

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA
ACUPUNTURA NO MODELO DE
LESÃO MEDULAR POR
COMPRESSÃO EM RATOS

RAQUEL DO NASCIMENTO DE SOUZA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA
ACUPUNTURA NO MODELO DE LESÃO
MEDULAR POR COMPRESSÃO EM RATOS**

RAQUEL DO NASCIMENTO DE SOUZA

**SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA
MAGDA ALVES DE MEDEIROS**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Seropédica, RJ

Junho de 2012

Anexo C –Ficha catalográfica a ser elaborada pela Biblioteca Central

636.0895892

S831e

T

Souza, Raquel do Nascimento de, 1984-
Efeito antiinflamatório da acupuntura no
modelo de lesão medular por compressão em
ratos/ Raquel do Nascimento de Souza. - 2012.
72 f.: il.

Orientador: Magda Alves de Medeiros.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas.

Bibliografia: f. 60-72.

1. Acupuntura veterinária - Teses. 2. Rato
como animal de laboratório - Teses. 3. Medula
óssea - Inflamação - Tratamento - Teses. 4.
Abelha - Veneno - Teses. I. Medeiros, Magda
Alves de, 1968-. II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

RAQUEL DO NASCIMENTO DE SOUZA

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, no Curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

DISSERTAÇÃO (TESE) APROVADA EM 12/06/2012 (Data da defesa)



Prof. Dra. Magda Alves de Medeiros
(Orientadora)



Prof. Dr. Alfred Sholl Franco



Prof. Dr. Frederico Argollo Vanderlinde

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos cadeirantes que enfrentam
diariamente os obstáculos da vida.

“Sempre desprezei as coisas mornas, as coisas que não provocam ódio nem paixão, as coisas definidas como mais ou menos, um filme mais ou menos, um livro mais ou menos. Tudo perda de tempo. Viver tem que ser perturbador, é preciso que nossos anjos e demônios sejam despertados, e com eles sua raiva, seu orgulho, seu asco, sua adoração ou seu desprezo. O que não faz você mover um músculo, o que não faz você estremecer, suar, desatinar, não merece fazer parte da sua biografia.”
(Martha Medeiros)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sônia e Mario estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Magda Alves de Medeiros com quem pude crescer profissionalmente. Sem o seu apoio, provavelmente, não estaria aqui.

À Fernanda (Fonkas) e Paula Assis por terem me ajudado em meus experimentos. Muito obrigada meninas.

À Fabrícia, Carol e Cema por me apoiarem nesses últimos meses tão estressantes. Muito obrigada pelo apoio moral.

Ao Fabio Telles e Natalia (Magda) por aturarem minhas choradeiras.

À Ligia, pelas longas discussões científicas. Acredito que nós crescemos muito juntas.

Ao mestre Luis, pelos ensinamentos que levarei por toda a vida.

Agradeço também aos demais professores Emerson, Wellington, Jairo, Alba, Fabio, Bruno, Michele e Fred por contribuírem muito para a minha formação.

Aos meus grandes amigos do DCF: Claudinho, Rafael, Raquel Teixeira, Robertinho, Marissa, Anderson, Claudinho, Natalia e Tine. Sem vocês, o departamento não teria a menor graça.

Ao Danilo que me recebeu tão bem em Ribeirão Preto, por vezes, até esqueci que não estava em casa.

Aos funcionários do Departamento Franklin, Maria Rita, Dona Leni, Sr Ney, Juca, Seu Ambrósio e Paulo.

Ao Fabio por aturar meu estresse e por me ajudar mesmo que de longe.

À minha irmã, Renata, por me incentivar e acreditar em mim sempre até quando eu deixei de acreditar.

À Faperj, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Souza, Raquel. **Efeito anti-inflamatório da acupuntura no modelo de lesão medular por compressão em ratos**. 2012. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A lesão medular (SCI) inicia uma série de eventos moleculares e celulares, denominados danos secundários, onde, uma resposta inflamatória exagerada resulta em uma maior disfunção motora e sensorial. Acredita-se que a acupuntura e apipuntura possa ser utilizada como uma terapia complementar que venha promover neuroproteção e minimize os déficits gerados pela SCI. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da apipuntura na recuperação funcional e na expressão de citocinas inflamatórias na medula espinal após à SCI por compressão. Para indução da SCI, um cateter fogarty de embolectomia foi inflado com 15µL de salina no espaço extradural, entre as vértebras T8 e T9, por 5 minutos em ratos Wistar, machos. Inicialmente foi investigado o efeito de dois tipos de estimulação (acupuntura manual: aplicação de agulhas de acupuntura nos pontos e apipuntura: injeção de 20µL de BV diluído em salina na dose de 0,08mg/kg nos pontos de acupuntura) em três combinações diferentes de acupontos (E36 (Zunsanli) + VG3(Yaoyangquan); ID3 (Houxi) + B62 (Shenmai) e VG3 (Yaoyangquan) + VG9 (Zhiyang) na recuperação locomotora após SCI, que foi avaliada através do teste BBB por duas semanas. Não foi detectada diferença significativa entre os tipos de estimulação (acupuntura e apipuntura), além disso, a estimulação da combinação dos acupontos E36+VG3 promoveu uma melhora significativa da capacidade locomotora em relação aos seus controles (sem estimulação e acupuntura ou apipuntura em não-pontos) e em relação a estimulação das combinações ID3 + B62 e VG3 + VG9. A estimulação das combinações ID3 + B62 e VG3 + VG9 não promoveu efeito significativo na capacidade locomotora dos ratos após SCI. Com base nesses resultados, imediatamente após o SCI, foi avaliada o efeito da apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 pelo método de quimiluminescência 1, 6 e 24 horas após o tratamento. A apipuntura nos acupontos E36+VG3 promoveu um aumento da expressão de IL-10 às 6 horas e redução de IL-6 às 24 horas em relação aos seus controles (BV em não pontos e controle sem manipulação). Não foram detectadas diferenças significativas na expressão da IL-1 β e IL-4 entre os grupos em nenhum dos tempos estudados. Dessa forma, estes resultados sugerem que apipuntura nos pontos E36+VG3 é capaz de promover recuperação parcial da locomoção e esta melhora está associada a uma ação anti-inflamatória através da modulação do balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Apipuntura, citocina proinflamatória, citocina anti-inflamatória, neuroinflamação, veneno de abelha.

ABSTRACT

Souza, Raquel. **Anti-inflammatory effect of acupuncture on the model of spinal cord compression in rats.** 2012. 118 p. Dissertation (Master in Physiological Sciences). Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Spinal cord injury (SCI) initiates a series of molecular and cellular events, called secondary damage, where an exaggerated inflammatory response results in major motor and sensory dysfunction. It is believed that acupuncture can be a complementary therapy to promote neuroprotection and minimize the deficits generated by SCI. The objective of this study was to investigate the effect of acupuncture and apipuncture on the functional recovery and on the inflammatory cytokines expression in the spinal cord after SCI by compression. For induction of SCI, a Fogarty embolectomy catheter was inflated with saline 15 μ L in the extradural space between vertebrae T8 and T9, for 5 minutes in male, Wistar rats. Initially we investigated the effect of two types stimulation (manual acupuncture: application of acupuncture needles in points and apipuncture: injection of 20 μ L of BV diluted in saline at a dose of 0.08 mg/kg at acupuncture points) in three different combinations of acupoints (E36 (Zusanli) + VG3 (Yaoyangquan), ID3 (Houxi) + B62 (Shenmai) and VG3 (Yaoyangquan) + VG9 (Zhiyang) on locomotor recovery after SCI, which was assessed using the BBB test for two weeks. No significant difference was detected between the types of stimulation (acupuncture and apipuncture), furthermore the stimulation of the combination of acupoints E36+VG3 promoted a significant increase in the locomotor capacity in relation to the controls (no stimulation or acupuncture or apipuncture in non-points) and in relation to stimulation of combinations and ID3 + B62 and VG3+VG9. The combinations of ID3 + B62 and VG9+VG3 did not promote significant effect on the locomotor capacity of rats after SCI. Based on these results, we evaluated using a chemiluminescence method, the effect of apipuncture at acupoints E36+VG3 immediately after SCI on the release of proinflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-4), 6 and 24 hours after SCI. Apipuncture at the acupoints on E36 + VG3 increased the expression of IL-10 at 6 hours and reduced the expression of IL-6 at 24 hours after SCI compared to their controls (BV in non-points and no manipulation control). There were no significant differences in the expression of IL-1 β and IL-4 between the groups in any of the periods studied. Thus, these results suggest that apipuncture at the acupoints VG3+E36 is able to promote partial recovery of locomotion and this improvement is associated with an anti-inflammatory action by modulating the balance of pro and anti-inflammatory.

Keywords: Apipuncture, proinflammatory cytokine, anti-inflammatory cytokine, neuroinflammation, spinal cord injury, bee venom.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos danos secundário após a lesão medular. p 7.

Tabela 2: Escala Basso, Beattie & Bresnahan para avaliação da capacidade de locomoção de ratos pós-lesão medular. p.46

Tabela 3: Escore de severidade do trauma e escore de capacidade locomotora de animais submetidos a lesão medular por compressão. p.57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrando a Coluna vertebral e a medula espinal humana. Estruturas externas (A) e internas (B), p.6

Figura 2: Desenho esquemático da organização citoarquitetônica das lâminas de Rexed no corno dorsal da medula espinal. O esquema demonstra a entrada de diferentes fibras sensoriais, provenientes da periferia, nas lâminas do corno dorsal da medula espinal., p.7

Figura 3: Esquema ilustrando Lesão Traumática. Em A, o desenho esquemático ilustra uma fratura óssea promovendo uma Lesão na medular. Em B, o desenho esquemático ilustra uma força compressiva também promovendo uma lesão medular. p.9

Figura 4: Danos primário e secundário após lesão da medula espinal. A força mecânica imposta à medula no momento da lesão causa imediata interrupção do tecido. A lesão primária raramente transecciona completamente a medula. O tecido adjacente que sobrevive é vulnerável aos danos secundário. As intervenções neuroproteroras tem o objetivo de minimizar e reduzir a perda de tecido neural que são decorrentes dos danos secundários., p.10

Figura 5: Processos fisiopatológicos agudos após a lesão medular. Seguido o trauma inicial uma complexa combinação de processos que incluem isquemia, inflamação, excitotoxicidade e danos oxidativos induzem a uma maior perda de tecido neural ocorrendo assim necrose e morte celular por e necrose na medula espinal. Como estes processos são interrelacionados frequentemente existe um feedback positivo entre eles piorando ainda mais a lesão., p.11

Figura 6: Desenho esquemático dos efeitos benéficos e deletérios da microglia ativa. As setas vermelhas indicam o potencial efeito citotóxico e as setas verdes indicam as vias que promovem neuroproteção., p.16

Figura 7: Modelo de ativação do NF- κ B pela IL-1 β em astrócitos. Esquema da cascata de ativação do NF- κ B pela IL-1 β promovendo a produção de moléculas de adesão e quimiocinas. A interação da IL-1 β com o seu receptor (IL-1R) leva a ativação da I κ B quinase e sua subsequente fosforilação e degradação. Dessa forma, o NF κ B, não ficando mais inibido pela I κ B, é translocado para o núcleo e induz a expressão genes inflamatórios, podendo promover, p.ex, a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, p.20

Figura 8: Desenho esquemático do aumento do sítio da lesão e da formação da cicatriz glial. O aumento da cavitação ocorre em decorrência aos danos secundários, principalmente, devido à resposta inflamatória. Essa intensa resposta inflamatória promove uma cascata de danos secundários, que danificam axônios que foram inicialmente poupados do impacto mecânico, também ocasiona desmielinização dos axônios adjacentes. Ocorre, então, a formação de uma cicatriz glial que esta associada com o aumento de moléculas inibitórias na matrix extracelular, como os proteoglicanos e o aumento do gradiente dessas moléculas inibitórias juntamente com as áreas de inflamação criam um ambiente totalmente não permissivo à regeneração, p.25

Figura 9: Delineamento do Experimento 1. Protocolo de avaliação da capacidade locomotora dos animais submetidos a estimulação por acupuntura manual (diariamente) ou apipuntura (semanalmente) na combinação de pontos E36+VG3 (A), ou na combinação de pontos ID3+B62 (B) ou na combinação de pontos VG3+VG9 (C), p.34

Figura 10: Delineamento do Experimento 2. Para avaliação da severidade do trauma, no 14º dia após avaliação da atividade locomotora, os animais tratados com acupuntura manual (acupuntura ponto ou não ponto) ou apipuntura (apipuntura ponto ou não ponto) foram perfundidos e os tecidos coletados para posterior análise histopatológica, p.35

Figura 11: Delineamento Experimento 3. Avaliação do perfil de Expressão de Citonas pro e antiinflamatória. Uma, 6 ou 24 horas após a lesão medular e o imediato tratamento com apipuntura (apipuntura ponto ou não ponto) foi realizada a coleta de tecido medular para dosagem de citocinas. p.36

Figura 12: Cirurgia de Lesão medular por compressão. Em A, Fotografia do animal sendo submetido à lesão medular por compressão através da inflação do balão de um cateter fogarty tipo 2 de embolectomia. Em B, posição do cateter em relação às vértebras e da compressão na medular. p.37

Figura 13: Estimulação dos pontos de acupuntura. Em A, desenho esquemático demonstrando os pontos usados neste experimento. *Fonte: modificado de Choi et al.,2010.* Em B, fotografia do aparato de imobilização para a realização da acupuntura manual. Animal recebendo tratamento com agulhas de acupuntura nos pontos E36+VG3. p.39

Figura 14: Teste para avaliação da capacidade locomotora. Animal sendo submetido ao teste de avaliação da capacidade locomotoras no 1º dia após a lesão medular. p.40

Figura 15: Esquema do procedimento de dosagem das citocinas segundo o fabricante. Etapas do procedimento de dosagem de citocinas pela técnica de quimiluminescência do MILLIPLEX xMAP® Milipore, USA p.44

Figura 16: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos E36+VG3 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (E36+VG3, n=7), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=7), apipuntura (VB E36+VG3, n=9), apipuntura não-ponto (BV NP, n=7) e o grupo controle (CTL, n=6) que não foi submetido a tratamento. Valores são apresentados como média \pm erro padrão do escore de capacidade locomotora (BBB test). Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. * indica diferença significativa em relação ao CTL e + indica diferença significativa ao controle não-ponto. p.48

Figura 17: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos E36+VG3 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (E36+VG3, n=7), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=7), apipuntura (BV E36+VG3, n=9), apipuntura não-ponto (BV NP, n=7) e o grupo controle (CTL, n=6) que não foi submetido a tratamento. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. Em A (comparação entre E36+VG3, ACUP-NP e

CTL), * indica diferença significativa do E36+VG3 em relação ao CTL e + indica diferença significativa do E36+VG3 em relação ao ACUP-NP. O grupo E36+VG3 obteve uma melhora locomotora significativa tanto em relação ao grupo ACUP-NP como em relação ao grupo CTL tanto na 1^o quanto na 2^o semana. Em B (comparação entre BV E36+VG3, BV NP e CTL) * indica diferença significativa do BV VG3+E36 em relação ao CTL e + em relação ao BV-NP. O grupo BV-E36+VG3 obteve uma melhora locomotora significativa tanto em relação ao grupo BV-NP como em relação ao grupo CTL tanto na 1^o quanto na 2^o semana. p.49

Figura 18: Efeito da acupuntura manual *versus* apipuntura (A) e da acupuntura nos pontos E36+VG3 *versus* em não-pontos (B) na capacidade locomotora de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (E36+VG3, n=7), apipuntura (BV E36+VG3, n=9). Em A, o teste Student-Newman-Keuls, onde $P < 0,05$, não detectou diferença significativa entre os grupos acupuntura manual e apipuntura quando foi considerado somente o efeito do tipo de estímulo, sendo assim a injeção de veneno de abelha não foi diferente da acupuntura manual. Em B, o teste Student-Newman-Keuls não detectou diferença entre os grupos não ponto (Manual e Veneno de abelha) e o grupo controle sem manipulação. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. p.50

Figura 19: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos ID3+B62 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (ID3+B62, n=5), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=5), apipuntura (BV-ID3+B62, n=6), apipuntura não-ponto (BV-NP, n=5), grupo controle sem manipulação (CTL, n=4). Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. + indica diferença significativa do grupo BV-ID3+B62 em relação ao BV-NP. p.52

Figura 20: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos ID3+B62 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (ID3+B62, n=5), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=5), apipuntura (BV ID3+B62, n=6), apipuntura não-ponto (BV-NP, n=5), grupo controle sem manipulação (CTL, n=4). Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. Em A, não houve diferenças significativas na comparação os grupos ID3+B62, ACUP-NP, e CTL. Em B, + indica diferença significativa do grupo BV-ID3+B62 em relação ao grupo BV-NP. O grupo BV-E36+VG3 obteve uma melhora locomotora significativa em relação ao grupo BV-NP tanto na 1^o quanto na 2^o semana. O grupo BV-ID3+B62 não foi diferente do CTL. p.52

Figura 21: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos VG3+VG9 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (VG3+VG9, n=4), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=3), apipuntura (BV-VG3+VG9, n=4), apipuntura não-ponto (BV-NP, n=3) e o grupo controle que não teve tratamento (CTL, n=6). Valores são apresentados como média \pm erro padrão. p.54

Figura 22: Avaliação de diferentes protocolos de estimulação na combinação VG3+VG9 pelo teste BBB após lesão medular de severidade intermediária (15 μ L). Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (VG3+VG9, n=4), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=3), apipuntura (BV-VG3+VG9, n=4), apipuntura não-

ponto (BV-NP, n=3) e o grupo controle (CTL, n=6) que não teve tratamento. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Em A, representação gráfica da avaliação atividade locomotora (teste BBB) do tratamento com acupuntura manual no grupo VG3+VG9, ACUP-NP e o controle sem manipulação. Em B, representação gráfica da avaliação atividade locomotora (teste BBB) do tratamento com apipuntura no grupo BV-VG3+VG9, BV-NP e o controle sem manipulação. p.54

Figura 23: Comparação entre as combinações E36+VG3, ID3+B62 e VG3+VG9 com Acupuntura Manual na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual nas combinações E36+VG3 (n=7), ID3+B62 (n=5) e VG3+VG9 (n=4) e CTL (n=6). Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. * indica diferença significativa do grupo E36+VG3 em relação ao grupo ID3+B62. + indica diferença significativa do E36+VG3 em relação ao grupo VG3+VG9. x indica diferença significativa do ID3+B62 em relação ao VG3+VG9. O Teste Student-Newman-Keuls detectou diferença significativa na melhora da função locomotora da combinação E36+VG3 em relação às demais combinações na 2ª semana. p.55

Figura 24: Comparação entre as combinações BV-E36+VG3, BV-ID3+B62 e BV-VG3+VG9 com Apipuntura após lesão medular de severidade intermediária (15 μ L) pelo teste BBB. Ratos Wistar foram submetidos à apipuntura nas combinações BV-E36+VG3 (n=7), BV-ID3+B62 (n=6) e BV-VG3+VG9 (n=4) e CTL (n=6). Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. * indica diferença significativa do grupo BV-E36+VG3 em relação ao grupo BV-ID3+B62. + indica diferença significativa do BV-E36+VG3 em relação ao grupo BV-VG3+VG9. x indica diferença significativa do BV-ID3+B62 em relação ao BV-VG3+VG9. O Teste Student-Newman-Keuls detectou diferença significativa superior na melhora locomotora da combinação BV-E36+VG3 em relação às demais combinações na 2ª semana. p.56

Figura 25: Severidade do trauma *versus* Atividade Locomotora. Gráfico de regressão linear simples demonstrando que existe uma correlação positiva entre a severidade do trauma e a atividade locomotora ($r^2 = 0,95$; $P = < 0,0001$, admitindo-se um intervalo de confiança de 95%). A reta indica que quanto menor a severidade do trauma maior é o escore BBB, dessa forma, quanto menor o dano ao tecido medular, melhor foi a atividade locomotora do animal. p.58

Figura 26: Cortes histológicos da Medula Espinal. Os cortes foram corados com Eosina-Hematoxilina. Em A, corte representativo do sítio da lesão de um animal do grupo CTL; Em B, corte representativo do sítio da lesão de um animal do grupo Sham; Em C, corte representativo do sítio da lesão de um animal do grupo BV-E36+VG3; Em D, corte representativo do sítio da lesão de um animal do grupo BV-NP. Em A, C e D é possível ver as cavitações pós-lesão. Barra de calibração de 10 μ m. p.59

Figura 27: Concentração de IL-1 β na medula espinal após a SCI. Comparação da expressão de IL-1 β liberada no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão às 1, 6 e 24 horas após o tratamento com apipuntura no ponto (BV-E36+VG3, n=4), apipuntura não ponto (BV-NP, n=4), animais controle sem manipulação (CTL, n=3) e sham. As colunas e as barras verticais representam a média e

o erro padrão. As concentração da citocina são expressas em pg/mL. # indica diferença significativa do grupo CTL em relação aos grupo sham (n=3). p.60

Figura 28: Concentração de IL-6 na medula espinal após a SCI. Comparação da expressão de IL-6 liberada no sitio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão às 1, 6 e 24 horas após o tratamento com apipuntura no ponto (BV-E36+VG3, n= 4), apipuntura não ponto (BV-NP, n=3), animais controle sem manipulação (CTL, n=3) e sham (n=3). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão. As concentração da citocina são expressas em pg/mL. # indica diferença significativa em relação ao grupo sham e ** indica diferença significativa do grupo BV-E36+VG3 em relação ao BV-NP e CTL. p.61

Figura 29: Concentração de IL-4 na medula espinal após a SCI. Comparação da expressão de IL-4 liberada no sitio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão às 1, 6 e 24 horas após o tratamento com apipuntura no ponto (BV-E36+VG3, n=4), apipuntura não ponto (BV-NP, n=4), animais controle sem manipulação (CTL, n=3) e sham (n=3). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão. As concentração da citocina são expressas em pg/mL. p.62

Figura 30: Concentração de IL-10 na medula espinal após a SCI. Comparação da expressão de IL-10 liberada no sitio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão às 1, 6 e 24 horas após o tratamento com apipuntura no ponto (BV-E36+VG3), apipuntura não ponto (BV-NP), animais controle sem manipulação (CTL) e Sham. As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão. As concentração da citocina são expressas em pg/mL. # indica diferença significativa em relação ao grupo sham, * indica diferença significativa do grupo BV-E36+VG3 em relação ao grupo BV-NP e CTL. p.63

Figura 31: Desenho esquemático da hipótese dos possíveis mecanismos da apipuntura na lesão medular. Baseado em estudos prévios, acredita-se que a acupuntura possa ter efeito sobre os danos secundários após a SCI na diminuição dos níveis de glutamato contribuindo para a redução da excitotoxicidade (CHOI *et al.*, 2005), efeito antioxidante (YU *et al* 2010), efeito sobre os níveis plasmáticos de NO, influenciando assim, no quadro isquêmico (HWANG *et al.*, 2011), efeito anti-inflamatório reduzindo atividade microglías e outros mediadores inflamatórios (CHOI *et al.*, 2010). Além de todos esses efeito, nossos resultados indicaram que a apipuntura foi capaz de influenciar no balanço de citocina pró e anti-inflamatória. Acreditamos assim que todos esses fatores juntos possam contribuir positivamente para a redução da apoptose reduzindo assim a perda neurológica. p.75

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

6-OHDA	6 -hidroxi-dopamina
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato
ANOVA	Análise de variância
BBB test	Escala de avaliação locomotora (Basso, Beattie e Bresnahan)
BV	Bee Venom
COX-2	Ciclooxigenase-2
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
NO	Óxido Nítrico
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
JK	Janus Quinase
MAPK	Proteína Cinase Ativadora de Mitógeno
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NF-kB	Fator Nuclear KB
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NT-3	Neurotrofina-3
NMDA	N-metil-D-aspartato
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
RNS	Especies Reativas de Nitrogênio
ROS	Especies reativas de Oxigênio
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
SCI	Lesão da Medula Espinal (traduzido do inglês – <i>Spinal Cord Injury</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS	Supressora da Sinalização de Citocinas
STAT	Proteínas Transdutoras do Sinal e Ativadoras da Transcrição
TGFβ	Fator de Crescimento de Transformação Beta
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - alfa
TLRs	Receptores Toll-like
μL	Microlitro
μM	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1. Medula Espinal.....	3
2.2. Anatomia da medula espinal.....	3
2.3. Lesão Medular.....	5
2.3.1 Bloqueio Vascular.....	8
2.3.2 Radicais Livres.....	8
2.3.3. Peroxidação Lipídica	9
2.3.4. Excitotoxicidade do glutamato	9
2.3.5. Inflamação	9
2.3.6 Citocinas	13
2.3.7 Limitada habilidade de regeneração dos neurônios e elementos inibitórios dentro do Sistema Nervoso Central (SNC)	17
2.4. Tratamento da lesão medular	18
2.5. Acupuntura e lesões medulares	19
2.6. Tipos de estimulação de Acupuntura	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Animais.....	24
4.2. Deliniamento experimentais.....	24
4.3. Procedimento cirurgico para lesão medular	26
4.4. Tratamento com Acupuntura e Apipuntura	27
4.5. A avaliação da capacidade locomotora de ratos pós-lesão medular.....	29
4.6. Perfusão tecidual	30
4.7. Avaliação histopatológica: Análise da severidade do trauma medular.....	30
4.8. Dosagem de Citocinas	31
4.9. Análise Estatística	33
5. RESULTADOS	35
5.1. Experimento 1: Efeito da acupuntura e da apipuntura em diferentes combinações de acupontos na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão.	35
5.2. Experimento 2: Efeito da acupuntura manual ou apipuntura nos acupontos E36+VG3 na severidade do trauma medular resultados preliminares.....	44

5.3. Experimento 3: Efeito da acupuntura dos acupontos E36+VG3 no perfil de expressão de citocinas pro (IL-1β, IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) na medula espinal de ratos submetidos a lesão medular por compressão.	46
6. DISCUSSÃO	50
6.1. Modelo de lesão medular por compressão.....	50
6.2. Especificidade dos acupontos na recuperação locomotora	51
6.3. Tipo de Estimulação dos acupontos.....	53
6.4. Efeito anti-inflamatório da acupuntura	54
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinal (referida pelo termo em inglês – Spinal Cord Injury) é uma síndrome neurológica altamente incapacitante e prolongada que ocasiona um impacto físico, fisiológico e social sobre o indivíduo, a família e a sociedade como um todo. A SCI pode ocorrer por traumas, doenças na coluna vertebral ou na própria medula espinal podendo afetar, em diferentes, graus a capacidade da medula espinal de mandar e receber informações, levando às deficiências sensoriais, motoras (voluntária e involuntária) e autonômicas.

Existe uma estimativa de 2,5 milhões de pessoas vivendo com lesão medular, com uma incidência de 130 mil novos casos por ano no mundo. Segundo dados da Secretaria de Saúde do estado de São Paulo e do DATASUS, em 2004 ocorreram cerca de 8950 novos casos de SCI no Brasil, sendo que já existem 250 mil pacientes com esta síndrome no país.

As principais etiologias das lesões medulares em humanos são traumas decorrentes de acidentes de trânsito, lesões corporais decorrentes da violência, quedas, acidentes pessoais e acidentes durante práticas esportivas. Infelizmente, os fatores que promovem o dano inicial a medula espinal são irreversíveis, não podendo ser controlados ou modificados, apesar da existência de programas de prevenção, não existem evidências reais de que as principais incidências estejam em declínio (Site Rede Sarah, 2010*).

A seqüela fisiopatológica depois do trauma medular agudo é dividida em dois eventos cronológicos distintos: lesão primária e lesão secundária. O dano primário iniciado pela fratura vertebral causa dano local e segmental na medula espinhal. O dano secundário progressivo é produzido por uma série de eventos moleculares e celulares desencadeados pela lesão inicial. Dessa forma, embora os danos iniciais sejam originalmente irreversíveis, a lesão secundária se trata de um processo ativo que promove uma progressiva perda tecidual. Assim, intervenções terapêuticas adequadas que possam ser capazes de reverter ou modifica-las são fundamentais para o sucesso.

Na maioria dos casos a incapacidade é severa e irreversível. Os tratamentos atuais são extremamente limitados e não existe ainda uma terapia que seja realmente eficiente em reverter estas perdas neurológicas. Pacientes com lesão medular necessitam da atenção de uma equipe multiprofissional e multidisciplinar capacitada.

A acupuntura tem sido usada para aliviar disfunções neurológicas em vários tipos de doenças degenerativas. Clinicamente, a acupuntura tem demonstrado resultados relevantes no tratamento de vítimas com lesão medular. Acredita-se que a acupuntura assim como a acupuntura possa ser uma terapia complementar que venha promover neuroproteção e minimizar os déficits gerados pela SCI.

Sendo assim, o presente estudo propõe avaliar a recuperação funcional locomotora e investigar se o efeito da estimulação pela acupuntura interfere no processo inflamatório modulando a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias em ratos submetidos à SCI.

* Fonte: <http://www.sarah.br/>

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Medula Espinal

Segundo Houaiss (2001), medula, etimologicamente, significa miolo e indica tudo o que está dentro. Sendo assim, a medula espinal recebeu essa denominação baseada na origem etimológica por estar dentro do canal espinal ou vertebral.

A Medula Espinal é a parte mais caudal e corresponde apenas 2% de todo o Sistema Nervoso Central. Apesar de apresentar uma organização bem simples, a medula é de fundamental importância, já que conduz informações sensoriais provenientes da periferia (aferência), incluindo, pele, articulações e músculos e contém os neurônios motores responsáveis pelo movimento voluntários e involuntários (reflexo medular) (KANDEL, 2000; AIRES, 2008).

Por muito tempo, a medula foi considerada como simplesmente uma estação intermediária entre o encefálo e a periferia, além de um centro reflexo. Tradicionalmente, ela era vista como um sistema de programação rígida, que responde de forma estereotipada as aferências dos receptores sensoriais na periferia ou aos comandos descendentes do encefálo.

A sua importância fica evidenciada quando ocorre uma lesão. No caso de uma transecção, por exemplo, o ponto de comunicação – no caso a medula – com os centros de integração ficam interrompidos, o que resulta em uma anestesia (perda de sensibilidade) da pele e paralisia em partes do corpo que estão caudais à secção. Neste caso, a paralisia não significa que os músculos não possam funcionar, o que ocorre é que os músculos não podem ser mais controlados pelos centros superiores (KANDEL, 2000; BEAR, 2006).

2.2. Anatomia da medula espinal

Em uma visão macroscópica, a medula espinal está contida dentro do canal vertebral (Figura 1) sendo protegida por este estojo ósseo e pelos envoltórios meníngeos (dura-máter, pia-máter e aracnóide). Entretanto, não ocupa a totalidade do comprimento da coluna vertebral. Ela se estende da base cranial até a primeira vértebra lombar (L1). Os feixes dorsal e ventral dos nervos lombar e sacral percorrem alguma distância antes de deixarem a coluna vertebral. Este grupo de feixes denomina-se cauda equina (MACHADO, 2000).

A medula espinal apresenta uma forma cilíndrica, onde seu calibre não é uniforme ao longo de seu comprimento, sendo assim, ela também varia em tamanho e forma dependendo se os nervos inervam o tronco ou membros (KANDEL, 2000; MACHADO, 2000; DIMITRIJEVIC, 1992).

Em uma visão microscópica, a medula é dividida de substância cinzenta disposta centralmente, onde estão contidos os corpos celulares dos neurônios, circundado pela substância branca composta de feixes de fibras mielinizadas. A substância branca é convencionalmente dividida em funículos dorsal, lateral e ventral e a substância cinzenta é dividida em cornos dorsal e ventral (KANDEL, 2000) (Figura 1).

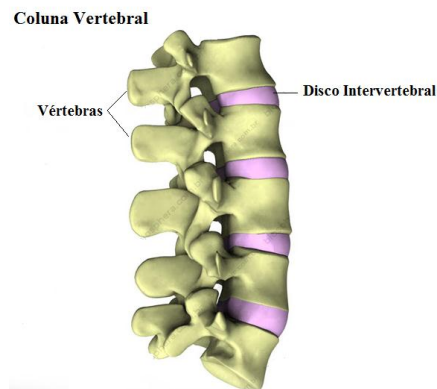
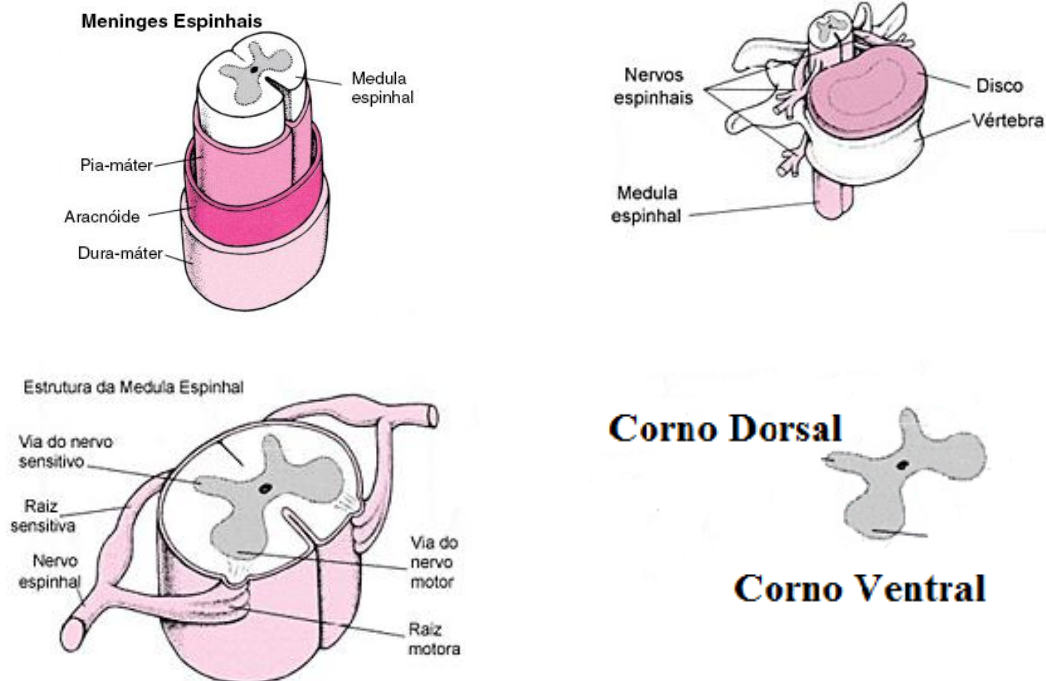
A**B**

Figura 1 - Esquema ilustrando a Coluna vertebral e a medula espinhal humana. Estruturas externas (A) e internas (B). Fonte: Retirado em 23/02/2012, de world wide web: <http://biosphera.com.br> e <http://msdonline.com.br>

Como dito anteriormente, na substância cinzenta estão contidos os corpos celulares com variadas formas e tamanhos. A substância cinzenta apresenta uma organização citoarquitetônica em 10 lâminas, denominadas lâminas de Rexed. Essas lâminas estão dispostas em toda a sua extensão indo do corno dorsal ao corno ventral (Figura 2). O corno dorsal contém um arranjo ordenado de neurônios sensoriais que recebem aferência da periferia e o corno ventral contém os núcleos de neurônios motores que inervam músculos específicos (KANDEL, 2000; BEAR, 2006). Na substancia branca, estão contidos axônios mielinizados que formam as vias ascendentes, longitudinais, através do qual a informação chega até o encéfalo.

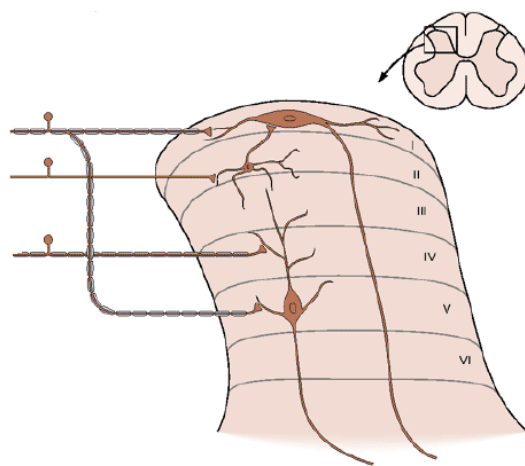


Figura 2- Desenho esquemático da organização citoarquitetônica das lâminas de Rexed no corno dorsal da medula espinal. O esquema demonstra a entrada de diferentes fibras sensoriais, provenientes da periferia, nas lâminas do corno dorsal da medula espinal. *Fonte: modificado de Kandel, 2000.*

2.3. Lesão Medular

Conhecendo a organização da medula espinal, fica claro que lesões que comprometam o delicado tecido neural acabam afetando a condução de informações sensoriais e motoras, por um rompimento total ou parcial dos tratos espinhais ascendentes e descendentes, levando à perda da percepção dos estímulos sensoriais e à imprecisão na organização do comportamento motor (LU *et al.*, 2005).

A lesão da medula espinal é considerada uma síndrome neurológica altamente incapacitante. Uma vez que ocorra lesão medular, o indivíduo terá que conviver com essa síndrome por toda a vida. Sendo assim, inevitavelmente, esta deficiência adquirida vai gerar um impacto físico, fisiológico e social sobre o indivíduo, sobre a sua família e sobre a sociedade como um todo (LIU *et al.*, 2011; OYINBO, 2011; KWON *et al.*, 2004; HAGG & OUDEGA, 2006).

As lesões podem ser definidas como traumáticas e não-traumáticas, herdando sua nomenclatura de acordo com o seu fato gerador. As traumáticas têm sua origem em um trauma, por exemplo, fratura de vértebra. As não-traumáticas têm seu fato gerador em decorrência de uma doença, por exemplo, a poliomielite, meningite, tumor na coluna vertebral, entre outros. Sendo traumáticas ou não, a medula espinal acaba sendo afetada, o que pode interferir em diferentes graus a sua capacidade de mandar e receber informações, levando às deficiências sensoriais, motoras (voluntária e involuntária) e autonômicas (HAGG & OUDEGA 2006; LIANZA *et al.*, 2001).

Após a lesão medular traumática ou não, os indivíduos podem se tornar paraplégicos ou tetraplégicos, completos ou incompletos (SCHWAB, 2002; BAREYRE, 2008).

A paraplegia está relacionada com lesões nas regiões torácica, lombar ou sacral, atingindo os membros inferiores e o tronco, sendo assim, a função dos membros superiores está preservada. A paraplegia acarreta diminuição ou perda da função motora e sensorial que são decorrentes da perda de componentes neurais da medula espinal (ASIA, 2001; MAYNARD *et al.*, 1997). A paraplegia ainda é considerada uma das piores complicações após o procedimento cirúrgico aos quais os pacientes que sofrem o trauma são submetidos (ESPOSITO *et al.*, 2011a)

A tetraplegia está relacionada com lesões na região cervical, a qual afeta os membros inferiores, superiores e o tronco. Devido aos danos, os elementos neurais

dentro do canal medular, os indivíduos tetraplégicos também apresentam diminuição ou perda da função sensorial e motora nos segmentos cervicais da medula espinal. Dessa forma, a tetraplegia acaba resultando em uma diminuição funcional dos membros superiores assim como do tronco, dos órgãos pélvicos e dos membros inferiores (LUNDY-EKMAN, 2004; MAYNARD *et al.*, 1997).

Como citado anteriormente, as lesões podem se completas ou incompletas. Em uma lesão medular incompleta ou parcial, algumas vias ascendentes e descendentes são preservadas. Sendo assim, na lesão medular parcial pode ocorrer ainda função sensorial e/ou motora preservada abaixo do nível de lesão (KANDEL, 2000). Lesados medulares completos apresentam total ausência da função motora e sensitiva abaixo do nível da lesão (KANDEL, 2000).

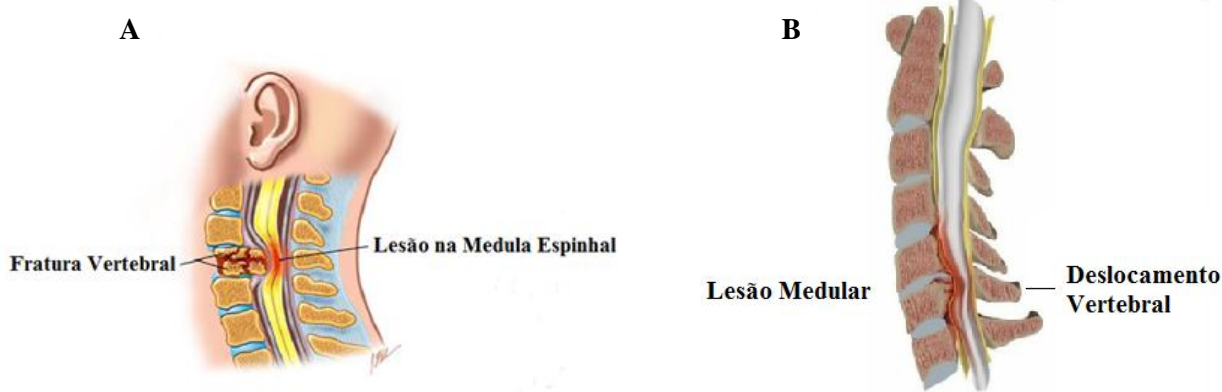


Figura 3 - Esquema ilustrando Lesão Traumática. Em A, o desenho esquemático ilustra uma fratura óssea promovendo uma Lesão na medular. Em B, o desenho esquemático ilustra uma força compressiva também promovendo uma lesão medular. Fonte: Retirado em 23/02/2012, de world wide web: <http://servidoresjt.wordpress.com>

Pesquisas prévias sobre os mecanismos fisiopatológicos da lesão medular (SCI) resultaram em um esquema classificatório de Lesão primária e Lesão secundária (CADOTTE *et al.*, 2010).

A Lesão primária se refere à natureza destrutiva do impacto inicial, a fratura vertebral, e a subsequente ruptura, pela penetração e forças compressivas que danificam o delicado tecido neural promovendo um dano local e segmental na medula espinal (Figura 4). O dano primário consiste principalmente da morte de neurônios, de axônios cortados e oligodendrócitos e esta perda celular, no entanto, não se limita apenas ao mecanismo inicial, sendo exacerbada por eventos secundários (CADOTTE *et al.*, 2010; KWON *et al.*, 2004).

Tabela 1: Resumo dos danos secundários após a SCI

Eventos Vasculares:	Quebra da barreira hemato-espinal Edema Isquemia e Hipoxia Liberação de Substâncias Vasoativas Alteração da Perfusão da Medula Espinal
Eventos Bioquímicos:	Excitotoxicidade Formação de Radicais livres e Óxido Nítrico Liberação de Proteases Dano Mitocondrial
Eventos Celulares:	Ativação de Microglia Residente Invasão de Neutrófilos Invasão de Macrófagos Periféricos Infiltração de Linfócitos Ativação de Astrócitos Apoptose de Oligodendrócitos e Neurônios

Fonte: Traduzido de Hausmann 2003.

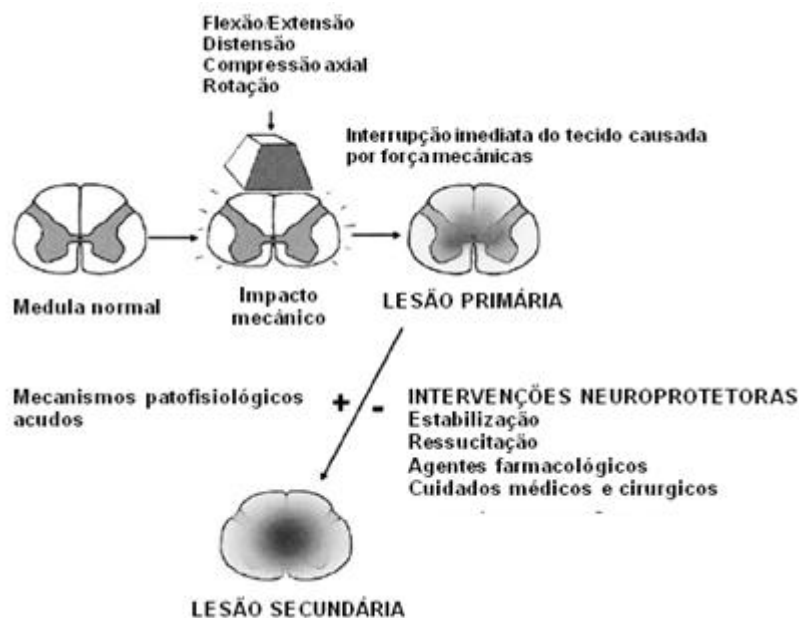


Figura 4: Danos primário e secundário após lesão da medula espinal. A força mecânica imposta à medula no momento da lesão causa imediata interrupção do tecido. A lesão primária raramente transecciona completamente a medula. O tecido adjacente que sobrevive é vulnerável aos danos secundário. As intervenções neuroprotetoras tem o objetivo de minimizar e reduzir a perda de tecido neural que são decorrentes dos danos secundários. Fonte: modificado de kwon et al, 2004.

Neurônios e oligodendrócitos continuam morrendo por horas após a traumática SCI e estas células não podem ser recuperadas nem regeneradas (PROFYRIS *et al.*, 2004).

Os eventos que caracterizam estas fases após a lesão mecânica são denominados de dano secundário, que podem durar por semanas ou meses, podendo progredir tanto rostral como cranialmente ao foco da lesão (KWON *et al.*, 2004). O dano secundário é produzido por uma série de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que são desencadeados pela injúria inicial (KWON *et al.*, 2004; GENOVESE *et al.*, 2008). Todos esses eventos juntos geram uma complexa combinação de processos que incluem isquemia, inflamação, excitotoxicidade e danos oxidativos celulares contribuindo assim para uma maior perda do tecido nervoso que resulta em uma maior disfunção neurológica (Figura 5). Como demonstrado na figura 5, estes processos estão interrelacionados, de forma que um processo pode intensificar o outro.

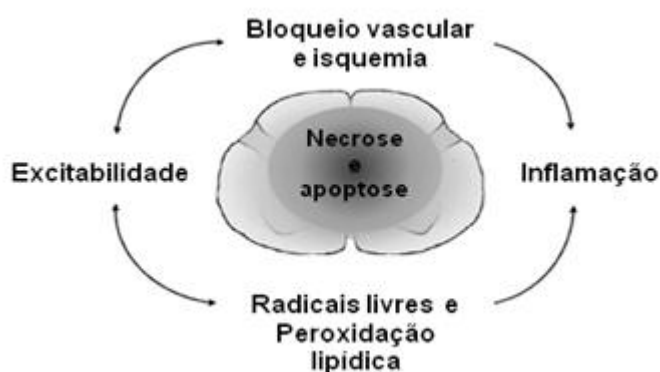


Figura 5: Processos fisiopatológicos agudos após a lesão medular. Seguido o trauma inicial uma complexa combinação de processos que incluem isquemia, inflamação, excitotoxicidade e danos oxidativos induzem uma maior perda de tecido neural ocorrendo assim necrose e morte celular por necrose na medula espinhal. Como estes processos são interrelacionados frequentemente existe um feedback positivo entre eles piorando ainda mais a lesão. *Fonte: modificado de Kwon et al., 2004.*

2.3.1 Bloqueio Vascular

As alterações vasculares locais e a isquemia da medula espinhal são consideradas os aspectos mais importantes dentre os danos secundários. Imediatamente após a SCI, uma grande redução no fluxo sanguíneo na região da lesão ocorre e a isquemia começa a se tornar progressivamente pior ao longo das primeiras horas (TATOR & FEHLINGS, 1991). O preciso mecanismo a cerca da isquemia ainda não está claro, acredita-se que o vasoespasmos em decorrência do dano mecânico e/ou aminas vasoativas possam contribuir (TATOR & FEHLINGS, 1991).

Um mecanismo alternativo observada na isquemia esta associado com a falta de suprimentos de glicose e oxigênio. Neurônios e oligodendrócitos são criticamente dependentes de um contínuo suprimento de oxigênio e glicose, dessa forma, Tanaka e colaboradores (2005) demonstram que a privação de oxigênio e glicose seguida pela reoxigenação induziu a apoptose em neurônios corticais (TANAKA *et al.*, 2005).

2.3.2 Radicais Livres

Durante o período de isquemia, espécies reativas de oxigênio são produzidas, contribuindo assim para a citotoxicidade (LEWEN *et al.*, 2000). A geração de radicais livres causa uma progressiva oxidação de ácidos graxos nas membranas celulares (peroxidação lipídica) e o processo de oxidação forma geometricamente mais radicais que podem propagar a reação por toda a superfície celular. O envolvimento de radicais livres na lesão medular é particularmente importante, uma vez que o efeito da inibição da peroxidação lipídica por antioxidantes tem revelado resultados positivos no tratamento da lesão medular. Liu e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento com resveratrol, significativamente promoveu uma recuperação funcional após a lesão medular por redução da apoptose celular, sendo que esta melhora parece estar relacionada principalmente à sua propriedade anti-oxidante (LIU *et al.*, 2011).

2.3.3. Peroxidação Lipídica

Na lesão medular aguda ocorre a formação de espécies reativas oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (XIONG *et al.*, 2007). Este aumento ocorre em decorrência do aumento dos níveis intracelulares de cálcio, disfunção mitocondrial e da ativação do óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (MCTIGUE, 2008). ROS e RNS causam peroxidação lipídica, assim como ocasionam danos a proteínas e ácidos nucleicos contribuindo para a morte de neurônios motores e uma maior disfunção neurológica (XU *et al.*, 2005). Na peroxidação lipídica, os radicais livres absorvem um elétron a partir da molécula lipídica, que se torna menos estável, assim desencadeando uma reação em cadeia que promove a lise da membrana e a morte por necrose. Esse dano coletivo promovido pelas ROS e RNS com certeza contribuem de forma significativa para a perda funcional após a SCI.

2.3.4. Excitotoxicidade do glutamato

O glutamato é o mais abundante neurotransmissor excitatório do SNC e tem seus níveis aumentados após a SCI. O glutamato pode ser tóxico para neurônios, fenômeno denominado de excitotoxicidade. Geralmente após o trauma na medula espinal, os níveis de glutamato aumentam muito ao redor do sítio da lesão, ocasionando um dano direto à medula e indireto estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (DUMONT *et al.*, 2001).

O excesso de glutamato ativa receptores NMDA, AMPA e os metabotrópicos. A ativação de receptores AMPA desbloqueia o canal NMDA permitindo a entrada de Ca^{+2} na célula. Além disso, também abre os canais de cálcio ativados por voltagem, liberando ainda mais glutamato. Todos os tipos de células neurais são suscetíveis a excitotoxicidade promovida pelo glutamato. Neurônios morrem após a ativação dos receptores AMPA que resulta em influxo de água e lise através da excessiva despolarização e aumento do sódio intracelular (MATYJA *et al.*, 2005).

Esposito e colaboradores (2011) observaram uma significativa melhora da recuperação da função locomotora através da administração de um antagonista de receptor NMDA (MK801) após a lesão medular.

2.3.5. Inflamação

A neuroinflamação é um dos componentes secundários que tem se tornado o principal foco das pesquisas terapêuticas para lesão medular nos últimos anos (DONNELLY & POPOVICH, 2007). A neuroinflamação é considerada como uma rede equilibrada de processos pelos quais mudanças sutis podem determinar uma maior ou menor perda neurológica, tendo como grande problema determinar quando as intervenções terapêuticas devem interferir no processo. Sendo assim, o entendimento

dos complexos mecanismos que regem a resposta inflamatória na SCI é essencial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

Apesar da inflamação ser considerada uma “vilã” na fase aguda do trauma, uma vez que contribui para o aumento do sítio da lesão, ela é um sistema de defesa normal do organismo e que nos protege contra agentes invasores e promove o reparo dos danos teciduais. Contudo, é fundamental que este processo seja rigidamente controlado. Uma inapropriada resposta ou o desenvolvimento de uma inflamação crônica pode promover a perda da função protetora e reparativa e incia-se uma “força destrutiva”. Dessa forma, a inflamação se torna literalmente a “grande vilã” e, como consequência, pode ocorrer o desenvolvimento de doenças como a doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson.

Apesar da resposta neuroinflamatória se apresentar muito complexa e por isso pouco compreendida, muitas definições sobre o mecanismo da inflamação tem sido estabelecidos, incluindo a invasão de células imunes da circulação (neutrófilos e macrófagos), indução e/ou ativação de mediadores inflamatórios como as citocinas (DONNELLY & POPOVICH, 2007; LUCAS *et al.*, 2006).

O trauma medular agudo induz uma rápida resposta inflamatória o que resulta em uma maior perda de tecido neural na fase aguda (FLEMING *et al.*, 2006). Contudo, os autores têm sido unânimes em defender a questão de que o bloqueio total da resposta inflamatória pode ser ainda mais prejudicial. Ibarra e colaboradores (2004) demonstraram que a inibição sistêmica da resposta imune com a ciclosporina foi menos efetiva na recuperação funcional do que o controle-veículo. Saganová e colaboradores (2008) também demonstraram que o bloqueio da resposta inflamatória com a minociclina, um antibiótico que apresenta ação anti-inflamatória, promoveu uma limitada melhora funcional após a lesão medular por compressão. Sendo assim, o papel da neuroinflamação é controverso.

Efeitos tanto benéficos quanto deletérios têm sido atribuídos à ação das microglias, macrófagos, neutrófilos, e citocinas (DONNELLY & POPOVICH, 2007; PROFYRIS *et al.*, 2004; HAUSMANN, 2003) dependendo do estágio de ativação dessas células de defesa (SCHWARTZ & YOLEN, 2006).

Sabe-se que após o insulto no SNC, específicos fatores são liberados por neurônios quando estes são danificados ou estressados com o potencial de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas microglias (KRAFT & HARRY, 2011), mas o exato mecanismo da indução da resposta inflamatória que desencadeia ativação de microglias residentes e recrutamento de células da circulação sistêmica ainda não esta totalmente esclarecida (HAUSMANN, 2003; DONNELLY & POPOVICH 2007).

As microglias se tornam ativas dentro de minutos a horas após a lesão medular promovendo o aumento de citocinas que estimulam a infiltração de outras células inflamatórias no sítio da lesão, e uma sinalização de citocinas secundárias, a partir daí, é iniciada (LUCAS *et al.*, 2006; FLEMING *et al.*, 2006). Embora as microglias produzam o aumento inicial, o estímulo persistente para produção de citocinas é desconhecido (POPOVICH *et al.*, 1999; LUCAS *et al.*, 2006). Têm sido demonstrado tanto em estudos *in vitro* quanto em *in vivo* que a microglia ativa é capaz de produzir numerosos mediadores inflamatórios, que são tipicamente categorizados como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) (LOANE & BYRNES, 2010).

Dependendo do tipo de estímulo, a resposta inflamatória pode ser iniciada pela microglia através dos seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que incluem os receptores Toll-like (TLRs). Estes receptores iniciam o processo de sinalização ligando-se a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Por fim, a ligação ao PAMPs leva a ativação de vias de transdução de sinais e a regulação de diversas

moléculas transcricional e pós-transcricional (AKIRA *et al.*, 2006). Estas moléculas incluem, por exemplo, membros da família Fator Nuclear KB (NF- κ B) que modula genes alvos que codificam citocinas pro-inflamatórias (AKIRA *et al.*, 2006).

Neurônios necróticos são capazes de ativar microglia de maneira dependente e a subsequente resposta que é a produção de citocinas pro-inflamatórias leva a um aumento da neurotoxicidade através da indução da glutaminase, uma enzima que produz glutamato. Esta via endógena parece ser um via comum a varias formas de lesão neuronal e promove uma ligação entre a inflamação no SNC e a neurodegeneração (PAIS *et al.*, 2008).

Em resumo, a microglia por ser a fonte primária de citocinas pro-inflamatórias em resposta a lesão no SNC, apresenta um papel primordial como mediadores da neuroinflamação e assim podem induzir ou modular um amplo espectro da resposta celular (KRAFT & HARRY, 2011). Tanto efeitos deletérios quanto efeitos benéficos estão atribuídos a prolongada presença microglial no SNC (SCHWAB & BARTHOLDI, 1996; SCHWARTZ, 2000) (Figura 6). Por exemplo, a prolongada liberação de citocinas pro-inflamatórias pode contribuir para uma maior destruição do tecido neural na fase aguda. Por outro, a ativação de microglias também pode levar a produção de citocinas pró-inflamatórias, assim como de fatores de crescimento que são essenciais à sobrevivência de neurônios e ao reparo tecidual (LOANE & BYRNES, 2010) (Figura 6).

Vale ressaltar que tanto neurônios quanto células gliais sintetizam citocinas pro-inflamatórias, (tais como o TNF α e IL-1 β) como parte normal da comunicação intracelular (HOPKINS & ROTHWELL, 1995). Contudo, a sustentada elevação dessas citocinas pro-inflamatórias, como no caso de doenças degenerativas e lesões medulares que se torna o problema, uma vez que, a sustentada elevação dessas citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) evoca uma exarcebção da resposta inflamatória e a desregulação na liberação de citocinas o que causa a morte de muitos neurônios e oligodendrócitos (LOANE & BYRNES, 2010; LEE *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2005).

Dessa forma, o que deve ficar claro é que a microglia tem um papel duplo, em que parece que o seu principal papel no centro da lesão é provavelmente a rápida fagocitose de detritos, ao invés, da indução da apoptose de tipos celulares (SHUMAN *et al.* 1997), ou seja, o reparo. Contudo, sua ativação também acarreta um aumento do sitio da lesão promovendo uma maior perda neurológica.

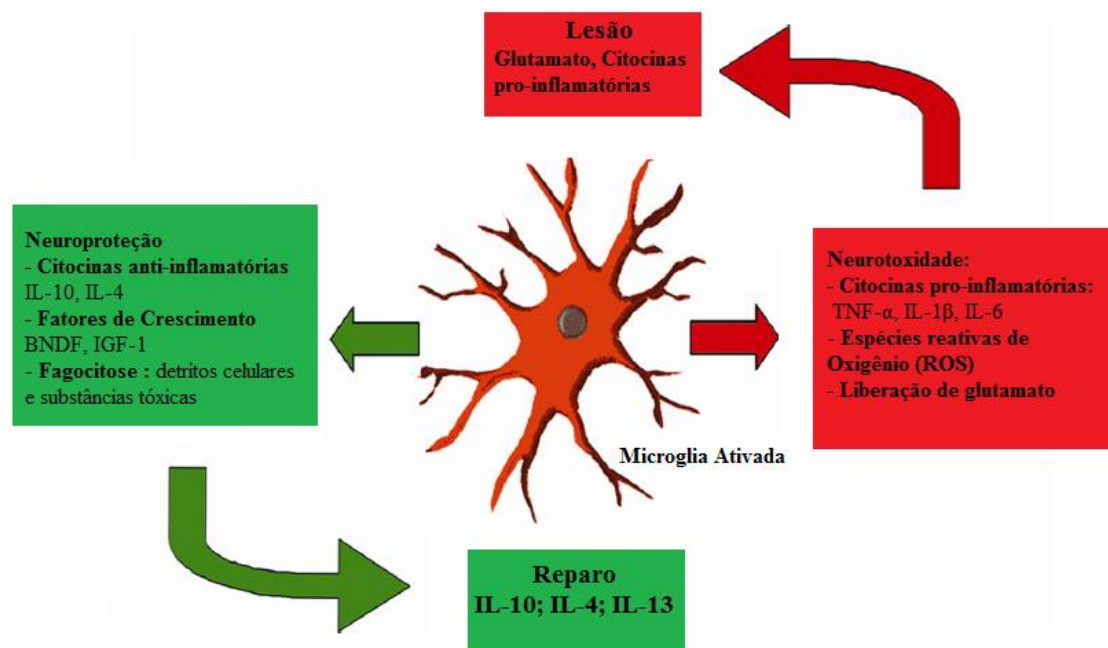


Figura 6: Desenho esquemático dos efeitos benéficos e deletérios da microglia ativa. As setas vermelhas indicam o potencial efeito citotóxico e as setas verdes indicam as vias que promovem neuroproteção. *Fonte: modificado de Loane & Byrnes, 2010.*

Estudos em humanos e em roedores têm demonstrado que as microglias e os neutrófilos são as primeiras células a participarem da resposta inflamatória na lesão medular. Estas células podem gerar uma variedade de enzimas oxidativas e proteolíticas que potencialmente pioram a disfunção neurológica (FLEMING *et al.*, 2006, DONNELLY & POPOVICH 2007).

Após a SCI, a primeira célula inflamatória proveniente da circulação a chegar ao sítio da lesão é o neutrófilos, através da barreira hemato-encefálica que se encontra interrompida (HABGOOD *et al.*, 2007). Além de atravessar a barreira hemato-encefálica, os neutrófilos também são atraídos para o sítio da lesão em respostas as quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias que foram previamente secretadas. Os neutrófilos aparecem no sítio da lesão por volta de 4-6 h, sendo o seu pico de concentração nas primeiras 12-24 horas e desaparecem por volta de aproximadamente 5 dias (TAOKA *et al.*, 1997, DONNELLY & POPOVICH 2007). Como dito anteriormente, os neutrófilos produzem enzimas proteolíticas e oxidativas que agem esterilizando o sítio da lesão e preparando-o para o subsequente “reparo” (TAOKA *et al.*, 1997). O problema é que isso aumenta ainda mais os danos secundários.

Estudos experimentais com roedores têm demonstrado que os neutrófilos, provavelmente, também contribuem para o dano tecidual por liberarem uma grande diversidade de mediadores pró-inflamatório (TAOKA *et al.*, 1997). Sendo assim, como esperado, estudos demonstram que o bloqueio do influxo de neutrófilos limita o dano secundário após a lesão e é neuroprotetor (GRIS *et al.*, 2004; TAOKA *et al.* 1998).

Os monócitos/macrófagos são as células que chegam mais tardiamente ao sítio da lesão. Os macrófagos infiltram o sítio da lesão, aproximadamente, no 2º dia após a lesão em ratos, e o seu pico de infiltração ocorre por volta 5-7 dias, e pode persistir por semanas a meses após a lesão (DONNELLY & POPOVICH 2007, POPOVICH *et al.*, 1999).

Os macrófagos, assim como as microglias, apresentam um papel duplo no processo inflamatório promovendo tanto efeitos benéficos como efeitos deletérios ao tecido neural. Em roedores, os macrófagos aumentam os danos secundários por

secretarem citocinas pró-inflamatórias, ROS, óxido nítrico e proteases (DONNELLY & POPOVICH 2007, POPOVICH *et al.*, 1999).

Em contraste aos efeitos destrutivos, alguns trabalhos na literatura também tem demonstrado a habilidade dos macrófagos no processo regenerativo por participam da remoção de restos de mielina (que contém fatores inibitórios ao crescimento de neurônios remanescentes), liberarem citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento como fator de crescimento do nervo (NGF) e neurotrofina-3 (NT-3) que induzem reparo tecidual no sítio da lesão. (HASHIMOTO *et al.*, 2005; DOUGHERTY *et al.*, 2000; SCHWARTZ, 2003, GUERRERO *et al.*, 2012). Shechter e colaboradores (2009) demonstram que a infiltração de macrófagos, através da barreira hematoencefálica, teve um papel crucial na recuperação após a lesão medular através da expressão de IL-10 e ação deste como agente anti-inflamatório local.

Essa diversidade na resposta dos macrófagos pode ser o resultado da presença de diferentes vias de ativações o que possibilita a geração de subpopulações celulares com habilidades divergentes (MOSSER & EDWARDS, 2008).

Recentes estudos têm indicado que estas diferentes subpopulações de macrófagos são baseadas em seus fenótipos e podem surgir em resposta a processos inflamatórios de várias condições (MOSSER & EDWARDS, 2008). Experimentos *in vivo* têm demonstrado esta divergência das subpopulações de macrófagos no tecido neural em lesões medulares (KIGERL *et al.*, 2009). Dois subtipos de macrófagos têm atraído grande interesse na área de regeneração do SNC que são os denominados estado de ativação clássico (fenótipo M1) e estado de ativação alternativo (fenótipo M2) (KIGERL *et al.*, 2009; GORDON, 2003). O estado alternativo dos macrófagos é ativado via citocinas como IL-4 e IL-10 que levam a expressão do fenótipo M2 pelos macrófagos que apresentam papéis fagocítico e a anti-inflamatórios, ou seja, estão envolvidos com a regeneração como no remodelamento de matrix (GORDON, 2003).

Recentemente, também foi demonstrado que esse estado alternativo dos macrófagos está envolvido na recuperação após a SCI (KIGERL *et al.*, 2009).

2.3.6 Citocinas

São polipeptídeos que apresentam um baixo peso molecular. As citocinas tem ação e podem ser sintetizadas por vários tipos celulares, inclusive por células do sistema nervoso. Quando secretadas podem atuar na resposta inflamatória como mediadores da inflamação, no crescimento e diferenciação celular (ROTHWELL & STRIJOS, 1995).

As citocinas são pleiotrópicas, podendo exercer múltiplas funções. Uma citocina pode exercer a mesma função que outra citocina em determinadas situações, por isso é tão difícil o bloqueio e o desenvolvimento de terapias baseadas no bloqueio de uma única citocina (TURRIN & PLATA-SALAMÁN, 2000). Entre as citocinas também pode ocorrer interação sinérgica promovendo assim um maior efeito quando atuam em conjunto ou uma citocina pode anular o efeito da outra citocina, demarcando assim um importante balanço entre elas (TURRIN & PLATA-SALAMÁN, 2000; RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012).

Além da bem estabelecida participação da citocinas na resposta imune, tem sido atribuída a elas um papel importante no desenvolvimento e na resposta a lesões dentro do sistema nervoso (BOULANGER, 2009, DEVERMAN E PATTERSON, 2009), inclusive em resposta a lesões medulares (ESPOSITO & CUZZOCREA, 2011).

Como citado anteriormente, as citocinas são produzidas e secretadas por inúmeros tipos celulares, inclusive células do SNC como neurônios, microglias e astrócitos. Elas não são previamente estocadas em vesículas como os neurotransmissores, sendo assim, são sintetizadas e imediatamente secretadas onde

atuam em receptores de membrana induzindo uma resposta (ROTHWELL & STRIJBOS, 1995). Geralmente, agem localmente onde são produzidas, dessa forma, podem ter ação autócrina, ou seja, agir na mesma célula que a produziu. Podem agir também em uma célula próxima, ação parácrina. Quando produzidas e secretadas em grandes quantidades podem entrar na circulação e ter uma ação endócrina (GIBSON *et al.*, 2004).

As citocinas podem ser classificadas de varias formas, sendo muito utilizada a classificação baseada em seu efeito final como citocina pró-inflamatória, ou seja, que estimula a inflamação e citocina anti-inflamatória, ou seja, que inibe a resposta inflamatória (RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012). Como citocinas pró-inflamatórias, nós temos a IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- α , já no grupo de citocinas anti-inflamatórias, temos a IL-10 e IL-4 (VITKOVIC *et al.*, 2001; RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012).

A maioria das respostas das citocinas é regulada por meio de transcrição gênica através da via JAK-STAT. Quando a citocina se liga ao seu receptor, ativa uma cascata de sinalização intracelular através da Janus Quinase (JAK). A especificidade de sinalização em resposta as citocinas é conseguida por meio de varias combinações de STATs e JAKs. A modulação da resposta é obtida pelas SOCS (proteínas supressoras da sinalização de citocinas). A SOCS atuam se ligando ao receptor, podem se ligar as JAKs ou inibirem as STAT (SHUAI & LIU, 2003).

O fator de transcrição NF- κ B (Fator Nuclear Kappa B) estimula a transcrição de mais de 150 genes diferentes, incluindo aquele que codificam citocinas e quimiocinas (DELEO *et al.*, 2007). A ativação da via do NF- κ B em astrócitos e especialmente em microglias leva a ativação de uma variedade de genes inflamatórios como TNF α , IL-1 β , além de quimiocinas como CCL2 (Figura 7) (DELEO *et al.*, 2007).

Em células quiescentes o NF- κ B esta sequestrado no citosol em um estado inativo pela ligação direta a um inibidor denominado I κ B (inibidor Kappa B). Uma única molécula de I κ B se liga a duas subunidades do NF- κ B p65 e p50 ocultando os sinais de localização nuclear. A degradação do I κ B por um complexo proteíno-quinase denominado I κ B quinase expõe os sinais de localização nuclear do NF- κ B que sofre translocação para o núcleo e ativa a transcrição de vários genes alvos (MOYNAGH, 2005).

Parece que o NF- κ B controla a expressão de citocinas IL-1 β e TNF- α que são mediadores essenciais da resposta inflamatória estando implicados na leucocitose, no dano tecidual, entre outros. IL-1 β e TNF- α são potentes indutores da ativação do NF- κ B, dessa forma, uma interdependência da persistente ativação do NF- κ B e sustentado níveis de IL- β e TNF- α é indicado (MAKAROV, 2000).

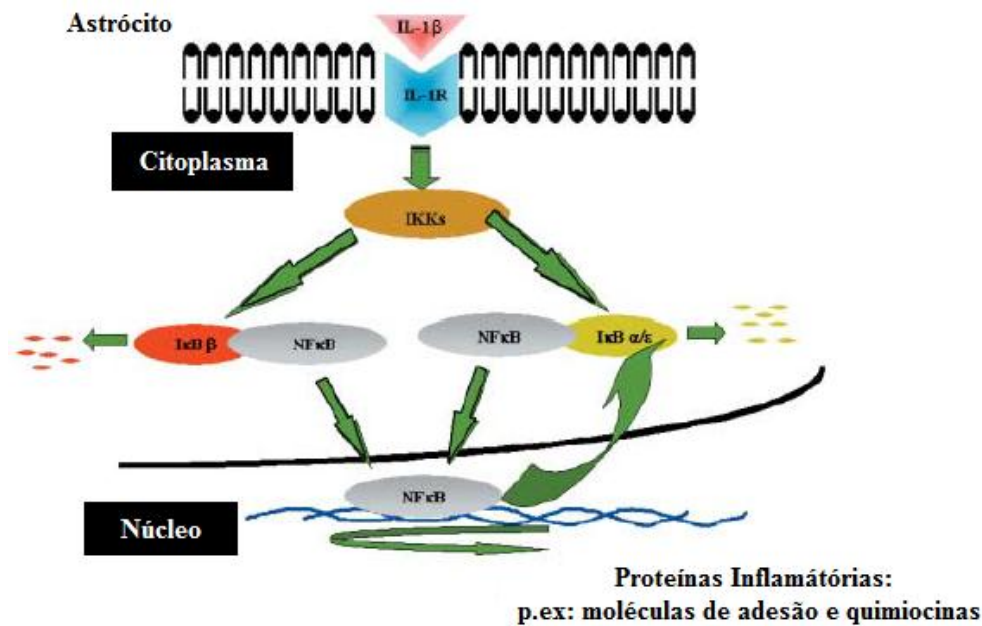


Figura 7: Modelo de ativação do NF- κ B pela IL-1 β em astrócitos. Esquema da cascata de ativação do NF- κ B pela IL-1 β promovendo a produção de moléculas de adesão e quimiocinas. A interação da IL-1 β com o seu receptor (IL-1R) leva a ativação da I κ B quinase e sua subsequente fosforilação e degradação. Dessa forma, o NF κ B, não ficando mais inibido pela I κ B, é translocado para o núcleo e induz a expressão genes inflamatórios, podendo promover, p.ex, a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas. *Fonte: modificado de Moynagh, 2005.*

Atualmente existem mais de 200 citocinas distintas identificadas. Neste trabalho, daremos enfoque nas citocina pro-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e nas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10.

Interleucina-1

A IL-1 consiste de três subtipos que são a IL-1 α , IL-1 β e a IL-1ra (ROTHWELL & STRIJBOS, 1995). A IL-1 α é expressa continuamente e a IL-1 β é induzida em resposta a lesão. Pertencente também a família da IL-1, um terceiro membro, a IL-1ra atua de forma antagonista, sendo altamente seletiva e competitiva pela ligação do receptor IL-1RI, bloqueando, dessa forma, toda a ação da IL-1 β (GREENFEDER *et al.*, 1995). A interleucina-1 β (IL-1 β) é uma citocina pro-inflamatória produzida por macrófagos, monócitos e células gliais (ROTHWELL & LUHESHI, 2000), a IL-1 β medeia seus efeitos pelo receptor de membrana através do complexo IL-1 tipo I e tipo II (IL-1RI)/IL-1RAcP, o qual deflagra vias de transdução de sinais que ativam fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (GREENFEDER *et al.*, 1995; ROTHWELL & STRIJBOS, 1995).

A citocina pro-inflamatória IL-1 β é aumentada imediatamente após a lesão medular (SCHNELL *et al.*, 1999) e é de crucial importância na mediação da infiltração de leucócitos no tecido lesionado, pois pode aumentar a permeabilidade vascular (SCHNELL *et al.*, 1999), além disso podem induzir a produção de moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1). (MOYNAGH, 2005).

Streit e colaboradores (1998) constataram o aumento das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e da IL-6 imediatamente após a injúria medular por contusão, mas observou um pico de persistência dos níveis de IL-1 β em relação a outras

citocinas e associaram o aumento do danos secundários. O bloqueio da IL-1 β confere neuroproteção em modelos de SCI, traumatismo crânio-encefálico e acidente vascular cerebral (GENOVESE *et al.*, 2006; SANDERSON *et al.*, 1999).

Interleucina-6

A IL-6 é uma citocina produzida por diversos tipos celulares como linfócitos, monócitos, inclusive por células gliais (O'REILLY *et al.* 2012, MUANGCHAN & POPE, 2012, LOANE & BYRNES, 2010)

Murphy e colaboradores (2000) demonstraram, *in vitro*, que baixas concentrações exógenas de IL-6 foram capazes de manter a sobrevivência de neurônios sensoriais que normalmente morrem, no período de 24 horas, sem o suporte neurotrófico (MURPHY *et al.*, 2000). Em altas concentrações, estas moléculas podem ativar fatores de transcrição como fator nuclear-kB e, assim, mediar a morte celular (LI *et al.*, 2001).

A IL-6 é rapidamente aumentada após a lesão medular, onde desempenha um papel crítico como citocina pro-inflamatória, podendo induzir a expressão de outras citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , que regulam a entrada de neutrófilos no sítio da lesão medular. (NAKAMURA *et al.*, 2003; HURST, *et al.* 2001).

Guerrero e colaboradores (2012) observaram que o bloqueio temporal da sinalização de IL-6 após SCI anulou a atividade inflamatória que inicialmente é prejudicial e associado a este bloqueio inicial ocorreu uma recuperação funcional através da formação macrófagos M2 (GUERRERO *et al.*, 2012).

Interleucina-4

A IL-4 é um membro protótipo da família de citocinas anti-inflamatórias (LEE *et al.*, 2010). Produzida por células Th2, macrófagos ou da linhagem de basófilos (RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012). Atualmente, muito pouco se conhece sobre o papel das citocinas anti-inflamatórias na lesão espinal traumática.

Lee e colaboradores (2010) observaram que injeções com anticorpo anti-IL-4 no local da lesão não interferiu na produção de outras citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, mas resultou em um aumento da marcação de macrófagos ativos (ED1-positivo) ao longo da extensão do sítio da lesão no 7º dias pós-lesão. Além disso, também foi observado um aumento da extensão das cavitações no final de quatro semanas após a lesão. Sendo assim, os autores sugerem que a IL-4 possa regular a extensão da ativação aguda de macrófagos e limitar a consequente formação da cavidade secundária depois da SCI (LEE *et al.*, 2010).

Interleucina-10

A Interleucina-10 (IL-10) é uma das principais citocinas anti-inflamatórias, produzidas por macrófagos, microglias e astrócitos (LOANE & BYRNES, 2010; WERRY *et al.*, 2012; VITKOVIC *et al.*, 2001). A IL-10 medeia seus efeitos, sobre a maioria das populações de células gliais no SNC, através da interação com os seus receptores de superfície (IL-10Rs), e limitam a inflamação por reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α (VITKOVIC *et al.*, 2001).

Estudos experimentais tem demonstrado que a IL-10 tem um efeito benéfico tanto após o trauma crânio-encefálico como após a lesão medular (KNOBLACH & FADEN, 1998; BREWER *et al.*, 1999). A administração sistêmica de IL-10 resultou em uma significativa redução do dano neuronal promovido pelo QUIS na SCI (injeção intra-espinal de Ácido Quisquálico) (BREWER *et al.*, 1999). A administração intravenosa de IL-10 após o trauma crânio-encefálico experimental melhorou a recuperação neurológica e significativamente reduziu a expressão de TNF- α e IL-1

(KNOBLACH & FADEN, 1998). Este efeito neuroprotetor parece estar associado à supressão da ativação microglial, no qual o tratamento com IL-10 tem demonstrado diminuir a produção de citocina pró-inflamatória (VITKOVIC *et al.*, 2001).

2.3.7 Limitada habilidade de regeneração dos neurônios e elementos inibitórios dentro do Sistema Nervoso Central (SNC)

A limitada regeneração de neurônios maduros no SNC é por um lado explicada pelo ambiente inibitório do SNC e por outro lado pela reduzida capacidade intrínseca dos neurônios do SNC em montar ou manter alguns programas de expressão gênica necessárias para a regeneração pós-lesão. A resposta regenerativa envolve a expressão de um vasto espectro de proteínas, incluindo fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto, do cone de crescimento e moléculas de adesão celular (FERNANDES & TETZLAFF, 2000). A identificação e a manipulação clínica da expressão destes genes podem representar uma estratégia para a regeneração neuronal. A expressão de alguns elementos como a GAP-43, o AMPc e fatores neurotróficos tem sido relacionados ao crescimento axonal. O AMPc, por exemplo, está envolvido tanto em alterações no corpo celular como no desenvolvimento do cone de crescimento (para revisão ver KWON *et al.*, 2002; AFSHARI *et al.*, 2009). Lembrando que só o crescimento não é considerado regeneração, para isso tem que se ter a garantia que a célula após o crescimento foi capaz de voltar a desempenhar a sua função no tecido.

O termo “cicatriz glial” se refere a uma reação complexa representada pela ativação de principalmente astrócitos, micróglia, invasão de macrófagos, fibroblastos e um crescimento de células meningeais (Figura 8).

A cicatriz glial (que é o resultado final de toda ativação da gliose reativa e da resposta inflamatória) e a mielina do SNC são consideradas os bloqueadores primários da regeneração no SNC após a lesão medular (AFSHARI *et al.*, 2009).

Os oligodendrócitos e a sua mielina são os principais inibidores do crescimento axonal no SNC. Três elementos inibitórios têm sido atribuídos à mielina, como a proteína Nogo-A, glicoproteína associada à mielina (MAG) e glicoproteína da mielina do oligodendrócito (OMgp). Estudos recentes mostram quais vias intracelulares estes elementos utilizam para promover inibição da regeneração (para revisão ver KWON *et al.*, 2002).

Estratégias terapêuticas visando à regeneração, que foram montadas baseado na neutralização destas proteínas, foram capazes de promover o crescimento de neuritos, mas não o suficiente para o restabelecimento total, por exemplo, anticorpos Anti-Nogo A demonstraram promover o crescimento de axônios cortico-espinais em saguis (FOUAD *et al.*, 2004) e macacos (FREUND *et al.*, 2006) a pós a lesão medular.

O astrócito é o principal constituinte da cicatriz glial. Eles expressam elementos que são inibitórios ao crescimento axonal, dentre eles, o principal componente inibitório da cicatriz glial é o proteoglicanos. Existem 4 classes principais de proteoglicanos que são expressos pelos astrócitos: proteoglicano sulfato de condroitina, proteoglicano sulfato de heparan, proteoglicano sulfato de keratan e proteoglicano sulfato de dermatan. Dentro da cicatriz glial, o proteoglicano sulfato de condroitina é o mais abundante (JOHNSON-GREEN *et al.*, 1991). Estudos tem demonstrado que astrócitos previamente ativos aumentam a expressão de proteoglicanos, principalmente o proteoglicano sulfato de condroitina que contribui para inibição do crescimento axonal (DOU *et al.*, 1994; MCKEON *et al.*, 1995). Dessa forma, além das substâncias inibitórias secretadas pelos astrócitos, a reação astrocitária parece ter importante função na inibição regeneração de nervos, uma vez que, a cicatriz também pode atuar como uma barreira física ao crescimento de axônios (Figura 8).

Agora fica claro perceber que durante a lesão traumática, quando axônios no SNC são lesados, eles apresentam uma pobre resposta de regeneração e essa pobre resposta se dá devido à combinação da forte resposta inflamatória que como foi vista irá resultar em extensa morte celular neuronal e glial. Além disso, ocorre uma intensa ativação glial e de hipertrofia que contribuem para a formação da cicatriz glial, principalmente de astrócitos. Essas respostas intrínsecas ao tecido lesado contribuem para um ambiente que é totalmente inibitório para o brotamento axonal (RAMER *et al.*, 2000) (Figura 8).

Levando em consideração todas as dificuldades apresentadas aqui, em relação à regeneração, estão evidentes que as melhores estratégias terapêuticas parecem ser aquelas voltadas ao controle dos danos secundários que são os responsáveis por um maior aumento da perda de tecido neural circunjacente ao sítio da lesão, uma vez que, ocorra uma perda muito grande, vários elementos inibitórios dentro do próprio SNC irão impedir o brotamento e a regeneração dos tipos celulares que foram perdidos. Portanto, a redução dos danos secundários ao tecido é o maior objetivo em casos de lesão medular (DUMONT *et al.*, 2001).

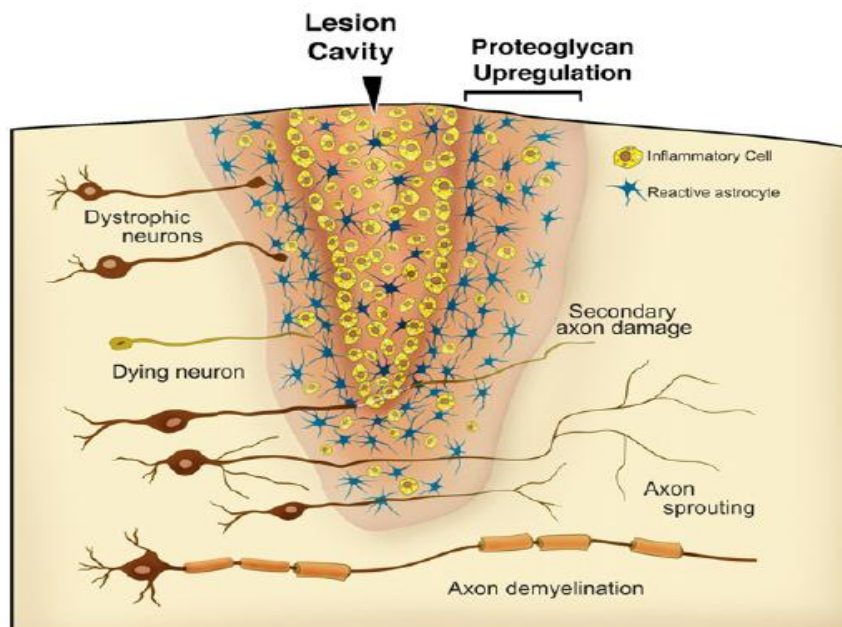


Figura 8: Desenho esquemático do aumento do sítio da lesão e da formação da cicatriz glial. O aumento da cavitação ocorre em decorrência aos danos secundários, principalmente, devido à resposta inflamatória. Essa intensa resposta inflamatória promove uma cascata de danos secundários, que danificam axônios que foram inicialmente poupados do impacto mecânico, também ocasiona desmielinização dos axônios adjacentes. Ocorre, então, a formação de uma cicatriz glial que esta associada com o aumento de moléculas inibitórias na matrix extracelular, como os proteoglicanos e o aumento do gradiente dessas moléculas inibitórias juntamente com as áreas de inflamação criam um ambiente totalmente não permissivo à regeneração. *Fonte: modificado de Fitch & Silver 2008.*

2.4. Tratamento da lesão medular

Como foi dito anteriormente, a SCI é uma patologia altamente debilitante que promovem impactos, na maioria das vezes, irreversíveis e resulta em uma grande perda funcional, sendo a tetraplegia ou a paraplegia uma das maiores complicações (ESPOSITO *et al.*, 2011a). A SCI esta acoplada a um processo ativo e multifatorial que

ocasiona uma perda progressiva após o trauma inicial. Toda esta complexa fisiopatologia reflete na dificuldade do desenvolvimento de terapias que sejam realmente eficientes.

Na prática clínica, os tratamentos atuais para SCI são extremamente limitados a ressuscitação, estabilização do paciente traumatizado e a administração de doses de metilprednisolona, sendo a melhora neurológica muito modesta mesmo com a utilização de altas doses (ESPOSITO *et al.*, 2011). O uso de altas doses de anti-inflamatório podem desencadear outros tipos de problemas, tais como o aumento de riscos a infecções, pneumonia e choque séptico, complicações de diabetes, sangramentos gastrointestinais e demora na cicatrização (COLEMAN *et al.*, 2000; HURLBERT *et al.*, 2001; SHORT *et al.*, 2000).

A verdade é que atualmente ainda não existe um tratamento que seja realmente efetivo e que limite a evolução dos danos secundários, assim como, ainda não existem tratamentos eficientes que tratem algumas das principais sequelas após a lesão na medula como os déficits motores e sensoriais, dor crônica, disfunção da bexiga, do intestino e sexual, disreflexia autonômica, entre outros (ESPOSITO *et al.*, 2011, HAGG & OUDEGA, 2006). O tratamento ideal deve diminuir a dor, a inflamação além de promover recuperação funcional com o mínimo de efeitos colaterais. Também não há profilaxia além do bom-senso, já que o trauma medular acontece em decorrência de um acidente que não pode ser previsto, nem evitado.

Em resumo, para que uma intervenção terapêutica seja realmente eficiente em promover uma melhora neurológica funcional após lesão medular, esta deverá combinar varias estratégias, uma vez que o agravamento após a lesão medular não é ocasionado por um fator único (CIZKOVA *et al.*, 2011). As terapias devem ser direcionadas a atenuação dos processos do dano secundário, como inflamação e a excitabilidade provocada pelo glutamato (ESPOSITO *et al.*, 2011). Também se faz necessário a inativação dos fatores inibidores do crescimento axonal promovendo um ambiente mais favorável a regeneração de axônio, além da estimulação da neurogênese na medula espinal gerando novos progenitores espinhais que podem ser obtidos através de atividade física, manipulação farmacológica, terapia celular e gênica visando substituir as células mortas como neurônios e oligodendrócitos. (CIZKOVA *et al.*, 2011).

A compreensão dos fenômenos celulares e moleculares subjacentes lesão medular pode contribuir para a consolidação de tratamentos mais direcionados, e promover, assim, melhora do quadro clínico.

Clinicamente, a acupuntura tem demonstrado resultados relevantes no tratamento de vítimas com lesão medular. Recentemente, foi iniciada uma investigação sobre os mecanismos da acupuntura experimental no modelo de lesão por contusão. Sendo assim, a proposta do nosso trabalho é investigar diferentes métodos de estimulação e os mecanismos subjacentes que promovem a melhora neurológica que já é observada em casos clínicos de lesão medular.

2.5. Acupuntura e lesões medulares

A acupuntura é uma das terapias da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) que tem como técnica básica à inserção de finas agulhas de metal em pontos específicos da pele com propósitos terapêuticos. A teoria geral da acupuntura é baseada na premissa de que há um padrão de fluxo de energia (chamada "Qi") através do corpo, essencial para uma saúde perfeita. Esta terapia tem sido utilizada em diversos problemas de saúde, segundo a MTC, quase todas as patologias são passíveis de tratamento pela acupuntura (MEDEIROS, 2001).

Na clínica diária, os acupunturistas a utilizam, com considerável sucesso, para um grande número de patologias. Já a Organização Mundial de Saúde (OMS) não é tão otimista e considera a terapia eficiente apenas na prevenção e tratamento de náusea e vômito, no tratamento da dor e do abuso de álcool, do tabaco e de outras drogas, no tratamento de problemas reprodutivos de mulheres, na prevenção de problemas respiratórios como asma e bronquite e adjuvante na reabilitação de danos neurológicos (MEDEIROS, 2001).

Quando avaliamos o efeito da acupuntura em lesões medulares devemos considerar duas condições distintas, uma relacionada a lesões incompletas com sintomas de gravidade leve a moderada e a segunda com lesões medulares completas. O primeiro tipo é normalmente associado a doenças da coluna vertebral, como as patologias do disco intervertebral; e o segundo tipo está normalmente associado a traumas.

Em relação a patologias do disco intervertebral, existem dados consistentes sobre o efeito da acupuntura sobre estas patologias, tanto em humanos (LONGWORTH & MCCARTHY, 1997) como em animais (HAYASHI *et al.*, 2007). Dores, deficiências motoras e sensoriais decorrentes de algum tipo de compressão de nervo provocado por hérnias de disco são queixas comuns nos consultórios de acupuntura.

Em lesões medulares mais severas, onde o paciente apresenta uma deficiência motora permanente, apesar dos dados científicos serem mais escassos, a maioria dos autores ainda sugerem que a acupuntura possa ser muito útil para estes pacientes (PAOLA & ARNOLD, 2003; WONG *et al.*, 2003). Obviamente nestes casos não se propõe que a terapia recupere totalmente os pacientes, e sim que produza alguma melhora motora e sensorial, melhore a dor, o tônus muscular, o controle dos esfíncteres, entre outros. A reabilitação total destes pacientes, como citado anteriormente, ainda não é alcançada com nenhuma terapia desenvolvida até o momento.

Numa revisão recente, Dorsher e McIntosh (2009) analisaram o efeito da acupuntura no tratamento de seqüelas de lesões medulares agudas e crônicas e concluíram que há evidências que o uso da eletroacupuntura na lesão medular aguda pode, significativamente, induzir recuperação neurológica a longo-prazo, melhorando as funções motoras, sensoriais e o controle das funções de micção e defecação. Além disso, em pacientes com lesões medulares crônicas, a acupuntura pode também induzir melhora neurológica, ajudando principalmente no controle da dor (DORSHER & MCINTOSH, 2009).

Recentes estudos têm demonstrado o efeito positivo da acupuntura em modelos de lesão medular em ratos.

Ding e colaboradores (2009) demonstraram que a eletroacupuntura nos pontos VG1, VG2, VG6 e VG9 (meridiano do vaso governador - VG9-Zhiyang; VG6-Jizhong; VG2-Yaoshu e VG1-Changqiang) associada ao uso de células tronco mesenquimais da medula óssea podem promover regeneração axonal e recuperação motora parcial em ratos submetidos à transecção da medula espinal (DING *et al.*, 2009).

Yan e colaboradores (2011) demonstraram que a eletroacupuntura (EA) em quatro pontos do vaso governador em associação com o tratamento de células tronco mesenquimais (MSCs) foram capazes de promover a diferenciação destas células e a regeneração de feixe de nervos através da indução endógena NT-3, dessa forma, a EA e o transplante de células mesenquimais quando associados podem promover uma melhora parcial dos membros paralizados após a lesão medular (YAN *et al.*, 2011).

Nesta mesma linha de pesquisa, Liu e colaboradores (2012) também demonstraram que o tratamento com a EA significativamente aumentou o número de células tronco mesenquimais do estroma comparado ao grupo não tratado e promoveu, assim, uma significativa melhora funcional nos animais com transecção medular (LIU *et*

al., 2012).

Li e colaboradores (2010) demonstraram em outro artigo recente que a eletroacupuntura (EA) (60Hz, 20 minutos) do VG6 e VG9 foi capaz de aumentar a expressão da proteínas ANXA5 (proteína que tem um potente efeito anti-inflamatório por inibir a ação da fosfolipase A2) e CRMP2 (proteína exclusiva do SNC que está envolvida com o crescimento axonal), na medula espinal de ratos submetidos ao modelo de lesão por transecção e relacionaram o aumento destas proteínas aos efeitos neuroprotetores proferidos pela acupuntura (LI *et al.*, 2010).

Choi e colaboradores (2010) demonstraram que a acupuntura manual, aplicada nos pontos VG26 e VB34, significativamente, reduziu a morte apoptótica de neurônios e oligodendrócitos promovendo assim uma melhora funcional após a lesão. A partir da investigação dos mecanismos, os autores puderam constatar que a acupuntura foi capaz de reduzir a ativação da microglia residente, reduzir citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6. Além de reduzir mediadores inflamatórios como a COX-2, NOS, e metaloprotease-9, a acupuntura também reduziu a ativação de caspase-3. A partir da análise do tecido medular, puderam observar que a acupuntura manual foi capaz de reduzir o tamanho das cavidades císticas e a perda axonal. Os autores concluíram que a neuroproteção proferida pela acupuntura sobre a lesão medular foi obtida pelo controle dos danos secundários através de um controle parcial da inflamação e da inibição microglial (CHOI *et al.*, 2010).

A acupuntura também tem demonstrado promover resultados positivos. Em trabalhos recentes, que utilizam outros modelos experimentais de doença neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, Esclerose Amiotrófica Lateral e isquemia.

Yang e colaboradores (2010), em um modelo de esclerose amiotrófica lateral usando camundongos da linhagem hSOD1G93A, demonstraram que os animais tratados com a EA no ponto Zusanli (E36) tiveram uma melhora motora significativa comparada aos animais controle e esta melhora parece estar associada a resposta anti-inflamatória (YANG *et al.*, 2010).

Kang e colaboradores (2007) observaram, no modelo de Parkinson induzido por MPTP, que o tratamento com acupuntura reduziu as perdas de neurônios dopaminérgicos no Estriato, em partes, por reduzir a neuroinflamação. Os autores constataram uma redução na quantidade de microglia ativa após o tratamento, assim como observaram uma redução dos mediadores inflamatórios como a COX-2 (ciclooxigenase-2) e na expressão do iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) (KANG *et al.*, 2007).

Usando um modelo de isquemia e reperfusão (LI/R) ocasionando dano oxidativo cerebral, disfunção cognitiva e diminuição da taxa de sobrevivência em ratos, Chen e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento prévio com EA antes da LI/R reduziram os danos causados por este modelo por previamente reduzir a ativação microglial e por atenuar o estresse oxidativo. Assim os autores propõem que o pré-tratamento com EA tem um grande potencial como uma terapia neuroprotetora (CHEN *et al.*, 2012).

Vários mecanismos fisiológicos da acupuntura podem contribuir para o efeito da acupuntura na recuperação funcional de animais lesados, dentre eles, a ação analgésica (MAYER *et al.*, 1977; POMERANZ & CHIU, 1976), neuroregeneradora (KIM *et al.*, 2001), neuroprotetora (JANG *et al.*, 2003), mas o nosso grupo acredita que o maior benefício da acupuntura no tratamento da lesão medular, seja o seu mecanismo anti-inflamatório, já comprovado (YIM *et al.*, 2007).

2.6. Tipos de estimulação de Acupuntura

Os tipos mais comuns de estimulação dos pontos de acupuntura são executados pela eletroacupuntura e com a acupuntura manual. A acupuntura manual é o tratamento com agulha seca no acuponto (ponto da acupuntura) e a estimulação ocorre por movimentos rotacionais realizados pelo acupunturista. Na eletroacupuntura, a agulha no ponto é estimulada por um aparelho eletro-estimulador (ZHAO, 2008). Este aparelho permite um estímulo com intensidade e duração pré-definidas. Muitas pessoas confundem a EA como o TENS (neuroestimulação elétrica transcutânea). Essas duas técnicas são totalmente diferentes. O TENS é colocado no músculo próximo a região dolorosa enquanto na eletroacupuntura a estimulação elétrica estimula a agulha no ponto de acupuntura (ZHAO, 2008).

Na experimentação animal o grande problema com relação à utilização dos métodos tradicionais de estimulação dos pontos de acupuntura é que tanto na acupuntura manual como na eletroacupuntura ocorre a necessidade de imobilização dos animais o que gera estresse (MEDEIROS, 2001).

Uma substância utilizada pela MTC para estimular os acupontos é o veneno de abelha. O uso terapêutico com veneno de abelha (apiterapia) é indicado para o tratamento de várias doenças, sendo muito usado pela MTC para alívio da dor e por redução da inflamação na artrite reumatoide crônica e na osteoartrite (SON *et al.*, 2007). Na apipuntura, a substância tem o papel apenas de causar uma “irritação” local e estimular pontos de acupuntura, produzindo um efeito mais intenso e duradouro que o agulhamento simples. Na experimentação animal, o veneno de abelha (BV, do inglês bee venom) é a substância mais utilizada para estimulação química de pontos de acupuntura.

O BV extraído de abelhas é conhecido como apitoxina e é usado na MTC para reduzir a inflamação na artrite reumatoide crônica e osteoartrite. Além dos efeitos anti-inflamatórios, o BV também apresenta efeitos antinociceptivos e anti-tumorais (YANG *et al.*, 2011; SON *et al.*, 2007). O BV possui ao redor de 18 componentes ativos, entre eles estão incluídos a histamina, noradrenalina, PLA₂ e uma variedade de peptídeos como a melitina e apamina (SON *et al.*, 2007) sendo que a melitina constitui de 40-60% do total do extrato seco (YANG *et al.*, 2011). Acredita-se que a melitina seja o maior componente bioativo que induza o efeito anti-inflamatório e anti-nociceptivo quando aplicado no acuponto (SON *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que apipuntura tem se mostrado efetiva para o tratamento de várias condições inflamatórias como no modelo de artrite reumatoide induzida pelo colágeno tipo II (SUH *et al.*, 2006), no teste da formalina (ROH *et al.*, 2006) e no modelo de dor neuropática por lesão do nervo periférico (ROH *et al.*, 2004). O BV também tem se mostrado eficiente no tratamento de doenças neurodegenerativas como esclerose amiotrófica lateral e na doença de Parkinson (KIM *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011). Até o momento não existem relatos na literatura dos benefícios promovidos pela apipuntura em lesões medulares.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Avaliar o efeito de diferentes protocolos de estimulação de pontos de acupuntura no modelo de lesão medular por compressão em ratos.

3.2. *Objetivos específicos*

➤ Avaliar se diferentes protocolos de estimulação (acupuntura manual *versus* apipuntura em três combinações de acupontos: E36+VG3; ID3+B62 e VG3+VG9) alteram a capacidade locomotora de ratos submetidos ao modelo lesão medular por compressão.

➤ Avaliar se a acupuntura manual ou apipuntura nos acupontos E36+VG3 interfere na severidade do trauma medular (análise histopatológica) de ratos submetidos ao modelo lesão medular por compressão através de inflação de balão.

➤ Avaliar se a apipuntura nos acupontos E36+VG3 interfere no perfil de expressão de citocinas pro (IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) na medula espinal de ratos submetidos ao modelo lesão medular por compressão através de inflação de balão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos adultos machos da raça Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, pesando entre 270 e 310 gramas, sendo mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 horas, em temperatura constante, com água e comida à vontade.

Todos os procedimentos realizados neste projeto estão de acordo com as normas internacionais de uso de animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.2. Deliniamento experimentais

Experimento 1: Avaliar se diferentes protocolos de estimulação (acupuntura manual versus apipuntura) em três combinações de acupontos: E36+VG3; ID3+B62 e VG3+VG9 alteram a capacidade locomotora de ratos.

Um dia após a lesão medular por compressão moderada, os animais foram submetidos à acupuntura manual (aplicação diária) ou apipuntura (aplicação semanal) em três combinações de pontos E36+VG3, ID3+B62 e VG3+VG9. A capacidade locomotora foi avaliada pelo teste BBB no 1º, 7º e 14º dia após a lesão (Figura 9).

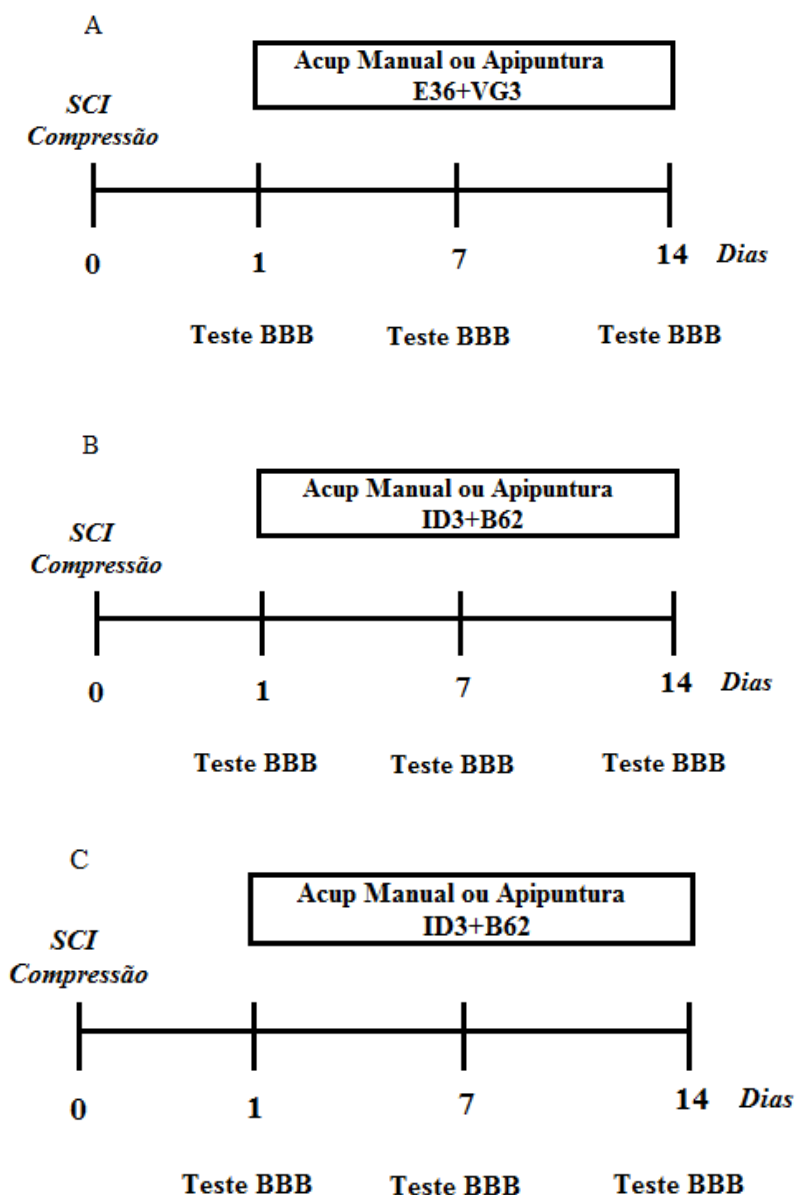


Figura 9: Delineamento do Experimento 1. Protocolo de avaliação da capacidade locomotora dos animais submetidos a estimulação por acupuntura manual (diariamente) ou apipuntura (semanalmente) na combinação de pontos **E36+VG3** (A), ou na combinação de pontos **ID3+B62** (B) ou na combinação de pontos **VG3+VG9** (C).

Experimento 2: Avaliar através da análise histopatológica se a acupuntura manual ou apipuntura nos acupontos E36+VG3 interfere na severidade do trauma medular.

No 14º dia (após a última análise comportamental), os animais do experimento 1 que foram submetidos à acupuntura manual (aplicação diária) ou apipuntura (aplicação semanal) na combinação dos pontos E36+VG3 foram perfundidos para análise da severidade da lesão (Figura 10).

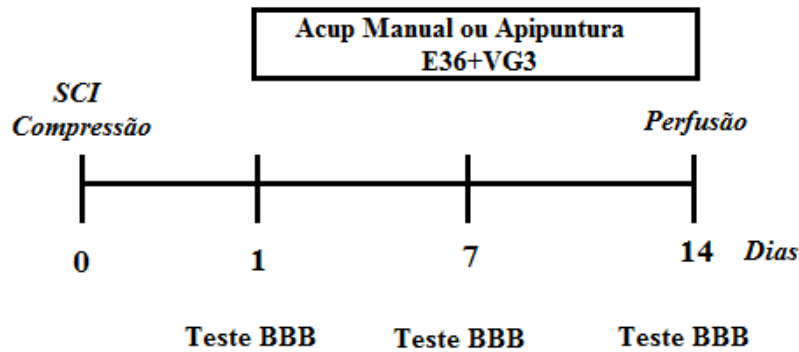


Figura 10: Delineamento do Experimento 2. Para avaliação da severidade do trauma, no 14º dia após avaliação da atividade locomotora, os animais tratados com acupuntura manual (acupuntura ponto ou não ponto) ou apipuntura (apipuntura ponto ou não ponto) foram perfundidos e os tecidos coletados para posterior análise histopatológica.

Experimento 3: Avaliar se a apipuntura nos acupontos E36+VG3 interfere no perfil de expressão de citocinas pro (IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4).

Imediatamente após a cirurgia de lesão medular, os animais foram submetidos a apipuntura (apipuntura ponto ou não ponto) na combinação dos pontos E36+VG3. Para mensurar os níveis de citocinas, foi coletado aproximadamente 1 cm de amostra de tecido medular contendo o sitio da lesão. A coleta foi realizada em três tempos diferentes 1, 6 e 24 horas após a cirurgia e o tratamento. Neste experimento foi incluído o grupo controle da cirurgia (Sham) onde os animais tiveram exposição do processo espinhoso em T10, mas não sofreram a lesão por compressão (Figura 11).

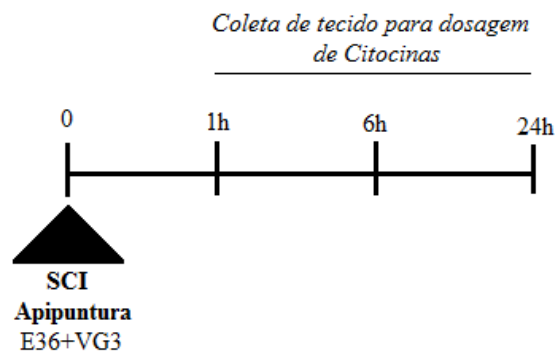


Figura 11: Delineamento Experimento 3. Avaliação do perfil de Expressão de Citonas pro e antiinflamatória. Uma, 6 ou 24 horas após a lesão medular e o imediato tratamento com apipuntura (apipuntura ponto ou não ponto) foi realizada a coleta de tecido medular para dosagem de citocinas.

4.3. Procedimento cirurgico para lesão medular

Os animais foram inicialmente anestesiados com ketamina (75mg/kg, i.p.) e xilasina (25mg/kg, i.p.). Após chegada do animal no plano anestésico, foi realizada tricotomia extensa do dorso seguida de uma incisão longitudinal na pele na linha média do dorso, em aproximadamente 3 a 4 cm, sobre os processos espinhosos de T7 a T11. Posteriormente, a musculatura nos processos espinhosos T7 e T11 foi dissecada, possibilitando a abertura de um pequeno orifício de 2 mm de diâmetro na região caudal do processo espinhoso T10 através do auxílio de uma furadeira dental.

A lesão por compressão na medula dos ratos foi executada com a utilização de um cateter fogarty do tipo 2 conectado a uma microseringa Hamilton de 50 µl previamente preenchido de solução salina 0,9% (VANICKÝ *et al.*, 2001). A ponta do cateter, em formato de balão, foi introduzida pelo orifício de 2 mm produzido no espaço epidural e avançado cranialmente por 1cm, de forma que o centro do balão ficasse entre T8-T9. Em seguida, o balão foi inflado com um volume definido de 15 µl salina por 5 minutos (lesão intermediária). Após este período de 5 minutos o cateter foi desinflado e removido cuidadosamente e o animal teve o tecido muscular e a pele suturados em camadas anatômicas (Figura 12).

Imediatamente após o procedimento cirúrgico de lesão medular, os animais receberam uma dose profilática de antibiótico (Pentabiótico, 40.000 UI/kg, s.c.) e injeção subcutânea de 5 ml de uma solução de dextrose e salina. Os animais foram mantidos em câmara com temperatura controlada e 2 horas após a cirurgia os animais receberam uma injeção de Fentanil (0,032 mg/kg, s.c.).

Os animais com lesão medular foram mantidos no máximo por duas semanas.

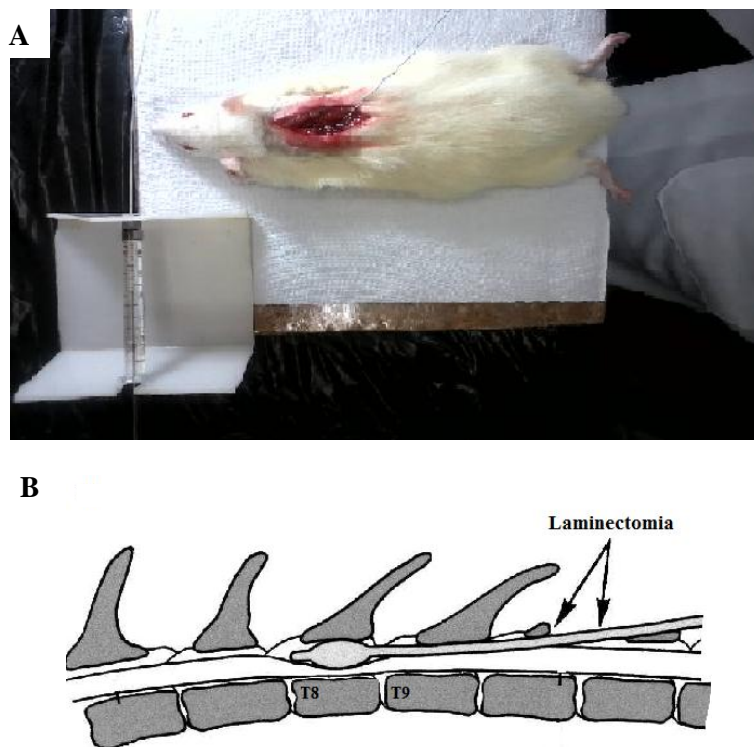


Figura 12: Cirurgia de Lesão medular por compressão. Em A, Fotografia do animal sendo submetido à lesão medular por compressão através da inflação do balão de um cateter fogarty tipo 2 de embolectomia. Em B, posição do cateter em relação às vértebras e da compressão na medular. *Fonte: modificado de Vanický et al 2001.*

4.4. Tratamento com Acupuntura e Apipuntura

- Estimulação de pontos de acupuntura

Para a escolha da combinação de pontos de acupuntura levamos em consideração a indicação da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) e os resultados de estudos científicos. Desta forma, utilizamos uma combinação de pontos que são

indicados para “melhorar o fluxo de energia” das costas e dispersar a estagnação de Qi (energia vital) e sangue (Xue), além de melhorar o movimento das pernas.

Na primeira fase deste trabalho (Experimento 1) foram testadas as combinações de ponto E36+VG3; ID3+B62 e VG3+VG9. Os animais submetidos à lesão intermediária por compressão foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, onde cada grupo recebeu diferentes tratamentos pós-lesão: grupo acupuntura manual (Grupos: E36+VG3 ou ID3+B62 ou VG3+VG9), grupo apipuntura (Grupos: BV-VG3+E36 ou BV-ID3+B62 ou BV-VG3+VG9), grupo controle acupuntura manual (ACUP-NP), grupo controle apipuntura (BV-NP), grupo controle sem manipulação (CTL).

- CONTROLE (Grupos CTL: para o teste do E36+VG3, n=6; para o teste do ID3+B62, n=4; para o teste do VG3+VG9, n=6) foi mantido na caixa de moradia sem nenhum tipo de manipulação até o final do experimento.

- ACUPUNTURA MANUAL (Grupos ACUP: E36+VG3, n=7; ID3+B62, n=5; VG3+VG9, n= 4) foi realizada diariamente, começando 24 horas pós-lesão. Os animais foram imobilizados e as agulhas de acupuntura (Dong Band®, 0,25 x30) inseridas (5 mm de profundidade) nos pontos de acupuntura (acupontos) e mantidas sem qualquer manipulação por 20 minutos.

- ACUPUNTURA NÃO-PONTO (Grupos ACUP-NP: para o teste do E36+VG3, n=7; para o teste do ID3+B62, n=5; para o teste do VG3+VG9, n=3), foi realizada diariamente, começando 24 horas pós lesão. Os animais foram imobilizados e as agulhas de acupuntura (Dong Band®, 0,25 x30) inseridas (5 mm de profundidade) em regiões próximas aos pontos de acupuntura e mantidas sem qualquer manipulação por 20 minutos.

- APIPUNTURA (Grupos BV: BV-E36+VG3, n=9; BV-ID3+B62, n=6; BV-VG3+VG9, n= 4) foi realizada no 1°, 7° e 14° dia pós- lesão. Foram injetados nos animais 20µl de solução de veneno de abelha (*Apis mellifera*, Sigma®, USA) diluído em salina (dose de 0,08 mg/kg) nos acupontos.

- APIPUNTURA NÃO-PONTO (Grupos BV-NP: para o teste do E36+VG3, n=7; para o teste do ID3+B62, n=5; para o teste do VG3+VG9, n=3) foi realizada no 1°, 7° e 14° dia pós-lesão. Foram injetados nos animais 20µl de solução de veneno de abelhas (*Apis mellifera*, Sigma®, USA) diluído em salina (dose de 0,08 mg/kg) em regiões próximas aos pontos de acupuntura.

Localização dos pontos de acupuntura e dos não-pontos

- VG3 (Yaoyangquan): acuponto unilateral localizado na linha média dorsal entre o processo espinhoso da última vértebra e a primeira sacral.
- E36 (Zusanli): acuponto bilateral localizado entre a tíbia e a fíbula, aproximadamente 5mm lateral ao tubérculo da tíbia.
- ID3 (Houxi): acuponto bilateral localizado lateralmente a articulação metacarpo falangeana, proximal a cabeça do quinto metacarpo.
- B62 (Shenmai): acuponto bilateral localizado na depressão distal ao maléolo lateral da fíbula.
- VG9 (Zhiyang): acuponto unilateral localizado na linha média dorsal entre os processos espinhosos das vértebras T11 e T12.
- Não-pontos E36+VG3: não-ponto unilateral 5 mm lateral ao ponto VG3 (na tentativa de evitar a estimulação de pontos do meridiano da Bexiga que passa

nesta região) e não-ponto bilateral localizado a 4 mm da linha média posterior da perna (no mesmo dermatomo que o acuponto E36).

- Não-pontos ID3+B62: mesmos não pontos utilizados no E36+VG3, já que os acupontos ID3 e B62 estão localizados nas patas por onde passam vários meridianos e é difícil evitar a estimulação de outros acupontos.

- Não ponto VG3+VG9: não-ponto unilateral 5 mm lateral ao ponto VG3 e não-ponto unilateral localizado a 1 cm lateral da base da cauda.

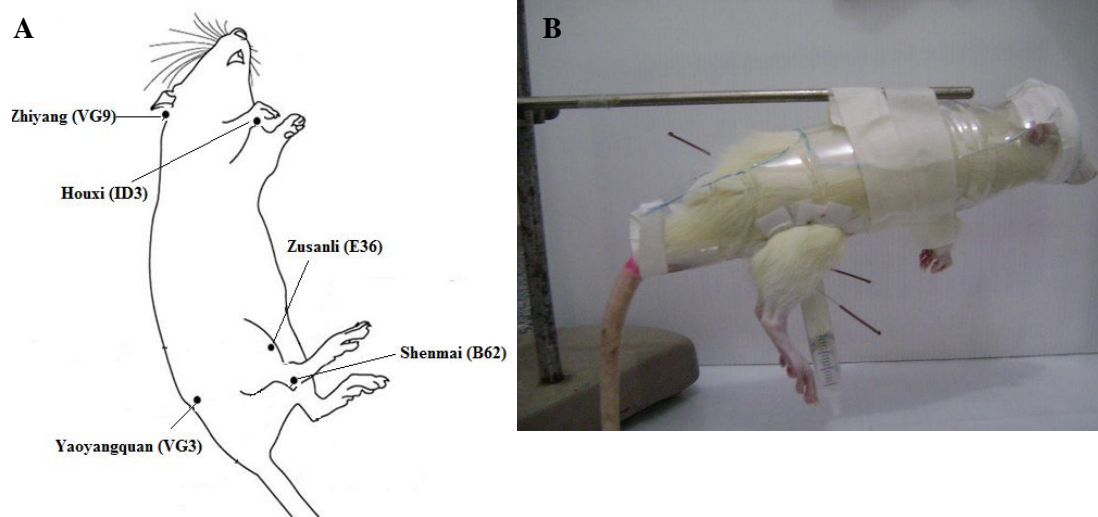


Figura 13: Estimulação dos pontos de acupuntura. Em A, desenho esquemático demonstrando os pontos usados neste experimento. *Fonte: modificado de Choi et al., 2010.* Em B, fotografia do aparato de imobilização para a realização da acupuntura manual. Animal recebendo tratamento com agulhas de acupuntura nos pontos E36+VG3.

4.5. A avaliação da capacidade locomotora de ratos pós-lesão medular (BBB test):

Cada animal foi colocado individualmente no centro do campo aberto que consiste de uma caixa transparente de acrílico de 80x80x30cm com fundo antiderrapante (Figura 14), permanecendo cada animal por 4 minutos, onde podiam se movimentar livremente.

A avaliação que foi realizada no 1º, 7º e 14º dia pós-lesão por um pesquisador que desconhecia os tratamentos. Foram atribuídos escores de 0 a 21, onde 21 indica locomoção normal e 0 indica nenhum movimento espontâneo nos membros posteriores (BASSO *et al.*, 1995), Tabela 2.

O escore BBB categoriza combinações dos movimentos posteriores, como, movimentação do joelho, suporte de peso, coordenação dos membros posteriores com os anteriores, posição e estabilização do tronco em relação às passadas, colocação das patas, liberação dos dedos, posição da cauda. Representando, dessa forma, as etapas sequenciais de recuperação que os ratos atingem após a lesão medular. Cada avaliação foi realizada por dois avaliadores que eram cegos ao experimento e os valores foram representados como média \pm erro padrão.



Figura 14: Teste para avaliação da capacidade locomotora. Animal sendo submetido ao teste de avaliação da capacidade locomotoras no 1º dia após a lesão medular.

4.6. Perfusão tecidual

No 14º dia pós-lesão (duas semanas), os animais foram submetidos a anestesia com thiopental sódico (50mg/kg, i.p., *Cristalia*) e depois de certificada a anestesia, pela constatação da ausência de reflexos musculares e corneanos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal. Foi realizada uma incisão a partir do processo Xifóide para ambos os lados contornando o gradil costal, depois ampliando-se de cada lado para cima. Em seguida desinseriu-se o diafragma, de modo a expor completamente o coração na cavidade torácica. Uma agulha ligada através de um cateter a uma bomba peristáltica, por sua vez, foi inserida no ápice do ventrículo esquerdo, em direção à artéria aorta ascendente. Em seguida, foi realizada uma pequena incisão no átrio direito e ligou-se a bomba. Por este procedimento, foram impulsionados 300 ml de solução de salina com heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/1000ml de solução salina) por aproximadamente 10 minutos, seguida de 700ml de Paraformaldeído a 4% em tampão fosfato pH 7,4 a 4°C durante 20 minutos.

Em seguida, a medula espinal de cada animal foi retirada (porção que continha o sítio da lesão) cuidadosamente do canal vertebral e pós-fixadas por 4 horas na mesma solução de perfusão. Posteriormente, as medulas espinais foram armazenadas em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato (PB) sob refrigeração a 4°C até o momento do corte.

4.7. Avaliação histopatológica: Análise da severidade do trauma medular

Para avaliação histopatológica, um segmento de 1 cm de cada medula contendo o sítio da lesão foi embebido em parafina e fatiados em micrótomo em cortes coronais de 5µm de espessura. Após serem desparafinados com xilol, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

Cada segmento foi analisado por um histopatologista experiente, onde cada corte da medula espinal no epicentro da lesão foi dividida em 4 áreas (cornos ventral e dorsal, direito e esquerdo). Alterações histopatológicas em cada uma destas áreas foram pontuadas em 7 scores, onde 0= nenhuma lesão observada; 1= substância cinzenta contendo pequenas petéquias; 2= substância cinzenta contendo edemas, microvacúolos, 3= substância cinzenta contendo muitos pontos hemorrágicos associados com microvacúolos; 4= pequena área de lesão (lesão ocupa menos que 1/3 da área cinzenta); 5= moderada área de lesão (1/3 da área infartada em relação ao total) e 6= Ampla área de lesão (maior que o total da área cinzenta). A pontuação final para cada corte será a soma das alterações patológicas das diferentes regiões (GENOVESE *et al.*, 2008).

Os escores serão atribuídos a todos os cortes dentro da lesão, e a média por rato será calculada. Todas as análises histopatológicas serão realizadas de maneira cega.

4.8. Dosagem de Citocinas

- Processamento do Tecido

Para coleta do tecido medular, a coluna vertebral (entre o segmento T7-T10) foi retirada e rapidamente dissecada. Aproximadamente 1 cm de amostra do tecido medular contendo o sítio da lesão foi retirado. Para se ter certeza da exata região do sítio da lesão a porção extraída foi comparada com o tecido medular dos animais Sham.

Para avaliação da expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e anti-inflamatória (IL-4 e IL-10), a coleta foi realizada nos tempos de 1, 6 e 24 horas após a lesão medular, como descrito por Choi e colaboradores. (Choi *et al.*, 2010).

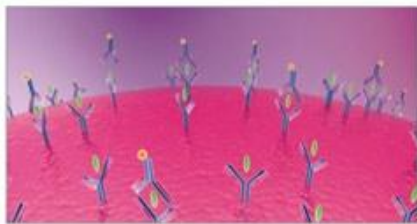
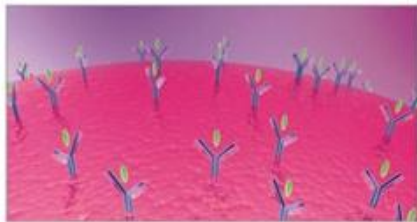
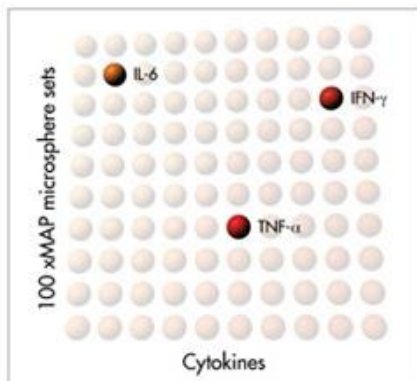
O tecido medular coletado foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C, para posterior processamento. O material foi mecanicamente macerado e homogenizado em 200 μ L de tampão de lise (100 mM de Tris-HCl com pH=6,8, contendo 1% de Triton X-100) contendo inibidores de proteases (Antipain 0,5 μ g/mL; Aprotinina 5 μ g/mL; Benzamidina 157 μ g/mL; Pepstatina A 0,1 μ g/mL e Phenylmethylsulfonyl fluoride 17 μ g/mL). Após a completa homogeneização, para isolar os pellets e restos de tecido as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por 5 minutos em centrífuga refrigerada. Após a completa centrifugação, o sobrenadante foi coletado e congelado a -80°C e enviados para o Instituto Genises de Análise Científica (IgAc LifeScience, SP) para posterior análise.

- Dosagem da concentração das citocinas no tecido medular

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-4 e IL-10 foram quantificadas pela técnica de quimiluminescência do MILLIPLEX xMAP® (Millipore, USA). Este kit é um painel para ratos que permite a dosagem de diferentes analitos em uma única amostra no equipamento Luminex™ xMAP.

A Tecnologia envolve um processo exclusivo que cria microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex. Estes kits da Milliplex foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam em imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito, que se deseja quantificar da amostra, se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

Os anticorpos para detecção das citocinas utilizados neste bioensaio são próprios para o uso no aparelho equipamento Luminex. A concentração das citocinas no tecido serão expressas como pg/mg de tecido.



- 1- Painel específico para dosar citocinas da **MILLIPLEX xMAP®**
- 2- Os Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados na superfície das microesferas;
- 3- O analito da amostra se liga aos anticorpos de captura;
- 4- A detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) que se liga ao anticorpo de detecção formando um sanduíche.
- 5- O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo.

Figura 15: Esquema do procedimento de dosagem das citocinas segundo o fabricante. Etapas do procedimento de dosagem de citocinas pela técnica de quimiluminescência do MILLIPLEX xMAP® Milipore, USA. *Fonte: www.milipore.com*

4.9. Análise Estatística

A capacidade locomotora foi avaliada pelo escore do teste comportamental (BBB) e as médias entre os grupos expressas como média \pm erro padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectados pela análise de variância de duas vias para medidas repetidas, admitindo-se os fatores grupo, tempo e tratamento. Posteriormente, foi executado o pós-teste de comparações múltiplas Student-Newman-keuls, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

A concentração de citocinas foi expressa como média \pm erro padrão. Foram realizados o teste Komolgorov-Smirnov para detectar se havia distribuição normal entre os grupos. Para grupos com distribuição normal, posterior a ANOVA de uma via foi realizado o teste de Student-Newman-keuls para comparações múltiplas. O teste não paramétrico de Kruskal wallis foi utilizado para grupos com distribuição fora da curva normal seguido do teste Dunn's para comparações múltiplas, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$ em todas as análises.

Na avaliação da análise histopatológica, foram calculadas as médias dos escores. O teste não paramétrico de Kruskal wallis foi utilizado na análise estatística. Posteriormente foi realizado uma regressão linear com as médias do teste da avaliação da capacidade locomotora.

As análises estatísticas foram realizadas por meio dos programas SigmaStat 3.5 e as apresentações gráficas dos resultados foram obtidas pelo programa GraphPad Prism 5.0.

Tabela 2: Escala Basso, Beattie & Bresnahan (BBB) para avaliação da capacidade de locomoção de ratos pós-lesão medular (BASSO *et al.*, 1995)

<i>Pontos</i>	<i>Definições operacionais de categorias e atributos</i>
0	Nenhum movimento observável do membro posterior
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou de duas articulações, geralmente do quadril ou joelho
2	Movimento extenso de uma articulação e discreto na outra
3	Movimento extenso nas duas articulações e nulo na terceira
4	Movimento discreto das três articulações do membro posterior
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior
8	Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar da pata sem suporte de peso
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente na fase de apoio (ex. quando estático) ou passada dorsal ocasional , freqüente ou consistente com o suporte de peso e nenhuma passada plantar
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente à consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior
14	Passo plantar com suporte de peso consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante/ da pata rodada (interna ou externa/) durante a locomoção, no contato inicial com a superfície e antes de liberar os dedos na fase final de apoio ou passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante/ da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com freqüente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodado no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com freqüente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e na liberação dos dedos .
18	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com consistente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodado no instante da liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com consistente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e na liberação dos dedos e apresenta cauda para baixo em parte do tempo ou o tempo todo.
20	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior durante a marcha com consistente liberação dos dedos durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e na liberação dos dedos com consistente elevação da cauda e instabilidade do tronco .
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, consistente liberação dos dedos, posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda fase de apoio, estabilidade consistente do tronco e consistente elevação da cauda.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Efeito da acupuntura e da apipuntura em diferentes combinações de acupontos na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão.

No *Experimento 1*, nós avaliamos se diferentes protocolos de estimulação (acupuntura manual *versus* apipuntura) em três: E36+VG3; ID3+B62 e VG3+VG9 alteram a capacidade locomotora de ratos.

- Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos E36+VG3 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos à lesão medular por compressão.

A Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores grupo (CTL; E36+VG3; ACUP NP; BV-E36+VG3; BV-NP) ($F_{(4,12)}= 13,92$; $p<0,001$), tempo (Antes da lesão, 24h, 1 e 2 semanas após lesão) ($F_{(3,12)}= 521,937$; $p<0,001$) e interação ($F_{(12,12)}= 3,625$; $p<0,05$). Os resultados demonstram (Figura 16) que no primeiro dia após a lesão, os animais apresentaram paraplegia e paresia, sendo atribuídos baixos índices na escala BBB variando de 0-3, o que segundo a tabela BBB significa que os animais não foram capazes de suportar o seu próprio peso pelos membros posteriores.

O teste Student-Newman-Keuls detectou que o grupo que recebeu o tratamento acupuntura manual diariamente nos pontos E36+VG3 na primeira (E36+VG3, média $6.07 \pm$ erro 0.99) e na segunda semana (11.00 ± 1.48) apresentou melhora locomotora significativamente superior ao controle acupuntura não-ponto (ACUP-NP, 1° semana 2.14 ± 1.13 ; 2° semana 6.42 ± 1.37) e ao grupo controle sem manipulação (CTL, 3.33 ± 1.35 ; 5.91 ± 1.01) (Figura 17A).

O teste Student-Newman-Keuls também detectou diferença significativa na melhora da função locomotora do grupo apipuntura nos pontos E36+VG3 (BV-E36+VG3, 1° semana 8.11 ± 1.35 ; 2° semana 12.27 ± 1.08) em relação ao grupo controle (CTL, 3.33 ± 1.35 ; 5.91 ± 1.01) e em relação ao grupo apipuntura não-ponto (BV-NP, 2.49 ± 0.54 ; 5.28 ± 0.69) na primeira e segunda semana após a cirurgia ($p<0.05$) (Figura 17B).

Considerando somente o efeito da localização do ponto (E36+VG3 *versus* Não ponto) sem considerar o tipo de estímulo (Manual *versus* Veneno de abelha), a Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores grupo (E36+VG3; NP, CTL) ($F_{(2,99)}= 15,34$; $p<0,001$), tempo (Antes da lesão, 24h, 1 e 2 semanas após lesão) ($F_{(3,99)}= 608,0,2$; $p<0,001$) e interação ($F_{(6,99)}= 3,625$; $p<0,001$). A estimulação dos acupontos E36+VG3 tanto pela acupuntura manual como pela estimulação com apipuntura produziu escores BBB significativamente maiores, o que indica uma melhora da locomoção dos membros posteriores em relação à estimulação do grupo não-ponto (manual ou apipuntura) e do grupo controle sem manipulação.

Contudo, quando foi considerado somente o efeito do tipo de estímulo (Manual *versus* Veneno de abelha), a Anova de duas vias não detectou diferença significativa no fator grupo (E36+VG3, BV-E36+VG3 e CTL) ($F_{(2,99)}= 1,37$; $p=0,268$) e nem no fator interação ($F_{(6,99)}= 1,043$; $p=0,403$) mas detectou no fator tempo (Antes da lesão, 24h, 1 e 2 semanas após lesão) ($F_{(3,99)}= 411,67$; $p<0,001$) (Figura 18A), o que sugere que o tipo de estímulo não produziu efeitos diferentes na recuperação locomotora.

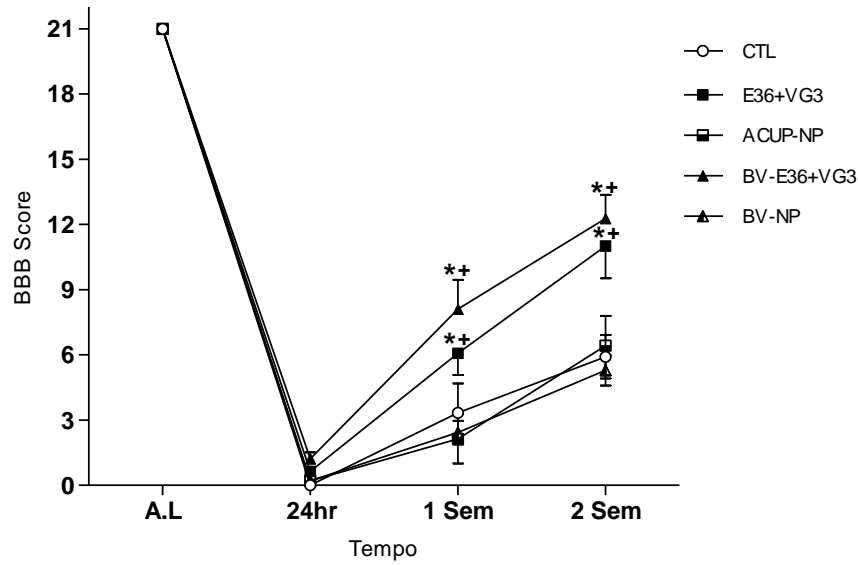


Figura 16: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos E36+VG3 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (E36+VG3, n=7), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=7), apipuntura (VB E36+VG3, n=9), apipuntura não-ponto (BV NP, n=7) e o grupo controle (CTL, n=6) que não foi submetido a tratamento. Valores são apresentados como média \pm erro padrão do escore de capacidade locomotora (BBB test). Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. * indica diferença significativa em relação ao CTL e + indica diferença significativa ao controle não-ponto.

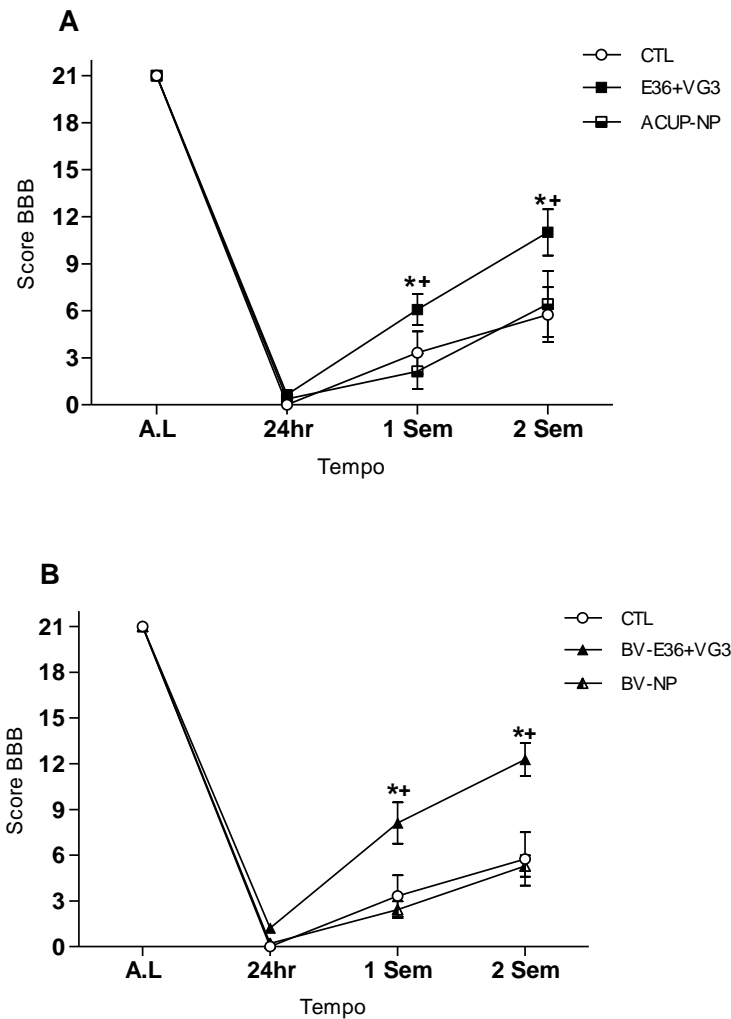


Figura 17: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos E36+VG3 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (E36+VG3, n=7), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=7), apipuntura (BV E36+VG3, n=9), apipuntura não-ponto (BV NP, n=7) e o grupo controle (CTL, n=6) que não foi submetido a tratamento. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. Em **A** (comparação entre E36+VG3, ACUP-NP e CTL), * indica diferença significativa do E36+VG3 em relação ao CTL e + indica diferença significativa do E36+VG3 em relação ao ACUP-NP. O grupo E36+VG3 obteve uma melhora locomotora significativa tanto em relação ao grupo ACUP-NP como em relação ao grupo CTL tanto na 1^o quanto na 2^o semana. Em **B** (comparação entre BV E36+VG3, BV NP e CTL) * indica diferença significativa do BV VG3+E36 em relação ao CTL e + em relação ao BV-NP. O grupo BV-E36+VG3 obteve uma melhora locomotora significativa tanto em relação ao grupo BV-NP como em relação ao grupo CTL tanto na 1^o quanto na 2^o semana.

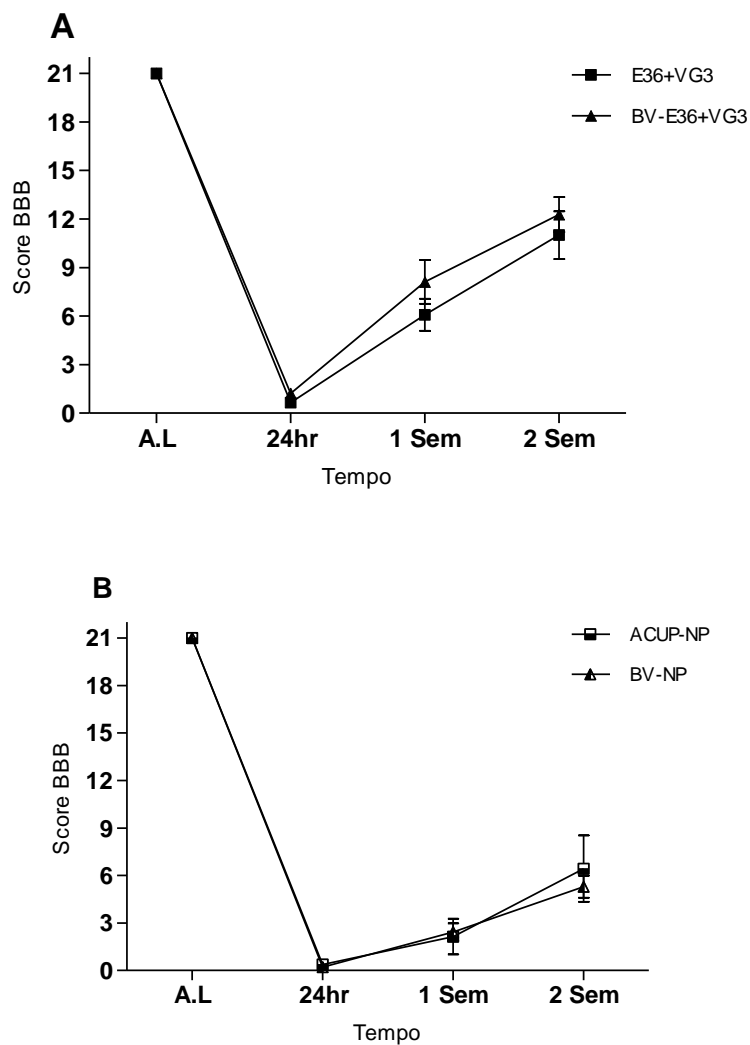


Figura 18: Efeito da acupuntura manual *versus* apipuntura (A) e da acupuntura nos pontos E36+VG3 *versus* em não-pontos (B) na capacidade locomotora de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (E36+VG3, n=7), apipuntura (BV E36+VG3, n=9). Em **A**, o teste Student-Newman-Keuls, onde $P < 0,05$, não detectou diferença significativa entre os grupos acupuntura manual e apipuntura quando foi considerado somente o efeito do tipo de estímulo, sendo assim a injeção de veneno de abelha não foi diferente da acupuntura manual. Em **B**, o teste Student-Newman-Keuls não detectou diferença entre os grupos não ponto (Manual e Veneno de abelha) e o grupo controle sem manipulação. Valores são apresentados como média \pm erro padrão.

- Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos ID3+B62 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos à lesão medular por compressão.

A Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores grupo (ID3+B62; ACUP-NP; BV-ID3+B62; BV-NP; CTL) ($F_{(4,60)}= 3,21$; $p<0,05$), tempo (Antes lesão; 24h, 1 e 2 semanas) ($F_{(3,60)}= 871,23$; $p<0,001$) e interação ($F_{(12,60)}= 2,659$; $p= <0,05$). Os animais, 24 horas após a lesão traumática, demonstraram um quadro de paraplegia e paresia, similar aos animais do grupo anterior, sendo atribuídos, aos mesmos, baixos índices de acordo com a escala BBB variando de 0-3 (Figura 19).

O teste Student-Newman-Keuls detectou que o grupo apipuntura nos pontos ID3+B62, (BV-ID3+B62, 1º semana 6.16 ± 1.54 ; 2º semana 7.58 ± 1.62) apresentou uma melhora motora significativa em relação ao grupo não-ponto (BV-NP, 1.70 ± 0.75 ; 3.30 ± 0.81) tanto na primeira quanto na segunda semana ($p<0.05$), mas não houve diferença significativa em relação ao controle sem manipulação (CTL, 4.50 ± 0.73 ; 6.87 ± 0.82) (Figura 20B). Não foram detectadas diferenças entre os demais grupos.

Estes resultados demonstraram que apesar da apipuntura nos pontos ID3+B62 ter sido estatisticamente diferente do seu controle não ponto, esta, não se diferenciou do grupo controle sem manipulação, o que indica que a acupuntura e apipuntura nesta combinação de pontos não promoveu recuperação da função locomotora nesse modelo de lesão medular.

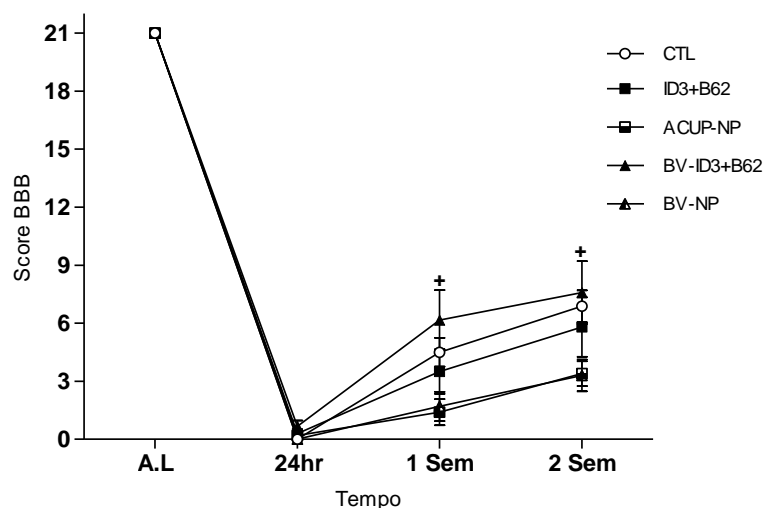


Figura 19: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos ID3+B62 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (ID3+B62, n=5), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=5), apipuntura (BV-ID3+B62, n=6), apipuntura não-ponto (BV-NP, n=5), grupo controle sem manipulação (CTL, n=4). Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. + indica diferença significativa do grupo BV-ID3+B62 em relação ao BV-NP.

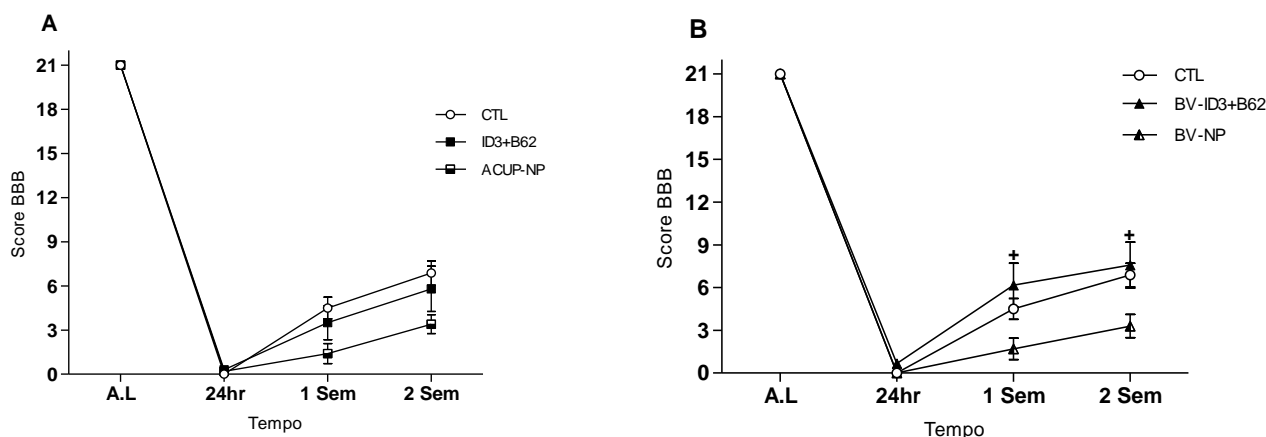


Figura 20: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos ID3+B62 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (ID3+B62, n=5), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=5), apipuntura (BV ID3+B62, n=6), apipuntura não-ponto (BV-NP, n=5), grupo controle sem manipulação (CTL, n=4). Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. Em **A**, não houve diferenças significativas na comparação os grupos ID3+B62, ACUP-NP, e CTL. Em **B**, + indica diferença significativa do grupo BV-ID3+B62 em relação ao grupo BV-NP. O grupo BV-E36+VG3 obteve uma melhora locomotora significativa em relação ao grupo BV-NP tanto na 1^o quanto na 2^o semana. O grupo BV-ID3+B62 não foi diferente do CTL.

- Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos VG3+VG9 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos à lesão medular por compressão.

A Anova de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa nos fatores grupo (VG3+VG9; ACUP-NP; BV-VG3+VG9; BV-NP; CTL) ($F_{(4,45)} = 1,431$; $p=0,272$) e interação ($F_{(12,45)} = 1,302$; $p<0,251$), mas detectou diferença significativa no fator tempo (Antes Lesão, 24 horas, 1 e 2 semana) ($F_{(3,45)} = 589,63$; $p<0,001$). Assim como ocorreu com os outros grupos, os resultados demonstraram que no primeiro dia após a lesão, os animais também apresentaram paraplegia e paresia, sendo atribuídos baixos índices na escala BBB variando de 0-3. Dessa forma, estes animais também não foram capazes de suportar o seu próprio peso pelos membros posteriores (Figura 21).

Sendo assim, os resultados sugerem que a associação dos acupontos VG3+VG9 não foi eficiente em promover uma melhora funcional da atividade locomotora dos animais submetidos à lesão medular por compressão.

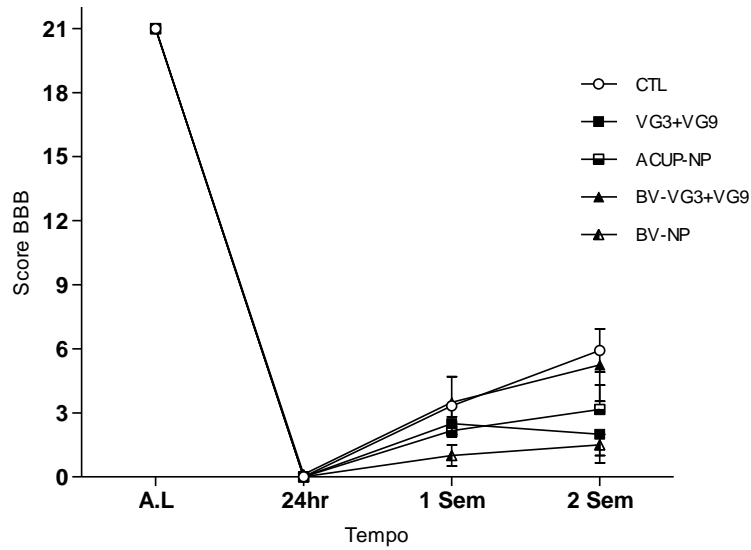


Figura 21: Efeito da acupuntura e da apipuntura nos acupontos VG3+VG9 na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (VG3+VG9, n=4), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=3), apipuntura (BV-VG3+VG9, n=4), apipuntura não-ponto (BV-NP, n=3) e o grupo controle que não teve tratamento (CTL, n=6). Valores são apresentados como média \pm erro padrão.

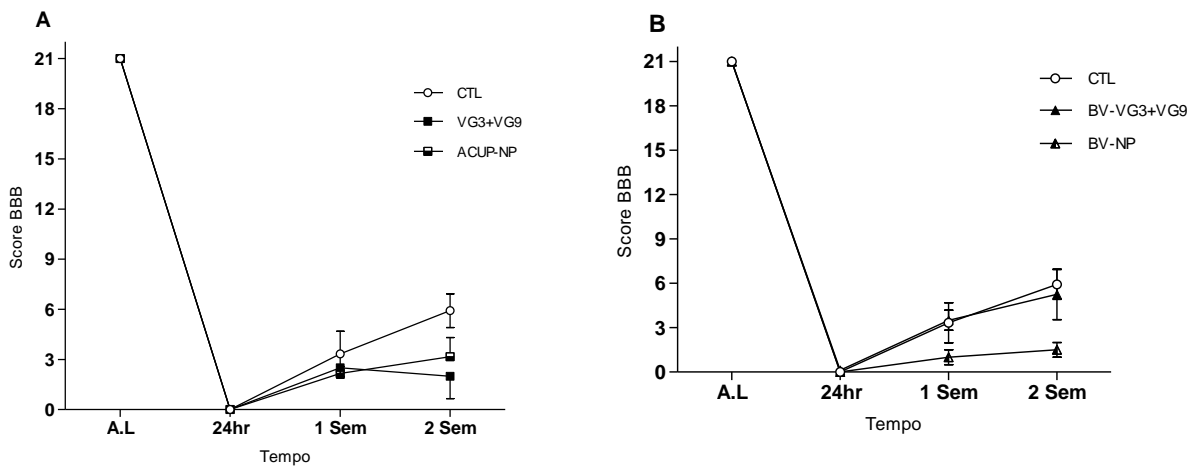


Figura 22: Avaliação de diferentes protocolos de estimulação na combinação VG3+VG9 pelo teste BBB após lesão medular de severidade intermediária (15 μ L). Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual (VG3+VG9, n=4), acupuntura manual não-ponto (ACUP-NP, n=3), apipuntura (BV-VG3+VG9, n=4), apipuntura não-ponto (BV-NP, n=3) e o grupo controle (CTL, n=6) que não teve tratamento. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Em **A**, representação gráfica da avaliação atividade locomotora (teste BBB) do tratamento com acupuntura manual no grupo VG3+VG9, ACUP-NP e o controle sem manipulação. Em **B**, representação gráfica da avaliação atividade locomotora (teste BBB) do tratamento com apipuntura no grupo BV-VG3+VG9, BV-NP e o controle sem manipulação.

- Comparação entre o efeito da acupuntura em diferentes combinações de pontos na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos à lesão medular por compressão.

A Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores grupo (E36+VG3, ID3+B62 e VG3+VG9; CTL) ($F_{(3,54)} = 4,66$; $p < 0,05$), tempo (Antes lesão; 24h, 1 e 2 semanas) ($F_{(3,54)} = 438,63$; $p < 0,001$) e interação ($F_{(9,54)} = 3,940$; $p < 0,001$). O teste Student-Newman-Keuls detectou que o grupo que recebeu o tratamento com a acupuntura manual diariamente nos pontos E36+VG3 (E36+VG3, 1ª semana 6.07 ± 0.99 ; 2ª semana 11.00 ± 1.48) apresentou uma melhora locomotora significativamente superior em relação à combinação ID3+B62 (3.50 ± 1.15 ; 5.80 ± 1.538) e em relação ao grupo VG3+VG9 ($2,50 \pm 0,61$; $2,00 \pm 1,33$) na segunda semana. O teste Student-Newman-Keuls também detectou que na 2ª semana após SCI, o grupo ID3+B62 foi significativamente superior ao grupo VG3+VG9 no teste BBB. (Figura 23).

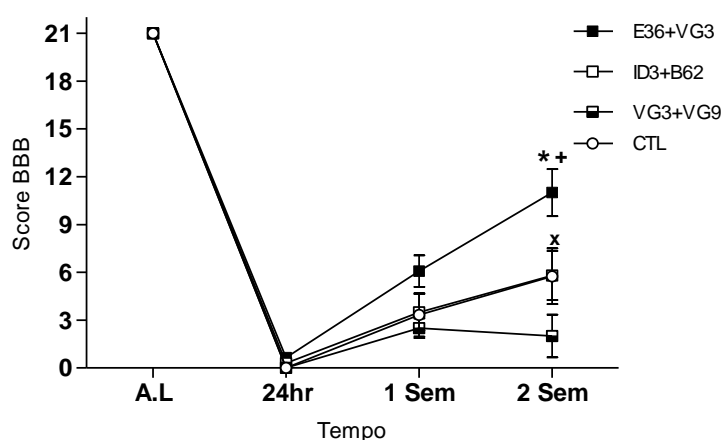


Figura 23: Comparação entre as combinações E36+VG3, ID3+B62 e VG3+VG9 com Acupuntura Manual na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos a lesão medular por compressão. Ratos Wistar foram submetidos à acupuntura manual nas combinações E36+VG3 (n=7), ID3+B62 (n=5) e VG3+VG9 (n=4) e CTL (n=6). Valores são apresentados como média \pm erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. * indica diferença significativa do grupo E36+VG3 em relação ao grupo ID3+B62. + indica diferença significativa do E36+VG3 em relação ao grupo VG3+VG9. x indica diferença significativa do ID3+B62 em relação ao VG3+VG9. O Teste Student-Newman-Keuls detectou diferença significativa na melhora da função locomotora da combinação E36+VG3 em relação às demais combinações na 2ª semana.

- Comparação entre o efeito da Apipuntura em diferentes combinações de pontos na capacidade locomotora (teste BBB) de ratos submetidos à lesão medular por compressão.

A Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores grupo (BV-E36+VG3, BV-ID3+B62 e BV-VG3+VG9; CTL) ($F_{(3,63)} = 4,72$; $p < 0,05$), tempo (Antes lesão; 24h, 1 e 2 semanas) ($F_{(3,63)} = 392,01$; $p < 0,001$) e interação ($F_{(9,63)} = 3,50$; $p < 0,001$). O teste Student-Newman-Keuls detectou que diferença significativa do grupo BV-E36+VG3 (12.27 ± 1.08) em relação ao grupo BV-ID3+B62 (7.58 ± 1.62) na segunda semana após SCI. No entanto o grupo BV-E36+VG3 (8.11 ± 1.35 ; 12.27 ± 1.08) mostrou significativa melhora da atividade locomotora em relação ao grupo BV-VG3+VG9 (3.05 ± 0.67 ; 5.25 ± 1.70) tanto na primeira como na

segunda semana. O teste Student-Newman-Keuls também detectou que na 1^o semana, o grupo ID3+62 foi significativamente superior ao grupo VG3+VG9, mas essa diferença não se manteve até a segunda semana. Desta forma, o grupo BV-E36+VG3 se mostrou mais eficiente em promover uma melhora da atividade locomotora em relação às demais combinações ao final das duas semanas de tratamento (Figura 24).

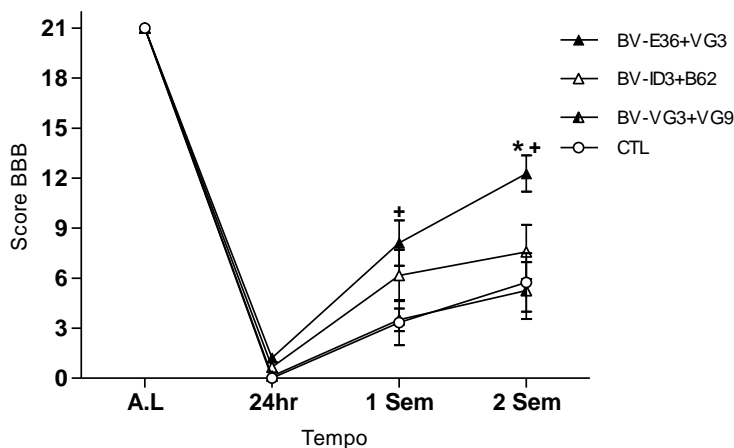


Figura 24: Comparação entre as combinações BV-E36+VG3, BV-ID3+B62 e BV-VG3+VG9 com Apipuntura após lesão medular de severidade intermediária (15µL) pelo teste BBB. Ratos Wistar foram submetidos à apipuntura nas combinações BV-E36+VG3 (n=7), BV-ID3+B62 (n=6) e BV-VG3+VG9 (n=4) e CTL (n=6). Valores são apresentados como média ± erro padrão. Teste Student-Newman-Keuls, P<0,05. * indica diferença significativa do grupo BV-E36+VG3 em relação ao grupo BV-ID3+B62. † indica diferença significativa do BV-E36+VG3 em relação ao grupo BV-VG3+VG9. x indica diferença significativa do BV-ID3+B62 em relação ao BV-VG3+VG9. O Teste Student-Newman-Keuls detectou diferença significativa superior na melhora locomotora da combinação BV-E36+VG3 em relação às demais combinações na 2^o semana.

5.2. Experimento 2: Efeito da acupuntura manual ou apipuntura nos acupontos E36+VG3 na severidade do trauma medular resultados preliminares.

Infelizmente tivemos problemas na execução dos cortes e, com isso, poucos animais puderam ser cortados. Desta forma, a análise de normalidade pelo teste Komolgorov-Smirnov, os grupos (E36+VG3, ACUP-NP, BV-E36+VG3, BV-NP, CTL e sham) não apresentaram distribuição normal, desta forma, realizamos o teste de Kruskal-Wallis que não detectou diferença significativa entre os grupos (K= 5,777; P = 0,329).

Para identificar a existência de uma relação entre a severidade da lesão e a melhora da atividade locomotora foi realizada uma regressão linear simples, onde, os resultados demonstraram uma correlação positiva dos dados ($r^2 = 0,95$; P < 0,001, admitindo-se um intervalo de confiança de 95%). Os resultados demonstraram que quanto maior o score da severidade do trauma (variando de 0-6, 0-ausência de lesão; 6-ampla área de infarto) menor a pontuação na escala BBB (variando de 0-21, 0-nenhum movimento dos membros posteriores e 21- locomoção normal), ou seja, quanto maior foi o dano ao tecido medular menor foi a capacidade locomotora do animal (Figura 25).

Tabela 3: Escore de severidade do trauma e escore de capacidade locomotora de animais submetidos a lesão medular por compressão.

Grupo	Escore de Lesão	Escore BBB
Sham	0	21
CTL	5,98	3
CTL	6	1
E36+VG3	4,78	10
Acup-NP	4,49	7,5
Acup-NP	6	2
BV-E36+VG3	1,03	18
BV-NP	4,1	8

Dessa forma, os animais controle, que não receberam nenhum tipo de tratamento, (análise histopatológica, CTL média=5.98) apresentaram uma atividade locomotora deficiente (teste BBB, CTL=3) em relação aos animais tratados com apipuntura nos pontos E36-VG3. Estes animais que receberam o tratamento com apipuntura apresentaram ao final de duas semanas um dano tecidual menor (análise histopatológica, BV-E36+VG3 média=1,03) e uma melhora na atividade locomotora (teste BBB, BV-E36+VG3=17).

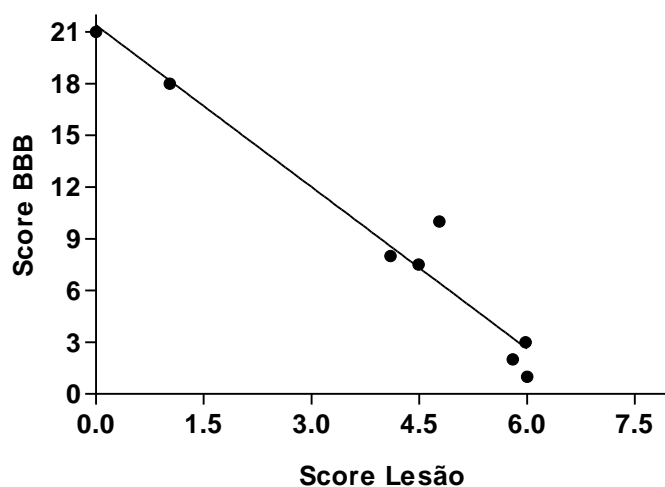


Figura 25: Severidade do trauma *versus* Atividade Locomotora. Gráfico de regressão linear simples demonstrando que existe **uma correlação** positiva entre a severidade do trauma e a atividade locomotora ($r^2 = 0,95$; $P < 0.0001$, admitindo-se um intervalo de confiança de 95%). A reta indica que quanto menor a severidade do trauma maior é o escore BBB, dessa forma, quanto menor o dano ao tecido medular, melhor foi a atividade locomotora do animal.

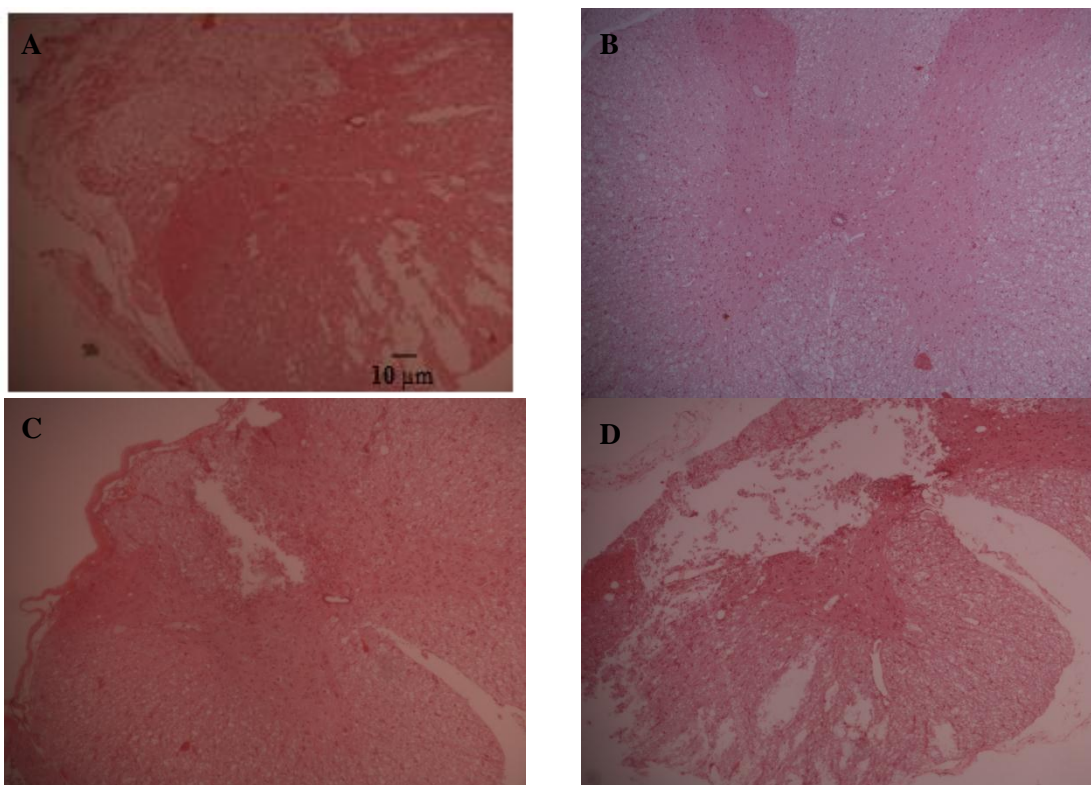


Figura 26: Cortes histológicas da Medula Espinal. Os cortes foram corados com Eosina-Hematoxilina. Em A, corte representativo do sítio da lesão de um animal do grupo CTL; Em B, corte representativo do grupo Sham; Em C, corte representativo do sítio da lesão de um animal do grupo BV-E36+VG3; Em D, corte representativo do sítio da lesão de um animal do grupo BV-NP. Em A, C e D é possível ver as cavitações pós-lesão. Barra de calibração de 10 µm.

5.3. Experimento 3: Efeito da apipuntura dos acupontos E36+VG3 no perfil de expressão de citocinas pro (IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) na medula espinal de ratos submetidos a lesão medular por compressão.

Nós optamos por continuar a investigação com a estimulação pelo veneno de abelha na combinação dos pontos E36+VG3 (BV- E36+VG3), uma vez que, nossos resultados comportamentais revelaram que a combinação E36+VG3 foi mais eficiente na recuperação da função locomotora em relação às demais combinações. Além disso, como não houve diferença significativa entre os tratamentos com acupuntura manual e o veneno de abelha, devido a maior facilidade de procedimento, nós escolhemos a estimulação dos pontos pelo veneno de abelha (Figura 18A).

- Concentração de IL-1 β na medula espinal após a SCI.

Na análise de normalidade pelo teste Komolgorov-Smirnov, os grupos (BV-E36+VG3, BV-NP, CTL e sham) não apresentaram distribuição normal, desta forma, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para cada tempo que detectou diferença nos tempos 1 hora (K= 8,231; p=0,041), 6 horas (K= 10,394; p= 0,015) e 24 horas (K= 8,474; p= 0,037). O teste Dunn's detectou diferença significativa na expressão de IL-1 β na medula espinal do grupo controle sem manipulação (CTL) em relação ao grupo sham em todos os tempos (1, 6 e 24 horas), onde, grupo CTL demonstrou um significativo aumento na expressão de IL-1 β em relação ao grupo sham após o tratamento com apipuntura. O teste Dunn's não detectou diferença dos grupos BV-E36+VG3 e BV-NP

em relação ao grupo sham e nem em relação ao CTL em nenhum dos tempos (1, 6 e 24 horas) ($p < 0,05$) após o tratamento com apipuntura.

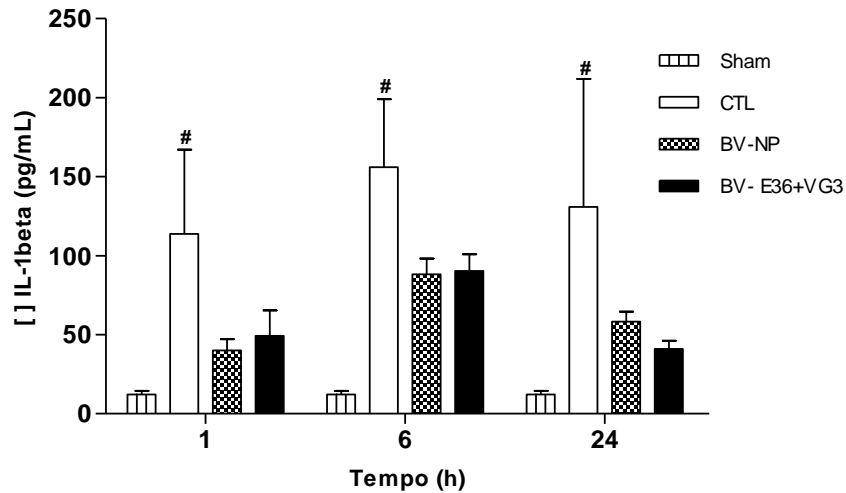


Figura 27: Concentração de IL-1 β na medula espinal após a SCI. Comparação da expressão de IL-1 β liberada no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão às 1, 6 e 24 horas após o tratamento com apipuntura no ponto (BV-E36+VG3, n=4), apipuntura não ponto (BV-NP, n=4), animais controle sem manipulação (CTL, n=3) e sham. As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão. As concentrações da citocina são expressas em pg/mL. # indica diferença significativa do grupo CTL em relação ao grupo sham (n=3).

- Concentração de IL-6 na medula espinal após a SCI.

A Anova univariada detectou diferença entre os grupos (BV-E36+VG3, BV-NP, CTL e sham) para todos os tempos estudados (1 hora - $F_{(3,8)} = 4,276$; $P = 0,045$, 6 horas - $F_{(3,9)} = 8,245$; $P = 0,006$ e 24 horas - $F_{(3,8)} = 18,291$; $P < 0,001$). O teste Student-Newman-Keuls detectou diferença significativa dos grupos BV-E36+VG3, BV-NP e CTL em relação ao grupo Sham, onde, estes grupos apresentaram um aumento da expressão de IL-6 no tempo de 1 e 6 horas. Vinte quatro horas após a SCI, o teste Student-Newman-Keuls continuou detectando diferença significativa dos grupos BV-NP e CTL em relação ao grupo Sham, mas não detectou diferença do grupo BV-E36+VG3 em relação ao sham. O grupo BV-E36+VG3 foi significativamente menor que os grupos BV-NP e CTL 24 horas após o tratamento com apipuntura.

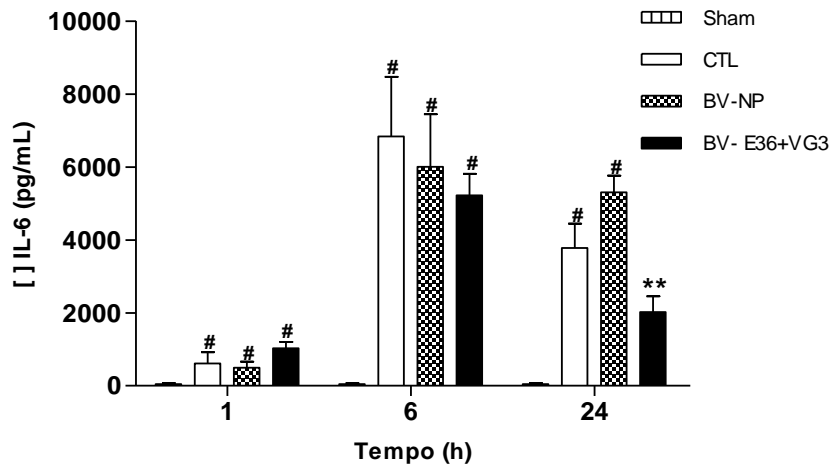


Figura 28: Concentração de IL-6 na medula espinal após a SCI. Comparação da expressão de IL-6 liberada no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão às 1, 6 e 24 horas após o tratamento com apipuntura no ponto (BV-E36+VG3, n= 4), apipuntura não ponto (BV-NP, n=3), animais controle sem manipulação (CTL, n=3) e sham (n=3). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão. As concentrações da citocina são expressas em pg/mL. # indica diferença significativa em relação ao grupo sham e ** indica diferença significativa do grupo BV-E36+VG3 em relação ao BV-NP e CTL.

- Concentração de IL-4 na medula espinal após a SCI.

Anova univariada detectou diferença significativa entre os grupos (BV-E36+VG3, BV-NP, CTL e sham) ($F_{(3,9)} = 3,886$; $P = 0,049$) 6 horas após o tratamento com apipuntura, no entanto o teste Student-Newman-Keuls não detectou diferença significativa entre os grupos BV-E36+VG3, BV-NP, CTL e sham. A Anova univariada não detectou diferença significativa entre os grupos no tempo de 1 ($F_{(3,8)} = 3,332$; $P = 0,077$) e 24 horas ($F_{(3,9)} = 1,182$; $P = 0,370$).

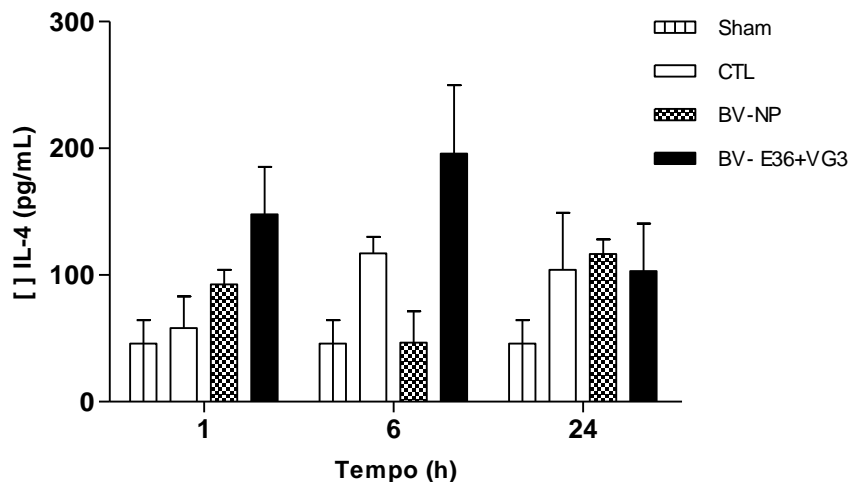


Figura 29: Concentração de IL-4 na medula espinal após a SCI. Comparação da expressão de IL-4 liberada no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão às 1, 6 e 24 horas após o tratamento com apipuntura no ponto (BV-E36+VG3, n=4), apipuntura não ponto (BV-NP, n=4), animais controle sem manipulação (CTL, n=3) e sham (n=3). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão. As concentrações da citocina são expressas em pg/mL.

- Concentração de IL-10 na medula espinal após a SCI.

A Anova univariada detectou diferença entre os grupos (BV-E36+VG3, BV-NP, CTL e sham) para todos os tempos estudados (1 hora - $F_{(3,8)} = 8,706$; $P = 0,007$, 6 horas - $F_{(3,10)} = 13,150$; $P < 0,001$ e 24 horas - $F_{(3,9)} = 7,599$; $P = 0,008$) ($p < 0,05$). O teste Student-Newman-Keuls detectou diferença significativa dos grupos BV-E36+VG3, BV-NP, CTL em relação ao grupo sham, onde ocorreu um aumento significativamente maior da expressão de IL-10 na medula espinal dos grupos operados em relação ao sham em todos os tempos (1, 6 e 24 horas). O teste Student-Newman-Keuls detectou que o grupo BV-E36+VG3 apresentou um aumento significativo da expressão de IL-10 em relação ao BV-NP e o CTL 6 horas após o tratamento.

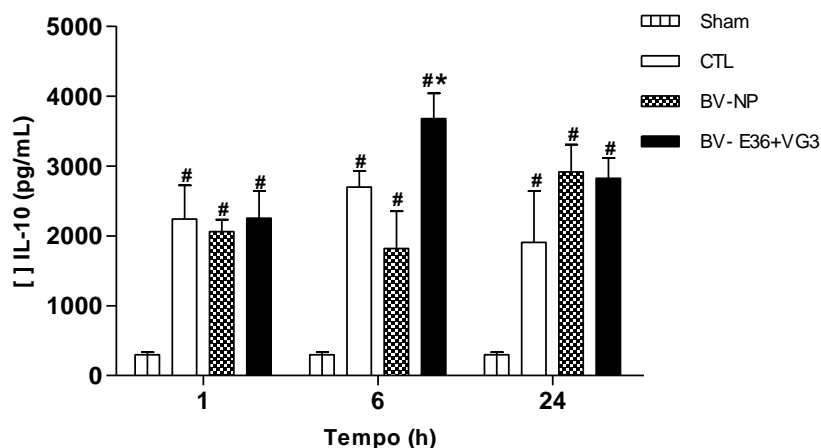


Figura 30: Concentração de IL-10 na medula espinal após a SCI. Comparação da expressão de IL-10 liberada no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão às 1, 6 e 24 horas após o tratamento com apipuntura no ponto (BV-E36+VG3), apipuntura não ponto (BV-NP), animais controle sem manipulação (CTL) e Sham. As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão. As concentrações da citocina são expressas em pg/mL. # indica diferença significativa em relação ao grupo sham, * indica diferença significativa do grupo BV-E36+VG3 em relação ao grupo BV-NP e CTL.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo evidenciaram que o tratamento com acupuntura manual e a apipuntura, na combinação dos pontos E36+VG3, promoveu uma melhora significativa da capacidade locomotora no modelo de lesão medular por compressão moderada em ratos. Além disso, estes resultados suscitam que esta melhora na capacidade locomotora dos animais tratados com apipuntura pode ser atribuída à redução do processo inflamatório através da modulação de citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatória.

6.1. Modelo de lesão medular por compressão

Na maioria das vezes as lesões medulares em humanos são irreversíveis e ainda não existe uma terapia eficiente que seja capaz de reverter integralmente ou amenizar o sofrimento destas vítimas (TATOR & FEHLINGS 1991; KWON *et al.*, 2002; KWON *et al.*, 2004, HAGG & OUDEGA 2006, ESPOSITO *et al.*, 2011a). O insulto primário que ocasiona o dano primário pode ser irreversível, trata-se de uma fatalidade que não pode ser prevista nem evitada (OYINBO, 2011). O mecanismo deste dano primário, geralmente é ocasionado por uma compressão da medula espinal devido ao deslocamento dos ossos e dos discos intervertebrais durante a fratura da coluna vertebral, ocasionando em sua forma mais severa uma paralisia permanente (KWON *et al.*, 2004).

Muitos modelos experimentais de SCI foram desenvolvidos a fim de imitar os eventos mecânicos que ocasionam as várias formas de SCI em humanos, estes devem gerar confiabilidade e reprodutibilidade às experiências para propiciar ao pesquisador a possibilidade de reproduzir os mesmos resultados diversas vezes (BEHRMANN *et al.*, 1992; VANICKÝ *et al.*, 2001). As técnicas de lesão medular experimental por contusão e por compressão são as que mais se aproximam da realidade aos acidentes que ocorrem com humanos, sendo muito rara a ocorrência de transecção completa da medula (KWON *et al.*, 2004).

Atualmente, o modelo mais usado é o de contusão por queda de peso que consiste em soltar um peso através de um tubo a uma distância fixa, controlado por um sistema computadorizado, sobre a medula exposta ocorrendo assim uma instantânea deformação mecânica. Outro modelo usado nas pesquisas de SCI é o modelo de compressão. Neste modelo, a lesão é induzida pela técnica de compressão progressiva por força dos materiais e métodos utilizados que podem ser pressão com balonete inflável, cliques de aneurisma, entre outros. Dessa forma, este modelo tem o objetivo, assim como o modelo de contusão, replicar a persistência de uma compressão na medula, que é comumente observado em acidentes que ocorrem com humanos que promovem a lesão medular (GENOVESE *et al.*, 2007).

Neste trabalho, o modelo de SCI utilizado foi o modelo de lesão por compressão em ratos através da inflação de um balão que foi previamente padronizado por Vanický e colaboradores (VANICKÝ *et al.* 2001). Este modelo é útil para o estudo de diferentes aspectos das consequências pós-traumáticas, pois com este modelo é possível observar o desenvolvimento de danos secundários devido a permanência da força compressiva (JENDELOVÁ *et al.*, 2004; SEDÝ *et al.*, 2007; URDZÍKOVÁ *et al.*, 2006) e principalmente porque o animal apresenta uma recuperação gradual se adequando perfeitamente a investigação terapêutica proposta neste trabalho.

Uma correlação altamente positiva dos escores da severidade do trauma e do escore BBB foi observada no presente estudo. Dessa forma, assim como outros autores, esses resultados indicam uma confiabilidade do modelo. Nós também podemos observar

que este modelo apresentam vantagens como o desenvolvimento gradual da lesão, reprodutividade, baixo custo, além de ser uma técnica de fácil execução.

6.2. Especificidade dos acupontos na recuperação locomotora

Neste estudo, primeiramente, nós testamos e selecionamos, qual das três combinações propostas seria a mais eficiente na recuperação neurológica após a lesão medular por compressão. Assim, nós identificamos que a combinação dos acupontos E36+VG3 se mostrou mais eficiente na recuperação locomotora após a lesão medular por compressão em comparação as outras duas combinações. Os animais submetidos ao tratamento tanto com o agulhamento seco como com a estimulação pelo veneno de abelha apresentaram escores maiores na escala BBB o que significa que os animais tiveram uma recuperação da função locomotora superior aos controles. As combinações dos acupontos ID3+B62 e VG3+VG9 não apresentaram efeito na recuperação funcional, além disso, quando comparamos os escores de capacidade locomotora das combinações observamos que E36+VG3 foi superior ao ID3+B62 e VG3+VG9, na segunda semana após o início do tratamento.

Apesar da seleção destas combinações terem sido baseadas na indicação da MTC para tratar lesões medulares, não existem relatos na literatura científica da combinação entre esses dois acupontos no tratamento de lesão medular experimental, sendo, portanto, demonstrado neste trabalho pela primeira vez. Choi e colaboradores (2010) selecionaram a associação dos pontos GV26 e GB34 como sendo os acupontos que exercem um maior efeito neuroprotetor no modelo de lesão medular moderada por contusão através da técnica histológica de contagem de neurônios motores ventrais viáveis (CHOI *et al.*, 2010). No entanto, não é possível garantir completamente que os neurônios motores sobreviventes possam estar funcionais no tecido (KNOW *et al.*, 2002). Sendo assim, o nosso grupo optou por fazer a seleção da melhor combinação dos acupontos através do teste comportamental.

A acupuntura se baseia numa técnica milenar onde agulhas são inseridas em pontos específicos do corpo (ZHANG, 2008). Dessa forma, na acupuntura a especificidade dos pontos e a reprodutibilidade da localização dos pontos são pré-requisitos fundamentais para pesquisas que envolvem a estimulação pela acupuntura (YIN *et al.*, 2008). Neste sentido, nossos resultados contribuem de forma positiva para confirmar a existência de uma importante especificidade do efeito.

Outro grande desafio nas pesquisas que envolvem a acupuntura é a determinação de um controle negativo que seja realmente fidedigno. Sendo assim, nós escolhemos como controle negativo qualquer parte do corpo (quando possível no mesmo dermatomo que os pontos) que segundo a MTC não fosse um ponto de acupuntura. Vale ressaltar que devido ao grande número de pontos, achar um a região que não seja ponto de acupuntura se trata de uma tarefa difícil principalmente em roedores. No entanto, a proposta do nosso estudo foi comparar o efeito de uma estimulação sensorial (seja BV ou agulhas) numa combinação de pontos específicos com a estimulação de outras regiões (mesmo que eventualmente estejamos estimulando pontos de acupuntura de outros meridianos).

Os nossos resultados demonstraram que a combinação dos pontos ID3+B62, apesar de serem pontos utilizados clinicamente para o tratamento de dores na coluna, não foi eficiente em promover a recuperação locomotora neste modelo experimental. Wong e colaboradores (2003) promoveram um estudo em 100 pacientes com lesão medular aguda, sendo estes divididos em controle tratado e não tratado, e observaram que os pacientes submetidos ao tratamento com a eletroacupuntura nos acupontos ID3 e B62 em associação com auriculoterapia iniciado no primeiro dia após a lesão

apresentaram uma melhor recuperação neurológica e funcional em relação aos pacientes não tratados (WONG *et al.*, 2003). Apesar, dos nossos resultados terem apresentado uma tendência positiva nesta combinação quando a estimulação foi realizada pelo veneno de abelha em relação à acupuntura manual, essa combinação ainda não se mostrou tão eficiente quanto à combinação do E36+VG3. Esta discrepância pode ser relacionada à diferenças entre ratos e humanos que podem apresentar características e indicações dos pontos acupuntura distintos. Apesar de existir uma tendência a transposição completa da localização e dos efeitos dos pontos de humanos para ratos esta relação não pode ser garantida para todos os pontos de acupuntura.

Pela MTC, em lesões na medula espinal os danos são decorrentes do comprometimento do meridiano do Vaso Governador. Clinicamente, pontos deste meridiano são muito utilizados para o tratamento de traumas medulares (YAN *et al.*, 2011). No entanto, não existem relatos na literatura do efeito combinação dos acupontos VG3+VG9 na lesão medular experimental (YANG *et al.*, 2011; DING *et al.*, 2009). Recentemente, a eletroacupuntura no VG9 em combinação com outros pontos do Vaso Governador, como o GV6 (Jizhong), GV2 (Yaoshu) e GV1 (Changqiang) demonstrou ser eficiente na melhora funcional dos membros paralizados em associação com a utilização de células tronco mesenquimais no modelo de transecção completa da medula espinal (YAN, *et al.*, 2011). Os nossos dados revelaram um resultado inesperado com a associação dos acupontos VG3+VG9, onde, esta combinação não demonstrou ter efeito sobre a recuperação da capacidade locomotora neste modelo de lesão medular por compressão. Talvez essa combinação não tenha sido eficiente no nosso experimento pelo fato do VG9 ficar localizado próximo ao local onde é realizada a cirurgia de SCI dentro da área hipersensibilizada pelo processo cirurgico. Este resultado também pode estar associado apenas ao ponto VG9, já que os resultados demonstraram que a combinação do VG3 com o E36 se mostrou ser a combinação mais eficiente em promover a melhora motora dentre as demais combinações testadas. No entanto vale ressaltar que o como não foi realizado o estudo dos pontos sozinhos não podemos garantir se o efeito é devido ao estímulo de um ponto específico ou da combinação de pontos.

O ponto Zusanli (E36) é um acuponto muito utilizado na prática clínica na acupuntura e atualmente é o acuponto mais estudado em estudos experimentais (YIN *et al.*, 2008). Além de proporcionar uma comprovada melhora neurológica funcional em modelos de doenças neurodegenerativas, a estimulação do ponto Zusanli (E36) foi capaz de aumentar a proliferação celular no giro denteado (KIM *et al.*, 2001), diminuir a expressão de c-Fos e a apoptose no CA1 de gerbils após isquemia causada por oclusão das carótidas (JANG *et al.*, 2003). A acupuntura no ponto Zusanli também pode aumentar a proliferação celular no giro denteado e a expressão de Neuropeptídeo Y em animais com diabetes induzida por estreptozotocina (KIM *et al.*, 2002). A eletroacupuntura no ponto Zusanli aumentou a expressão de fatores neurotróficos no hipocampo de ratos submetidos ao estresse de imobilização (YUN *et al.*, 2002).

Quando levamos em consideração a melhora funcional em testes comportamentais, existe um conjunto de evidências na literatura que corroboram com os nossos resultados. Estudos demonstram o benefício da acupuntura em promover uma melhora na recuperação funcional e neurológica, assim como a especificidade dos pontos, em modelos de doenças neurodegenerativas como ALS e doença de Parkinson (YANG *et al.*, 2010, KIM *et al.*, 2011). A estimulação elétrica ou estimulação química tanto pelo veneno de abelha como pela melitina no acuponto Zusanli (E36) foram capazes de produzir uma melhora significativa da atividade motora em camundongos avaliados pelo teste de performance Rota-rod em relação aos seus controles no modelo

de ALS (YANG *et al* 2010; YANG *et al* 2010a; YANG *et al* 2011). No modelo de doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA, também se verificou uma melhora no teste comportamental rotacional induzido pela apomorfina, onde animais tratados com acupuntura no ponto E36 apresentaram um melhor desempenho de assimetria no teste rotacional. Este melhor desempenho estaria associado há uma redução da perda de neurônios dopaminérgicos na *Substancia nigra* e no Estriato demonstrada pela imunomarcção da tirosina-hidroxilase em relação aos animais controle não-ponto (KIM *et al.*, 2005). Em estudos clínicos com pacientes após acidente vascular cerebral (AVC), a EA também eficiente na melhora funcional motora (ALEXANDER *et al.*, 2004). Chae e colaboradores (2009) através de estudos realizados com ressonância magnética puderam constatar que o tratamento com acupontos específicos poderiam melhorar a função motora em pacientes com doença de Parkinson (CHAE *et al.*, 2009).

6.3. Tipo de Estimulação dos acupontos

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença entre a utilização da acupuntura manual e a apipuntura como formas de estimular os acupontos. Dessa forma, os dois métodos de estimulação dos acupontos se mostraram eficiente em promover a recuperação da capacidade locomotora após a lesão medular por compressão. O nosso grupo foi o primeiro grupo que comparou o efeito da acupuntura manual com a estimulação química pelo veneno de abelha na lesão medular experimental.

Kim e colaboradores (2000) realizaram a comparação do efeito do tratamento somente com a eletroacupuntura e associada com a acupuntura manual e demonstraram que a combinação das duas formas de estimulação promove um resultado terapêutico mais eficiente do que as duas formas aplicadas de forma isolada. Apesar de não investigarmos associação da aplicação da apipuntura com a acupuntura manual, nós também acreditamos que associação das duas formas também possa promover um resultado terapêutico mais eficiente, visto que a associação de técnicas é comum na prática clínica (KIM *et al.*, 2000).

Devemos ressaltar que apesar do reconhecimento da importância da eletroacupuntura e da acupuntura como método de estimulação em estudos experimentais, devemos considerar que, em ratos, estes tipos de estimulação, invariavelmente geram estresse. Estes métodos envolvem a permanência das agulhas por determinado tempo, geralmente 20 minutos, o que exige a imobilização dos animais. A dissociação dos efeitos do estresse de imobilização e da acupuntura é uma limitação do uso destas técnicas em ratos (MEDEIROS, 2001).

Um método que vem sendo bastante explorado e em alguns casos podendo até substituir a eletroacupuntura ou até mesmo a acupuntura manual é a injeção de substâncias químicas em acupontos. Neste caso a substância tem o papel apenas de causar uma “irritação” local e conseqüentemente estimular acupontos. Na experimentação animal, o veneno de abelha (BV, do inglês bee venom) é a substância mais utilizada para estimulação química de pontos de acupuntura. A principal hipótese sobre o efeito da apipuntura é que o BV nos pontos intensifica seus próprios efeitos o que auxilia ainda mais na melhora clínica (SON *et al.*, 2007).

A especificidade do efeito do sitio de aplicação foi verificada através de estudos comparativos onde a estimulação com BV nos acupontos foi comparada a estimulação de não-pontos em modelos animais de artrite (KWON *et al.*, 2001a; KWON *et al.*, 2001c; KIM *et al.*, 2003; KWON *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; KWON *et al.*, 2005). Estes estudos demonstraram que o BV no acuponto que é responsável por promover a eficiência terapêutica e não somente o veneno de abelha. Nossos resultados também demonstraram que BV no acuponto é o responsável por promover a recuperação da

atividade locomotora, uma vez que, o BV no não-ponto não teve efeito e não diferiu dos animais controle sem manipulação.

O nosso grupo utilizou o BV nos acupontos com o intuito apenas de ocasionar uma irritação local dos acupontos. Para determinar se o efeito benéfico foi promovido pelo BV *per se* ou pela estimulação específica do ponto, nós injetamos no grupo controle da apipuntura um volume igual do veneno de abelha diluído em regiões não-ponto. Alguns estudos, além de utilizarem doses maiores de BV, utilizam como controle a injeção de salina no ponto de acupuntura (YANG *et al.*, 2010a). Vale ressaltar que o BV possui propriedades inflamatórias e anti-inflamatórias e o seu efeito já é reconhecido no tratamento de várias doenças. Desta forma, o uso de doses “altas” de BV pode produzir efeitos sistêmicos e assim não podemos determinar se o efeito é promovido pela estimulação de acupontos ou pela injeção subcutânea do BV. No nosso trabalho nós utilizamos uma dose considerada baixa (0,08 mg/kg) que foi proposta por Kim e Colaboradores (2005) no estudo do mecanismo antinociceptivo promovido pelo veneno de abelha. No entanto, muitos estudos utilizam doses de BV de aproximadamente 0,25-0,6 mg/kg diluídos em 20 µL de salina (KIM *et al.*, 2011, BAEK *et al.*, 2006, YOON *et al.*, 2005).

Em virtude das questões já discutidas acima e pelo fato da apipuntura não ter apresentado resultados diferentes da estimulação manual, o nosso grupo optou pela utilização da apipuntura na combinação dos acupontos E36+VG3 para investigar os mecanismos que poderiam estar envolvidos na melhora da função locomotora.

6.4. Efeito anti-inflamatório da acupuntura

Através da dosagem de citocinas foi possível constatar que apipuntura na combinação dos pontos E36+VG3 promoveu um aumento da expressão de IL-10 nas primeiras 6 horas após o tratamento e uma redução de IL-6 24 horas após o tratamento. Nossos dados revelaram que o tratamento com a apipuntura não exerceu efeito sobre a expressão das citocinas IL-1β e IL-4.

A IL-10 é uma das principais citocinas anti-inflamatória e seus receptores estão presentes em vários tipos celulares do sistema nervoso, inclusive em microglias e neurônios. A IL-10 atua inibindo a síntese de citocinas pro-inflamatórias como a IL-1β, IL-6 e TNF-α (MOORE *et al.*, 2001; LOANE & BYRNES, 2010). Outras citocinas anti-inflamatórias como a IL-1ra, IL-4 e TGF-β também são capazes de suprimir a produção de citocinas proinflamatórias e esse mecanismo de ação é um efeito crítico para o conceito de equilíbrio entre citocinas pro e anti-inflamatorias (RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012). A desregulação no balanço, com altos níveis de citocina proinflamatória e baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias pode levar a uma ação sinérgica de retroalimentação destas citocinas pro-inflamatórias. Este processo pode induzir a amplificação da ativação do ciclo celular promovendo ainda mais a citotoxicidade e os processos neurodegenerativos (RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012; LOANE & BYRNES, 2010). A IL-10 também atua por *feedback* negativo inibindo a ativação de microglias e macrófagos diminuindo assim a expressão de moléculas associadas com apresentação de antígenos, diminuindo também expressão de citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio.

Estudos *in vitro* demonstraram que a IL-10 também pode atuar diretamente em neurônios motores da medula espinal e ativar uma via de transcrição de genes através do NF-κB promovendo aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl₂ e Bcl_x. Além disso, a IL-10 promoveu o bloqueio da liberação de citocromo c e a clivagem de caspases após a exposição ao glutamato, o que conseqüentemente, reduziu a apoptose destes neurônios. Em estudos, *in vivo*, revelaram que o tratamento com um

vector expressando IL-10 promoveu um aumento significativo da sobrevivência de neurônios motores, o que conseqüentemente, propiciou uma melhora na atividade locomotora após a lesão medular. Este mesmo estudo também demonstrou que ocorreu um bloqueio do desenvolvimento de uma cascata apoptótica caracterizada pela liberação do citocromo c pelas mitocôndrias e clivagem da caspase 3 (ZHOU et al., 2009; ZHOU et al., 2008). Dessa forma, além de atuar em células que participam da resposta inflamatória a IL-10 também pode atuar diretamente em neurônios reduzindo a sua morte após a lesão medular ou a exposição ao glutamato que é tóxico.

A IL-6 apesar de apresentar efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na lesão medular ela parece exercer efeitos proinflamatórios estando associada ao desenvolvimento dos danos secundários (NAKAMURA *et al.*, 2003). Lacroix e colaboradores (2002) demonstraram que no modelo de lesão medular o aumento da expressão de IL-6 resultou e um aumento, de aproximadamente, seis vezes maior na infiltração de neutrófilos e em um aumento duas vezes maior na ativação de microglias e macrófagos. A associação de todos estes fatores contribuiu para um decréscimo no crescimento axonal no local da lesão na fase aguda (LACROIX *et al.*, 2002). O bloqueio temporal da sinalização de IL-6 após SCI pode prevenir o processo inflamatório e promover recuperação funcional através da ativação de uma via alternativa de macrófagos, denominados macrófagos M2 (GUERRERO *et al.*, 2012).

Dessa forma, no nosso estudo, a apipuntura promoveu um aumento da expressão de IL-10 que pode ter atuado em outras células inflamatórias reduzindo a produção de citocinas pro-inflamatórias como a IL-6 (LOANE & BYRNES, 2010) como também pode ter atuado diretamente nos neurônios motores do corno ventral reduzindo a sua morte (ZHOU et al., 2009). Neste sentido, nossos resultados também podem indicar que o aumento inicial de IL-10 promovido pela apipuntura nos ponto E36+VG3 nas primeiras 6 horas pode ter induzido um bloqueio temporal de IL-6. Neste contexto, o aumento de IL-10 associado à redução de IL-6 podem ter contribuído fortemente para recuperação parcial da função locomotora induzida pela apipuntura no nosso estudo.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre o efeito da acupuntura ou apipuntura promovendo aumento da liberação de citocina anti-inflamatória neste modelo de lesão medular. No entanto, alguns estudos demonstraram a acupuntura foi capaz de reduzir a expressão de citocinas pro-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 em vários modelos de doenças degenerativas, inclusive no modelo de lesão medular (CHOI *et al* 2010; KANG *et al* 2007; YANG *et al* 2010). Em outros modelos de inflamação fora do SNC a acupuntura tem demonstrado influencia sobre o balanço das citocinas inflamatórias. No modelo de fertilidade uterina, acupuntura promoveu melhora do estado receptivo do endométrio através da alteração no balanço de citocinas Th1/Th2 aumentando IL-10 e inibindo IL-1 β e IL-2 (GUI *et al.*, 2012). No modelo de inflamação do peritônio induzido pela carragenina o efeito anti-inflamatório da acupuntura manual foi associado a um aumento da expressão da IL-10, contudo não houve alteração nos níveis de citocinas IL-1 β e TNF- α (DA SILVA *et al.*,2011). Esses resultados corroboram com os nossos achados, onde apesar de ocorrer uma tendência à redução de IL-1 β nos animais tratados, essa diferença não foi significativa entre os demais grupos. Nem sempre o efeito da acupuntura ocorre sobre a redução de citonas pro-inflamatórias. Carneiro e colaboradores (2010) demonstraram que o benefício proferido pela eletroacupuntura no modelo de asma esta relacionado a uma influencia sobre o balanço de citocinas Th1/Th2, onde, a eletroacupuntura proferiu um aumento de IL-1, IFN- δ e diminuição de IL-4, IL-10 associado à redução de outros fatores que também contribuem para o agravamento da asma (CARNEIRO *et al.*, 2012).

Nós acreditamos que o efeito da acupuntura na recuperação funcional após SCI não deva envolver apenas o balanço de citocinas.

O número de evidências que demonstram a influência da acupuntura sobre o estado de ativação microglial têm se tornado cada vez maior. Yang e colaboradores (2010) demonstram que a acupuntura no ponto E36 foi capaz de atenuar a neuroinflamação desencadeada por TNF- α e reduzir significativamente a ativação microglial tanto na medula espinal como no tronco encefálico no modelo de esclerose amiotrófica lateral (YANG *et al.*, 2010). Kang e colaboradores (2007) também demonstraram que a acupuntura manual foi capaz de inibir a ativação microglial e a expressão de mediadores inflamatórios como COX-2, iNOS, entre outros, no modelo da Doença de Parkinson induzido pelo MPTP em camundongos (KANG *et al.*, 2007). Choi e colaboradores (2010) também constataram uma atenuação da ativação microglial e redução da expressão de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β ; TNF- α e IL-6 no modelo de lesão medular (CHOI *et al.*, 2010). As microglias são células imunologicamente ativas capazes de responder a qualquer condição que possa perturbar a homeostase no SNC. Sabe-se que após a lesão medular, microglias se tornam ativas em resposta ao conteúdo intracelular liberado por neurônios danificados como glutamato, ATP, NO, além dos restos de mielina aos quais as microglias são extremamente sensíveis (TAOKA & OKAJIMA 1998; LOANE & BYRNES, 2010). Dessa forma, elas atuam como fontes primárias na geração do processo inflamatório onde aumentam a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6, iNOS, espécies reativas de oxigênio, entre outros, atraindo outros tipos celulares para o local da lesão (LOANE & BYRNES, 2010; DAVALOS *et al.*, 2005; MIN *et al.*, 2003). No entanto é importante lembrar que a ativação microglial em curto prazo não é deletéria, mas em caso como lesões ou doenças degenerativas a hiperatividade microglial gera uma auto-propagação de retroalimentação positiva que promove uma incontrollada e prolongada ativação de tipos celulares que induz a morte celular de neurônios e oligodendrócitos além de conduzir a uma crônica progressão da lesão (GAO & HONG, 2008). Apesar do número crescente de trabalhos demonstrando que acupuntura inibe a ativação microglial o exato mecanismo de como ela promove essa inibição ainda é desconhecido.

Após a lesão medular, ocorre um aumento massivo da liberação de glutamato por neurônios danificados, este glutamato, por sua vez, estimula neurônios remanescentes a liberarem ainda mais glutamato, gerando assim um ciclo de excitabilidade e morte celular (KWON *et al.*, 2004, DUMONT *et al.*, 2001). Tem sido demonstrado que a acupuntura é capaz de reduzir a liberação de glutamato na medula espinal por neurônios do corno da raiz dorsal (CHOI *et al.*, 2005). Dessa forma, acredita-se que a acupuntura também possa promover efeito citoprotetor através da redução da excitotoxicidade que é um dos fatores que contribuem fortemente para uma maior perda de tecido neural após a SCI.

A peroxidação lipídica promovida por espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio também contribuem para o aumento da perda de tecido neural ao redor da lesão primária (KWON *et al.*, 2004; LEWEN *et al.*, 2000). Chen e colaboradores (2012) demonstram que a eletroacupuntura foi capaz de atenuar o estresse oxidativo no modelo de isquemia e reperfusão reduzindo assim o comprometimento cognitivo (CHEN *et al.*, 2012). Yu e colaboradores (2010) demonstraram que acupuntura foi capaz de promover um efeito neuroprotetor através de uma ação antioxidante no modelo de doença de Parkinson. Sendo assim, talvez esse também seja um mecanismo pelo qual a acupuntura possa contribuir para a melhora da atividade locomotora que foi observada no grupo de animais tratados (YU *et al.* 2010).

As alterações vasculares locais e a isquemia na medula espinal são significativamente deletérias após a SCI. Imediatamente após o trauma, ocorre redução no fluxo sanguíneo que se tornar progressivamente pior ao longo das primeiras horas. O preciso mecanismo a cerca da isquemia ainda não está claro (TATOR & FEHLINGS, 1991). Recentemente, Hwang e colaboradores (2011) demonstraram que a eletroacupuntura foi capaz de atenuar a elevação da pressão sanguínea através de uma influência sobre atividade da NO/NOS na artéria mesentérica de ratos espontaneamente hipertensivos. Os autores constataram que ocorreu um aumento nos nível plasmático de NO, que é um potente vasodilatador, após o tratamento com a eletroacupuntura. Dessa forma, é possível que o tratamento com a acupuntura após a SCI também seja capaz de minimizar esse quadro de isquemia contribuindo assim para redução dos danos secundários em decorrência da isquemia (HWANG *et al.*, 2011).

Apesar de não termos investigado os mecanismos acima citados. Estes dados, da literatura científica indicam que a acupuntura também possa atuar em diversos outros parâmetros que estão associados aos danos secundários, além da influencia no balanço de citocinas pro e anti-inflamatória que foi visto no nosso trabalho (Figura 31). Dessa forma, são necessários ainda mais estudos para esclarecer estes possíveis benefícios que possam ser mediados pela acupuntura na lesão medular.

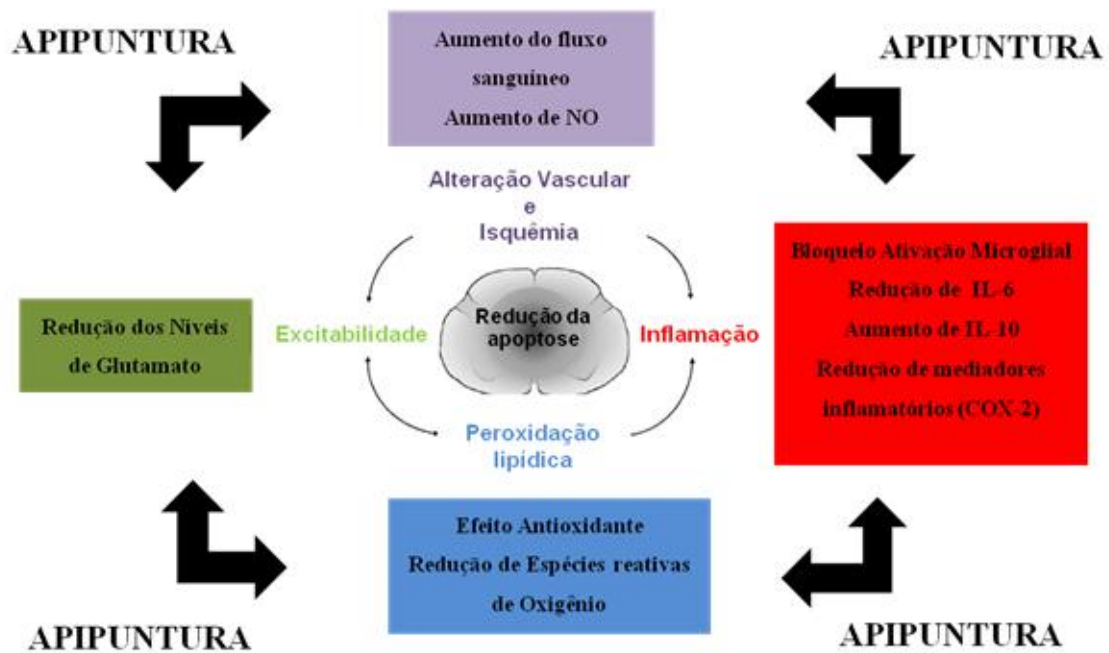


Figura 31: Desenho esquemático da hipótese dos possíveis mecanismos da acupuntura na lesão medular. Baseado em estudos prévios, acredita-se que a acupuntura possa ter efeito sobre os danos secundários após a SCI na diminuição dos níveis de glutamato contribuindo para a redução da excitotoxicidade (CHOI *et al.*, 2005), efeito antioxidante (YU *et al.* 2010), efeito sobre os níveis plasmáticos de NO, influenciando assim, no quadro isquêmico (HWANG *et al.*, 2011), efeito anti-inflamatório reduzindo atividade microglias e outros mediadores inflamatórios (CHOI *et al.*, 2010). Além de todos esses efeito, nossos resultados indicaram que a acupuntura foi capaz de influenciar no balanço de citocina pró e anti-inflamatória. Acreditamos assim que todos esses fatores juntos possam contribuir positivamente para a redução da apoptose reduzindo assim a perda neurológica. *Fonte: modificado de Know et al, 2004.*

7. CONCLUSÕES

A partir deste estudo, concluímos que:

- A estimulação (por apipuntura e por acupuntura manual) da combinação dos acupontos E36+VG3 promoveu uma melhora significativa na capacidade locomotora de ratos submetidos à lesão medular em relação ao seu controle não-ponto e ao controle sem manipulação. Além disso, estimulação desta combinação foi mais eficiente na recuperação da função locomotora em relação à estimulação das combinações dos acupontos ID3+B62 e VG3+VG9.
- A estimulação da combinação dos acupontos ID3+B62 e VG3+VG9 não promoveu efeito na capacidade locomotora de ratos submetidos a lesão medular;

Dessa forma, nossos resultados contribuem para um dos conceitos mais importantes da Medicina Tradicional Chinesa que é a especificidade dos pontos de acupuntura, uma vez que a estimulação de uma combinação específica de pontos de acupuntura promoveu uma recuperação locomotora superior a demais combinações em ratos submetidos a lesão medular.

- Não existiu diferença significativa entre o efeito da acupuntura (realizada diariamente) e da apipuntura (realizada semanalmente) na capacidade locomotora de ratos submetidos a lesão medular por compressão.
- Na análise da severidade do trauma foi detectada uma correlação significativamente positiva entre a severidade do trauma e a avaliação da capacidade locomotora.
- A apipuntura nos acupontos E36+VG3 realizada imediatamente após a SCI promoveu significativo aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 no tempo de 6 horas após a SCI.
- A apipuntura nos acupontos E36+VG3 realizada imediatamente após a SCI promoveu significativa redução da expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 no tempo de 24 horas após a SCI.
- A apipuntura nos acupontos E36+VG3 realizada imediatamente após a SCI não alterou a expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β e citocina anti-inflamatória IL-4.

Em conjunto, os nossos resultados indicam que a apipuntura nos acupontos E36+VG3 é capaz de promover recuperação parcial da função locomotora e esta melhora parece estar associada a uma ação anti-inflamatória através de uma influência modulatória no balanço da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias. O presente estudo sugere que a acupuntura, especialmente na combinação dos acupontos E36+VG3 possa ser uma terapia promissora como ferramenta terapêutica complementar em pacientes com lesão medular na fase aguda.

8. REFERÊNCIAS

- Afshari FT, Kappagantula S, Fawcett JW. (2009) Extrinsic and intrinsic factors controlling axonal regeneration after spinal cord injury. *Expert Rev Mol Med.* 8, 11-37.
- Aires, MM. Fisiologia. 3^a. edição. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara-Koogan, 2008.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124,783-801.
- Alexander DN, Cen S, Sullivan K.J, Bhavnani, G, Ma X, Azen SP. (2004) Effects of acupuncture treatment on poststroke motor recovery and physical function: a pilot study. *Neurorehabil Neural Repair.* 18, 259–267.
- ASIA. ASIA impairment scale. Disponível em: http://www.asia-spinalinjury.org/publications/2001_Classif_worksheet.pdf. Acesso em 21 jan 2012.
- Baek YH, Huh JE, Lee JD, Choi do Y, Park DS. (2006) Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by alpha2-Adrenoceptors. *Brain Res.* 16, 1073-1074.
- Bareyre FM. (2008) Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. *J Neurol Sci.* 265, 63-72.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 12, 1-21.
- Bear, MF, Connors, BW e Paradiso, MA. Neuroscience: Exploring the Brain. Third edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. (1992) Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: Behavioral and histological analysis. *J. Neurotrauma* 9, 197–217.
- Boulanger, LM. (2009) Immune Proteins in Brain Development and Synaptic Plasticity. *Neuron.* 64, 93-109.
- Brewer KL, Bethea JR, Yeziarski RP. (1999) Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. *Exp Neurol.* 159, 484-493.
- Cadotte DW, Singh A, Fehlings MG. (2010) The timing of surgical decompression for spinal cord injury. *F1000 Med Rep.* 8, 2-67.
- Carneiro ER, Xavier RA, De Castro MA, Do Nascimento CM, Silveira VL. (2010) Electroacupuncture promotes a decrease in inflammatory response associated with Th1/Th2 cytokines, nitric oxide and leukotriene B4 modulation in experimental asthma. *Cytokine.* 50, 335-340.

- Chae Y, Lee H, Kim H, Kim CH, Chang DI, Kim KM, Park HJ. (2009) Parsing brain activity associated with acupuncture treatment in Parkinson's diseases. *Mov Disord* 24, 1794–1802.
- Chen Y, Zhou J, Li J, Yang SB, Mo LQ, Hu JH, Yuan WL. (2012) Electroacupuncture pretreatment prevents cognitive impairment induced by limb ischemia-reperfusion via inhibition of microglial activation and attenuation of oxidative stress in rats. *Brain Res.* 1432, 36-45.
- Choi BT, Kang J, Jo UB. (2005) Effects of electroacupuncture with different frequencies on spinal ionotropic glutamate receptor expression in complete Freund's adjuvant-injected rat. *Acta Histochem.* 107, 67-76.
- Choi DC, Lee JY, Moon YJ, Kim SW, Oh TH, Yune TY. (2010) Acupuncture-mediated inhibition of inflammation facilitates significant functional recovery after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 39, 272-282.
- Cizkova D, Novotna I, Slovinska L, Vanicky I, Jergova S, Rosocha J, Radonak J. (2011) Repetitive intrathecal catheter delivery of bone marrow mesenchymal stromal cells improves functional recovery in a rat model of contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 28, 1951-1961.
- Coleman WP; Benzel D; Cahill DW; Ducker T; Geisler F; Green B; Gropper MR; Goffin J; Madsen PW 3rd; Maiman DJ; Ondra SL; Rosner M; Sasso RC; Trost, GR, Zeidman S. (2000) A critical appraisal of the reporting of the national acute spinal cord injury studies (II and III) of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *J. Spinal Disord.* 13, 185–199.
- da Silva MD, Guginski G, Werner MF, Baggio CH, Marcon R, Santos AR. (2011). Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011-217946.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 8, 752-758.
- DeLeo, JA, Sorkin, LS, Watkins, LR. (eds) *Immune and Glial Regulation of Pain* (IASP, Seattle, 2007).
- Deverman, BE, Patterson, PH. (2009). Cytokines and CNS Development. *Neuron*, 64, 61-78.
- Dimitrijevic MR. (1992) Development of neurophysiological aspects of the spinal cord during the past ten years. *Paraplegia.* 30, 92-95.
- Ding Y, Yan Q, Ruan JW, Zhang YQ, Li WJ, Zhang YJ, Li Y, Dong H, Zeng YS. (2009) Electro-acupuncture promotes survival, differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells as well as functional recovery in the spinal cord-transected rats. *BMC Neurosci.* 20, 10-35.

- Donnelly DJ, Popovich PG. (2007) Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 209, 378-388.
- Dorsher PT, McIntosh PM. (2009) Acupuncture's Effects in Treating the Sequelae of Acute and Chronic Spinal Cord Injuries: A Review of Allopathic and Traditional Chinese Medicine Literature. *Evid Based Complement Alternat Med.*
- Dou CL and Levine JM. (1994) Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci.* 14, 7616-7628
- Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB. (2000) Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/ macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 7, 574-585
- Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB and Dumont AS. (2001) Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol.* 24, 254-264.
- Esposito E, Cuzzocrea S. (2011) Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. *Trends Pharmacol Sci.* 32, 107-115.
- Esposito E, Paterniti I, Mazzon E, Genovese T, Galuppo M, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea S. (2011a) MK801 attenuates secondary injury in a mouse experimental compression model of spinal cord trauma. *BMC Neuroscience.* 14, 12-31.
- Fernandes, KJL e Tetzlaff, W. Gene expression in axotomized neurons: identifying the intrinsic determinants of axonal growth, in *Regeneration in the Central Nervous System* (Murray, N., ed.), (2000), New York: Marcel Dekker.
- Fitch MT, Silver J. (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol.* 209, 294-301.
- Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, Pasquale-Styles M, Dietrich WD, Weaver LC. (2006) The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain.* 129, 3249-3269.
- Fouad K, Klusman I, Schwab ME. (2004) Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1. *Eur J Neurosci.* 20, 2479-2482.
- Freund P, Schmidlin E, Wannier T, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM. (2006) Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nat Med.* 12, 790-792
- Gao HM, Hong JS. (2008) Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol.* 29, 357-365.
- Genovese T, Esposito E, Mazzon E, Muià C, Di Paola R, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea S. (2008) Evidence for the role of mitogen-activated protein kinase

signaling pathways in the development of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 325, 100-114.

Genovese T, Mazzon E, Esposito E, Muià C, Di Paola R, Crisafulli C, Bramanti P, Cuzzocrea S. (2007) N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone reduces severity of experimental spinal cord injury. *Shock.* 27, 258-265.

Genovese T, Mazzon E, Mariotto S, Menegazzi M, Cardali S, Conti A, Suzuki H, Bramanti P, Cuzzocrea S. (2006) Modulation of nitric oxide homeostasis in a mouse model of spinal cord injury. *J Neurosurg Spine.* 4, 145-153.

Gibson RM, Rothwell NJ, Le Feuvre RA. (2004) CNS injury: the role of the cytokine IL-1. *Vet J.* 168, 230-237.

Gordon S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3, 23-35.

Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of interleukin-1 receptor complex. *J Biol. Chem.* 270, 13757-13765.

Gris D, Marsh DR, Oatway MA, Chen Y, Hamilton EF, Dekaban GA, Weaver LC. (2004) Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function. *J Neurosci.* 24, 4043-4051.

Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, Johnson WE, Baba H. (2012) Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation.* 27;9:40.

Gui J, Xiong F, Li J, Huang G. (2012) Effects of acupuncture on Th1, th2 cytokines in rats of implantation failure. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012-893023.

Habgood MD, Bye N, Dziegielewska KM, Ek CJ, Lane MA, Potter A, Morganti-Kossmann C, Saunders NR. (2007) Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci.* 25, 231-238.

Hagg T, Oudega M. (2006) Degenerative and Spontaneous Regenerative Processes after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 23, 264-280.

Hall ED. (2001) Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success? *J Spinal Cord Med.* 24, 142-146.

Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Shen L, Furukawa S. (2005) Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury. *Neuroreport.* 16, 99-102.

Hausmann ON. (2003) Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord.* 41, 369-378.

- Hayashi AM, Matera JM, da Silva TS, Pinto AC, Cortopassi SR. (2007) Electroacupuncture and Chinese herbs for treatment of cervical intervertebral disk disease in a dog. *J Vet Sci.* 8, 95-98.
- Hopkins SJ, Rothwell NJ. (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci.* 18, 83-88.
- Houaiss, A. Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.
- Hurlbert RJ. (2001) The role of steroids in acute spinal cord injury: an evidence based analysis. *Spine* 26, 39–46.
- Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. (2001) IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity.* 14, 705-714.
- Hwang HS, Kim YS, Ryu YH, Lee JE, Lee YS, Yang EJ, Choi SM, Lee MS. (2011) Electroacupuncture Delays Hypertension Development through Enhancing NO/NOS Activity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011, 130529
- Ibarra A, Hauben E, Butovsky O, Schwartz M. The therapeutic window after spinal cord injury can accommodate T cell-based vaccination and methylprednisolone in rats. (2004) *Eur J Neurosci.* 19, 2984-2990.
- Jang MH, Shin MC, Lee TH, Lim BV, Shin MS, Min BI, Kim H, Cho S, Kim EH, Kim CJ. (2003) Acupuncture suppresses ischemia-induced increase in c-Fos expression and apoptosis in the hippocampal CA1 region in gerbils. *Neurosci Lett.* 14, 3475-3478.
- Jendelová P, Herynek V, Urdzíkova L, Glogarova K, Kroupová J, Andersson B, Bryja V, Burian M, Hájek M, Syková E. (2004) Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res.* 76, 232-243.
- Jeon S, Kim YJ, Kim ST, Moon W, Chae Y, Kang M, Chung MY, Lee H, Hong MS, Chung JH, Joh TH, Lee H, Park HJ. (2008) Proteomic analysis of the neuroprotective mechanisms of acupuncture treatment in a Parkinson's disease mouse model. *Proteomics* 8, 4822–4832.
- Johnson-Green PC, Dow KE, Riopelle RJ. (1991) Characterization of glycosaminoglycans produced by primary astrocytes in vitro. *Glia* 4, 314-321.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of Neural Science. EUA: McGraw-Hill; 2000.
- Kang JM, Park HJ, Choi YG, Choe IH, Park JH, Kim YS, Lim S. (2007) Acupuncture inhibits microglial activation and inflammatory events in the MPTP-induced mouse model. *Brain Res.* 1131, 211-219.

- Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. (2009) Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci.* 29, 13435-13444.
- Kim EH, Jang MH, Shin MC, Lim BV, Kim HB, Kim YJ, Chung JH, Kim CJ. (2002) Acupuncture increases cell proliferation and neuropeptide Y expression in dentate gyrus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett.* 12, 33-36.
- Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, Huh Y, Chung JH, Seo JC, Kang JE, Lee HJ, Yim SV, Kim CJ. (2001) Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 297, 21-24.
- Kim HW, Kwon YB, Ham TW, Roh DH, Yoon SY, Lee HJ, Han HJ, Yang IS, Beitz AJ, Lee JH. (2003) Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J Vet Med Sci.* 65, 349-355.
- Kim HW, Kwon YB, Han HJ, Yang IS, Beitz AJ, Lee JH. (2005) Antinociceptive mechanisms associated with diluted bee venom acupuncture (apipuncture) in the rat formalin test: involvement of descending adrenergic and serotonergic pathways. *Pharmacol Res.* 51, 183-188.
- Kim JH, Min BI, Schmidt D, Lee HJ, Park DS. (2000) The difference between electroacupuncture only and electroacupuncture with manipulation on analgesia in rats. *Neurosci Lett.* 279, 149-152.
- Kim JI, Yang EJ, Lee MS, Kim YS, Huh Y, Cho IH, Kang S, Koh HK. (2011) Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. *Int J Neurosci.* 121, 209-217.
- Kim SN, Doo AR, Park JY, Bae H, Chae Y, Shim I, Lee H, Moon W, Lee H, Park HJ. (2011) Acupuncture enhances the synaptic dopamine availability to improve motor function in a mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 6, 1-9.
- Kim YK, Lim HH, Song YK, Lee HH, Lim S, Han SM, Kim CJ. (2005) Effect of acupuncture on 6-hydroxydopamine-induced nigrostratal dopaminergic neuronal cell death in rats. *Neurosci Lett.* 384, 133-138.
- Knobloch SM, Faden AI. (1998) Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 153, 143-151.
- Kraft AD, Harry GJ. (2011) Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health.* 8, 2980-3018.
- Kwon BK, Borisoff JF, Tetzlaff W. (2002) Molecular targets for therapeutic intervention after spinal cord injury. *Mol Interv.* 2, 244-258.
- Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. (2004) Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.* 4, 451-464.

- Kwon YB, Ham TW, Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Han HJ, Yang IS, Kim KW, Beitz AJ, Lee JH. (2005) Water soluble fraction (<10 kDa) from bee venom reduces visceral pain behavior through spinal alpha 2-adrenergic activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 80, 181-187.
- Kwon YB, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. (2004) Bee venom acupoint stimulation increases Fos expression in catecholaminergic neurons in the rat brain. *Mol Cells.* 17, 329-333.
- Kwon YB, Kang MS, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. (2001a) Visceral antinociception produced by bee venom stimulation of the Zhongwan acupuncture point in mice: role of alpha(2) adrenoceptors. *Neurosci Lett.* 3, 133-137.
- Kwon YB, Kang MS, Kim HW, Ham TW, Yim YK, Jeong SH, Park DS, Choi DY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. (2001c) Antinociceptive effects of bee venom acupuncture (apipuncture) in rodent animal models: a comparative study of acupoint versus non-acupoint stimulation. *Acupunct Electrother Res.* 26, 59-68.
- Lacroix S, Chang L, Rose-John S, Tuszynski MH. (2002) Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J Comp Neurol.* 454, 213-228.
- Lee SI, Jeong SR, Kang YM, Han DH, Jin BK, Namgung U, Kim BG. (2010) Endogenous expression of interleukin-4 regulates macrophage activation and confines cavity formation after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci Res.* 88, 2409-2419.
- Lee YB, Yune TY, Baik SY; Shin, YH, Du S, Rhim H; Lee EB; Kim YC; Shin ML, Markelonis GJ, Oh TH. (2000) Role of tumor necrosis factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 166, 190-195.
- Lewen A, Matz P, Chan PH. (2000) Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 17, 871-890.
- Li WJ, Pan SQ, Zeng YS, Su BG, Li SM, Ding Y, Li Y, Ruan JW. (2010) Identification of acupuncture-specific proteins in the process of electro-acupuncture after spinal cord injury. *Neurosci Res.* 67, 307-316.
- Li X, Commane M, Jiang Z, Stark GR. (2001) IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 4461-4465.
- Li, AH, Zhang, JM, Xie, YK. (2004) Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin-nerve complexes with enriched nerve endings. *Brain Res.* 1012, 154-159.
- Lianza S, Casalis MEP, Greve JMD, Eichberg R. (2001) Lesão medular. In: Lianza S. *Medicina de Reabilitação.* 3ª. ed. São Paulo: Guanabara-Koogan, 299-321.
- Liu C, Shi Z, Fan L, Zhang C, Wang K, Wang B. (2011) Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury. *Brain Res.* 1374, 100-109.

- Liu H, Yang K, Xin T, Wu W, Chen Y. (2012) Implanted electro-acupuncture electric stimulation improves outcome of stem cells' transplantation in spinal cord injury. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2
- Loane DJ, Byrnes KR. (2010) Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics.* 7, 366-377.
- Longworth W, McCarthy PW. (1997) A review of research on acupuncture for the treatment of lumbar disk protrusions and associated neurological symptomatology. *J Altern Complement Med.* 3, 55-76.
- Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. (2005) BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord. *Exp Neurol.* 191, 344-360.
- Lu, KT, Wang YW, Yang JT, Chen HI. (2005) Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J. Neurotrauma* 22, 885–895.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 147, 232-240.
- Lundy-Ekman L. Neurociência: Fundamentos para Reabilitação. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
- Machado, ABM. Neuroanatomia Funcional. 2ª edição. Rio de Janeiro: *Livraria Atheneu*, 2000.
- Makarov SS. (2000) NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol Med Today.* 6, 441-448.
- Matyja E, Nagańska E, Taraszewska A, Rafałowska J. (2005) The mode of spinal motor neurons degeneration in a model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. *Folia Neuropathol.* 43, 7-13.
- Mayer DJ, Price DD, Ruff A. (1977) Antagonism of acupuncture analgesia in man by the narcotic antagonist naloxone. *Brain Res.* 121, 368-372.
- Maynard FM Jr, Bracken MB, Creasey G, Ditunno JF Jr, Donovan WH, Ducker TB, Garber SL, Marino RJ, Stover SL, Tator CH, Waters RL, Wilberger JE, Young W. (1997) International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. American Spinal Injury Association. *Spinal Cord.* 35, 266-274.
- McKeon R.J, Hoke A. and Silver J. (1995) Injury- induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp. Neur.* 136, 32-43
- McTigue DM. (2008) Potential therapeutic targets for ppar γ after spinal cord injury. *PPAR Res* 517162.
- Medeiros MA. (2001) Mapeamento através da expressão de c-Fos das estruturas encefálicas envolvidas na acupuntura analgésica (ponto Zusanli) em animais imobilizados. In: Departamento de Psicobiologia, p 129. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo.

- Min KJ, Jou I, Joe E. (2003) Plasminogen-induced IL-1beta and TNF-alpha production in microglia is regulated by reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 312, 969-974.
- Molina, AELS. Análise da sensibilidade e reprodutividade da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) em ratos Wistar. Dissertação de mestrado. USP. São Paulo (2006).
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 683-765.
- Mosser DM, Edwards JP. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8, 958-69.
- Moynagh PN. (2005) The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J Anat.* 207, 265-269.
- Muangchan C, Pope JE. (2012) Interleukin 6 in Systemic Sclerosis and Potential Implications for Targeted Therapy. *J Rheumatol.* [Epub ahead of print]
- Murphy PG, Borthwick LA, Altares M, Gauldie J, Kaplan D, Richardson PM. (2000) Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. *Eur J Neurosci.* 12, 1891-1899.
- Nakamura M, Houghtling RA, MacArthur L, Bayer BM, Bregman BS. (2003) Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Exp Neural,* 184, 313-325.
- O'Reilly S, Ciechomska M, Cant R, Hügle T, van Laar JM. (2012) Interleukin-6, its role in fibrosing conditions. *Cytokine Growth Factor Rev.* [Epub ahead of print]
- Oyinbo CA. (2011) Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 71, 281-299.
- Pais TF, Figueiredo C, Peixoto R, Braz MH, Chatterjee S. (2008) Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by a MyD88-dependent pathway. *J. Neuroinflammation.* 9, 5-43.
- Paola FA, Arnold M. (2003) Acupuncture and spinal cord medicine. *J Spinal Cord Med.* 26, 12-20.
- Park HJ, Lim S, Joo WS, Yin CS, Lee HS, Lee HJ, Seo JC, Leem K, Son YS, Kim YJ, Kim CJ, Kim YS, Chung JH. (2003) Acupuncture prevents 6-hydroxydopamine-induced neuronal death in the nigrostriatal dopaminergic system in the rat Parkinson's disease model. *Exp Neurol.* 180, 93-98.
- Park HJ, Lim S, Lee HS, Lee HJ, Yoo YM, Lee HJ, Kim SA, Yin CS, Seo JC, Chung JH. (2002) Acupuncture enhances cell proliferation in dentate gyrus of maternally-separated rats. *Neurosci Lett.* 22, 153-156.
- Pomeranz B., Chiu D. (1976) Naloxone blocks acupuncture analgesia and causes hyperalgesia: endorphine is implicated. *Life Sci.* 19, 1757-1762.

- Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT. (1999) Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*. 158, 351-365.
- Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, and Petratos S (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis*. 15, 415–436.
- Ramer MS, Harper GP, Bradbury EJ. (2000) Progress in spinal cord research - a refined strategy for the International Spinal Research Trust. *Spinal Cord* . 38,449-72.
- Roh DH, Kim HW, Yoon SY, Kang SY, Kwon YB, Cho KH, Han HJ, Ryu YH, Choi SM, Lee HJ, Beitz AJ, Lee JH. (2006) Bee venom injection significantly reduces nociceptive behavior in the mouse formalin test via capsaicin-insensitive afferents. *J Pain*. 7, 500-512.
- Roh DH, Kwon YB, Kim HW, Ham TW, Yoon SY, Kang SY, Han HJ, Lee HJ, Beitz AJ, Lee JH. (2004) Acupoint stimulation with diluted bee venom (apipuncture) alleviates thermal hyperalgesia in a rodent neuropathic pain model: involvement of spinal alpha 2-adrenoceptors. *J Pain*. 5, 297-303.
- Rothwell NJ, Luheshi GN (2000) Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci* 23, 618–625.
- Rothwell, NJ, Strijbos, PJ. (1995) Cytokines in neurodegeneration and repair. *Int J Dev Neurosci*. 13, 179-185.
- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. (2012) A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Scientific World Journal*, ID 756357.
- Saganová K, Orendáčová J, Cízková D, Vanický I. (2008) Limited minocycline neuroprotection after balloon-compression spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett*. 433, 246-249.
- Sanderson KL, Raghupathi R, Saatman, KE; Martin D, Miller G, McIntosh TK. (1999) Interleukin-1 receptor antagonist attenuates regional neuronal cell death cognitive dysfunction after experimental brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 19, 1118–1125.
- Schnell L, Fearn S, Schwab M.E, Perry VH, Anthony DC. (1999) Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 58, 245–254.
- Schwab ME, Bartholdi D. (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev*; 76, 319–370.
- Schwab ME. (2002) Repairing the Injured Spinal Cord. *Science*. 295, 1029-1031.
- Schwartz M, Yoles E. (2006) Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond. *J Neurotrauma*.23, 360–370.

Schwartz M. (2000) Autoimmune involvement in CNS trauma is beneficial if well controlled. *Prog Brain Res*; 128: 259–263.

Schwartz M. (2003) Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful? *J Cereb Blood Flow Metab.* 23, 385–394.

Sedý J, Urdzíkova L, Likavcanová K, Hejcl A, Jendelová P, Syková E. (2007) A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rat. *Neurosci Lett.* 423, 167-171.

Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, Rolls A, Mack M, Pluchino S, Martino G, Jung S, Schwartz M. (2009) Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med.* 6, e1000113

Short DJ, El Masry WS, Jones PW. (2000) High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord.* 38, 273-286.

Shuai, K. & Liu, B. (2003) Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 3, 900-911.

Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS. (1997) Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res.* 50, 798-808.

Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. (2007) Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol. Ther.* 115, 246–270.

1 Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT. (1998) Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol.* 152, 74-87.

Suh SJ, Kim KS, Kim MJ, Chang YC, Lee SD, Kim MS, Kwon DY, Kim CH. (2006) Effects of bee venom on protease activities and free radical damages in synovial fluid from type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats. *Toxicol In Vitro.* 20, 1465-1471.

Tanaka S, Takehashi M, Iida S, Kitajima T, Kamanaka Y, Stedeford T, Banasik M, Ueda K. (2005) Mitochondrial impairment induced by poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in cortical neurons after oxygen and glucose deprivation. *J Neurochem.* 95, 179-190.

Taoka Y, Okajima K, Murakami K, Johno M, Naruo M. (1998) Role of neutrophil elastase in compression-induced spinal injury in rats. *Brain Res.* 799, 264–269.

Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K. (1997) Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience.* 79; 1177-1182.

- Tator CH and Fehlings MG. (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.* 75, 15-26.
- Turrin NP, Plata-Salamán CR. (2000) Cytokine-cytokine interactions and the brain. *Brain Res Bull.* 51, 3-9
- Urdzíkova L, Jendelová P, Glogarová K, Burian M, Hájek M, Syková E. (2006) Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 23, 1379-1391.
- Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, Cízková D, Gálik J. (2001) A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J Neurotrauma.* 18, 1399-1407.
- Vitkovic L, Maeda S, Sternberg E. (2001) Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. *Neuroimmunomodulation.* 9, 295-312.
- Werry EL, Liu GJ, Lovelace MD, Nagarajah R, Bennett MR. (2012) Glutamate potentiates lipopolysaccharide-stimulated interleukin-10 release from neonatal rat spinal cord astrocytes. *Neuroscience.* 207, 12-24.
- Wong AM, Leong CP, Su TY, Yu SW, Tsai WC, Chen CP. (2003) Clinical trial of acupuncture for patients with spinal cord injuries. *Am J Phys Med Rehabil.* 82, 21-27.
- Wu CP, Chao CC, Zhao ZQ, Wei, JY. (1974) Inhibitory effect produced by stimulation of afferent nerves on responses of cat dorsolateral fasciculus fibers to nocuous stimulus. *Sci. Sin.* 17, 688–697.
- Xiong Y, Rabchevsky AG, Hall ED. (2007) Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem.* 100, 639-649.
- Xu W, Chi L, Xu R, Ke Y, Luo C, Cai J, Qiu M, Gozal D, Liu R. (2005) Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord* 43, 204–213.
- Yan Q, Ruan JW, Ding Y, Li WJ, Li Y, Zeng YS. (2011) Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury. *Exp Toxicol Pathol.* 63, 151-156.
- Yang EJ, Jiang JH, Lee SM, Hwang HS, Lee MS, Choi SM. (2010) Electroacupuncture reduces neuroinflammatory responses in symptomatic amyotrophic lateral sclerosis model. *J Neuroimmunol.* 223, 84-91.
- Yang EJ, Jiang JH, Lee SM, Yang SC, Hwang HS, Lee MS, Choi SM. (2010a) Bee venom attenuates neuroinflammatory events and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis models. *J Neuroinflammation.* 15, 1-12.
- Yang EJ, Kim SH, Yang SC, Lee SM, Choi SM. (2011) Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. *J Neuroinflammation.* 20, 1-9.

- Yim YK, Lee H, Hong KE, Kim YI, Lee BR, Son CG, Kim JE. (2007) Electroacupuncture at acupoint ST36 reduces inflammation and regulates immune activity in Collagen-Induced Arthritic Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 4, 51-57.
- Yin CS, Jeong HS, Park HJ, Baik Y, Yoon MH, Choi CB, Koh HG. (2008) A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. *Res Vet Sci.* 84, 159-165.
- Yoon SY, Kim HW, Roh DH, Kwon YB, Jeong TO, Han HJ, Lee HJ, Choi SM, Ryu YH, Beitz AJ, Lee JH. (2005) The anti-inflammatory effect of peripheral bee venom stimulation is mediated by central muscarinic type 2 receptors and activation of sympathetic preganglionic neurons. *Brain Res.* 1049, 210-216.
- Yu YP, Ju WP, Li ZG, Wang DZ, Wang YC, Xie AM. (2010) Acupuncture inhibits oxidative stress and rotational behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rat. *Brain Res.* 1336, 58-65.
- Yun SJ, Park HJ, Yeom MJ, Hahm DH, Lee HJ, Lee EH. (2002) Effect of electroacupuncture on the stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 25, 85-88.
- Zhao ZQ. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. (2008) *Prog Neurobiol.* 85, 355-75.
- Zhou Z, Peng X, Hao S, Fink DJ, Mata M. (2008) HSV-mediated transfer of interleukin-10 reduces inflammatory pain through modulation of membrane tumor necrosis factor alpha in spinal cord microglia. *Gene Ther.* 15, 183-190.
- Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M. (2009) IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 220, 183-190.

