



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

THAYSSA FERREIRA DOS SANTOS

**NEUROPROTEÇÃO, DIMINUIÇÃO DO INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS E
MICROGLIOSE APÓS TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE
COPAIFERA RETICULATA DUCKE EM UM MODELO EXPERIMENTAL
DE LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL**

Belém-PA
2017

THAYSSA FERREIRA DOS SANTOS

**NEUROPROTEÇÃO, DIMINUIÇÃO DO INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS E
MICROGLIOSE APÓS TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE
COPAIFERA RETICULATA DUCKE EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito obrigatório para obtenção do título de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

BÉLEM - PA
2017

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Santos, Thayssa Ferreira dos

Neuroproteção, diminuição do infiltrado de neutrófilos e microgliose após tratamento com óleo-resina de copaifera reticulata ducke em um modelo experimental de lesão aguda da medula espinhal / Thayssa Ferreira dos Santos; Orientador, Wallace Gomes Leal. - 2017.

74 f. : il.

Inclui bibliografia

Área de concentração: Neurociências

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Medula espinhal – ferimentos e lesões. 2. Copaíba. 3. Agentes antiinflamatórios. I. Leal, Wallace Gomes, orientador. II. Título.

CDD – 22 ed. 362.1

THAYSSA FERREIRA DOS SANTOS

**NEUROPROTEÇÃO, DIMINUIÇÃO DO INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS
E MICROGLIOSE APÓS TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE
COPAIFERA RETICULATA DUCKE EM UM MODELO EXPERIMENTAL
DE LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito obrigatório para obtenção do título de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal - Orientador
Instituto de Ciências Biológicas – ICB/ UFPA

Prof.^a Dr^a Vânia Castro Corrêa - Examinadora
Instituto de Ciências Biológicas – ICB/ UFPA

Prof.^a Dra Lucidia Fonseca Santiago - Examinadora
Instituto de Ciências Biológicas – ICB/ UFPA

Prof. Dr. Enio Mauricio Nery dos Santos - Suplente
Instituto de Ciências Biológicas – ICB/ UFPA

BELÉM – PARÁ
2017

Agradeço a Deus por ter me dado oportunidade, força e perseverança em delimitar e alcançar meus objetivos sempre com muito êxito, humildade e cabeça erguida.

A minha mãe Suely Maria Ferreira dos Santos e meu irmão Áthila Santos Souza pelo simples fato de estar ao meu lado e dá o apoio moral e sempre me fazer lembrar de onde vim e por que quero chegar 'lá'.

Á minha tia Maria Correa de Oliveira, que em nossa família e a única que seguiu a carreira acadêmica e me deu forças para não fraquejar nas barreiras e sempre seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Ieda Lousada Guedes que independente dos pontos de vistas divergentes me deu auxilio no ingresso do mestrado. E que mesmo a distância a considero uma pessoa forte, guerreira e batalhadora.

Ao Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, que com sua humildade acreditou em mim e me deu a oportunidade em seu laboratório de desenvolver um projeto e conseguir alcançar o meu sonho. A sua visão científica de tudo é extremamente atraente e faz com que seus orientando nunca perca o brilho nos olhos em desenvolver um projeto novo, surpreendente e inovador. Agradeço a paciência e oportunidade de me deixar fazer parte de sua pequena família de laboratório, que esse simples gesto jamais esquecerei. Muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório Michelle, Amanda, Carol, Jona Beto, Rodrigo, Iury, Cahy, Lucas, Valéria, Nelson... Onde em algum momento sempre teve uma ajuda dada, uma mão estendida e até mesmo uma dica de como se pode fazer da melhor forma. Obrigada!

Ao Prof. Msc. Ijair Santos, pelo apoio técnico em todos os momentos na qual precisei ele estava presente para suprir a dúvida ou necessidade da pesquisa, dentro dos seus limites. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Anderson Herculano, que na condição de coordenador do programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, conduziu com responsabilidade e atenção as normas regimentais previstas neste programa.

“Que sejamos capazes de enxergar sempre algo BOM, em cada momento RUIM que nos for apresentado”.

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL (LAME).....	14
1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS DA MEDULA ESPINHAL.....	16
1.3 HISTOLOGIA.....	20
1.3.1 Astrocitos.....	21
1.3.2 Oligodendrocitos.....	22
1.3.3 microglia.....	23
1.4 FISIOPATOLOGIA DA LAME.....	24
1.4.1 Lesão primaria e lesão secundaria.....	24
1.4.2 Lesão vascular.....	26
1.4.3 Excitotoxicidade.....	28
1.4.4 Peroxidação lipídica	29
1.4.5 Morte celular.....	30
1.4.6 Neuroinflamação.....	32
1.4.6.1 Neutrófilo.....	33
1.4.6.2 Microglia	33
1.4.6.3 Astrócito	35
1.5 TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	35
1.5.1 Extratos de plantas da Amazônia como agentes antiinflamatórios e neuroprotetores	37
1.5.1.1 Óleo de resina de copaíba	39
1.6 HIPOTESE EXPERIMENTAL	41
1.7 OBJETIVOS.....	42
1.7.1. Objetivo Geral.....	42
1.7.2 Objetivos Específicos.....	42
2. MATERIAL E METODOS.....	43

2.1. ANIMAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	43
2.2. OBTENÇÃO DO ÓLEO DE RESINA DE COPAIBA	45
2.3. INDUÇÃO A LAME E O TRATAMENTO.....	45
2.4. PERFUSÃO E CRIOPROTEÇÃO.....	47
2.5. ANÁLISE HISTOPATÓLOGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	47
2.5.1. Análise histopatológica geral.....	48
2.5.2. Imunohistoquímica.....	48
2.6. ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA.....	49
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
3. RESULTADOS.....	51
3.1. HEMISECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS ADULTOS INDUZIU A DEFICITS MOTORES CARACTERISCA DE HEMIPLEGIA.....	51
3.2. TRATAMENTO COM ÓLEO DE RESINA DE COPAIBA DIMINUI A AREA DE LESÃO	51
3.3. TRATAMENTO COM O ÓLEO DE COPAIBA REDUZIU O NUMERO DE NEUTROFILO NA AREA DA LESÃO.....	53
3.4. TRATAMENTO COM O ÓLEO DE COPAIBA REDUZIU O NUMERO DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL NA AREA DA LESÃO.....	56
4. DISCUSSÃO	60
4.1. O MODELO EXPERIMENTAL E A INDUÇÃO DE HEMIPLEGIA EM RATOS ADULTOS.....	60
4.2. O TRATAMENTO COM ÓLEO DE RESINA DE COPAIBA PRESERVOU O PARÊNQUIMA MEDULAR APÓS LAME.....	61
4.3. O TRATAMENTO COM O ÓLEO DE RESINA DE COPAIBA DIMINUI O RECRUTAMENTO DE NEUTROFILOS APÓS LAME.....	62
4.4. O TRATAMENTO COM O ÓLEO DE RESINA DE COPAIBA DIMINUI A ATIVAÇÃO DE CELULAS MICROGLIAIS APÓS LAME.....	64
5. CONCLUSÃO.....	65
6. REFERÊNCIAS.....	66

RESUMO

A fisiopatologia da lesão aguda da medula espinhal (LAME) envolve processos complexos como alterações vasculares, excitotoxicidade, peroxidação lipídica e neuroinflamação, causada principalmente pelas células microgлияis. Apesar do conhecimento da fisiopatologia, ainda não existe um tratamento eficaz para a LAME. Diante disso, existe uma mobilização da comunidade científica em encontrar uma substância capaz de promover neuroproteção e, conseqüentemente diminuir as sequelas da LAME abaixo do nível da lesão. Nesse contexto, o Óleo de resina de Copaíba, pode representar uma boa estratégia terapêutica. Neste estudo, investigamos os efeitos antiinflamatórios e neuroprotetores do óleo de resina de copaíba após hemiseção da medula espinhal de ratos. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais e controle de 24h e 7 dias de sobrevida. Foram utilizadas técnicas imunohistoquímicas usando os anticorpos anti-MBS-1(marcador de neutrófilos), anti-Iba -1(marcador de micrógлияs), assim como coloração com Violeta de Cresila. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas. O óleo de resina de copaíba se mostrou eficaz em diminuir o recrutamento de células inflamatórias para a área de lesão medular e promoveu melhor preservação da área tecidual em comparação com o grupo controle. Assim como no menor recrutamento de neutrófilos em ratos tratados em comparação com o grupo controle (Grupo Tratado : $8,33 \pm 0,66$ (N=3); Grupo Controle: $12,27 \pm 0,28$ (N=3)). O óleo de resina de copaíba também promoveu a redução do número de micrógлияs na área de lesão medular em diferentes tempos (Grupo Tratado no 1º dia: $8,59 \pm 1,72$ (N=3), Grupo Controle no 1º dia : $35,07 \pm 9,87$ (N=3). Grupo Tratado no 7º dia: $19,59 \pm 9,48$ (N=3), Grupo Controle no 7º dia : $65,77 \pm 6,19$ (N=3)). Esses resultados sugerem o efeito antiinflamatório e neuroprotetor do óleo de resina de copaíba após a LAME, revelando uma estratégia promissora para o paciente pós LAME.

Palavras-chave: Lesão da Medula Espinhal, Óleo de Copaíba, Antiinflamatório,

ABSTRACT

Most central nervous system (CNS) diseases are incurable and extremely debilitating, acute spinal cord injury (LAME) causes permanent loss of neurological function below the level of the injury, causing severe physical consequences to patients. Trauma, falls and gunshot or joint weapon damage together make up almost 100% of the main mechanisms that cause LAME, as well as contribute to the high costs of the public health system. The pathophysiology of LAME involves complex processes such as vascular changes, excitotoxicity, lipid peroxidation and neuroinflammation, generated mainly by microglial cells. Despite the knowledge of pathophysiology, there is still no effective treatment for LAME. Thus, there is a mobilization of the scientific community to find a substance capable of promoting neuroprotection and, consequently, to reduce the sequelae of LAME below the level of the lesion. In this context, the Copaíba Resin Oil may represent a good therapeutic strategy. In this study, we investigated the antiinflammatory and neuroprotective effects of copaiba resin oil after hemisection of the spinal cord of rats. The animals were divided into experimental and control groups. Immunohistochemical techniques using anti-MBS-1 (neutrophil marker), anti-Iba-1 (microglial marker) antibodies, as well as staining with Cresila Violet were used. Qualitative and quantitative analyzes were performed. Copaiba resin oil proved effective in decreasing the recruitment of inflammatory cells to the area of spinal cord injury and promoted better preservation of the tissue area compared to the control group. As in the lowest neutrophil recruitment in treated rats compared to the control group (Treated group: 8.33 ± 0.66 (N = 3); Control group: 12.27 ± 0.28 (N = 3)) . Copaíba resin oil also promoted a reduction in the number of microglia in the area of spinal cord injury at different times (Treated group on day 1: 8.59 ± 1.72 (N = 3), Control Group on day 1: 35, (N = 3), Control Group on the 7th day: 65.77 ± 6.19 (N = 3)). These results suggest the antiinflammatory and neuroprotective effect of copaiba resin oil after LAME, revealing a promising strategy for the patient after LAME.

Keywords: Acute Spinal cord Injury, Copaiba Oil, Anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura da medula espinhal (ME) em relação à coluna vertebral no corpo humano.....	18
FIGURA 2 – Ilustração esquemática de corte transversal da medula espinhal em humanos.....	19
FIGURA 3 – Corte transversal histológico da ME mostrando o “H” medular.....	20
FIGURA 4 – Ilustração das células gliais.....	24
FIGURA 5 - Mecanismos envolvidos na lesão secundária da LAME.....	26
FIGURA 6 - Ilustração Esquemática irrigação medular.....	27
FIGURA 7 – Tipos de morte celular.....	32
FIGURA 8 - Ilustração Esquemática da Hemisseção Medular.....	46
FIGURA 9 - Análise da área de lesão necrótica evidenciada pela coloração violeta de cresila	51
FIGURA 10 – Análise do número de neutrófilos migrantes para a área da lesão.....	52
FIGURA 11 - Análise quantitativa do número de neutrófilos migrantes para o local da lesão após LAME.....	53
FIGURA 12 - Análise do número de micróglia ativadas próximo a área da lesão.....	54
FIGURA 13 - Análise quantitativa do número de micróglia após LAME.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

UFPA – Universidade Federal do Pará

SNC – Sistema Nervoso Central

ME – Medula Espinhal

AMPA – α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropiónico

β APP – proteína precursora de beta amiloide

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

IL-1 β - interleucina 1 beta

IL-6 - interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

INF- γ - interferon gama

TGF β – Fator Beta de Crescimento Transformador

MAPK – Proteína Quinase Ativadas por Mitógenos

COX 2 – Ciclo Oxigenase 2

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuários

AT-LAME – Animal tratado – Lesão da medula espinhal

AC-LAME - Animal controle – Lesão da medula espinhal

AVE - Acidente Vascular Encefálico

PBS – solução salina

ATP – Adenosina tri-fosfato

LAME – Lesão da Medula Espinhal

H₂O₂ – Peroxido de Hidrogênio

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL

As doenças do sistema nervoso central (SNC) são incuráveis e extremamente debilitantes. Quando não levam a óbito causam perda neurológica, o que resulta em diminuição da qualidade de vida dos pacientes. Estas doenças podem ser classificadas em agudas (acidente vascular encefálico - AVE, trauma crânioencefálico e da medula espinhal) e crônicas (doenças de Parkinson, Huntington, Alzheimer, Esclerose Múltipla, Esclerose Lateral Amiotrófica, Epilepsia). No primeiro grupo, a perda neuronal ocorre rapidamente (horas e dias) (SONNTAG e VOLMER, 2004; DRYDEN et al., 2004), enquanto que no segundo a perda de neurônios é progressiva, podendo durar décadas (MARTIN, 2003).

A principal característica da lesão aguda da medula espinhal (LAME) é a incapacidade física que ela produz abaixo do nível da lesão, causando uma perda de sensações e movimentos funcionais (FECHIO Et al., 2009).

O diagnóstico é simples e claro, porém os danos psicológicos, físicos e sociais causados ao paciente são inúmeros e de diversas formas. Além do alto custo de um tratamento demorado e continuado para os cofres públicos, sem resultados satisfatórios (SANTOS et al., 2012).

Quando falamos sobre a incidência da LAME, se obtém números imensuráveis e alarmantes. Segundo o DataSUS (2015), no Brasil e suas capitais temos um total de 3.170.050,06 casos, colocando em uma ordem crescente ficaria da seguinte forma: PE-Recife em primeiro lugar com 728.750,56 casos, MG-Belo Horizonte com 465.400,21

casos e em terceiro BA-Salvador com 265.233,22 casos. Quando se leva para uma escala global obtemos números ainda maiores. A estimativa é de 23 novos casos por milhão, o que gira em torno de 179.312 novos casos por ano no mundo (RIDER, 2014). Estima-se que ocorram a cada ano no país, mais de 10 mil novos casos de lesão medular, sendo o trauma a causa predominante, o que representa uma incidência muito elevada quando comparada com outros países. Trata-se definitivamente de uma patologia de alto impacto sócio-econômico no nosso país, sendo que o custo para a sociedade por paciente permanece alto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

As causas da LAME são variáveis, mas que também tem uma relação estreita com traumas direto como acidentes no transito (57%), lesão por arma de fogo ou arma branca (24%), lesão causada por quedas (21%) e com atividades recreativas como mergulhos (9%). O local de lesão mais comum é nos seguimentos cervical e torácico totalizando 84% centralizado nessas duas regiões, sendo a faixa etária mais atingida estando entre 10 e 29 anos, sendo o sexo masculino mais atingido com 74% da estatística (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). De acordo com a gravidade e nível da lesão a LAME pode ser de dois tipos, os paraplégico (40%) que são descritos como aqueles pacientes que mobilizam voluntariamente 2 de seus 4 membros/ segmentos ou tetraplégico (60%), paciente que move voluntariamente apenas a cabeça (FERREIRA e GUERRA, 2014).

Após o trauma raquimedular, o paciente deverá ser submetido a tratamento de suporte clínico, em terapia intensiva sendo monitorizado todos os seus sinais vitais, mas é um tratamento paliativo. Atualmente, não há nenhum tratamento farmacológico eficaz capaz de conter a lesão inflamatória ocasionado pelo trauma. Quanto aos custos

financeiros, na década de 90, os cuidados médicos, cirúrgicos e de reabilitação dos pacientes paraplégicos e tetraplégicos norte-americanos foram estimados em cerca de 4 bilhões de dólares por ano (KWON et al,2004).

1.2 DESCRIÇÃO ANATÔMICA DA MEDULA ESPINHAL

A medula espinhal (ME) é a porção do sistema nervoso central (SNC) na qual se prolonga caudalmente protegida por vértebras, de onde a cada nível medular se prolonga nervos (Cervicais, torácico e lombar) para conduzir informações sensoriais e motoras. Sua função é transportar as informações do encéfalo para as estruturas corpóreas como: Pele, músculos, articulações e órgãos internos. Assim como também recebe as informações desses tecidos e transporta-los cranialmente para o encéfalo para ser processada uma resposta (MACHADO, 2005).

O comprimento da ME é de aproximadamente 45 cm em um homem adulto, sendo menor no sexo feminino. Seu limite superior é o forame magno do osso occipital e seu limite caudal é na 2º vértebra lombar (L2). O cone medular é formado a partir do afunilamento em L2, onde a ME e o seu prolongamento se dá pelo filamento da meninge terminal (DEFINO, 1999; MARTIN, 2003) (figura 1).

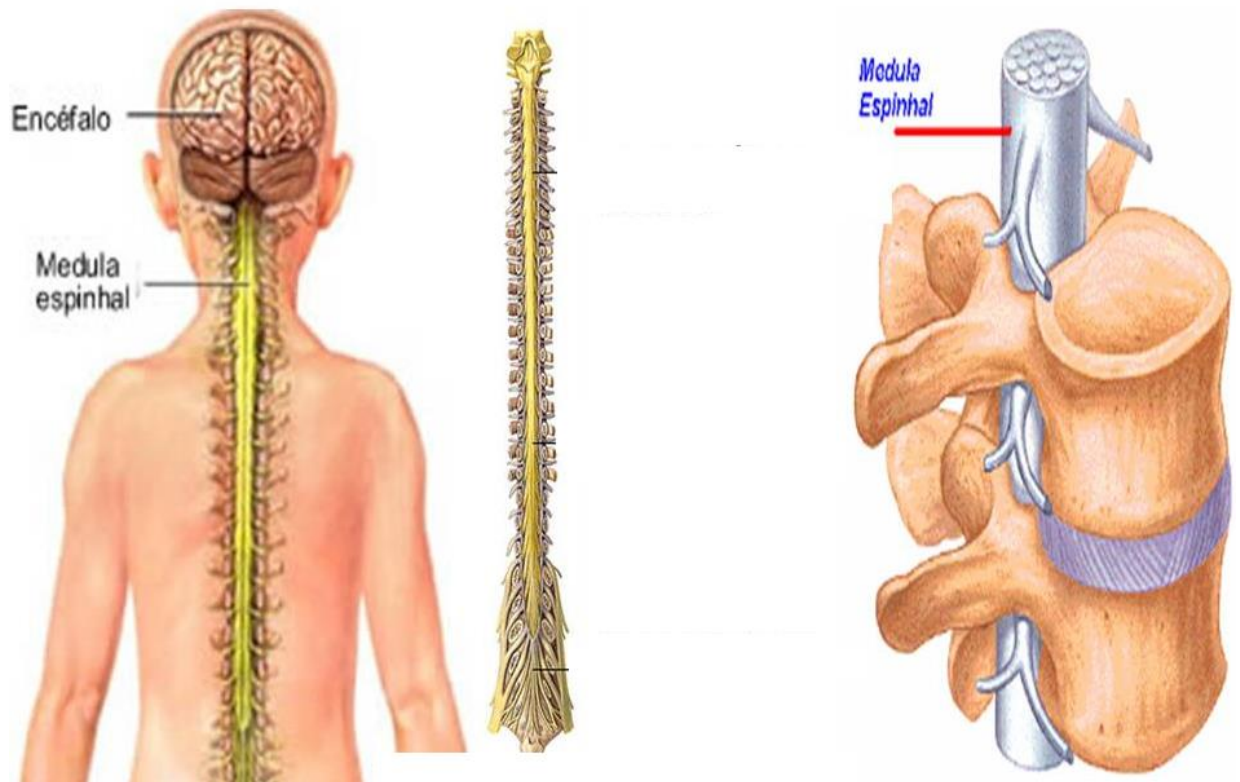


Figura 1: Vista posterior da ME no corpo humano e sua localização no canal vertebral.

Fonte: NETTER, 2000.

A substância cinzenta da ME só é possível ser visualizada em cortes transversais e possui o formato da letra 'H', onde por alguns autores é chamado de H medular (figura 2).

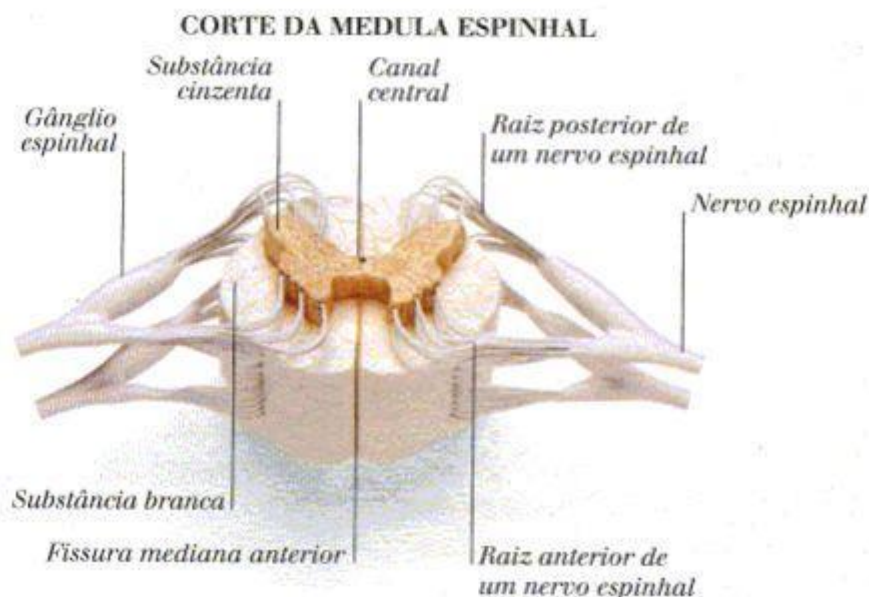


Figura 2: Vista posterior da ME no corpo humano e sua localização no canal vertebral.

Fonte: Moraes, 2009.

Na medula espinhal existem a substância branca e cinzenta. O “H” medular é formado pela substância cinzenta, onde se subdivide nos cornos ventral, dorsal e a zona intermediária. A parte circundante a zona do ‘H’ medular é composta pela substância branca, composta pelas células da glia e tratos espinhais, na qual transitam pela medula em sentido ascendente e descendente (MACHADO, 2005) (figura 3). Em estudos recentes foi relatada a presença de células com morfologia semelhante de neurônio na substância branca da medula espinhal. Estas células possuem padrão ramificado e se localizam em maior quantidade na substância branca ventral, mas especificamente nos funículos ventrais e dorsais, onde projetam dendritos para a substância cinzenta intermediária (DEFINO, 1999; MACHADO, 2005; NETTER, 2000).

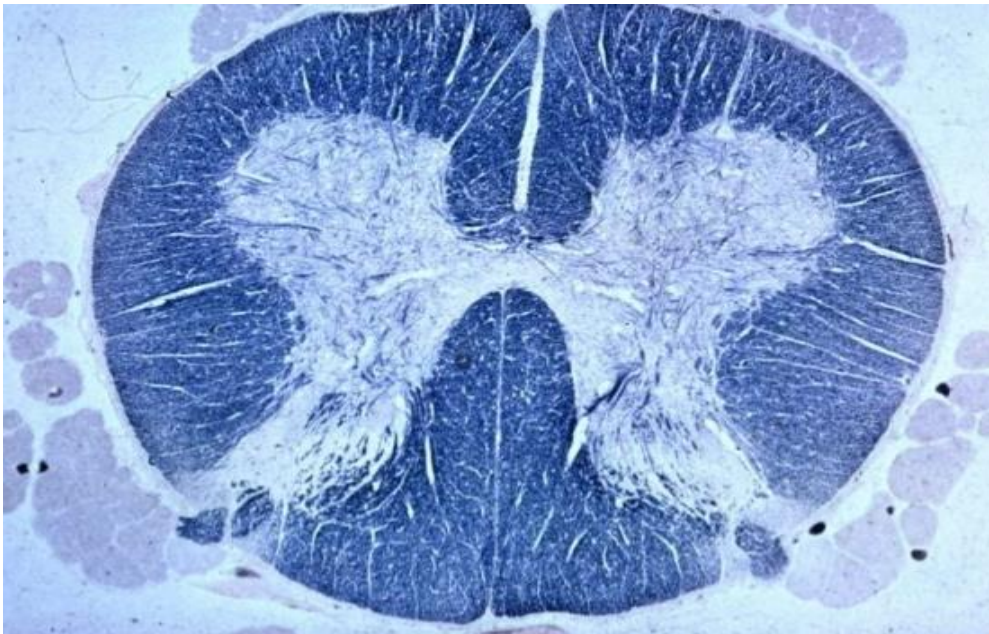


Figura 3: Em um corte transversal (em humanos) é possível visualizar os cornos ventrais (superior) e dorsais (inferior) da substância cinzenta além das colunas dorsais (inferior) e ventrais (superior) da substância branca.

Fonte: Adaptada de Junqueira e Carneiro, 2013

De acordo com Bear et al., 2008, as fibras da raiz dorsal fazem sinapse com as células do corno dorsal da medula e na via ventral ocorre a projeção dos axônios onde irão inervar as células alvo. Entre o corno posterior e o anterior, existe a zona intermediária onde ocorre a modulação das aferências motoras, aferências sensoriais e a informação do encéfalo pelos interneurônios. Pode-se dizer que existe uma análise das informações sensoriais pelos neurônios da substância cinzenta, ocorrendo assim uma ‘auto-opinião’ sobre a coordenação e reflexos dos movimentos.

1.3 DESCRIÇÃO HISTOLOGIA

As células do tecido nervoso se dividem em dois tipos, os neurônios e as células da glia (MACHADO, 2013).

Quando se fala em neurônios, sabe-se que são as principais células do sistema nervoso e responsáveis principalmente pelo processamento das informações, além de enviar e receber as informações aferentes e eferentes. A comunicação interneurônios é feita através de ligações químicas em sua membrana e sua divisão anatômica neuronal é feita em corpo, onde possui o núcleo, dendritos, onde recebe estímulos de outros neurônios e axônio, e por fim o axônio, onde é encaminhado os potenciais de ação saltatórios ou não (MACHADO, 2005).

As células gliais correspondem cerca de 90% de todas as células do SNC e são subdivididas em três principais tipos: os astrócitos, os oligodendrócitos e micróglia, (Figura 4). A função da glia se sintetiza em dá suporte estrutural aos neurônios e tem um papel decisivo no desenvolvimento do SNC e função neural (GOMES-LEAL, 2012).

Quando se leva em consideração apenas a Medula Espinhal (ME), há diferenças entre a substância branca da cinzenta. A substância branca da ME é composta por: Astrócitos, micróglia, oligodendrócitos, axônio mielinizados e não mielinizados além de vasos sanguíneos. Sabe-se que atualmente tem neurônios de substância branca ligados a parte ventral da ME, porém sua função ainda não é totalmente esclarecida. Já a substância cinzenta da ME possui as células gliais assim como os corpos neuronais (LENT, 2010).

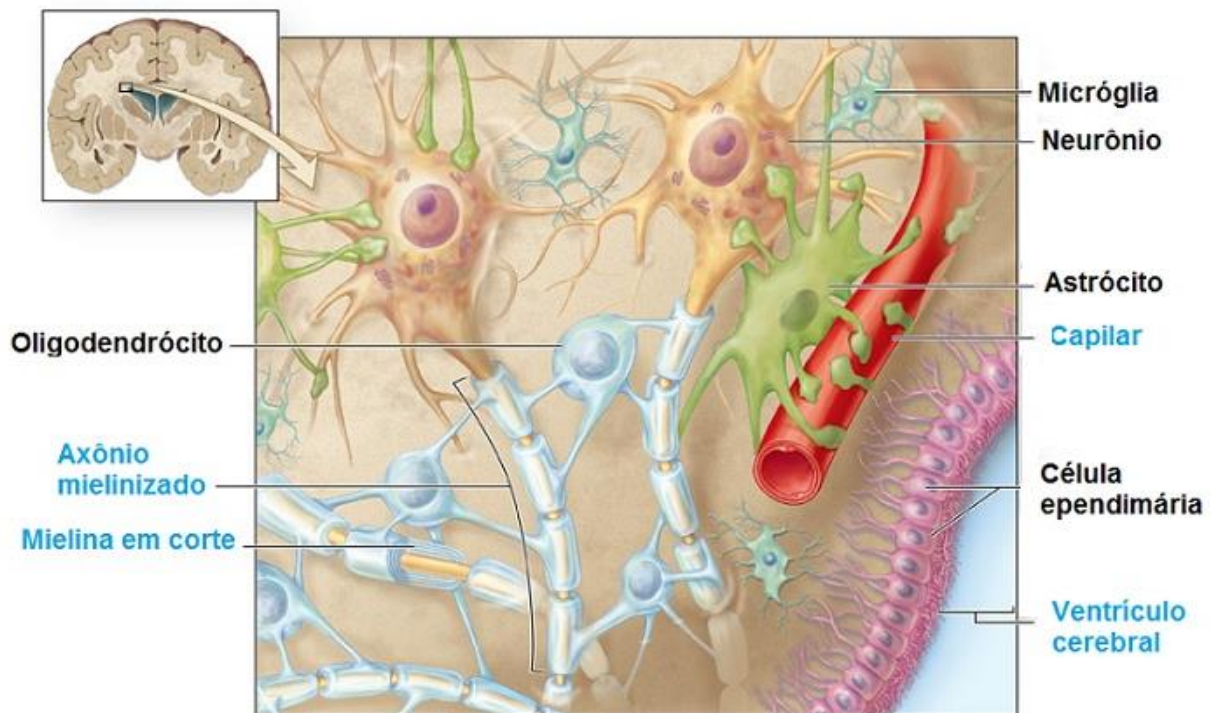


Figura 4: Em um desenho esquemático mostra o neurônio e a atuação e localização das principais células gliais: Astrócitos e seus pés vasculares levando nutrição ao neurônio; Os oligodendrócitos fazendo a produção da bainha de mielina dos neurônios; As micróglias fazendo o mapeamento ao local; As células endoteliais produzindo o liquor .

Fonte: RONSYN et al., 2008

1.3.1 Astrócitos

Os astrócitos são as principais células gliais e se diferenciam em dois tipos, o fibrilar e protoplasmático. O astrócito fibrilar é conhecido por seus longos prolongamentos citoplasmáticos com extensões longas, finas, lisas e muito ramificadas que passam entre as fibras nervosas e terminam em pés astrocitários, conhecido também

como pés vasculares, onde se ligam a vasos sanguíneos e axônio. Sua localização é principalmente na substância branca do encéfalo (SOFRONIEW e VINTERS, 2010).

Os Astrócitos protoplasmáticos são encontrados na substância cinzenta do encéfalo e assim como o astrócito fibroso, suas extensões passam entre os corpos de células nervosas. Porém, estas são mais curtas, grossas e ramificadas. A função dos astrócitos varia em homeostase do SNC, contribui para o processamento de informações, reagem a agentes nocivos no SNC, suporte estrutural, secreta neurotransmissores vitais, nutrição além de suporte metabólico (ZHU Et al., 2013).

1.3.2 Oligodendrocitos

Os oligodendrocitos são menores que os astrócitos, possuem poucos prolongamentos, mas também podem formar pés vasculares, além de possuir um núcleo menor e mais condensado. Sua principal função é a produção de mielina, na qual circunda os axônios. A morte dessas células é muito prejudicial, pois resulta tardiamente na morte dos axônios com a desmielinização e obstrução da condução nervosa do mesmo (ALLEN e BARRES, 2009; FULLER e GOODMAN, 2001, MACHADO, 2013).

Assim como os astrócitos os oligodendrocitos possuem dois tipos: Os satélites, na qual ficam adjacentes aos corpos neuronais e dendritos. E os fasciculares, encontrados adjacentes as fibras nervosas e esse último é responsável pela mielinização das fibras dos axônios (FULLER e GOODMAN, 2001).

1.3.3 Microglia

As células microgлияis, são células imunes na qual são ativadas e recrutadas rapidamente em locais com lesão, inflamação e neurodegeneração. As células microgлияis são as células imunes, também conhecidas como macrófagos residentes do SNC (RANSOHOFF; PERRY, 2009). São rapidamente ativadas e recrutadas aos locais de lesão, de neurodegeneração e inflamação. Quando há rompimento de axônios, as células da micróglia, antes em repouso, tornam-se ativadas, proliferam-se e envolvem motoneurônios com seus prolongamentos citoplasmáticos, resultando em deslocamento dos terminais nervosos dos seus respectivos corpos neuronais. Após esse envolvimento, há remoção dos neurônios mortos ou que estão morrendo. A remoção acontece através da fagocitose realizada pela própria célula microglial. A figura 5 demonstra resumidamente o papel das células microgлияis durante processos inflamatórios no SNC.

Essas células podem ser estimuladas por uma variedade de citocinas, neurotransmissores, moduladores e neurotoxinas, assim como moléculas de matriz extracelular e proteases presentes nas áreas do SNC que estejam sofrendo algum tipo de dano. Elas funcionam como células apresentadoras de antígeno e interagem com os linfócitos T que penetram no SNC (MATUTE, 2009).

É conhecida também como macrófagos residentes do SNC. Sua estimulação é feita de diversas formas como, neurotransmissores, neurotoxinas, citosinas, moduladores, moléculas extracelular e enzimas na presentes em áreas de lesão no SNC (GOMES-LEAL, 2012).

Existem dois tipos de contexto, opiniões e pontos de vistas diferentes para os efeitos da micróglia. Alguns autores opinam que quanto mais micróglia ativadas,

melhor é o reparo da lesão contribuindo ainda para uma melhora da função, pós lesão medular. Porém com outros estudos mostram que quanto mais micróglia ativadas, maior é a produção de radicais livre, de O₂, neurotrofinas, quimiocinas, citocinas e proteínas de adesão no local da lesão fazendo com que o raio da lesão aumente e assim causando a morte de mais neurônios, axônio, bainha de mielina, oligodendrócitos/ Células de Schwann (SOUZA-RODRIGUES, 2008; GOMES-LEAL, 2012).

1.4 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL

Os causadores desse tipo de lesão variam entre um efeito “chicote”, onde a coluna vertebral é submetida a uma força brusca ou mudança de direção abruptamente causando uma hiperflexão e logo em seguida uma hiperextensão, não necessariamente nessa ordem. Deslocamento de cargas em sentidos axiais assim como torções e rotações também relacionados a queda do indivíduo da mesma altura ou não são consideradas um fator de risco. E por último mas não menos importante os casos de violência que atualmente estão muito presentes na sociedade de modo global, causando traumatismos graves totais ou parciais na medula espinhal, por arma de fogo ou branca (QUINTANA-GONZALES et al., 2011; JUNIOR et al, 2011; BRITO, 2011).

1.4.1 Lesão Primária e Lesão Secundária

A LAME primária acontece no primeiro dano do tecido logo após o momento do trauma, onde há a transferência de ações de força ou objetos pontiagudos para a medula espinhal, ocorrendo o rompimento das fibras axonais, logicamente ocorre a lesão das células nervosas no local e conseqüentemente a rotura dos vasos sanguíneos causando a lesão primária da medula espinhal (Figura 5) (DEFINO, 1999; BUNGE et al., 1993).

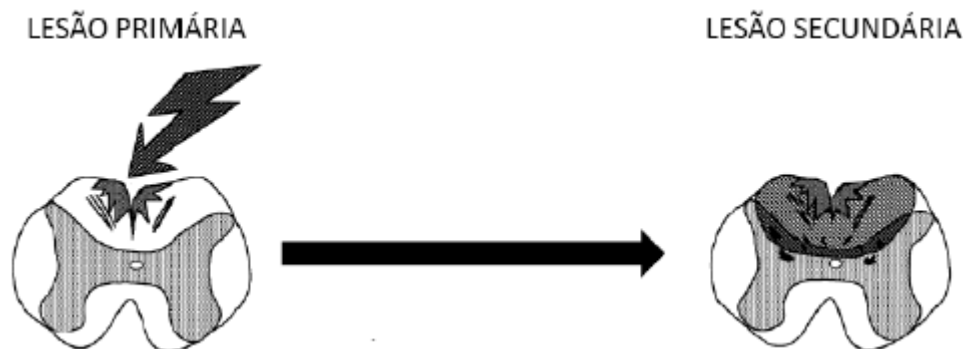


Figura 5: Desenho esquemático da lesão primária e o aumento da lesão após o período de 8h com alteração da área da lesão.

Fonte: Modificado de Taoka e Okajima, 1998

A LAME secundária é entendida como os acontecimentos seguintes após a lesão primária, onde teoricamente são benéficos, porém na prática seus pontos de vista diferem. No estágio de até aproximadamente 8h após o trauma, ocorre os seguintes acontecimentos: hemorragia e necrose da substância cinzenta, seguida de edema e petéquias hemorrágicas aglutinadas, resultando em uma necrose central. Após o período de 4h a 8h seguintes se estende para a substância branca, trazendo como consequência a redução do fluxo sanguíneo, onde essa redução pode provocar a morte das células e axônios que não foram inicialmente lesados (DEFINO, 1999).

E com a morte de células e axônios que na lesão primária não foram lesionados ocorre a exacerbação dos danos causados pela lesão principal, promovendo uma maior área afetada, menores áreas funcionais e uma pior na recuperação neurológica dos pacientes (Figura 5) (SOUZA-RODRIGUES, 2008; FEHLING, 2010; GOMES-LEAL, 2012; HAYAKAWA Et al., 2014).

1.4.2 Lesão Vascular

No local da lesão ocorre uma redução geral do fluxo sanguíneo, onde a seguir as células inflamatórias migram para o local da lesão, acompanhadas de proliferação de células da glia. A redução do fluxo sanguíneo para o segmento lesado da medula espinhal pode ser ocasionado por diversos fatores, como: alteração do canal vertebral, hemorragia, edema ou redução da pressão sistêmica, o que conduzem à lesão secundária (KWON et al., 2004).

O trauma primário rompe além de fibras nervosas os vasos que estão irradiando para a medula (Figura 6) e com o rompimento, ocorre conseqüentemente o extravasamento do sangue para o tecido nervoso causando petéquias hemorrágicas com trombose intravascular. A retenção e migração de fluidos é quase que imediato, após a lesão, provocando hipoperfusão intravascular e de acordo com a gravidade da lesão pode-se ter uma idéia de dimensões vasculares atingidas e seus agravantes (KWON et al., 2010). O local mais atingido pelo rompimento dos vasos sanguíneos é a substância cinzenta, por necessitar de uma demanda metabólica alta e principalmente por conter vários corpos neuronais e poucos axônios – quando comparado com a substância branca – e por possuir mecanismos regulatórios próprios sobre a hemodinâmica vascular, e com a chegada do sangue no local se perde essas funções importantes, e perdendo a auto regulação, a medula espinhal fica mas sujeita a variação de pressão (KWON et al., 2004).

Essa redução do fluxo sanguíneo pode provocar a morte das células neuronais e axônios que não foram inicialmente lesados. A separação dos axônios é um processo gradual, que ocorre no local da lesão, após alguns dias do traumatismo, sendo o

resultado de uma série de eventos patológicos, relacionados à lesão da membrana celular e suas proteínas, e não da separação física imediata do axônio (KWON et al., 2004).

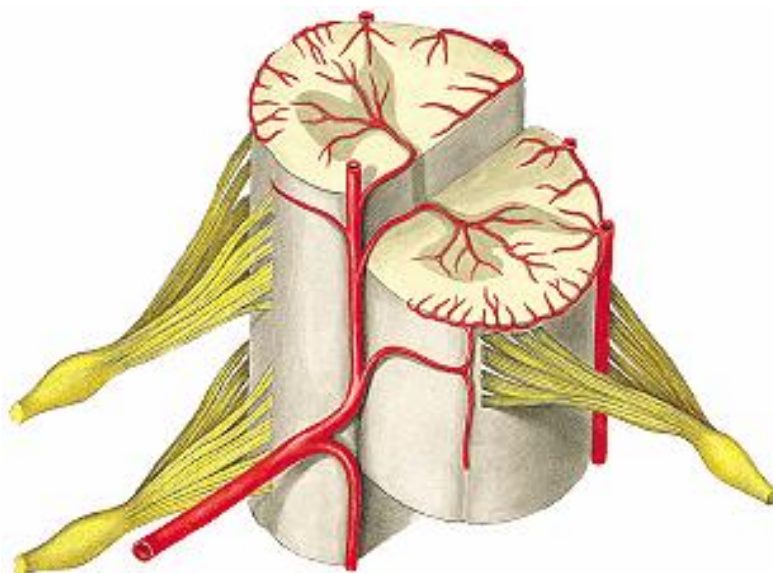


Figura 6: Desenho esquemático da medula espinhal, enfatizando a irrigação sanguínea.

Fonte: Netter, 2000

A lesão ocasiona a interrupção da condução do estímulo nervoso imediatamente após o trauma, ocasionando uma despolarização imediata da membrana do axônio, associado com a falha de sua repolarização, fazendo com que ocorra a perda de potássio pelo axônio. A isquemia do sistema nervoso central é caracterizada por um grande influxo de cálcio para as células, e reações metabólicas, como falha das mitocôndrias e ativação das fosfolipases, proteases e adenosina trifosfatase ocorrem, e o resultado é a perda de energia e colapso da membrana celular, que também é mediado pela produção de radicais livres e ativação das fosfolipases e lipases. A impossibilidade da célula em converter completamente o oxigênio para dióxido de carbono e água, promove a

formação de radicais livres, que resulta em peroxidação lipídica e subsequente falha da membrana celular (KWON et al., 2010).

1.4.3 Excitotoxicidade

Posteriormente a lesão de uma célula nervosa, esse tecido fica sujeito a mudanças eletrolíticas significativas, como: Aumento de sódio intracelular, aumento de potássio extracelular e aumento de cálcio intracelular, sendo esse último atingindo níveis demasiadamente altos e se tornando tóxico a essa célula. Essa toxicidade causa a perda da função normal da célula na fase chamada de choque medular, que perdura por um período de 24h (DANBOLT, 2001).

Os aminoácidos excitatórios, em particular o glutamato, também atingem altas concentrações, tornando-se tóxicos para o SNC. A excitação causada pelo glutamato na membrana pré-sináptica pode ocorrer de duas formas; Através de uma ligação covalente, na qual o glutamato não se desprende dos receptores glutamatergicos (NMDA, AMPA, CAINATO), gerando assim um potencial de ação intermitente levando a célula ao estresse máximo ou pode ser pela presença continua do glutamato na fenda sináptica gerando assim também um potencial de ação de maneira anormal para esse neurônio. De qualquer maneira o efeito é o mesmo, uma falcia bioenergética com desequilíbrio iônico (GREENWOOD e CONNOLLY, 2007).

Sendo o glutamato o neurotransmissor mais abundante no nosso SNC, a sua estimulação excessiva provoca um efeito deletério nas células nervosas e comprometem a recaptura dele na fenda sináptica. A alta concentração do glutamato age nos receptores metabotrópicos como também nos ionotrópicos. A ativação do receptor metabotrópico,

causa conseqüentemente a ativação da proteína G, na qual agem como segundo mensageiro intracelular e medeiam diversas funções celulares. Já o receptor ionotrópico, na qual é responsável pelo transporte de íons de sódio e cálcio, permitem a entrada em abundância desses íons do meio extracelular para o meio intracelular, através do gradiente de concentração, além de liberar os cálcios estocados nos compartimentos citoplasmáticos para o meio intracelular (DOYLE et al., 2008).

O cálcio com altas concentrações no citosol e mitocôndria ativam processos em momento importunos e invariável para o metabolismo celular. Dentre os processos ativados indevidamente incluem a ativação de enzimas líticas, geração de radicais livres e desregulação da fosforilação oxidativa da mitocôndria, e todos esses distúrbios geram a morte celular por apoptose. Já as altas taxas de concentração de sódio, no citosol causam o aumento da lesão nos axônios e nos componentes gliais da substância branca através da intensa despolarização e pela perda da adenosina tri-fosfato (ATP). A perda do ATP causa a deficiência da celular de mover esse sódio do meio intracelular para o meio extracelular, levando o acúmulo tóxico desse íons no axônio da célula nervosa e conseqüentemente levando a morte celular por mecanismo excitotóxico (GREENWOOD e CONNOLLY, 2007).

1.4.4 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é causada por um radical livre altamente reativo a lipídios, proteínas e DNA. As espécies reativas do oxigênio ‘sequestram’ os ácidos graxos polisaturados da membrana celular ocasionando uma reação em cadeia como: a perda da seletividade da membrana, oxidação lipídios insaturados, rompimentos das organelas, formação de produtos citotóxicos, mutações no DNA, compromete a matriz

extracelular levando colapso metabólico e conseqüentemente a morte da célula, podendo esta ser necrótica ou apoptótica (SUN, 1990).

Os efeitos da peroxidação lipídica é considerada um mecanismo de lesão secundária para a LAME, sendo que sua inibição ou diminuição pode ser uma das linhas de pesquisas importantes para a melhora dos pacientes com lesões medulares (BROUNS & DE DEYN, 2009).

1.4.5 Morte Celular

A morte celular pode ser descrita de duas formas, como necrose celular e a apoptose celular. Porém as vias na qual os dois meios de morte celular podem ocorrer são diferentes, como por exemplo; na necrose celular ela é ocasionada por fatores externos na qual a célula se encontra em um estado de privação de nutrientes vitais (água, oxigênio e glicose), onde conseqüentemente é diagnosticada uma falha energética e perda de ATP, além de edema celular, rompimentos das organelas, lise da membrana e secreção do conteúdo celular aumentando a reação inflamatória. Essas características são causadas por ligantes extracelulares em receptores de membrana, na qual ativam uma proteína celular e essa sinaliza a ativação da caspase-8, em que pode desencadear duas seguintes vias, porém independente da via ativada o resultado é o mesmo, a morte celular (KWON et al., 2004; DOYLE et al., 2008).

Por outra via existe a apoptose celular, ocasionada pela falha no metabolismo interno e necessita de ATP juntamente com a síntese de proteínas para iniciar e terminar o processo apoptótico. Seu acontecimento consiste na falta de oxigênio que afeta a membrana mitocondrial, onde o resultado é a translocação de inibidores das proteínas

anti-apoptóticas (Citocromo-c). Já no citosol o citocromo-c reagem com algumas moléculas pro-apoptóticas e ocorre a ativação da caspase-9, que por sua vez ativa a caspase-3 e esta por sua vez ativa o DNA-nuclear levando a célula ao enrugamento, fragmentação das organelas em corpos apoptóticos, onde posteriormente serão fagocitadas por macrófagos, como se pode visualizar na figura 7 (SUGAWARA et al., 2004; DOYLE et al., 2008).

Embora os dois modos de morte celular ocorram por vias diferentes, os mecanismos que as desencadeiam são os mesmos, como: isquemia, estresse oxidativo e excitotoxicidade. Porém quanto maior a extensão da lesão, maior é o número de células que morrem por necrose. Evitar a morte celular por necrose, é praticamente impossível, mas a morte das células que circundam a lesão primária e sujeitas aos eventos secundários e tardiamente apoptose celular, podem ser uma boa estratégia de pesquisa para a LAME (BROUNS e DEYN, 2009).

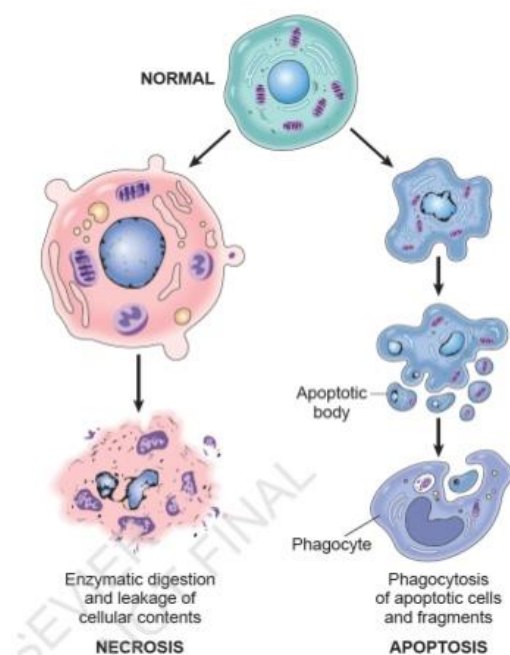


Figura 7: Os dois tipos de morte celular (necrose e apoptose).

1.4.6 Neuroinflamação

A reação inflamatória e imunológica da LAME difere das reações dos outros tecidos. Ocorrendo a lesão no tecido medular, rapidamente ele é infiltrado por neutrófilos sanguíneos, onde com sua presença começa a ser secretado enzimas líticas e citocinas (SOUZA-RODRIGUES et al., 2008). A infiltração desses neutrófilos e suas secreções, prejudicam as células do local circundante a lesão assim como recrutam outras células inflamatórias para o local da lesão, como os monócitos e micróglia, onde sua principal função é fagocitar aquele tecido que foi lesionado, e com sua fagocitose também produz citocinas na qual medeiam a resposta inflamatória do sistema imune adaptativo como: interleucina-1 (IL-1), Fator alfa de necrose tumoral (TNF- Alfa), interleucina-10 (IL-10) e o fator beta de crescimento transformador (TGF-Beta) além é claro das quimiocinas, contribuindo para o aumento da extensão da lesão e ativação de células imunes (BROUNS & DE DEYN, 2009; ZHU et al., 2013).

O sistema imune pode ser visto de duas formas, o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. O sistema imune inato, falando diretamente para a medula espinhal, tem as participações de células como, neutrófilos, monócitos e células dendrites. O sistema imune adaptativo depende do sistema imune inato para ser ativado, pois sua ativação e recrutamento é feita com a configuração de antígenos e mediadores inflamatórios (Citocinas e quimiocinas) apresentados pelo imune nato (JADIDI-NIARAGH e MIRSHAFIEY, 2010).

1.4.6.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas e logo migram para área da lesão, onde o seu pico máximo é em torno de 24h após a lesão. Eles são ativados e com seu afeito fagocitário causam uma toxicidade neuronal e glial, pois produzem enzimas neurotóxicas, como por exemplo as enzimas líticas (elastases) que promovem ciclooxigenase e forma radicais livres, além de elevar a permeabilidade vascular, o influxo dos leucócitos e degradar a matriz extracelular (DOYLE et al., 2008). Em resumo, o papel do neutrófilo na lesão se dá através de síntese e lançamento de vários mediadores inflamatórios capazes de causar danos irreversíveis as células endoteliais além de sinalizar para que mais neutrófilos migrem para a área da lesão aumentando assim o raio da lesão inicial (BROUNS & DE DEYN, 2009; AKOPOV et al., 1996).

1.4.6.2 Micróglia

As células micrógliais são as células imunes, também conhecidas como macrófagos residentes do SNC (RANSOHOFF; PERRY, 2009). São rapidamente ativadas e recrutadas aos locais de lesão, de neurodegeneração e inflamação. Quando há rompimento de axônios, as células da micróglia, antes em repouso, tornam-se ativadas, proliferam-se e envolvem motoneurônios com seus prolongamentos citoplasmáticos, resultando em deslocamento dos terminais nervosos dos seus respectivos corpos neuronais. Após esse envolvimento, há remoção dos neurônios mortos ou que estão morrendo. A remoção acontece através da fagocitose realizada pela própria célula microglial.

Essas células podem ser estimuladas por uma variedade de citocinas, neurotransmissores, moduladores e neurotoxinas, assim como moléculas de matriz extracelular e proteases presentes nas áreas do SNC que estejam sofrendo algum tipo de dano. Elas funcionam como células apresentadoras de antígeno e interagem com os linfócitos T que penetram no SNC (MATUTE, 2009).

Os efeitos e consequências da ativação microglial nas lesões neuronais são controversos. Alguns estudos demonstram que o aumento no número de macrófagos/células microgliais ativadas pode contribuir para a melhora da lesão nervosa, contribuindo, inclusive, para a melhora funcional após lesão medular (SHECHTER et al, 2009).

Assim como os neutrófilos, a micróglia também causa uma toxicidade neuronal e glial através de enzimas neurotóxicas. A liberação de neurotoxinas causada pelas microglias, induz o aumento dos danos na lesão medular logo nas primeiras horas após a lesão, contribuindo assim diretamente e quase de forma espontânea para a lesão secundária (KAMINSKA et al., 2015). Em sua ação de liberação das neurotoxinas estão presentes o ácido nítrico, radicais livres, ácido araquidônico, enzimas proteolíticas, interleucina e o fator de necrose tumoral (TNF- α). Em especial o TNF- α , sua ação se dá diretamente ao receptores de AMPA, induzindo as células gliais a liberar mais glutamato e TNF- α , levando assim ao agravamento da lesão (CHERRY et al., 2014; KAMINSKA et al., 2015; GOMES-LEAL Et al., 2004). Porém assim como há estudos de que a microglia pode ser maléfica, outros provam o seu efeito neuroprotetor com a modulação das baixas doses de IFN- γ e IL-4 e outros mostram que a longo prazo ela pode contribuir para a melhora funcional do indivíduo (CHERRY et al., 2014; GOMES-LEAL, 2012; GOMES-LEAL, 2005).

1.4.6.3 Astrócitos

Os astrócitos auxiliam na defesa imune no SNC, por meio da síntese e secreção de diversas citocinas inflamatórias. Além disso, essas células têm grande impacto no controle energético cerebral, em razão do fornecimento de energia e metabólitos (SOFRONIEW e VINTERS, 2010).

Os astrócitos quando se deparam com em uma situação patológica no SNC, sua forma estrutural muda, quando antes tinham em sua forma anatômica o corpo celular pequeno e com ramificações longas após a lesão, o corpo celular se torna hipertrófico e com ramificações curtas, além de aumentar a atividade lisossômicas, de enzimas oxidativas e o número de astrócitos se dividindo e migrando para a área de lesão (ZHU et al., 2013). Estudos mostram que os astrocitos podem estar possivelmente relacionado com a necrose progressiva na área da lesão.

1.5 TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

Inúmeras evidências experimentais sugerem que a manipulação da resposta inflamatória da lesão secundária é uma abordagem experimental promissora para minimizar a perda tecidual após LAME. Os impactos físicos e psicológicos para o indivíduo e financeiros para o estado motivam a comunidade científica na investigação e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que sejam eficazes no sentido de evitar agravamentos das lesões, diminuir a morte celular (neurônios) e até melhorar a função motora e sensitiva desses pacientes (KWON *et al.*, 2004; WATTANANIT et al., 2016).

Alguns estudos experimentais paralelos como o da minociclina tem avançado quando se trata de LAME, por um fator primordial, ela consegue atravessar a barreira

hematocefálica, onde a sua função anti-inflamatória se dá pela ação sobre os macrófagos e neutrófilos interferindo na liberação de citocinas preservando oligodendrócitos, aumentando a regeneração axonal, modulando a morte por apoptose e consequentemente diminuindo a lesão secundária. De acordo com YRJANHEIKKI *et al.*, (1999), essa inibição melhora a função nervosa e morte celular através da via caspase-dependente e a caspase não-dependente, causando assim a neuroproteção de células adjacentes em particular os oligodendrocitos (RUGGIERI *et al.*, 2008).

Estudos adjacentes com células mononucleares também se mostraram muito eficazes em seus resultados no sistema nervoso central, pois segundo MacDonald e Howard (2002) as células estamitais embrionária tem uma fonte de ilimitada e são pluripotentes e geneticamente flexível ao meio na qual se encontra, causando assim uma influência no ambiente da lesão propiciando ainda fatores de crescimento e a proliferação das células progenitoras, assim como a melhora funcional quando aplicado logo na fase aguda da lesão (URDZIKOVA *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2012). De acordo com Lu *et al.* (2012), essas células estamitais também podem ajudar de uma forma similar na LAME, com a formação de reles neuronais, onde o local da lesão poderia funcionar de forma similar ao tálamo, recebendo informações aferentes ou eferentes e retransmitindo ao seu alvo superior ou inferior, e assim fazendo a comunicação entre as extremidades.

Quando se fala em tratamentos com fitoterápicos experimentais no sistema nervoso central, se observa algumas pesquisas como com gergelim que tem seu efeito neuroprotetor relatado, testado e comprovado em ratos como, sugere a pesquisa de Botelho *et al.* (2014), onde foi relatado que o gergelim tem em seu composto substâncias como fitoesteróis capazes de atravessar a barreira hematocéfálica e induzir

uma neuroproteção de doenças neurodegenerativas sendo elas crônicas ou agudas. Para a epilepsia o sesamin – composto originado da semente do gergelim – possui um efeito antioapoptótico, antiinflamatória, inibição da peroxidação lipídica, inibição de MAPK e ativação COX2 (HSIEH et al., 2011). Alguns estudos ainda estão em andamento para saber seu melhor efeito neuroprotetor no SNC.

Nos últimos anos, vários estudos sugerem um amplo espectro dos efeitos do óleo de resina de copaifera em tecidos não neurais, incluindo anti-inflamatório e atinociceptivo (VEIGA *et al*,2007). O óleo de copaíba já é utilizado tradicionalmente como um agente anti-inflamatório pela medicina popular Amazônica.

1.5.1 Extratos de Plantas da Amazônia Como Agentes Anti-inflamatórios e Neuroprotetores

Na Amazônia brasileira possui uma incomparável biodiversidade com uma grande variedade de espécies de plantas com potencial anti-inflamatório e/ou neuroprotetor praticamente inexplorado (CRISTOPHER et al., 2014). Na região amazônica, bem como em outros estados brasileiros, a medicina popular sugere o uso destes extratos ou óleos de plantas para os mais diversos tipos de enfermidades, incluindo doenças do SNC (LAMEIRA, 2008). No entanto, as informações passadas pelo povo mais antigo sobre este conhecimento popular, são consideradas não científicas pela comunidade acadêmica e geralmente ignoradas na escolha de plantas para testes científicos.

Em escala nacional, existem estudos sobre algumas espécies de plantas nos mais diversos tipos de enfermidades não neurais (DA CUNHA et al., 2001; FERREIRA et al., 2000; FRODE et al., 2001; MALHEIROS et al., 2001; OTUKI et al., 2005; ROGERIO et al., 2009). No entanto, praticamente inexistem estudos que tenham investigado o potencial anti-inflamatório e neuroprotetor dos extratos de plantas da Amazônia em modelos experimentais de desordens neurais agudas ou crônicas, incluindo a lesão da medula espinhal e acidente vascular encefálico.

O grupo no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará é referência mundial nos estudos sobre neuroinflamação em doenças como AVE (CARDOSO, 2012; DOS SANTOS, 2007; FRANCO et al., 2012; GOMES-LEAL, 2012; GUIMARAES et al., 2010; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; THORED et al., 2009) e trauma da medula espinhal (GOMES-LEAL et al., 2004a; GOMES-LEAL et al., 2005b). Recentemente, foi observado que o tratamento com óleo de copaíba diminui a neuroinflamação e induz neuroproteção em um modelo de lesão excitotóxica no córtex motor de ratos adultos (GUIMARAES-SANTOS et al., 2012). Este é o único estudo publicado mostrando o efeito eficaz deste óleo em um modelo experimental “in vivo” de uma doença do SNC.

No caso da medula espinhal, poucas terapias realmente eficazes foram comprovadas em humanos, com exceção de altas doses do glicocorticoide metilprednisolona, que também é pouco eficaz e já está em desuso pela comunidade médica atualmente (BRACKEN, 2001).

A ineficácia das mais de mil drogas testadas em animais para as desordens neurais agudas (O'COLLINS et al., 2006; SACCHETTI, 2008) enfatizam a necessidade

da busca de novos e mais eficazes agentes neuroprotetores e/ou anti-inflamatórios para doenças do SNC, como o trauma da medula espinhal e acidente vascular encefálico, considerando o imenso significado epidemiológico destas doenças.

1.5.1.1 Óleo de Resina da Copaíba

O principal produto que constitui o óleo copaíba é o beta-cariofileno (Tabela 1). O beta-cariofileno possui ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica, e o beta-bisaboleno, analgésico e anti-inflamatório (PIERRI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

Componetes do Óleo de Resina de Copaíba	Porcentagem(%)
δ - elemene	0.2
cyclosativene	0.9
α - copaene	0.5
β –elemene	3.2
α - gurjunene	0.7
β - caryophyllene	37.3
<i>Trans</i> - α - bergamotene	9.0
aromadendrene	0.9
<i>epi</i> - β - santalene	0,1
α - humulene	5.4
β - chamigrene	1.0
γ - gurjunene	0.6
γ - curcumene	0.6
β – selinene	4.8
α – selinene	3.0
(<i>Z</i>)- α - bisabolene	1.8
α - bulnesene	2.2
β - bisabolene	14.5
β - curcumene	0.4
β - sesquiphelandrene	1.2
(<i>E</i>)- γ - bisabolene	1.4
caryophyllene oxide	0.1
<i>epi</i> - β - bisabolol	0.1
β - bisabolol	0.2

Tabela 1. Componentes do óleo-resina de copaíba.

No Brasil, mas especificamente na região amazônica, encontram-se várias espécies, onde a mais comum é a *C. reticulata* Ducke e popularmente conhecidas como copaibeiras (LEITE; LLERAS, 1993; MORS; RIZZINI, 1976).

Alguns estudos anteriores sugeriram um amplo espectro de efeitos da copaiba em tecidos não neurais, como atividade anti – inflamatória (PAIVA et al., 2004), anti-nociceptiva (GOMES et al., 2007), Anti-bacteriana (MORELLI et al., 2015) citotóxica e anticancerígeno (GOMES et al., 2008), possui também ação contra protozoários parasitas (SANTOS et al., 2011) e como cicatrização de feridas e anti-úlceras (PAIVA et al., 1998). No entanto, poucos investigaram os efeitos dessa copaiba no sistema nervoso central como no estudo de Guimarães-Santos (2012) que observou uma melhora e redução de neutrófilos Recrutados e Microglia Activativada, diminuição da necrose tecidual e cavitação na área lesada e uma diminuição visível do número de polimorfonucleares e células mononucleares, concluindo assim que a copaíba possui agente anti-inflamatório e neuroprotector para o encéfalo.

Porem até o momento não existem estudos que tenham investigado os possíveis papéis anti-inflamatórios e neuroprotetores do óleo de copaíba após LAME.

No presente estudo, investigamos experimentalmente os possíveis efeitos neuroprotetores e anti-inflamatório do óleo resina de copaíba, em um modelo experimental de lesão da medula espinhal.

1.6 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

A resposta inflamatória tem um papel muito importante na fisiopatologia da LAME (ANKENY e POPOVICH, 2009; CHAN, 2008; GOMES-LEAL *et al.*, 2004). Estudos

atuais afirmam que essa resposta inflamatória possui um teor prejudicial a partir de certo ponto após a LAME (KIGERL et al., 2009; GOMES-LEAL *et al*, 2005; JONES, 2005; TAOKA *et al*, 1998).

Estudo recente mostrou que o óleo de copaíba tem efeito neuroprotetor e anti-inflamatório após lesão do córtex motor, diminuindo o recrutamento de neutrófilos e ativação microglial (GUIMARAES et al, 2012). Contudo, ainda não há nenhum estudo que mostre o efeito do ORC após lesão aguda da medula espinhal.

O presente estudo traz a questão de que o tratamento com óleo-resina de copaifera reticulata ducke após lesão aguda experimental da medula espinhal possui ou não efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Geral

Investigar os possíveis efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios do óleo resina de *Copaifera reticulata Ducke* em roedores submetidos à lesão aguda da medula espinhal

1.7.2 Especifico

- Descrever qualitativamente os padrões de perda tecidual e morte celular após lesão aguda da medula espinhal;
- Descrever qualitativamente e quantitativamente, em 1 tempos de sobrevivência (24h), o recrutamento de neutrófilos após LAME;

- Descrever qualitativamente e quantitativamente, em 2 tempos de sobrevivência (24h e 7 dias), o ativação de astrócitos após LAME;

2 MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados na pesquisa 12 ratos Wistar (n=12), todos machos adultos, com massa corporal variando de 250 a 300g, obtidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biológicas - ICB da Universidade Federal do Pará. Todos animais foram alojados em condições padrões de comida e água, todas as medidas foram tomadas para evitar o sofrimento e o estresse dos animais. Todos os procedimentos deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (protocolo nº 071-12).

Os animais foram divididos em grupos experimentais (Tabela 2). Os grupos experimentais AT-LAME 24h e AT-LAME 7 dias e os grupos em controle-tween AC-LAME 24h e AC-LAME 7 dias

Para este estudo foram planejados quatro grupos experimentais, conforme disposto na tabela a baixo.

TABELA 02. Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais/ grupo.

GRUPO	DESCRIÇÃO	NUMERO
AC-LAME 7 dias	Animal controle LAME – Foram os animais tratados apenas com Tween. Receberam todos os procedimentos cirúrgicos para a LAME e inserido o Tween focal ao local da lesão	3
AT-LAME 7 dias	Animal tratado LAME – Foram os animais tratados com extrato de copaíba. Receberam todos os procedimentos cirúrgicos para a LAME e inserido o extrato de copaíba focal ao local da lesão	3
AC-LAME 24h	Animal controle LAME – Foram os animais tratados apenas com Tween. Receberam todos os procedimentos cirúrgicos para a LAME e inserido o Tween focal ao local da lesão	3
AT-LAME 24h	Animal tratado LAME – Foram os animais tratados com extrato de copaíba. Receberam todos os procedimentos cirúrgicos para a LAME e inserido o extrato de copaíba focal ao local da lesão	3

2.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO RESINA DE COPAÍBA

O óleo de resina de copaíba utilizado neste trabalho, foi fornecido gentilmente pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e, foi extraído no campus da EMBRAPA no município de Belterra-PA, através dos troncos de árvores da espécie *Copaifera reticulata* Ducke.

2.3. INDUÇÃO DE LESÃO AGUDA NA MEDULA ESPINHAL E TRATAMENTO

Antes da indução da lesão medular, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (72mg/kg) e xilazina (9mg/kg), administrados por via intraperitoneal. Após a remissão dos reflexos corneanos e da retirada da pata, foi realizada a tricotomia do dorso do animal, além de ser realizada a assepsia do dorso com álcool iodado. Então, ele foi posicionado e fixado em uma plataforma de ferro galvanizado, fixada na mesa cirúrgica. A incisão tem aproximadamente 2 cm, com exposição do tecido subcutâneo e muscular do animal. O procedimento cirúrgico foi previamente relatado na literatura (RAPALINO *et al*, 1998). A musculatura paravertebral foi afastada e as incisões musculares dos processos transversais e posteriores foram dissecadas e cortadas para visualização da lâmina da vértebra T8. Uma laminectomia total foi realizada nessa vértebra para exposição do tecido nervoso medular. A hemisseção da medula foi realizada com bisturi em forma de “foice” e a lesão total foi confirmada com microscópio cirúrgico. Logo após a confirmação da lesão, o grupo AT-LAME 7 dias e o grupo AT-LAME 24h foram tratados com 20 µl de óleo de copaíba aplicada no segmento medular lesionado através de uma micropipetae.

Os animais do grupo AC-LAME 7 dias e AC-LAME 24h foram utilizados 20 μ l de tween aplicada no segmento medular lesionado através de uma micropipeta. Posteriormente a aplicação, a pele do dorso do animal foi suturada, higienizada e aplicada uma pomada anti-bactericida.

Após a cirurgia, os animais foram hidratados com 1 ml de soro fisiológico aplicado por modo intraperitoneal e mantidos em gaiolas padrão de 3 animais por gaiolas. Durante o tempo de sobrevivência, os animais foram monitorados quanto à alimentação, consumo de água e função excretora.

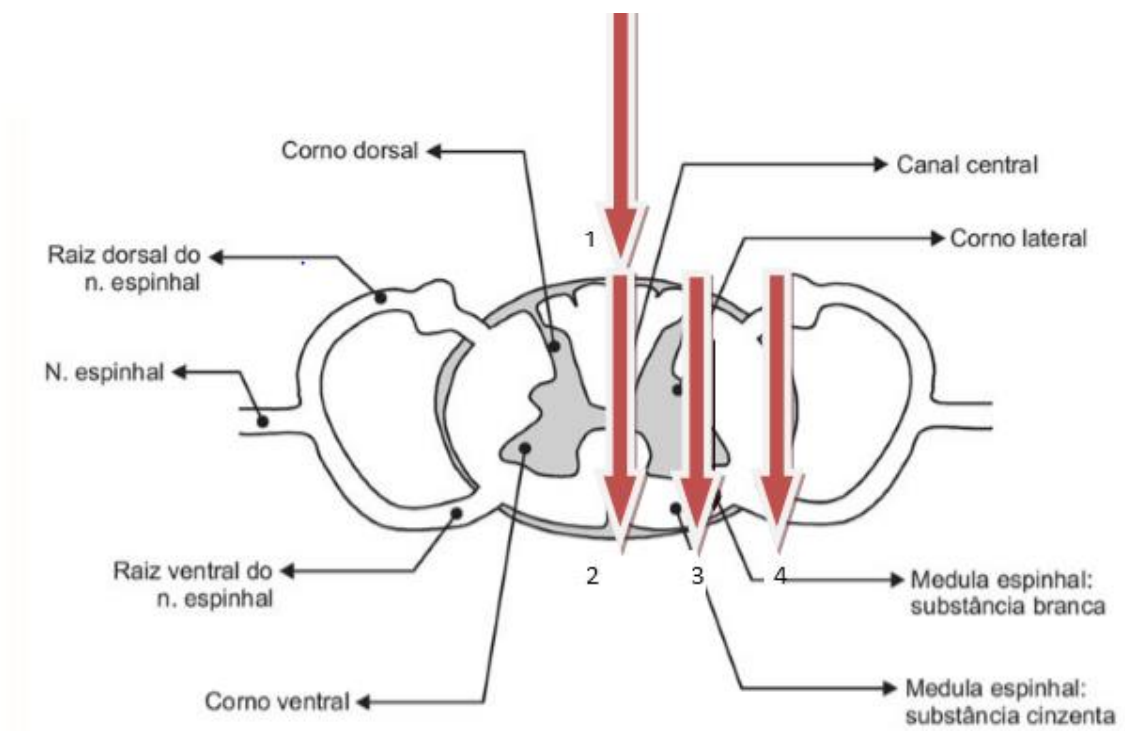


Figura 8: Ilustração Esquemática da Hemisseção Medular. As setas mostram o a lesão parcial da medula espinhal realizada com o bisturi.

Fonte: Adaptado Neurofisiologia clínica, 2010

2.4. PERFUSÃO E CRIOPROTEÇÃO

Após o tempo de sobrevivência de cada grupo, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (72mg/kg) e xilazina (9mg/kg), administrados via intraperitoneal. Após a remissão de reflexos corneanos e retirada da pata, foi feita a perfusão transcardinalmente com 0,9% de salina heparinizada seguida de Tampão Fosfato, pH= 7,4 e 0,1M, e paraformaldeído a 4%. As medulas foram retiradas, pós-fixadas durante 24 horas e crioprotegidas. Em seguida, apenas a área de lesão foi congelada em Tissue-Tek® OCT compound (Sakura), e seccionada transversalmente em criostato (Microm® / modelo HM-505-E) em espessuras de 20 µm e 50 µm. As lâminas foram montadas e congeladas a -20° C até o processamento histológico adequado.

As secções de 50 µm foram utilizadas para avaliar qualitativamente a área de lesão através da coloração pela violeta de cresila. Essa técnica permite a visualização dos corpos celulares de neurônios e células gliais. Já as secções de 20 µm foram utilizadas para as análises utilizando a técnica de imunohistoquímica.

2.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

2.5.1. Análise Histopatológica Geral

A análise histopatológica foi realizada com violeta de Cresila. Esta coloração permite a visualização de corpos celulares e a perda dos mesmos em situações patológicas (Guimaraes et al., 2012; Souza-Rodrigues et al., 2008).

2.5.2. Imunohistoquímica

As análises imunohistoquímicas foram feitas com o objetivo de:

- Anti-MBS-1 – marcador de neutrófilos. Este anticorpo marca a população geral de neutrófilos (GOMES-LEAL et al, 2005; ZHU et al., 2013). Ele reconhece epítomos na membrana de neutrófilos.
- Anti- IBA-1 – marcador de células microglias ativadas e não ativadas. Uma proteína quelante de Ca^{++} presente especificamente em células é marcada por esta técnica. Detalhes do protocolo de imunohistoquímica podem ser obtidos em (GOMES-LEAL et al, 2004; ZHU et al., 2013).

O protocolo utilizado foi previamente usado em (GOMES-LEAL et al., 2002). As lâminas com as secções montadas foram retiradas do freezer e colocadas na estufa (BrasDonto, BrClave®) à 40°C por 30 minutos. Em seguida, as secções foram delimitadas com uma caneta hidrofóbica (Dako Pen, ref. S2002), lavadas em PBS por 3 minutos, e imersas em tampão borato (0,2M, pH 9,0; Nuclear) à temperatura constante de 65°C, por 25 minutos. Após esta fase, as secções ficaram mais 20 minutos à temperatura ambiente para não ter choque térmico. As secções foram novamente lavadas em PBS por 3 minutos e submetidas ao tratamento com solução metanol (QEEL) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Merck) (1ml de H₂O₂ para cada 100ml de metanol absoluto) sob agitação constante. As secções foram então lavadas (3 tempos, 3 minutos cada) em solução de PBS/Tween® (Sigma-Aldrich) e incubadas por 1h em soro normal de cavalo/ cabra a 10% em câmara úmida. Depois, o excesso de soro normal foi retirado para incubação no anticorpo primário, por uma noite. No dia seguinte, as secções foram lavadas (3 tempos, 3 minutos cada) na solução de

PBS/Tween® e incubadas por 2h no anticorpo secundário biotínido anti-camundongo feito em cavalo/ cabra (1:100; Vector). Após este período, três lavagens foram realizadas (3 minutos cada) em PBS/Tween para que as secções fossem incubadas no Complexo Avidina-Biotina Peroxidase (Vector, kit ABC Vectastain®) por 2h. As secções foram lavadas (4 tempos, 3 minutos cada) antes da revelação utilizando diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich). As secções foram incubadas em uma solução contendo 250 ml de PB 0.1M (pH 7,2 – 7,4) juntamente com 125mg de DAB e 130 µl de H₂O₂. As mesmas foram monitoradas em microscópio óptico até que a intensidade da reação ficasse adequada. Após o término da revelação, as secções foram lavadas em PB 0,1 M (pH 7,2 – 7,4), desidratadas em gradientes de álcool/ xileno e montadas em Entellan® (Merck).

2.6. ANÁLISE QUALITATIVA

As secções de todos os grupos experimentais, marcadas pelos métodos imunohistoquímicos foram analisadas em microscópio óptico (Bioval, L2000C). Imagens de campos representativos foram obtidas com auxílio de uma câmera digital (Moticam 2500) acoplada a um microscópio óptico (Nikon, Eclipse 50i).

2.7 ANÁLISE QUANTITATIVA

Para análise quantitativa, o número de neutrófilos, macrófagos/micróglia ativados por campo, foram contados usando microscópio binocular com gradícula de contagem (0,0625 mm²) em objetiva de 40 x por outro pesquisador cego aos grupos. Contou-se 3 secções por animal e três campos por secções para um total de 3 animais por grupo.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo teste t Student para dados não pareados para as contagens de neutrófilos. Para a contagem de células Iba-1, os dados foram comparados pela análise de variância um critério com correção a posteriori de Tukey. O nível alfa de significância foi $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software GraphPad Prism 5.0*. Os gráficos foram produzidos no *software Microsoft Excel 2007*.

3. RESULTADOS

3.1 HEMITRANSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS ADULTOS INDUZIU DÉFICITS MOTORES CARACTERÍSTICOS DE HEMIPLEGIA.

Logo após o procedimento cirúrgico relatado, observou-se sinais característicos de lesão aguda medular (fase de choque medular), como arreflexia da pata posterior direita e atonia dos músculos posteriores ao nível da lesão medular do lado direito. Todos os animais apresentaram esse quadro, demonstrando que o modelo de indução foi eficaz.

3.2 TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA DIMINUIU A ÁREA DE LESÃO

Para avaliar a área de lesão, utilizamos as secções coradas com violeta de cresila (Figura 9) em todos os grupos experimentais e controle, a qual permite a visualização da morfologia da medula espinhal. Após a LAME, houve uma intensa cavitação no parênquima da medula espinhal em animais não-tratados com uma significativa infiltração de células, o que revela intensa área de necrose (Figura 9-A) e, verificamos uma diminuição da cavitação em animais tratados com o óleo de copaíba (Figura 9-B), mostrando uma melhor preservação da estrutura do tecido medular.

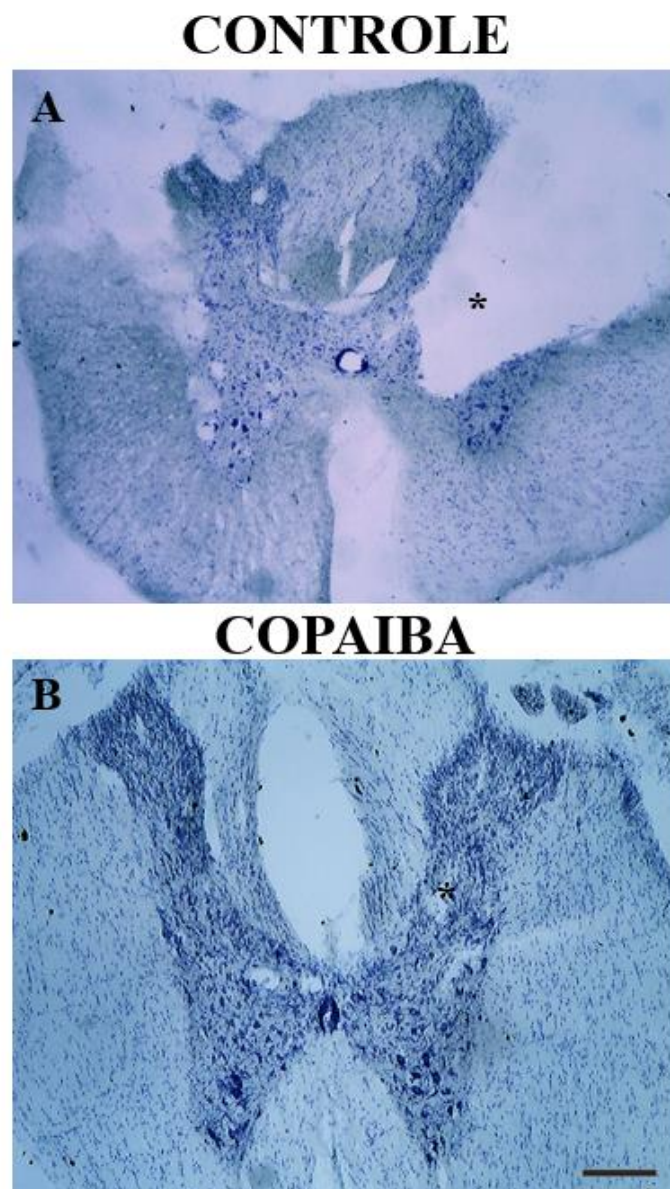


Figura 9: Foto micrografia do corte transversal do animal controle e tratado fazendo uma análise da área de lesão necrótica (*) evidenciada pela coloração violeta de cresila.

A - Animal Controle; **B** - Animal tratado. Objetiva 4x e Escala = 200 μ m para A e B.

3.3 TRATAMENTO COM ÓLEO DE COPAÍBA REDUZIU O NÚMERO DE NEUTRÓFILOS NA ÁREA DE LESÃO

Para identificação de neutrófilos após a hemisseção medular, realizou-se a imunohistoquímica usando o anticorpo MBS-1, somente nos grupos com tempo de sobrevivência de 1 dia (Figura 10), devido à grande infiltração dessas células nos primeiros dias pós-lesão. Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao parênquima lesado e, subsequentemente, os macrófagos teciduais (ABBAS et al, 2005). Nos animais não-tratados foi observado um maior recrutamento de neutrófilos para o parênquima lesionado (Figura 10-A), enquanto que os animais que sofreram LAME e foram tratados com o óleo de resina de copaíba, observou-se um menor recrutamento de neutrófilos (Figura 10-B). A diminuição do recrutamento de neutrófilos foi confirmada quantitativamente, através da contagem de neutrófilos MBS-1 nos diversos grupos experimentais (Figura 11) (Grupo Tratado: $8,33 \pm 0,66$ (N=3), Grupo Controle: $12,27 \pm 0,28$ (N=3)).

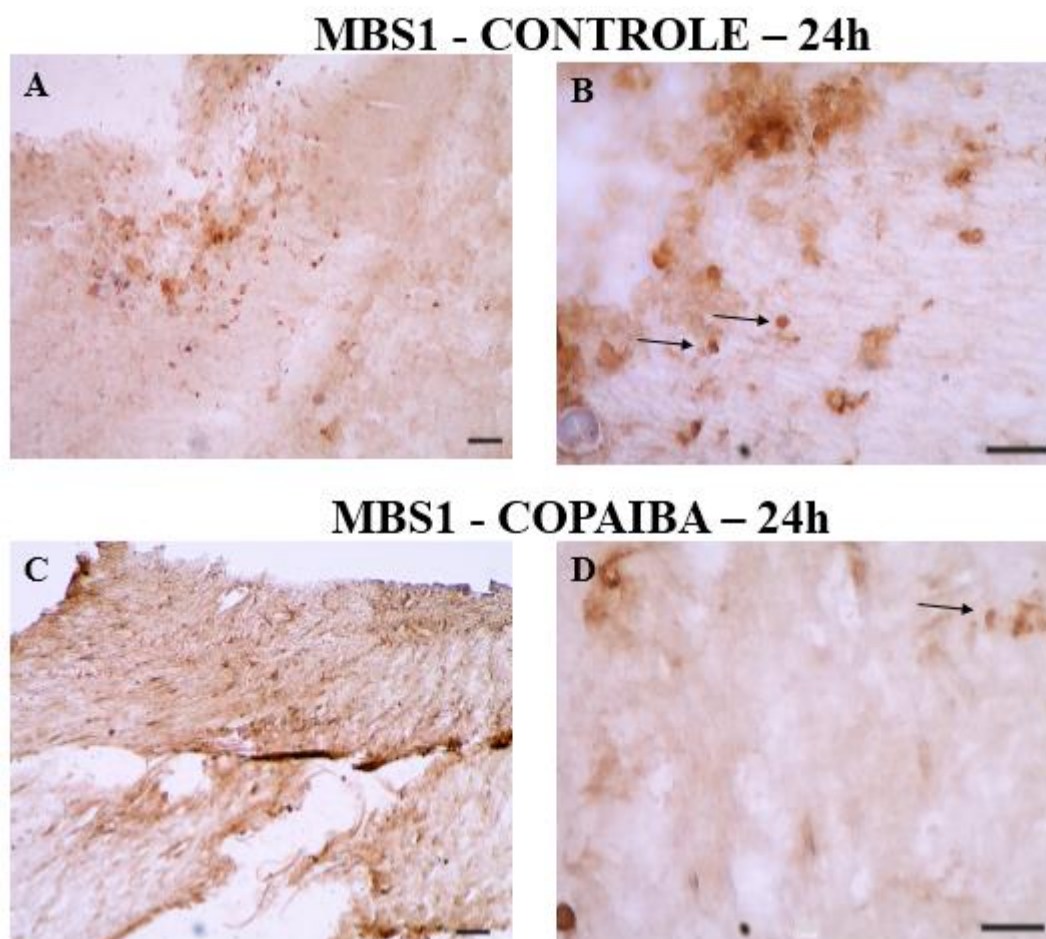


Figura 10. Fotomicrografia do corte transversal de um animal controle e tratado evidência os neutrófilos marcados com anti-MBS-1 mostrando a diferença entre o grupo tratado e controle do mesmo animal, após LAME. Animal controle (**A e B**). Animal Tratado (**C e D**). Objetiva de 10x (figuras A e C) e 40x nas (figuras B e D) Escala = 50 μ m para os animais A e C, de 20 μ m para os animais B e D

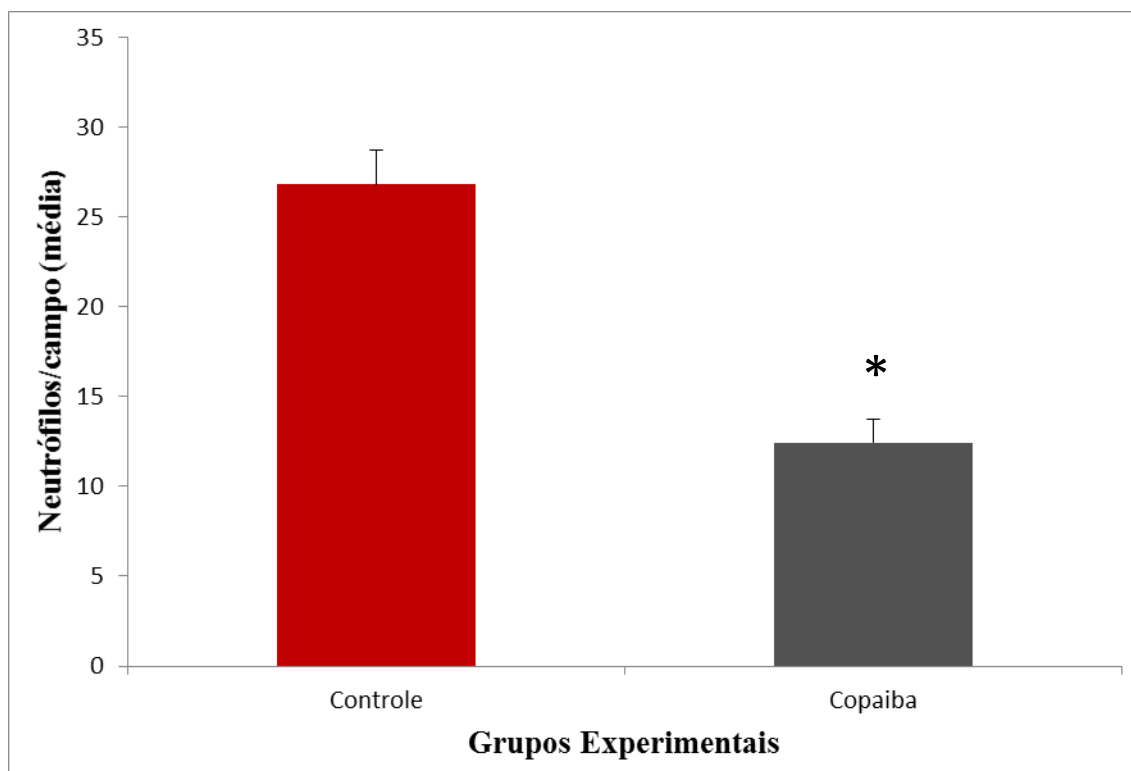


Figura 11: Quantificação do número de neutrófilos após hemitransecção medular e sobrevida de 24h. A contagem foi realizada dividindo a área de lesão medular em 3 campos do mesmo animal, realizando a contagem através da gradícula, no tempo de sobrevida de 24h. O grupo tratado (*) em comparação com o grupo controle (**p<0,01). Grupo Tratado: $8,33 \pm 0,66$ (N=3), Grupo Controle: $12,27 \pm 0,28$ (N=3). Teste t não pareado $P < 0,05$.

3.4 TRATAMENTO COM ÓLEO DE COPAÍBA REDUZIU O NÚMERO DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL NA ÁREA DE LESÃO

Para avaliação da ativação microglial/macrofágica após lesão aguda da medula espinhal, foi realizada imunohistoquímica com anticorpo Iba-1 em todos os grupos experimentais (Figura 12). Após a hemissecção da medula espinhal houve intensa ativação de microglial na área de lesão. Os animais não tratados tiveram um maior número de micróglia/macrófagos ativados no epicentro da lesão (Figura 10-A). No entanto, os animais tratados com o óleo de copaíba, foi observado um número reduzido de micróglia/macrófagos ativados no parênquima lesionado (Figura 10-B). Esses resultados foram confirmados pela análise quantitativa (Figura 13). O grupo Tratado no 1º dia: $8,59 \pm 1,72$ (N=3), Grupo Controle no 1º dia: $35,07 \pm 9,87$ (N=3). Grupo Tratado no 7º dia: $19,59 \pm 9,48$ (N=3), Grupo Controle no 7º dia: $65,77 \pm 6,19$ (N=3).

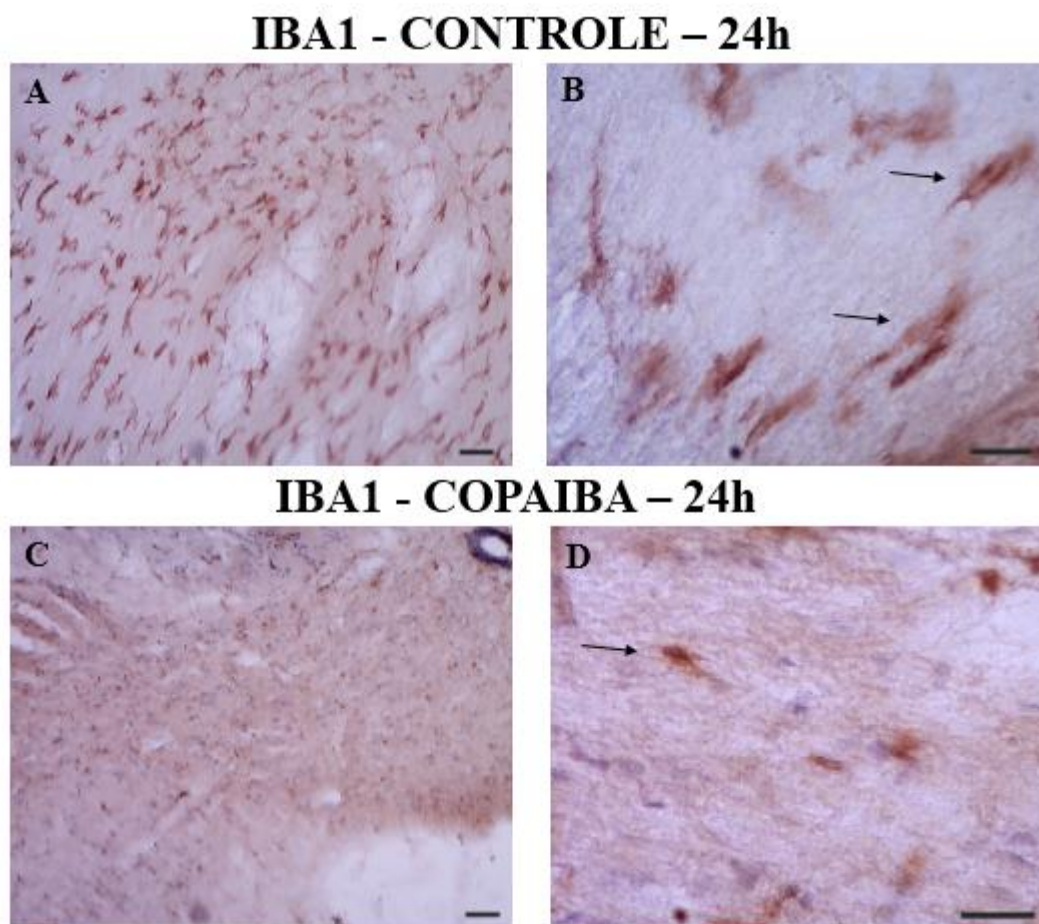


Figura 12: Fotomicrografia do corte transversal da área de lesão de um animal controle e tratado de ativação microglial com a sobrevida de 24h após LAME. Ativação microglial marcada com anticorpo Iba-1. Animal controle (A e B). Animal Tratado (C e D). Escala = 50 μ m para os animais A e C, de 20 μ m para os animais B e D.

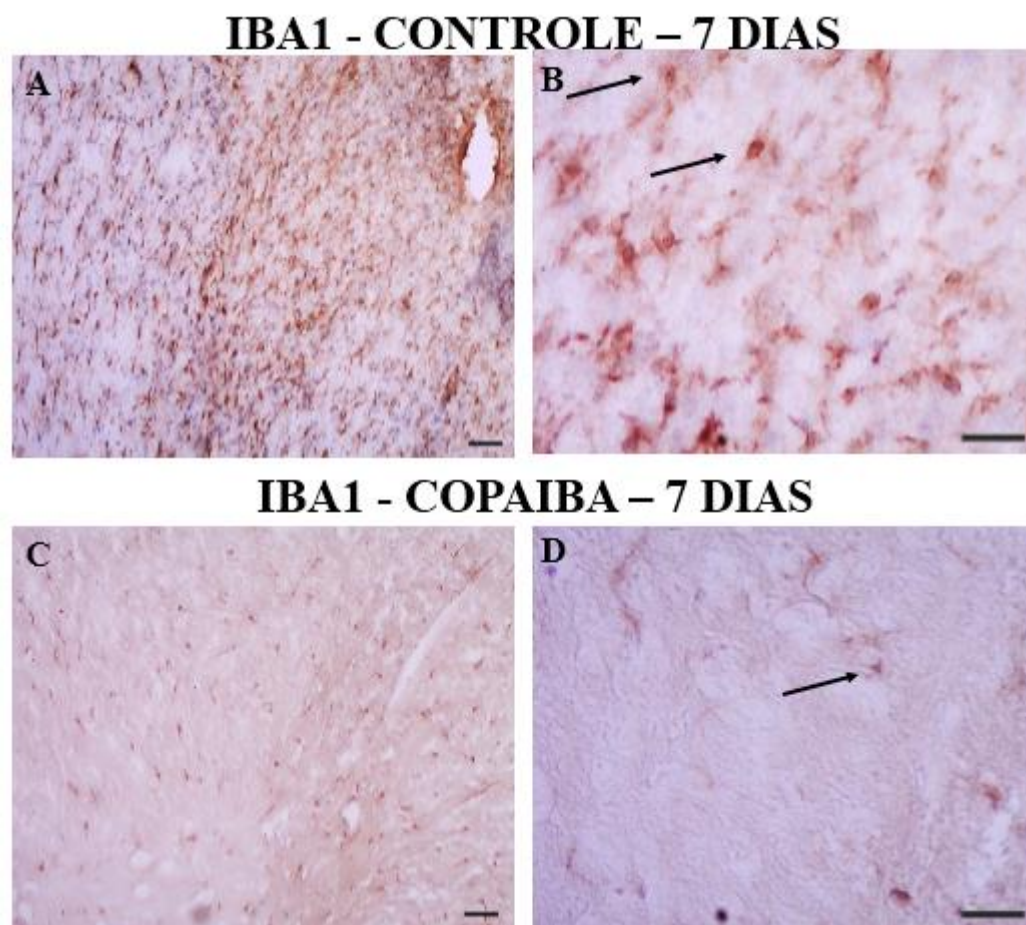


Figura 13: Fotomicrografia do corte transversal da área de lesão de um animal controle e tratado de ativação microglial com a sobrevida de 7 dias após LAME. Ativação microglial marcada com anticorpo Iba-1. Animal controle (**A e B**). Animal Tratado (**C e D**). Escala = 50 μ m para os animais A e C, de 20 μ m para os animais B e D.

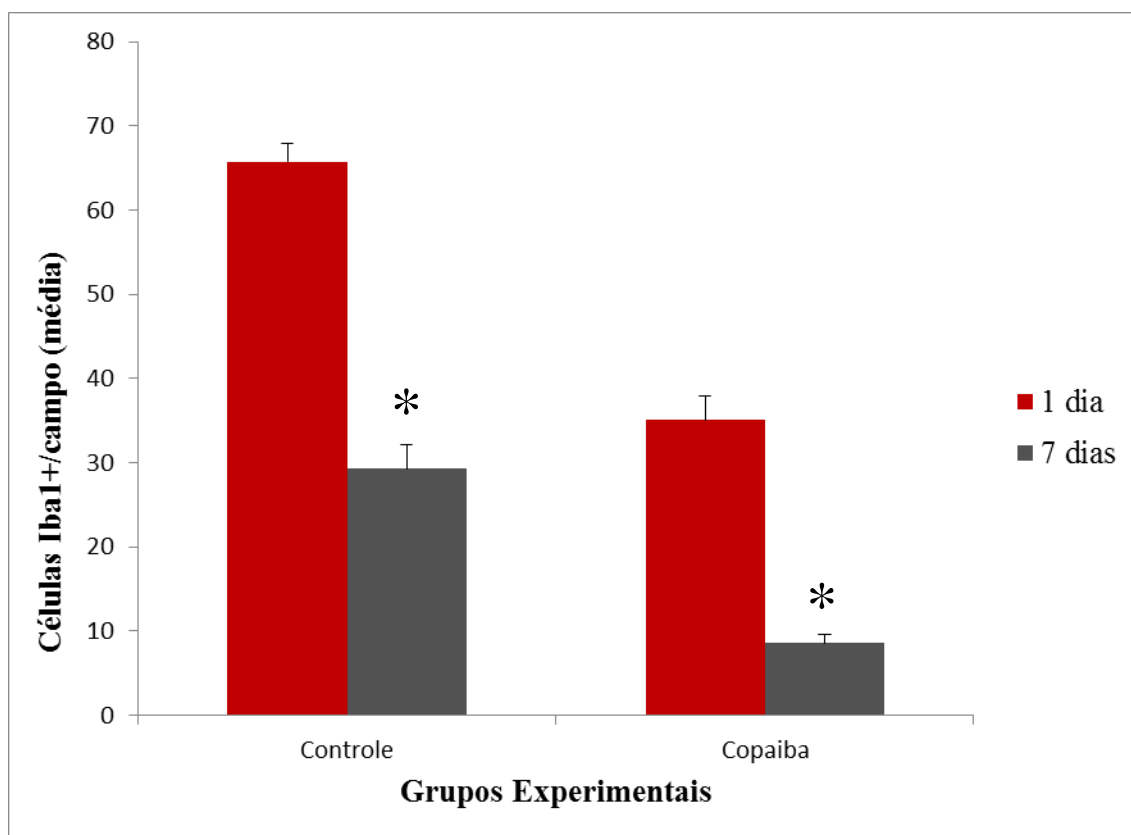


Figura 14: Análise quantitativa do número de micrólia, após LAME. Comparação com o grupo controle não tratado (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Grupo Tratado no 1º dia : $8,59 \pm 1,72$ (N=3), Grupo Controle no 1º dia : $35,07 \pm 9,87$ (N=3). Grupo Tratado no 7º dia : $19,59 \pm 9,48$ (N=3), Grupo Controle no 7º dia : $65,77 \pm 6,19$ (N=3). Teste t de Student não pareado $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

4.1. O MODELO EXPERIMENTAL E A INDUÇÃO DE HEMIPLEGIA EM RATOS ADULTOS

O modelo experimental de Lesão por Contusão Medular tem sido amplamente utilizado em estudos pré-clínicos e, é atualmente considerado o modelo mais adequado de lesão aguda medular em humanos, utiliza-se do Impactor que é um dispositivo de lesão por contusão, impulsionado pela gravidade ou força eletromagnética, induz lesão traumática por uma rápida deformação do tecido da medula espinhal. (YOUNG et al, 2002; SILVA, N. A. et al., 2014). Por ser um aparelho metodicamente calculado de acordo com o peso e tamanho do animal exato para gerar a força de contusão medular precisa, ocorre uma certa dificuldade em selecionar o animal exato para o experimento além de ser um aparelho oneroso, e nosso laboratório ainda não dispõe desse tipo recursos. Logo, adaptamos um modelo mais simples descrito primeiramente por Rappalino em 1998 que é o de lesão perfuro-cortante direto na medula espinhal.

Esse tipo de lesão (perfuro-cortante) consegue representar o que acontece em casos de hemiplegia em humanos, pois raramente uma pessoa tem a sua medula espinhal totalmente seccionada em um trauma (KWON et al, 2004). Por isso, optamos por realizar uma hemiseccção e não uma transecção completa medular, para que o experimento retrate o mais próximo que encontramos em humanos.

O modelo experimental utilizado no presente trabalho foi a hemiseccção direita, a nível da vértebra torácica T7, com intuito de induzir déficits motores (hemiplegia

direita). Houve necrose, com inflamação intensa, ativação microglial/macrofágica e recrutamento de neutrófilos para a área de lesão, esses parâmetros foram avaliados pelas técnicas de coloração com violeta de cresila e Imunohistoquímica.

A hemiseção medular em ratos adultos foi capaz de provocar intensa inflamação, além de outros sinais fisiopatológicos típicos da lesão medular o que nos permitiu avaliar o efeito do óleo –resina de copaíba após LAME nesses animais.

4.2. O TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA PRESERVOU O PARÊNQUIMA MEDULAR APÓS LESÃO AGUDA MEDULA ESPINHAL

Ao avaliarmos a área de lesão, nossos resultados apontaram uma melhor preservação do parênquima medular e menor cavitação nos animais tratados. Os mecanismos pelo qual o óleo de copaíba exerce efeito neuroprotetor ainda não estão esclarecidos totalmente, especulasse que seja pelo componente de quase 50% do óleo de copaíba chamado β – carofileno, como mostra a tabela 1. Com a liberação das células inflamatórias, libertam radicais de oxigênio, proteases e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), contribuindo a danos nos tecidos (JORDAN et al., 1999; BARONE et al., 1991). Então especulasse que o Óleo de copaíba poderia modular a liberação dessas células pró-inflamatórias com a ação do β -cariofileno inibindo os efeitos anti-inflamatórios com a inibição do canabinóide tipo 2 se ligando ao seu receptor seletivamente que normalmente conduz à expressão de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α 9 (GERTSCH et al., 2008). Diminuindo dessa forma a extensão das ações dessas células pró-inflamatórias.

Até o momento ainda não existem outros trabalhos para que se possa fazer uma comparação, pelo fato desse estudo ser o primeiro que avalia a resposta do óleo-resina

de copaíba após Lesão Aguda da Medula espinhal. O mais próximo que tivemos foi uma pesquisa publicada recentemente de nosso laboratório que mostrou o efeito do ORC no Sistema Nervoso Central em ratos submetidos a AVE isquêmico, esse estudo também mostrou que o óleo de copaíba levou a uma melhor preservação tecidual em ratos submetidos a este tratamento. Apesar dos mecanismos ainda não estarem muito bem esclarecidos de como o óleo de resina de copaíba levou a essa preservação do parênquima neuronal, algumas hipóteses podem justificar esse efeito, como sua ação antiinflamatória (GUIMARAES et al, 2012). Um estudo com o sistema nervoso periférico mostrou a eficácia no efeito antinociceptivo periférico sem produzir efeitos tóxicos (GOMES et al., 2007).

Outros estudos, com tecidos não-neuronais apontam o potente efeito antiinflamatório do ORC após indução de colite em ratos adultos (PAIVA et al, 2004). O ORC também se revelou como uma terapia eficaz em reduzir edema e inflamação em ferida cutânea infeccionada em paciente diabético (MARTINS et al., 2010). Um estudo recente mostra a eficácia do óleo de copaíba contra as bactérias (MORELLI et al., 2015)

No presente estudo, a lesão medular foi significativa e nos animais tratados com o óleo-resina de copaíba apresentaram uma melhora tecidual em relação aos animais controles. Esses resultados podem servir como base para outros estudos pré-clínicos que possam avaliar além da melhora tecidual nos animais tratados se também promove alguma melhora funcional - motora.

4.3. O TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA DIMINUIU O RECUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS APÓS A LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico, com importante papel nas fases precoces das reações inflamatórias. Estão entre as primeiras células a migrarem para o sítio de lesão atraídos por quimiocinas, produtos bacterianos e citocinas (ABBAS *et al*, 2015). Após a lesão, o tecido medular é rapidamente infiltrado por neutrófilos sanguíneos (cerca de duas vezes mais do que em lesões cerebrais), os quais secretam enzimas líticas e citocinas, que podem danificar as células locais e ainda recrutar outras células inflamatórias (SCHNELL *et al*, 1999).

Sabendo disso, avaliamos o número de neutrófilos após o 1º dia de LAME, já que são as principais células inflamatórias nos primeiros dias após a lesão. E, nossos resultados também demonstraram uma diminuição no recrutamento de neutrófilos para o sítio de lesão em animais tratados com o óleo de resina de copaíba.

Tem sido demonstrado que o tratamento com óleo de copaíba (200 e 400 mg / kg) reduz a infiltração neutrofílica em lesão da mucosa do cólon seguido de colite induzida por ácido acético em ratos (PAIVA *et al*, 2004).

O tratamento com o óleo de resina de copaíba também reduziu a atividade da mieloperoxidase, diminuindo o recrutamento de neutrófilos (GUIMARAES *et al*, 2012). E, tem sido demonstrado que o recrutamento de neutrófilos está associado a maiores danos após lesão aguda neuronal, inclusive na medula espinhal.

Nesse estudo, ocorreu uma diminuição do recrutamento de neutrófilos para a área de lesão nos animais tratados com o óleo de resina de copaíba, podendo sugerir que a atividade inflamatória do mesmo é um dos mecanismos responsáveis pela melhor preservação tecidual em animais tratados.

4.4. O TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA DIMINUIU A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS MICROGLIAIS APÓS LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL

As células microgliais são as células imunes, também conhecidas como macrófagos residentes do SNC (RANSOHOFF e PERRY, 2009). São rapidamente ativadas e recrutadas aos locais de lesão, de neurodegeneração e inflamação, elas têm a função primordial de fagocitar o tecido lesionado. Quando há rompimento de axônios, as células da micróglia, antes em repouso, tornam-se ativadas, proliferam-se e envolvem motoneurônios com seus prolongamentos citoplasmáticos, resultando em deslocamento dos terminais nervosos dos seus respectivos corpos neuronais (STREIT et al, 1999). Após esse envolvimento, há remoção dos neurônios mortos ou que estão morrendo. Essa remoção é realizada através da fagocitose, feita pela própria célula microglial criando assim a cicatriz glial e isolando de vez os axônios e neurônios lesionado (STREIT et al, 1999).

O tratamento com o óleo de copaíba reduziu em mais de 60% dos níveis de ativação da microglia seguido de danos agudos corticais (GUIMARÃES-SANTOS, 2012). A infiltração e a ativação microglial/macrofagocitária é a principal responsável pelo início da lesão axonal, lesão secundária e a cavitação progressiva após LAME (POPOVICH et al.,2002).

No presente estudo, o óleo de copaíba reduziu a infiltração microglial em relação aos grupos não-tratados.

5. CONCLUSÃO

- A hemiseção da medula espinhal em nível torácico se mostrou eficaz na indução de lesão medular provocando hemiplegia direta em ratos, cavitação progressiva da ME, intensa resposta inflamatória e déficits funcionais se mostrando satisfatória para o objetivo da pesquisa;
- A dose única aplicada diretamente na lesão de óleo de resina de copaíba se eficiente para reduzir a área de lesão da ME nos tempos de sobrevida investigados;
- O tratamento com óleo de resina de copaíba reduziu significativamente o infiltrado de neutrófilos na área de lesão, após a indução do trauma experimental;
- Os animais que receberam o tratamento com óleo de resina de copaíba apresentaram uma diminuição significativa da quantidade de micróglia/macrófagos presentes no epicentro da lesão medular, após a indução da lesão experimental;

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., Lichtman, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AKOPOV, S et al.. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. **Stroke**, v.27, n.10, p.1739-1743, Oct. 1996.

ALLEN, N. J., BARRES, B. A. Neuroscience: Glia - more than just a brain glue. **NATURE**, 457(7230), 675-7. 2009.

ANKENY, D. P., and P. G. POPOVICH,. Mechanisms and implications of adaptive immune responses after traumatic spinal cord injury. **Neuroscience** 158, 1112-1121. 2009.

BARONE F. C., L. M. Hillegass, W. J. Price et al., "Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification," **Journal of Neuroscience Research**, vol. 29, no. 3, pp. 336–345, 1991.

BEAR, M. F., Et al. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*, 3 ed, artmed , São Paulo, Brasil. (2008).

BRITO, J. Incapacidade por traumatismo raquimedular secundário a acidentes de trânsito. **Coluna**. 10(3): 175-8. 2011.

BROUNS, R. & DEYN, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v.111, n.6, p.483-495, Jul. 2009.

BUNGE, RP; PUCKETT, WR; BECERRA, JL. Observations on the pathology of human spinal cord injury: A review and classification of 22 new cases with deficits in from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. **Adv Neurol** 59: 75-89, 1993.

CHAN, C. C.. Inflammation: beneficial or detrimental after spinal cord injury? **Recent Pat CNS Drug Discov** 3, 189-199. 2008.

CHERRY, J et al.. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **Journal of Neuroinflammation** 2014.

CHRISTOPHER W. Et al.,. Useful Brazilian plants listed in the manuscripts and publications of the Scottish medic and naturalista George Gardner(1812–1849). **Journal of Ethnopharmacology**. 161.18–29.2015.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DEFINO, H. Spinal cord injuries., **Simpósio: TRAUMA II**. Medicina, Ribeirão Preto. 32: 388-400, out./dez. 1999.

DEFINO, H. Trauma raquimedular. **Medicina, Ribeirão Preto**. 32: 388-400, out./dez. 1999.

DOYLE, K.P.; SIMON, R.P. & STENZEL-POORE, M.P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v.55, n.3, p.310-318, Sep. 2008.

DRYDEN, D. M.; SAUNDERS, L. D.; ROWE, B. H.; MAY, L. A.; YIANNAKOULIAS, N.; SVENSON, L. W.; SCHOPFLOCHER, D. P. e VOAKLANDER, D. C. Utilization of

health services following spinal cord injury: a 6-year follow-up study. **Spinal Cord**, v. 42, n. 9, p. 513-525, 2004.

FECHIO, M., Et al.. A repercussão da lesão medular do sujeito. **Acta Fisiátrica**, 16, 38-42. (2009).

FERREIRA, M; GUERRA, M. Adaptação à lesão vertebro-medular Adjustment to spinal cord injury. **Psicologia, saúde e doenças**, 15(2), 380-395, 2014.

FULLER, G. N., GOODMAN, J. C. Practical Review of Neuropathology. **Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins**. 2001.

GERTSCH J., M. Leonti, S. Raduner et al., “Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid,” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 105, no. 26, pp. 9099–9104, 2008.

GOMES, N et al..Antineoplastic activity of Copaifera multijuga oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 119, no. 1, pp. 179–184, 2008.

GOMES, Niele et. Al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology** 109 (486–492) 2007.

GOMES-LEAL, W. et al..Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Research**. 57 – 70. 2005.

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain and Behavior* 2(3): 345–356. 2012.

GOMES-LEAL, W., Corkill, D.J., Freire, M.A., Picanco-Diniz, C.W., Perry, V.H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. *Exp Neurol* 190, 456-467. 2004^a.

GREENWOOD, S; CONNOLLY, C. Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology*. 891 e 898. 2007.

HAYAKAWA, K. Lipopolysaccharide Preconditioning Facilitates M2 Activation of Resident Microglia After Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience Research*. 2014.

HSIEH, P., et al.. Sesamin ameliorates oxidative stress and mortality in kainic acid-induced status epilepticus by inhibition of MAPK and COX-2 activation, *J. Neuroinflammation* 8, 1–10. 2011.

JADIDI-NIARAGH, F. e MIRSHAFIEY, A. Histamine and histamine receptors in pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology*, v. 59, n. 3, p. 180-189, 2010.

JONES, T. B., MCDANIEL E.E., POPOVICH P.G.. Inflammatory-mediated injury and repair in the traumatically injured spinal cord. *Curr Pharm Des* 11, 1223-1236. 2005.

JORDAN J. E., Z. Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen, “The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury,” **Cardiovascular Research**, vol. 43, no. 4, pp. 860–878, 1999.

JUNIOR, F et al.. Traumatismo raquimedular por ferimento de projétil de arma de fogo: avaliação epidemiológica. **Coluna**. 10(4): 290-2, 2011.

KIGERL, K. A.; GENSEL, J. C.; ANKENY, D. P.; ALEXANDER, J. K.; DONNELLY, D. J. e POPOVICH, P. G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. **J Neurosci**, v. 29, n. 43, p. 13435-13444, 2009.

KWON, B et al.. Translational research in spinal cord injury: a survey of opinion from the SCI community. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 1, p. 21-33, 2010.

KWON, B.et al.. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. **Spine J**, v. 4,n. 4, p. 451-464, 2004.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**. Editora, Atheneu. 2º Edição. 2010.

MACHADO, ABM. Anatomia macroscópica da medula espinhal e seus envoltórios. In: MACHADO, ABM. **Neuroanatomia funcional**. 3ºEd.São Paulo: Atheneupg35-42; ,2013.

MACHADO. Neuroanatomia funcional. 2ª ed., São Paulo: **Atheneu**, 2005.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomy: text and atlas**. 3 ed., New York: Mc Graw-Hill Companies 2003.

MARTIN, J. H. Neuroanatomy: text and **atlas**. 3 ed., New York: Mc Graw-Hill Companies

MATUTE, C. Calcium dyshomeostasis in white matter pathology. **Cell calcium**; doi:10.1016/j.ceca. 12.004; 2009.

MCDONALD JW, HOWARD MJ. Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. **Prog Brain Res** 2002;

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. **Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular**. Brasília: MS, 2015. p7-8. Disponível

Em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_atencao_pessoa_lesao_medula_r.pdf. Acesso em: 12 mar 2016.

MORAES, A.. Parahyba Quartim de - O Livro do cérebro. Vol 1. São Paulo. SP, **Editora Duetto** - 2009.

MORELLI C., Et al. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. **Industrial Crops and Products** 70 (134–141). 2015.

MORELLI, C et al.. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. **Industrial Crops and Products** 70 (134–141), 2015.

NETTER, H.. **Atlas de Anatomia Humana**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

PAIVA, L et al. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 62 (73–78) 1998.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (Copaifera sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev. Bras Plantas Med.**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

QUINTANA-GONZALES et al.. Lesiones medulares no traumáticas: etiología, demografía y clínica. **rev peru med exp salud publica.**;28(4):633-38. 2011.

RANSOHOFF, RM; PERRY, VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annual Rev. Immunol.** 27: 119-145; 2009.

RIEDER, Marcelo. Trauma raquimedular: Aspectos epidemiológicos, de recuperação funcional e de biologia molecular. **Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Porto Alegre.** 2014.

RODRIGUES L.P. et al.. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. **Braz J Med Biol Res**, Volume 45(1) 49-57. 2012.

RONSYN, M. W.; BERNEMAN, Z. N.; VAN TENDELOO, V. F.; JORENS, P. G. e PONSAERTS, P. Can cell therapy heal a spinal cord injury? **Spinal Cord**, v. 46, n. 8, p. 532-539, 2008.

RUGGIERI, M Et al.. Combination treatment of Glatiramer Acetate and Minocycline affects phenotype expression of blood monocyte-derived dendritic cells in Multiple Sclerosis patients. **Journal of Neuroimmunology**; 197: 140-146; 2008.

SANTOS, A. et al..Leishmania amazonensis: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology** 129 (145–151).2011.

SANTOS, Talami; GUIMARÃES, Raphael; BOEIRA, Samyra. Spinal cord injury epidemiology in public emergency rooms in the municipality of Rio de Janeiro. **Esc Anna Nery** (impr.); 16 (4):747 – 753. out - dez 2012.

SHECHTER, R; LONDON, A; VAROL, C; RAPOSO, C; CUSIMANO, M; YOVEL, G; ROLLS, A; MACK, M; PLUCHINO, S; MARTINO, G; JUNG, S; SCHWARTZ, M. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. **PLoS Med.** 6 (7): e1000113. Doi: 10.1371/journal.pmed.1000113; 2009.

SILVA, N. A.; SOUSA, N.; REIS, R. L. e SALGADO, A. J. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. **Prog Neurobiol**, v. 114, n. p. 25-57, 2014.

SOFRONIEW, M. V., VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **ACTA NEUROPATHOLOGY**, 119(1), 7-35. 2010.

SONNTAG, V. K. H. e VOLMER, D. G. Spine. em WINN, H. R., ed. Youmans Neurological Surgery, vol. 5. **Philadelphia: Saundersp.** Pages 4869-48852004.

SOUZA-RODRIGUES, R. A resposta inflamatória e lesão da substância branca depois microinjections de endotelina-1 no corpo estriado de rato. **Brain research** 1200, 78–88, 2008.

SUGAWARA, T et al.. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx**, v.1, n.1, p.17-25, Jan. 2004.

SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. **Free Radic Biol Med**, v. 8, n. 6, p. 583-599, 1990.

TAOKA, Yuji; OKAJIMA, Kenji. Spinal cord injury in the rat. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 341-358, 1998.

URDZIKOVA L, et al.. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. **J Neurotrauma**; 23: 1379-1391. 2006.

WATTANANIT, Somsak et al .Monocyte-DeriveWATTANANITd Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice. **The Journal of Neuroscience**, April 13, • 36(15):4182– 4195. 2016.

YRJÄNHEIKKI, K. J et al.. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **PNAS**: v.96, p. 13496 - 13500, 1999.

ZHU, P Et al.. Development and Treatments of Inflammatory Cells and Cytokines in Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury. **Mediators of Inflammation**. 2013.