



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

NELSON ELIAS ABRAHÃO DA PENHA

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO  
DE GERGELIM (*Sesamum indicum* L.) EM UM MODELO EXPERIMENTAL  
DE LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS**

BELÉM – PARÁ  
2016

NELSON ELIAS ABRAHÃO DA PENHA

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO  
DE GERGELIM (*Sesamum indicum L.*) EM UM MODELO EXPERIMENTAL  
DE LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima.

BELÉM – PARÁ  
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Penha, Nelson Elias Abrahão da, 1978 - Efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato de gergelim (*Sesamum indicum L.*) em um modelo experimental de lesão aguda da medula espinhal de ratos/ Nelson Elias Abrahão da Penha. - 2016.

Orientador: Wallace Gomes Leal;

Coorientador: Rafael Rodrigues Lima.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Lesão medular - Pesquisa médica – Agentes antiinflamatórios. 2. Lesão medular-Inflamação. 3. Agentes antiinflamatórios - Extrato de gergelim. I. Título.

CDD 22. ed. 617.48204427

NELSON ELIAS ABRAHÃO DA PENHA

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO  
DE GERGELIM (*Sesamum indicum L.*) EM UM MODELO EXPERIMENTAL  
DE LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

BANCA EXAMINADORA:

---

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

---

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima – Co-orientador  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFPA

---

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

---

Prof. Dr. Moisés Hamoy – Examinador  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFPA

---

Prof. Dr. Arnaldo Jorge Martins Filho – Examinador  
Instituto Evandro Chagas – IEC

---

Prof. Dr. Ênio Maurício Nery dos Santos – Examinador/Suplente  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFPA

BELÉM - PARÁ  
2016

*A **Deus**, por ter me dado a vida e me tornado capaz de trilhar essa caminhada. A **Jesus Cristo** por ter me feito entender que o amor não é apenas um sentimento, é vida! A **Nossa Senhora de Nazaré** por ter me dado coragem, perseverança e atino durante esses anos de luta.*

*Aos meus pais, **Rosana Abrahão da Penha e Gonçalo José da Penha** por terem me dado a vida e me amado o suficiente para que eu pudesse reunir condições de estar realizando este sonho.*

*À minha irmã, **Nátilla Abrahão da Penha** e ao meu sobrinho **Nícolas Abrahão da Penha**, simplesmente por existirem.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, por sua incansável busca pela perfeição no que se diz respeito aos seus trabalhos científicos, lição que sempre fez questão de transmitir aos seus orientandos, independente do grau, inclusive a mim. Agradeço por ter me feito capaz de perceber a ciência em minha vida acadêmica e cotidiana, por sua amizade e atenção no desenvolvimento deste projeto. Muito obrigado!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rafael Lima, que, além de um amigo para a vida, participou diretamente da execução desse projeto, fazendo pontuações e ponderações importantes sobre os métodos e resultados deste trabalho. Tenho muito a lhe agradecer, difícil será retribuir no mesmo nível. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior, que aceitou o desafio de orientar meu mestrado em uma linha de pesquisa nova para as propostas do laboratório, me ensinou os caminhos da ciência, sempre com honestidade, sabedoria e responsabilidade. Hoje agradeço por ter me mostrado no passado que nem todas as fases que alcançamos são feitas de flores, os espinhos fazem parte da formação.

Ao Prof. Dr. Adriano Guimarães, pelo apoio, amizade e por nunca ter deixado de acreditar na minha capacidade de vencer. Aos que me ajudaram um dia, serei eternamente grato. Obrigado!

Ao Prof. MSc. Ijair Santos, pelo apoio técnico, pela amizade, companheirismo e por sempre ter me estimulado a prosseguir, mesmo diante de todas as dificuldades impostas pela realidade em se fazer pesquisa neste país. Muito obrigado!

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. Agradeço pelo companheirismo e auxílio intelectual na reta final deste trabalho.

À Profa. Dra. Milena Fernandes Caldato, por ter compreendido algumas ausências minhas no trabalho em momentos pontuais e necessárias, motivadas pela conclusão deste projeto importante em minha vida e na minha formação.

Ao Prof. Dr. João Paulo Mendes, por ter acreditado e investido nos momentos que mais precisei me ausentar do trabalho para aprimorar meus conhecimentos em neurociências.

Ao Prof. Dr. Moisés Hamoy, por ter fornecido todo o suporte técnico para realização dos testes eletrofisiológicos apresentados neste projeto. Por sua amizade e disponibilidade em ajudar, sempre. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Arnaldo Filho, pela amizade, apoio e disponibilidade para ajudar na conclusão deste trabalho.

Aos Professores Dr. Marcelo Cardoso, Dr. Ademir Júnior e MSc. Igor Negrão, pela amizade de sempre e por me mostrarem que os amigos estão sempre ao nosso lado para o que precisarmos, de fato.

À Profa. MSc. Ana Augusta Motta Oliveira, por nunca ter deixado de acreditar que eu seria capaz de realizar este sonho. Agradeço também por ter me mostrado, de forma material, que a fé não é apenas uma crença, mas um fundamento extraordinário.

Ao amigo Reginaldo Trindade, pela amizade e pela atenção e disponibilidade de sempre em ajudar fornecendo o modelo experimental deste trabalho. Obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE): Michelle Nerissa, Amanda, Thayssa, Jona Beto, Rosana, Celice, Michel, Paulo Rodrigo, Iury, Lucas Lacerda, Valéria, Leonardo,... dentre outros que não estão mencionados. Agradeço pelos ensinamentos diários, pela amizade, apoio e pelo companheirismo. Deixo aqui meus sinceros votos de sucesso na vida de cada um de vocês.

“Não se amoldem ao padrão deste mundo, mas transformem-se pela renovação da sua mente, para que sejam capazes de experimentar e comprovar a boa, agradável e perfeita vontade de Deus.”

Romanos 12:2

## EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE GERGELIM (*Sesamum indicum L.*) EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS

A medula espinhal é o componente do sistema nervoso central (SNC) com funções cruciais para o estabelecimento da locomoção, habilidades motoras, somestesia e controle autonômico. Lesões medulares estão entre as condições patológicas mais graves e mais debilitantes à saúde humana, com grande incidência em todas as regiões do mundo. A reprodução dos diferentes tipos de lesão da medula espinhal (ME) em animais de experimentação e o entendimento de sua fisiopatologia, bem como a busca de tratamentos que minimizem os danos neurológicos e estimulem a recuperação morfofuncional do indivíduo afetado são temas de grande relevância científica e clínica. Neste estudo, investigamos os possíveis efeitos neuroprotetores e/ou anti-inflamatórios do extrato supercrítico de gergelim (*Sesamum indicum L.*) em tempos agudos após lesão experimental da medula espinhal (ME) de ratos adultos. Ratos machos adultos foram submetidos à hemisseção da ME em uma mesa estabilizadora em nível de T8. Os grupos controle e sham (falso operado) foram tratados com tween a 5% (veículo) e o grupo tratado recebeu injeções intraperitoneais de extrato de gergelim (150 mg/kg dividido em duas doses diárias) em tempos agudos e sub-agudos de sobrevivência após a lesão (1, 3 e 7 dias). Foram obtidas seções de 20 µm da ME com auxílio de um criostato. Estas seções foram coradas com azul de metileno, hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de gomori, violeta de cresila e imunomarcadas por anticorpos específicos para a identificação de neutrófilos (anti-MBS-1) e micróglia (anti-ED1). Avaliou-se a força muscular por registro eletromiográfico realizados nos animais controle e tratados com gergelim, 1 e 7 dias após o trauma da ME. Os animais controle apresentaram cavitação progressiva da ME concomitante com recrutamento de neutrófilos e ativação microglial/macrofágica. O tratamento com extrato de gergelim induziu preservação tecidual e diminuição considerável do recrutamento de neutrófilos nos tempos de 1 e 3 dias após a indução da lesão experimental, o que foi confirmado por análise quantitativa ( $p < 0.05$ ). O tratamento com gergelim também diminuiu a ativação microglial/macrofágica no tempo de 7 dias após a lesão ( $P < 0.05$ ). Os registros eletromiográficos revelaram que o tratamento com gergelim induziu cerca de 50% de recuperação da força muscular em relação aos animais controle. Os resultados sugerem que o extrato de sementes de gergelim preto é anti-inflamatório, neuroprotetor e induz recuperação da força muscular em ratos adultos submetidos à trauma experimental da medula espinhal. Estudos futuros devem confirmar que fitoterápicos à base de gergelim podem ser usados como possíveis agentes neuroprotetores para tratamento da lesão da medula espinhal humana.

Palavras chave: Lesão medular; neuroproteção; extrato de gergelim; neuroinflamação

## **NEUROPROTECTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF GERGELIM (*Sesamum indicum L*) EXTRACT IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE SPINAL CORD INJURY IN RATS**

The spinal cord is a component of central nervous system (CNS) with crucial functions for locomotion, motor skills, somatosensory and autonomic control. Spinal injuries are among the more serious and debilitating pathological conditions to human health with large worldwide. The use of experimental models of spinal cord injury (SCI) is pivotal to understand the SCI pathophysiology as well as search for treatments to minimize the neurological deficits and improve functional recovery. In this work, we aimed to investigate the neuroprotective and anti-inflammatory effects of supercritical gergelim (*Sesamum indicum L.*) extract in the acute phase of SCI in adult rats. Male Adult rats were submitted to spinal cord (SC) hemisection at T8. The sham (non lesioned) and control animals were treated with 5% tween (vehicle), while treated animals received intraperitoneal (i.p) injections of Gergelim extract (150 mg/kg divided in two doses per day). Animals were allowed to recovery and were perfused at 1, 3 and 7 days post-lesion. 20  $\mu\text{m}$  sections were obtained using a cryostat and stained with methylen blue, hematoxylin-eosin (HE), trichromic of Gomori and cresyl violet for gross histopathology. In addition, sections were immunolabeled with specific antibodies against neutrophils (anti-MBS-1) and activated microglia/macrophages (anti-ED1). The muscle force was assessed through electromiographic records performed in both control and treated animals at 1 and 7 days postlesion. The control animals presented progressive SC cavitation concomitant with neutrophil recruitment and microglia/macrophage activation. The treatment with gergelim extract induced tissue preservation and considerable decrease of neutrophil recruitment at 1 and 3 days, which was confirmed by quantitative analysis (ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). The gergelim treatment also decreased the microglia/macrophage activation at 7 days (ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). The electromiographic records revealed that the gergelim treatment improved the muscular force in about 50% compared to control animals. The results suggest that black gergelim seed extract is anti-inflammatory, neuroprotective and induces muscle force recovery in adults rats submitted to acute SCI. Future studies should confirm that a phytotherapeutic obtained from black sesame extract can be used as possible neuroprotective agent for human SCI.

**Key words:** spinal cord injury, neuroprotection, gergelim extract, neuroinflammation.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1. Secção transversal da medula espinhal com coloração para mielina.	15
FIGURA 2. Desenho esquemático da lesão primária e lesão tardia.	24
FIGURA 3. Diagrama da mesa metálica utilizada para estabilizar o animal, posicionando-o “ventralmente”.	38
FIGURA 4. Diagrama corresponde ao <i>Estabilizador Vertebral Simples</i> já acoplado à <i>mesa cirúrgica</i> .	38
FIGURA 5. Diagrama da vista lateral do equipamento utilizado.	39
FIGURA 6. Foto de um animal anestesiado posicionado no estabilizador vertebral.	39
FIGURA 7. Lesão medular por hemissecção. Medula corada por hematoxilina- eosina (HE).	47
FIGURA 8. Lesão medular por hemissecção e infiltrado inflamatório em T8. Secções distais ao centro da lesão.	48
FIGURA 9. Eletromiograma (EMG): Registro dos animais do grupo Sham com contração do músculo semitendinoso durante o registro.	49
FIGURA 10. Histologia da medula espinhal intacta de ratos adultos revelada pela violeta de cresila.	50
FIGURA 11. Diminuição de cavitação e infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 1 dia após a lesão.	52
FIGURA 12. Diminuição de cavitação e infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 3 dias após a lesão.	53
FIGURA 13. Diminuição de cavitação e infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 7 dias após a lesão.	54
FIGURA 14. Diminuição do infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 1 dia após a lesão.	56
FIGURA 15. Análise quantitativa das células MBS-1+ por campo 24 hs após a hemissecção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão.	57
FIGURA 16. Diminuição do infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 3 dias após a lesão.	58
FIGURA 17. Análise quantitativa das células MBS-1+ por campo 3 dias após a hemissecção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão.	59
FIGURA 18. Micróglia/macrófagos na área de lesão medular 1 dia após a lesão.	61

FIGURA 19. Análise quantitativa das células ED1+ por campo 1 dia após a hemisseção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão.	62
FIGURA 20. Micróglia/macrófagos na área de lesão medular 3 dias após a lesão.	63
FIGURA 21. Análise quantitativa das células ED1+ por campo 3 dias após a hemisseção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão.	64
FIGURA 22. Diminuição do número de células ED1+ por campo pelo Gergelim 7 dias após a lesão.	65
FIGURA 23. Análise quantitativa das células ED1+ por campo 7 dias após a hemisseção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão.	66
FIGURA 24. Gráfico de distribuição de amplitude em registros de 5 minutos nos animais dos grupos Sham (EMG-C), controle (EMG-NT) e tratado com gergelim (EMG e EMG-T).	68
TABELA 1. Classificação das LME em relação às incidências e suas características.	19
TABELA 2. Alterações, fases da lesão e características e consequências das LME.	30
TABELA 3. Delineamento dos grupos experimentais.	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IEC – Instituto Evandro Chagas

UFPA – Universidade Federal do Pará

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

CNS – *Central Nervous System*

SB – Substância Branca

SC – Substância Cinzenta

ME – Medula Espinhal

LME – Lesão da Medula Espinhal

HE – hematoxilina-eosina

NMDA – N-metil-D-Aspartato

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropiónico

$\beta$ APP – proteína precursora de beta amiloide

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

IL-1 $\beta$  - interleucina 1 beta

IL-6 - interleucina 6

INF- $\gamma$  - interferon gama

ET-1 – endotelina 1

ERO - espécie reativa de oxigênio

AVE - Acidente Vascular Encefálico

CEPAE - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação

i.p. – intraperitoneal

H/D - altura versus diâmetro de leito

PSD - densidade de potência espectral

TG - tricrômico de gomori

PBS – solução salina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA MEDULA ESPINHAL	15
1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LESÕES NA MEDULA ESPINHAL	17
1.3 FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES DA MEDULA ESPINHAL	19
<b>Fase Aguda</b>	20
<b>Fase Subaguda</b>	22
<b>Fase Tardia</b>	23
1.4 ALTERAÇÕES VASCULARES	25
1.5 EXCITOTOXICIDADE	25
1.6 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	26
1.7 MORTE CELULAR	27
1.8 RESPOSTA INFLAMATÓRIA	27
1.9 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA LME	31
1.10 ESTRATÉGIAS FITOTERÁPICAS NEUROPROTETORAS PARA LME	32
1.11 PERGUNTA EXPERIMENTAL	33
1.12 OBJETIVOS	35
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	36
2.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	36
2.2 MODELO DE LESÃO MEDULAR	37
2.2.1 <b>Procedimento cirúrgico</b>	37
2.2.2 <b>Cuidados pós cirúrgicos</b>	39
2.3 TRATAMENTO DOS GRUPOS CONTROLE E TRATADO	40
2.4 FRACIONAMENTO/ISOLAMENTO DO EXTRATO	40
2.4.1 <b>Caracterização e Preparação da Matéria Prima</b>	40
2.4.2 <b>Obtenção dos Extratos por Fracionamento com Fluidos Supercríticos</b>	41
2.5 ELETROMIOGRAFIA DOS ANIMAIS	42
2.5.1 Análise dos Dados da Eletromiografia	42
2.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	43
2.7 IMUNOHISTOQUÍMICA	44
2.8 ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA	45
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
<b>3 RESULTADOS</b>	47
3.1 A TÉCNICA DE HEMISSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL INDUZIU MONOPLÉGIA POSTERIOR DIREITA EM T8 CONFIRMADA POR TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E FUNCIONAIS	47
3.2 TRATAMENTO COM EXTRATO DE GERGELIM DIMINUIU A ÁREA DE LESÃO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS TRATADOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE	50

3.3 TRATAMENTO COM EXTRATO DE GERGELIM DIMINUIU O INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS E A MIGRAÇÃO DE MICRÓGLIA PARA A ÁREA DE LESÃO NA MEDULA ESPINHAL _____	55
3.4 O TRATAMENTO COM GERGELIM INDUZIU RECUPERAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR NOS ANIMAIS QUE SOFRERAM HEMISSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL _____	67
<b>4 DISCUSSÃO _____</b>	<b>69</b>
4.2. O TRATAMENTO COM EXTRATO SUPERCRÍTICO DE SEMENTES DE GERGELIM PRETO DIMINUI A CAVITAÇÃO PROGRESSIVA DA MEDULA ESPINHAL E O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS _____	69
4.3 O TRATAMENTO COM EXTRATO DE GERGELIM INIBE A ATIVAÇÃO MICROGLIAL 7 DIAS APÓS A LESÃO _____	70
4.4. OS EFEITOS NEUROPROTETORES E ANTI-INFLAMATÓRIOS DO GERGELIM POSSIVELMENTE ESTÃO ASSOCIADOS À SUA AÇÃO ANTIOXIDANTE _____	71
4.5. O TRATAMENTO COM EXTRATO DE GERGELIM INDUZ RECUPERAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR APÓS LESÃO DA MEDULA ESPINHAL _____	72
<b>5 CONCLUSÃO _____</b>	<b>73</b>
<b>6 REFERÊNCIAS _____</b>	<b>74</b>
<b>ANEXOS _____</b>	<b>88</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA MEDULA ESPINHAL

De uma maneira geral o sistema nervoso humano é dividido em central e periférico. A medula espinhal e o encéfalo formam o sistema nervoso central (SNC). O sistema nervoso periférico (SNP) é formado pelos nervos periféricos e os gânglios. Anatomicamente a medula espinhal é constituída de substância branca (SB), externamente e de substância cinzenta (SC) na porção mais central, formando uma espécie de um “H” quando seccionada transversalmente (Fig. 1). A SC medular apresenta duas regiões funcionalmente distintas, os cornos ventrais (motores) e os dorsais (sensoriais). Já a SB possui três colunas orientadas rostrocaudalmente nas quais axônios ascendem ou descendem: dorsal, ventral e lateral. No centro da SC medular encontra-se o canal central da medula (ependimário), representante do sistema ventricular (MARTIN, 2003).

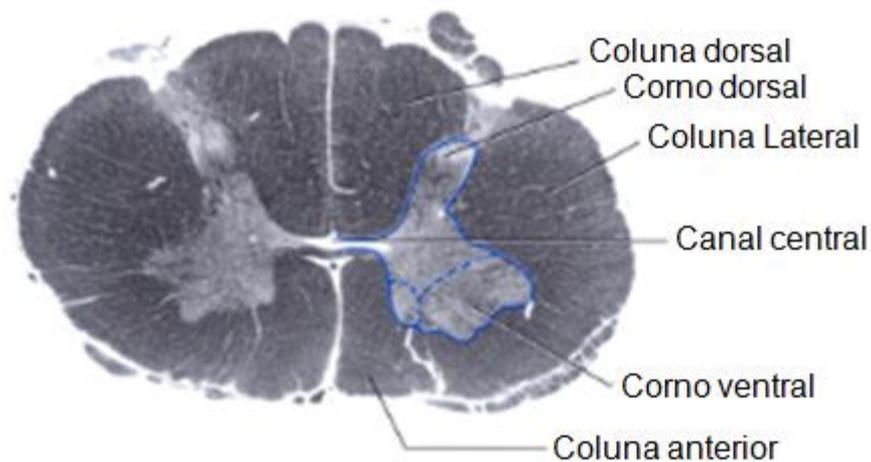


Fig. 1. Secção transversal da medula espinhal com coloração para mielina. As três partes da SB (coluna ventral, lateral e dorsal), assim como os cornos da SC (anterior e posterior) estão distintos. Adaptado de Martin (2003).

Histologicamente, a medula espinhal possui os tipos celulares característicos do sistema nervoso: neurônios e células da glia. No entanto, a organização e distribuição destas células e grupos celulares são diferentes de acordo com o local do sistema (MACHADO, 2005). As células da glia (neuroglia) abrangem cerca de 90% de todo tecido nervoso, auxiliam no suporte e na arquitetura do tecido, assim como, fornecem suporte funcional ao neurônio (HE e SUN, 2007). As células da glia são classificadas em: macróglia (astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias) e micróglia.

Os astrócitos são células com muitos prolongamentos, associadas aos processos de: suporte metabólico, secreção e captação de neurotransmissores e sustentação estrutural. Estão associadas também à resposta a danos ao sistema nervoso através de modificação do seu potencial, nestes casos são chamados de astrócitos reativos (BURDA et al., 2016). Possuem um importante papel na manutenção da água e do fluxo sanguíneo para o funcionamento do neurônio (RANSOM et al., 2003).

Oligodendrócitos estão relacionados aos mecanismos de produção da bainha de mielina para os neurônios. A perda destas células pode causar desmielinização além de obstrução axonal e, inclusive, morte celular (MATUTE, 2010). Estudos recentes mostram a existência de um quarto tipo celular glial de forma estrelada, conhecido como oligodendrócito progenitor, o qual estaria ligado aos processos de formação de novos oligodendrócitos (FERNANDEZ-CASTANEDA e GAULTIER, 2016).

As células ependimárias compõem uma camada epitelial simples de células colunares ciliadas que revestem os ventrículos e o plexo coroide (barreira hematoencefálica), produzindo o líquido cerebrospinal (BRUNI, 1998). No entanto, esta camada não é apenas um “forro” neuroepitelial inerte, está associada a regulação do transporte de íons, de pequenas moléculas e de água entre o líquido cerebrospinal e o parênquima nervoso.

Atua como uma barreira funcional a fim de proteger o tecido contra a ação de patógenos (HAUWEL et al., 2005). Muitos estudos associam as células endoteliais dos ventrículos laterais com a produção de células tronco no cérebro adulto, em situações patológicas (HAUWEL et al., 2005; MARTINO et al., 2001).

As células microgliais são macrófagos residentes do SNC e, como células do sistema imune inato, fazem parte da resposta primária à infecção e são responsáveis por iniciar o processo inflamatório (CHERRY et al., 2014). As células da micróglia são vigilantes constantes do SNC, fazendo uma varredura completa deste sistema contribuindo para a homeostase tecidual através de movimentos estocásticos de seus finos e longos processos (DAVALOS et al., 2005; GLASS et al., 2010; NIMMERJAHN et al., 2005), além de participar ativamente do processo inflamatório (GOMES-LEAL, 2012). As células da micróglia respondem a danos ao SNC, com ações benéficas e prejudiciais (GOMES-LEAL, 2012).

Várias citocinas são capazes de estimular a micróglia (neurotransmissores e neurotoxinas, proteases e moléculas da matriz extracelular, por exemplo) provenientes, em grande parte, de locais do sistema nervoso que estejam sofrendo alguma agressão. Desta forma, vão funcionar como células apresentadoras de antígenos, interagindo com linfócitos T que atravessam a barreira hematoencefálica e penetram no SNC (MATUTE, 2010).

## 1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LESÕES NA MEDULA ESPINHAL

Lesões medulares são responsáveis por danos neurológicos permanentes que variam de pequenos déficits até quadros mais graves como paraplegia, tetraplegia e até morte. As lesões da medula espinhal (LME) destacam-se entre as maiores causas de incapacidades funcionais e morte após trauma em diversas regiões do mundo (NORENBERG et al.,

2004; SONNTAG e VOLMER, 2004). O número de pessoas vivas nos Estados Unidos com LME até 2007 está estimado em aproximadamente 255.702 (NSCISC e CENTER, 2008). O entendimento da incidência e prevalência dos traumas da medula espinhal é importante por causa das suas consequências pessoais, psicológicas e sócio-econômicas a curto, médio e longo prazo aos indivíduos lesados (WYNDAELE e WYNDAELE, 2006). Os pacientes com LME representam um custo alto para o sistema de saúde, não apenas na fase aguda, mas também nos primeiros anos após a lesão, geralmente por problemas secundários à lesão medular como internações por infecções urinárias e úlceras de decúbito, serviços de assistência, além de acompanhamento psicológico (DRYDEN et al., 2004).

No Brasil, poucos estudos mostraram o real cenário da incidência das LME, no entanto, estima-se que ocorram, por ano, cerca de 10.000 novos casos de lesões medulares, sendo o trauma a causa predominante com um índice médio de 71 novos casos por milhão de habitantes/ano (MASINI, 2000; 2001). Estes resultados superam a maioria dos dados estatísticos publicados por outros países em relação a incidência de lesões medulares que é por volta de 40 novos casos por milhão de habitantes/ano (BLUMER e QUINE, 1995). Em relação ao gênero, a incidência é maior em homens que em mulheres (CAMPOS et al., 2008; ZANINELLI et al., 2005), sendo a faixa etária mais atingida entre os homens de 21 a 30 anos (CAMPOS et al., 2008; FREITAS, 1990; MASINI et al., 1995; MCKINLEY et al., 1999) e entre as mulheres antes dos 30 anos (BOTELHO, R. V. et al., 2001). Dentre as principais causas de lesões medulares estão: quedas (40%), acidentes automobilísticos (25%), ferimento por armas de fogo (7%), mergulhos em águas rasas (3%) e agressões (2%) (CAMPOS et al., 2008). Estudos prévios são bastante discrepantes em relação às causas de LME (BARROS FILHO et al., 1990; CARODOZO-GONZALES et al., 2001).

### 1.3 FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES DA MEDULA ESPINHAL

A classificação das lesões medulares em relação ao segmento acometido é feita de duas maneiras: cervicais e toracolombares, sendo as lesões cervicais encontradas com maior prevalência na literatura (FRANKEL et al., 1969; KANNUS et al., 2000; MELLO et al., 2004; VAN ASBECK et al., 2000), mesmo que em outros estudos o contrário tenha sido sugerido (CAMPOS et al., 2008; SPOSITO et al., 1986). Lesões medulares graves (cervicais) em que há maior risco de invalidez ocorrem em indivíduos jovens que representam força de trabalho significativa da sociedade, elevando, portanto, os gastos públicos no suporte a tais vítimas (BARSS et al., 2008; DEFINO et al., 2000).

Trabalhos anteriores (BUNGE et al., 1993; NOREMBERG et al., 2004) apresentaram uma classificação geral para as LME em humanos, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Classificação das LME em relação às incidências e suas características (BUNGE et al., 1993; NOREMBERG et al., 2004).

<b>Tipo de lesão</b>	<b>Incidência de casos (%)</b>	<b>Características</b>
<b>Lesão Medular Sólida</b>	10	Anatomicamente normal, porém, apresenta alterações histológicas importantes.
<b>Contusão/Cavitação</b>	49	Apresenta áreas de hemorragia e necrose no parênquima medular.
<b>Laceração</b>	21	Típica descontinuidade anatômica da medula, provocada por corte.
<b>Compressão maciça</b>	20	Maceração da medula espinhal de diversos graus.

Estudos recentes apontam que os modelos experimentais para LME têm melhorado o conhecimento da fisiopatologia destas lesões e proporcionado oportunidades para buscar estratégias terapêuticas *in vivo* (SU et al., 2015). Importantes metodologias para reprodução de LME têm sido desenvolvidas utilizando pequenos animais como modelo experimental, principalmente ratos (MARQUES et al., 2009).

Ensaio clínico na área da neuropatologia têm determinado critérios para a classificação temporal das LME, em três fases: aguda, subaguda e tardia.

### **Fase Aguda**

O trauma raquimedular agudo é comumente dividido em primário e secundário. Danos primários advêm da lesão inicial à coluna vertebral e são caracterizados pela destruição do tecido. Após a lesão primária, a medula espinhal sofre uma sequência de modificações patológicas progressivas (danos secundários) incluindo hemorragias, edemas, necrose neuronal, fragmentação axonal, desmielinização e formação de vacúolos (GOMES-LEAL et al., 2002; JOAKIM et al., 2010; KAYSER et al., 1996). Os primeiros eventos fisiopatológicos induzem a despolarização da membrana, consequentemente abertura de canais iônicos dependentes de voltagem (Na, K, Ca), os quais levam à liberação de uma variedade de neurotransmissores, dentre eles o glutamato, o qual pode provocar a abertura de canais iônicos em receptores de glutamato (N-metil-D-Aspartato - NMDA,  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico - AMPA,...), causando várias consequências, dentre elas o acúmulo de  $Ca^{2+}$  no meio intracelular, o que inicia uma cadeia de efeitos danosos como disfunção mitocondrial, o que leva a falhas no metabolismo energético além de acúmulo de lactato, ativação da síntese de óxido nítrico mitocondrial e citoplasmático, ativação de fosfolipase  $A_2$ , levando à vasoconstrição e agregação de leucócitos polimorfonucleares e entrada de macrófagos, a peroxidação

lipídica, resultante da reação do radical superóxido com óxido nítrico durante a disfunção mitocondrial, é o mecanismo chave para o rompimento da membrana celular (BRAUGHLER e HALL, 1989; HALL e BRAUGHLER, 1993; HALL e SPRINGER, 2004). Até 30 minutos após a lesão medular ocorrem pequenas hemorragias nos espaços perivasculares e mudanças nos padrões axonais, 1 hora após a lesão pode-se observar danos na região da substância cinzenta (SC), a substância branca (SB) se separa da SC no centro necrótico, como consequência, ocorre a formação de edema espongiiforme (CARLSON e GORDEN, 2002). Estudos prévios fizeram a descrição desses vacúolos utilizando microscopia eletrônica de transmissão após lesão excitotóxica (NMDA) na medula espinhal de ratos machos adultos 3 dias após a lesão (GOMES-LEAL et al., 2004).

O acúmulo de organelas como mitocôndrias, lisossomos e neurofilamentos incluindo a proteína precursora de beta amiloide ( $\beta$ APP) além de edema são as principais características fisiopatológicas das lesões axonais da SB quatro horas após a lesão primária (GENTLEMAN et al., 1993). Em cerca de 8 horas após a lesão medular, o dano, que inicialmente era mais evidente na SC, atinge a SB, células gliais parecem estar afetadas da mesma maneira a esse ponto (BRUCE et al., 2000).

O mecanismo de auto regulação do fluxo sanguíneo na medula espinhal após a lesão traumática aguda é danificado (SENER e VENES, 1979). Em circunstâncias normais a medula espinhal autorregula o fluxo sanguíneo em uma faixa de pressão semelhante à do cérebro (50-130 mm/Hg) (MARCUS et al., 1977). Com a perda da auto regulação, o fluxo sanguíneo regional nas extremidades dos capilares se torna passivamente dependente da pressão sanguínea decorrente da circulação arterial sistêmica, os vaso espasmos promovem aumento do acúmulo de neurotransmissores (noradrenalina, dopamina, serotonina, dentre outros), o que pode restringir ainda mais o fluxo sanguíneo e comprometer a chegada de oxigênio ao ambiente isquêmico. (FADEN

et al., 1981). É estabelecido que após trauma da medula espinhal, o aumento do fluxo sanguíneo ocorre primeiro na SB e depois na SC (SCHWAB e BARTHOLDI, 1996).

As alterações bioquímicas relacionadas à LME baseiam-se principalmente no fluxo iônico através da membrana das células neuronais, aumentando a concentração de sódio e cálcio no meio intracelular. Esse desequilíbrio no interior da célula resulta em acidose intracelular e morte celular por edema citotóxico. Um aumento do cálcio intracelular pode levar à formação de radicais livres pela célula, substância que pode lesionar ou mesmo destruir a membrana celular, favorecendo assim a agregação de plaquetas, vaso espasmos, e liberação de enzimas lisossomais (ANDERSON, 1992; BRAUGHLER e HALL, 1992; BRAUGHLER et al., 1985; BRAUGHLER et al., 1987; HALL e BRAUGHLER, 1993; HALL et al., 1992).

### **Fase Subaguda**

A fase subaguda é caracterizada, principalmente, pelo início da resposta inflamatória com ativação microglial e astrocitária, recrutamento de neutrófilos, células de Schwann, meníngeas e fibroblastos (GOMES-LEAL et al., 2005; SCHNELL et al., 1999). As células de Schwann migram para a área de lesão assim como células meníngeas e fibroblastos durante a LME (FAWCETT e ASHER, 1999; LI, Y. et al., 1999b; SCHWAB e BARTHOLDI, 1996). Dentre as diversas tentativas promovidas pelo sistema nervoso a fim de atenuar os danos promovidos pela lesão medular está a indução da remielinização, que pode estar relacionada à migração das células de Schwann do sistema nervoso periférico para o centro da lesão no SNC, já que estas produzem mielina para os axônios dos nervos (KAKULAS, 1999). Os fibroblastos estão envolvidos nos mecanismos de cicatrização das estruturas não neurais (ECLANCHER et al., 1996), além

da liberação de citocinas envolvidas na estimulação do processo de neovascularização do parênquima medular lesado (LOY et al., 2002).

### **Fase Tardia**

A fase tardia ocorre após semanas ou meses desde a lesão medular primária. Nesta fase o processo inflamatório já cessou. Neste período, ocorre o aparecimento de uma cavidade marcando o sítio da lesão primária. Duas semanas após a lesão ocorre o aparecimento da cicatriz glial, constituída por proliferação de astrócitos e/ou células do mesoderma (FAWCETT e ASHER, 1999). A degeneração da SB é um evento importante a ser observado na fase tardia da LME. Alguns estudos demonstraram danos à SB na fase crônica tanto provocados por LME quanto por doenças degenerativas, demonstrando ainda que a desmielinização se inicia logo após a lesão primária e atinge um pico por volta de duas semanas depois (BLIGHT, 1985; YAMAURA et al., 2002). Outros estudos com microscopia eletrônica de transmissão revelam que a desmielinização na fase tardia da LME não, necessariamente, provoca o rompimento do axônio envolvido, sendo este relacionado diretamente ao trauma físico inicial (ANTHES et al., 1995). As desmielinizações na fase secundária da LME podem estar relacionadas a mecanismos excitotóxicos devido à presença de receptores de NMDA na SB e em células da glia (astrócitos e oligodendrócitos). Estes receptores poderiam ser ativados por concentrações patológicas de glutamato no meio extracelular, lesando a bainha de mielina, mas não diretamente os axônios (GARCIA-BARCINA e MATUTE, 1998; GOMES-LEAL et al., 2005; MATUTE et al., 2001).

Alguns estudos sugerem que a desmielinização mais grave pode apresentar uma prevalência maior em alguns pontos da SB da medula espinhal, apesar de estar presente nos três funículos (ventral, dorsal e lateral), sendo que o lateral parece estar mais

vulnerável à desmielinização e perda axonal (HAYES e KAKULAS, 1997). A figura 2 revela as características mais marcantes entre os mecanismos fisiopatológicos ocorridos na fase aguda e na fase crônica das LME.

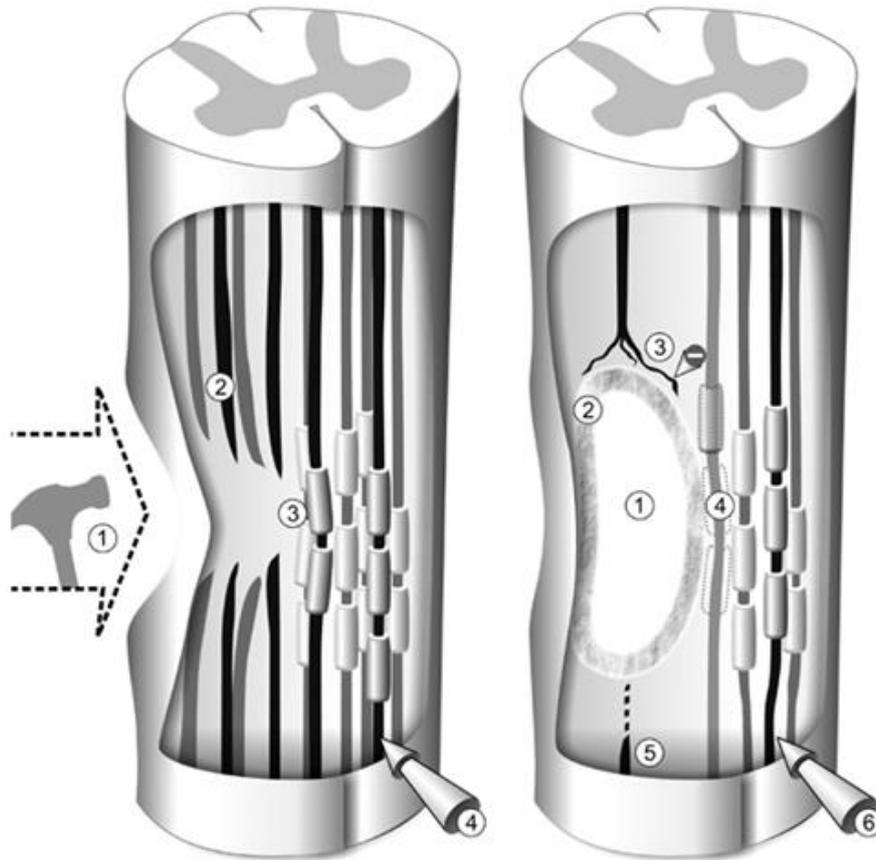


Fig. 2. Desenho esquemático da lesão primária (à esquerda) e lesão tardia (à direita). À esquerda: 1. Impacto, 2. Axônios lesionados, 3. Contusão axonal, 4. Influxo de células inflamatórias. À direita: 1. Centro da cavidade, 2. Cicatriz tecidual, 3. Inibição de regeneração axonal, 4. Desmielinização, 5. Retração axonal, 6. Influxo de células inflamatórias. Figura adaptada (RONSYN et al., 2008).

#### 1.4 ALTERAÇÕES VASCULARES

Durante a produção do dano primário, a microvasculatura da região medular afetada é rompida, levando ao surgimento imediato de petéquias hemorrágicas e trombose intravascular, com subsequentes alterações vasomotoras (vaso espasmos) e edema, resultando em isquemia tecidual (KOYANAGI et al., 1993).

A SC é a região medular primeiramente e mais afetada pelo desequilíbrio vascular das LME, fato possivelmente explicado pela alta demanda metabólica dos corpos dos neurônios além da perda de mecanismos auto reguladores do controle hemodinâmico. Este fato ocasiona uma reperfusão vascular na região isquêmica, o que pode promover um acúmulo de radicais livres derivados de oxigênio, aumentando assim a lesão secundária (KWON et al., 2004).

#### 1.5 EXCITOTOXICIDADE

Excitotoxicidade é o termo utilizado para se referir à morte celular mediada, principalmente, por glutamato. (OLNEY, 1990). O aminoácido L-glutamato é considerado o principal mediador de sinais excitatórios no SNC dos mamíferos e é envolvido com funções cerebrais normais como cognição, memória e aprendizagem (FONNUM, 1984; HEADLEY e GRILLNER, 1990). Este aminoácido excitatório se liga a três principais tipos de receptores ionotrópicos pós-sinápticos: NMDA, Cainato e AMPA, além de receptores metabotrópicos envolvendo a participação da proteína G (CONN e PIN, 1997).

O glutamato apresenta uma maior concentração no meio intracelular, entretanto, sua presença no meio extracelular e na fenda sináptica é rigorosamente controlada por importantes mecanismos envolvendo enzimas e transportadores deste aminoácido em neurônios e células da glia (DANBOLT, 2001). Em algumas condições patológicas no

sistema nervoso, incluindo as LME, estes mecanismos falham em manter as concentrações de glutamato no meio extracelular, elevando assim seus níveis em relação às condições fisiológicas, o que irá induzir morte celular por excitotoxicidade (MELDRUM, 2000). As lesões neuronais provocadas pelo aumento da concentração de glutamato apresentam dois padrões dependendo da fase em que são desencadeadas: a lesão inicial caracterizada por edema, alguns minutos após a lesão neuronal (mediada pela presença de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ), e a lesão tardia caracterizada por morte neuronal algumas horas após a lesão (dependente de  $\text{Ca}^{++}$ ) (CHOI, 1985). Na SB da ME os receptores AMPA/cainato podem ser mais importantes que os de NMDA como mediadores de morte neuronal (AGRAWAL e FEHLINGS, 1996; AGRAWAL et al., 1998; LI, S. et al., 1999a).

#### 1.6 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Um dos principais mecanismos secundários após LME é o ataque de radicais livres à membrana celular, um mecanismo prejudicial que promove alteração de todos os componentes celulares incluindo ácidos graxos insaturados por processos de peroxidação lipídica (HALL e BRAUGHLER, 1989; SUN, 1990). O SNC é especialmente sensível a radicais livres devido à alta taxa metabólica, altos níveis de lipídios polinsaturados, além de seu relativamente baixo nível de sistema protetor. No entanto, a atividade de enzimas antioxidantes é baixa em comparação com a de outros tecidos corporais (ASPBERG e TOTTMAR, 1994).

Após a lesão da SC, radicais livres são parcialmente gerados por células inflamatórias presentes na área da lesão pós-trauma. Estas células inflamatórias liberam nitrogênio reativo e espécies intermediárias derivadas de oxigênio (POPOVICH et al., 1997).

## 1.7 MORTE CELULAR

Os mecanismos de morte celular podem estar relacionados tanto aos danos primários quanto aos secundários nas LME, sendo representados, morfológicamente, por duas vias distintas: necrose e apoptose. A morte celular por necrose ocorre por ruptura mecânica da célula, ou mesmo por dano celular que pode ocorrer passivamente durante a cascata de alterações secundárias, já a morte celular por apoptose é considerada fisiológica ou programada que parece ser uma resposta ativada por indução celular a um estímulo específico (ABRAMS et al., 1993; LEE et al., 2004). A participação de enzimas conhecidas como caspases promovem a clivagem de proteínas nucleares e do citoesqueleto levando a célula a ser decomposta durante a apoptose (KWON et al., 2004). Evitar mortes celulares por necrose é improvável, já que o impacto mecânico atinge diretamente a estrutura celular, entretanto, as células da penumbra, as quais não são diretamente lesadas, estão sujeitas a apoptose por mecanismos secundários de lesão (KWON et al., 2004). O influxo excessivo de  $Ca^{++}$  é um evento determinante para a morte celular mediada por concentrações de glutamato e seus agonistas (MELDRUM, 2000; 2002).

## 1.8 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

O sistema imune tanto em tecidos neurais como em não neurais, possui componentes inatos e específicos. Em termos gerais, denomina-se imunidade inata a um grupo de respostas estereotipadas que constituem a primeira linha de defesa contra agentes lesivos. Este tipo de imunidade não possui especificidade ou capacidade de memória. Denomina-se imunidade específica a um grupo de respostas imunes específicas para um determinado antígeno com capacidade de memória (ABBAS e JANEWAY, 2000; JADIDI-NIARAGH e MIRSHAFIEY, 2010).

Dotada de uma grande variedade de receptores imunológicos, tais como: receptores *toll-like*, NOD, *NOD-like*. Estas células possuem a capacidade de reconhecer estímulos maléficos e produzir citocinas inflamatórias, incluindo: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interferon gama (INF- $\gamma$ ), as quais são importantes mediadores inflamatórios (BOCHE et al., 2013; RANSOHOFF e PERRY, 2009; RANSOHOFF e BROWN, 2012).

Entender o papel específico da micróglia ao longo do curso da inflamação do sistema nervoso exige o conhecimento dos seus fenótipos. Fenotipicamente, a micróglia é classificada em tipo M1 e tipo M2 (GENSEL et al., 2009; GOMES-LEAL, 2012; KIGERL et al., 2009), os quais estão, respectivamente, associados a eventos de citotoxicidade e resposta inflamatória, enquanto que o segundo fenótipo é reconhecido pelo papel benéfico após condições patológicas, podendo ainda ser subdividida em M2a, envolvida em reparo e regeneração, M2b imunoreguladora e ainda a M2c, relacionada a desativação específica (CHHOR et al., 2013; GENSEL e ZHANG, 2015; HU, X. et al., 2012).

Os componentes celulares do sistema imune inato são os fagócitos, tais como macrófagos e neutrófilos, e para o sistema imune específico são os linfócitos. Além de ser a primeira linha de defesa do organismo contra agentes lesivos, o sistema imune inato possui outras funções importantes. Este sistema age em sinergismo com o sistema imune específico contribuindo para a indução de seus componentes e, ao mesmo tempo, sendo aperfeiçoado por ele. Por exemplo, macrófagos podem sintetizar e liberar citocinas em resposta a um estímulo lesivo, os quais induzem ativação de linfócitos. Linfócitos, por sua vez, podem liberar moléculas que podem ativar mais macrófagos. A opsonização de patógenos por proteínas do complemento (componentes humorais do sistema inato) pode induzir a síntese de anticorpos pelos linfócitos B (ABBAS e JANEWAY, 2000).

No SNC, interações similares ocorrem entre os componentes dos dois tipos de sistema imune (MATYSZAK, 1998). Como mencionado anteriormente, acredita-se que alguns componentes celulares da resposta inflamatória podem contribuir para o aumento da área de lesão secundária após lesão do SNC (BLIGHT, 1992; 1994; BLIGHT e ZIMBER, 2001; POPOVICH et al., 1999).

O processo inflamatório no restante do corpo ocorre quando as células da imunidade inata identificam o patógeno natural (vírus, bactéria, fungo, protozoário) e ativam os linfócitos t através de mediadores químicos, os quais se dirigem ao local onde se encontra o agente agressor (OYOSHI ET AL., 2011). No sistema nervoso as células dendríticas são encontradas na região das meninges, no plexo coroide, líquido cérebrospinal e na barreira hemato-encefálica, as quais são de origem hematogênica (PRODINGER ET AL., 2011), assim, uma vez que a micróglia detecta a presença de uma substância potencialmente maléfica, ela é ativada, assim como os macrófagos, a micróglia participa diretamente do processo inflamatório, a fim de proteger o sistema nervoso (CHERRY ET AL., 2014).

A tabela 2 demonstra uma relação de das alterações descritas com a fase da lesão e suas características.

Tabela 2. Alterações, fases da lesão e características e consequências das LME.

<b>Alteração</b>	<b>Fase da Lesão</b>	<b>Características/Consequências</b>
Alterações Vasculares	Primária/Secundária	Hemorragia, vaso espasmo, trombose, rompimento da barreira hematoencefálica, infiltrado de células inflamatórias, edema, necrose e isquemia (BAREYRE e SCHWAB, 2003; SILVA, N. A. et al., 2014).
Formação de radicais livres e peroxidação lipídica	Secundária	Redução do fluxo sanguíneo para a medula espinhal, edema, resposta inflamatória e perda de função neuronal (HALL e BRAUGHLER, 1982).
Quebra do equilíbrio iônico de $K^+$ , $Na^+$ e $Ca^{2+}$	Primária/Secundária	Morte celular (STYS, 1998).
Excitotoxicidade	Primária/Secundária	Morte celular pelo aumento da estimulação de receptores excitatórios (glutamato) (LIU et al., 1999; MCADOO et al., 1999).
Apoptose	Secundária	Morte celular programada de neurônios, oligodendrócitos, micróglia e, talvez, astrócitos. Leva a desmielinização e danos aos tratos medulares (BEATTIE et al., 2000; SILVA, N. A. et al., 2014).
Resposta Inflamatória	Primária/Secundária	Aumento de citocinas e espécie reativa de oxigênio (ERO) em decorrência do infiltrado de leucócitos, aumentando a inflamação e lesionando o sistema nervoso (DONNELLY e POPOVICH, 2008).

Algumas drogas e fitoterápicos têm sido testadas, inclusive algumas em humanos, com o objetivo de minimizar os efeitos das lesões secundárias no tecido nervoso, proporcionando neuroproteção, tais como: metilprednisolona, gangliosidose GM1,

hormônio liberador de tireotropina, nimodipina, gaciclidina, estrogênio e minociclina (LAJTHA, 2009).

### 1.9 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA LME

A busca por um tratamento farmacológico adequado capaz de minimizar os danos neurodegenerativos provocados pela LME tem sido um desafio para os cuidados à saúde em decorrência dos prejuízos primários e secundários provocados pela lesão (NASIRINEZHAD et al., 2015). Os glicocorticoides esteroidais, principalmente a metilprednisolona, começaram a ser utilizados para o tratamento clínico de pacientes com LME desde a década de 1970 (ALBAYRAK et al., 2015). Este fármaco tem sido associado aos tratamentos para humanos e animais acometidos por LME em decorrência dos seus efeitos neuroprotetores (BRACKEN, 1992). A utilização deste alopático em altas doses desencadeia uma série de fatores no sistema nervoso, os quais interromperam alguns eventos neurodegenerativos durante as lesões primárias e secundárias da LME, como: inibição da isquemia pós traumática, atenuação da permeabilidade vascular, diminuição da resposta inflamatória, recuperação neurológica, suporte energético aeróbico e ação antioxidante (BEHRMANN et al., 1994; FAROOQUE et al., 1996; HOLTZ et al., 1990; XU et al., 1992; XU et al., 2001). Entretanto, esse tratamento apresenta limitações, pois prioriza os cuidados de suporte decorrentes dos mecanismos complexos da LME (NASIRINEZHAD et al., 2015).

Outros fármacos têm sido testados em pesquisa para como opção para o tratamento das LME, como a dexmedetomidina que possui um efeito análogo à metilprednisolona (CELIK et al., 2013). O riluzol, que é um anticonvulsivante utilizado para o tratamento de esclerose lateral amiotrófica, também tem sido testado em pacientes com LME, apontando alguma melhora clínica (WILSON e FEHLINGS, 2014). A

minociclina, um antibiótico da família das tetraciclinas, tem sido testada como estratégia terapêutica para fases agudas da LME em ratos, apesar de seus efeitos neuroprotetores serem bastante questionados (ARAS et al., 2015). Entretanto, a metilprednisolona é o único medicamento indicado para o tratamento das lesões medulares na fase aguda.

#### 1.10 ESTRATÉGIAS FITOTERÁPICAS NEUROPROTETORAS PARA LME

Muitos trabalhos buscam alternativas fitoterápicas para o tratamento de lesões no sistema nervoso, seja no encéfalo ou na medula espinhal. Para estratégias relacionadas à LME, poucos estudos testaram a administração de extratos como o açafrão da Índia (KIM et al., 2014) e a Ginkgo biloba (AO et al., 2006) como fitoterápicos com efeitos neuroprotetores.

A copaíba (*Copaifera* sp.) é uma planta nativa da América Latina e do oeste africano. A forma de uso mais utilizada pela população é o óleo da sua raiz. No Brasil este óleo é utilizado para tratamento de algumas patologias (BOTELHO et al., 2015). Estudos prévios relacionaram positivamente o uso do óleo de copaíba a efeitos anticancerígenos em metástase pulmonar (LIMA et al., 2003), atividade antiparasitária no combate à tripanossomíase (IZUMI, E. et al., 2012), além de efeito anti-inflamatório e neuroprotetor no sistema nervoso central de ratos após dano agudo (GUIMARAES-SANTOS et al., 2012).

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é uma planta cultivada há centenas de anos para obtenção de suas sementes, as quais são utilizadas, sobretudo, para alimentação e como condimentos. O gergelim possui um grande potencial de cura de algumas patologias quando administrado oral ou topicamente (KIRAN e ASAD, 2008). Existem evidências de que as sementes de gergelim em forma de extrato possuem propriedades antioxidantes (HU, Q. et al., 2004). Um trabalho publicado por Botelho e colaboradores (2014) revelou

indícios de efeitos neuroprotetores promovidos pela semente do gergelim em forma de extrato supercrítico no estriato de ratos, após lesão química induzida por endotelina-1 (ET-1).

### 1.11 PERGUNTA EXPERIMENTAL

Inexistem tratamentos farmacológicos ou com terapia celular para minimizar os danos neurais que ocorrem após LME humana (SILVA, G. S. e VALIENTE, 2014). O único tratamento aprovado em humanos utiliza altas doses de metilprednisolona (YOUNG e BRACKEN, 1992; YOUNG et al., 1988) o que é pouco eficaz e está caindo em desuso no Brasil.

Considerando a alta incidência de novos casos de LME e os altos custos sociais e econômicos já mencionados, é fundamental o desenvolvimento de terapias para trauma da ME humana. Inúmeras drogas potencialmente alopáticas foram testadas para este fim, com sucesso parcial em animais de experimentação, mas com insucesso em humanos (KWON et al., 2010). Considerando o insucesso de drogas alopáticas, o uso de fitoterápicos com ação neuroprotetora é uma interessante possibilidade terapêutica. Em Nosso laboratório, demonstramos que o tratamento com óleo de copaíba induz neuroproteção concomitante com um potente efeito anti-inflamatório após lesão excitotóxica focal do corte motor de ratos adultos (GUIMARAES-SANTOS et al., 2012). Em outro estudo, realizou-se extração com fluido supercrítico e avaliou-se os efeitos neuroprotetores do óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) em ratos submetidos a modelos de acidente vascular encefálico (AVE) experimental. Os resultados sugerem que a ação

do extrato de copaíba promoveu uma redução da inflamação no tecido cerebral afetado, diminuindo a lesão tecidual (BOTELHO ET AL, 2015).

Outro estudo do nosso grupo (BOTELHO, ET AL., 2014) investigou parâmetros químicos e os possíveis efeitos neuroprotetores do extrato de semente de gergelim (*Sesamum indicum L.*) obtido por extração com fluido supercrítico após isquemia focal induzida por microinjeções de ET-1 no córtex motor. Os resultados deste sugerem que o extrato de gergelim é neuroprotetor após AVE experimental.

Apesar dos resultados descritos acima, inexitem estudos que tenham investigado as ações neuroprotetoras e anti-inflamatórias do extrato de gergelim em modelos experimentais de lesão aguda da ME. Nesta tese, induziremos lesão traumática da ME de ratos adultos para investigarmos os efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios do extrato de gergelim em tempos agudos após a indução de trauma experimental da ME.

## 1.12 OBJETIVOS

### GERAL

Investigar os possíveis efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios, bem como a recuperação funcional subsequente, do extrato de gergelim em tempos agudos após lesão aguda da medula espinhal de ratos adultos.

### ESPECÍFICOS

- a. Descrever qualitativamente e quantitativamente os padrões lesivos após lesão traumática experimental em ratos adultos;
- b. Investigar os efeitos do extrato de gergelim sobre a área de lesão, infiltrado neutrofílico e microgliose em tempos agudos no modelo experimental proposto;
- c. Investigar o efeito do tratamento com extrato de gergelim sobre a recuperação funcional após lesão experimental da medula espinhal utilizando registro eletrofisiológico do músculo.

## 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Ratos Wistar machos adultos (250-300g) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Pará. Todos os animais foram alojados sob condições padronizadas, com alimentos e água disponíveis *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com os princípios e normas sob cuidados com animais de laboratório e/ou experimentação (NIH Publication No. 86-23, revisado 1985) e com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA/BIO 137-13 – ver anexo), órgão responsável pelo acompanhamento dos procedimentos realizados em animais de experimentação. Foram feitos todos os esforços para evitar o estresse e sofrimento dos animais.

Os grupos experimentais foram divididos e classificados na tabela 3:

Tabela 3: Delineamento dos grupos experimentais.

<b>GRUPO</b>	<b>EXPERIMENTO</b>	<b>ANIMAIS (n)</b>
<b>1</b>	<b>FALSO OPERADO (SHAM)</b> – Animais submetidos ao procedimento cirúrgico (lamnectomia), contudo, sem lesão medular.	5
<b>2</b>	<b>CONTROLE (CO)</b> – Animais lesionados, tratados com solução veículo (tween).	9 (3-24 hs; 3–3 dias; 3–7 dias)
<b>3</b>	<b>GRUPO TRATADO (EG1)</b> – Animais lesionados e tratados com extrato de gergelim, a 24hs.	5
<b>4</b>	<b>GRUPO TRATADO (EG2)</b> – Animais lesionados e tratados com extrato de gergelim, a 3 dias.	5
<b>5</b>	<b>GRUPO TRATADO (EG3)</b> – Animais lesionados e tratados com extrato de gergelim, a 7 dias.	5
	<b>TOTAL</b>	29

## 2.2 MODELO DE LESÃO MEDULAR

### 2.2.1 Procedimento Cirúrgico

Ratos Wistar machos adultos (ratos 250-300g) foram anestesiados inicialmente com cetamina (90mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg,i.p) injeção intraperitoneal. O plano anestésico foi mantido até um nível no qual o reflexo de retirada de pata e corneano foram abolidos. Foi realizada a tricotomia no segmento do terço médio da região dorsal do animal, entre as porções cervical e lombar da coluna vertebral, além de assepsia do local da incisão.

Em seguida, os ratos foram posicionados numa plataforma de ferro galvanizado, fixada na mesa cirúrgica (figuras: 3-6). Uma incisão em sentido longitudinal no plano mediano de aproximadamente 2 cm foi feita na pele (região dorsal) expondo a tela subcutânea e a musculatura do animal. A musculatura paravertebral foi rebatida e a coluna vertebral do animal foi exposta. Em seguida foi realizada uma laminectomia em nível da vértebra T8, com o auxílio de um alicate cirúrgico de precisão, expondo o tecido nervoso da medula espinhal. As análises da abertura do campo cirúrgico, laminectomia e lesão medular ao nível de T8 foram realizadas com auxílio de microscópio cirúrgico (DFV Vasconcelos S.A. – São Paulo). Após o rebatimento da dura-máter, realizou-se uma hemissecção com auxílio de uma lâmina de bisturi. Neste procedimento evitou-se sangramento excessivo da parte posterior da medula espinhal e vasos médios. A incisão dorsal foi fechada com utilização de fio de sutura (monofilamento preto-TECHNOFIO-Nylon 4-0) não absorvível acoplado a uma agulha cirúrgica de aço inoxidável (tamanho: 15 mm; Espessura 0,5 mm; série-AISI 420). Durante a cirurgia, a temperatura do corpo foi mantida a 36,0-37,0°C por exposição a uma lâmpada incandescente.

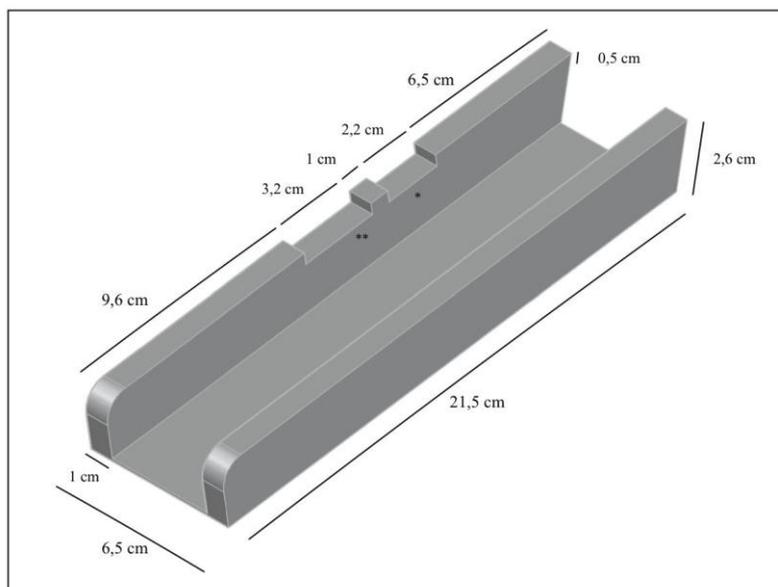


Figura 3 – Diagrama da mesa metálica utilizada para estabilizar o animal, posicionando-o “ventralmente”. \*Intervalo das vértebras cervicais. \*\*Intervalo das vértebras torácicas.

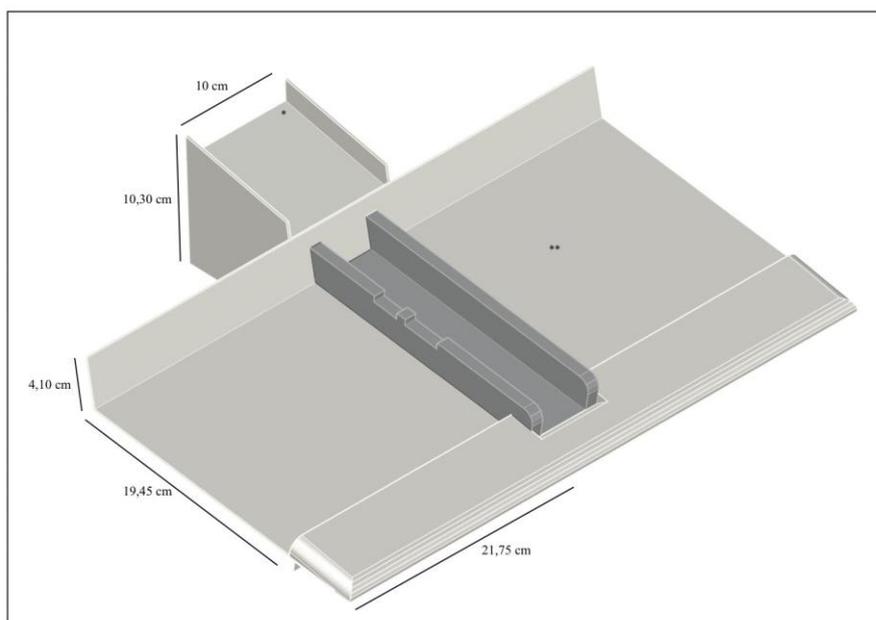


Figura 4 - Diagrama corresponde ao *Estabilizador Vertebral Simples* já acoplado à *mesa cirúrgica*. O conjunto foi usado para os procedimentos cirúrgicos.

\*Área designada para o suporte de iluminação. \*\*Área designada para o material cirúrgico.

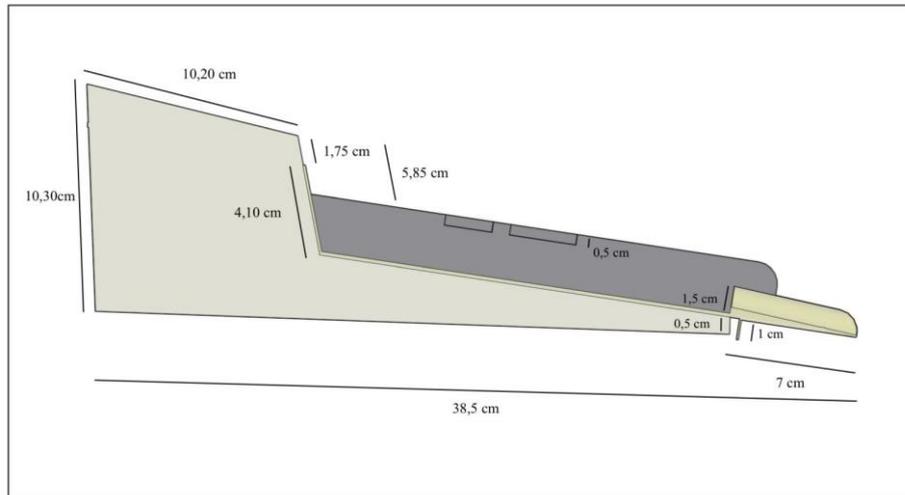


Figura 5 - Diagrama da vista lateral do equipamento utilizado.

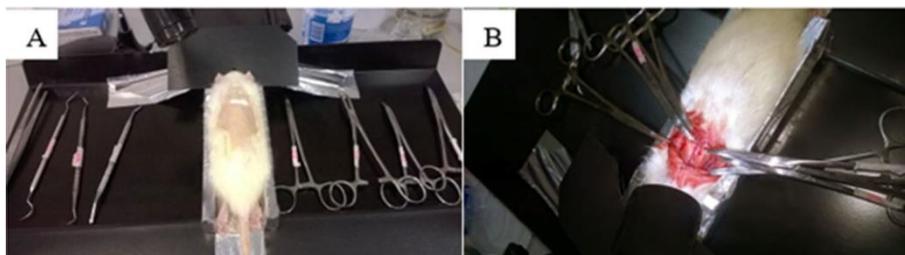


Figura 6 – Foto de um animal anestesiado posicionado no estabilizador vertebral. (A); apresentação do animal durante o procedimento cirúrgico (B).

### 2.2.2 Cuidados pós cirúrgicos

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas-padrão individuais. Durante os tempos de sobrevivência investigados, os animais foram monitorados quanto à alimentação, consumo de água e função excretora (com auxílio de massagem vesical). Todos os animais receberam aplicação tópica de Nebacetin® (Sulfato de neomicina 5mg/g; bacitracina zínica 250UI/g).

## 2.3 TRATAMENTO DOS GRUPOS CONTROLE E TRATADO

O grupo experimental tratado recebeu uma dose total diária de 150 mg/kg de extrato de gergelim, dividida em duas doses diárias de 75 mg/kg a cada período de 12 horas.

Os animais dos grupos EG1, EG2 e EG3 receberam a primeira dose imediatamente após o término do procedimento cirúrgico que ocasionou a lesão medular. O mesmo esquema experimental foi utilizado para os animais controle (CO), mantendo-se assim os períodos e as doses estabelecidas para os animais tratados, entretanto, estes receberam o veículo (tween).

Este ciclo garantiu aos grupos que recebessem a última dose do extrato de gergelim 12 horas antes da perfusão.

## 2.4 FRACIONAMENTO/ISOLAMENTO DO EXTRATO

### 2.4.1 Caracterização e Preparação da Matéria Prima

Estes procedimentos foram adaptados de Botelho et al., (2015). A matéria prima (sementes de gergelim) foi adquirida na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), devidamente identificada e caracterizada. As sementes foram processadas no Laboratório de Separação e Processos do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Inicialmente, a matéria prima foi lavada e depois submetida à secagem até peso constante e colocada em sacos plásticos de polipropileno, fechadas e armazenadas em freezer doméstico em temperatura inferior a  $-5^{\circ}\text{C}$ . As sementes foram moídas em um moinho elétrico de facas (TECNAL, modelo TE 631/1, São Paulo, Brasil). Em seguida,

realizada a análise granulométrica do material utilizando um conjunto de peneiras padronizadas da Série Tyler (W.S. Tyler, USA), com abertura de  $-18 + 60 \text{ mesh}$ . O produto deste processo foi colocado em um agitador magnético (PRODUTEST, modelo 3580, São Paulo, Brasil), até a separação completa das partículas. Após o peneiramento deste material, as frações de 24 a 48 malhas foram homogeneizadas e adicionadas a vácuo em sacos plásticos de polipropileno, os quais foram armazenados em um freezer em temperatura inferior à  $-5^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.2 Obtenção dos Extratos por Fracionamento com Fluidos Supercríticos

Os experimentos foram realizados em duplicatas com planejamento aleatorizado na unidade de extração supercrítica. O leito de extração foi cerca de 10% do volume da célula de extração empacotada com matéria prima utilizando partículas de tamanho de 24, 32 e 48 malhas, divididas em partes iguais, o restante foi preenchida com esferas de vidro. Foram realizadas extrações exaustivas até que todo material solúvel na condição de processo (temperatura, pressão e vazão de solvente) tenha sido removido da matriz. As condições operacionais de pressão, temperatura e vazão de solvente para a realização dos ensaios seguiram um plano fatorial com repetições para quatro níveis de pressão, três níveis de temperatura e três níveis de vazão de solvente.

Foram estudadas diferentes relações: altura versus diâmetro de leito (H/D) com objetivo de otimizar o processo e definir a relação ideal para se obter maior rendimento global de matéria prima. O volume restante da célula de extração para cada relação H/D foi completado com esfera de vidro.

A completa caracterização da matéria prima foi feita de acordo com os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (A.O.A.C.) como: lipídeos, carboidratos, cinzas, proteína e fibras. Para identificar o perfil de composição fitoquímica das matérias-

primas, extrações preliminares foram realizadas com métodos de extração convencionais como maceração e hidrodestilação.

## 2.5 ELETROMIOGRAFIA DOS ANIMAIS

Para constatação das alterações eletromiográficas, foram implantados eletrodos em aço inox acomodados no músculo semitendinoso da pata direita dos membros dos ratos tratados e controles. Após o procedimento de implante de eletrodo os eletrodos foram conectados a um amplificador de alta impedância (Grass Technologies, P511), monitorado por um osciloscópio (Protek, 6510), os dados foram continuamente digitalizados em uma taxa de 1 KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX). Os dados foram armazenados em disco rígido e processados através de um software especializado (LabVIEW express). O eletrodo de registro foi localizado no lado direito do hemisfério; e do lado esquerdo, o eletrodo de referência. Todo o experimento foi executado dentro da gaiola de Faraday.

Os registros foram feitos após 10 minutos de acomodação e tiveram a duração de 5 minutos para cada animal.

### 2.5.1 Análise dos Dados da Eletromiografia

Para as análises dos sinais adquiridos, uma ferramenta foi construída usando a linguagem de programação Python versão 2.7. As bibliotecas Numpy e Scipy foram usadas para o processamento matemático e a biblioteca Matplotlib para os gráficos. A interface gráfica foi desenvolvida utilizando a biblioteca PyQt4.

Os espectrogramas foram calculados usando uma janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 segundos), cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro a densidade de potência espectral (PSD) foi calculada

pelo método periodograma média de Welch. O histograma de frequência foi gerado pelo primeiro cálculo do PSD do sinal usando a janela de Hamming com 256 pontos, sem sobreposição, com o PSD, resultando um histograma construído com caixas de 1 Hz. Para analisar a diferença entre os experimentos, um gráfico com a média e desvio padrão de PSD de vários experimentos foi construído, cada onda do gráfico foi gerada a partir de um conjunto de testes, onde o PSD foi gerado e calculado a média e o desvio padrão de cada grupo, para o cálculo da janela PSD Hamming foram usados 256 pontos sem sobreposição.

## 2.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os animais foram perfundidos após os tempos de sobrevida descritos na Tabela 1. Os mesmos foram profundamente anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Cetamin<sup>®</sup>, Syntec, 72 mg/kg, i.p.) e Cloridrato de Xilazina (Xilazin<sup>®</sup>, Syntec, 9 mg/kg, i.p.). Após a abolição dos reflexos corneano e de retirada de pata, os animais foram perfundidos através da inserção de uma agulha fina no ventrículo esquerdo do coração, por onde infundi-se 500 ml de solução salina a 0,9% com heparina (0,5 ml/l) e 500 ml de paraformaldeído a 4%. Em seguida, as medulas espinhais foram extraídas, pós-fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas e crioprotetidas em gradientes de sacarose e glicerol.

Algumas amostras foram processadas em uma bateria de álcool em diferentes concentrações e imersas em xilol para, em seguida, serem embebidas em parafina. Após inclusão em parafina, foram obtidas secções transversais e longitudinais através de um micrótomo (American Optical Corporation) com 5µm de espessura. As secções foram montadas em lâminas que passaram previamente por procedimentos de lavagem e armazenamento em álcool 70%. Em seguida as secções foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de gomori (TG) e azul de metileno.

As amostras crioprotégias foram processadas e seccionadas no local da lesão, congeladas em Tissue-Tek® OCT compound (Sakura) e seccionadas horizontalmente em criostato em espessuras de 20 µm e 50 µm. As secções de 50 µm foram utilizadas para avaliar qualitativamente a área de lesão através da coloração pela violeta de cresila. As lâminas foram montadas com 3 secções cada e congeladas a -20°C.

## 2.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para as análises imunohistoquímicas foram utilizados os seguintes anticorpos:

- **anti-MBS-1 (1:200, Martine Bernardes Silva do CNS inflammation Group da Universidade de Southampton):** Neutrófilos foram marcados utilizando o anticorpo policlonal MBS-1, o qual reconhece epítomos presentes na maioria da população de neutrófilos.
- **Anti-ED1 (1:500, Serotec):** Identifica a presença de macrófagos e micróglia ativadas, na área de lesão e em regiões circunjacentes, através do reconhecimento de um epítomo na membrana de lisossomas no citoplasma de macrófagos ativados (ROBINSON et al., 1986).

O protocolo de imunohistoquímica utilizado foi previamente aplicado e estabelecido pelo nosso grupo (GOMES-LEAL et al., 2005; GOMES-LEAL et al., 2002; GOMES-LEAL et al., 2004). As lâminas montadas foram retiradas do congelamento e secadas a temperatura ambiente por 24 horas. Então, foram lavadas em solução PBS sob agitação constante por 5 minutos, imersas em tampão borato em temperatura constante de 65°C (0,2M; pH 9,0; ácido bórico da Nuclear®) e resfriadas, na mesma solução, em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, as secções foram lavadas em PBS por 5 minutos e imersas em álcool metílico e peróxido de hidrogênio (Merck®) (1ml de peróxido de hidrogênio/100ml de metanol), inibindo a peroxidase endógena das células

do tecido analisado. A partir daí, iniciou-se o processo imunohistoquímico propriamente dito, no qual as secções foram novamente lavadas em PBS, dessa vez com Tween® (5 minutos), e então incubadas em soro normal de cabra (no caso de uso do anticorpo anti-MBS-1) e de cavalo (no caso de uso do anticorpo anti-ED1) ambos em diluição de 10%, durante 1 hora. Após isto, as secções foram incubadas em anticorpo primário, e deixadas *over night*, de acordo com a diluição especificada. No dia seguinte, as secções foram novamente lavadas (PBS/Tween, 5 minutos) e incubados em anticorpo secundário anti-coelho feito em cabra (1:500; MBS-1) e anti-rato feito em cavalo (1:200, ED1), por 2 horas. Após nova lavagem, foram incubadas em ABC (complexo avidina-biotina – Vector®, kit ABC Vectastain) por 2 horas. Em seguida, nova lavagem e revelação. O cromógeno utilizado foi o DAB (diaminobenzidina – Sigma-Aldrich). Em seguida, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas, diafanizadas e montadas.

## 2.8 ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA

Para análise qualitativa, foram analisadas as lâminas marcadas pelos diferentes métodos histológicos, em microscópio óptico (Bioval, L2000C) e as imagens foram captadas por câmara fotográfica (Moticam® – 2500 – 5 MPixels) acoplada a microscópio óptico (Nikon® – ECLIPSE 50i).

Para análise da área de lesão, as imagens obtidas foram analisadas no *software ImageJ*, onde foi estimada a área de lesão de todos os grupos experimentais.

Para análise quantitativa, o número de neutrófilos e de corpos de micróglia/macrófagos por campo foram contados usando microscópio binocular com gradícula de contagem ( $0,0625 \text{ mm}^2$ ) em objetiva de 40x.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias e os erros padrão para todos os grupos foram obtidos. As diferenças nas contagens do número de neutrófilos e micróglia foram comparadas por análise de variância (ANOVA) para o teste de Tukey. O nível de significância foi  $p < 0,05$ . Os valores foram plotados no *software GraphPad Prism* e os gráficos foram produzidos no *software Microsoft Excel 2016*.

As diferenças nos registros eletrofisiológicos dos tempos de 1 e 7 dias foram comparadas por análise de variância (ANOVA) para o teste de Turkey. O nível de significância foi  $p < 0,05$ . Os valores foram plotados e os gráficos foram gerados no *software GraphPad Prism*.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 A TÉCNICA DE HEMISSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL INDUZIU MONOPLEGIA POSTERIOR DIREITA EM T8 CONFIRMADA POR TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E FUNCIONAIS

Para avaliação histológica, cortes coronais de ME lesionadas e controle foram examinados. Necrose com palor tecidual e infiltrado inflamatório, bem como degeneração neuronal, foram observados 24 h após o trauma medular. O centro da lesão foi reconhecido pelo comprometimento das substâncias branca e cinzenta. Cavitação foi observada estendendo-se da região dorsal até a região ventral. Observou-se perda neuronal e cavitações nos animais lesionados (Figura 7) mas não nos animais controle 24 horas após a LME.

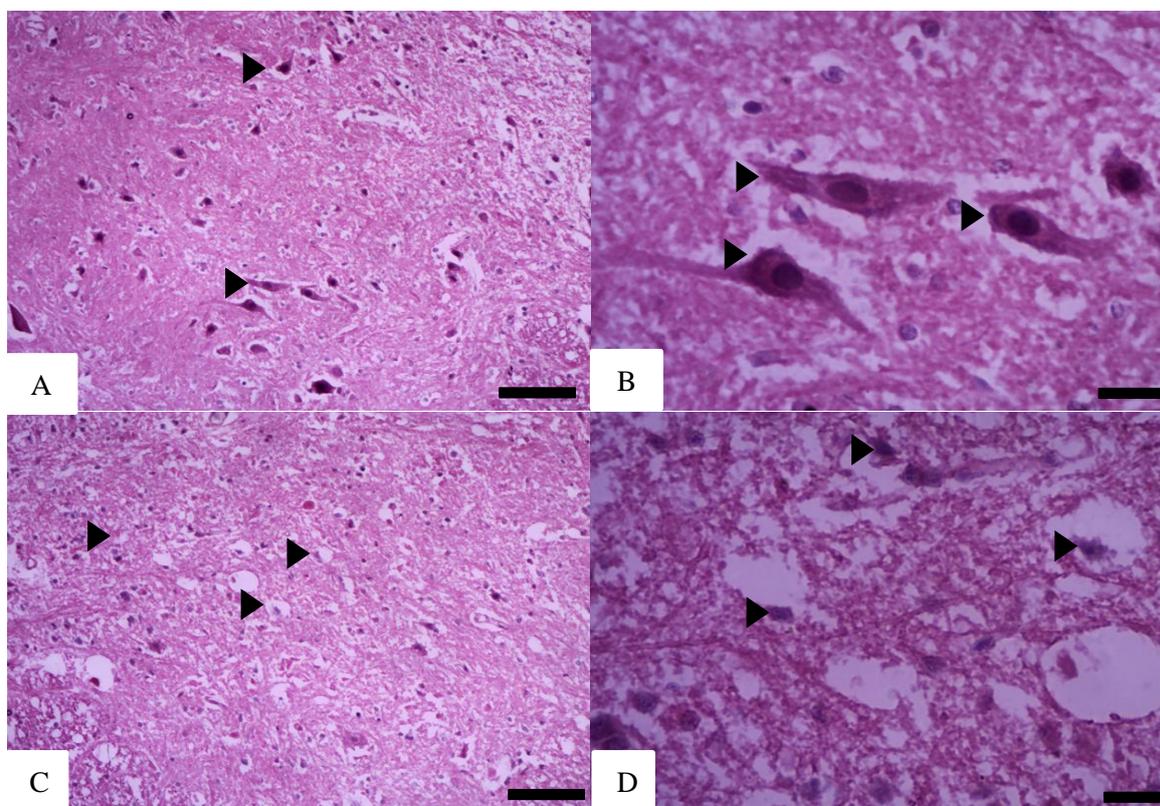


Figura 7 - Lesão medular por hemisseção em T8. Medula espinhal corada por hematoxilina-eosina (HE). Hemisfério medular intacto (A e B) e lesionado (substância cinzenta) (C e D). Neurônios motores intactos e lesionados (cabeças de seta). Escalas: A-C 300  $\mu$ m; B-D 100  $\mu$ m.

Nas regiões com lesão, observou-se aumento do infiltrado de células inflamatórias (Figura 8), concomitante com perda tecidual 24 horas após a LME.

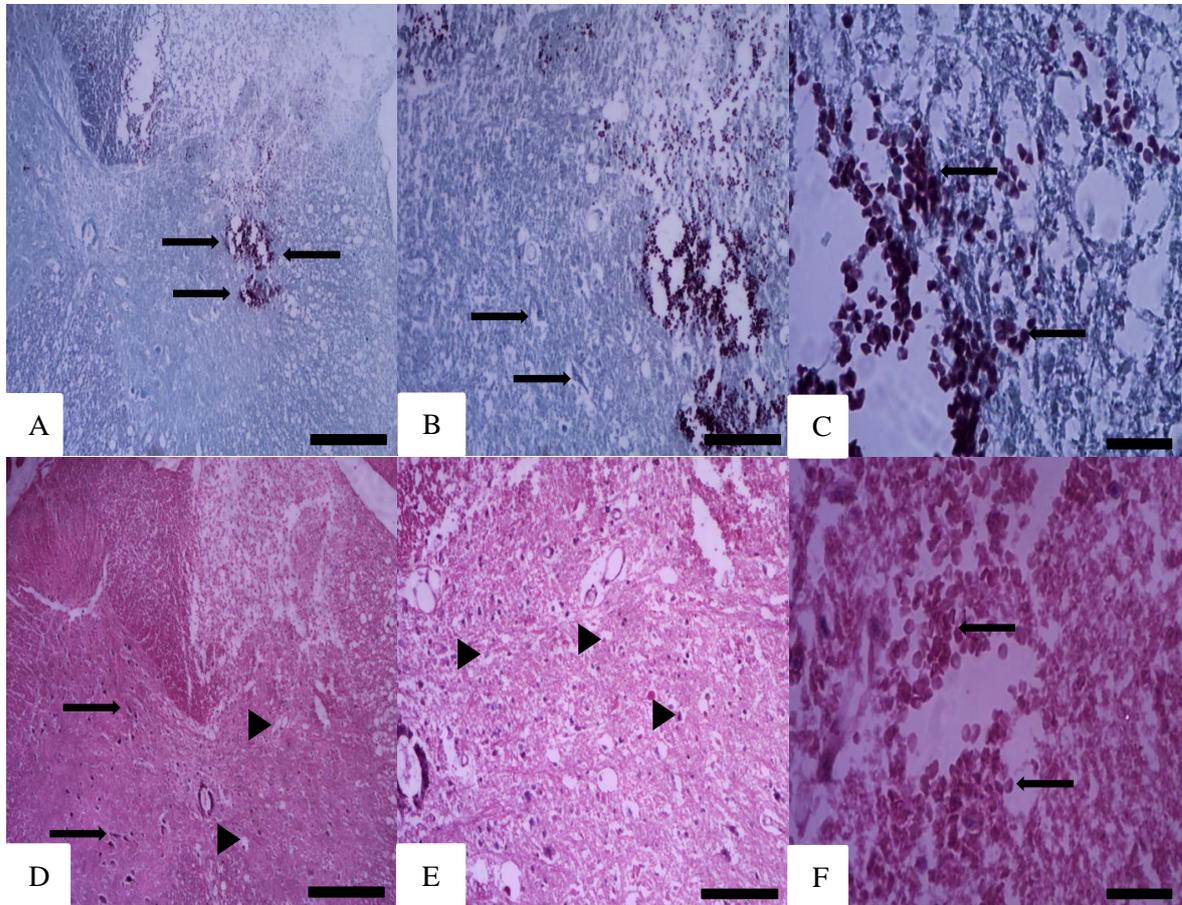


Figura 8 - Lesão medular por hemisseção e infiltrado inflamatório em T8. Secções distais ao centro da lesão. Secções da medula corada por cromotrope G2 (A-C) e hematoxilina-eosina (D-F). Observar o hemisfério medular intacto (D - setas) e o lesionado (A-C - setas) (substância cinzenta) mostrando neurônios motores intactos e lesionados (D-E - cabeças de seta); (C-F) infiltrado de células. Escalas: A-D 40  $\mu$ m; A, B, D-E 300  $\mu$ m e C-F 100 $\mu$ m.

O déficit motor na pata posterior direita dos animais foi confirmado por registro eletromiográfico nos animais lesionados e controle. A figura 9 ilustra os resultados obtidos por registro eletromiográfico em animais não lesionados e lesionados. Os registros realizados durante a contração do músculo semitendinoso mostraram modificações de amplitude no traçado eletromiográfico, apresentando maior frequência

de contrações e duração nos animais do grupo controle. Houve diferença de tempo da contração muscular da pata monopléica entre os grupos avaliados (Figura 9D-F).

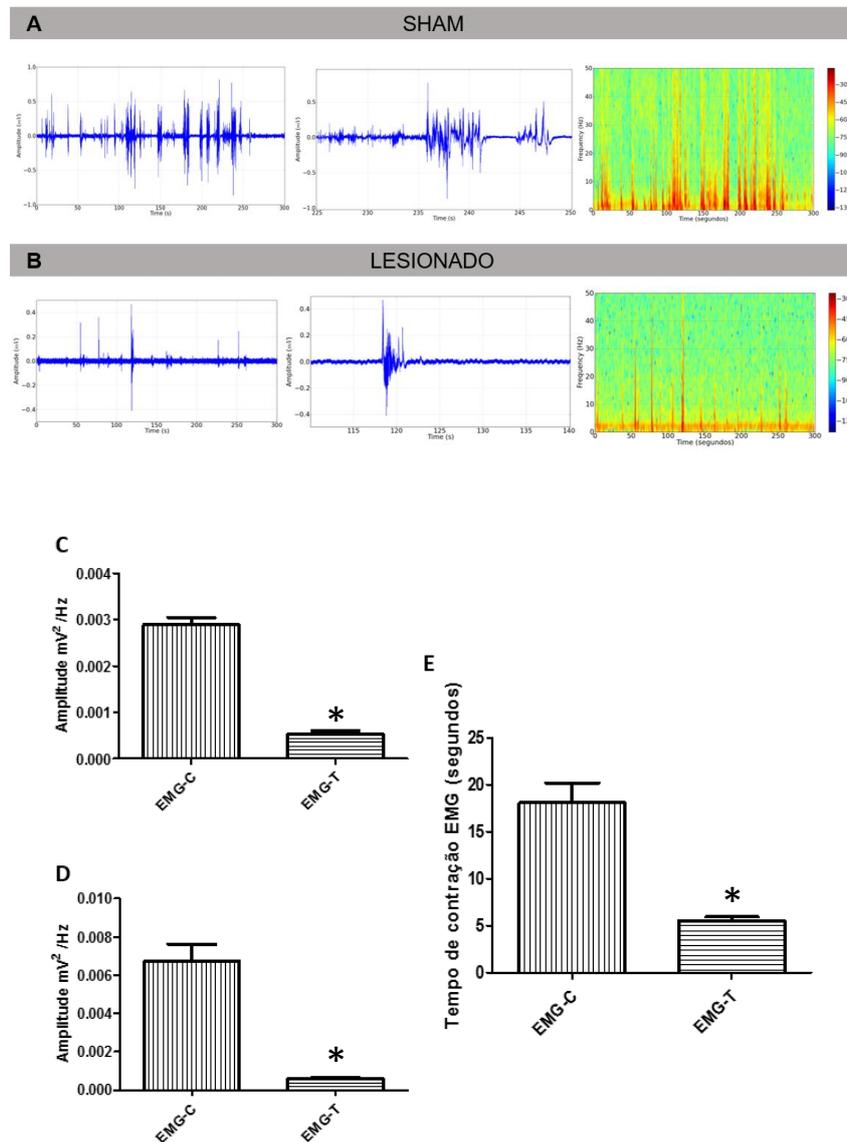


Figura 9. Eletromiograma (EMG): Registro dos animais do grupo Sham com contração do músculo semitendinoso durante o registro (A), registro do músculo semitendinoso dos animais submetidos à lesão medular (B) (n=4). Gráfico comparando as amplitudes acumuladas nas frequências até 50 Hz de forma linear (C), distribuição linear indicando as médias de amplitude durante o momento da contração de forma linear (D), Diferença na média de tempo de contração entre os animais do grupo Sham (EMG-C) e com lesão medular (EMG-T) (E).

### 3.2 – TRATAMENTO COM EXTRATO DE GERGELIM DIMINUIU A ÁREA DE LESÃO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS TRATADOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE

Para a análise histopatológica do tecido da ME, foi utilizada a técnica de coloração por violeta de cresila das secções. Como uma linha de base da morfologia intacta da medula espinhal, secções longitudinais de 20 µm de espessura dos animais controle não manipulados (Sham) foram coradas por violeta de cresila (Figura 10). Delineou-se claramente as substâncias branca (SB) e cinzenta (SC) dos animais sham (Figura 10).

#### SHAM

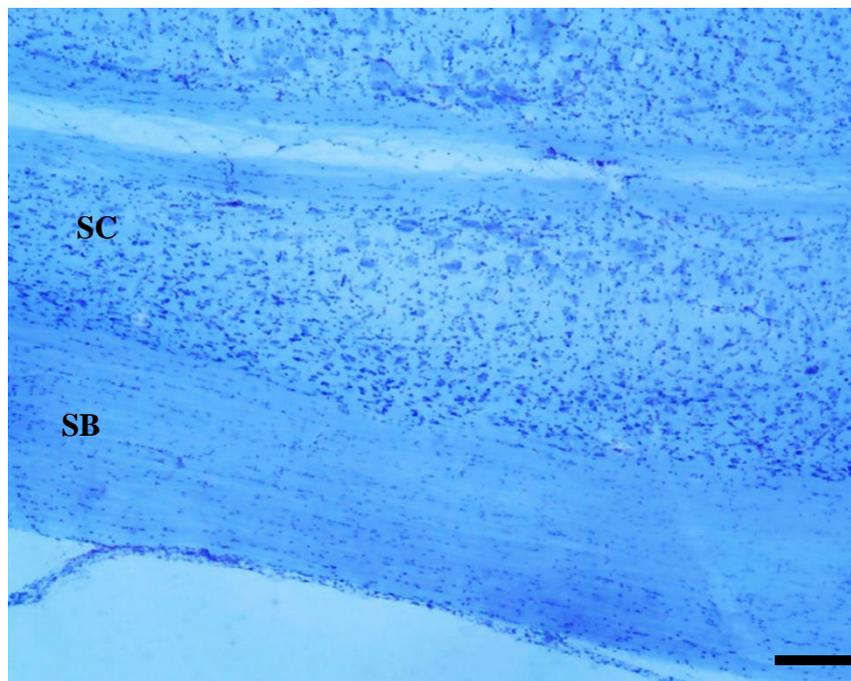


Figura 10. Histologia da medula espinhal intacta de ratos adultos revelada pela violeta de cresila em corte longitudinal. Observou-se claramente as substâncias branca e cinzenta do animal falso operado. SC= substância cinzenta; SB= substância branca. Escala = 300µm.

A hemisseção da ME induziu cavitação progressiva e intenso infiltrado inflamatório 1 (Figura 11), 3 (Figura 12) e 7 dias (Figura 13) após a indução da lesão. 24h após a lesão, observou-se cavitação e intenso infiltrado de células polimorfonucleares nos animais controle (Figura 11A-B). Nos tempos de 3 (Figura 12A-B) e 7 dias (Figura 13A-B), houve cavitação progressiva, diminuição das células polimorfonucleares e aumento progressivo do infiltrado de células mononucleares.

O tratamento com Gergelim, na concentração investigada, diminuiu consideravelmente a cavitação progressiva e o infiltrado de células polimorfonucleares em 24h (Figura 11C-D). Houve aparente diminuição do infiltrado de células mononucleares pelo Gergelim (Figuras 12C-D; 13C-D), o que se confirmou apenas para o tempo de 7 dias, quando se utilizou anticorpos específicos para micróglia/macrófagos ativados (ver próximo tópico).

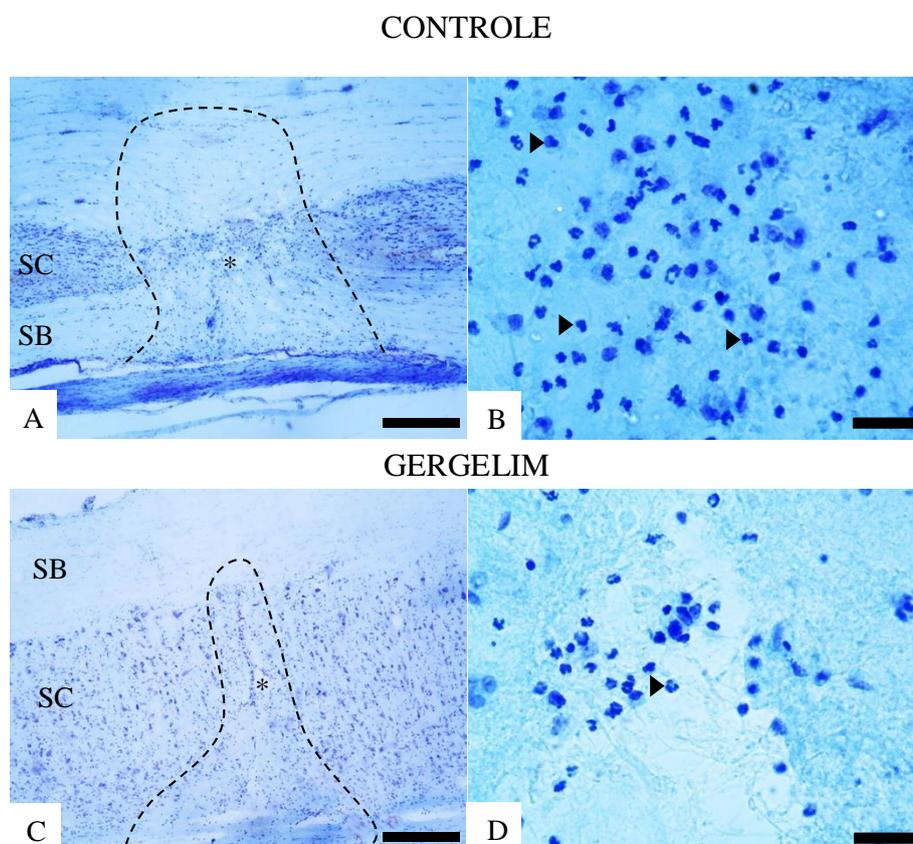
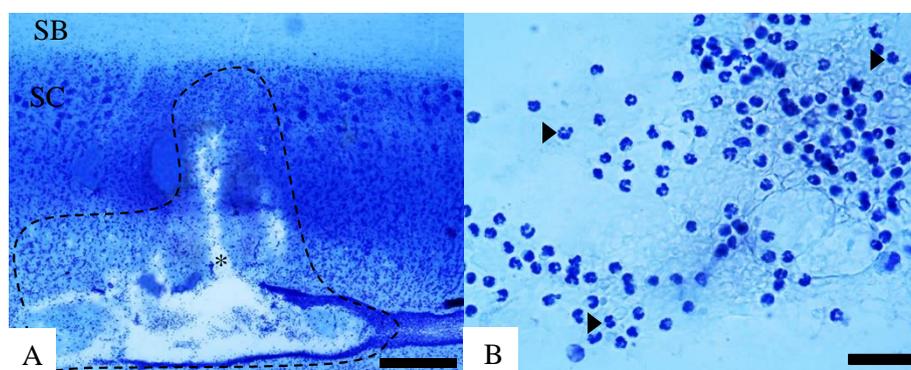


Figura 11. Diminuição de cavitação e infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 1 dia após a lesão. Animal hemisseção da ME tratado com PBS-Tween (A-B) ou extrato de Gergelim (C-D). B e D são maiores aumentos de A e C. A área tracejada delinea a área primária de lesão com cavitação central. O asterisco indica o epicentro da lesão. Setas apontam para células inflamatórias em B e D. SB, substância branca; SC, substância cinzenta; Escalas: C= 300 $\mu$ m; D=100 $\mu$ m.

## CONTROLE



## GERGELIM

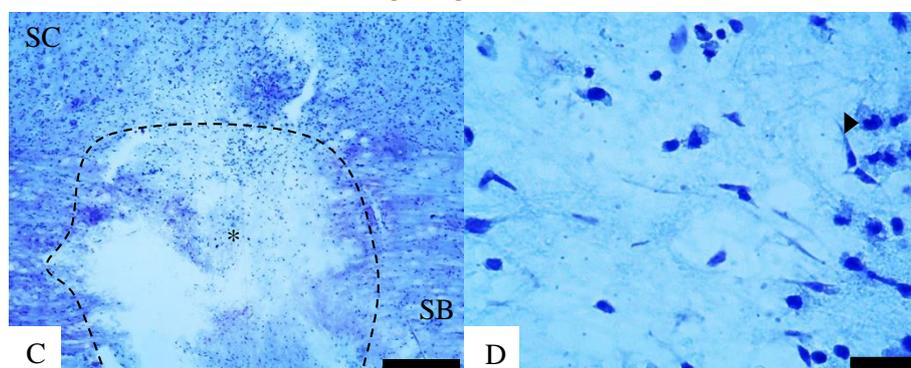
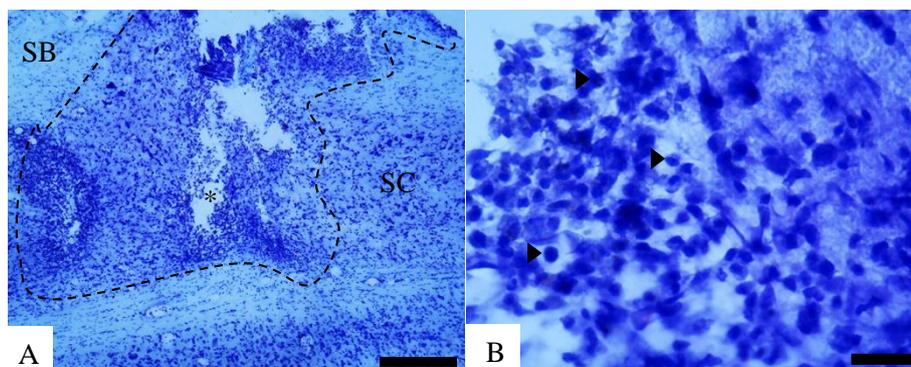


Figura 12. Diminuição de cavitação e infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 3 dias após a lesão. Animal hemisseção da ME tratado com PBS-Tween (A-B) ou extrato de Gergelim (C-D). B e D são maiores aumentos de A e C. A área tracejada delinea a área primária de lesão com cavitação central. O asterisco indica o epicentro da lesão. Setas apontam para células inflamatórias em B e D. SB, substância branca; SC, substância cinzenta; Escalas: C= 300 $\mu$ m; D=100 $\mu$ m.

## CONTROLE



## GERGELIM

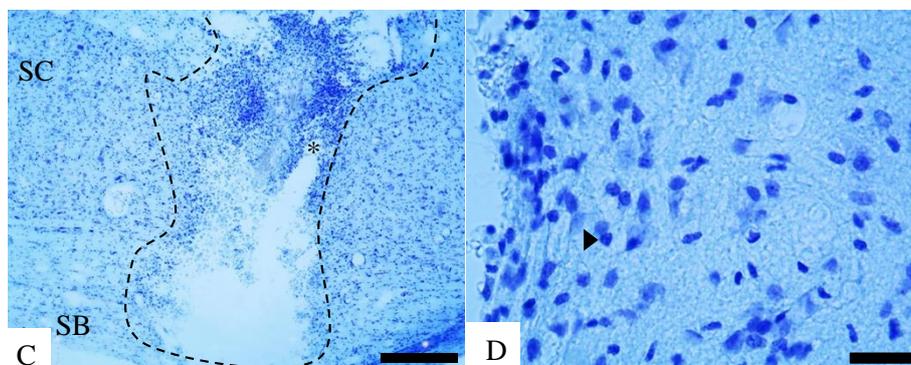


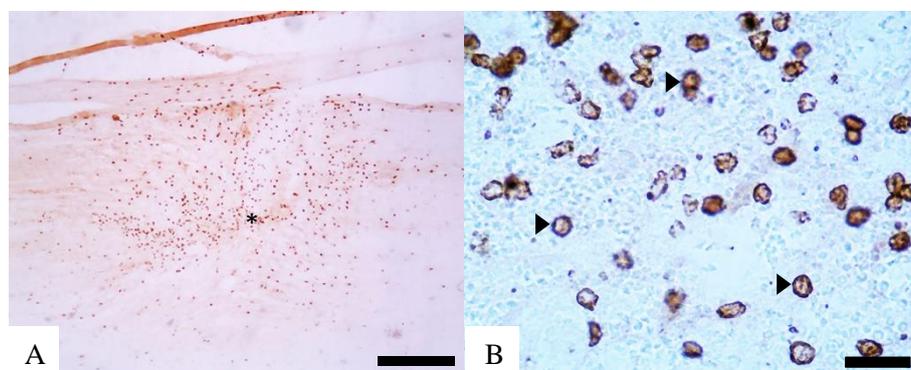
Figura 13. Diminuição de cavitação e infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 7 dias após a lesão. Animal hemisseção da ME tratado com PBS-Tween (A-B) ou extrato de Gergelim (C-D). B e D são maiores aumentos de A e C. A área tracejada delinea a área primária de lesão com cavitação central. O asterisco indica o epicentro da lesão. Setas apontam para células inflamatórias em B e D. SB, substância branca; SC, substância cinzenta; Escalas: C= 300 $\mu$ m; D=100 $\mu$ m.

### 3.3 TRATAMENTO COM EXTRATO DE GERGELIM DIMINUIU O INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS E A MIGRAÇÃO DE MICRÓGLIA PARA A ÁREA DE LESÃO NA MEDULA ESPINHAL

Para avaliação do infiltrado de células polimorfonucleares (neutrófilos) no centro da lesão e nas regiões rostral e caudal, após lesão aguda da medula espinhal, foi realizada imunohistoquímica com o anticorpo anti-MBS-1, que é específico para neutrófilos, nas secções dos animais dos grupos controle e tratado, para os tempos de 24 horas e de 3 dias após o trauma experimental. A figura 14 apresenta os dados referentes ao infiltrado de neutrófilos no tecido 1 dia após a lesão medular.

Nos animais controle, houve intenso infiltrado de neutrófilos no centro da lesão 1 (Figuras 14A-B e 15) e 3 (16A-B e 17) dias após a lesão. O tratamento com Gergelim diminuiu consideravelmente o infiltrado neutrófilos no tecido medular lesionado (Figuras 14C-D e 16C-D). Estes resultados foram confirmados por análise quantitativa (Figuras 15 e 17). A análise quantitativa mostrou que houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do número de células MBS-1+/campo de contagem em relação aos animais controle 1 (Figura 15) e 3 dias (Figura 17) após a lesão. Para o tempo de sobrevivência de 1 dia obtiveram-se as seguintes médias e erros padrão: (grupo controle: centro  $69 \pm 10,34$  (N=3), rostral  $31,83 \pm 4,963$  (N=3), caudal  $34,83 \pm 4,362$  (N=3); grupo gergelim: centro  $10,34 \pm 4,254$  (N=3), rostral  $19 \pm 3$  (N=3), caudal  $21,5 \pm 4,288$  (N=3)). Para o tempo de 3 dias os dados obtidos foram os seguintes: (grupo controle: centro  $75,5 \pm 8,152$  (N=3), rostral  $31,83 \pm 4,269$  (N=3), caudal  $20,83 \pm 1,701$  (N=3); grupo gergelim: centro  $38,33 \pm 2,654$  (N=3), rostral  $25,5 \pm 2,262$  (N=3), caudal  $21,33 \pm 1,308$  (N=3)).

## CONTROLE



## GERGELIM

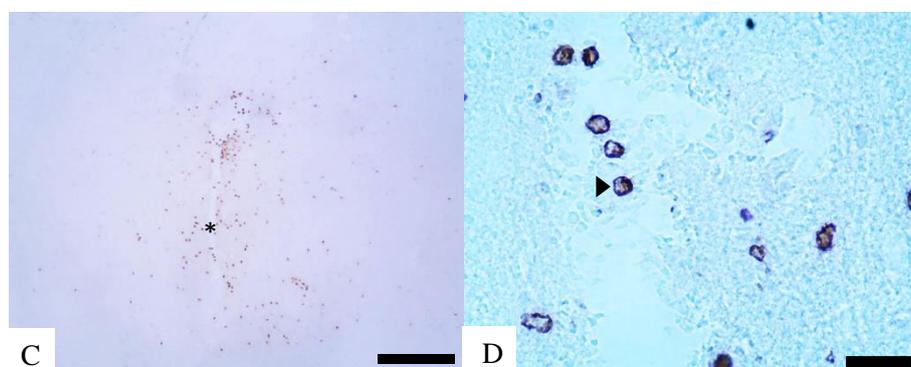


Figura 14. Diminuição do infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 1 dia após a lesão. Animal hemisseção da ME tratado com PBS-Tween (A-B) ou extrato de Gergelim (C-D). B e D são maiores aumentos de A e C. O asterisco indica o epicentro da lesão. Setas apontam para células inflamatórias em B e D. Escalas: C= 300 $\mu$ m; D=100 $\mu$ m.

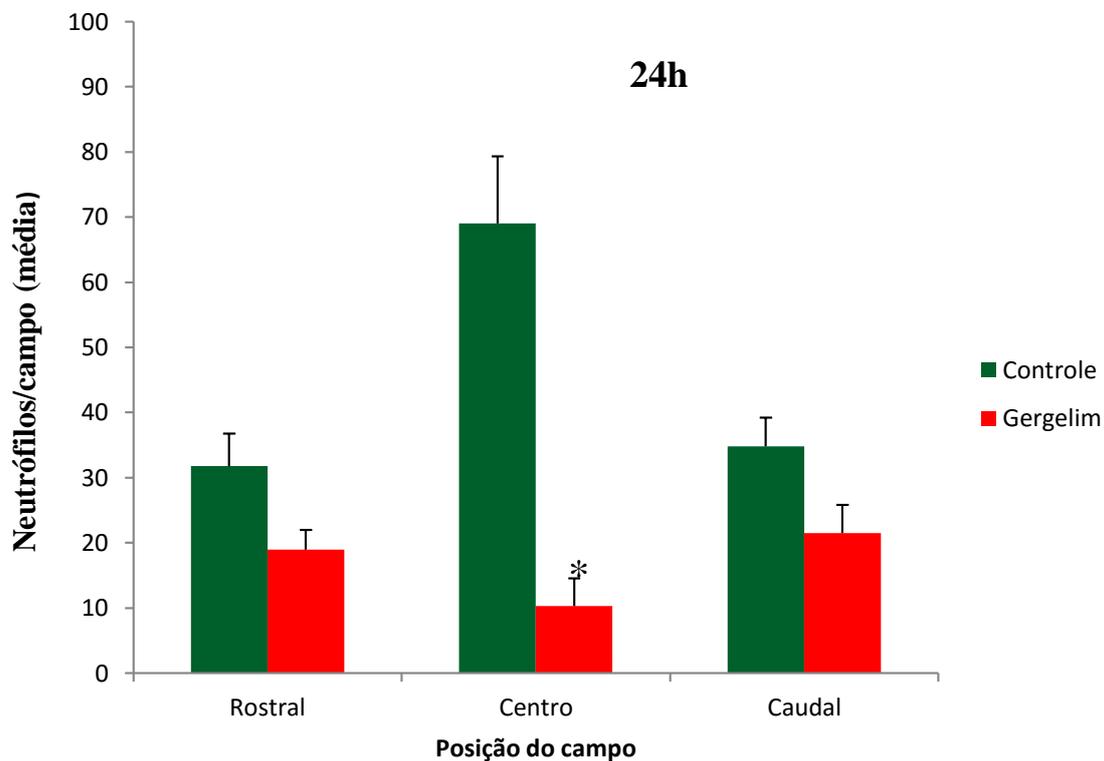
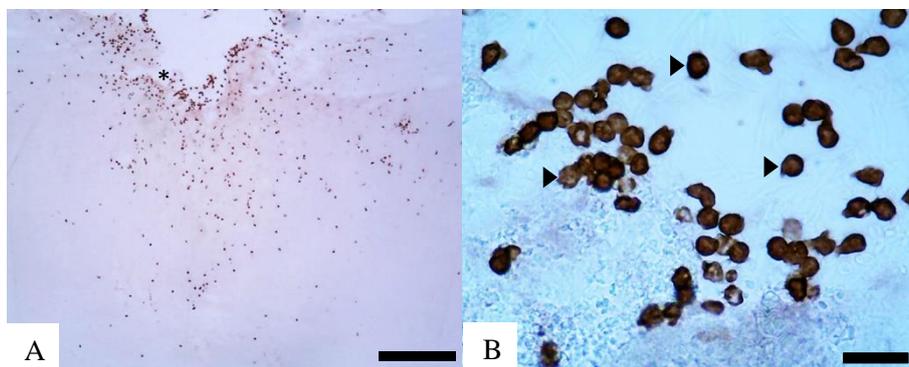


Figura 15. Análise quantitativa das células MBS-1+ por campo 24 hs após a hemisseção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão. O centro da lesão apresentou uma redução significativa (\*) do infiltrado de neutrófilos no grupo tratado com gergelim em relação à mesma porção do grupo que recebeu PBS/tween ( $p < 0,05$  – ANOVA - Tukey).

## CONTROLE



## GERGELIM

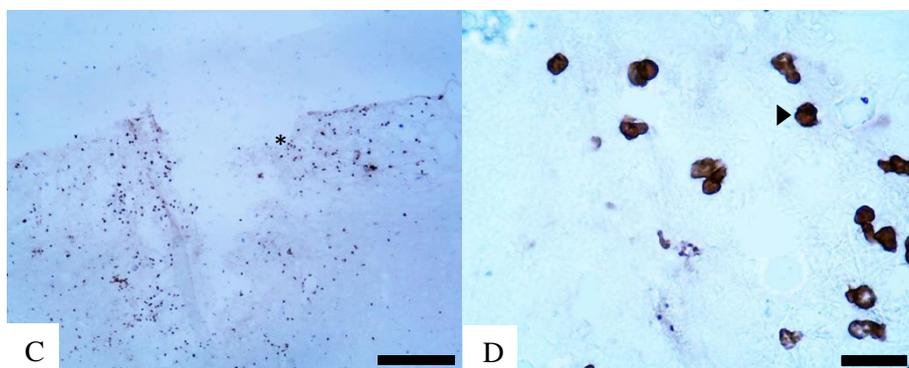


Figura 16. Diminuição do infiltrado de células polimorfonucleares pelo Gergelim 3 dias após a lesão. Animal hemisseção da ME tratado com PBS-Tween (A-B) ou extrato de Gergelim (C-D). B e D são maiores aumentos de A e C. O asterisco indica o epicentro da lesão. Setas apontam para células inflamatórias em B e D. Escalas: C= 300 $\mu$ m; D=100 $\mu$ m.

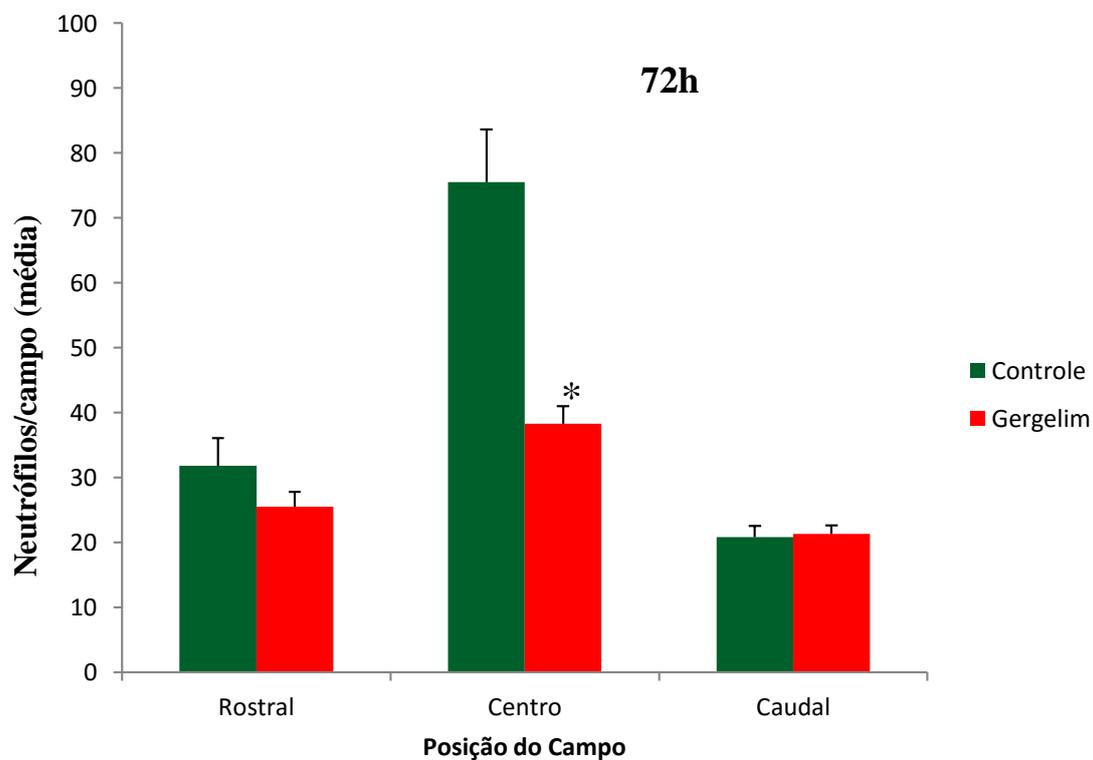
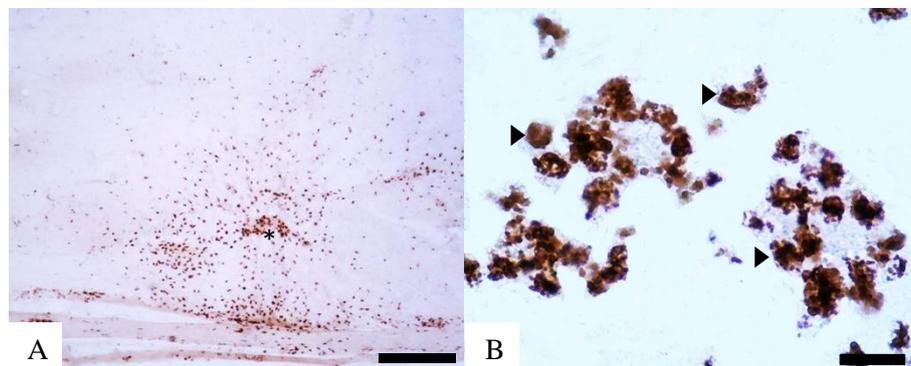


Figura 17. Análise quantitativa das células MBS-1+ por campo 3 dias após a hemisseção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão. O centro da lesão apresentou uma redução significativa (\*) do infiltrado de neutrófilos no grupo tratado com gergelim em relação à mesma porção do grupo que recebeu PBS/tween ( $p < 0,05$  – ANOVA - Tukey).

Também investigamos os efeitos do tratamento com Gergelim sobre micróglia/macrófagos ativados no centro e em campos rostral e caudal à lesão utilizando-se o anticorpo ED1. A hemisseção da ME induziu ativação microglial/macrofágica 24 horas após a lesão (Figura 18A-B). Houve aumento progressivo da ativação microglial/macrofágica nos tempos de sobrevivência de 3 (Figura 20A-B) e 7 dias (Figura 22A-B), com pico no tempo de 7 dias. O tratamento com extrato de Gergelim diminuiu a ativação microglial/macrofágica nos três tempos de sobrevivência investigados (Figuras 18C-D, 20C-D, 22C-D), apesar de que a análise quantitativa mostrou uma diminuição estatisticamente significativa apenas no tempo de 7 dias ( $p < 0.05$ , Figura 23). As contagens para os tempos de 1 e 3 dias não revelaram diferenças significativas entre animais controle e tratados ( $P > 0.05$ ), apesar da diminuição das médias do número de células ED1+/campo (Figuras 19 e 21).

## CONTROLE



## GERGELIM

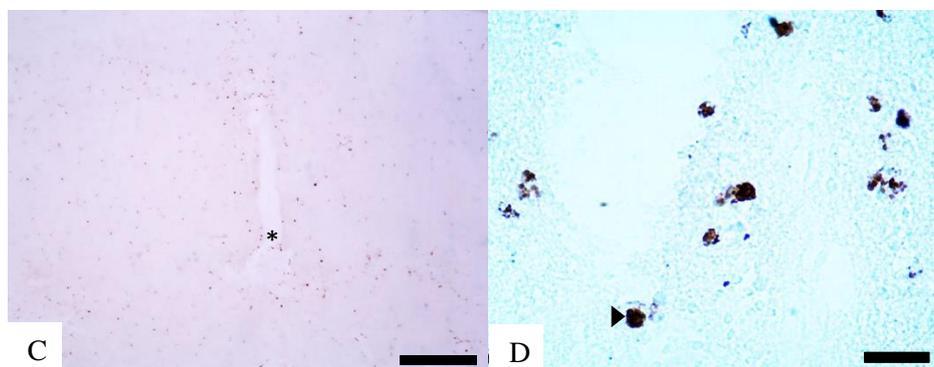


Figura 18. Micróglia/macrófagos na área de lesão medular 1 dia após a lesão. Animal hemisseção da ME tratado com PBS-Tween (A-B) ou extrato de Gergelim (C-D). B e D são maiores aumentos de A e C. O asterisco indica o epicentro da lesão. Setas apontam para células inflamatórias em B e D. Escalas: C= 300 $\mu$ m; D=100 $\mu$ m.

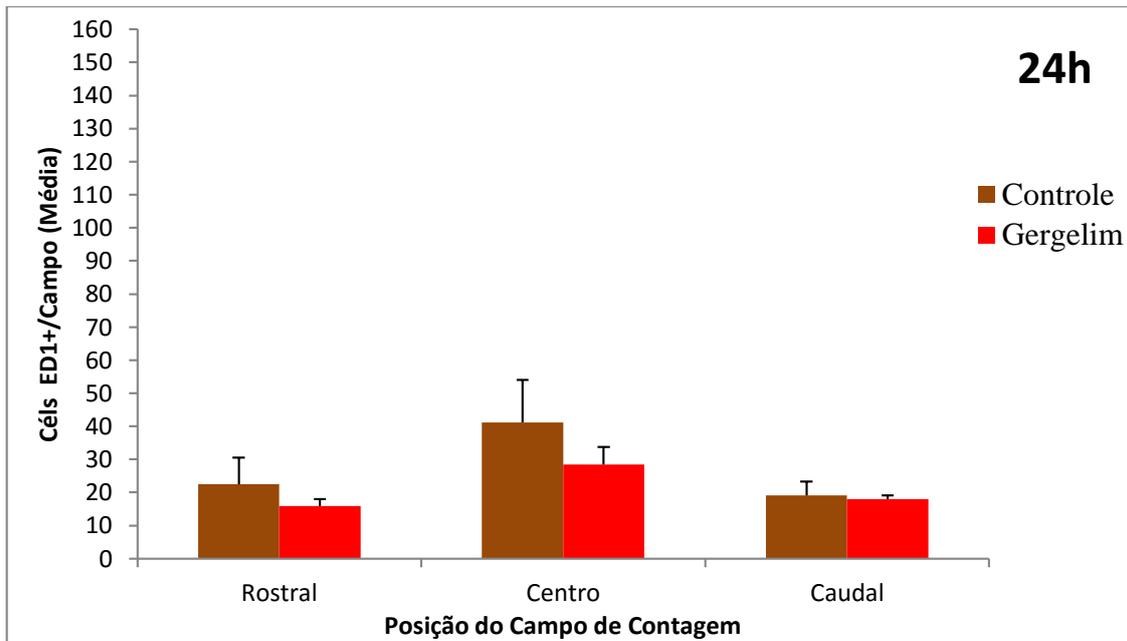
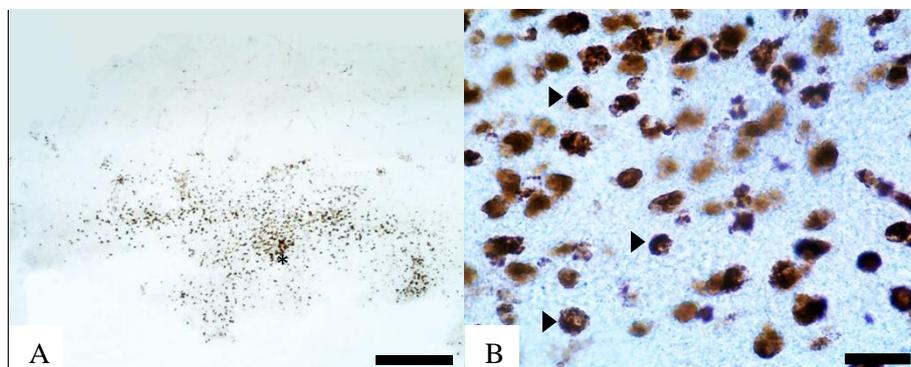


Figura 19: Análise quantitativa das células ED1+ por campo 1 dia após a hemisseção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão. Não houve redução significativa do número de micróglia/macrófagos no grupo tratado com gergelim em relação às mesmas porções do grupo que recebeu PBS/tween ( $p < 0,05$  – ANOVA - Tukey). (controle: centro,  $41,17 \pm 12,79$  (N=3), rostral,  $22,5 \pm 8,049$  (N=3), caudal,  $19,17 \pm 4,045$  (N=3). Gergelim: centro,  $28,5 \pm 5,201$  (N=3), rostral,  $15,83 \pm 2,197$  (N=3), caudal,  $18 \pm 1,033$  (N=3)).

## CONTROLE



## GERGELIM

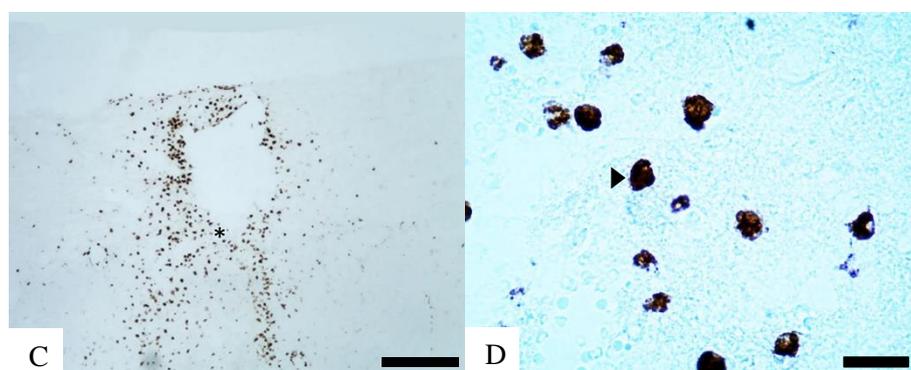


Figura 20. Micróglia/macrófagos na área de lesão medular 3 dias após a lesão. Animal hemisseção da ME tratado com PBS-Tween (A-B) ou extrato de Gergelim (C-D). B e D são maiores aumentos de A e C. O asterisco indica o epicentro da lesão. Setas apontam para células inflamatórias em B e D. Escalas: C= 300 $\mu$ m; D=100 $\mu$ m.

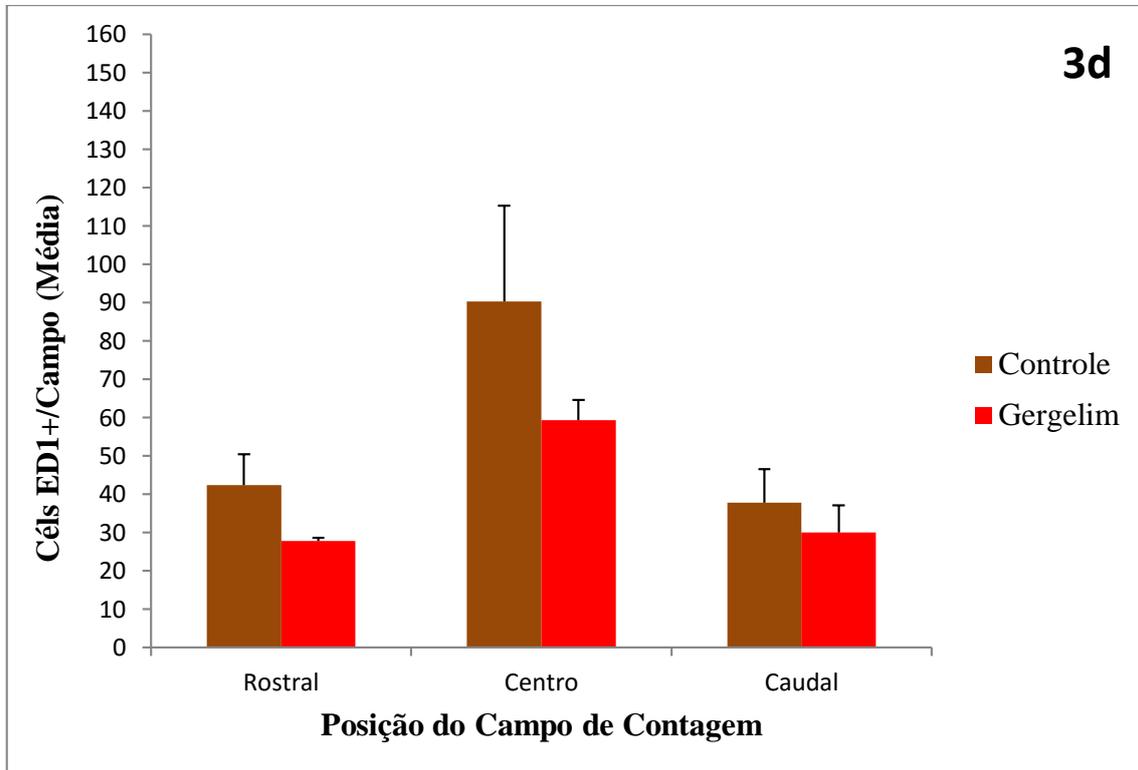
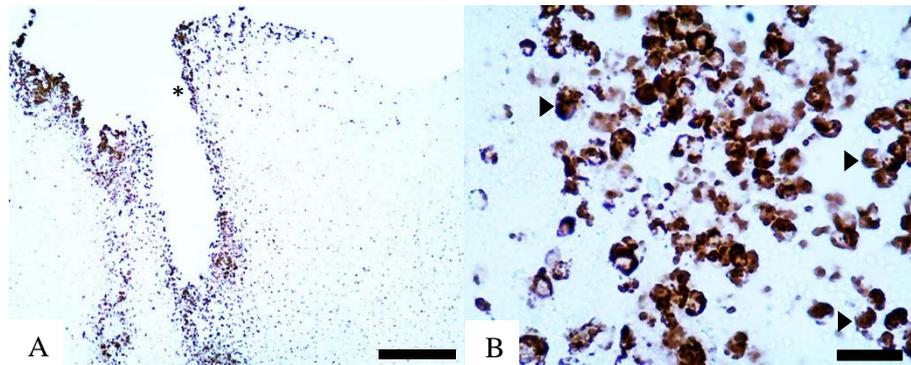


Figura 21. Análise quantitativa das células ED1+ por campo 3 dias após a hemisseção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão. Não houve redução significativa do número de micróglia/macrófagos no grupo tratado com gergelim em relação às mesmas porções do grupo que recebeu PBS/tween ( $p < 0,05$  – ANOVA - Tukey). (controle: centro  $90,33 \pm 25,01$  (N=3), rostral  $42,33 \pm 8,151$  (N=3), caudal  $37,83 \pm 8,758$  (N=3); grupo gergelim: centro  $59,33 \pm 5,333$  (N=3), rostral  $27,83 \pm 0,7923$  (N=3), caudal  $30 \pm 7,057$  (N=3)).

## CONTROLE



## GERGELIM

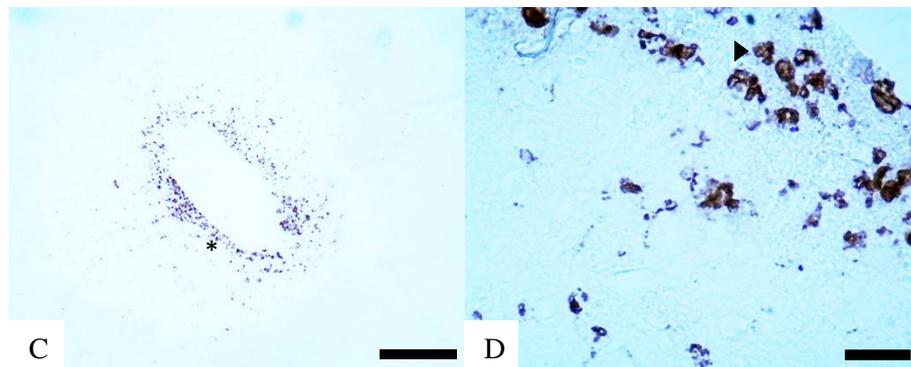


Figura 22. Diminuição do número de células ED1+ por campo pelo Gergelim 7 dias após a lesão. Animal hemisseção da ME tratado com PBS-Tween (A-B) ou extrato de Gergelim (C-D). B e D são maiores aumentos de A e C. O asterisco indica o epicentro da lesão. Setas apontam para células inflamatórias em B e D. Escalas: C= 300 $\mu$ m; D=100 $\mu$ m.

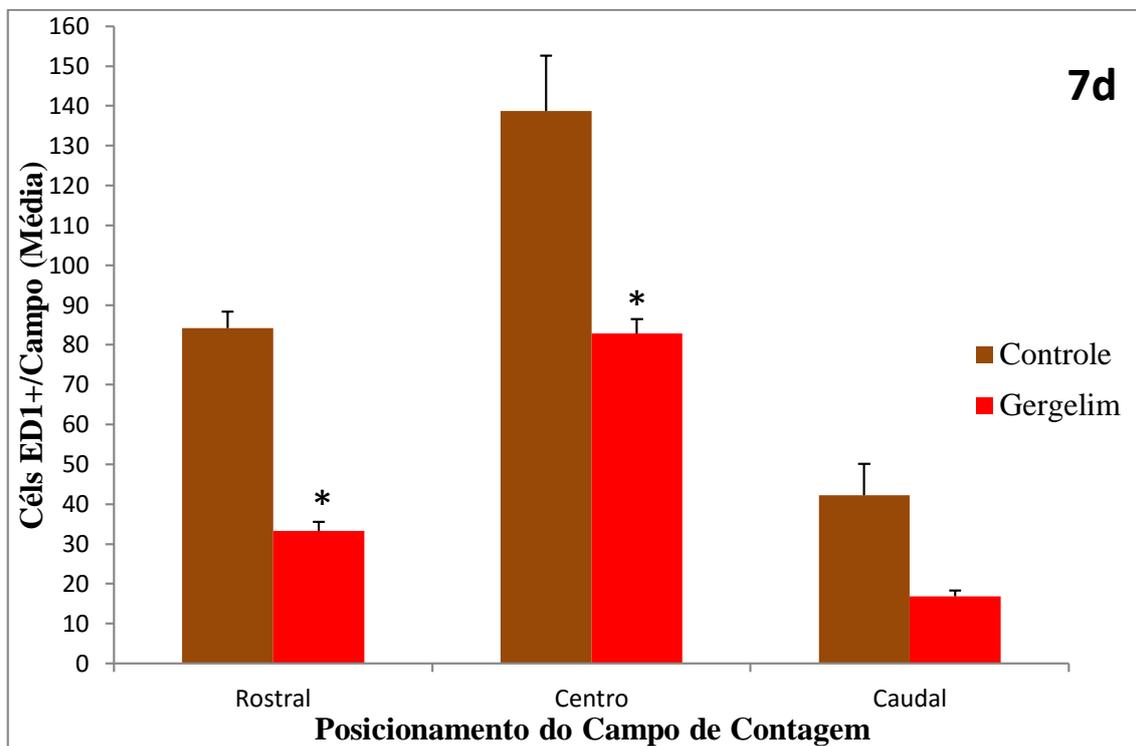


Figura 23. Análise quantitativa das células ED1+ por campo 7 dias após a hemissecção da medula espinhal nas porções: rostral, caudal e centro da lesão. O centro da lesão e a região rostral apresentaram uma redução significativa (\*) na quantidade de células ED1+ no grupo tratado com gergelim em relação às mesmas porções no grupo que recebeu PBS/tween ( $p < 0,05$  – ANOVA - Tukey). (grupo controle: centro  $138,7 \pm 13,95$  (N=3), rostral  $84,17 \pm 4,227$  (N=3), caudal  $42,17 \pm 7,881$  (N=3). Grupo gergelim: centro  $82,83 \pm 3,692$  (N=3), rostral  $33,33 \pm 2,171$  (N=3), caudal  $16,83 \pm 1,537$  (N=3)).

### 3.4. O TRATAMENTO COM GERGELIM INDUZIU RECUPERAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR NOS ANIMAIS QUE SOFRERAM HEMISSECÇÃO DA MEDULA ESPINHAL

Para avaliar a perda ou recuperação de função da pata posterior direita dos animais entre os grupos, realizou-se uma análise eletromiográfica na referida pata nos tempos de 24 horas e de 7 dias após a lesão medular. Pôde ser constatado no gráfico de frequência acumulada onde a média de amplitude de registro foi de  $0,002886 \pm 0,0004242 \text{ mV}^2/\text{Hz}$  para os eletromiogramas dos animais do grupo sham, onde a contração muscular está normal, a média obtida para os animais controle foi registrado amplitude de  $0,0005396 \pm 0,000180 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ , o que demonstrou diferença estatística com o animal sham. Para os animais tratados com gergelim a média foi de  $0,001538 \pm 0,0008380 \text{ mV}^2/\text{Hz}$  demonstrando que o eletrodo inserido na musculatura detectou contração da musculatura equivalente a 53,29 % da contração dos animais do grupo sham (Fig. 23A-B).

O gráfico demonstrando amplitude de contrações isoladas nos animais do grupo sham, apresentou média de potência durante a contração de  $0,006704 \pm 0,002626 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ , os animais controle apresentaram média de  $0,0008039 \pm 0,0004608 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ . Os animais tratados com gergelim indicaram uma maior amplitude de contração detectada pelo eletrodo com média de  $0,002488 \pm 0,0009954 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ , e demonstraram diferença estatística em relação ao grupo não tratado (Fig. 25C).

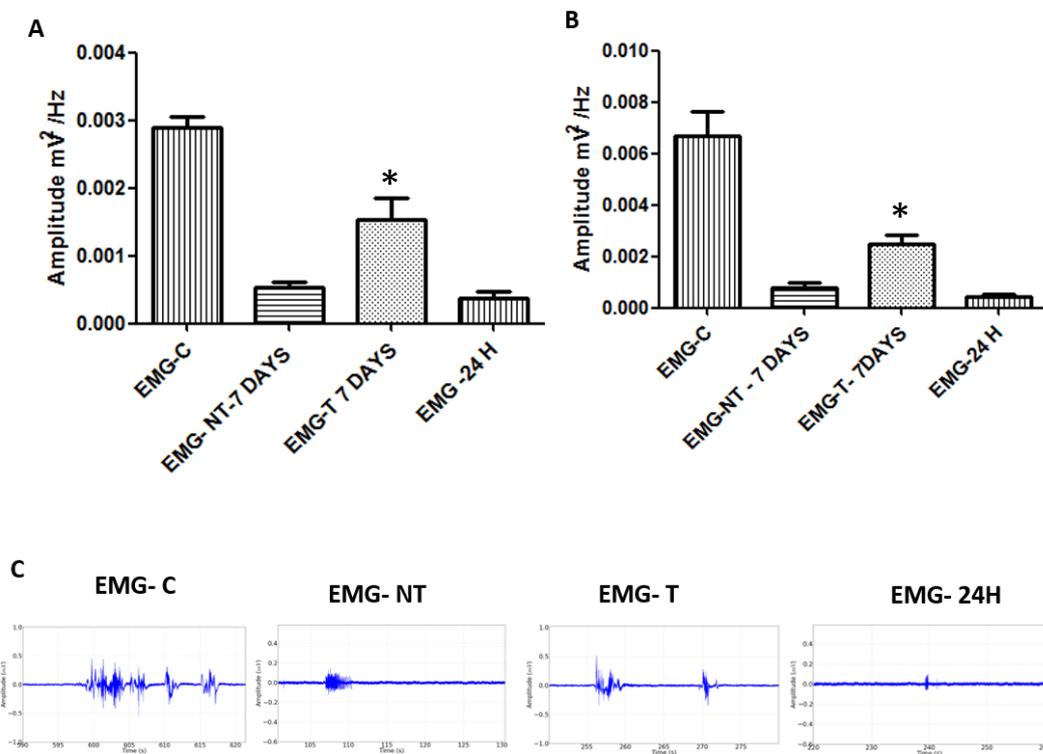


Figura 24. Gráfico de distribuição de amplitude em registros de 5 minutos nos animais dos grupos Sham (EMG-C), controle (EMG-NT) e tratado com gergelim (EMG e EMG-T), 24 horas e 7 dias após a lesão medular. (A); Gráfico comparando as amplitudes observadas durante as contrações de forma isolada (B); Traçados eletromiográficos demonstrativos das características das contrações (C).

## 4 – DISCUSSÃO

### 4.1 O MODELO EXPERIMENTAL PROPOSTO É UMA ALTERNATIVA DE BAIXO CUSTO QUE INDUZ CAVITAÇÃO PROGRESSIVA E INTENSA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA MEDULA ESPINHAL DE RATOS

Neste estudo, utilizou-se um modelo de hemisseção da ME em nível de T8 que foi implementado com sucesso em ratos adultos (SANTOS et al, 2016 – dados não publicados). O modelo proposto utiliza uma mesa cirúrgica de baixo custo que pode ser implementada em laboratórios com poucos recursos financeiros. A hemisseção implementada induziu cavitação progressiva entre 1 e 7 dias após a indução do trauma experimental, com lesão máxima entre 3 e 7 dias pós-lesão. Houve concomitante resposta inflamatória dominada pelo recrutamento de neutrófilos nas primeiras 72 hs pós lesão e por ativação microglial/macrofágica com pico em torno de 7 dias pós-lesão. O tratamento com extrato supercrítico de sementes de gergelim preto diminuiu consideravelmente a cavitação e a resposta inflamatória nos tempos de sobrevivência de 1 e 3 dias (neutrófilos) e 7 dias (microglia/macrófagos). Também se evidenciou que o tratamento com gergelim induziu recuperação da força muscular em cerca de 50% em relação aos animais controle.

Diversos estudos utilizam modelos experimentais de trauma da medula espinhal em roedores por compressão ou contusão da medula espinhal (SILVA, N. A. et al., 2014). Em um dos modelos mais usados, utiliza-se o *impactor*, um equipamento que induz lesão leve, moderada ou severa na ME de ratos adultos (SILVA, N. A. et al., 2014). No entanto, este equipamento é extremamente caro. O presente modelo experimental é uma alternativa de baixo custo ao *impactor* que pode ser utilizada por laboratórios emergentes com pouco recurso disponível. Os eventos histopatológicos descritos, incluindo cavitação e intensa resposta inflamatória, são similares aos observados pelo uso do *impactor*. Propusemos, portanto, este modelo experimental, como alternativa ao uso do *impactor*.

#### 4.2. O TRATAMENTO COM EXTRATO SUPERCRTICO DE SEMENTES DE GERGELIM PRETO DIMINUI A CAVITAÇÃO PROGRESSIVA DA MEDULA ESPINHAL E O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS

O extrato supercrítico de gergelim injetado intraperitonealmente nos animais com lesão medular na fase aguda (1 a 7 dias) mostrou efeitos neuroprotetores e uma diminuição considerável do recrutamento de neutrófilos em 1 e 3 dias. Cavitação progressiva é uma característica fundamental da lesão aguda da ME humana que é comumente encontrada em animais de experimentação (GOMES-LEAL ET AL., 2004; 2005). A cavitação é altamente debilitante, pois é decorrente de necrose progressiva devida à perda de neurônios e células gliais (SCHWAB e BARTHOLDI, 1996). Os componentes da SB são bastante afetados durante a cavitação progressiva e um dos principais responsáveis pelos déficits neurológicos subsequentes (MATUTE et al., 2001).

No trabalho de IZUMI, B. et al. (2011) os autores estabeleceram uma relação positiva entre a presença de neutrófilos no local da lesão da medula espinhal e a modulação da resposta inflamatória através da expressão do microRNA (miR-223), o qual está relacionado com a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) associada a neutrófilos. O trabalho de BOTELHO et al. (2015) apresentou dados qualitativos do efeito do extrato supercrítico de copaíba relacionado à redução do infiltrado de neutrófilos e diminuição do dano tecidual na área de lesão no córtex motor de ratos 24 horas após a indução da lesão.

A diminuição do infiltrado de neutrófilos induzida pelo extrato de gergelim pode ter contribuído significativamente para a neuroproteção observada. Estudos futuros

devem estabelecer os mecanismos pelos quais o gergelim diminui o recrutamento de neutrófilos e contribui para a neuroproteção.

#### 4.3 O TRATAMENTO COM EXTRATO DE GERGELIM INIBE A ATIVAÇÃO MICROGLIAL 7 DIAS APÓS A LESÃO

Neste estudo, observou-se que o tratamento com extrato de gergelim diminui a ativação microglial 7 dias após a indução da lesão. Este fato pode contribuir para os efeitos neuroprotetores observados. Existem evidências experimentais que a ativação microglial excessiva contribui para a exacerbação do processo lesivo em modelos experimentais de desordens neurais agudas, incluindo AVE e trauma (WELLS et al., 2003; YRJANHEIKKI et al., 1999).

O tratamento com a tetraciclina minociclina melhora o processo lesivo após trauma experimental, diminuindo a área de lesão secundária e protegendo a morte tardia de oligodendrócitos (WELLS et al., 2003). O tratamento com gergelim pode agir através de mecanismos similares aos da minociclina, mas esta hipótese deve ser investigada em trabalhos futuros. Uma outra possibilidade é que o extrato de gergelim module a resposta inflamatória diminuindo a ativação da população microglial M1 e maximizando a ativação da população microglial benéfica M2. Sabe-se que na ME os dois fenótipos microgliais coexistem após trauma experimental (KIGERL et al., 2009).

#### 4.4. OS EFEITOS NEUROPROTETORES E ANTI-INFLAMATÓRIOS DO GERGELIM POSSIVELMENTE ESTÃO ASSOCIADOS À SUA AÇÃO ANTIOXIDANTE

Alguns trabalhos apresentaram dados demonstrando os componentes químicos e os efeitos do *Sesamum indicum L.* na saúde humana (AL-BACHIR, 2016; WEI et al., 2013; WIKUL et al., 2012). No trabalho de PANZELLA et al. (2012) os autores apresentam um estudo detalhado sobre os componentes estruturais do pigmento escuro da semente de gergelim, reduzindo os componentes da análise por processos de remoção de gorduras por tratamento com diclorometano seguido de otimização hidrolítica, como resultado deste processo, os autores determinaram que o gergelim é um eficiente antioxidante, além de atuar na redução de íon ferro e um potente antinitrosante. O efeito antioxidante do gergelim é sempre destacado nos trabalhos que investigam as propriedades da semente. No estudo apresentado por KUO et al. (2011) é possível identificar componentes como: sesaminol, sesamol, pinoresinol e derivados glicosídeos. Segundo os mesmos autores, o sesamol e o sesaminol são compostos associados a redução da peroxidação lipídica. Estes dados também foram encontrados no trabalho de UCHIDA (1996) onde foi demonstrada a inibição dos efeitos da peroxidação lipídica sobre o fígado e o rim em ratos. O estudo apresentado por PARK (2010) encontrou efeitos neuroprotetores, anti-hipertensivos e anti-inflamatórios da semente de gergelim. Substâncias com efeito antioxidante são capazes de reduzir a quantidade de radicais livres no meio extracelular, reduzindo os danos à membrana celular evitando a peroxidação lipídica. A lesão da medula espinhal causa danos primários e secundários ao tecido nervoso, dentre estes, a peroxidação lipídica é descrita como uma etapa importante da fisiopatologia das lesões do sistema nervoso, levando à degeneração das moléculas de fosfolipídios causando o rompimento da membrana ocasionando morte celular. Evitar o estresse oxidativo pode reduzir os mecanismos de dano celular nas lesões dos tecidos do

corpo, incluindo o sistema nervoso. Sendo assim, é possível que o mecanismo bem descrito na literatura, relacionado a peroxidação lipídica, seja inibido pela ação antioxidante do extrato de gergelim, levando a preservação do tecido nervoso e recuperação motora nos animais analisados neste trabalho, nos tempos agudos até o sétimo dia de tratamento.

#### 4.5. O TRATAMENTO COM EXTRATO DE GERGELIM INDUZ RECUPERAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR APÓS LESÃO DA MEDULA ESPINHAL

A avaliação eletromiográfica realizada para investigar a função muscular da pata posterior direita dos animais mostrou que naqueles tratados com gergelim houve uma recuperação de cerca de 50% da função motora até o sétimo dia após lesão, quando comparados com os animais que receberam apenas veículo (PBS/tween). É possível que o tratamento com extrato de gergelim tenha diminuído a resposta inflamatória e o estresse oxidativo, contribuindo para a melhor preservação de neurônios motores garantindo melhor inervação sobre as fibras musculares. Este fato pode claramente contribuir para o aumento da força muscular nos animais tratados.

## 5 – CONCLUSÃO

- O modelo de hemisseção proposto foi eficiente para induzir cavitação progressiva da ME, intensa resposta inflamatória e déficits funcionais em roedores adultos, o que foi comprovado por registro eletromiográfico;
- A dose diária de 150 mg/kg (75 mg/kg de 12 em 12 hs) do extrato supercrítico de gergelim, administrada intraperitonealmente, foi eficiente para reduzir a área de lesão da ME nos tempos de sobrevida investigados;
- O tratamento com extrato de gergelim reduziu significativamente o infiltrado de neutrófilos na área de lesão 1 e 3 dias após a indução do trauma experimental;
- Os animais que receberam o tratamento com gergelim apresentaram uma diminuição significativa da quantidade de micróglia/macrófagos presentes no epicentro da lesão medular e na porção rostral, 7 dias após a indução da lesão experimental;
- O tratamento com gergelim proporcionou uma recuperação da função motora na pata dos animais 7 dias após a lesão da ME, constatado por registro eletromiográfico.

## 6 – REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. e JANEWAY, C. A., JR. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 129-138., 2000.

ABRAMS, J. M.; WHITE, K.; FESSLER, L. I. e STELLER, H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. **Development**, v. 117, n. 1, p. 29-43, 1993.

AGRAWAL, S. K. e FEHLINGS, M. G. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na<sup>+</sup>, Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase, the Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchanger, and the Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. **J Neurosci**, v. 16, n. 2, p. 545-552, 1996.

AGRAWAL, S. K.; THERIAULT, E. e FEHLINGS, M. G. Role of group I metabotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord white matter injury. **J Neurotrauma**, v. 15, n. 11, p. 929-941, 1998.

AL-BACHIR, M. Some microbial, chemical and sensorial properties of gamma irradiated sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. **Food Chem**, v. 197, n. Pt A, p. 191-197, 2016.

ALBAYRAK, S.; ATCI, I. B.; KALAYCI, M.; YILMAZ, M.; KULOGLU, T.; AYDIN, S.; KOM, M.; AYDEN, O. e AYDIN, S. Effect of carnosine, methylprednisolone and their combined application on irisin levels in the plasma and brain of rats with acute spinal cord injury. **Neuropeptides**, v. 52, n. p. 47-54, 2015.

ANDERSON, D. K. Chemical and cellular mediators in spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 9, n. 2, p. 143-145; discussion 145-146, 1992.

ANTHES, D. L.; THERIAULT, E. e TATOR, C. H. Characterization of axonal ultrastructural pathology following experimental spinal cord compression injury. **Brain Res**, v. 702, n. 1-2, p. 1-16, 1995.

AO, Q.; SUN, X. H.; WANG, A. J.; FU, P. F.; GONG, K.; ZUO, H. C.; GONG, Y. D. e ZHANG, X. F. Protective effects of extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on nerve cells after spinal cord injury in rats. **Spinal Cord**, v. 44, n. 11, p. 662-667, 2006.

ARAS, M.; ALTAS, M.; MOTOR, S.; DOKUYUCU, R.; YILMAZ, A.; OZGIRAY, E.; SERASLAN, Y. e YILMAZ, N. Protective effects of minocycline on experimental spinal cord injury in rats. **Injury**, v. 46, n. 8, p. 1471-1474, 2015.

ASPBERG, A. e TOTTMAR, O. Oxidative stress decreases antioxidant enzyme activities in reaggregation cultures of rat brain cells. **Free Radic Biol Med**, v. 17, n. 6, p. 511-516, 1994.

BAREYRE, F. M. e SCHWAB, M. E. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 10, p. 555-563, 2003.

BARROS FILHO, T. E.; TARICCO, M. A.; OLIVEIRA, R. P.; GREVE, J. M.; SANTOS, L. C. e NAPOLI, M. M. Estudo epidemiológico dos pacientes com traumatismo da coluna vertebral e déficit neurológico, internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. **Revista do Hospital de Clínica Médica da Universidade de São Paulo**, v. 43, n. 3, p. 123-126, 1990.

BARSS, P.; DJERRARI, H.; LEDUC, B. E.; LEPAGE, Y. e DIONNE, C. E. Risk factors and prevention for spinal cord injury from diving in swimming pools and natural sites in Quebec, Canada: a 44-year study. **Accid Anal Prev**, v. 40, n. 2, p. 787-797, 2008.

BEATTIE, M. S.; FAROOQUI, A. A. e BRESNAHAN, J. C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 17, n. 10, p. 915-925, 2000.

BEHRMANN, D. L.; BRESNAHAN, J. C. e BEATTIE, M. S. Modeling of acute spinal cord injury in the rat: neuroprotection and enhanced recovery with methylprednisolone, U-74006F and YM-14673. **Exp Neurol**, v. 126, n. 1, p. 61-75, 1994.

BLIGHT, A. R. Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. **Cent Nerv Syst Trauma**, v. 2, n. 4, p. 299-315, 1985.

—. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 9, n. 1, p. S83-91, 1992.

—. Effects of silica on the outcome from experimental spinal cord injury: implication of macrophages in secondary tissue damage. **Neuroscience**, v. 60, n. 1, p. 263-273., 1994.

BLIGHT, A. R. e ZIMBER, M. P. Acute spinal cord injury: pharmacotherapy and drug development perspectives. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 2, n. 6, p. 801-808., 2001.

BLUMER, C. E. e QUINE, S. Prevalence of spinal cord injury: an international comparison. **Neuroepidemiology**, v. 14, n. 5, p. 258-268, 1995.

BOCHE, D.; PERRY, V. H. e NICOLL, J. A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 39, n. 1, p. 3-18, 2013.

BOTELHO, E. A. [History of medicine in the Amazon region. Disappearance of the shaman and Christianization of healing rituals among the tariano Indians, at the urban outskirts of Manaus]. **Hist Sci Med**, v. 48, n. 2, p. 199-202, 2014.

BOTELHO ET AL, A. G.-S., M. E ARAÚJO, M. E. MBRAGA, WALACE GOMES-LEAL, RAUL N. CARVALHO-JR, M. A. A. MEIRELES, M. S. OLIVEIRA Copaíba

(Copaifera sp.) leaf extracts obtained by CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, n. p. 167-171, 2015.

BOTELHO, R. V.; ABGUSSEN, C. M.; MACHADO, G. C.; ELIAS, A. J.; SILVA, A. A.; BITTENCOURT, L. R. e FONTOURA, E. A. Epidemiologia do trauma raquimedular cervical na zona norte da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 20, n. 3/4, p. 64-76, 2001.

BRACKEN, M. B. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: current status and future prospects. **Paraplegia**, v. 30, n. 2, p. 102-107, 1992.

BRAUGHLER, J. M. e HALL, E. D. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. **Free Radic Biol Med**, v. 6, n. 3, p. 289-301, 1989.

—. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. **J Neurotrauma**, v. 9 Suppl 1, n. p. S1-7, 1992.

BRAUGHLER, J. M.; DUNCAN, L. A. e GOODMAN, T. Calcium enhances in vitro free radical-induced damage to brain synaptosomes, mitochondria, and cultured spinal cord neurons. **J Neurochem**, v. 45, n. 4, p. 1288-1293, 1985.

BRAUGHLER, J. M.; PREGENZER, J. F.; CHASE, R. L.; DUNCAN, L. A.; JACOBSEN, E. J. e MCCALL, J. M. Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. **J Biol Chem**, v. 262, n. 22, p. 10438-10440, 1987.

BRUCE, J. H.; NORENBURG, M. D.; KRAYDIEH, S.; PUCKETT, W.; MARCILLO, A. e DIETRICH, D. Schwannosis: role of gliosis and proteoglycan in human spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 17, n. 9, p. 781-788, 2000.

BRUNI, J. E. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. **Microsc Res Tech**, v. 41, n. 1, p. 2-13, 1998.

BUNGE, R. P.; PUCKETT, W. R.; BECERRA, J. L.; MARCILLO, A. e QUENCER, R. M. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. **Adv Neurol**, v. 59, n. p. 75-89, 1993.

BURDA, J. E.; BERNSTEIN, A. M. e SOFRONIEW, M. V. Astrocyte roles in traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 275 Pt 3, n. p. 305-315, 2016.

CAMPOS, M. F.; RIBEIRO, A. T.; LISTIK, S.; PEREIRA, C. A. B. e SOBRINHO, J. A. Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v. 35, n. 2, p. 88-93, 2008.

CARLSON, G. D. e GORDEN, C. Current developments in spinal cord injury research. **Spine J**, v. 2, n. 2, p. 116-128, 2002.

CARODOZO-GONZALES, R. I.; VILLA, T. C. e CALIRI, M. H. O processo da assistência ao paciente com lesão medular: gerenciamento de caso como estratégia de organização da alta hospitalar. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 34, n. 3/4, p. 325-333, 2001.

CELIK, F.; GOCMEZ, C.; KAMASAK, K.; TUFEK, A.; GUZEL, A.; TOKGOZ, O.; FIRAT, U. e EVLIYAOGU, O. The comparison of neuroprotective effects of intrathecal dexmedetomidine and metilprednisolone in spinal cord injury. **Int J Surg**, v. 11, n. 5, p. 414-418, 2013.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A. e O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **J Neuroinflammation**, v. 11, n. p. 98, 2014.

CHHOR, V.; LE CHARPENTIER, T.; LEBON, S.; ORE, M. V.; CELADOR, I. L.; JOSSERAND, J.; DEGOS, V.; JACOTOT, E.; HAGBERG, H.; SAVMAN, K.; MALLARD, C.; GRESSENS, P. e FLEISS, B. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. **Brain Behav Immun**, v. 32, n. p. 70-85, 2013.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. **Neurosci Lett**, v. 58, n. 3, p. 293-297, 1985.

CONN, P. J. e PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, n. p. 205-237, 1997.

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

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L. e GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 752-758, 2005.

DEFINO, H. L.; RODRIGUEZ FUENTES, A. E.; REMONDI, P. H. e VALLIM, E. C. Tratamento conservador das fraturas da coluna toracolombar. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 35, n. 8, p. 301-308, 2000.

DONNELLY, D. J. e POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 209, n. 2, p. 378-388, 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.

ECLANCHER, F.; KEHRLI, P.; LABOURDETTE, G. e SENSENBRENNER, M. Basic fibroblast growth factor (bFGF) injection activates the glial reaction in the injured adult rat brain. **Brain Res**, v. 737, n. 1-2, p. 201-214, 1996.

FADEN, A. I.; JACOBS, T. P. e HOLADAY, J. W. Opiate antagonist improves neurologic recovery after spinal injury. **Science**, v. 211, n. 4481, p. 493-494, 1981.

FAROOQUE, M.; HILLERED, L.; HOLTZ, A. e OLSSON, Y. Effects of methylprednisolone on extracellular lactic acidosis and amino acids after severe compression injury of rat spinal cord. **J Neurochem**, v. 66, n. 3, p. 1125-1130, 1996.

FAWCETT, J. W. e ASHER, R. A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Res Bull**, v. 49, n. 6, p. 377-391, 1999.

FERNANDEZ-CASTANEDA, A. e GAULTIER, A. Adult oligodendrocyte progenitor cells - multifaceted regulators of the CNS in health and disease. **Brain Behav Immun**, v. n. p. 2016.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem**, v. 42, n. 1, p. 1-11, 1984.

FRANKEL, H. L.; HANCOCK, D. O.; HYSLOP, G.; MELZAK, J.; MICHAELIS, L. S.; UNGAR, G. H.; VERNON, J. D. e WALSH, J. J. The value of postural reduction in the initial management of closed injuries of the spine with paraplegia and tetraplegia. I. **Paraplegia**, v. 7, n. 3, p. 179-192, 1969.

FREITAS, P. E. Traumatismos raquimedulares agudos: estudo epidemiológico de cem casos consecutivos. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 1990.

GARCIA-BARCINA, J. M. e MATUTE, C. AMPA-selective glutamate receptor subunits in glial cells of the adult bovine white matter. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 53, n. 1-2, p. 270-276, 1998.

GENSEL, J. C. e ZHANG, B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. **Brain Res**, v. 1619, n. p. 1-11, 2015.

GENSEL, J. C.; NAKAMURA, S.; GUAN, Z.; VAN ROOIJEN, N.; ANKENY, D. P. e POPOVICH, P. G. Macrophages promote axon regeneration with concurrent neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 29, n. 12, p. 3956-3968, 2009.

GENTLEMAN, S. M.; NASH, M. J.; SWEETING, C. J.; GRAHAM, D. I. e ROBERTS, G. W. Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. **Neurosci Lett**, v. 160, n. 2, p. 139-144, 1993.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C. e GAGE, F. H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918-934, 2010.

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain Behav**, v. 2, n. 3, p. 345-356, 2012.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J. e PICANCO-DINIZ, C. W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Res**, v. 1066, n. 1-2, p. 57-70, 2005.

GOMES-LEAL, W.; SILVA, G. J.; OLIVEIRA, R. B. e PICANCO-DINIZ, C. W. Computer-assisted morphometric analysis of intrinsic axon terminals in the supragranular layers of cat striate cortex. **Anat Embryol (Berl)**, v. 205, n. 4, p. 291-300, 2002.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; FREIRE, M. A.; PICANCO-DINIZ, C. W. e PERRY, V. H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 190, n. 2, p. 456-467, 2004.

GUIMARAES-SANTOS, A.; SANTOS, D. S.; SANTOS, I. R.; LIMA, R. R.; PEREIRA, A.; DE MOURA, L. S.; CARVALHO, R. N., JR.; LAMEIRA, O. e GOMES-LEAL, W. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, n. p. 918174, 2012.

HALL, E. D. e BRAUGHLER, J. M. Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity. Dose-response analysis during 1st hour after contusion injury in the cat. **J Neurosurg**, v. 57, n. 2, p. 247-253, 1982.

—. Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. **Free Radic Biol Med**, v. 6, n. 3, p. 303-313, 1989.

—. Free radicals in CNS injury. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis**, v. 71, n. p. 81-105, 1993.

HALL, E. D. e SPRINGER, J. E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 80-100, 2004.

HALL, E. D.; YONKERS, P. A.; ANDRUS, P. K.; COX, J. W. e ANDERSON, D. K. Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 9 Suppl 2, n. p. S425-442, 1992.

HAUWEL, M.; FURON, E.; CANOVA, C.; GRIFFITHS, M.; NEAL, J. e GASQUE, P. Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 48, n. 2, p. 220-233, 2005.

HAYES, K. C. e KAKULAS, B. A. Neuropathology of human spinal cord injury sustained in sports-related activities. **J Neurotrauma**, v. 14, n. 4, p. 235-248, 1997.

HEADLEY, P. M. e GRILLNER, S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 5, p. 205-211, 1990.

HOLTZ, A.; NYSTROM, B. e GERDIN, B. Effect of methylprednisolone on motor function and spinal cord blood flow after spinal cord compression in rats. **Acta Neurol Scand**, v. 82, n. 1, p. 68-73, 1990.

HU, Q.; XU, J.; CHEN, S. e YANG, F. Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 4, p. 943-947, 2004.

HU, X.; LI, P.; GUO, Y.; WANG, H.; LEAK, R. K.; CHEN, S.; GAO, Y. e CHEN, J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 43, n. 11, p. 3063-3070, 2012.

IZUMI, B.; NAKASA, T.; TANAKA, N.; NAKANISHI, K.; KAMEI, N.; YAMAMOTO, R.; NAKAMAE, T.; OHTA, R.; FUJIOKA, Y.; YAMASAKI, K. e OCHI, M. MicroRNA-223 expression in neutrophils in the early phase of secondary damage after spinal cord injury. **Neurosci Lett**, v. 492, n. 2, p. 114-118, 2011.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F., JR.; PINTO, A. C. e NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **J Med Chem**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.

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.

JOAKIM, C.; MARK, E. K.; HABGOOD, D.; JENNIFER, K.; CALLAWAY, R. D.; M., K.; DZIEGIELEWSKA, P. A.; JOHANSSON, A. P.; BENJAMIN, W. e S., N. R. Spatio-Temporal Progression of Grey and White Matter Damage Following Contusion Injury in Rat Spinal Cord. **PLOS ONE**, v. 5, n. 8, p. 1-16, 2010.

KAKULAS, B. A. A review of the neuropathology of human spinal cord injury with emphasis on special features. **J Spinal Cord Med**, v. 22, n. 2, p. 119-124, 1999.

KANNUS, P.; NIEMI, S.; PALVANEN, M. e PARKKARI, J. Continuously increasing number and incidence of fall-induced, fracture-associated, spinal cord injuries in elderly persons. **Arch Intern Med**, v. 160, n. 14, p. 2145-2149, 2000.

KAYSER, K.; BERTHOLD, S.; EICHHORN, S.; KAYSER, C.; ZIEHMS, S. e GABIUS, H. J. Application of attributed graphs in diagnostic pathology. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 18, n. 4, p. 286-292, 1996.

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.

KIM, K. T.; KIM, M. J.; CHO, D. C.; PARK, S. H.; HWANG, J. H.; SUNG, J. K.; CHO, H. J. e JEON, Y. The neuroprotective effect of treatment with curcumin in acute spinal cord injury: laboratory investigation. **Neurol Med Chir (Tokyo)**, v. 54, n. 5, p. 387-394, 2014.

KIRAN, K. e ASAD, M. Wound healing activity of *Sesamum indicum* L seed and oil in rats. **Indian J Exp Biol**, v. 46, n. 11, p. 777-782, 2008.

KOYANAGI, I.; TATOR, C. H. e THERIAULT, E. Silicone rubber microangiography of acute spinal cord injury in the rat. **Neurosurgery**, v. 32, n. 2, p. 260-268; discussion 268, 1993.

KUO, P. C.; LIN, M. C.; CHEN, G. F.; YIU, T. J. e TZEN, J. T. Identification of methanol-soluble compounds in sesame and evaluation of antioxidant potential of its lignans. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 7, p. 3214-3219, 2011.

KWON, B. K.; HILLYER, J. e TETZLAFF, W. 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. K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J. N.; BEINER, J. e VACCARO, A. R. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. **Spine J**, v. 4, n. 4, p. 451-464, 2004.

LAJTHA, A. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Brain and Spinal Cord Trauma. 3 ed., New York: Springer, 2009, 669 p.

LEE, B. H.; LEE, K. H.; KIM, U. J.; YOON, D. H.; SOHN, J. H.; CHOI, S. S.; YI, I. G. e PARK, Y. G. Injury in the spinal cord may produce cell death in the brain. **Brain Res**, v. 1020, n. 1-2, p. 37-44, 2004.

LI, S.; MEALING, G. A.; MORLEY, P. e STYS, P. K. Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transport. **J Neurosci**, v. 19, n. 14, p. RC16, 1999a.

LI, Y.; FIELD, P. M. e RAISMAN, G. Death of oligodendrocytes and microglial phagocytosis of myelin precede immigration of Schwann cells into the spinal cord. **J Neurocytol**, v. 28, n. 4-5, p. 417-427, 1999b.

LIMA, S. R.; JUNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C. e FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. **Phytother Res**, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, 2003.

LIU, Y.; KIM, D.; HIMES, B. T.; CHOW, S. Y.; SCHALLERT, T.; MURRAY, M.; TESSLER, A. e FISCHER, I. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. **J Neurosci**, v. 19, n. 11, p. 4370-4387, 1999.

LOY, D. N.; CRAWFORD, C. H.; DARNALL, J. B.; BURKE, D. A.; ONIFER, S. M. e WHITTEMORE, S. R. Temporal progression of angiogenesis and basal lamina deposition after contusive spinal cord injury in the adult rat. **J Comp Neurol**, v. 445, n. 4, p. 308-324, 2002.

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

MARCUS, M. L.; HEISTAD, D. D.; EHRHARDT, J. C. e ABOUD, F. M. Regulation of total and regional spinal cord blood flow. **Acta Neurol Scand Suppl**, v. 64, n. p. 538-539, 1977.

MARQUES, S. A.; GARCEZ, V. F.; DEL BEL, E. A. e MARTINEZ, A. M. A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment. **J Neurosci Methods**, v. 177, n. 1, p. 183-193, 2009.

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

MARTINO, G.; FURLAN, R.; COMI, G. e ADORINI, L. The ependymal route to the CNS: an emerging gene-therapy approach for MS. **Trends Immunol**, v. 22, n. 9, p. 483-490, 2001.

MASINI, M. Tratamento das fraturas e luxações da coluna toracolombar por descompressão pósterio-lateral e fixação posterior com retângulo e fios segmentares sublaminares associados a enxerto ósseo (dissertação). **Escola Paulista de Medicina**, v. n. p. 2000.

— Estimativa da incidência e prevalência de lesão medular no Brasil. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 12, n. 2, p. 97-100, 2001.

MASINI, M.; KHAN, P.; TEIXEIRA, M. M.; PLAINTIER, A. L. M. B.; CANTANHEDE, W. C. e MARANHÃO, V. L. Trauma raquimedular em crianças - diferenças na etiologia, tratamento e evolução quando comparado com o adulto. **Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 14, n. 2, p. 119-128, 1995.

MATUTE, C. Calcium dyshomeostasis in white matter pathology. **Cell Calcium**, v. 47, n. 2, p. 150-157, 2010.

MATUTE, C.; ALBERDI, E.; DOMERCQ, M.; PEREZ-CERDA, F.; PEREZ-SAMARTIN, A. e SANCHEZ-GOMEZ, M. V. The link between excitotoxic

oligodendroglial death and demyelinating diseases. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 4, p. 224-230, 2001.

MATYSZAK, M. K. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. **Prog Neurobiol**, v. 56, n. 1, p. 19-35., 1998.

MCADOO, D. J.; XU, G. Y.; ROBAK, G. e HUGHES, M. G. Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. **Exp Neurol**, v. 159, n. 2, p. 538-544, 1999.

MCKINLEY, W. O.; SEEL, R. T. e HARDMAN, J. T. Nontraumatic spinal cord injury: incidence, epidemiology, and functional outcome. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 80, n. 6, p. 619-623, 1999.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-1015S, 2000.

—. Concept of activity-induced cell death in epilepsy: historical and contemporary perspectives. **Prog Brain Res**, v. 135, n. p. 3-11, 2002.

MELLO, L. R.; ESPÍNDOLA, G.; SILVA, F. M. e BERNARDES, C. I. Lesado medular. Estudo prospectivo de 92 casos. **Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia.**, v. 23, n. 4, p. 151-156, 2004.

NASIRINEZHAD, F.; GAJAVELLI, S.; PRIDDY, B.; JERGOVA, S.; ZADINA, J. e SAGEN, J. Viral vectors encoding endomorphins and serine histogranin attenuate neuropathic pain symptoms after spinal cord injury in rats. **Mol Pain**, v. 11, n. p. 2, 2015.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F. e HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, 2005.

NORENBERG, M. D.; SMITH, J. e MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **J Neurotrauma**, v. 21, n. 4, p. 429-440, 2004.

NSCISC e CENTER, N. S. C. I. S. Spinal cord injury: Facts and figures at a glance. **Birmingham: University of Alabama**, v. n. p. 2008.

OLNEY, J. W. Excitotoxin-mediated neuron death in youth and old age. **Prog Brain Res**, v. 86, n. p. 37-51, 1990.

OYOSHI, M. K.; ELKHAL, A.; SCOTT, J. E.; WURBEL, M. A.; HORNICK, J. L.; CAMPBELL, J. J. e GEHA, R. S. Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2210-2220, 2011.

PANZELLA, L.; EIDENBERGER, T.; NAPOLITANO, A. e D'ISCHIA, M. Black sesame pigment: DPPH assay-guided purification, antioxidant/antinitrosating properties, and identification of a degradative structural marker. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 36, p. 8895-8901, 2012.

PARK, S. H. R., S. N.; BU, Y.; KIM, H.; SIMON, J. E.; KIM, K. S. Antioxidant components as potential neuroprotective agents in sesame (*Sesamum indicum* L.). **Food Rev. Int.**, v. 26, n. p. 2010.

POPOVICH, P. G.; WEI, P. e STOKES, B. T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. **J Comp Neurol**, v. 377, n. 3, p. 443-464, 1997.

POPOVICH, P. G.; GUAN, Z.; WEI, P.; HUITINGA, I.; VAN ROOIJEN, N. e STOKES, B. T. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 158, n. 2, p. 351-365., 1999.

PRODINGER, C.; BUNSE, J.; KRUGER, M.; SCHIEFENHOVEL, F.; BRANDT, C.; LAMAN, J. D.; GRETER, M.; IMMIG, K.; HEPPNER, F.; BECHER, B. e BECHMANN, I. CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 121, n. 4, p. 445-458, 2011.

RANSOHOFF, R. M. e PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, v. 27, n. p. 119-145, 2009.

RANSOHOFF, R. M. e BROWN, M. A. Innate immunity in the central nervous system. **J Clin Invest**, v. 122, n. 4, p. 1164-1171, 2012.

RANSOM, B.; BEHAR, T. e NEDERGAARD, M. New roles for astrocytes (stars at last). **Trends Neurosci**, v. 26, n. 10, p. 520-522, 2003.

ROBINSON, A. P.; WHITE, T. M. e MASON, D. W. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. **Immunology**, v. 57, n. 2, p. 239-247., 1986.

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.

SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M. E. e PERRY, V. H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. **Eur J Neurosci**, v. 11, n. 10, p. 3648-3658, 1999.

SCHWAB, M. E. e BARTHOLDI, D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. **Physiol Rev**, v. 76, n. 2, p. 319-370, 1996.

SENER, H. J. e VENES, J. L. Loss of autoregulation and posttraumatic ischemia following experimental spinal cord trauma. **J Neurosurg**, v. 50, n. 2, p. 198-206, 1979.

SILVA, G. S. e VALIENTE, R. A. Spinal cord infarct as the primary presentation of aortic dissection. **Spine J**, v. 14, n. 11, p. 2787-2788, 2014.

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.

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

SPOSITO, M. M.; LAREDO FILHO, J.; BRAGA, F. M. e NOVO, N. F. Paraplegia por lesão medular: estudo epidemiológico em pacientes atendidos para reabilitação. **Revista Paulista de Medicina**, v. 104, n. p. 196-202, 1986.

STYS, P. K. Anoxic and ischemic injury of myelinated axons in CNS white matter: from mechanistic concepts to therapeutics. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 18, n. 1, p. 2-25, 1998.

SU, Y. F.; LIN, C. L.; LEE, K. S.; TSAI, T. H.; WU, S. C.; HWANG, S. L.; CHEN, S. C. e KWAN, A. L. A modified compression model of spinal cord injury in rats: functional assessment and the expression of nitric oxide synthases. **Spinal Cord**, v. 53, n. 6, p. 432-435, 2015.

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

UCHIDA, M. N., S.; TOYOSHIMA, S.; SHINODA, M. Antioxidant effect of sesamol and related compounds on lipid peroxidation. **Biol. Pharmacol. Bull**, v. 19, n. p. 1996.

VAN ASBECK, F. W.; POST, M. W. e PANGALILA, R. F. An epidemiological description of spinal cord injuries in The Netherlands in 1994. **Spinal Cord**, v. 38, n. 7, p. 420-424, 2000.

WEI, W.; LI, D.; WANG, L.; DING, X.; ZHANG, Y.; GAO, Y. e ZHANG, X. Morpho-anatomical and physiological responses to waterlogging of sesame (*Sesamum indicum* L.). **Plant Sci**, v. 208, n. p. 102-111, 2013.

WELLS, J. E.; HURLBERT, R. J.; FEHLINGS, M. G. e YONG, V. W. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. **Brain**, v. 126, n. Pt 7, p. 1628-1637, 2003.

WIKUL, A.; DAMSUD, T.; KATAOKA, K. e PHUWAPRAISIRISAN, P. (+)-Pinoresinol is a putative hypoglycemic agent in defatted sesame (*Sesamum indicum*) seeds though inhibiting alpha-glucosidase. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 22, n. 16, p. 5215-5217, 2012.

WILSON, J. R. e FEHLINGS, M. G. Riluzole for acute traumatic spinal cord injury: a promising neuroprotective treatment strategy. **World Neurosurg**, v. 81, n. 5-6, p. 825-829, 2014.

WYNDAELE, M. e WYNDAELE, J. J. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? **Spinal Cord**, v. 44, n. 9, p. 523-529, 2006.

XU, J.; QU, Z. X.; HOGAN, E. L. e PEROT, P. L., JR. Protective effect of methylprednisolone on vascular injury in rat spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 9, n. 3, p. 245-253, 1992.

XU, J.; KIM, G. M.; AHMED, S. H.; XU, J.; YAN, P.; XU, X. M. e HSU, C. Y. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 21, n. 1, p. 92-97, 2001.

YAMAURA, I.; YONE, K.; NAKAHARA, S.; NAGAMINE, T.; BABA, H.; UCHIDA, K. e KOMIYA, S. Mechanism of destructive pathologic changes in the spinal cord under chronic mechanical compression. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 27, n. 1, p. 21-26, 2002.

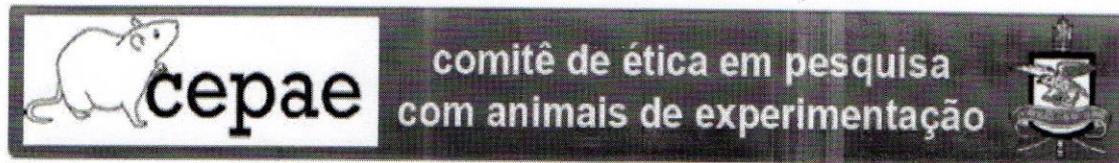
YOUNG, W. e BRACKEN, M. B. The Second National Acute Spinal Cord Injury Study. **J Neurotrauma**, v. 9 Suppl 1, n. p. S397-405, 1992.

YOUNG, W.; DECRESCITO, V.; FLAMM, E. S.; BLIGHT, A. R. e GRUNER, J. A. Pharmacological therapy of acute spinal cord injury: studies of high dose methylprednisolone and naloxone. **Clin Neurosurg**, v. 34, n. p. 675-697, 1988.

YRJANHEIKKI, J.; TIKKA, T.; KEINANEN, R.; GOLDSTEINS, G.; CHAN, P. H. e KOISTINAHO, J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13496-13500, 1999.

ZANINELLI, E. M.; GRAELLS, X. S.; NÉRI, O. J. e DAU, L. Avaliação epidemiológica das fraturas da coluna torácica e lombar de pacientes atendidos no Pronto-Socorro do Hospital do Trabalhador da UFPR de Curitiba - Paraná. **Coluna/Columna**, v. 4, n. 1, p. 11-15, 2005.

## ANEXO I

**PARECER 137-13**

**Projeto:** EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA E SEUS PRINCÍPIOS ATIVOS COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO E TRAUMAS CRANIOENCEFÁLICO E DA MEDULA ESPINHAL

**Coordenador:** Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

**Área Temática:** Neurociências

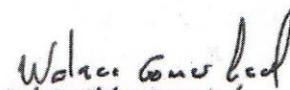
**Vigência:** 04/2014 a 04/2016

**Nº no CEPAE-UFPa:** 137-13

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (Ratos Wistar, N= 200) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 05 de março de 2013

  
**Prof. Dr. Wallace Gomes Leal**  
Presidente do CEPAE-UFPa