

# CARACTERIZAÇÃO DE LEUCÓCITOS DE VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS SUBMETIDOS À ELETROACUPUNTURA.

**Fernanda Dias TOME<sup>1</sup>, Mayara Miranda e Silva<sup>1</sup>, Danillo Nunes de Aguiar<sup>1</sup>, Valeria Bernadete Leite Quixabeira<sup>2</sup>, Milton Adriano Pelli de Oliveira<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

<sup>2</sup> Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia, Goiânia, GO

PIBIC: Fernanda D. Tome nanda\_dias91@hotmail.com

Orientador: Milton A. P. Oliveira: mapoliv@iptsp.ufg.br

**Palavras Chave: eletroacupuntura, leucócitos, arginase, óxido nítrico.**

## 1 INTRODUÇÃO

A acupuntura é uma terapia alternativa extremamente popular em vários países da Ásia nos Estados Unidos e no Brasil, sendo utilizada clinicamente há mais de cinco mil anos no tratamento de doenças como asma, doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (Lee et al. 2007, Park et al. 2004).

Embora esta terapia seja praticada há muito tempo no Oriente, somente mais recentemente as técnicas da acupuntura foram mais aceitas pelas instituições acadêmicas ocidentais, sendo que esta aceitação pode ser evidenciada pela concessão do Prêmio Nobel de 1977 ao médico Ronald Melzack pelo seu trabalho na área de tratamento de dor. Neste trabalho, Melzack correlacionou os acupontos que os cientistas ocidentais vinham estudando com os pontos da acupuntura chinesa (Mori 2006).

São diversas as técnicas de estimulação dos acupontos segundo a medicina tradicional chinesa (MTC), desde o agulhamento simples até a aplicação de ervas como a *Artemisia vulgaris* para aquecimento e defumação de pontos específicos na pele (moxabustão); a puntura de áreas reflexas como cranioacupuntura (aplicação de agulhas em regiões delimitadas na cabeça), auriculoacupuntura (utilização do pavilhão auricular como método diagnóstico e terapêutico) e mais recentemente a utilização de correntes elétricas com o

objetivo de potencializar a ação terapêutica da acupuntura. Esta última técnica é conhecida como eletroacupuntura (EA).

As alterações diretas provocadas pela técnica podem ser iniciadas pela estimulação de mastócitos, já que existe um número de mastócitos nos acupontos significativamente maior que em outros locais (Zonglian 1979). Além disto, mastócitos de ratos sofrem desgranulação após sua estimulação com agulha de acupuntura (Hwang 1992).

A acupuntura pode influenciar o sistema imunológico de uma maneira mais generalizada pela modulação imuno-neuro-endócrina, promovendo a estimulação cerebral seletiva, especialmente do hipotálamo, responsável pela modulação de estímulos nociceptivos periféricos. Um exemplo da interferência da acupuntura no sistema imune é a inibição da produção de citocinas pro-inflamatórias por macrófagos, como fator de necrose tumoral (TNF), Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-18 (IL-18), entre outras (Kavoussi and Ross 2007).

Por outro lado, a acupuntura também está associada à imunodepressão pela diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (Kavoussi and Ross 2007). A eletroacupuntura em alta potência por longos períodos também induziu imunodepressão em ratos submetidos a essa técnica nos acupontos E36 e Sanyinjiao por 30 minutos diariamente, durante 5 dias. A imunodepressão observada foi de uma inibição da proliferação de linfócitos T induzida por concanavalina A; efeito melhor observado no quinto dia e menor no décimo dia (Qinglan 1991).

A depressão da resposta imune pela acupuntura também foi descrita em camundongos imunizados com dinitrofenol (DNP-KLH / modelo de indução da resposta Th2). Neste modelo, os animais tiveram redução dos níveis séricos de IgE antígeno específicas por supressão da produção de IL-4, contudo sem alteração nos níveis de INF- $\gamma$ , comparados ao grupo controle; embora os animais não imunizados e submetidos a acupuntura (E36) não sofreram alterações no perfil imunológico (Park et al. 2004).

A redução de IL-4, IL-10, NO e leucotrieno B4 (LTB4) no lavado bronquioalveolar e tecido pulmonar foi observada após realização de EA em ratos wistars com asma experimental. A acupuntura mostrou-se efetiva no controle da secreção de citocinas responsáveis pela patogênese da doença (Carneiro et al. 2010). Em contrapartida, foi demonstrada atividade analgésica e anti-edematogênica da EA através de regulação de fatores inflamatórios, como redução da expressão de cicloxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina E2 (PGE2) nos sítios inflamatórios em modelos experimentais murinos por indução de inflamação através de carragenina (Lee et al. 2007).

A acupuntura pode agir sobre o sistema imune pela regulação da produção de citocinas como citado acima, além do aumento da citotoxicidade de células natural killer (NK) mediado pelo aumento da produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), da expressão de proteína tirosina quinase (PTK), de moléculas de adesão (VCAM-1) e redução da expressão gênica de proteína fosfatase-1 (SHP-1) pós estimulação de EA (Kim et al. 2005, Kim and Bae 2010).

O estímulo da eletroacupuntura é acuponto-específico e dependente da frequência, tipo e intensidade da corrente elétrica, haja vista que EA em não acupontos não promovem efeitos modulatórios sobre o sistema imune (Kim et al. 2009).

Nos últimos anos, a compreensão de como os macrófagos são fundamentais no direcionamento da resposta imune têm avançado significativamente, permitindo identificar subconjuntos com características funcionais distintas. Os macrófagos são células do sistema imune derivadas de monócitos e apresentam fenótipo altamente plástico, o que lhes permite se especializar e realizar respostas polarizadas, tais como pró-inflamatória ou anti-inflamatória em respostas às citocinas ou produtos microbianos. Na fase inicial de uma resposta imune inata, após estímulos inflamatórios, há o desenvolvimento de uma inflamação no tecido afetado. Os macrófagos presentes nos tecidos inflamados podem ser ativados de duas formas distintas. Classicamente, os macrófagos denominados M1, podem ser ativados por IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF, citocinas que aumentam o potencial microbicida destas células, favorecendo a produção de óxido nítrico (NO), um derivado do aminoácido L-arginina, pela atividade enzimática de dioxigenases, denominadas óxido nítrico sintetases (NOS). Dois isômeros dessa enzima são expressos na forma constitutiva (cNOS) em células endoteliais, nos neurônios e músculos esqueléticos. O terceiro isômero induzido (iNOS) é identificado nas células do sistema imune, a exemplo dos macrófagos (Jobgen et al. 2006). O NO têm se mostrado importante na proteção do hospedeiro por ser uma molécula efetora anti-microbiana bem como um mediador em potencial na destruição de diversos patógenos no contexto da imunopatologia (Kroncke et al. 1995) (Liew and O'Donnell 1993). As citocinas ativadoras dos macrófagos M1 podem ser produzidas por células da imunidade inata, como células NK, macrófagos, células dendríticas, ou células da imunidade adquirida como linfócitos T, principalmente os linfócitos Th1 (Liew and O'Donnell 1993).

Alternativamente, os macrófagos podem ser ativados por IL-4, IL-13, IL-10, glicocorticóides, entre outras substâncias, sendo que as citocinas descritas podem ser produzidas principalmente por linfócitos Th2 (Gordon 2003, Mosmann and Sad 1996). Macrófagos ativados por citocinas do perfil Th2 e glicocorticóides, também denominados M2 são subdivididos em M2a (ativados por IL-4), M2b (ativados por complexos imunes ou TLR)

e macrófagos M2c ativados por IL-10. Essas células possuem um aumento na capacidade fagocítica, uma melhor capacidade para reparo tecidual, porém, uma diminuição na capacidade de produzir substâncias microbidas (Gordon 2003, Mosser and Edwards 2008, Villalta et al. 2009).

Macrófagos M2 expressam alta atividade de arginase. Anfíbios e mamíferos expressam duas isoformas da enzima e ambas catalisam a mesma reação, ou seja, participam da etapa final na síntese do ciclo da uréia. No entanto são codificadas por diferentes genes e diferem no que diz respeito a distribuição celular e modo de regulação. A arginase I também conhecida como arginase hepática é uma enzima citosólica expressa quase que exclusivamente no fígado, mas também pode ser expressa por macrófagos e linfócitos extra-hepáticos (Kanyo et al. 1996). A arginase II é uma enzima mitocondrial amplamente distribuída nos tecidos como rins, próstata, intestino delgado e no cérebro (Jenkinson et al. 1996). A isoforma arginase I é regulada positivamente em macrófagos murinos e células dendríticas, sendo importante na regulação de processos imunológicos, enquanto que a arginase II é expressa constitutivamente (Munder et al. 1998).

Alguns trabalhos mostraram que o estímulo de alguns pontos de acupuntura pode ocasionar um aumento na produção de glicocorticóides (Guimaraes et al. 1997) (Li et al. 2007), sendo assim, estes estímulos poderiam favorecer a geração de macrófagos alternativamente ativados.

Os macrófagos classicamente ativados utilizam a L-arginina para produzirem NO pela enzima iNOS, enquanto macrófagos alternativamente utilizam a L-arginina para síntese de poliaminas e uréia. As poliaminas são importantes para síntese de ácido nucléico e colágeno no reparo do tecido lesado, enquanto o NO pode reagir com DNA, RNA e enzimas contendo ferro, em patógenos, promovendo a morte destes microorganismos (Bogdan 2001, Gordon 2003).

Experimentos demonstram também que a mudança do fenótipo de M1 para M2a, concomitantemente aumentam a expressão de arginase com redução de óxido nítrico sintase (Munder et al. 1998). A regulação da iNOS e aumento da atividade de arginase refletem a mudança no metabolismo da arginina que é o substrato comum para ambas as enzimas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Caracterizar leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis após a eletroacupuntura.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1 Avaliar o leucograma de voluntários sadios submetidos ou não a eletroacupuntura.

2.2.2 Avaliar a concentração de óxido nítrico no plasma de sangue periférico de voluntários sadios submetidos ou não a eletroacupuntura.

2.2.3 Avaliar a atividade de arginase em leucócitos obtidos do sangue periférico de voluntários sadios submetidos ou não a eletroacupuntura.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS**

Foram convidados a participar do estudo doze voluntários saudáveis da Brigada de Operações Especiais de Goiânia, gênero masculino, com idade entre 18 e 25 anos, ingressos no 1º ano de serviço militar. Os voluntários apresentavam hábitos saudáveis semelhantes com alimentação equilibrada e realização de prática de exercícios físicos regularmente. Os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa por meio de cartazes afixados no Selotex de todas as unidades da organização militar e todos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes do início da experimentação.

### **3.2 GRUPO EXPERIMENTAL E ELETROACUPUNTURA**

Os experimentos foram feitos em duas etapas, sendo a primeira (6 voluntários) feita em 2010 e a segunda (6 voluntários) será concluída no início de julho de 2011. Os voluntários foram separados em dois grupos sendo um tratado com eletroacupuntura, por quatro dias consecutivos durante 4 semanas (Primeira etapa) ou 5 semanas (segunda etapa). A eletroacupuntura realizada foi a preconizada pela Sociedade Brasileira de Fisioterapeutas Acupunturistas e Colégio de Medicina Imperial de Pequim através de eletroacupuntura dos pontos auriculares (Shen Men e Endócrino) e sistêmicos VG 20 (Bahui), localizado no Meridiano do Vaso governador, no meio do crânio, no topo da cabeça, na intersecção da linha medial do corpo com a linha que parte do eixo vertical das orelhas, e VB20 (Feng Chi), localizado abaixo do occipital, na depressão entre as extremidades superiores dos músculos trapézio e esternocleidomastóideo, pontos classicamente usados na medicina tradicional chinesa no tratamento de dores agudas e crônicas (Macioccia 1996). Foram utilizadas agulhas de 0,18 x 8 mm e o aparelho WQ IOD1 com corrente elétrica selecionada denominada *rise di fall di*, polarizada, intermitente e alternada.

### 3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Uma quantidade de 8 ml de sangue periférico dos voluntários foi coletada pelo fisioterapeuta e acupunturista Ms. Danillo Nunes de Aguiar em tubos a vácuo contendo EDTA antes da primeira sessão de acupuntura e no 4<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 18<sup>o</sup>, 25<sup>o</sup> e 32<sup>o</sup> dias após o início da acupuntura. Este sangue foi rotulado com um código contendo as três primeiras letras do nome dos voluntários. Quatro mililitros de sangue foram encaminhados ao Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia para realização do hemograma completo e citometria de fluxo. Os demais 14 mL foram levados ao Laboratório de Citocinas da UFG para análise de atividade de arginase e dosagem de óxido nítrico no plasma.

### 3.4 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A concentração de nitrito foi feita pelo método de dosagem de nitrito plasmático utilizando-se o sistema cádmio-cobre descrito anteriormente (Navarro-Gonzalvez et al. 1998). Para tanto, 0,5 mL de plasma de cada voluntário foi centrifugado por 10 minutos a 200xg a 4° C e congelados para posterior análise. Foram adicionados 50 µL de ZnSO<sub>4</sub> a 75 mM a 60 µL de plasma que foi homogeneizado e centrifugado por 2 min a 10.000xg a 4° C. Em seguida, foram adicionados ao sobrenadante 70 µL de NaOH a 55 mM que também foi homogeneizado

e centrifugado nas mesmas condições. Seguiu-se a adição de 50 µL de glicina-NaOH (45 g/L pH 9,7) que foi incubado com 400 mg de esferas de cádmio previamente ativadas em HCl (HCl concentrado por 10 min) para redução de nitrato a nitrito. Cinquenta microlitros das amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços, seguindo da adição de 50 µL de Reagente de Griess (Sulfanilamida: 0,4 g em 20 mL de ácido fosfórico 5% - protegidos da luz; Naftil etileno diamida: 40 mg em 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada). A placa foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos, e a absorbância medida a 550 nm em leitor de microplacas (Labsystem, Finlândia).

### 3.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE DE ARGINASE

As células do sangue periférico dos voluntários foram lisadas pela incubação por 3 vezes consecutivas com tampão de lise de hemácias (17 mM tris-HCl + 0,144 M de cloreto de amônio pH7.2) seguida por centrifugação a 200 x g por 10 min. Os leucócitos restantes foram aliqüotados em 0,3 ou 1,0 x 10<sup>6</sup> células em 50 µL de PBS. Adicionou-se 5 µL de tampão de lise de leucócitos 10X (Tris-HCl 500mM pH 7,5 contendo 1% de Triton 114). O lisado das células foi mantido a 25°C com agitação por 30 minutos. Após este tempo, 50 µL de MnCl<sub>2</sub> (em Tris-HCl 50 mM pH7,5) foram adicionados e incubados por 10 min a 56° C para ativação da enzima. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de L-arginina 0.5 M pH 9.7. As amostras foram processadas como descrito anteriormente e em seguida a reação foi parada pela adição de 200 µL da mistura 1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 3 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: 7 H<sub>2</sub>O. Em seguida adicionou-se 25 µL de isonitrosopropiofenona (0,9 g em 10 mL de etanol absoluto), incubou-se a 95° C por 45 minutos e manteve-se no escuro a 25° C por 15 minutos. A absorbância foi medida a 550 nm em um espectrofotômetro. Uma curva padrão de uréia foi preparada nos mesmos tampões para a dosagem da para quantificar a uréia das amostras.

Para padronização da técnica foram utilizados lisados de linhagens de células (RAW 164 e AP284) cultivadas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cripion, São Paulo) inativado a 56° C por 30 min, 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co), 11mM de bicarbonato de sódio (Merck, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co), 2mM de HEPES. Este cultivo foi feito na presença ou ausência de 20ng/mL de rIL-4 (R&D systems, Miniápolis, EUA). Após 48 h, o sobrenadante de cultura foi coletado e as células remanescentes da cultura lisadas com solução de lise de leucócitos para dosagem da atividade de arginase.

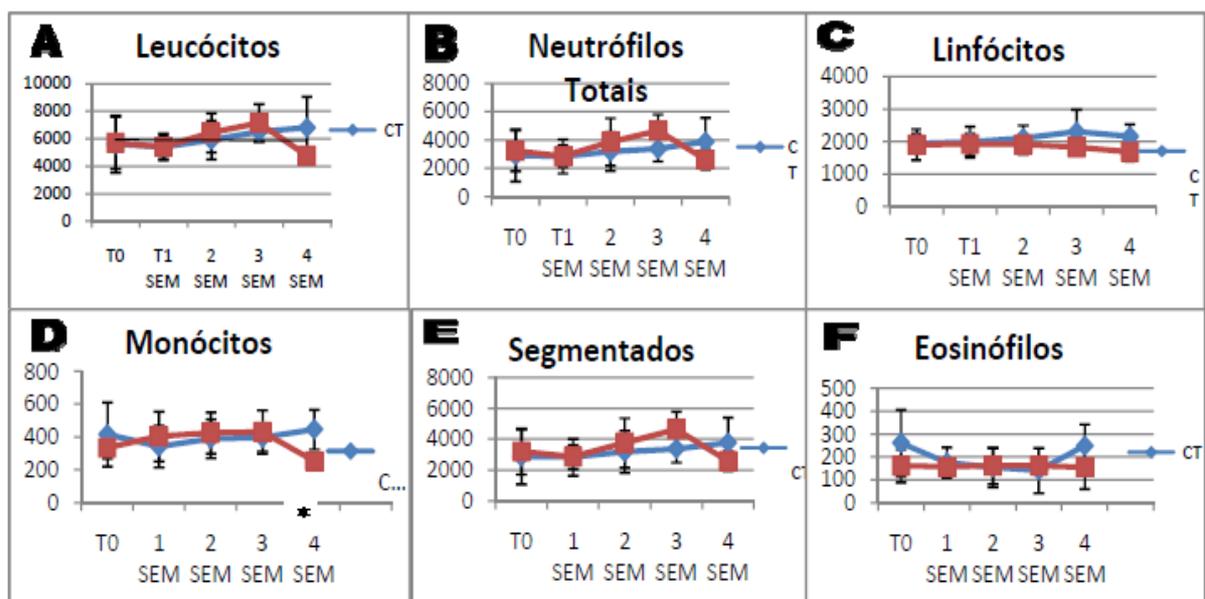
### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram comparadas quanto a significância utilizando-se o programa Prism versão 4.0 (Graphpad) por meio do teste "t" de Student. As amostras foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 LEUCOGRAMA

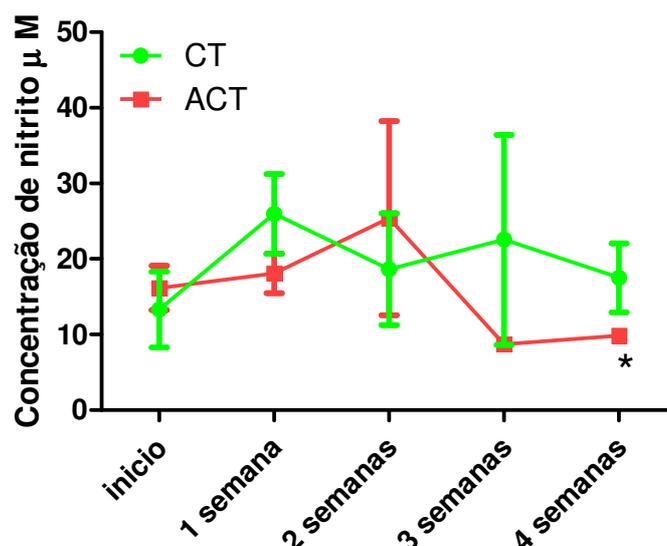
Os leucócitos circulantes de todos os voluntários mantiveram-se dentro dos níveis de normalidade para o gênero masculino, entretanto, a quantidade de monócitos circulantes foi significativamente menor nos voluntários que se submeteram à acupuntura do que os controles na 4ª semana de experimentação (Figura 1 D). O mesmo perfil foi observado para a média de neutrófilos totais e de segmentados (Figura 1 B e E), embora não tenha sido observada diferença estatística entre estes grupos. O número de linfócitos sofreu pequenas variações em nossos experimentos nos dois grupos (Figura 1C), mas não foi observada uma queda significativa destas células pela terapia com acupuntura. Não se observou também alterações significativas na quantidade de eosinófilos circulantes (Figura 1F).



**Figura 1.** Leucograma de voluntários submetido à eletroacupuntura (vermelho) ou controles (azul). Os símbolos representam a média  $\pm$  (DP) da quantidade dos diferentes leucócitos por  $\text{mm}^3$  de três voluntários em cada grupo no período de 4 semanas de experimento. T0 indica o período antes do início da terapia com acupuntura \* Indica diferença significativa entre o grupo controle e o grupo eletroacupuntura ( $p < 0,05\%$ , teste t de student's).

#### 4.2 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A concentração de nitrito no plasma dos voluntários da primeira etapa variou de 5,92 a 60,66  $\mu\text{M}$  durante o período experimental. O nitrito médio observado no grupo controle permaneceu em valores entre 10 e 25  $\mu\text{M}$ , enquanto os voluntários tratados com eletroacupuntura apresentaram uma maior variação nestes valores (Figura 2). Vale ressaltar que na quarta semana do experimento os voluntários tratados com eletroacupuntura apresentavam uma quantidade de óxido nítrico significativamente menor que os respectivos controles.



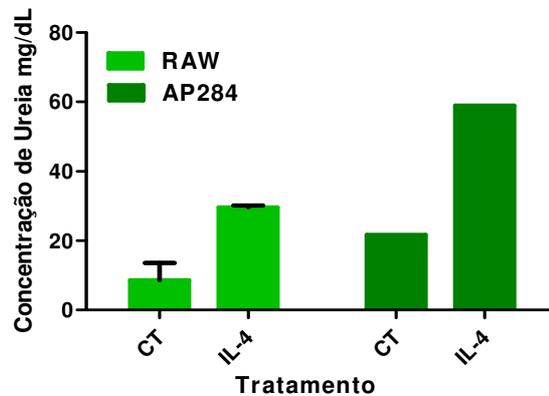
**Figura 2.** Quantificação do óxido nítrico em plasma. Voluntários foram submetidos a EA (ACT- vermelho) ou não (CT- verde) durante quatro semanas e após cada semana foram coletadas amostras sanguíneas para quantificação de nitrito em plasma. Os símbolos representam a média  $\pm$  (DP) da quantidade de nitrito no plasma de três voluntários em cada grupo no período de 4 semanas de experimento. \* Indica diferença significativa entre o grupo CT e ACT ( $p < 0,05\%$ ).

#### 4.3 ANÁLISE DE ATIVIDADE DE ARGINASE

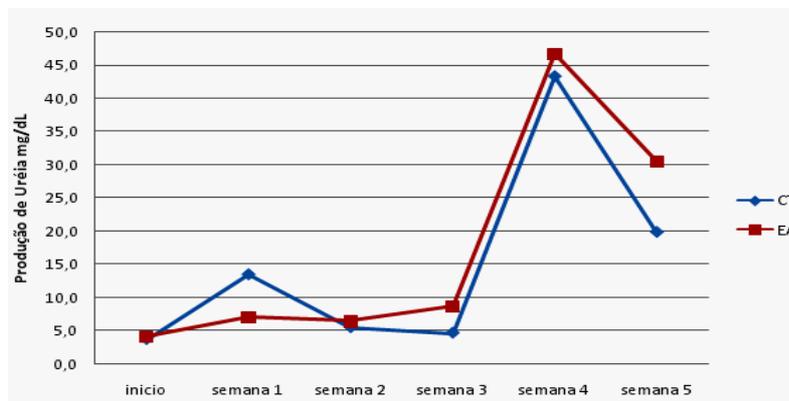
A L-arginina é um substrato para produção de ureia pela enzima arginase. Para padronizar a técnica de avaliação de atividade de arginase, foram cultivadas  $1 \times 10^6$  células de linhagens fagocíticas murinas AP284 ou RAW264. Como pode ser observado na Figura 3, as células AP284 produziram mais uréia que as células RAW264, principalmente após a adição de IL-4, que é uma citocina conhecida por induzir a expressão de arginase 1 em leucócitos (Gordon 2003, Mosser and Edwards 2008).

Após a padronização da técnica,  $0,3 \times 10^6$  leucócitos dos voluntários foram utilizados para avaliar a atividade de arginase. Infelizmente, os resultados obtidos para as células na primeira fase foram muito variados, sendo que na maioria das vezes não foi possível observar produção de uréia. Para solucionar este problema, os experimentos da segunda fase foram realizados com  $1 \times 10^6$  leucócitos. Nesta situação, a produção de uréia foi observada nas células de todos os voluntários, porém pode ser constatada uma grande variação na atividade da arginase ao longo do tempo (Figura 4). O período onde se observou uma maior atividade

da enzima foi na quarta semana de experimentação, porém, o aumento foi observado nos grupos controles e nos tratados com eletroacupuntura.



**Figura 3** Produção de uréia pela enzima arginase de fagócitos murinos: uma quantidade de  $1 \times 10^6$  células de linhagem fagocítica RAW264 ou AP284 foi incubada na presença ou ausência de IL-4 por 24 h. Após este tempo as células foram lisadas e a produção de uréia analisada após a incubação do lisado com L-arginina. As barras representam a média  $\pm$  (DP) da concentração de uréia.



**Figura 4.** Produção de uréia pela enzima arginase de leucócitos humanos: uma quantidade de  $1 \times 10^6$  leucócitos do sangue periférico foram lisados e incubados na presença de L-arginina a 37C por 1h. As linhas representam a produção de uréia por leucócitos de cada doador submetidos a EA (vermelho) ou controles (azul).

## 5 DISCUSSÃO

Durante todo o período experimental (primeira etapa), o perfil dos leucócitos circulantes de todos os voluntários manteve-se dentro dos níveis de normalidade para o gênero masculino, que é de 2.844 a 10.939 leucócitos/mm<sup>3</sup> (Loterio 1992). Entretanto, a

quantidade de monócitos e neutrófilos circulantes diminuiu nos voluntários que se submeteram à acupuntura. Dados semelhantes foram observados anteriormente, quando foi relatado que a acupuntura pode alterar os níveis de leucócitos circulantes promovendo um decréscimo dos linfócitos após a terceira semana de tratamento (Kou et al. 2005). Embora não tenha sido observada a diminuição de linfócitos em nossos experimentos, nossos dados concordam com os resultados obtidos por KOU *et al.*, 2005 que demonstra que esta terapia foi capaz de provocar efeitos imunomodulatórios mesmo em indivíduos saudáveis.

Além da diminuição de leucócitos circulantes, nossos dados sugerem que a eletroacupuntura promove uma diminuição da produção de NO no plasma dos voluntários tratados. Praticamente todas as células humanas estudadas até agora têm a capacidade de produzir NO (Wang 2005). Atualmente, três isoformas de NOS foram identificadas: a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS) (ambas cálcio-dependentes e expressas em condições fisiológicas) e a terceira, a isoforma induzida (iNOS), ativada por estímulos imunológicos e independente do íon cálcio (Tatchum-Talom et al. 2000). As células que produzem NO pela iNOS são apenas células do sistema imune, principalmente células do sistema fagocítico mononuclear. Baseado nestes dados, é difícil supor que a queda de NO no plasma na quarta semana tenha sido devido a diminuição de NO pelas células do sistema imune, porém é possível que a diminuição dos níveis plasmáticos de NO esteja associado ao decréscimo na quantidade de monócitos como citado anteriormente.

A L-arginina é um substrato comum em vias do metabolismo para produção de NO e citrulina pela iNOS, bem como de uréia e ornitina pela enzima arginase, sendo que esta última está associado a um perfil imunomodulador dos macrófagos (MUNDER *et al.*, 1999). A atividade de arginase foi observada em células de todos os voluntários durante todo o período experimental, porém a variação na atividade desta enzima foi muito grande nos dois grupos, não sendo possível associar aumento na atividade de arginase ao tratamento com eletroacupuntura.

## 6 CONCLUSÕES

A eletroacupuntura induziu uma queda na quantidade de monócitos circulantes e na concentração de óxido nítrico no plasma, sugerindo uma ação imunomoduladora desta terapia.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bogdan C 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916.
- Carneiro ER, Xavier RA, De Castro MA, Do Nascimento CM, and Silveira VL 2010. Electroacupuncture promotes a decrease in inflammatory response associated with Th1/Th2 cytokines, nitric oxide and leukotriene B4 modulation in experimental asthma. *Cytokine* 50: 335-340.
- Gordon S 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
- Guimaraes CM, Pinge MC, Yamamura Y, and Mello LE 1997. Effects of acupuncture on behavioral, cardiovascular and hormonal responses in restraint-stressed Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 30: 1445-1450.
- Hwang YC 1992. Anatomy and classification of acupoints. *Probl Vet Med* 4: 12-15.
- Jenkinson CP, Grody WW, and Cederbaum SD 1996. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114: 107-132.
- Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, and Wu G 2006. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 17: 571-588.
- Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE, and Christianson DW 1996. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* 383: 554-557.
- Kavoussi B, and Ross BE 2007. The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. *Integr Cancer Ther* 6: 251-257.
- Kim CK, Choi GS, Oh SD, Han JB, Kim SK, Ahn HJ, Bae H, and Min BI 2005. Electroacupuncture up-regulates natural killer cell activity Identification of genes altering their expressions in electroacupuncture induced up-regulation of natural killer cell activity. *J Neuroimmunol* 168: 144-153.
- Kim SK, and Bae H 2010. Acupuncture and immune modulation. *Auton Neurosci* 157: 38-41.
- Kim SK, Lee Y, Cho H, Koo S, Choi SM, Shin MK, Hong MC, Min BI, and Bae H 2009. A Parametric Study on the Immunomodulatory Effects of Electroacupuncture in DNP-KLH Immunized Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*.
- Kou W, Bell JD, Gareus I, Pacheco-Lopez G, Goebel MU, Spahn G, Stratmann M, Janssen OE, Schedlowski M, and Dobos GJ 2005. Repeated acupuncture treatment affects leukocyte circulation in healthy young male subjects: a randomized single-blind two-period crossover study. *Brain Behav Immun* 19: 318-324.
- Kroncke KD, Fehsel K, and Kolb-Bachofen V 1995. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376: 327-343.
- Lee Y, Kim SK, Kim Y, Lee H, Shin MK, Hong MC, Min BI, and Bae H 2007. The alpha-adrenoceptor mediation of the immunomodulatory effects of electroacupuncture in DNP-KLH immunized mice. *Neurosci Lett* 423: 149-152.
- Li A, Zhang RX, Wang Y, Zhang H, Ren K, Berman BM, Tan M, and Lao L 2007. Corticosterone mediates electroacupuncture-produced anti-edema in a rat model of inflammation. *BMC Complement Altern Med* 7: 27.
- Liew FY, and O'Donnell CA 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 32: 161-259.
- Loterio HA 1992. *Valores de leucócitos em uma população de doadores de sangue*, [dissertação] Universidade de São Paulo.

Macioccia G 1996. *Os fundamentos da Medicina Chinesa*. São Paulo: Roca. 1996.

. RoccaSão Paulo,pp.

Mori H 2006. *Introdução a Acupuntura*. Ícone Editora,1, pp.

Mosser DM, and Edwards JP 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.

Munder M, Eichmann K, and Modolell M 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4<sup>+</sup> T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 160: 5347-5354.

Navarro-Gonzalvez JA, Garcia-Benayas C, and Arenas J 1998. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44: 679-681.

Park MB, Ko E, Ahn C, Choi H, Rho S, Shin MK, Hong MC, Min BI, and Bae H 2004. Suppression of IgE production and modulation of Th1/Th2 cell response by electroacupuncture in DNP-KLH immunized mice. *J Neuroimmunol* 151: 40-44.

Qinglan W 1991. Research on animal acupuncture moxibustion immunity. *Word Veterinary Congress 24, Anais*: 57.

Tatchum-Talom R, Schulz R, McNeill JR, and Khadour FH 2000. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1757-1766.

Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, and Tidball JG 2009. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 18: 482-496.

Wang JS 2005. Effects of exercise training and detraining on cutaneous microvascular function in man: the regulatory role of endothelium-dependent dilation in skin vasculature. *Eur J Appl Physiol* 93: 429-434.

Zonglian H 1979. A study on the histologic structure of acupuncture points and types of fibers conveying needling sensation. *Chin Med J (Engl)* 92: 223-232.