. Em 1967, Ham cita que o fígado possui mais de 100 funções diferentes. Trinta anos mais tarde (1997), Center menciona que este órgão realiza pelo menos 1500 funções bioquímicas vitais. Em 2003, Tomita descreve que no fígado ocorrem mais de cinco mil reações químicas. Dentre estas funções podem-se destacar as numerosas funções metabólicas (metabolismo de carboidratos, de proteínas e participação no metabolismo de lipídios e na regulação dos níveis da glicose sanguínea, além da regulação do metabolismo hormonal), um grande número de biossínteses, a capacidade de transformar inúmeros compostos do sangue e da bile, ação desintoxicante para determinadas substâncias, formação de depósito de várias vitaminas (A, B₁₂, D, E e K) e oligoelementos, ação fagocitária (os

macrófagos sinusoidais do fígado fagocitam os glóbulos vermelhos senis, os glóbulos brancos e algumas bactérias) e secreção da bile (GUYTON, 1997; HAM, 1967; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

As várias funções das células hepáticas no metabolismo ocorrem graças a um grande abastecimento de ribossomos, mitocôndrias e enzimas. Com uma medida individual de 20 a 30 microns em sua maior dimensão, o hepatócito (Gr. *Hepar*, fígado, + *Kytos*, célula) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), tem aproximadamente 1000-1500 enzimas diferentes, 2000-3000 mitocôndrias e 5-6 milhões de ribossomos (principalmente polirribossomos) (KOLB, 1984).

A célula hepática é muito versátil, pois tem uma função secretora não só exócrina como também, endócrina. A secreção exócrina do fígado é a bile, um líquido verde-oliva ou castanho-amarelado, cujo pH é de 7,6-8,6 e consiste, principalmente, em água, colesterol, fosfolipídios (lecitinas), pigmentos bilíferos, diversos íons, sais biliares e ácidos biliares (TORTORA; GRABOWSKI, 2002), que desempenham ação detergente tornando o fígado, em comparação com o rim, um órgão excretor ideal para esses tipos de compostos (CUNNINGHAM, 1999). Na espécie humana são formados e eliminados para a luz intestinal diariamente 500 a 1000 ml de bile (HAM, 1967); Tortora e Grabowski (2002) citam, que esta quantidade varia entre 800 a 1000 ml.

As substâncias metabolizadas e excretadas pelo fígado incluem muitas drogas e toxinas importantes, o que tem grande significado clínico, porque as ações desses agentes podem ser potencializadas por função hepática prejudicada (CUNNINGHAM, 1999).

3.1.3) A Histologia Hepática

Estima-se que 60% da população celular do fígado de um homem adulto, sejam de hepatócitos (250 milhões de células), o que compreende cerca de 80% do volume hepático (HAM, 1967; MIYAI, 1994). Sendo uma célula poliédrica (que possui muitas superfícies), cujos limites estão em geral bem definidos (BANKS, 1992), o hepatócito é constituído por um núcleo; ou às vezes dois, disposto(s) centralmente, apresentando formato arredondado e com um ou dois nucléolos bem evidentes. A organela mais evidente do hepatócito é o retículo endoplasmático, tanto em sua forma lisa como na rugosa. Na forma rugosa aparece na célula hepática como acúmulos dispersos no citoplasma, formando os corpos basófilos. É nesta organela que transcorre a síntese das várias proteínas plasmáticas produzidas pelo fígado, dentre elas, a albumina e o fibrinogênio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004b).

O fígado tem como unidade funcional o lóbulo hepático (ARGENZIO, 1996; GUYTON, 1997), cuja quantidade varia de espécie para espécie. O termo lóbulo significa pequeno lobo, expressão esta que foi empregada inicialmente em anatomia para a descrição de qualquer porção ou estrutura arredondada e saliente. Quando usado em relação aos órgãos glandulares, o termo lobo passou a ser empregado para designar qualquer porção que se projeta da massa central de um órgão, ou é separada de outras partes do órgão por fissuras, septos ou depressões. Sendo assim, a expressão lóbulo foi inicialmente usada para designar pequenas divisões no lobo por meio de fissuras, septos ou depressões menores. Posteriormente, com o advento do microscópio, os lóbulos de tecido glandular, passaram a ser, além de áreas delimitadas por partições de tecido conjuntivo, um grupo de unidades

secretoras adjacentes drenadas por um canal comum ou por um sistema de canais. Este fato leva a uma mais refinada definição para o termo lóbulo, que passa a ser descrito como: pequena divisão de um órgão, constituída de grupos de unidades secretoras intimamente adjacentes, que são drenadas por um canal comum ou por um sistema de canais (HAM, 1967).

Construído ao redor de uma veia central, que deságua nas veias hepáticas, e segue na veia cava, o lóbulo é constituído principalmente por numerosas placas ou lâminas de células hepáticas, dispostas como se fossem cordões, que irradiam da veia central em direção centrífuga, semelhante aos raios de uma roda. Cada placa hepática apresenta uma espessura geralmente formada por duas células, e entre as células adjacentes, encontram-se pequenos canalículos biliares que deságuam nos dutos biliares dos septos fibrosos que separam os lóbulos hepáticos adjacentes.

Nesses septos, existem pequenas vênulas porta que recebem seu sangue principalmente a partir do fluxo venoso do trato gastrintestinal, através das veias porta. Por intermédio dessas vênulas, o sangue flui para uma veia central através dos sinusóides hepáticos, que são os espaços irregularmente dilatados entre os cordões (ou lâminas hepáticas), compostos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas (com fenestras a partir de 100 nm de diâmetro). Nos septos interlobulares, além das vênulas porta, encontram-se também as arteríolas hepáticas, que vão suprir os tecidos do septo com sangue arterial entre os lóbulos adjacentes. Muitas destas arteríolas também deságuam nos sinusóides hepáticos.

O fato dos lóbulos hepáticos terem um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um duto biliar, faz com que estas três estruturas sejam denominadas de tríade hepática. Além das células hepáticas, os sinusóides hepáticos são revestidos por dois outros tipos de células: os macrófagos sinusoidais

e as células estreladas. Antes chamadas de células estreladas de *von Kupffer* (ou somente células de Kupffer), os macrófagos sinusoidais (também conhecidos por células reticulo-endoteliais), constituem cerca de 15% da população celular do fígado e se localizam nos sinusóides hepáticos fixados à face luminal das células endoteliais tendo como função a destruição de leucócitos, células sanguíneas desgastadas, bactérias e outras substâncias estranhas presentes no sangue venoso que drena no trato gastrointestinal. Sendo o segundo tipo celular que reveste os sinusóides hepáticos, as células estreladas (também conhecidas como células armazenadoras de lipídeos ou células de Ito) atuam nos processos hepáticos inflamatórios e na fibrose hepática. Abaixo do revestimento endotelial dos sinusóides, entre as células endoteliais e as células hepáticas, existe um estreito espaço tecidual, denominado espaço perissinusoidal (ou espaço de Disse). Milhões desses espaços perissinusoidais são conectados com os vasos linfáticos nos septos interlobulares, que removem o excesso de líquido desses espaços. Devido a ocorrência de grandes poros no endotélio (alguns com o diâmetro de quase 1 micron), as substâncias no plasma, inclusive grande parte das proteínas plasmáticas, movem-se livremente para o espaço perissinusoidal e desse para as células hepáticas (BANKS, 1992; CENTER, 1997; CRAWFORD, 2000; GUYTON, 1997; HAM, 1967; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; MIYAI, 1994; TORTORA; GRABOWSKI, 2002; REECE, 1996; SPENCE, 1991).

3.2 A FIBROSE (OU FIBROPLASIA) HEPÁTICA

3.2.1) As Fibras do Tecido Conjuntivo

São três os principais tipos de fibras que formam o tecido conjuntivo: as fibras elásticas, as fibras reticulares e as fibras colágenas.

Sendo abundantes na pele, nas paredes dos vasos sanguíneos e no tecido pulmonar, as fibras elásticas apresentam-se longas, ramificadas, filiformes e com diâmetro menor que as fibras colágenas. Com frequência formam redes entrelaçadas e têm como principal proteína a elastina, circundada por uma glicoproteína, chamada fibrina, essencial para a estabilidade da fibra elástica. A elastina confere às fibras a capacidade de retornar ao seu comprimento original logo após ter sido estirada (CHEVILLE, 2004; SPENCE, 1991). Tortora e Grabowski (2002) citam que devido à sua estrutura molecular especial, as fibras elásticas são tão resistentes que podem ser distendidas até 150% do seu comprimento relaxado sem se romper.

As fibras reticulares participam na formação da membrana basal e são consideravelmente mais finas que as fibras colágenas, além de serem curtas e formadas por colágeno, com uma capa de glicoproteína. Através de suas ramificações formam uma rede firme chamada retículo. Produzidas pelos fibroblastos, as fibras reticulares dão suporte e resistência formando o estroma ou arcabouço de sustentação de muitos órgãos moles como o baço e os linfonodos, além de também fornecerem suporte às paredes dos vasos sanguíneos. Sendo

composta principalmente por um tipo de colágeno chamado reticulina, as fibras reticulares têm como destaque a sua propriedade inelástica (SPENCE, 1991; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

As fibras colágenas, às vezes referidas como fibras brancas, são o tipo de fibras que se encontram em maior abundância, representando cerca, de 25% da proteína total do corpo. Cada fibra é formada por feixes paralelos de fibrilas muito finas. Sendo encontradas na maioria dos tecidos conjuntivos, as fibras colágenas são fortes e inelásticas (SPENCE, 1991; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

Quimicamente as fibras colágenas têm a proteína colágeno, que é o arcabouço extracelular de todos os organismos multicelulares. A importância desta proteína é tamanha, pois sem ela, o ser humano seria reduzido a um conglomerado de células interconectadas por alguns neurônios (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Os colágenos são formados por uma hélice tripla de três cadeias polipeptídicas α , com sequências repetidas gly-x-y (PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995). Aproximadamente 30 cadeias α formam pelo menos 14 tipos distintos de colágeno dos quais os principais são os tipos: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Estes mesmos autores citam os tipos I, II e III como mais abundantes, que são os colágenos intersticiais ou fibrilares, enquanto que os tipos IV, V e VI são colágenos não-fibrilares ou amorfos, que são encontrados no tecido intersticial e nas membranas basais (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

3.2.2) A Inflamação Crônica na Fibroplasia Hepática

Visto que a inflamação crônica atua como coadjuvante no processo da fibroplasia, faz-se necessário comentar à seu respeito. Sendo um produto comum de seqüela nas várias formas de injúria aos tecidos do fígado, a fibroplasia hepática é encontrada principalmente em inflamações resultantes de doenças hepáticas crônicas, cuja evolução é um componente essencial no desenvolvimento da cirrose (CRAWFORD, 2000; FRIEDMAN, 1993; LEE; YOON; MOON, 2004; PINES et al., 1997; YASUDA et al., 1999). Embora a necrose hepática possa parecer no início da inflamação, o inverso também é fato. O ataque a células hepáticas viáveis por células T sensibilizadas é dito como uma causa comum na lesão hepática. A inflamação pode ser limitada ao local de entrada dos leucócitos, que são os tratos portais, ou expandir-se ao parênquima (CRAWFORD, 2000).

Uma das características fundamentais na inflamação é a destruição tecidual, com lesão das células parenquimatosas e do arcabouço do estroma. Em consequência, o reparo não pode ser realizado somente através da regeneração das células parenquimatosas, o que acarreta em tentativas de reparo da lesão tecidual através da substituição das células parenquimatosas não-regeneradas por tecido conjuntivo, o qual, com o decorrer do tempo, produzem fibrose e formação de cicatriz. Esse mecanismo é constituído dos seguintes componentes: formação de novos vasos sangüíneos (ou angiogênese), migração e proliferação dos fibroblastos, deposição da matriz extracelular (MEC) e maturação com organização do tecido fibroso, também chamada de remodelamento (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Estes mesmos autores postulam que o processo de reparo começa logo no início da inflamação (às vezes em apenas 24 horas após a lesão), onde se não houver resolução os fibroblastos e as células endoteliais vasculares começam a se proliferar com o objetivo de formar (em 3 a 5 dias) um tecido especializado conhecido com tecido de granulação.

3.2.3) A Importância das Células Estreladas

As células estreladas (ou armazenadoras de lipídeos, outrora chamadas de Células de Ito), contêm gordura de origem mesênquimal e assim como os macrófagos sinusoidais também se localizam no espaço perissinusoidal. Contendo inclusões lipídicas ricas em vitamina A, as células estreladas desempenham num fígado saudável, funções como: a captação, o armazenamento e a liberação de retinóides, a síntese e a secreção de fatores de crescimento e citosinas além da regulação do diâmetro do lúmen sinusoidal em resposta a diferentes fatores reguladores (como prostaglandinas, tromboxano A₂ e outros) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Esses autores citam que em um fígado cronicamente doente, as células estreladas proliferam e adquirem características de miofibroblastos (com ou sem as inclusões lipídicas). Os referidos autores salientam que sob tais condições essas células são observadas próximo aos hepatócitos lesados e são muito importantes no desenvolvimento da fibrose, inclusive da fibrose secundária à doença alcoólica hepática.

3.2.4) O Mecanismo da Fibrose Hepática

A fibrose hepática consiste de uma resposta comum às injúrias hepáticas de diversas origens; a saber: virais, metabólicas e tóxicas. Caracterizada pelo aumento da produção de componentes da matriz extracelular (MEC) protéica, particularmente de colágenos, que são depositados nos espaços perissinusoidais (CHEVILLE, 2004; FRIEDMAN, 1993; CRAWFORD, 2000; GRESSNER; BACHEM, 1990; LEE; YOON; MOON, 2004; TOSTES, 2003). O depósito continuado de colágeno nos espaços perissinusoidais dentro do parênquima preservado é acompanhado de perda das fenestrações nas células endoteliais sinusoidais. No processo, o espaço sinusoidal passa a assemelhar-se a um capilar ou invés de um canal onde eram efetuadas as trocas de solutos entre os hepatócitos e o plasma. A secreção hepatocelular de proteínas, como a albumina, os fatores de coagulação e as lipoproteínas ficam comprometidos, assim como, o transporte de sangue até os hepatócitos. (CRAWFORD, 2000).

Num fígado considerado normal, encontram-se todos os tipos de colágeno (I,III,IV,V e VI), mas, durante o processo de fibroplasia ocorre um aumento desses colágenos (SCHUPPAN; RUHLMANN; HAHN, 1985), dos quais o tipo I e o tipo III, são intersticiais e sua ocorrência é de 80% a 95% de todo o colágeno hepático (ROJKIND; PEREZ-TAMAYO, 1983). Embora a liberação de grande parte do colágeno seja creditada aos fibroblastos intersticiais, os hepatócitos também podem sintetizar e liberar colágeno. O colágeno do tipo IV (para as membranas basais) é sintetizado no início da injúria hepática, enquanto, os tipos I e III são

produzidos nas fases posteriores da lesão (CHEVILLE, 2004). Contudo, esta posição não é compartilhada por alguns autores como Center (1997), que afirma haver o predomínio de colágeno tipo I na fase inicial da fibrose hepática, enquanto que o predomínio do tipo III ocorre na fase avançada do processo.

Shiba et. al (1998), apontam que após três dias da indução experimental de fibrose hepática em ratos Wistar, houve uma maior intensidade da imunoreação de colágeno tipo I em áreas necróticas perto das veias centrais do fígado, ao ponto que, decorridos mais 6 dias foi constatado que a imunodeposição do colágeno tipo III estava mais evidente; porém, no 14° dia do experimento foi constatado que tanto o colágeno tipo I quanto o tipo III estavam equiparados, porém mais altos que no período inicial do experimento. A expressão do gene referente aos níveis de procolágeno (um precursor da molécula de colágeno, sintetizado no fibroblasto e clivado para formar o colágeno extracelular) tipo I e tipo III, também se mostrou mais evidente no 14° dia do experimento.

O desenvolvimento da fibrose hepática pode ser associado com um número de alterações bioquímicas que conduzem às anormalidades estruturais do metabolismo hepático. Algumas dessas alterações são caracterizadas por mudanças nos níveis de vários produtos metabólicos, que são liberados no sangue e posteriormente excretados pela urina. Importantes alterações nos parâmetros metabólicos e anormalidades bioquímicas ocorrem durante a indução de danos hepáticos experimentalmente induzidos. Estas alterações são compatíveis com a deterioração das funções hepáticas durante a patogênese da fibrose hepática, que está relacionada ao fator de crescimento do tecido de conexão (CTGF) (GEORGE; CHANDRAKASAN, 1996, 2000; PARADIS et al., 1999; RACHFAL; BRIGSTOCK, 2003).

O CTGF é definido como uma proteína multifuncional produzida por vários tipos de células e cuja ação se dá através das vias autócrina e parócrina para regular as várias funções celulares incluindo: crescimento, proliferação, apoptoses, adesão, migração, produção da MEC e diferenciação (LAU; LAM, 1999), além de desempenhar diversos processos biológicos como angiogênese, condrogênese, embriogênese, implantação, desenvolvimento, tumorigênese e fibrose (RACHFAL; BRIGSTOCK, 2003). Alguns estudos demonstraram que o CTGF pode ser um dos efetores que diminuem o TGF- β . Isto tem feito do CTGF um componente bem aceito no processo da fibrogênese (PARADIS et al., 1999). O fato do CTGF ser produzido pelos macrófagos sinusoidais (RACHFAL; BRIGSTOCK, 2003), também ressalta a importância de ambos, do CTGF e macrófagos sinusoidais nos trâmites que elucidam a fibrose hepática.

Várias substâncias e mecanismos têm sido mencionados como bloqueadores ou componentes que influenciam positivamente no bloqueio da fibrose hepática, entre eles: a *pirfenidone* (um agente antifibrótico) (TADA et al., 2001b), o estradiol (YASUDA et al., 1999), o alcalóide *halofuginone* (PINES et al., 1997), bloqueio do TGF- β (ZHE QI et al., 1999) e inibição do TGF- β (NAKURA et al., 2000).

Muitas descobertas e estudos a respeito da fibrose hepática, bem como dos fatores que a envolve foram realizados, mas alguns de seus mecanismos, como o que esclarece o aumento do colágeno no fígado durante a patologia, ainda não foi totalmente esclarecidos (SHIBA et al., 1998), porém o fator mais importante na fibrose hepática é a sua irreversibilidade (CRAWFORD, 2000) e o seu aspecto mais preocupante consiste no fato de que o momento exato desta irreversibilidade é

desconhecido tanto em termos histológicos, como nas mudanças específicas na composição da matriz extracelular e de seu conteúdo (FRIEDMAN, 1993).

3.2.5) Fibrose e Cirrose

A cirrose hepática encontrar-se entre as 10 maiores causas de morte no mundo ocidental (CRAWFORD, 2000). Em cães, a ocorrência da cirrose é atribuída a 15% das moléstias hepáticas desenvolvidas nestes animais (TWEDT, 1985). Em cavalos e suínos esta patologia também é relatada, porém sua maior incidência ainda acomete a espécie canina (SANTOS, 1986). Afirmações como estas aliadas ao fato da fibrose hepática advir de um processo fibrótico (CRAWFORD, 2000; FRIEDMAN, 1993; LEE; YOON; MOON, 2004; PARADIS et al, 1999; PINES et al., 1997; YASUDA et al.,1999), conferem à cirrose hepática um espaço neste trabalho.

O termo cirrose deriva do grego “kirrhós”, que significa cor amarela ou alaranjada. Este termo foi erroneamente empregado, pois nem todos os tipos de fígados cirróticos apresentam esta cor (BOGLIOLO, 1981; ROBBINS, 1965).

As progressões de uma lesão hepática e da fibrose fazem com que os hepatócitos remanescentes sejam estimulados a regenerar-se. Como resultado deste processo regenerativo os hepatócitos acabam por proliferarem-se como nódulos esféricos dentro dos limites dos septos fibrosos; isto aliado ao fato do estreitamento do espaço sinusoidal e do conseqüente comprometimento do transporte de sangue e substâncias aos hepatócitos, bem como do fluxo biliar intra-hepático, acarreta na desorganização generalizada da arquitetura hepática (BOGLIOLO, 1981; CHEVILLE, 2004; CRAWFORD, 2000; GOODMAN; ISHAK, 1999). Como a função é

altamente dependente da estrutura organizacional do tecido, alterações na estrutura conseqüentemente levarão a alterações na função e vice-versa (ROJKIND, 1994), este fato coligado as alterações já mencionadas levam o fígado a um estágio irreversível, mesmo que a sua causa subjacente seja eliminada (CHEVILLE, 2004; JOHNSON, 1997).

Uma vez que a arquitetura hepática original sofre mudanças é correto afirmar que uma nova forma é originada. Em detrimento a estas mudanças, é possível observar degeneração dos hepatócitos, a deposição dos colágenos tipos I e III no lóbulo, criando tratos septais delicados ou espessos (no fígado normal os colágenos intersticiais tipos I e III concentram-se nos tratos portais e ao redor das veias centrais, com feixes eventuais no espaço perissinusoidal) e obliteração dos canais biliares. A etapa final deste mecanismo é caracterizada por insuficiências hepáticas progressiva, complicação relacionada à hipertensão portal ou o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CRAWFORD, 2000). Nas vítimas acometidas pela cirrose hepática, podem-se observar alterações como: estado de coma (resultante do progresso da insuficiência hepática), icterícia e ascite (JOHNSON, 1997; BOGLIOLO, 1981). A intensidade e a ocorrência de outros sintomas e sinais clínicos variam muito, uma vez que existem vários tipos de cirrose e várias etiologias atribuídas a esta moléstia (ROBBINS, 1965), no entanto, o autor cita que um aumento da consistência do fígado é o único fator comum a todas as formas de cirrose.

Como é considerada uma consequência da fibrose hepática, basicamente, todos os fatores que podem ocasionar os mecanismos de uma fibrose, se perpetuantes, levarão o fígado ao quadro cirrótico, porém alguns fatores como

alcoolismo, hepatite crônica, doença biliar e a sobrecarga de ferro merecem destaque (CRAWFORD, 2000).

3.2.6) A Importância das Moléstias Hepáticas na Saúde Pública

O consumo excessivo de álcool que atualmente atinge 10 milhões de brasileiros pode induzir à instalação de cirrose hepática pelas lesões crônicas que causa no fígado. Quinze por cento dos alcoólatras desenvolvem este mal e destes, 75% podem morrer devido aos danos hepáticos (SAMPAIO, 2005).

As hepatites dos tipos B e C, também caracterizam uma preocupação crescente, pois acomete um número significativo da população mundial. Os dados fornecidos pela Organização Mundial da Saúde (HEPATITE, 2000) mostrando que de 2,5% a 4,9% da população brasileira e pelo menos, 1,5% a 2% da população mundial, são portadoras do vírus da hepatite C (“VHC”, um RNA vírus de única fita, com genoma clonado e sequenciado em 1989, pertencente à família *Flaviviridae*) (SILVA, 2000). A hepatite C representa um grave problema de saúde pública e se manifesta, basicamente, por carcinoma hepatocelular que é precedido de cirrose hepática resultante das lesões crônicas que acometem o fígado (ALBERTI; CHEMELLO, 1999; STRAUSS, 2001).

Em animais, as moléstias hepáticas também denotam destaque. Prova disso é que quinze por cento das biópsias realizadas em cães, em casos de hepatopatias, revelaram a manifestação de cirrose hepática (JOHNSON, 1997). Cornelius (1996) e Santos (1986), também ressaltam a importância desta enfermidade na espécie canina.

3.3 A ACUPUNTURA

Proveniente das palavras em latim *acus* (agulha) e *pungere* (espetar) (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997), o termo acupuntura ou Chen-Chui (como é conhecido no oriente) denomina um antigo método chinês que se baseia na estimulação de determinados pontos do corpo através de agulha (Chen) ou de fogo (Chui), com o objetivo de restaurar e manter a saúde (YAMAMURA, 2001). As ações causadas pela acupuntura também podem ser decorrentes de: estimulação elétrica, laser, substâncias químicas, ventosas e escarificações da pele (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997).

A acupuntura faz parte da medicina tradicional chinesa (MTC), termo usado para denominar a combinação prática da acupuntura, moxabustão e da farmacologia natural, realizando desta forma um complexo de meios terapêuticos que segundo relatos de milênios são considerados precisos e eficazes (DUMITRESCU, 1996).

O primeiro tratado clássico da MTC foi compilado entre 500-300 a.C. (400-200 a.C., segundo Altman (1992)). Com o título de *Huandgi Neijing* (Canon of Medicine ou O Cânon de Medicina do Imperador Amarelo) também chamado de *Nei Jing*, esta obra é um resumo teórico e prático da experiência médica da época. O referido livro consiste de duas partes: *Suwen* e *Lingshu* que descrevem as teorias básicas da MTC, patologias e suas etiologias, métodos de diagnóstico e diferenciação das síndromes, bem como o conhecimento básico referente aos pontos da acupuntura e os métodos de uso das agulhas, sendo que 60 % das informações referentes à localização e a indicação terapêutica dos pontos descritos

neste livro, são usados até hoje (ALTMAN, 1992; MAIKE, 1995; HONG JIN PAI, 2005).

A avaliação de MTC realizada durante 10.000 anos de evolução mostra que os sistemas orgânicos são mantidos por uma integração e não devem ser considerados isoladamente (JAGGAR, 1992; LIMEHOUSE, 1992), ao contrário da medicina ocidental que considera o homem como uma unidade indivisível (Ferreira, 1985). Este mesmo autor também postula que ainda em revés ao sistema ocidental de medicina, a MTC, a exemplo do pensamento oriental, tem uma visão sintética do todo, onde o importante não é o fato em si, mas sim o contexto no qual está inserido, assim como o seu significado dentro deste contexto. Além de analisar o organismo a ser estudado como um todo, a MTC, também trata da sua interação com diversos fatores externos como: nutrição, fatores sociais, ambientais, temperatura (calor, frio), umidade do ar, secura) e influências sazonais (estações do ano) (QI-WEN XIE, 1982; JAGGAR, 1992; LIMEHOUSE, 1992; MAIKE, 1995).

Considerado um dos principais “braços” da MTC, a acupuntura é tão vasta que tanto na China, como no Brasil, verifica-se a tendência de substituir o seu nome por acupunturologia (HONG JIN PAI, 2005).

Os estímulos da acupuntura são realizados em áreas definidas na pele, tanto para terapêutica como para auxílio diagnóstico de doenças funcionais reversíveis e também para a melhora de doenças consideradas graves.

A acupuntura promove efeito analgésico, calmante, antidepressivo leve, cicatrizante, anti-inflamatório e relaxante muscular, além de promover imunidade e agir na reabilitação das sequelas do derrame cerebral, fato esses que fazem com que este meio terapêutico seja indicado no tratamento de diversas doenças, inclusive de caráter crônico (HONG JIN PAI, 2005).

3.3.1) O Crescimento da Acupuntura

No período de 1949 a 1977, foram registrados cerca de 8.000 artigos sobre pesquisa clínica com a acupuntura (HONG JIN PAI, 2005). De 1970 a 1983, somente em relação ao mecanismo de ação desta técnica terapêutica, foram publicados mais de 2.000 trabalhos científicos (HONG JIN PAI, 2005). Devido a sua importância, até o ano de 2005 foram registrados no Brasil, cerca de 50 cursos de especialização em acupuntura e 90 serviços de atendimento na rede pública, vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS) (FERREIRA, 2006; SMBA, 2006).

Hong Jin Pai (2005) cita que em 1998 foi criado o Colégio Médico de Acupuntura (CMA), e que até o ano de 2004 o mesmo já contava com 2.500 médicos titulados. Esse mesmo autor também relata que centros médicos como: o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Faculdade de Medicina do São José do Rio Preto e Hospital Regional de São José já possuem residência médica em acupuntura.

Em 1994, após a realização do primeiro Simpósio Brasileiro de Acupuntura Veterinária, a acupuntura começou a difundir-se entre os médicos veterinários no tratamento de animais de pequeno e grande porte. Após cinco anos da realização deste evento, foi fundada a Associação Brasileira de Acupuntura Veterinária (Abravet) durante o I Congresso Brasileiro de Acupuntura Veterinária (HONG JIN PAI, 2005).

Embora a acupuntura no Brasil tenha avançado bastante desde que surgiu no país (1810), ainda caminha em passos lentos, quando comparada a outros

países, como a Alemanha, onde o seu crescimento é considerado exponencial, visto que de 1998 a 2005 o número de médicos que praticavam esta especialidade aumentou de 18.000 para 50.000 profissionais. Neste mesmo país, 90% dos médicos que trabalham em clínica de dor praticam esta forma terapêutica. Os números de médicos de família que também usam a acupuntura para tratar seus pacientes cresceram consideravelmente ao longo dos anos em vários países, a saber: Nova Zelândia, 21% em 1990, Suécia, 25% em 1992, Estados Unidos da América, 1% em 1994 e Inglaterra, 4% até 1997, sendo que neste último país a acupuntura é a segunda terapia mais popular no país (HONG JIN PAI, 2005). Este mesmo autor postula que nos Estados Unidos da América, até o ano de 2005, foi relatada a existência de 27 escolas médicas que incluem a acupuntura na grade curricular de seus cursos, dentre as quais: Harvard, Stanford, Columbia, Johns Hopkins, Yale, UCLA, University of Califórnia (San Francisco) e Case Western. O referido autor ainda ressalta que no Canadá, até o ano de 1997, a Fundação Canadense de Acupuntura realizou cursos para cerca de 2.000 médicos.

3.3.2) A agulha usada na Acupuntura

Descobertas arqueológicas revelaram que no período Neolítico (12000 a 2000 a.C.) foram confeccionados os primeiros instrumentos de pedra. Dentre eles os chamados *bian* ou *bian-shi* (segundo alguns textos), que eram instrumentos com aproximadamente 4,5 cm de comprimento, 0,4cm de largura, borda e uma das extremidades afiadas. Estes instrumentos foram encontrados em uma escavação em Toudaowa (interior da Mongólia) e eram destinados a perfurar a pele para aliviar

dores e curar doenças. Estes seriam as primeiras supostas “agulhas” de acupuntura, que posteriormente passaram a serem confeccionadas de bambu, osso e cerâmica (JAGGAR, 1992, 2006). Esse mesmo autor relata que as primeiras agulhas de metal (confeccionadas de cobre), só surgiram entre 2200 e 500 a.C., (período que compreende a idade do bronze). Seguidas pelas agulhas de cobre, também foram usadas agulhas de prata e de ouro (ALTMAN, 1992), agulhas estas que até os dias de hoje são usadas por alguns profissionais (GAVIOLLE, 1999).

Segundo Klide e Kung¹ (1977 apoud JAGGAR, 2006), graças aos avanços tecnológicos da indústria metalúrgica, as agulhas usadas nos dias atuais são confeccionadas de aço inoxidável e têm como principais características uma fina espessura e um aspecto delicado o que as diferenciam das agulhas comumente usadas para medicações injetáveis (HONG JIN PAI, 2005). Possuem um “corpo” retilíneo, firme, sólido, elástico e de diâmetro igual de ponta a ponta que está acoplado a uma base que o une ao cabo (estrutura constituída de um enrolamento de fios metálicos compridos) cujo comprimento deve ser proporcional ao “corpo” (AUTEROCHE; AUTEROCHE, 1996). Estas características permitem que a aplicação das agulhas de acupuntura seja um procedimento praticamente indolor , que raramente provocando sangramento (HONG JIN PAI, 2005).

¹ KLIDE, A. M.; KUNG, S. H. **Veterinary acupuncture**, Philadelphia, 1977, University of Pennsylvania Press.

3.3.3) O Ponto de Acupuntura

A base morfológica dos pontos de acupuntura ou acupontos tem sido um importante objeto de interesse da pesquisa básica sobre o fenômeno desta ciência (EGERBACHER, 2006).

O ponto de acupuntura é uma realidade concreta, possuindo um significado de comunicação elétrica transcutânea entre o meio elétrico biológico e o meio externo (DUMITRESCU, 1996). Já foi verificado que o ponto de acupuntura é uma região da pele com alta concentração de terminações nervosas livres, que quando estimuladas, projetam esses estímulos para o sistema nervoso central (FABER; TIMO-IARIA, 1994). Estas regiões cutâneas apresentam sensibilidade espontânea ao estímulo e são caracterizadas por uma baixa resistência elétrica (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997). Esse achado também é compartilhado por Zhang et al.² (1988 apud WYNN et al., 2006) e Mu et al.³ (1998 apud WYNN et al., 2006), que mencionam achados de pontos estáveis e linhas de baixas resistências em regiões de membro e tronco, que possuem uma localização quase idêntica às dos pontos de acupuntura clássicas. Afirmam ainda, que nos últimos anos os estudos sobre a resistência dos acupontos foram conduzidos em vários animais (burros, cabras, cães, carneiros, cavalos, coelhos, cordeiros, gado, mulas, porcos, ratos e veados), demonstrando que a maioria dos acupontos apresentava baixa

² ZHANG, L. S. et al. Resistance measurement of meridian acupoint in healthy animals. **Journal Traditional of Chinese Medicine**, v. 1, p. 6-9, 1988.

³ MU, X. et al. Low resistance measurement of acupoints in the small-size pig. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, v. 24, n. 4, p. 45-47, 1998.

resistência aparente e simetria bilateral. A baixa resistência dos acupontos é mais uma evidência quanto à existência dos mesmos (WYNN et al., 2006).

Brunner⁴ (1980 apud DRAEHMPAEHL e ZOHMANN, 1997), após experimento em vários locais de passagens nervosas pode-se constatar a existência da relação com os pontos de acupuntura.

Heine⁵ (1987 apud DRAEHMPAEHL e ZOHMANN, 1997), através de estudo em cadáveres humanos, descobriu que na profundidade destes pontos existem cilindros de tecido conjuntivo na fáscia superficial, nos quais passam nervos e vasos.

Segundo Zhao et al⁶ (1993 apud WYNN et al., 2006) achados anatômicos, 323 dos 324 acupontos (99,7%) são encontrados próximos à nervos periféricos; 304 acupontos (93,8 %) estão relacionados a nervos superficiais (pele) e 170 (52,5%), com nervos de maior profundidade.

Em estudos realizados por Kothbauer⁷ (1961 apud EGERBACHER, 2006), os pontos de acupuntura em vacas e cães são organizados de acordo com dois princípios estruturais diferentes. Um deles denota que os acupontos são encontrados no local de perfuração dos nervos e vasos através da fáscia, enquanto um segundo princípio estrutural indica que os pontos de acupuntura estão localizados no local em que o nervo cutâneo penetra na derme, medialmente ao local de sua perfuração da fáscia.

⁴ BRUNNER, F. Akupunktur für Tierärzte - Akupunktur der Kleintiere. **WBV Biologisch-Medizinische Verlagsgesellschaft mbH & Co.**, Schorndorf, 1980.

⁵ HEINE, H. Zur Morphologie der Akupunkturpunkte. **Dtsch. Zschr. Akup.**, v. 4, p.75-79, 1987

⁶ ZHAO, Y. S. et al. **Veterinary acupuncture**, Beijing, 1993, China Agriculture Press, p. 272.

⁷ KOTHBAUER, O. Ober die druckpunktdiagnose und Neuraltherapie bei tieren. **Wien Tierärztl Mschr.** v. 48, p. 282-294, 1961.

3.3.4) Acupuntura e o Fígado

Existe a visão de que a acupuntura é usada em sua grande maioria, no tratamento de afecções músculo-esqueléticas, porém, a ciência tem demonstrado um universo muito mais amplo onde este meio terapêutico é empregado.

Em 1979, a Organização Mundial da Saúde (OMS) editou uma lista com 41 doenças que apresentaram excelentes resultados com o tratamento feito por acupuntura. Neste documento foi analisada a eficácia da acupuntura, em comparação ao tratamento convencional para 147 doenças, sintomas e condições de saúde, onde se pode observar que no caso de portadores do vírus da hepatite B, o vírus foi negativado em 30% dos casos e nesta mesma patologia, o organismo efetuou uma produção de anticorpos em 50% dos casos (NOETHLICH, 2009).

A pesquisa do uso da acupuntura no tratamento de moléstias hepáticas tem progredido ao longo dos anos, sendo citada a sua aplicação no tratamento de hepatite C para reduzir os efeitos secundários da medicação (WILLIAMS, 1998).

Segundo Hong Jin Pai (2005), a acupuntura deve ser considerada a primeira opção de tratamento em muitas moléstias, dentre as quais, a insuficiência da função hepática. A acupuntura também se mostrou efetiva na prevenção e reversão de lesões por causas tóxicas, ao reduzir o grau de lesões histopatológicas causadas por tetracloreto de carbono (HSU-JAN LIU et al., 2001).

3.3.4.1) A importância do Acuponto *Zusanli* para o Fígado

Muitos acupontos têm sido instrumentos de estudos científicos em diversos órgãos e sistemas corpóreos. O fígado, bem como suas funções e patologias também são objetos de estudo para a acupuntura. Dentre os diversos acupontos usados em estudos hepáticos destaca-se o ponto *Zusanli*.

Também conhecido por E-36 (estômago_36), o *Zusanli* é muito citado e importante no tratamento de muitos distúrbios orgânicos em humanos (seja isoladamente ou em conjunto com outros acupontos). Dentre as patologias nas quais o *Zusanli* é usado, pode-se destacar: gastrites agudas e crônicas, úlceras gástricas e duodenais, enterites agudas e crônicas, constipações, pancreatites agudas, indigestões, gastralgias, paralisias, dores nos membros inferiores, dores nos ombros, estados de choque, fraquezas gerais, anemias, alergias, hipotensões, icterícias, convulsões, asma, enureses, afecções do sistema reprodutor, dores e distensões abdominais, náuseas, vômitos, epilepsias, palpitações, depressões e distúrbios mentais, insônias, doenças oculares (MAIKE, 1995; YAMAMURA, 2001; CARVALHO, 2003). Em medicina veterinária, o *Zusanli* também é considerado um acuponto importante no tratamento de diversas espécies. Em cães o emprego do *Zusanli* destaca-se no tratamento de distúrbios gastrintestinais, paralisias do membro pélvico, doenças metabólicas e endócrinas, além de ser empregado com grande êxito em analgesia por acupuntura (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997; YANN-CHING HWANG; LIMEHOUSE, 2006). Na espécie equina, o *Zusanli* se destaca no tratamento de dor tibial e fibular, dor na soldra, artrite da articulação do

tarso, paralisia dos nervos tibial e fibular, distúrbios gastrointestinais, imunoestimulação, febre, anorexia, letargia, entre outros (FLEMING, 2006). Em aves, o *Zusanli* é usado no tratamento de quaisquer tipos de distúrbios no aparelho digestório, dor abdominal, distúrbios mentais, hemiplegia, dores na região de patela e patas (McCLUGGAGE, 2006).

Na pesquisa experimental, pouco tem sido investigado em relação aos efeitos da acupuntura nas funções hepáticas e a maior parte desses estudos foi publicada em chinês o que limita o acesso a esses conhecimentos. No entanto, podemos observar que o E-36 (*Zusanli*) tem sido um dos acupontos mais escolhidos nessas pesquisas:

Shi et al. (2008), obtiveram em ratos induzidos por agente hepatotóxico, a diminuição dos níveis anormais de α -Fetoproteína hepática e dos níveis sanguíneos de Alanina aminotransferase (ALT) através de eletroacupuntura no acuponto *Zusanli* (E-36).

Chakrabarti et al. (1983), relataram após estimulação crônica com eletroacupuntura, (nos acupontos *Shenshu*, *Dachangshu* e *Zusanli*), a alteração significativa de funções hepáticas à níveis celulares e subcelulares. Estes mesmos autores relataram que o uso da eletroacupuntura não causou nenhum tipo de efeito negativo nas funções hepáticas dos animais usados no experimento.

Xia et al. (2007), demonstraram através de estudo com eletroacupuntura que os acupontos *Fenglong* (E40) e *Zusanli* (E-36), usados em ratos com uma dieta altamente gordurosa e a base de sacarose, diminuiriam consideravelmente os níveis de colesterol LDL (Low Density Lipoprotein-cholesterol), triglicerídeos, bilirrubina total, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), quando comparados ao grupo controle.

Segundo, Yin et al. (2007), vinte pacientes obtiveram melhora da distensão abdominal decorrente de transplante hepático, através da aplicação de neostigmina dentro do acuponto *Zusanli* (E-36).

3.3.4.2) A importância do Acuponto *Sanyinjiao* para o Fígado

Também chamado de BP-6 (baço-pâncreas_6) o acuponto *Sanyinjiao* assim como o *Zusanli*, tem sido instrumento de muitos estudos no meio científico. Suas indicações também são abrangentes, e seu uso em tratamentos pode ser feito de forma isolada ou em associação com outros pontos de acupuntura.

Embora sejam escassas as pesquisas relativas aos efeitos da acupuntura diretamente sobre a atividade hepática, existem vários estudos experimentais evidenciando seus efeitos na atividade gastrointestinal. E nessa linha, os efeitos do BP-6 (*Sanyinjiao*) têm sido bem relatados, principalmente em associação ao E-36 (*Zusanli*). Alguns trabalhos são descritos a seguir:

Sugai et al. (2004), relatam a utilização do *Sanyinjiao* juntamente com o *Zusanli* na motilidade gastro-intestinal de ratos. Os pontos descritos são usados em comparação, com outros pontos e com a técnica de moxabustão, visando comparar e eficácia dos pontos e da técnica descrita na motilidade gastro-intestinal dos animais.

Liu e Zhao (1991), sugerem que a acupuntura promove o movimento intestinal através dos pontos *Sanyinjiao* (PB-6) e *Zusanli* (E-36), realizados em 39 pacientes, de 12 a 24 horas pós-cirurgia .

Feng et al. (2008), obtiveram através da eletroacupuntura realizada em ratos e feita nos acupontos: *Sanyinjiao* (BP-6), *Taichong* (F3), *Fenglong* (E40) e *Zusanli* (E-36); a diminuição dos cinco índices determinantes da doença do fígado gorduroso não-alcoólico. Os referidos autores também elucidam que a eletroacupuntura pode ser usada eficientemente para melhorar o quadro clínico apresentado pela referida doença.

Tabosa et al. (2002), investigaram a influência da estimulação elétrica dos acupontos *Zusanli* (E-36) e *Sanyinjiao* (BP-6) na atividade mioelétrica do intestino delgado de 38 ratos Wistar machos, concluindo que os pontos mencionados foram significativamente capazes de aumentar esta atividade.

Na clínica veterinária, o BP-6 (*Sanyinjiao*) também se destaca no tratamento de várias patologias em diversas espécies. Em cães, é empregado para animar pacientes geriátricos, fadiga, fraqueza e analgesia por acupuntura em cirurgias abdominais (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997; YANN-CHING HWANG; LIMEHOUSE, 2006). Estes mesmos autores também postulam o uso do *Sanyinjiao* no tratamento de distúrbios gastrointestinais, pâncreas e fígado. Em cavalos, o *Sanyinjiao* é empregado no tratamento de distúrbios obstétricos, gastrointestinais e urinários, além de ser usado como imunoestimulador (FLEMING, 2006). Em aves, o *Zusanli* é indicado no tratamento de: diarreia, prolapso de cloaca, retenção de ovos, enfraquecimento motor, paralisia e dor nas patas (McCLUGGAGE, 2006).

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

O presente trabalho de pesquisa utilizou 70 ratos albinos (Wistar), machos, com um peso aproximado de 220-250g. Os animais foram identificados e distribuídos em 7 lotes (CP, CT, CI, LE36, LE36s, LBP6, LBP6s) cada um com N=10, confinados em caixas apropriadas de polipropileno, (quantidade máxima de cinco animais/caixa), em condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz à partir das 07:00 horas). Os animais e as caixas foram provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP).

Todo protocolo experimental e os cuidados com os animais foram aprovados pela comissão de bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

4.1.1) Manejo dos Animais

Foi colocada diariamente em cada gaiola 50g de ração e água *ad libitum*. A cama foi trocada a cada 2 dias e os animais mantidos sob foto-período natural (PARRA et al., 1995).

4.1.1.1) Sedação

Os animais foram mantidos em estado de consciência, porém tiveram suas atividades funcionais reduzidas, visando a minoração da irritabilidade e da excitação para que as agulhas pudessem ser mantidas posicionadas adequadamente nos pontos de acupuntura. Para tanto, os respectivos animais foram inicialmente colocados em uma caixa de indução (30 cm x 20 cm x 20 cm) onde receberam isoflurano em oxigênio a 100% através do aparelho de ventilação mecânica Takaoka 640[®] com auxílio de máscara de tamanho e formato apropriados. Durante todo o procedimento anestésico foram verificadas as frequências cardíaca e respiratória, o grau de relaxamento muscular e os reflexos digitais. Após apresentarem sinais sedativos, os animais foram retirados da caixa de indução e mantidos sob sedação por meio de máscara com tamanho apropriado e confortável para que os animais recebessem isoflurano através do circuito de Magill.

O uso do isoflurano se justificou pelo fato desta droga ter baixa biotransformação e por seus metabólitos intermediários não serem hepatotóxicos (MASSONE, 1994).

4.2 ELETROACUPUNTURA

Optamos por usar a eletroacupuntura principalmente porque este recurso (diferentemente da acupuntura manual) possibilita que a estimulação dos pontos

seja efetuada com frequência e amperagem rigorosamente padronizada minimizando desta forma, o viés na execução da pesquisa e também por sua eficiência e praticidade. Dumitrescu (1996) elucida que nos tempos atuais, a eletroacupuntura é tão largamente utilizada quanto à acupuntura tradicional. Este mesmo autor menciona que numerosos praticantes utilizam a corrente elétrica como meio de estimulação, com resultados claramente superiores à estimulação mecânica.

Neste trabalho, os animais sob efeito de sedação foram submetidos à eletroacupuntura (ondas contínuas de 50 μ A na frequência de 2 Hz,) por um período de 20 minutos. Este procedimento foi realizado através do eletroestimulador AP585-Pro[®] (VMV Costa-Lautz / Brasil).

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Antes dos procedimentos experimentais, todos os animais foram submetidos a exame físico e tiveram sua função hepática avaliada. Esse procedimento objetivou a certificação daqueles que estavam em perfeito estado de saúde. Os animais fora dos padrões normais para os marcadores hepáticos foram substituídos por outros até a obtenção de um lote com amostras uniformes. Após a seleção os animais foram distribuídos aleatoriamente, por sorteio, em sete lotes:

LOTE CP (Controle de Parâmetros) (N=10)

Composto por animais usados como controle na determinação dos seguintes marcadores sanguíneos de lesões hepáticas: alanina aminotransferase (ALT),

aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamyl transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL). Estes marcadores de lesões hepáticas foram dosados através do analisador bioquímico VetLab[®] (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME, EUA). Os animais deste lote receberam doses intraperitoniais de solução salina (9%) três vezes por semana. Porém sem a droga tioacetamida. Ao final de 7 semanas, os componentes deste grupo tiveram seus fígados coletados após sacrifício por overdose de anestésico (CLOSE et al., 1996, 1997), e analisados histologicamente com o objetivo de mostrar a normalidade destes quando comparados aos demais grupos.

LOTE CT (Controle da Tioacetamida) (N=10)

Neste lote, foram analisados os mesmos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas do LOTE CP, através de duas coletas de sangue: uma no início do experimento e outra após 7 semanas. Depois da primeira coleta, cada um dos ratos recebeu o agente hepatotóxico tioacetamida (TAA) por via intraperitoneal, três vezes por semana num período de 7 semanas. Antes da administração da droga cada animal foi devidamente pesado, objetivando desse modo, que a droga fosse administrada de acordo com a dose de 250 mg/Kg [(baseada no protocolo de Ikejima et al. (2002)], diluída em solução salina a 9%. A partir da quarta semana a droga sofreu um aumento de 10% na sua dose (passando a ser 275mg/Kg), para que os organismos dos animais não viessem a adquirir resistência à droga, fato que causaria interferência nos resultados.

Assim como no LOTE CP, os animais deste grupo também tiveram seus fígados coletados e analisados histologicamente, após sacrifício por overdose de anestésico (CLOSE et al., 1996, 1997)

LOTE CI (Controle do Isoflurano) (N=10)

Neste lote foram realizadas a análise dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas e a administração da tioacetamida (TAA) nas mesmas condições e prazos descritos no LOTE CT juntamente com a sedação por isoflurano, aplicada sempre um pouco antes de cada administração da TAA e pelo tempo de 20 minutos. O objetivo deste lote foi investigar possíveis efeitos do isoflurano sobre a função hepática dos animais, uma vez que para se fazer os procedimentos de eletroacupuntura (próximos lotes) as agulhas de acupuntura precisam permanecer retidas nos pontos por um período de 20 minutos e tecnicamente o animal precisa estar sob condição de imobilidade temporária. Este grupo também teve material coletado e submetido à análise histológica de forma similar à descrita para o Lote CT.

LOTE LE36 (N=10)

Nos componentes deste grupo foram efetuados os mesmos procedimentos e prazos descritos no LOTE CI, com o acréscimo do tratamento por eletroacupuntura (ondas contínuas de 50 μ A na freqüência de 2 Hz,) por um período de 20 minutos, realizada através do eletroestimulador AP585-Pro[®] (VMV Costa-Lautz / Brasil). A eletroacupuntura foi aplicada com agulhas de acupuntura feitas de aço inoxidável (0,18 mm / 8 mm, Lautz / Brasil) inseridas bilateralmente no ponto de acupuntura *Zusanli* (E-36) e localizado, nesses animais a 1 mm lateral da tuberosidade tibial (TABOSA et al., 2002).

LOTE LE36s (N=10)

Os animais deste lote foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para o LOTE LE36, porém a eletroestimulação foi aplicada bilateralmente em um “não-ponto” de acupuntura (Sham) localizado 45° distal do ponto E-36 (*Zusanli*) verdadeiro. O objetivo desse lote foi comparar a eletroacupuntura com a eletroestimulação aleatória.

LOTE LBP6 (N=10)

Os animais de LBP6 foram submetidos aos mesmos procedimentos do LOTE LE36 diferindo somente na eletroacupuntura, que foi realizada bilateralmente no ponto *Sanyinjiao* (BP-6), localizado nesses animais, na borda medial da tíbia, a 0,5 mm acima do maléolo medial (TABOSA et al., 2002).

LOTE LBP6s (N=10)

Neste lote os procedimentos foram semelhantes aos do LE36s, exceto que o “não-ponto” utilizado se localizou 45° proximal ao *Sanyinjiao* (BP-6). O objetivo de uso deste lote de animais foi comparar se os efeitos obtidos são decorrentes da função do ponto de acupuntura ou somente uma reação ao estímulo nociceptivo induzido pela inserção da agulha.

Os animais foram submetidos às sessões de eletroacupuntura imediatamente após a sedação com isoflurano, aplicada sempre um pouco antes de cada administração do agente hepatotóxico (tioacetamida), nos dias e prazos prescritos.

Assim como nos LOTES CP, CT e CI os animais dos lotes restantes (LE36, LE36s, LBP6, LBP6s), após sacrifício [(realizado por overdose de anestésico (CLOSE et al., 1996, 1997)], também tiveram seus fígados coletados para estudo

histológico que foram comparados com a análise dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (realizadas através da coleta de sangue dos lotes) visando analisar se as alterações teciduais e funcionais dos fígados tiveram influência da eletroacupuntura.

4.3.1) Processamento do Material para a Histologia

As amostras de tecido foram obtidas dos 7 lotes e coletadas de vários lobos do fígado. Os referidos fragmentos não ultrapassaram o diâmetro de 5 mm, para desta forma tornarem-se mais adequados ao processamento histológico. A análise histológica do material objetivou a comparação dos tecidos hepáticos referentes aos sete lotes onde foram verificadas e descritas as alterações causadas pela droga tioacetamida (TAA) e se essas alterações sofreram interferência da eletroacupuntura.

4.3.1.1) Fixação e Inclusão para Microscopia de Luz

A fixação foi realizada em líquido fixador de BOUIN por 12 horas. O respectivo material foi incluído em paraplast e sofreu cortes histológicos de 5 micrômetros de espessura realizados em micrótomo manual. Estes cortes foram distendidos em banho-maria a uma temperatura média de 39°C para em seguida serem recolhidos em lâminas de vidro.

4.3.1.2) Colorações para Microscopia de Luz

Os cortes de fígado recolhidos em lâmina de vidro foram desparafinados em xilol e xilol/etanol (1:1), rehidratados em sequência decrescente de etanol, lavados em água corrente e, então, corados. Após a coloração, esses cortes passaram por desidratação, na sequência inversa, sendo retirados do xilol e montados em resina sintética Permount[®] (LIMA, 2008).

4.3.1.2a) Coloração em Hematoxilina e Eosina (HE)

Para uma verificação mais precisa dos aspectos morfológicos bem como para a observação das lesões, o material foi corado por Hematoxilina-Eosina (BANCROFT & STEVENS, 1982). A ação desses corantes ocorre da seguinte forma: enquanto a Hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas, a Eosina vai atuar corando o citoplasma e o colágeno em cor-de-rosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004a), possibilitando desta forma uma visão geral da célula através do contraste entre núcleo e citoplasma.

4.3.1.2a1) Classificação das Lesões Obtidas em Hematoxilina e Eosina (HE)

As lesões visualizadas nas lâminas de Hematoxilina e Eosina (HE) foram descritas segundo o índice de atividade histológica (IAH) e seus *scores*, descrito por

Ishak et al. (1995) e observado na tabela 1.

Tabela 1 – Índice de atividade Histológica (IAH) e seus scores

Necrose de Piecemeal	Score
Ausente	0
Suave (focal/poucas regiões portais)	1
Suave a Moderado (focal/diversas regiões portais)	2
Moderado (contínuo ao redor de < 50% das regiões portais ou sinusoidais)	3
Severo (contínuo ao redor de > 50% das regiões portais ou sinusoidais)	4
Necrose	Score
Ausente	0
Focal	1
Em Zona 3 (poucas regiões)	2
Em Zona 3 (diversas regiões)	3
Em Zona 3 e ocasionalmente na ponte v. porta – V. terminal hepática	4
Em Zona 3 e múltiplos locais na ponte v. porta – V. terminal hepática	5
Multiacinar	6
Inflamação Focal / Apoptose	Score
Ausente	0
1 foco ou menos por campo (objetiva de 10x)	1
2 a 4 focos por campo (objetiva de 10x)	2
5 a 10 focos por campo (objetiva de 10x)	3
Mais de 10 focos por campo (objetiva de 10x)	4
Inflamação Portal	Score
Ausente	0
Suave (poucas regiões portais)	1
Moderado (diversas regiões portais)	2
Acentuado (todas as regiões portais)	3
Severo (todas as regiões portais)	4

4.3.1.2b) Coloração em Picro-Sirius (PS)

O Picro-sirius (PS), considerado um corante para visualização de colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979), foi utilizado para a evidenciação dessa respectiva estrutura no tecido hepático alterado pela tioacetamida (TAA). Antes de o material sofrer a coloração em Picro-sirius (PS), foi banhado por 1 minuto em solução de ácido fosfomolibdico a 2%, para eliminar o fundo projetado nas imagens, facilitando a evidenciação do colágeno. Os cortes foram analisados pelo sistema de análise de imagem kontron KS400.3 Zeiss® e a ocorrência de colágeno nos cortes foi determinada e comparada qualitativamente em todos os grupos.

4.3.1.2a2) Classificação das Lesões Obtidas em Picro-Sirius (PS)

As lesões visualizadas nas lâminas de Picro-sirius (OS) foram descritas segundo a classificação de lesões estruturais ocorridas em fibrose e/ou cirrose em seus *scores*, descritos por Ishak et al. (1995) e observadas na tabela 2.

Tabela 2 – Alterações estruturais ocorridas em fibrose e/ou cirrose

Alterações Estruturais / Fibrose e/ou Cirrose	Score
Sem fibrose	0
Expansão da fibrose em <u>algumas</u> regiões portais, com ou sem pequenos septos fibrosos	1
Expansão da fibrose em <u>diversas</u> regiões portais, com ou sem pequenos septos fibrosos	2
Expansão da fibrose em <u>diversas</u> regiões portais, com ocasional formação de pontes entre os espaços portais	3
Expansão da fibrose nas regiões portais, com marcante formação de pontes entre os espaços portais ou entre a v. porta e a v. terminal hepática	4
Marcante formação de pontes entre os espaços portais e entre a v. porta e a v. terminal hepática, com formação ocasional de nódulos (cirrose incompleta)	5
Cirrose	6

4.3.2) PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA ANÁLISE DOS MARCADORES SANGUÍNEOS DE LESÕES HEPÁTICAS

A coleta de sangue dos animais referentes aos sete lotes foi realizada através de anestesia com isoflurano (Cristália, Brasil) em oxigênio a 100% através do aparelho de ventilação mecânica Takaoka 640[®] com auxílio de máscara, cujo tamanho e formato eram apropriados aos animais. Durante toda a coleta foram verificadas as frequências cardíaca e respiratória, pelo grau de relaxamento muscular e pelos reflexos digitais. As amostras de sangue foram coletadas através de punção por via intra-cardíaca. O volume de sangue colhido foi de, no máximo, 1 ml, utilizando-se agulhas de 30 x 0,7 mm e seringa de 3 mL, ambas heparinizadas.

As amostras permaneceram em um recipiente com gelo picado até o término dos procedimentos de coleta, imediatamente após este processo, foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos (LIMA, 2008). O plasma resultante da centrifugação foi usado para a obtenção das análises dos seguintes marcadores sanguíneos de lesões hepáticas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL). Os valores médios de ALT, AST, ALKP e GGT foram apresentados em U/L, enquanto que os valores de ALB e TP foram expressos em g/dL e os das TBIL em mg/dL. O processamento do plasma foi realizado no analisador bioquímico VetTest[®] (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME, EUA).

As amostras de sangue obtidas no início do experimento foram realizadas para checar a normalidade dos parâmetros citados e as amostras colhidas na última semana do experimento (7^a semana), foram feitas visando pesquisar as alterações nos animais submetidos à tioacetamida (TAA) antes e após os mesmos serem tratados pela eletroacupuntura.

4.4 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Após a obtenção das lâminas coradas, as mesmas foram fotografadas em microscópio óptico (OLYMPUS, BX60) com câmara acoplada (ZEISS, AxioCam HRc) através do *software* Axion Vision[®] (ZEISS, 2000), para a aquisição das imagens.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos através da análise histológica e bioquímica do material referente aos 7 lotes foram submetidos à análise estatística e confrontados entre si.

4.5.1) Testes Paramétricos

As comparações dos marcadores sanguíneos de lesão hepática foram realizadas em três etapas:

1ª ETAPA:

Os lotes CP, CI e CT foram comparados pelo teste Anova, com pós-teste de Tukey, para comprovar a atuação da droga tioacetamida (TAA) no lote CT e verificar através do lote CI se o anestésico influenciou os marcadores sanguíneos dos outros grupos.

2ª ETAPA:

Dentro dessa etapa foram previstas duas possibilidades de procedimentos metodológicos, que seriam aplicados de acordo com os resultados dos testes da primeira etapa. Ou seja, se os testes da 1ª etapa não apresentassem influência do anestésico nos marcadores sanguíneos, seriam confrontados os lotes E36, E36s, BP6 e BP6s com o lote CT para analisar a expressão dos pontos de acupuntura usados em relação aos marcadores sanguíneos representados sob a forma de controle através do lote CT. Esta etapa seria realizada através do teste Anova com o pós-teste de Tukey

Já se o testes da 1ª etapa apresentasse influência do anestésico nos marcadores sanguíneos, os lotes E36, E36s, BP6 e BP6s seriam confrontados com o lote CI para analisar a expressão dos pontos de acupuntura usados em relação aos marcadores sanguíneos representados sob a forma de controle, que nesse caso seria efetuado através do lote CT. Esta etapa também seria realizada através do teste Anova com o pós-teste de Tukey.

4.5.2) Testes Não-paramétricos

Com o objetivo de analisar estatisticamente os resultados obtidos através do IAH (índice usado para classificar as alterações vistas através do HE) e das Alterações estruturais ocorridas em fibrose e/ou cirrose (classificação usada para analisar as lâminas de PI); foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho são descritos a seguir

5.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS MARCADORES SANGUÍNEOS DE LESÕES HEPÁTICAS

Objetivando um melhor entendimento dos resultados, foram criadas algumas normas para a interpretação dos resultados referentes às análises dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas.

Norma 1: Os resultados estatísticos foram apresentados junto com os resultados das análises bioquímicas, visando um melhor entendimento.

Norma 2: O fato dos animais serem pesados constantemente para o cálculo da administração da tioacetamida (TAA), permitiu também que o peso fosse acompanhado em todos os grupos.

Norma 3: Em todos os lotes, com exceção do lote CP, os valores da primeira coleta só serviram para expressar se os fígados dos animais estavam em boas condições fisiológicas, o que representa a aceitação do animal no lote para o prosseguimento dos procedimentos experimentais. Estes dados não foram incluídos nos resultados.

5.1.1) Resultados dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas do LOTE CP

A análise dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas [alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL)], resultantes do plasma sanguíneo da 1ª e 2ª coletas do lote CP, foram comparadas, contudo, não expressaram diferenças consideráveis, exceto o peso que, como era esperado, apresentou um aumento expressivo (33,92%) em relação ao observado na primeira coleta, comprovando assim um bom estado fisiológico do fígado destes animais, logo, os resultados deste lote foram usados como referência para animais que não apresentam anormalidades hepáticas.

O resultado das médias dos parâmetros da 2ª coleta de sangue dos animais desse lote é apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Médias e Desvios Padrões dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas da 2ª coleta de sangue do lote Controle de Parâmetros (CP) – São Paulo – 2009

MARCADORES do LOTE CP	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Peso g	394,10	33,46
ALB g/dl	2,97	0,3529
ALKP U/L	96,00	10,64
ALT U/L	39,00	18,95
AST U/L	104,50	41,80
GGT U/L	0,0	0,0
TBIL mg/dl	0,07	0,0823
TP g/dl	6,53	0,2452

Nota: Os marcadores apontados são expressos da seguinte forma: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL). N=10 animais.

5.1.2) Comparação dos resultados dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas dos lotes: CP, CT e CI

Após comparação dos lotes CP, CT e CI, realizadas pela aplicação do teste Anova, foram constatadas as diferenças entre eles (tabela 4). Estas diferenças foram apresentadas através da aplicação do pós-teste de Tukey que além do peso, indicou, quais marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH) demonstraram alterações estatisticamente significantes (tabela 5). As diferenças apresentadas no peso e nos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH): ALB, ALKP, ALT, AST, GGT, TBIL e TP, são ilustradas respectivamente nas figuras: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Tabela 4 – Confronto entre os lotes: Controle de Parâmetros (CP), Controle de Tioacetamida (CT) e Controle de Isoflurano (CI), pelo teste Anova, apresentando diferença significativa entre os lotes expressa através do **P. VALUE** – São Paulo – 2009

MARCADORES	P. VALUE (P < 0,05)	LOTE CP (M ± DP)	LOTE CT (M ± DP)	LOTE CI (M ± DP)
Peso g	0,0001	394,10 ± 33,46	209,53 ± 35,55	241,30 ± 15,36
ALB g/dl	0,0052	2,97 ± 0,3529	2,63 ± 0,3020	2,46 ± 0,3134
ALKP U/L	0,0001	96,00 ± 10,64	251,10 ± 87,04	231,50 ± 52,46
ALT U/L	0,0004	39,00 ± 18,95	88,10 ± 15,36	18,40 ± 63,14
AST U/L	0,0059	104,50 ± 41,80	189,80 ± 65,58	179,60 ± 66,11
GGT U/L	0,0003	0,0 ± 0,000	5,2 ± 3,521	3,3 ± 2,541
TBIL mg/dl	0,0036	0,07 ± 0,0823	0,51 ± 0,2424	0,36 ± 0,3864
TP g/dl	0,0003	6,53 ± 0,2452	6,11 ± 0,4557	5,73 ± 0,4057

Nota: Os Marcadores apontados são expressos da seguinte forma: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL). N=10 animais.

Tabela 5 – Demonstração dos Marcadores Sanguíneos de Lesões Hepáticas (MSLH) através do pós-teste de Tukey, mostrando as diferenças apontadas pelo teste Anova – São Paulo – 2009

MARCADORES SANGUÍNEOS	Lotes que demonstraram diferenças (A com B)*	P. VALUE (P < 0,05)	Média (A e B)*	Desvio Padrão (A e B)*
Peso g	(CP com CI)	0,001	(394,10 e 241,30)	(33,46 e 15,36)
	(CP com CT)	0,001	(394,10 e 209,53)	(33,46 e 35,55)
ALB g/dl	(CP com CI)	0,01	(2,97 e 2,46)	(0,3529 e 0,3134)
ALKP U/L	(CP com CI)	0,001	(96,00 e 251,10)	(10,64 e 87,04)
	(CP com CT)	0,001	(96,00 e 231,50)	(10,64 e 52,46)
ALT U/L	(CP com CI)	0,05	(39,00 e 88,10)	(18,95 e 15,36)
	(CP com CT)	0,001	(39,00 e 18,40)	(18,95 e 63,14)
AST U/L	(CP com CI)	0,01	(104,50 e 189,80)	(41,80 e 65,58)
	(CP com CT)	0,05	(104,50 e 179,60)	(41,80 e 66,11)
GGT U/L	(CP com CI)	0,001	(0,0 e 5,2)	(0,000 e 3,521)
	(CP com CT)	0,05	(0,0 e 3,3)	(0,000 e 2,541)
TBIL mg/dl	(CP com CT)	0,001	(0,07 e 0,51)	(0,0823 e 0,2424)
TP g/dl	(CP com CI)	0,0003	(6,53 e 5,73)	(0,2452 e 0,4057)

Nota: * Representa a comparação de dois lotes: o primeiro indicado pela letra **A** e o segundo representado pela letra **B**. Os marcadores Marcadores Sanguíneos apontados são expressos da seguinte forma: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL). Os lotes comparados na 2ª coluna são: Controle de Parâmetros (CP) e o Controle de Isoflurano (CI). N=10 animais.

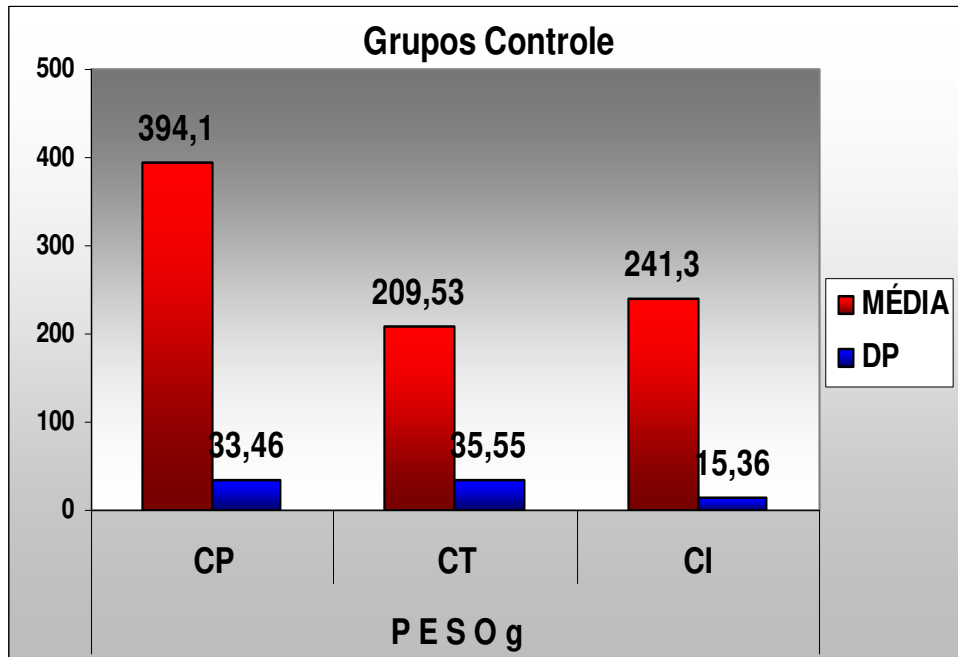


Figura 1-Gráfico das médias e desvios padrões (DP) do peso dos grupos controle, referentes aos lotes Controle de Parâmetros (CP), Controle de Tioacetamida (CT) e Controle de Isoflurano (CI). N=10

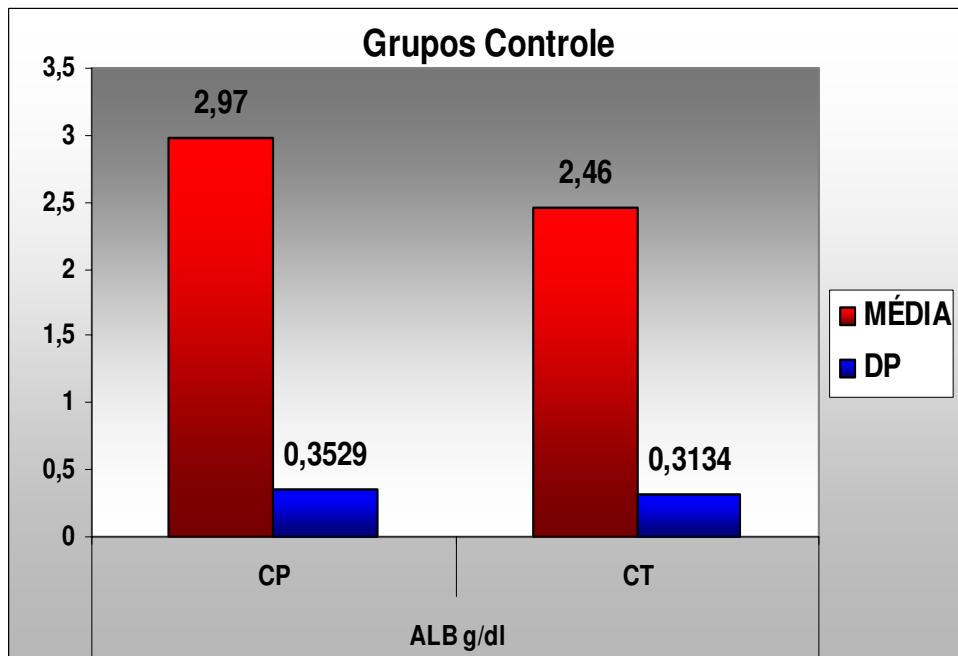


Figura 2- Gráfico das médias e desvios padrões (DP) dos grupos controle, referentes ao marcador sanguíneo de lesão hepática albumina (ALB), dos lotes Controle de Parâmetros (CP) e Controle de Tioacetamida (CT). N=10

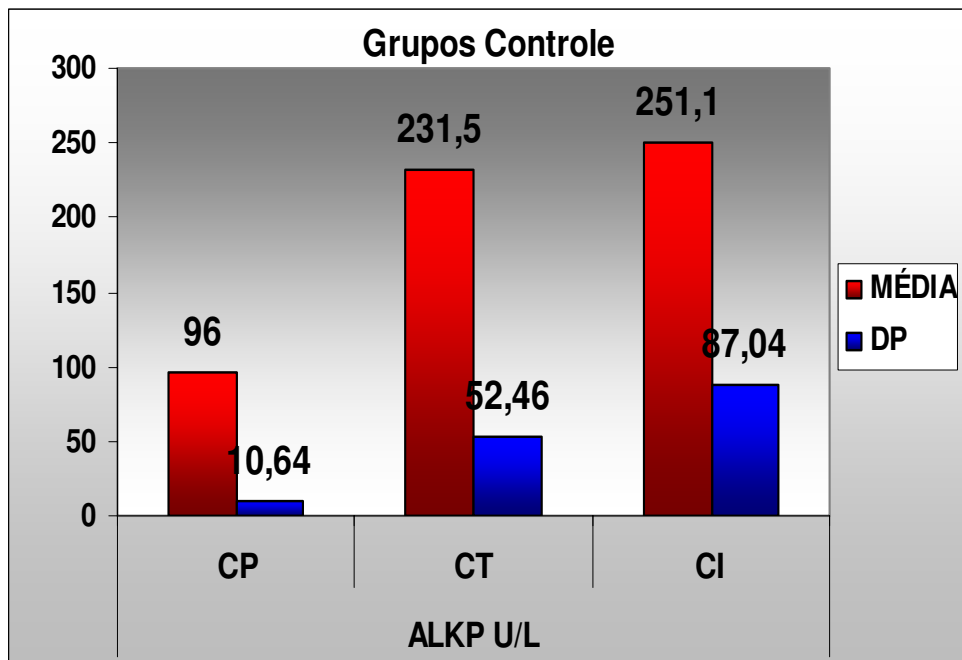


Figura 3- Gráfico das médias e desvios padrões (DP) dos grupos controle, referentes ao marcador sanguíneo de lesão hepática fosfatase alcalina (ALKP), dos lotes Controle de Parâmetros (CP) ,Controle de Tioacetamida (CT) e Controle de Isoflurano (CI). N=10

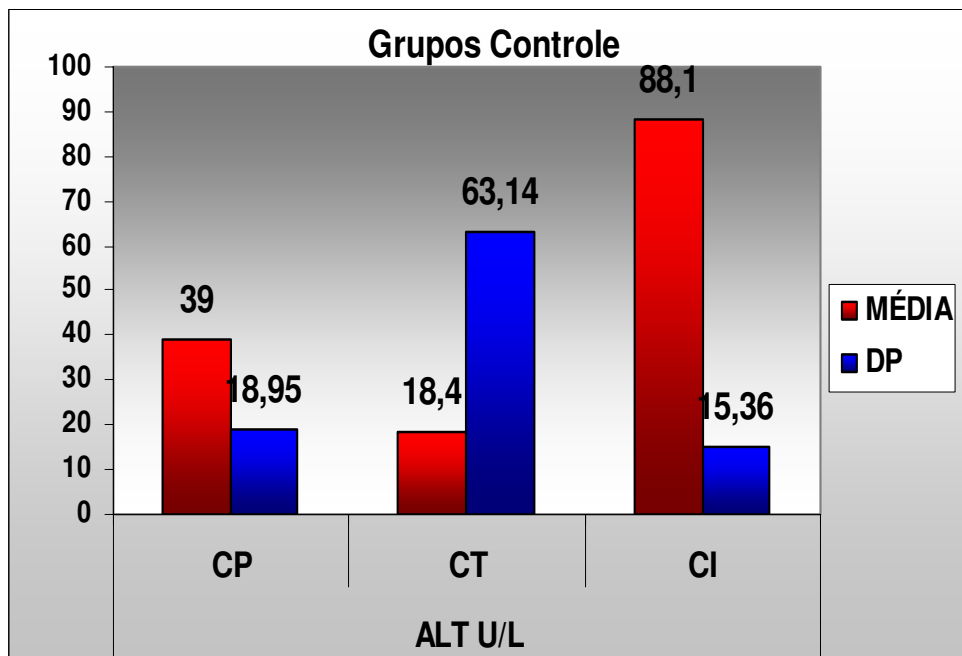


Figura 4- Gráfico das médias e desvios padrões (DP) dos grupos controle, referentes ao marcador sanguíneo de lesão hepática alanina aminotransferase (ALT), dos lotes Controle de Parâmetros (CP) ,Controle de Tioacetamida (CT) e Controle de Isoflurano (CI). N=10

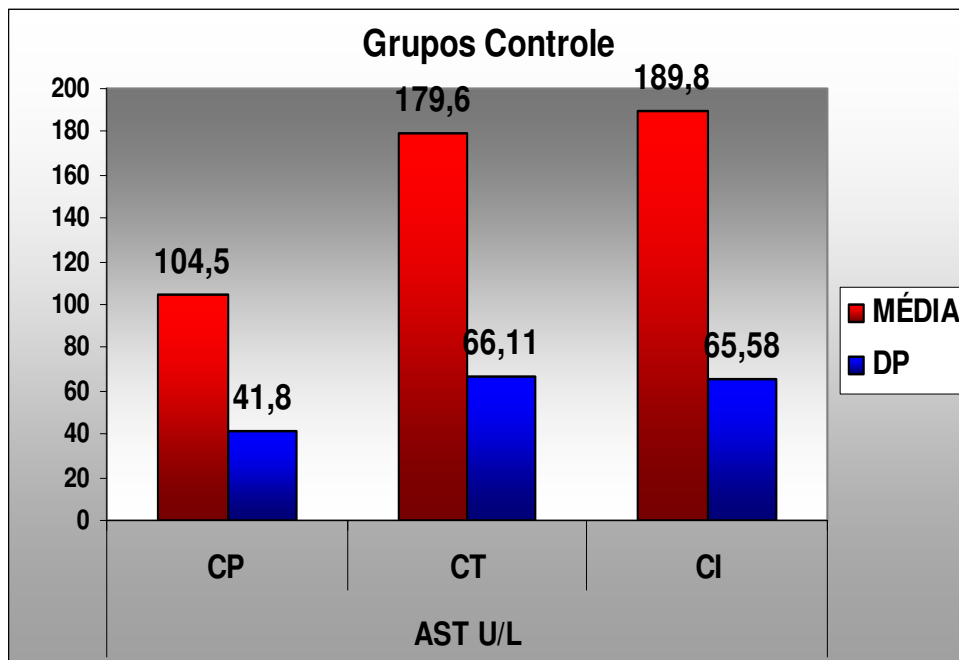


Figura 5- Figura 4- Gráfico das médias e desvios padrões (DP) dos grupos controle, referentes ao marcador sanguíneo de lesão hepática aspartato aminotransferase (AST), dos lotes Controle de Parâmetros (CP) ,Controle de Tioacetamida (CT) e Controle de Isoflurano (CI). N=10

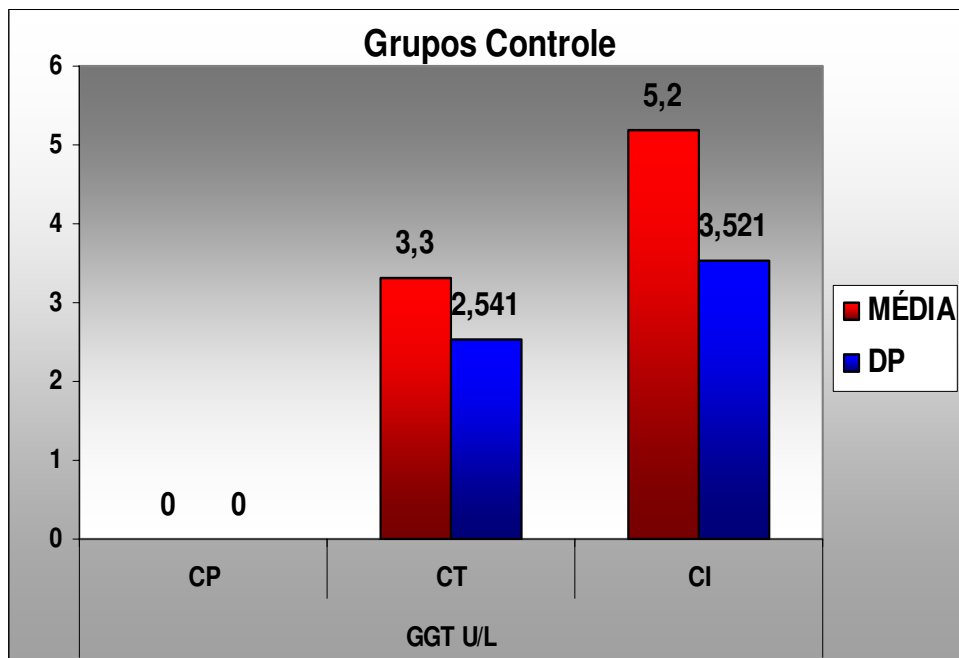


Figura 6- Gráfico das médias e desvios padrões (DP) dos grupos controle, referentes ao marcador sanguíneo de lesão hepática γ -glutamil transferase (GGT), dos lotes Controle de Parâmetros (CP) ,Controle de Tioacetamida (CT) e Controle de Isoflurano (CI). N=10

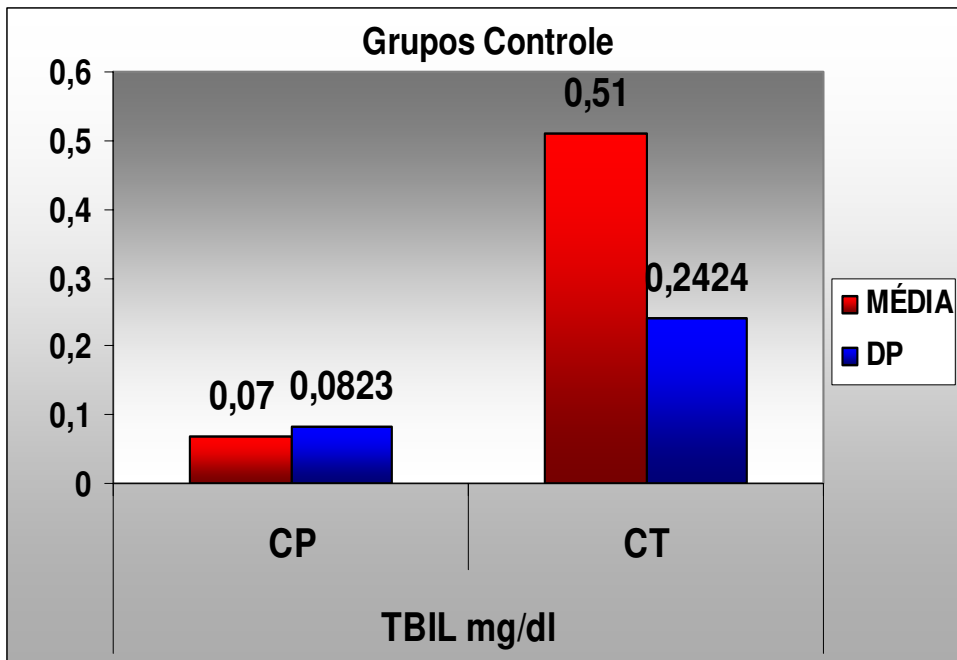


Figura 7- Gráfico das médias e desvios padrões (DP) dos grupos controle, referentes ao marcador sanguíneo de lesão hepática bilirrubinas totais (TBIL), dos lotes Controle de Parâmetros (CP) e Controle de Tioacetamida. N=10

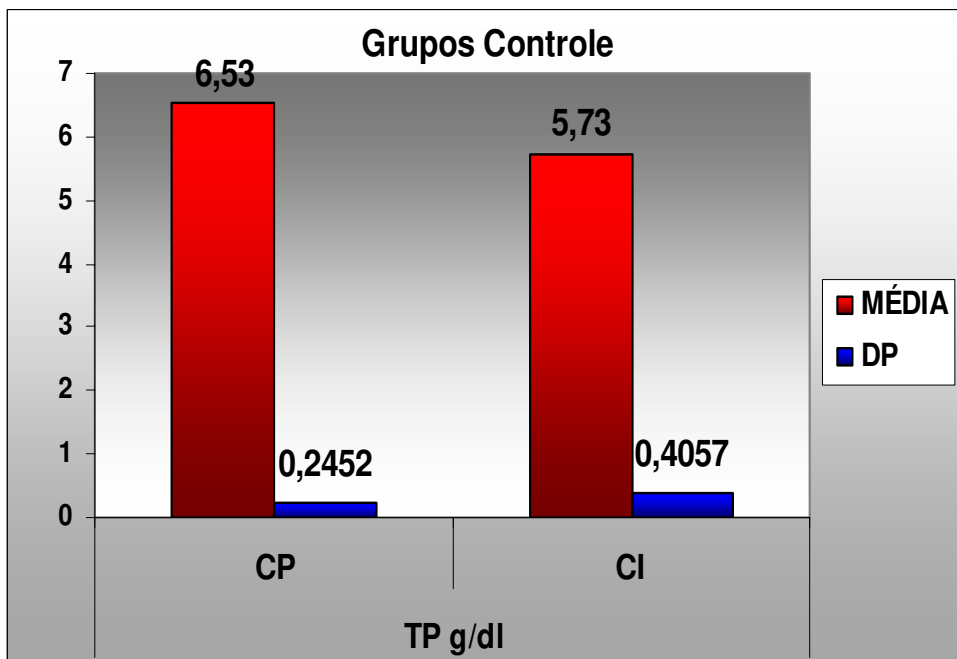


Figura 8- Gráfico das médias e desvios padrões (DP) dos grupos controle, referentes ao marcador sanguíneo de lesão hepática proteína total (TP), dos lotes Controle de Parâmetros (CP) e Controle de Tioacetamida. N=10

Os marcadores sanguíneos de lesões hepáticas ALB e TP, referentes ao lote CI apresentaram uma diferença estatística no pós-teste de Tukey em relação aos mesmos marcadores apontados no lote CP (como demonstrado na tabela 5 e nas figuras 2 e 8). Em contra partida os mesmos marcadores do lote CT, não apresentaram diferença. Diante deste fato, o lote escolhido para ser confrontado com os lotes dos pontos de acupuntura e de “não-pontos” (E36, E36s, BP6 e BP6s) foi o CI, que serviu como controle para avaliar se a eletroacupuntura interferiu ou não na progressão de lesões hepáticas. Esta questão é esclarecida através dos resultados da tabela 6 apresentados mediante a realização do teste de Anova que apontou em quais marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH) a eletroacupuntura interferiu. O resultado indicando a precisão desta interferência, bem como a comparação da eficácia entre os pontos de acupuntura, é apresentado na tabela 7, pela aplicação do pós-teste de Tukey.

Tabela 6 – Confronto entre os lotes: Controle de Isoflurano (CI), Ponto de Acupuntura E36 (E36), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), Ponto de Acupuntura BP6 (BP6) e “Não-ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s), pelo teste Anova, demonstrando em quais Marcadores Sanguíneos de Lesões Hepáticas (MSLH) a eletroacupuntura interferiu estatisticamente – São Paulo – 2009

Marcadores	P. Value (P < 0,05)	Lote CI (N=10) (M ± DP)	Lote E36 (N=10) (M ± DP)	Lote E36s (N=10) (M ± DP)	Lote BP6 (N=10) (M ± DP)	Lote BP6s (N=10) (M ± DP)
ALB g/dl	0,0073	2,46±0,3134	2,71±0,3107	2,4±0,2828	2,84±0,2675	2,64±0,2459
ALT U/L	0,0015	118,40±63,14	94,50±26,61	99,90±23,54	52,80±9,93	88,70±13,18
AST U/L	0,0068	179,60±66,11	171,60±46,73	227,70±81,15	128,60±38,92	188,00±29,98

Nota: Os Marcadores apontados são expressos da seguinte forma: albumina (ALB), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Tabela 7 – Atuação e comparação estatística da eletroacupuntura sobre Marcadores Sanguíneos de Lesões hepáticas (MSLH) específicos pela aplicação do pós-teste de Tukey – São Paulo – 2009

MARCADORES SANGUÍNEOS	Lotes que demonstraram diferenças (A com B)*	P. VALUE (P < 0,05)	Média (A e B)*	Desvio Padrão (A e B)*
ALB g/dl	(CI com BP6)	0,05	(2,46 e 2,84)	(0,3134 e 0,2675)
	(BP6 com E36s)	0,05	(2,84 e 2,4)	(0,2675 e 0,2828)
ALT U/L	(CI com BP6)	0,001	(118,40 e 52,80)	(63,14 e 9,93)
	(BP6 com E36s)	0,05	(52,80 e 99,90)	(9,93 e 23,54)
AST U/L	(BP6 com E36s)	0,01	(128,60 e 227,70)	(38,92 e 81,15)

Nota: * Representa a comparação de dois lotes: o primeiro indicado pela letra **A** e o segundo representado pela letra **B**. N=10 animais. Os Marcadores apontados são expressos da seguinte forma: albumina (ALB), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Os nomes dos lotes comparados na primeira coluna são apresentados da seguinte maneira: Controle de Isoflurano (CI), Ponto de Acupuntura BP6 (BP6) e “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s). N=10 animais

Os resultados mais significativos da eletroacupuntura indicados na tabela 7 estão ilustrados nas figuras 9 e 10.

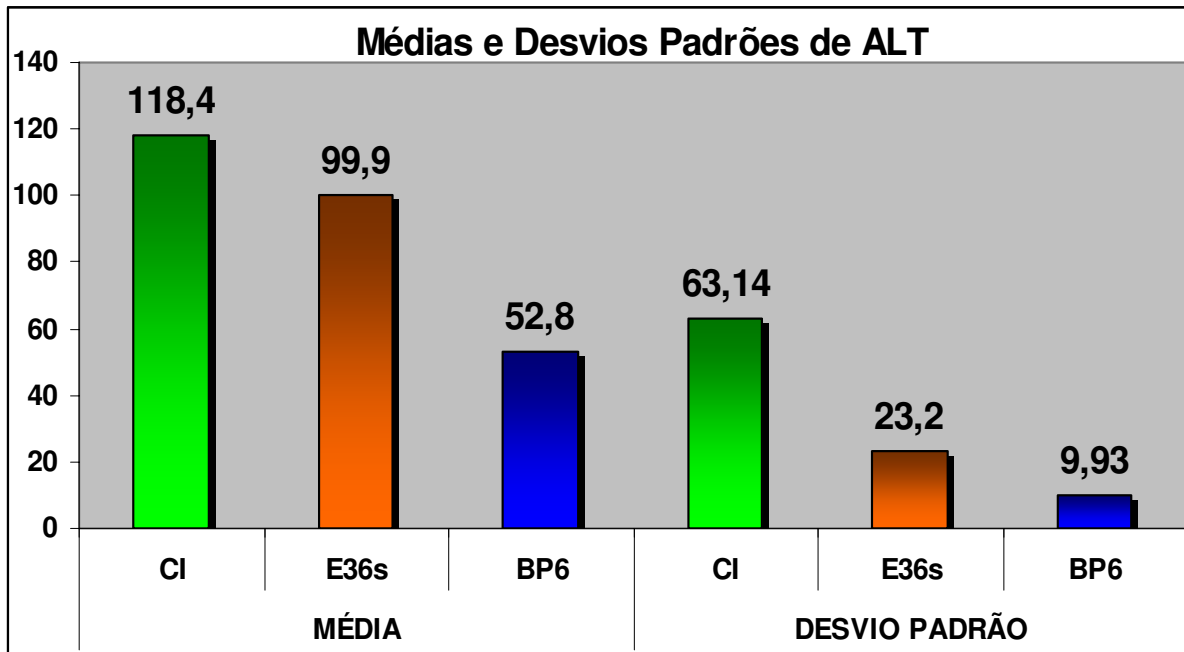


Figura 9 - Gráfico das médias e desvios padrões dos lotes Controle de Isoflurano (CI), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s) e Ponto de Acupuntura (BP6), evidenciando a influência da eletroacupuntura sobre o marcador sanguíneo de lesão hepática alanina aminotransferase (ALT). N=10 animais

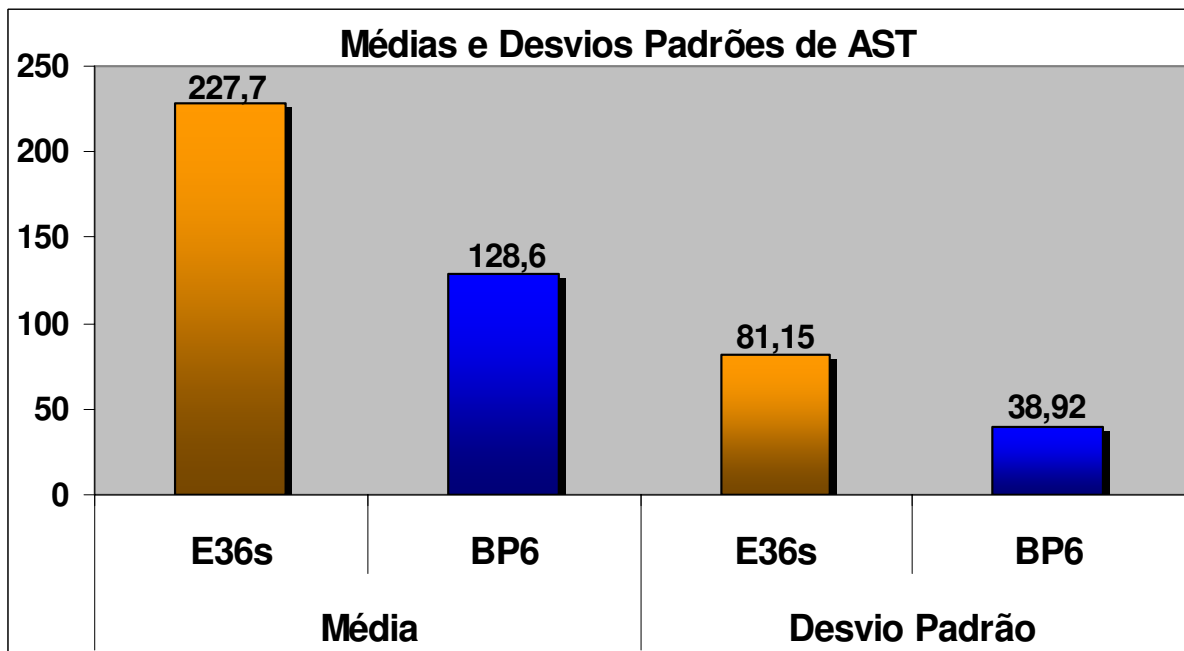


Figura 10 - Gráfico das médias e desvios padrões dos lotes: “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s) e Ponto de Acupuntura BP6 (BP6), evidenciando a influência da eletroacupuntura sobre o marcador sanguíneo de lesão hepática aspartato aminotransferase (AST). N=10 animais

5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS

5.2.1) Resultados das análises em Hematoxilina e Eosina (HE)

Os *scores* do índice de atividade histológica (IAH) dos lotes são mostrados em ordem decrescente na tabela 8, indicando a média de acometimento de cada lote. Estes também podem ser visualizados graficamente através da figura 11.

Tabela 8 - Médias e Desvios Padrões dos *scores* do índice de atividade histológica (IAH), apresentadas em ordem decrescente pelo valor da Média, indicando do lote mais acometido para o menos afetado pelas lesões hepáticas em material corado por Hematoxilina e Eosina (HE) – São Paulo – 2009

Índice de Atividade Histológica (IAH)						
LOTE	CT	BP6s	CI	E36s	E36	BP6
MÉDIA	6,9	6,7	6,0	5,9	4,3	3,4
DESVIO PADRÃO	0,738	1,494	1,155	0,568	0,160	0,843

Nota: Os nomes dos lotes são expressos da seguinte maneira: Controle de Tioacetamida (CT), “Não-ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s), Controle de Isoflurano (CI), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), Ponto de Acupuntura E36 (E36) e Ponto de Acupuntura (BP6). N= 10 animais.

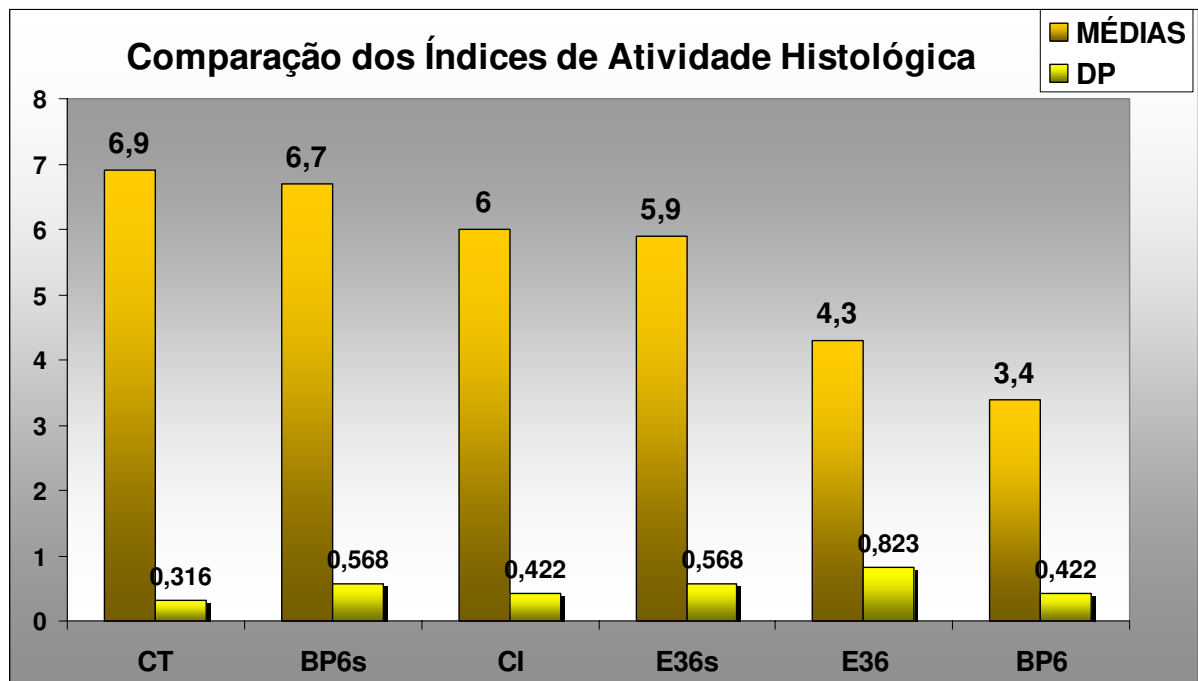


Figura 11 - Gráfico das médias dos *scores* do índice de atividade histológica (IAH) dos lotes: Controle de Tioacetamida (CT), “Não-ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s), Controle de Isoflurano (CI), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), Ponto de Acupuntura E36 (E36) e Ponto de Acupuntura BP6 (BP6). N= 10 animais

Estatisticamente, a análise destes resultados foi realizada empregando o teste de Kruskal-Wallis, que indicou uma diferença visível entre os lotes ($P < 0,0001$). O resultado deste teste foi processado pelo pós-teste de Dunn, que comparou os resultados de maior expressão estatística através de análise da mediana, média e desvio padrão de cada lote (tabela 9).

Tabela 9 – Comparação dos lotes que apresentaram maior expressão estatística no índice de atividade histológica (IAH), pelo pós-teste de Dunn – São Paulo – 2009

Lotes que demonstraram maior expressão (A com B)*	P. VALUE (P < 0,05)	Mediana (A e B)*	Média (A e B)*	Desvio Padrão (A e B)*
(CI com BP6)**	0,01	(6 e 3)	(6 e 3,4)	(1,155 e 0,843)
(BP6s com BP6)**	0,001	(7 e 3)	(6,7 e 3,4)	(1,494 e 0,843)
(BP6s com E36)**	0,05	(7 e 4)	(6,7 e 4,3)	(1,494 e 0,160)
(BP6 com E36s)**	0,01	(3 e 6)	(3,4 e 5,9)	(0,843 e 0,568)

Nota: * Representa a comparação de dois lotes: o primeiro indicado pela letra **A** e o segundo representado pela letra **B**. N=10 animais. ** Os nomes dos lotes da primeira coluna, são expressos da seguinte maneira: Controle de Isoflurano (CI), Ponto de Acupuntura BP6 (BP6), “Não-ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s), Ponto de Acupuntura E36 (E36) e “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s). N= 10 animais.

5.2.1.1) Documentação fotográfica das análises em Hematoxilina e Eosina (HE)

A documentação fotográfica do lote CP revelou que os animais não sofreram alterações morfológicas hepáticas este fato pode ser comprovado através da figura: 12.

As alterações morfológicas descritas pelo índice de atividade histológica (IAH) de Ishak et al. (1995) que foram vistas nos lotes (com exceção do CP), são as seguintes: inflamação focal (figura 13), apoptose, necrose em saca-bocado (Piecemeal-necrosis), necrose e inflamação portal (figura 14). Estas lesões se apresentaram em diferentes graus de acordo com os lotes, e indicam que lotes foram mais acometidos na tabela 8, em ordem decrescente (do mais para o menos acometido).

Além das alterações descritas no Índice de atividade Histológica (IAH), também foi observado: proliferação de ductos biliares (figura 15), megalocitose (figura 16), células bi-nucleadas (figura 16), presença de vacúolos (figura 17), atipia

(figura 17), células ovais, pigmento de hemossiderina (figura 13), início de processo degenerativo, figura mitótica, inclusão eosinofílica e presença de peliose (figura 13). Neste trabalho, essas alterações são apresentadas apenas para indicarem a anormalidade do fígado dos animais, não implicando no grau de acometimento dos mesmos, que foi avaliado pela Classificação de Alterações Estruturais ocorridas em Fibrose e/ou Cirrose (CAEF/C) segundo Ishak et al. (1995).

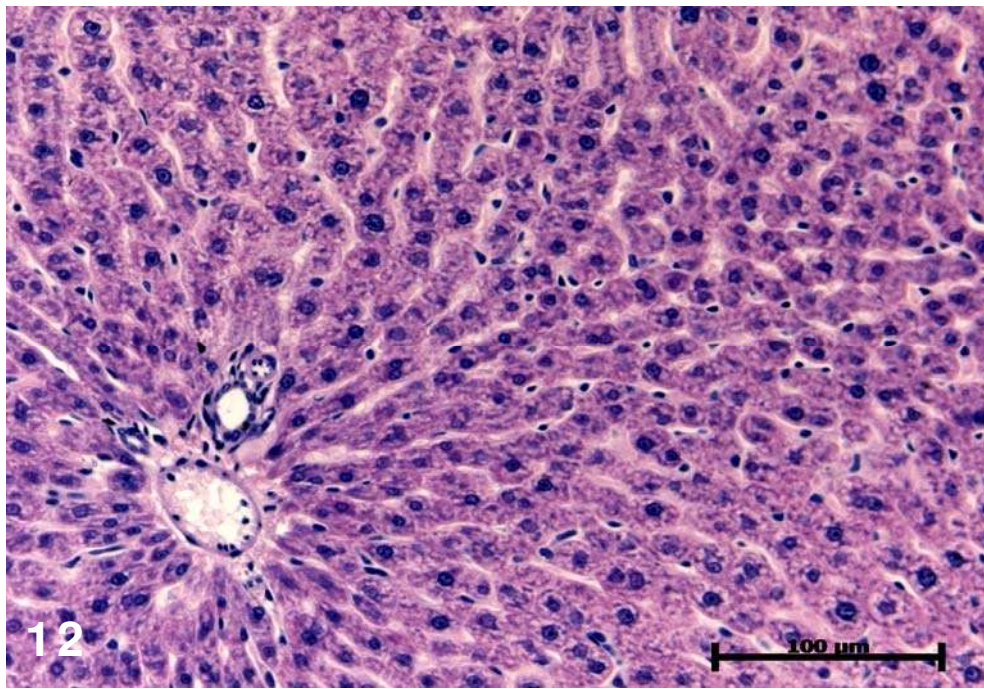


Figura 12 – Fotomicrografia de corte de fígado de animal do lote CP, ilustrando o fígado sem alterações morfológicas. Coloração HE. Barra = 100 μm

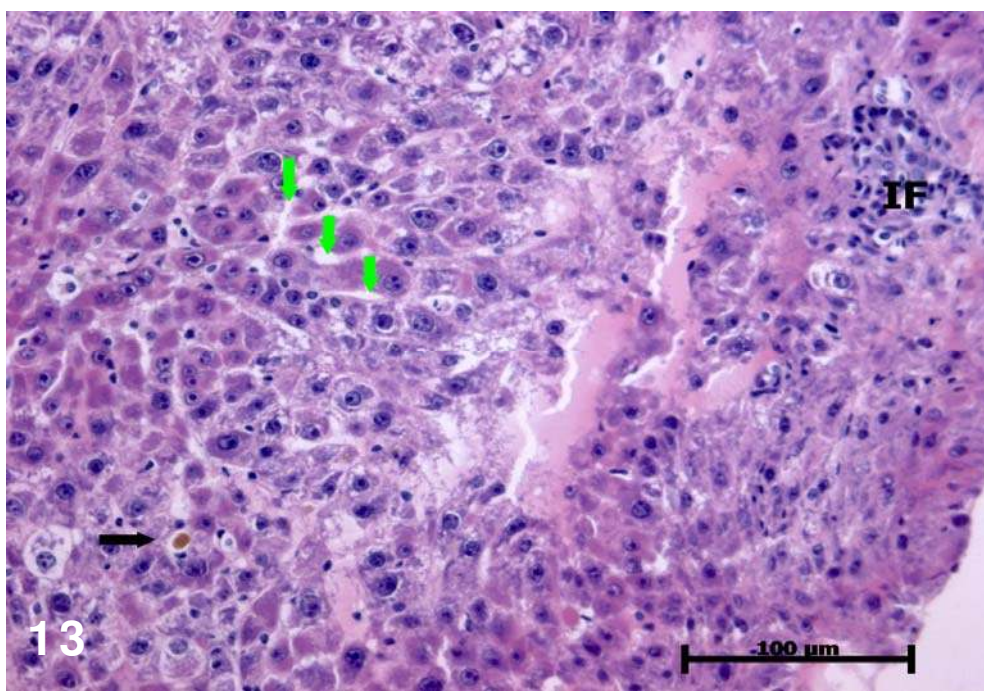


Figura 13 – Fotomicrografia de corte de fígado de animal do lote E36, ilustrando: Infiltrado focal (IF), presença de peliose (**setas verdes**) e pigmento de hemossiderina (**seta negra**). Coloração HE. Barra = 100 μm

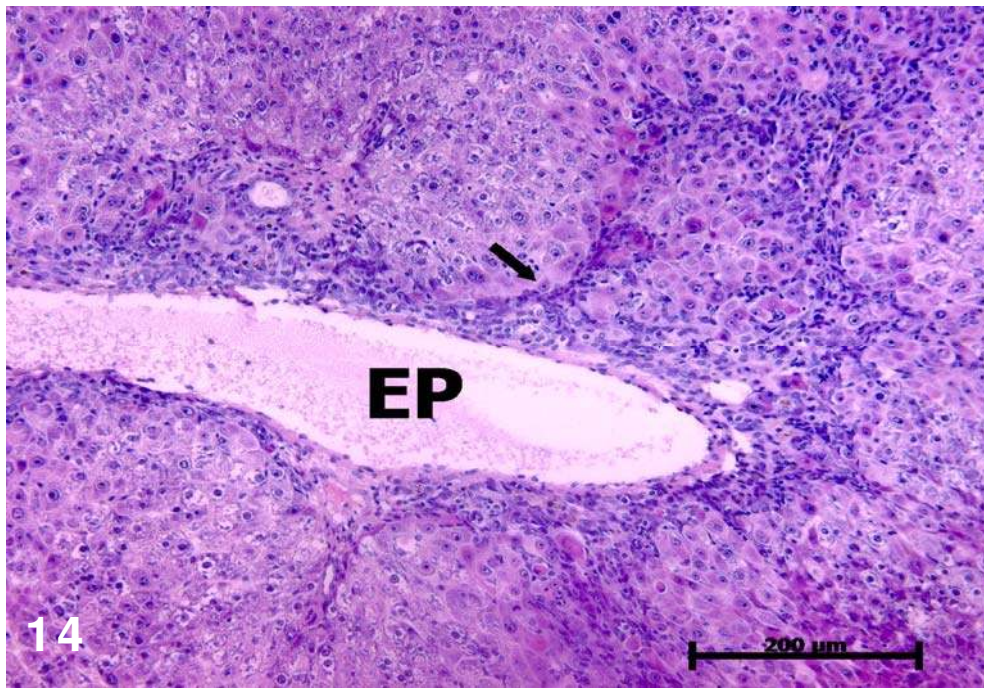


Figura 14 – Fotomicrografia de fígado de animal do lote BP6s, ilustrando inflamação portal (**seta negra**) ao redor de espaço porta (**EP**).Coloração HE. Barra = 200 µm

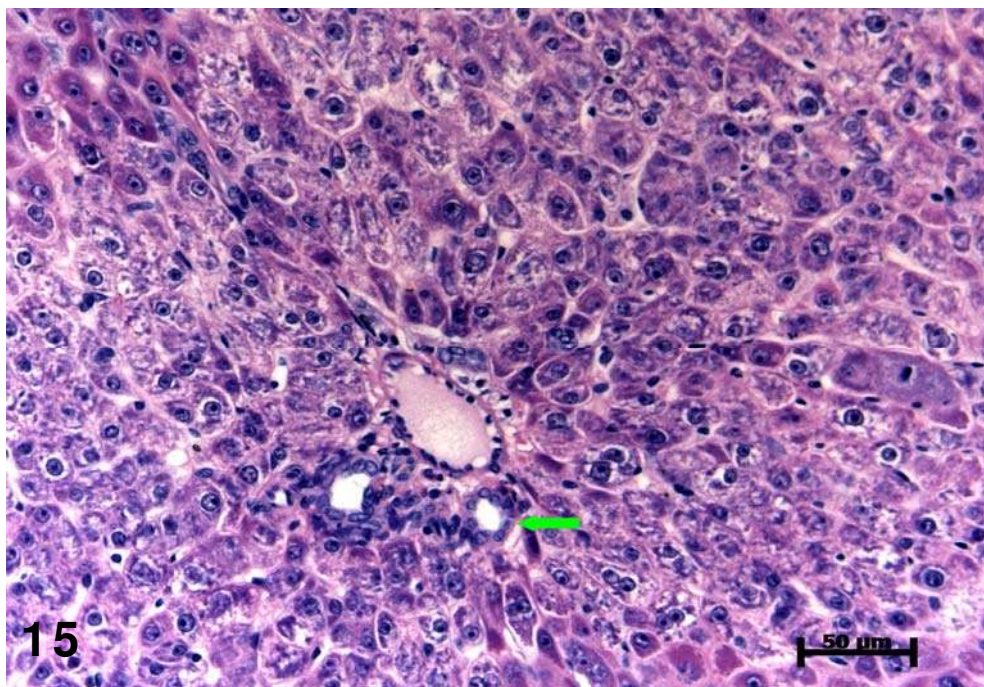


Figura 15 – Fotomicrografia de fígado de animal do lote C1, ilustrando proliferação de ductos biliares (**seta verde**). Coloração HE. Barra = 50 µm

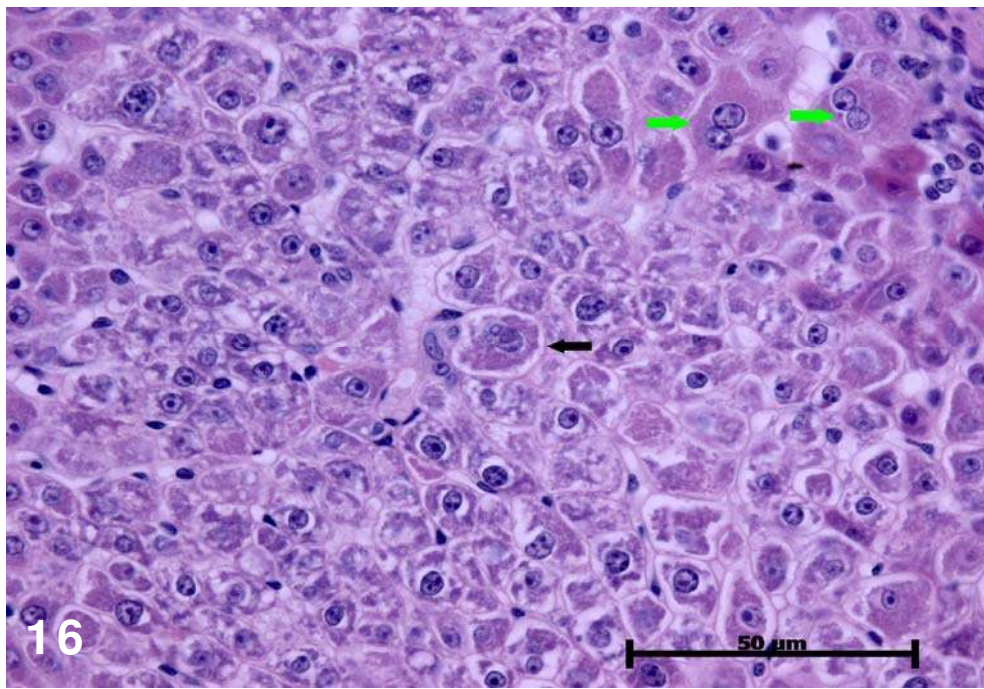


Figura 16 – Fotomicrografia de fígado de animal do lote E36s, ilustrando células binucleadas (**setas verdes**) e megalocitose (**seta negra**). Coloração HE. Barra = 50 μ m

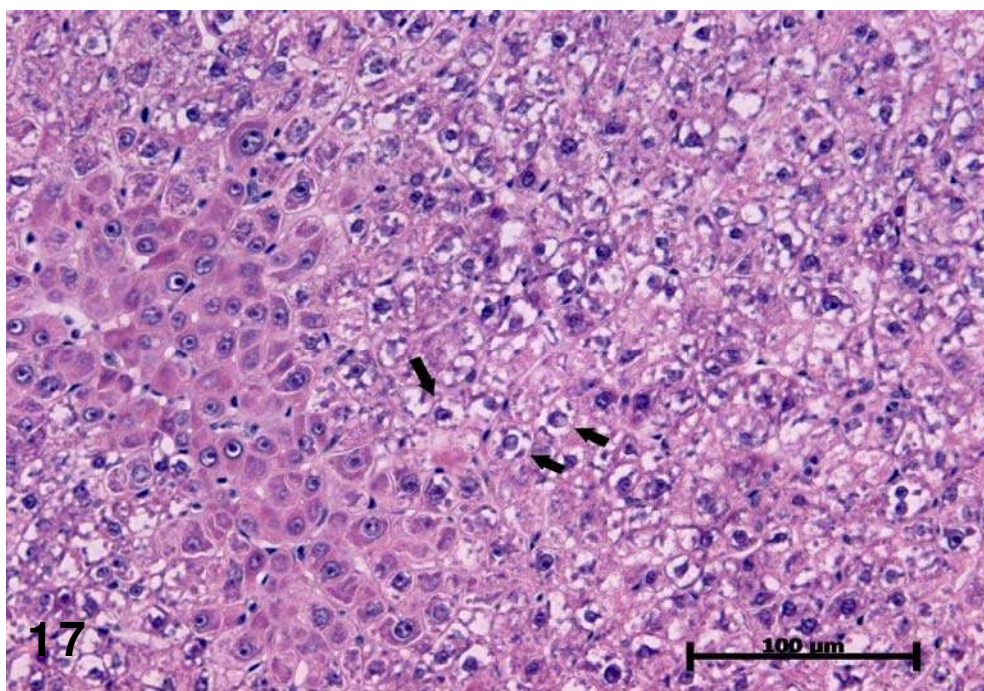


Figura 17 – Fotomicrografia de fígado de animal do lote CT, ilustrando presença de vacúolos (**setas negras**) e um desarranjo total da arquitetura do tecido, caracterizando um quadro de atipia. Coloração HE. Barra = 100 μ m

5.2.2) Resultados das análise em Picrossirius (PS)

Os *scores* das classificações de alterações estruturais ocorridas em fibrose e/ou cirrose (CAEF/C), segundo o método de Ishak et al. (1995), são mostrados em ordem decrescente na tabela 10, indicando a média de acometimento de cada lote.

Tabela 10 - Médias e Desvios Padrões dos *scores* resultantes da Classificação de Alterações Estruturais ocorridas em Fibrose e/ou Cirrose (CAEF/C), apresentadas em ordem decrescente pelo valor da Média, indicando do lote mais acometido para o menos afetado pelo colágeno em material corado em Picrossirius (PS) – São Paulo – 2009

Classificação de Alterações Estruturais ocorridas em Fibrose e/ou Cirrose (CAEF/C)						
LOTE	E36s	BP6s	CT	CI	E36	BP6
MÉDIA	3,1	3,1	2,9	2,8	2,7	2,2
DESVIO PADRÃO	0,568	0,568	0,316	0,422	0,823	0,422

Nota: Os nomes dos lotes são expressos da seguinte maneira: “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), “Não-ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s), Controle de Tioacetamida (CT), Controle de Isoflurano (CI), Ponto de Acupuntura E36 (E36) e Ponto de Acupuntura (BP6). N=10 animais

Estatisticamente, a análise destes resultados foi feita empregando o teste de Kruskal-Wallis, que indicou diferença visível entre os lotes ($P < 0,0071$). O resultado deste teste foi processado pelo pós-teste de Dunn, que comparou os resultados de maior expressão estatística através de análise da mediana, média e desvio padrão de cada lote (tabela 11). Esses resultados também podem ser vistos graficamente através da figura 12.

Tabela 11 – Comparação dos lotes que apresentaram maior expressão estatística na Classificação de Alterações Estruturais ocorridas em Fibrose e/ou Cirrose (CAEF/C), pelo pós-teste de Dunn – São Paulo – 2009

Lotes que demonstraram maior expressão (A com B)*	P. VALUE (P < 0,05)	Mediana (A e B)*	Média (A e B)*	Desvio Padrão (A e B)*
(BP6s com BP6)	0,05	(3 e 2)	(3,1 e 2,2)	(0,568 e 0,422)
(BP6 com E36s)	0,05	(2 e 3)	(2,2 e 3,1)	(0,422 e 0,568)

Nota: * Representa a comparação de dois lotes: o primeiro indicado pela letra **A** e o segundo representado pela letra **B**. Os nomes dos lotes mostrados na primeira coluna são expressos da seguinte maneira: “Não-ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s), Ponto de Acupuntura (BP6) e “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s). N= 10 animais.

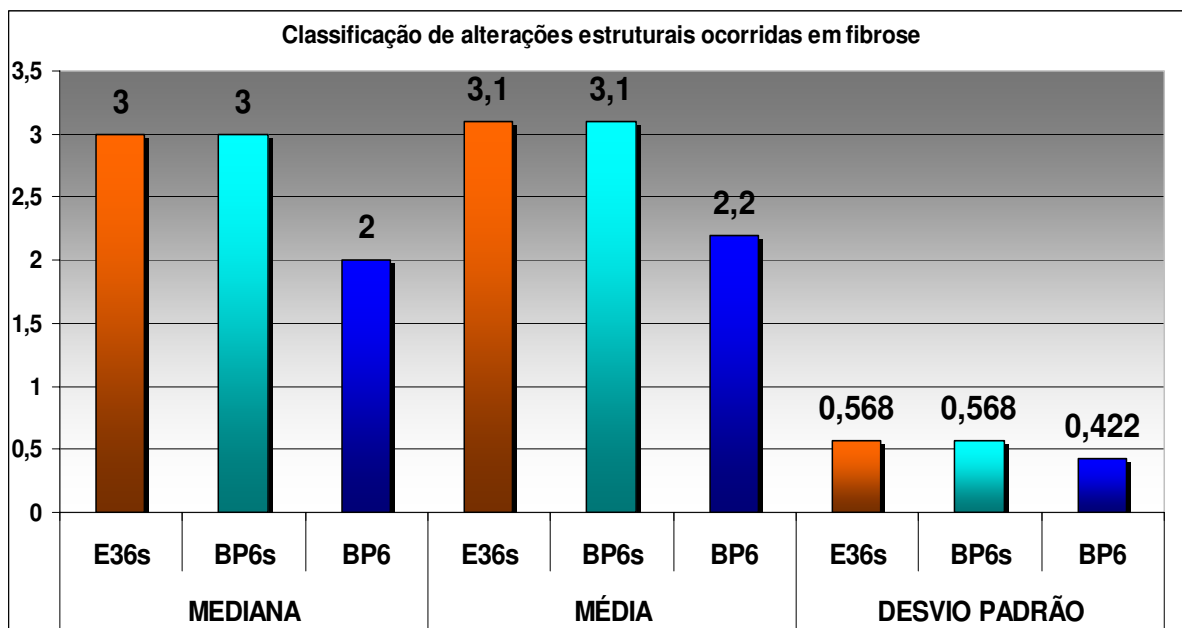


Figura 12 - Gráfico das medianas, médias e desvios padrões da classificação de alterações estruturais ocorridas em fibrose e/ou cirrose, após aplicação do pós-teste de Dunn nos lotes: “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), “Não-ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s) e Ponto de Acupuntura (BP6). N=10 animais

5.2.2.1) Documentação fotográfica das análises em Picrossirius (PS)

A documentação fotográfica do lote CP revelou que os animais não sofreram alterações morfológicas hepáticas, ou seja, não foi evidenciado colágeno neste lote, fato pode ser comprovado através da figura: 18.

As anormalidades morfológicas descritas pela Classificação de Alterações Estruturais ocorridas em Fibrose e/ou Cirrose (CAEF/C) segundo Ishak et al. (1995), que foram vistas nos lotes (com exceção do CP), foram as seguintes: expansão fibrosa (figura 19) e pontes de colágeno (figuras 20 e 21). Estas alterações indicam o aparecimento de colágeno nos lotes em diferentes graus de acordo com o acometimento de cada lote, que está expresso na tabela 10 em ordem decrescente (do mais para o menos acometido).

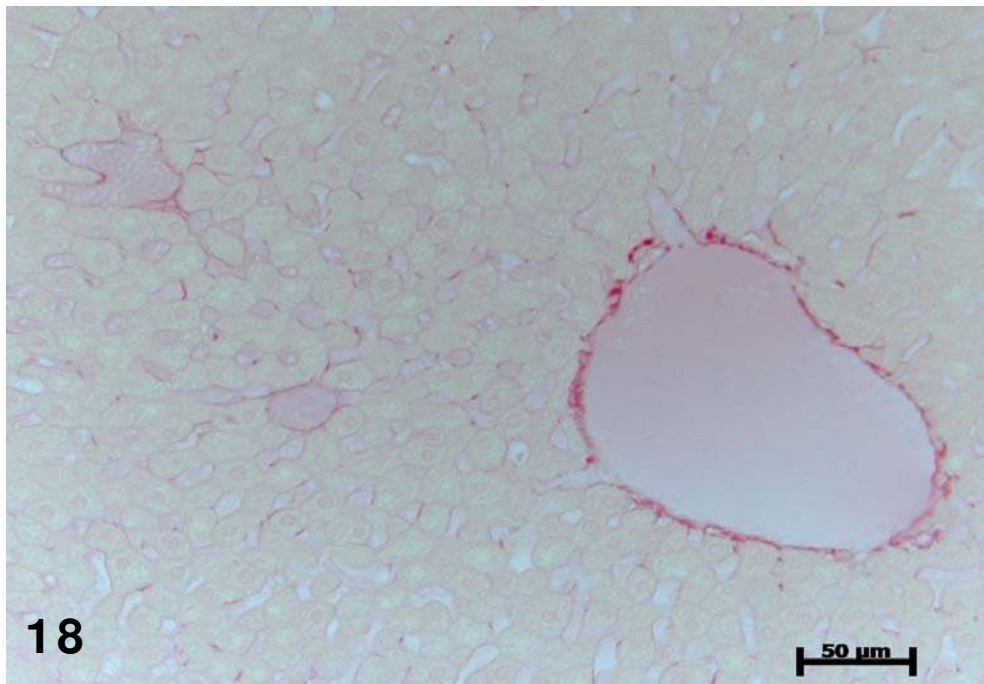


Figura 18 – Fotomicrografia de corte de fígado de animal do lote CP, ilustrando o fígado sem alterações morfológicas. Coloração Picrossirius . Barra = 50 µm

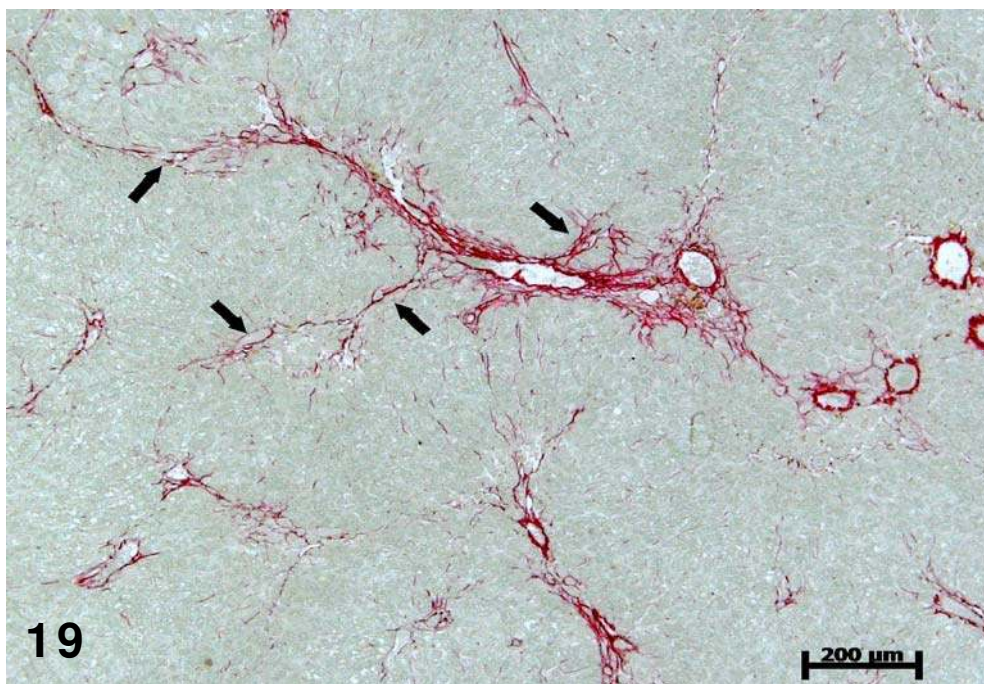


Figura 19 – Fotomicrografia de corte de fígado de animal do lote CT, ilustrando expansões fibrosas (**setas negras**). Coloração Picrossirius. Barra = 200 µm

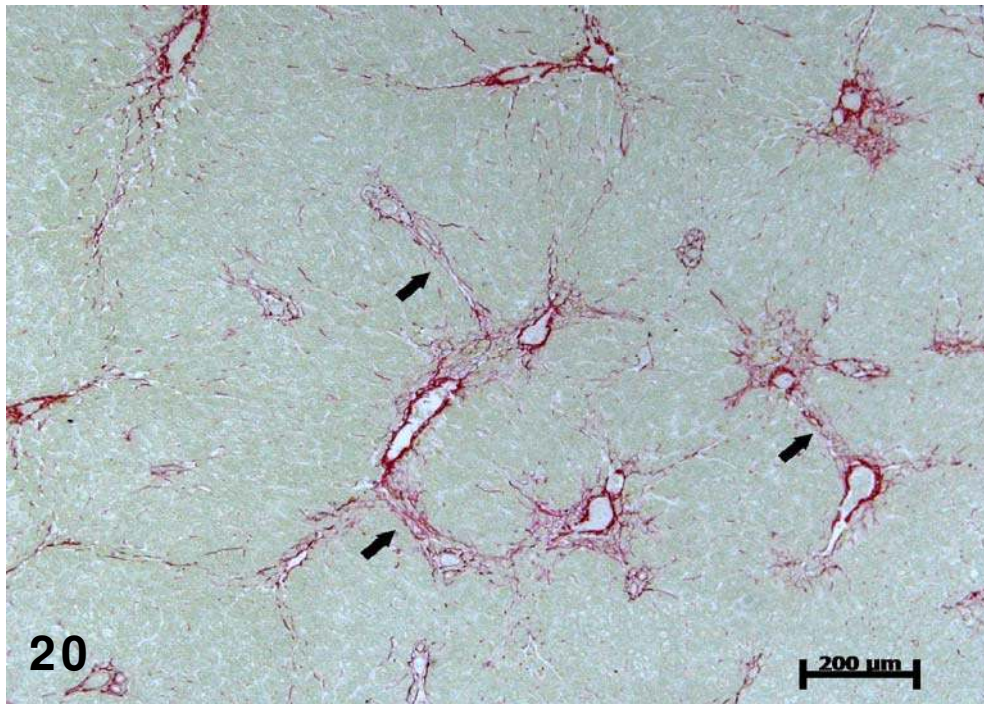


Figura 20 – Fotomicrografia de corte de fígado de animal do lote CT, ilustrando pontes de colágeno (**setas negras**). Coloração Picrosirius. Barra = 200 μm

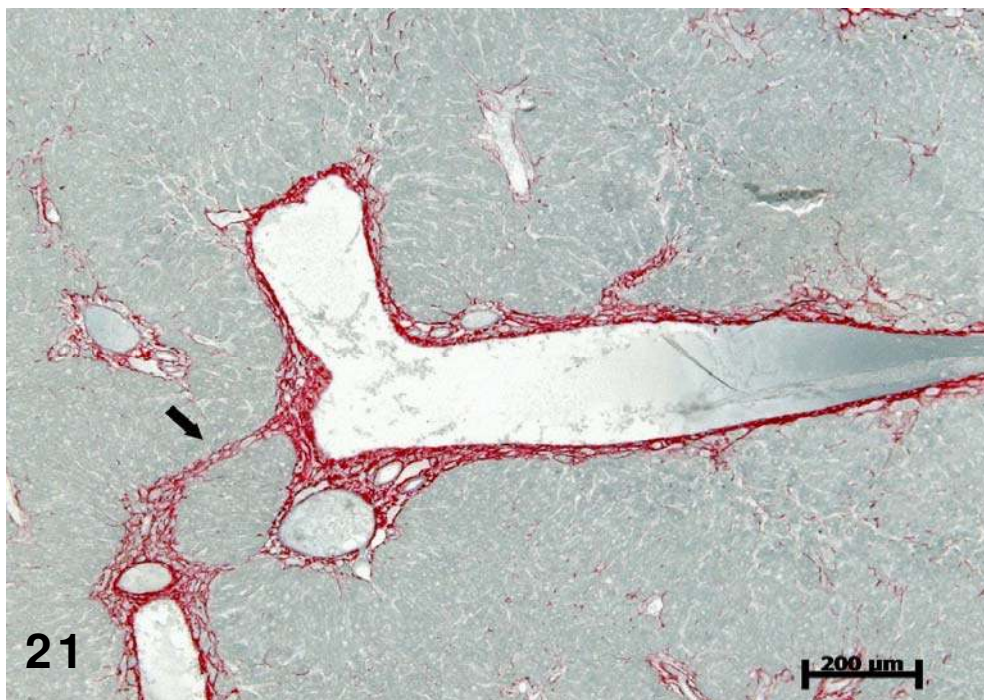


Figura 21 – Fotomicrografia de corte de fígado de animal do lote CT, ilustrando pontes de colágeno (**setas negras**). Coloração Picrosirius. Barra = 200 μm

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Doenças como a cirrose hepática, que atualmente esta entre as 10 maiores causas de morte no mundo ocidental (CRAWFORD, 2000), têm incentivado a pesquisa de várias drogas e substâncias endógenas como fatores hepatotróficos (PEREIRA, 2003; ALOIA, 2006; GUERRA, 2006;). A pesquisa dos mecanismos hepáticos, principalmente os que envolvem a “regeneração” também têm sido amplamente estudados (STARZL et al., 1975; STARZL et al., 1976; BAKER, 1985; SHIROIWA et al. 1993; CHIJIWA et al., 1994; SATO et al., 1999; YASUI et al., 2000; OE et al., 2003), contribuindo de forma significativa no estudo da fisiopatologia hepática.

6.1 O USO DA ELETROACUPUNTURA

Devido a sua eficácia e baixos custos, a acupuntura já foi implementada no sistema médico público de vários países (HONG JIN PAI, 2005), como no Brasil que até o ano de 2006, já contava com 90 serviços de atendimento na rede pública, vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS) (FERREIRA, 2006; SMBA, 2006). Dados como este, aliados à pesquisas realizadas com acupuntura em fígado por diversos autores [Chakrabarti et al. (1983), Hsu-Jan Liu et al., (2001), Yin et al. (2007), Xia et al. (2007) e Shi et al. (2008)], motivaram a realização deste trabalho que buscou usar a acupuntura como meio de intervenção na progressão de lesões hepáticas.

6.2 COMPARAÇÃO DO PESO E DOS MARCADORES SANGUÍNEOS DE LESÕES HEPÁTICAS DOS GRUPOS: CONTROLE DE PARÂMETROS (CP), CONTROLE DE TIOACETAMIDA (CT) E CONTROLE DE ISOFLURANO (CI)

Visando comparar as mudanças estruturais com as funcionais, foi utilizado para este trabalho, a análise bioquímica do fígado através de marcadores sanguíneos de lesões hepáticas [(alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALKP), albumina (ALB), proteína total (TP) e bilirrubinas totais (TBIL)]. Estes marcadores são muito úteis para analisar a detecção e a progressão de lesões hepáticas, visto que, algumas enfermidades do fígado além de apresentarem sintomas inespecíficos como anorexia, perda de peso e fraqueza, também se mostram assintomáticas (LIDA et al., 2005).

Como era esperado, o grupo Controle de Parâmetros (CP) não apresentou lesões hepáticas, visto que nos animais foi injetada apenas solução salina a 9%. O aumento de peso destes animais (33.92% em relação à primeira coleta), mostra, quando comparados aos outros lotes, as normalidades das funções hepáticas deste grupo. Este fato pode ser visto na tabela 3 e confirmado através da ausência de lesões hepáticas demonstradas através da documentação fotográfica, tanto pela coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) (figura 12), quanto pela coloração de Picrossirius (PS) (figura 18).

Os lotes Controle de Tioacetamida (CT) e Controle de Isoflurano (CI), foram usados respectivamente para fazerem o controle da droga hepatotóxica tioacetamida (TAA) e o controle do anestésico usado no experimento. Este último se

fez necessário pela possível interferência que este anestésico poderia trazer nos resultados, embora não seja causador de lesões hepáticas, devido sua baixa biotransformação e seus metabólitos intermediários não serem hepatotóxicos (MASSONE, 1994), alguns autores citam a possibilidade de danos hepáticos, uma vez que o isoflurano, como os outros anestésicos inalatórios, após biotransformação hepática, produza flúor inorgânico e hexafluorisopropanol, que têm potencial nefrotóxico e hepatotóxico (NISHIYAMA et al., 1998). Embora ainda seja visto com reserva, existe a possibilidade da proteção do tecido hepático através de anestésico isoflurano. Esta hipótese foi levantada depois da observação de que o isoflurano atuaria em hepatócitos isolados, durante um desafio anóxico, como um agente poupador de energia (KON et al., 1997).

Diante de muitas linhas de pensamento sobre a influência do anestésico isoflurano no fígado, este trabalho resolveu se resguardar de quaisquer efeitos que o anestésico pudesse vir a causar na pesquisa proposta. Por isto, houve a necessidade da criação do lote Controle de Isoflurano (CI).

A comparação dos lotes: Controle de Parâmetros, Controle de Tioacetamida (CT) e Controle de Isoflurano (CI), foi feita através do teste estatístico Anova e como revelou diferenças estatísticas significantes (tabela 4), foi aplicado, o pós-teste de Tukey para descobrir em que marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH) apareceram a citada significância (tabela 5).

Os lotes CT e CI não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados entre si, porém quando comparados com o lote Controle de Parâmetros, sempre demonstraram diferenças consideráveis e explicáveis, pelo fato dos animais do lote CP não terem recebido nenhuma droga (como já foi comentado). A ordem dos resultados se colocou da seguinte maneira: o lote CT sempre

demonstrou um maior acometimento dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH) do que os animais do lote CI, frente ao lote Controle de Parâmetros (CP), ou seja:

CT > CI > CP

Porém, ocorreram duas exceções que são descritas a seguir.

6.2a) Comparação dos marcadores Albumina (ALB) e Proteína Total (PT) dos lotes: CP, CT e C

Estatisticamente o lote CI não apresentou diferença estatística quando comparado com o lote CT, porém, quando comparado à CP (tabela 5), o lote CI se mostrou estatisticamente diferente ($P < 0,01$), suas médias se mostraram maiores que as do lote CP. Isto indica que o anestésico isoflurano influenciou o marcador sanguíneo de lesão hepática ALB (tabela 5 e figura 2).

O isoflurano pode causar alterações na glicose sanguínea e creatinina sérica, com diminuição no nitrogênio uréico sanguíneo, colesterol sérico e fosfatase alcalina. Estes dados confirmam a possível atuação do anestésico usado no fígado, que aliados ao fato dos animais já se encontrarem prejudicados pela ação da droga tioacetamida (TAA), pôde ocasionar a diminuição do marcador Albumina (ALB) nos animais do lote Controle de Isoflurano em relação aos animais do lote Controle de Parâmetros (CP), que não receberam a droga hepatotóxica e nem o anestésico.

A diminuição da Proteína Total (PT) ($P < 0,0003$), que é mostrada na tabela 5 e ilustrada na figura 8, pode ser justificada da seguinte forma: como houve uma diminuição da Albumina (ALB) e a mesma corresponde à quase metade da proteína total produzida no fígado, sendo responsável por cerca de 70%-75% da pressão

osmótica vascular (CENTER, 1987; BANKS, 1992); a sua diminuição acarreta na redução da Proteína Total (PT).

Em decorrência da diminuição destes dois marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH), os lotes dos pontos e dos “não-pontos” de acupuntura (E36, E36s, PB6 e PB6s) não poderiam mais terem o lote CT para referência como controle. Por isto, o lote controle para verificar se houve ou não interferência da eletroacupuntura nos marcadores, passou a ser o lote Controle de Isoflurano (CI).

6.2.1 COMPARAÇÃO DO PESO E DOS MARCADORES SANGUÍNEOS DE LESÕES HEPÁTICAS DOS GRUPOS: CONTROLE DE ISOFLURANO, PONTO DE ACUPUNTURA E36 (E36), “NÃO-PONTO” DE ACUPUNTURA E36S (E36S), PONTO DE ACUPUNTURA BP6 (BP6) E “NÃO-PONTO” DE ACUPUNTURA BP6S (BP6S)

A comparação dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH) dos lotes Controle de Isoflurano (CI), Ponto de Acupuntura E36 (E36), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), Ponto de Acupuntura BP6 (BP6) e “Não-ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s), pelo teste Anova, demonstrou estatisticamente que a eletroacupuntura interferiu nos seguintes marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH): Albumina (ALB) ($P < 0,0073$), Alanina Aminotransferase (ALT) ($P < 0,0015$) e Aspartato Aminotransferase (AST) ($P < 0,0068$); estes dados podem ser observados na tabela 6. Para saber a precisão desta interferência, bem como a comparação da eficácia entre os pontos de acupuntura, foi realizado o pós-teste de Tukey (tabela 7).

6.2.1a) Comparação do marcador Albumina (ALB) dos lotes: Controle de isoflurano, Ponto de Acupuntura E36 (E36), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), Ponto de Acupuntura BP6 (BP6) e “Não-Ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s)

Como o fígado é a única fonte de produção da Albumina (ALB) no organismo, a hipoalbuminemia pode ser considerada uma incapacidade hepática de sintetizar esta proteína (BUNCH, 1994). A Albumina (ALB) é usada como indicador da função hepática, sua diminuição é observada em processos hepáticos crônicos.

Estatisticamente, foram observadas diferenças nos seguintes lotes: CI com BP6 ($P < 0,05$) e BP6 com E36s ($P < 0,05$).

A eficácia do ponto de acupuntura *Sanyinjiao* (BP6) frente ao marcador sanguíneo de lesão hepática (MSLH) ALB, foi observada no lote Ponto de Acupuntura BP6 (BP6), que sofreu um aumento de 15,44% na ALB em relação ao lote CI. As médias e desvios padrões que ilustram esta comparação, podem ser observados nas tabelas 4 e 7.

Quando comparado ao “não-ponto” de acupuntura E36s (E36s), o lote Ponto de Acupuntura BP6 (BP6) também expressou diferença estatística ($P < 0,05$). O “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), cumpriu sua função, visto que era usado apenas como efeito placebo visando justificar se os efeitos obtidos decorrentes da função do ponto de acupuntura realmente ocorrem ou se são somente uma reação ao estímulo nociceptivo induzido pela inserção da agulha.

O restante dos lotes não apresentou resultados estatísticos significativos.

6.2.1b) Comparação do marcador Alanina Aminotransferase (ALT) dos lotes: Controle de isoflurano, Ponto de Acupuntura E36 (E36), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), Ponto de Acupuntura BP6 (BP6) e “Não-Ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s)

A Alanina Aminotransferase (ALT) é uma enzima citosólica considerada hepatoespecífica para algumas espécies (cão e gato) (BANKS, 1992; CENTER, 1997). Sua atuação como catalisador do grupamento amino da alanina para o α -cetoglutarato formando piruvato, aponta a importância deste marcador na função na gliconeogênese e no metabolismo de aminoácidos. Embora sua principal atividade seja no fígado, também ocorre em outros locais como músculos, coração, rins, cérebro e tecido adiposo, mas em fração muito menor (SCHINDHELM et al., 2006).

Sendo considerada um importante marcador sanguíneo de lesão hepática, a Alanina Aminotransferase (ALT), quando se mostra aumentada, indica: lesão hepatocítica com vazamento de enzimas a partir do citoplasma do hepatócito, necrose com e inflamação hepatocelular (JOHNSON, SHERDING; 1998). Grigorescu (2006), cita que apesar da ALT indicar danos hepáticos, apresenta uma associação mais significativa com a presença de fibrose (GRIGORESCU, 2006).

As diferenças estatisticamente significantes perante o marcador ALT, foram encontradas no confronto dos lotes: CI com BP6 ($P < 0,001$) e BP6 com E36s (0,05), observado na tabela 7.

Quando comparados, o lote BP6 apresentou uma considerável diferença estatística em relação ao lote CI: CI ($118,40 \pm 63,14$) e BP6 ($52,80 \pm 9,93$). Se comparar a eficácia deste ponto de acupuntura com os resultados deste mesmo marcador para o lote CI, constata-se que a acupuntura causou uma diminuição de 70,61% neste marcador. Este dado aponta a atuação do Ponto de Acupuntura BP6

(BP6) frente às lesões hepáticas induzidas pela tioacetamida (TAA), sugerindo a atuação deste no retardamento da necrose e da inflamação causados pela droga tioacetamida (TAA).

O restante dos lotes não apresentou resultados estatísticos significativos.

6.2.1c) Comparação do marcador Aspartato Aminotransferase (AST) dos lotes: Controle de isoflurano, Ponto de Acupuntura E36 (E36), “Não-ponto” de Acupuntura E36s (E36s), Ponto de Acupuntura BP6 (BP6) e “Não-Ponto” de Acupuntura BP6s (BP6s)

O marcador sanguíneo de lesão hepática (MSLH) aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima que efetua a catabolização de aminoácidos permitindo que os mesmos entrem no ciclo do ácido cítrico. Essa enzima faz a transaminação do grupo amino, do aspartato para o α -cetogluturato, formando oxalato. Apesar de estar relacionada com a integridade dos hepatócitos, a AST não é específica do fígado, podendo ser encontrada nos seguintes locais: rins, cérebro, músculo cardíaco, células vermelhas do sangue e em grande quantidade no tecido muscular esquelético (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

No caso de lesão hepatocítica, o vazamento de ALT do citoplasma, resulta em um aumento da atividade sérica. Embora o AST se associe primariamente às mitocôndrias, também está presente no citoplasma. A lesão de AST das mitocôndrias requer lesão severa. Sendo assim, no caso de uma lesão hepatocítica, a ALT é liberada mais facilmente e o seu nível de atividade geralmente será mais alto que o da AST (JOHNSON, SHERDING; 1998).

As diferenças estatisticamente significantes envolvendo o marcador AST, foram encontradas na comparação dos lotes: CI com BP6 ($P < 0,001$) e BP6 com E36s (0,05), observado na tabela 7.

Quando comparados, o lote BP6 apresentou uma considerável diferença estatística em relação ao lote E36s. As médias e os desvios padrões se apresentaram da seguinte forma para cada lote: BP6 ($128,60 \pm 38,92$) e E36s ($227,70 \pm 81,15$). Estes resultados são expressados graficamente através da figura 10. Com isto, pode-se constatar que a acupuntura causou uma diminuição de 28,40% no marcador AST quando comparados ao mesmo marcador do lote CI (tabela 4).

Com isto pode-se constatar que a acupuntura, através do ponto BP6, apresenta uma influência positiva perante a elevação do marcador sanguíneo de lesão hepática (MSLH) AST em ratos com danos hepáticos induzidos pela droga tioacetamida (TAA). Segundo a citação de Johnson e Sherding (1998), que a AST é liberada em casos de lesões mais graves, pois está contida em maior número dentro das mitocôndrias, pode-se sugerir que esta ação de liberação da AST pode sofrer influência do ponto BP6 quando aplicada a eletroacupuntura.

O restante dos lotes não apresentou resultados estatísticos significativos.

6.3 O USO DA TIOACETAMIDA (TAA)

A opção de usar a droga tioacetamida (TAA) para causar as lesões hepáticas nos animais, foi feita, devido a eficiência que a mesma têm apresentado para este fim (BRUCK et al., 2004; REIF et al., 2004; TOYAMA et al., 2004; IDE et al., 2005; NAGATA et al., 2005; NATARAJAN et al., 2006). Esta droga foi administrada

intraperitonealmente, através da via de administração injetável, pois a administração oral da mesma, seja em água ou diretamente na ração dos animais, causa uma diminuição no efeito tóxico da droga, visto que, quando o processo patológico se instala nos animais, eles apresentam uma diminuição no apetite e na ingestão de água e conseqüentemente, deixam de usar a droga, diminuindo assim o efeito tóxico da mesma no organismo dos animais (MOREIRA et al., 1995; FONTANA et al., 1996; GEORGE et al., 2001). Através da via de administração oral, o processo de indução de lesões hepáticas também fica comprometido pelo fato de ocorrerem falhas e variações no processo de indução, pois não é possível controlar o quanto cada animal come ou bebe. Assim, dependendo da quantidade de água e ração consumidas, ocorrerá uma grande variação individual nas lesões resultantes (LIMA, 2008).

Foi objetivado a causa de lesões buscando fibrose, tomando a precaução para que a mesma não evoluísse para cirrose, para tal, utilizou-se um protocolo de fibrose baseado nos trabalhos de Ikejima et al., (2002).

6.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS FEITAS EM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

6.4.1 O ÍNDICE DE ATIVIDADE HISTOLÓGICA (IAH)

Criado por Ishak et al., (1995), o índice de atividade histológica (IAH) visa classificar as lesões hepáticas observadas em diferentes graus de hepatites. As lesões são classificadas pelos autores através de pontuações denominadas pelos mesmos de *scores*, divididos em quatro categorias nas quais o somatório de pontos

destas, resulta em um *score* geral que determina a classificação das lesões como um todo (tabela 1).

Foi utilizada esta classificação pois ela apresenta as lesões de forma mais padronizada visto que os alguns tipos de lesões que caracterizam fibrose ou cirrose, diferem de autor para autor. A cirrose pode ser definida como um processo difuso caracterizado por septos fibrosos em ponte, conversão da arquitetura normal do fígado em lóbulos estruturalmente anormais e presença de nódulos de regeneração (CRAWFORD, 2000; MACLACHLAN; CULLEN, 1998), enquanto a fibrose ocorre em resposta a qualquer injúria sofrida pelo fígado. Padrões diferentes de fibrose podem ser produzidos, o que determinará uma condição positiva ou não do estabelecimento de cirrose.

Rodrigues (2004), mencionou achar um desarranjo parcial da arquitetura hepática de fígados de ratas wistar que foram induzidos à fibrose por dimetilnitrosamina, porém o restante das lesões obtidas não eram totalmente compatíveis com cirrose, o que levou o referido autor a classificar os seus achados como um grau avançado de fibrose. Visando contornar problemas como este, deu-se preferência por adotar o índice de atividade histológica (IAH).

Neste trabalho, os resultados obtidos através do *scores* pelo IAH, foram submetidos à análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,0001$), que revelou haver significância entre os lotes (tabela 8). Estes resultados foram expressos graficamente na figura 11.

Mediante os resultados obtidos através desta análise estatística foi constatada a seguinte ordem de grau de acometimento entre os lotes:

CT > BP6s > CI > E36s > E36 > BP6

Mais uma vez o lote Ponto de Acupuntura BP6 (BP6), obteve destaque perante os outros grupos, pois os lotes dos animais que receberam este ponto apresentaram menos lesões histológicas, porém aqui, cabe destacar a atuação do ponto E36, que também teve bons resultados perante a morfologia tecidual afetada pela droga, mesmo não aparecendo nas análises estatísticas dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH), em discordância de Hsu-Jan Liu et al., (2001), que citaram uma diminuição (relatada estatisticamente) das enzimas ALT e AST em animais cujo ponto de acupuntura E36 foi puncionado. Porém os resultados das análises morfológicas deste trabalho mostraram concordância com estes autores, visto que o lote E36 foi um dos lotes que apresentou menos danos hepáticos causados pela droga tioacetamida (TAA).

6.4.2 AS LESÕES OBSERVADAS EM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

As alterações morfológicas descritas pelo índice de atividade histológica (IAH) de Ishak et al. (1995) que foram vistas nos lotes (com exceção do CP), foram as seguintes: inflamação focal (figura 13), apoptose, necrose em saca-bocado (Piecemeal-necrosis) indicando um processo crônico através da penetração de células inflamatórias entre os hepatócitos da periferia, necrose que têm como consequência a destruição do parênquima hepático e inflamação portal que também é um indicativo de quadro crônico (figura 14).

Embora não fosse o objetivo do trabalho, também foram descritas lesões fora da classificação de Ishak et al., (1995), que também indicam um grau de

agressão hepática. Estas lesões encontradas em todos os lotes (exceto CP), porém em menor número no lote BP6 seguido do lote E36, são descritas a seguir.

Proliferação de ductos biliares (figura 15), indicando que o fígado apresenta deficiências funcionais, megalocitose e células binucleadas (figura 16); a primeira está relacionada com hepatócitos de núcleos poliplóides. Estas células caracterizam-se pelo seu tamanho maior, que é proporcional à ploidia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O processo de poliploidização dos hepatócitos é visto como um mecanismo de adaptação evolutiva que reflete um grau de diferenciação irreversível da célula hepática. Esse mecanismo é adotado para diminuir o alto risco de dano genômico o qual o hepatócito está exposto (TORRES et al., 1999). Gandillet et al., 2003 cita que em um fígado do rato adulto normal, apenas 19,6% dos hepatócitos são diplóides ($2n$), enquanto a maioria das células (75,1%) são tetraplóides ($4n$) e uma apenas uma pequena parcela (5,3%) é constituída por células octaplóides ($8n$), que tem um estado de diferenciação terminal sendo portanto senescentes. Embora a visualização de células binucleadas não seja rara em um fígado normal, em um fígado com alto acometimento de lesões, essa presença torna-se mais evidente por se destacar em um fundo de células diplóides, que aparecem em maior quantidade, onde os hepatócitos com núcleos pequenos passam a ser a maioria no fígado em regeneração (LIMA, 2008). Esta mesma autora cita que provavelmente, as células grandes classificadas como megalocitose são hepatócitos octaplóides que não participam do processo regenerativo.

A presença de vacúolos (figura 17) muito volumosos e irregulares intumescem consideravelmente a célula, que tende para a forma esférica ou lobulada e comprime os hepatócitos adjacentes (BOGLIOLO, 1981).

A ocorrência de células ovais (figura 13) e a inclusão eusínofílica caracterizam um quadro inflamatório comumente associado à danos na função hepática. (GERTMAN et al., 1970; PARRA, 1992; PEREIRA, 2003; SAAD, 1972; SAAD, 1975).

A hemoessiderina (figura 13), ou agregados insolúveis de ferritina (a forma como o ferro é estocado nas células retículo-endoteliais) é um pigmento marrom que contém ferro e está usualmente contido em macrófagos do sistema retículo-endotelial em muitos locais do organismo como a medula óssea e o fígado; quando se apresenta de forma proeminente constitui lesão hepática (THOMSON, 1983). A ocorrência de hemociderina no fígado ou hemociderose hepática pode ser visualizada sob a forma de manchas de ferrugem ou pardo-escura em colorações HE e têm várias causas, entretanto, a mais importante é a destruição excessiva e anormal de hemácias com liberação de hemoglobina (SANTOS, 1988).

A presença de peliose (figura 13), caracteriza a dilatação dos sinusóides hepáticos por associada à esteróides ou agressão química ao fígado.

A atipia encontrada no parênquima hepático está associada ao desarranjo da arquitetura lobular e ao início de processo degenerativo evidenciando uma grande extensão de lesão hepática. Embora esta alteração seja compatível com cirrose, a exemplo de Rodrigues (2004), não foram encontradas outras evidências que junto com esta pudessem caracterizar o quadro cirrótico. As alterações encontradas são classificadas morfológicas encontradas neste trabalho são classificadas como um alto grau de fibrose hepática.

6.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS FEITAS EM PICROSSIRIUS (PS)

6.5.1 O ÍNDICE DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS OCORRIDAS EM FIBROSE E/OU CIRROSE (CAEF/C)

Assim como o índice de atividade histológica (IAH), o índice das alterações estruturais ocorridas em fibrose e/ou cirrose (CAEF/C) também foi desenvolvido por Ishak et al., (1995), visando padronizar os critérios para identificação de fibrose e/ou cirrose. Disposto em 7 níveis caracterizando desde as mais leves lesões até o grau de cirrose, este índice também é trabalhado através de *scores* que classificam o tipo e grau de lesões encontrados (tabela 2).

Neste trabalho, os resultados obtidos através do *scores* pelo CAEF/C, foram submetidos à análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,0071$), que revelou haver significância entre os lotes (tabela 10). Estes resultados foram expressos através do gráfico da figura 12.

Mediante os resultados obtidos através desta análise estatística foi constatada a seguinte ordem de grau de acometimento entre os lotes:

E36s > BP6s > CT > CI > E36 > BP6

Novamente houve destaque para o lote Ponto de Acupuntura BP6 (BP6), pois o lote dos animais que foram tratados com este ponto apresentou-se menos afetado pelas lesões em relação aos outros lotes. O ponto E36, assim como na classificação feita em HE, também teve bons resultados retardando o efeito da droga hepatotóxica

tioacetamida (TAA), ainda que não aparecendo nas análises estatísticas dos marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH).

O uso do ponto E36 é largamente difundido e usado pelos praticantes de acupuntura, tanto humana quanto veterinária. Os resultados obtidos através do uso deste ponto variam de acordo como e para que ele é usado. Enquanto autores como, Tsai et al., (2007) não obtiveram sucesso na diminuição de lipopolissacarídeos hepáticos usando este ponto de acupuntura, outros autores relatam sucesso quando utilizado este ponto para fins hepáticos, como Shi et al., (2008), que reduziram os níveis da enzima ALT em ratos que tiveram lesões hepáticas induzidas por endotoxinas.

6.5.2 AS LESÕES OBSERVADAS EM PICROSSIRIUS (PS)

As anormalidades morfológicas descritas pela classificação de alterações estruturais ocorridas em fibrose e/ou cirrose (CAEF/C) segundo Ishak et al. (1995), foram vistas em todos os lotes (com exceção do CP). As anormalidades estruturais encontradas foram expansão fibrosa (figura 19) e pontes de colágeno (figuras 20 e 21), ambas compatíveis com as lesões provocadas pela droga tioacetamida (TAA) evidenciando através da técnica de coloração de Picrossirius (PS), o aparecimento de colágeno em todos os lotes, estava de acordo com os efeitos hepatotóxicos da droga tioacetamida (TAA), que além da perda de peso nos animais tratados, também provocou regeneração de hepatócitos, proliferação de ductos biliares e fibrose (MOREIRA et al., 1995; FONTANA et al., 1996; AL BADER et al., 2000; JEONG et al., 2001), evidenciada por esta técnica, mas em diferentes graus de acometimentos e a intensidade, provando a atuação positiva da eletroacupuntura no tratamento de lesões hepáticas causadas por esta droga.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste experimento, este trabalho teve como conclusões:

- 1 A acupuntura reduziu a evolução das lesões histopatológicas no modelo da tioacetamida (TAA) através da técnica de eletroacupuntura que demonstrou ser mais eficiente quando o ponto BP6 foi usado para reduzir lesões hepáticas quando comparado ao efeito do ponto E36, que também apresentou na redução das lesões hepáticas;
- 2 A eletroacupuntura influenciou o teor de colágeno nas lesões causadas pela droga tioacetamida (TAA), sendo que o ponto BP6 causou uma redução de colágeno mais evidente do que o ponto E36;
- 3 A eletroacupuntura interferiu nos níveis dos seguintes marcadores sanguíneos de lesões hepáticas (MSLH) usados: albumina (ALB), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST);
- 4 O uso do anestésico isoflurano por tempo prolongado durante o experimento piorou o quadro sorológico de indicadores de lesão hepática, indicando que este anestésico contribuiu ligeiramente para o agravamento do quadro de lesão hepática.

8 REFERÊNCIAS

- ✓ De acordo com ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2002;
- ✓ De acordo com as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na FMVZ da Universidade de São Paulo (4ª edição, revista, atualizada e ampliada – SP-2003).

8 REFERÊNCIAS

A Hepatite C no Mundo, **Organização Mundial da Saúde (Weekly Epidemiological Record**, v. 75, n. 3, p.18, 2000).

AL-BADER, A.; MATHEW, T. C.; ABUL, H.; AL-SAYER, H.; SINGAL, P. K.; DASHTI, H. M. Cholangiocarcinoma and liver cirrhosis in relation to changes due to thioacetamide. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 208, p. 1-9, 2000.

ALBERTI, A. e CHEMELLO, L. Natural history. In: International Consensus Conference on Hepatitis C. **European association for the study of the liver**. Paris, 1999, p. 7.

ALOIA, T. P. A. **Efeitos de fatores hepatotróficos no fígado em ratos wistar (*Rattus norvegicus*)** 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ALTMAN, S. Techniques and instrumentation. **Problems in veterinary medicine**. v. 4, n.1, p. 66-87, 1992.

ARGENZIO, R. A. Funções secretórias do trato gastrintestinal. In: _____. **Dukes Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. part. III, cap. 18, p. 326-329.

AUTEROUCHE, B.; AUTEROUCHE, M. Generalidades sobre a agulha fina Hao Zhen. In: _____. **Guia prático de acupuntura e moxibustão**. São Paulo: Andrei, 1996. cap. 1, p. 31-37.

BAKER, A. L. Hepatotrophic factors: concepts and clinical implications. **Acta Medica Scandinavica**, v. 703, p. 201-208, 1985. Suplemento.

BANCROFT, J. D. e STEVENS, A. **Theory and practice in of histological technicians**, 2. ed. London, Chruchill, 1982, 662p.

BANKS, W. L. Sistema digestivo II – órgão extramurais. In: _____. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 22, p. 468-480.

BOGLIOLO, L. Fígado e vias biliares. In: _____. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981. cap. 20, p. 658-743.

BUNCH, S. E. Distúrbios hepatobiliares e pancreáticos exócrinos. In: NELSON, R.; COUTO, C. G. Fundamentos de medicina interna de pequenos animais. São Paulo: Guanabara Koogan, 1994. cap. 34-38, p. 273-318.

Bruck R., Schey R., Aeed H., Hochman A., Genina O., Pines M. A protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate in a rat model of liver cirrhosis. **Liver International**, vol. 2 n. 24, p. 169-176, 2004

CARVALHO, G. E. F. A teoria dos canais (jing) e colaterais (luo) e os acupontos. **Acupuntura e fitoterapia chinesa clássica**. Rio de Janeiro: Taba Cultural, 2003. cap. 9, p. 63-89.

CENTER, S. A. Fisiopatologia, diagnóstico laboratorial, e afecções do fígado: A. Fisiopatologia e diagnóstico laboratorial das afecções hepatobiliares. In: ETTINGER, S. J. ; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, cap. 106, p. 1745-1816.

CHAKRABARTI, A. K.; CHATTERJEE, K.; GOSH, J. J. Electroacupuncture and its effect on rat hepatic functions. **Acupuncture and Electro-Therapeutics Research**, vol. 8, n. 2, p. 111-126, 1983

CHEVILLE, N. F. Cicatrização e inflamação crônica. In: _____. **Introdução à patologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2004. cap. 5, p. 139.

Chijiwa K., Nakano K., Kameoka N., Nagai E., Tanaka M. Proliferating cell nuclear antigen, plasma fibronectin, and liver regeneration rate after seventy percent hepatectomy in normal and cirrhotic rats (1994) *Surgery*, 116 (3), pp. 544-549.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E. M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.;

GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. **Laboratory Animals**, v. 30, n. 4, p. 293-316, 1996.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E. M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 1, p. 1-32, 1997.

CORNELIUS, L. M. Enfermidades Hepáticas. In: LORENS, M. D.; CORNELIUS, L. M.; FERGUSON, D. C. **Terapêutica clínica em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. cap. 9, p. 200-216.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: _____. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 4, p. 79-100.

CRAWFORD J. M. O fígado e o trato biliar. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 19, p. 759-808.

CUNNINGHAM, J. C. Secreções do trato digestivo. In: _____. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 28, p. 234-241.

DRAEHMPAEHL, D. ; ZOHMANN, A. **Acupuntura no cão e no gato** (Princípios básicos e prática científica). São Paulo: Roca, 1997.

DUMITRESCU, I. F. **Acupuntura científica moderna**. São Paulo: Andrei, 1996.

EGERBACHER, M. Anatomia e classificação dos acupontos. In: SHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária – Da arte antiga à medicina moderna**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2006. cap. 2, p. 17-23.

FABER, P. L.; TIMO-IARIA, C. Acupuntura e Sistema Nervoso. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 67, n. 5-6, p. 125-131, 1994.

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

FERREIRA, M. V. **O que é acupuntura?**. Rio de Janeiro: Brasiliense, 1985.

FERREIRA, W. T. Locais de atendimentos: Ambulatórios. Disponível em: <http://www.amba.org.br>. Acesso em: 01 fev. 2006.

FLEMING, P. Atlas de transposição de acupuntura equina. In: SHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária – Da arte antiga à medicina moderna**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2006. cap. 31, p. 383-423.

FONTANA, L.; MOREIRA, E.; TORRES, M. I.; FERNÁNDEZ, M. I.; RIOS, A.; MEDINA, F. S.; GIL, A. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. **Toxicology**, v. 106, n. 1-3, p. 197-206, 1996.

FRIEDMAN, S. L.; The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 25, p. 1828-1835, Jun. 1993.

GANDILLET, A.; ALEXANDRE, E.; HOLL, V.; ROYER, C.; BISCHOFF, P.; CINQUALBRE, J.; WOLF, P.; JAECK, D.; RICHERT, L. Hepatocyte ploidy in normal young rat. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 134, n. 3, p. 665-673, 2003.

GANONG, F. W. Secreção e motilidade gastrintestinal. In: _____. **Fisiologia médica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. sec. 5, cap. 26, p. 431-435.

GAVIOLLE, M. C. **Modelo experimental para o estudo da interação entre acupuntura e o fenômeno regenerativo induzido em caudas de girinos de *Rana catesbeiana* (SHAW, 1802)**. 1999. 105 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V. A. F. Marcadores histopatológicas de doenças hepáticas. In: MATTOS, A. A.; DANTAS, W. **Compêndio de hepatologia**. São Paulo: Fundação Byk, 1995. p. 57-76.

GEORGE, J. ; CHANDRAKASAN, G. Biochemical abnormalities during the Progression of Hepatic Fibrosis Induced by Dimethylnitrosamine. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n.7, 563-570, 2000.

GEORGE, J. ; CHANDRAKASAN, G. Molecular characteristics of dimethylnitrosamine induced fibrotic liver collagen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1292, p. 215-222, 1996.

GEORGE, J.; RAO, K. R.; STERN, R.; CHANDRAKASAN, G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. **Toxicology**, v. 156, n. 2-3, p. 129-138, 2001.

GERTMAN, P. M.; MADDEN, BEVIN, A. G.; SMITH, H. C. Hepatic collagen metabolism in dimethylnitrosamine induced cirrhosis in rats. **Surgery Forum**, v. 21, p. 363-364, 1970.

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

GOODMAN. Z. D. ; ISHAK, K. G. Hepatic histopathology. In: SCHIFF, E. R.; SORRELL, M. F.; MADDREY, W. C. Chiff's diseases of the liver. 8. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v. 1, part I, chapter 3, p. 53-117.

GRESSNER, A. M.; BACHEM, M. G. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. **Seminars in Liver Disease**, v. 10, n. 1, p. 30-46. Fev.1990.

GRIGORESCU, M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 15, n. 2, p. 149-159, 2006.

GUERRA, R. R. **Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em ratas (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose por tioacetamida**. 2006. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. O fígado como órgão. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap. 70, p. 799-804.

HAM, A. W. Pâncreas, fígado e vesicular biliar. In: _____. **Histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1967. pt. 4, cap. 25, p. 662-690.

HAN, J.S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trend Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 17-22, 2003.

HEPATITE C no mundo. **Weekly Epidemiological Record**, v. 75, n. 3, p. 18, 2000.

HONG JIN PAI. **Acupuntura – de terapia alternativa a especialidade médica**. São Paulo: Ceimec (Centro de Estudos Integrado de Medicina Chinesa), 2005.

HSU-JAN LIU; SHENG-FENG HSU; CHANG-CHI HSIEH; TIN-YUN HO; CHING-LIANG HSIEH; CHIN-CHUAN TSAI; JAUNG-GENG LIN. The effectiveness of tsu-san-li (st-36) and tai-chung (li-3) acupoints for treatment of acute liver damage in rats. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 29, n. 2, p. 221-226, 2001.

IDE M., Kuwamura M., Kotani T., Sawamoto O., Yamate J. Effects of gadolinium chloride (GdCl₃) on the appearance of macrophage populations and fibrogenesis in thioacetamide-induced rat hepatic lesions (2005) *Journal of Comparative Pathology*, 133 (2-3), pp. 92-102.

IKEJIMA, K., Takei Y., Honda H., Hirose M., Yoshikawa M., Zhang Y.-J., Lang T., Fukuda T., Yamashina S., Kitamura T., Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat (2002) *Gastroenterology*, 122 (5), pp. 1399-1410.

ISHAK, K.; BAPTISTA, A.; BIANCHI, L.; CALLEA, F.; GROOTE, J. D.; GUDAT, F.; DENK, H.; DESMET, V.; KORB, G.; MACSWEEN, R. N. M.; PHILIPS, M. J.; PORTMANN, B. G.; POULSEN, H.; SCHEUER, P. J.; SCHMID, M.; THALER, H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **Journal of Hepatology**. v. 22, p. 696-699, 1995.

JAGGAR, D. History and basic introduction to veterinary acupuncture. In: SCHOEN, A. M. **Problems in Veterinary medicine**. v. 4, n.1, p. 1-11, 1992.

JAGGAR, D. História da acupuntura veterinária. In: SHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária – Da arte antiga à medicina moderna**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2006. cap. 1, p. 1-16

JEONG, D.; JANG, J.; LEE, S.; LEE J.; LIM, I.; LEE, M.; LEE, Y. Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCL₄ or thioacetamide. **Journal of Gastroenterology**. v. 36, p. 24-33, 2001.

JOHNSON, S. E. Fisiopatologia, diagnóstico laboratorial, e afecções do fígado: B. Afecções do fígado. In: ETTINGER, S. J. ; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, cap. 106, p. 1817-1899.

JOHNSON, S. E.; SHERING R. G. Hepatopatias e doenças do Trato Biliar. In BIRCHARDK, S. J.; SHERING R. G Manual Saunders – Clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, 1998. ses. 7, cap. 2, 812-856

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia e seus Métodos de Estudo. In: _____. Histologia básica – texto / atlas. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004a cap. 1, p. 3.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Órgãos associados ao Trato Digestivo. In: _____. Histologia básica – texto / atlas. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004b cap. 16, p. 317-338.

KOLB, E.; GÜRTLER, H.; KETZ, H. -A.; SCHRÖDER, L.; SEIDEL, H. Fisiologia do fígado. **Fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. cap. 13, p. 339-347.

KON, S.; IMABI, M.; INABA, H. Isoflurane attenuates early neutrophil-independent hypoxia-reoxygenation injuries in the reperfused liver in fasted rats. *Anesthesiology*, n. 86, p.128-136, 1997.

LAU, L. F.; LAM, S. C. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. ***Experimental Cell Research***, v. 248, p. 44-57, Apr. 1999.

LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. ***Journal of Hepatology***. v. 36, p. 488-493, 2002.

LIDA, V. H.; SILVA, T. J. A.; SILVA, A. S. F.; SILVA, L. F. F.; ALVES, V. A. F. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados as suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. ***Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial***, v. 41, n. 1, p. 29-36, 2005.

LIMA, T. C. **Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar**. 2008. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.

LIMEHOUSE, J. B. Oriental concepts of acupuncture. In: SCHOEN, A. M. **Problems in Veterinary medicine**. v. 4, n.1, p. 53-65, 1992.

LIU, J. X.; ZHAO, Q. Effect of acupuncture on intestinal motion and sero-enzyme activity in perioperation. ***Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi***, vol. 11, n. 3, p. 156-157, 133-134, 11 Mar. 1991.

LEE, M-H.; YOON, S.; MOON, J-O. The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. ***Biological and Pharmaceutical Bulletin***, v. 27, n. 1, p. 72-76, 2004.

MAIKE, S. R. L. (trade). **Fundamentos essenciais da acupuntura chinesa**, São Paulo: Ícone, 1995.

MACLACHLAN, N. J.; CULLEN, J. M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. cap. 2, p. 95-131.

MASSONE, F. Anestesia Geral Volátil ou Inalatória. In: _____. **Anestesiologia Veterinária** (Farmacologia e técnicas). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. cap. 7, p. 80-97.

McCLUGGAGE, D. Acupuntura em pacientes aviários. In: SHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária – Da arte antiga à medicina moderna**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2006. cap. 26, p. 299-325.

MIYAI, K. Structure-function relationship of the liver in health and disease. In: GITNICK, G.; HOLLANDER, D.; SCHOENFIELD, L. J.; SAMLOFF, I. M.; VIERTLING, J. M. **Principles and Practice of Gastroenterology and Hepatology**, 2. ed. Norwalk, connecticut: Appleton & Lange, 1994. sec. VI, chapter 51, p. 679-696.

MOREIRA, E.; FONTANA, L.; TORRES, M. I.; FERNÁNDEZ, I.; RÍOS, A.; MEDINA, F. S.; GIL, A. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids influence the recovery of thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 19, n. 6, p. 461-469, 1995.

Nagata T., Kudo H., Nishino T., Doi Y., Itoh H., Fujimoto S. Increased immunoreactivities against endothelin-converting enzyme-1 and monocyte chemotactic protein-1 in hepatic stellate cells of rat fibrous liver induced by thioacetamide. **Medical molecular morphology**, v. 3, n. 38 , p. 161-172, 2005

NAKAMURA, T.; SAKATA, R.; UENO, T.; SATA, M.; UENO, H. Inhibition of transforming growth factor β prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. **Hepatology**, v. 32, n. 2, p. 247-255, Aug. 2000

Natarajan S.K., Thomas S., Ramamoorthy P., Basivireddy J., Pulimood A.B., Ramachandran A., Balasubramanian K.A. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: A comparison of two different experimental models, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.6, n. 21, p. 947-957, 2006

NISHIYAMA, T; HANAOKA, K. Inorganic fluoride kinetics and renal and hepatic function after repeated sevoflurane anesthesia. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 8, n. 45, p. 789-793, 1998.

NOETHLICH, B. Doenças, sintomas e condições tratáveis com a acupuntura. Disponível em: <http://acupuntura.pro.br/oms/doencas-trataveis/>. Acesso em: 10/01/2009.

Oe S., Fukunaka Y., Hirose T., Yamaoka Y., Tabata Y. A trial on regeneration therapy of rat liver cirrhosis by controlled release of hepatocyte growth factor (2003) *Journal of Controlled Release*, 88 (2), pp. 193-200.

PARADIS, V.; DARGERÉ, D.; VIDAUD, M.; GOUVILLE, A-C.; HUET, S.; MARTINEZ, V.; GAUTHIER, J-M.; BA, N.; SOBESKY, R.; RATZIU, V.; BEDOSSA, P. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. **Hepatology**, v. 30, n. 4, p.968-976, Oct. 1999.

PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; FERRAZ NETO, J. B. H. E.; SILVA, R. A. P. DE S.; COLLETO, G. M. D.; SAAD JR., W. A. Additional growth of an intact liver induced by exogenous hepatotrophic factors. A study in rat. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 7, n. 40, p. 64-68, 1992.

PARRA, O. M.; SILVA, R. A. P. S.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; SAAD, W. A.; SAAD JUNIOR, W. A. Reduction of liver mass due to malnutrition in rats. Correlation of animals and size of organs not inserted in the portal system. **Revista Paulista de Medicina**, v. 113, n. 3, p. 903-909, 1995.

PEREIRA, H. M. **Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos sobre o fígado de ratas (Wistar) com fibrose induzida experimentalmente**. 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PINES, M.; KNOPOV, V.; GENINA, O.; LAVELIN, I.; NAGLER, A.; Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 27, p. 391-398, 1997.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. **Annual Review Biochemistry**, v. 64, p. 403-434, 1995.

QI-WEN XIE. Endocrinological basis of Acupuncture. **American Journal of Chinese Medicine**, v.9, n.4, p. 298-304, 1982.

RACHFAL, A. W.; BRIGSTOCK, D. R. Connective tissue growth factor (CTGFCCN2) in hepatic fibrosis. **Hepatology Research**, v. 26, p. 1-9, 2003.

REECE, W. O. Digestão e absorção. In: _____. **Fisiologia de animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1996. cap. 9, p. 215-240.

Reif S., Aeed H., Shilo Y., Reich R., Kloog Y., Kweon Y.O., Bruck R. Treatment of thioacetamide-induced liver cirrhosis by the Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid, *Journal of Hepatology*, v.2, n. 41, p. 235-241, 2004.

ROBBINS, S. L. O fígado e o tracto biliar. In: _____. **Patologia com aplicação clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1965. p. 770-784.

RODRIGUES, A. S. **Expressão e distribuição da conexina 32 em fígados com fibrose experimentalmente induzida** 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ROJKIND, M. Fibrosis and cirrhosis as alterations in homeostais of the liver ecosystem. In: GITNICK, G.; HOLLANDER, D; SCHOENFIELD, L. J.; SAMLOFF, I. M.; VIERLING, J. M. **Principles and Practice of Gastroenterology and Hepatology**, 2. ed. Norwalk, connecticut: Appleton & Lange, 1994. sec. VI, chapter 55, p. 731-741.

ROJKIND, M.; PEREZ-TAMAYO, R. Liver fibrosis. **International Review of Connective Tissue Research**, vol. 10, p. 333-393, 1983.

SAAD, W. A. **Observações morfológicas, auto-radiográficas, morfométricas, histoquímica e bioquímica sobre a regeneração do fígado cirrótico de rato, induzida pela hepatectomia parcial**. 1972. 46 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

SAAD, W. A.; **Observações morfológicas, auto-radiográficas, morfométricas, histoquímica e bioquímica sobre a regeneração do fígado cirrótico de rato, induzida pela dupla hepatectomia parcial**.

1975. 75 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975.

SAMPAIO, C. Nova técnica para detectar início de cirrose. Disponível em <http://www.saudeemmovimento.com.br>. Acesso em: 27 jan. 2005.

SANTOS J. A. Distúrbio das pigmentações. In: _____. **Patologia dos animais domésticos (mamíferos e aves)**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. cap. 8, p. 111-127.

SANTOS, J. A. Tubo digestivo. In: _____. **Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves)**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. cap. X, p. 445-473.

Sato N., Hatakeyama Y., Igarasi W., Ono T., Koyama Y., Inoue N., Tsuchiya A., Abe R. Quantitive analysis of extracellular matrix components in liver cirrhosis and its significance, **Japanese Journal of Gastroenterological Surgery**, v.8, n.32, p. 2085-2094, 1999

SCHINDHELM, R. K.; DIAMANT, M.; DEKKER, J. M.; TUSHUIZEN, M. E.; TEERLINK, T.; HEINE, R. J. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 22, n. 6, p. 437-443, 2006.

SHAW, D. H.; IHLE, S. L. Doenças hepatobiliares e pancreáticas exócrinas. In: _____. **Medicina interna de pequenos animais**. Porto Alegre: Artmed, 1999. cap. 42, p. 325-353.

Shiroiwa H., Usami M., Ohyanagi H., Saitoh Y. Effect of ischemia and reperfusion on hepatic regeneration following partial hepatectomy in cirrhotic rat liver, *Nippon Geka Gakkai zasshi*, 94 (3), pp. 250-258, 1993

Shi, X.; Song, Q.; Hu, S.; Li, Z. F.; Liu, Q.; Wang, L. Study on protective action of electroacupuncture on endotoxin-induced hepatic injury in rats. **Chinese acupuncture & moxibustion**, vol. 28, n. 4, p. 290-292, 2008.

SHIBA, M.; SHIMIZU I.; YASUDA, M.; LI, K.; ITO, S. Expression of type I and type III collagens during the course of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Liver**, vol. 18, p. 196-204, 1998.

SILVA, O. S. **Tratamento da hepatite C e de suas formas evolutivas**. São Paulo: Donnelley-Cochrane, 2000. 94 p.

SMBA – Sociedade Médica Brasileira de Acupuntura. Serviços de Acupuntura em Instituições Públicas no Brasil. Disponível em: <http://www.smba.org.br>. Acesso em: 01 fev. 2006.

STARZL, T. E.; PORTER, K. A.; KASHIWAGI, N.; PUTNAM, C. W. Portal hepatotrophic factors, diabetes mellitus and acute liver atrophy, hypertrophy and regeneration. **Surgery Gynecology Obstetric** v. 141, n. 6, p. 46-49, 1975.

STARZL, T. E.; PORTER, K. A.; WATANABE, K.; PUTNAM, C. W. Effects of insulin, glucagon, and insulin/glucagon infusions on liver morphology and cell division after complete portocaval shunt in dogs. **The Lancet**. v. 1, p. 821, 1976.

SPENCE, A. P. Sistema digestivo. In: _____. **Anatomia humana básica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991. cap. 20, p. 537-571.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-82, jan-fev, 2001.

SUGAI, G.C.; FREIRE ADE, O.; TABOSA, A.; YAMAMURA, Y.; TUFIK, S.; MELLO, L. E. Serotonin involvement in the electroacupuncture – and moxibustion-induced gastric emptying in rats. **Physiol Behav**, vol. 82, n. 5, p. 855-861, 15 Oct. 2004.

TABOSA, A.; YAMAMURA, Y.; FORNO, E. R.; MELLO, L. E. Effect of the acupoints ST-36 (*Zusanli*) and SP-6 (*Sanyinjiao*) on intestinal myoelectric activity of Wistar rats. **Brazilian Journal Medical Biology Reserch**, v. 35, n. 6, p. 731-739, 2002.

TADA, S.; NAKAMUTA, M.; ENJOJI, M.; SUGIMOTO, R.; IWAMOTO, H.; KATO, M.; NAKASHIMA, Y. NAWATA, H. Pirfenidone inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 7, p. 522-527, 2001b.

THOMSON, R. G. Degeneração e necrose. In: _____. **Patologia geral veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. cap. 2, p. 83-89.

Toyama T., Nakamura H., Harano Y., Yamauchi N., Morita A., Kirishima T., Minami M., Itoh Y., Okanoue T. PPAR α ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats (2004) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324 (2), pp. 697-704.

TOMITA, R. Y. In: _____. **Minimanual do Corpo Humano**. São Paulo: Rideel, 2003. p. 75.

TORRES, S.; DÍAZ, B. P.; CABRERA, J. J.; DÍAZ-CHICO, J. C.; DÍAZ-CHICO, B. N.; LÓPEZ-GUERRA, A. Thyroid hormone regulation of rat hepatocyte proliferation and polyploidization. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 276, n. 1, p. 155-163, 1999.

TOSTES, R. A. **Avaliação histológica da fibrose na doença hepática crônica canina: análise semiquantitativa por escores, análise digital morfométrica e detecção imunoistoquímica de adenovírus canino tipo 1 (CAV-1)**. 2003. 100 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, 2003.

TWEDT, D. C. Cirrhosis: a consequence of chronic liver disease. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 15, p. 151-176, 1985.

TORTORA G. J.; GRABOWSKI S. R. In: _____. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 2- 4, 92-123, 770-774.

TSAI, P.-S., Wang, T.-Y., Yan, L.-P., Xu, H.-Z., Huang, C.-J. Acupuncture stimulation of ST36 (Zusanli) attenuates acute renal but not hepatic injury in lipopolysaccharide-stimulated rats *Anesthesia and Analgesia*, v. 3, n. 104, p. 646-654, 2007

WATARI, N.; KURONO, Y.; TAKAGI, K. The curative effect of acupuncture for liver injury caused by CCL₄ administration. **Proceedings of the International Union Physiological Sciences**, Paris, v. 13, p. 801-807, 1977.