

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE

**A APIPUNTURA INFLUENCIA O BALANÇO DE
FENÓTIPOS DE MICRÓGLIA/MACRÓFAGOS, A
NEUROINFLAMAÇÃO E O FATOR ANTI-
APOPTÓTICO NO MODELO DE LESÃO MEDULAR
POR COMPRESSÃO EM RATOS *WISTAR***

RAQUEL DO NASCIMENTO DE SOUZA

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**A APIPUNTURA INFLUENCIA O BALANÇO DE FENÓTIPOS DE
MICRÓGLIA/MACRÓFAGOS, A NEUROINFLAMAÇÃO E O FATOR
ANTI-APOPTÓTICO NO MODELO DE LESÃO MEDULAR POR
COMPRESSÃO EM RATOS *WISTAR***

RAQUEL DO NASCIMENTO DE SOUZA

Sob a Orientação da Professora
Magda Alves de Medeiros

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências Fisiológicas**, no Programa
Multicêntrico de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas.

Seropédica, RJ
Maio de 2017

D719a

DO NASCIMENTO DE SOUZA, RAQUEL, 27/11/1984-
A APIPUNTURA INFLUENCIA O BALANÇO DE FENÓTIPOS DE
MICRÓGLIA/MACRÓFAGOS, A NEUROINFLAMAÇÃO E O FATOR ANTI
APOPTÓTICO NO MODELO DE LESÃO MEDULAR POR COMPRESSÃO
EM RATOS WISTAR / RAQUEL DO NASCIMENTO DE SOUZA. -
2017.

111 f.

Orientador: MAGDA ALVES DE MEDEIROS ALVES DE
MEDEIROS. Tese(Doutorado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLOGICAS, 2017.

1. LESÃO MEDEULAR. 2. APIPUNTURA. 3.
NEUROINFLAMAÇÃO. I. ALVES DE MEDEIROS, MAGDA ALVES DE
MEDEIROS, 27/051973-, orient. II Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLOGICAS III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

RAQUEL DO NASCIMENTO DE SOUZA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM, 17/05/2017, por:

Magda Alves de Medeiros. Ph.D. UFRRJ
(Orientadora)

Silvana Allodi. Ph.D. UFRJ

Victor Túlio Ribeiro de Resende. Ph.D. UFRJ

David do Carmo Malvar Ph.D. UFRRJ

Marcelo Felipe Santiago. Ph.D. UFRJ

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Mario Luiz e Sônia Regina, pelo apoio incondicional
nesta árdua jornada.*

*À minha irmã, Renata, por sua inteligência e por ter me dado ensinamentos valiosos como,
disciplina, dedicação e objetividade.*

*Ao meu melhor amigo e companheiro Fabio Barreto, por ser meu alicerce e por quem tenho
enorme admiração.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais que 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.

Ao meu maior mestre, Luis Carlos Reis com quem compartilhar todas as minhas dúvidas tanto pessoais como científicas. Levarei seus ensinamentos por toda a vida.

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

À Lívia, Vivi e Cema por me apoiarem nesses últimos meses tão estressantes. Muito obrigada pelo apoio moral, pela amizade e pelo companheirismo. Graças a vocês nunca me senti sozinha no laboratório.

Ao Cesar, Claudinho e Mariana do Desterro, por aturarem minhas choradeiras.

À Gabi (UFRJ) pelas longas discussões científicas. Acredito que cresci muito com você. Serei eternamente grata a tudo que fez por mim

À professora Silvana Allodi, por toda gentileza e generosidade. É de pessoas com o seu perfil que a ciência precisa.

Aos meus grandes amigos do DCF: Robertinho, Marissa, Bruna. Sem vocês, o departamento não teria a menor graça.

Ao Fernando e a Raiana (UFRJ), nunca poderei agradecer tudo o que fizeram por mim.

À Fabi, pelas longas jornadas de bancada, sem você não teria chegado até aqui.

Aos funcionários do Departamento Franklin, Dione e Vicente.

À minha chefe Alba, por compreender algumas ausências.

Ao meu amor, cúmplice e melhor amigo Fabio Barreto, 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.

RESUMO

Souza, Raquel do Nascimento de. **A apipuntura influencia o balanço de fenótipos de micróglia/macrófagos, a neuroinflamação e o fator anti-apoptótico no modelo de lesão medular por compressão em ratos *wistar***. 2017. 90p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O objetivo do presente estudo foi investigar os tipos celulares e os mecanismos fisiológicos envolvidos com a apipuntura no modelo de lesão medular moderada (SCI) por compressão. Para indução da SCI, um cateter fogarty de embolectomia foi inflado com 15µL de água destilada no espaço extradural, entre as vértebras T8 e T9, por 5 minutos em ratos *Wistar*. Inicialmente, avaliou-se a melhora da capacidade e da coordenação locomotora pelo teste de avaliação da capacidade locomotora (teste BBB) e da passarela gradeada nos grupos: 1- Grupo Veneno de Abelha (VB) no ponto de acupuntura - aplicação do VB na dose de 0,08 mg/kg diluído em 20µL de salina nos acupontos (E36 - Zunsanli + VG3 - Yaoyangquan); 2- Grupo VB em não ponto (VB-NP) – aplicação do VB em região que não fosse ponto de acupuntura na mesma dose que o grupo VB-E36+VG3; 3- Grupo Controle (CTL-SCI) – grupo com SCI que não foi submetido a nenhum tipo de tratamento. Nesse primeiro ensaio experimental, detectou-se que a melhora locomotora estava realmente associada à estimulação dos acupontos E36+VG3 pelo VB, já que o grupo VB-NP e o grupo CTL-SCI não apresentaram melhora significativa da capacidade locomotora parcial como o grupo VB-E36+VG3. Nossos resultados indicaram que a melhora da capacidade locomotora estava correlacionada à significativa redução da perda de tecido medular espinal promovido pela apipuntura. A próxima etapa da pesquisa investigou os tipos celulares, os fatores neuroinflamatórios, os fatores apoptóticos e a sobrevivência de neurônios e de oligodendrócitos. A apipuntura reduziu a ativação de micróglia/macrófagos no 1º, 3º e 5º dias, enquanto, a ativação de astrócitos só foi influenciada pela apipuntura no 3º dia. A apipuntura também apresentou influência sobre a polarização de micróglia/macrófagos associados aos fenótipos pro (M1) e anti-inflamatórios (M2), no qual, a expressão de RNAm da iNOS, - marcador do fenótipo M1, foi reduzida no 3º e 5º dia e as expressões de RNAm da Arginase-1 e TGF-β, - marcadores M2, foram reduzidas apenas no 5º dia. A redução da expressão de RNAm do fator inflamatório - COX-2, influenciado pela apipuntura ocorreu no 1º e 5º dia, enquanto, a redução do NF-kB ocorreu somente no 3º dia. A apipuntura não demonstrou influência sobre a expressão de RNAm da caspase-3 em nenhum dos tempos estudados, mas promoveu aumento significativo da expressão da proteína antiapoptótica, - o BCL-2, no 5º dia. Por fim, a apipuntura influenciou a preservação de neurônios e oligodendrócitos no tecido medular espinal no 7º dia após a SCI. Dessa forma, o conjunto de resultados sugere que a apipuntura, aplicada nos acupontos E36+VG3, foi capaz de promover recuperação parcial da locomoção e os resultados indicaram que esta melhora locomotora pode estar associada a uma influência da apipuntura sobre a redução da ativação de astrócitos, modulação sobre a polarização de micróglia/macrófagos, sobre a redução da neuroinflamação no aumento do conteúdo da proteína antiapoptótica, o BCL-2, e na neuroproteção de neurônios e oligodendrócitos no tecido medular espinal após a SCI.

Palavras-chave: Apipuntura, micróglia/macrófagos, polarização M1 e M2, astrócitos, inflamação, apoptose, veneno de abelha e lesão medular.

ABSTRACT

Souza, Raquel do Nascimento de. **The apipuncture influences the balance of microglia / macrophages phenotypes, neuroinflammation and anti-apoptotic factor in the model of spinal cord injury by compression in wistar rats.** 2017. 90p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The aim of the present study was to investigate the cell types and physiological mechanisms related to the use of apipuncture in the model of moderate spinal cord injury (SCI) by compression in Wistar rats. For induction of SCI, a Fogarty embolectomy catheter was inflated with 15µL of distilled water in the extradural space, between the T8 and T9 vertebrae, for 5 minutes. Initially, it was evaluated the improvement of the locomotor capacity and coordination by locomotor rating scale (BBB test) and the grid walkway in the following groups: 1- Bee Venom Group (VB) at the acupuncture point - application of BV at the dose of 0.08 mg / kg diluted in 20µL of saline in acupoints (E36 - Zunsanli + VG3 - Yaoyangquan); 2-VB group at no point (VB-NP) - application of VB in a region that was not an acupuncture point at the same dose as the VB-E36 + VG3 group; 3 - Control Group (CTL-SCI) - group with SCI that did not undergo any type of treatment. In this first experimental trial, it was detected that the locomotor improvement was actually associated with the stimulation of the E36 + VG3 acupoints by the VB, since the VB-NP group and the CTL-SCI group did not show significant improvement of the partial locomotor capacity as the VB-E36 + VG3 group. Our results indicated that the improvement of the locomotor capacity was correlated to the significant reduction of spinal cord tissue loss promoted by apipuncture. The next step of the research investigated cell types, neuroinflammatory and apoptotic factors, and survival of neurons and oligodendrocytes. The apipuncture reduced the activation of microglia / macrophages in the 1st, 3rd and 5th days, whereas, the activation of astrocytes was only influenced by apipuncture on the 3rd day. The apipuncture also had an influence on microglia / macrophage polarization associated with pro (M1) and anti-inflammatory (M2) phenotypes, in which iNOS mRNA expression - marker of the M1 phenotype was reduced in the 3rd and 5th Day and Arginase-1 and TGF-β (M2 markers) mRNA expression were reduced only on the 5th day. The reduction of COX-2 (inflammatory factor) mRNA expression influenced by apipuncture occurred on day 1 and 5, while the reduction of NF-kB occurred only on day 3. The apipuncture showed no influence over caspase-3 mRNA expression in any of the analysed times, but promoted a significant increase in the expression of the anti-apoptotic protein BCL-2 on the 5th day. Finally, apipuncture influenced the preservation of neurons and oligodendrocytes in spinal cord tissue on the 7th day after SCI. Thus, the set of results suggests that apipuncture, applied in E36 + VG3 acupoints, was able to promote partial recovery of locomotion. This locomotor improvement may be associated with an influence of apipuncture on the reduction of astrocyte activation, modulation on microglial / macrophage polarization, reduction of neuroinflammation through the increase of anti-apoptotic protein content, BCL-2, and neuroprotection of neurons and oligodendrocytes in spinal cord tissue after SCI.

Key words: Apipuncture, microglia / macrophages, M1 and M2 polarization, astrocytes, inflammation, apoptosis, bee venom and spinal cord injury.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos principais danos secundários à lesão medular. Modificado de Oyinbo, 2011 e Hausmann, 2003. Pág. 9.

Tabela 2: Escala Basso, Beattie & Bresnahan (Teste BBB) para avaliação da capacidade de locomoção de ratos pós-lesão medular (BASSO et al., 1995). Pág. 40.

Tabela 3: Descrição dos anticorpos usados neste experimento. Pág. 42.

Tabela 4: Sequência dos primers usados neste experimento. Pág. 44.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrando a coluna vertebral e a medula espinal humana. Estruturas externas e internas da medula espinal. Fonte: World Wide, no endereço eletrônico: <http://biosphera.com.br> e <http://msdonline.com.br>, pesquisado no dia 08/03/2017. **Pág. 3.**

Figura 2- Desenho esquemático da organização citoarquitetônica das lâminas de Rexed no corno dorsal da medula espinal. O esquema demonstra as subdivisões da substância cinzenta em corno dorsal e ventral e a entrada de diferentes fibras sensoriais periféricas no corno dorsal nas lâminas de Rexed na medula espinal. Fonte: modificado de Kandel, 2000. **Pág. 3.**

Figura 3- Desenho esquemático comparando o tecido medular espinal de ratos com o de humanos. O esquema demonstra a similaridade da medula espinal de ratos e de humanos, assim, como a localização dos tratos ascendentes e descendentes por onde são propagadas as informações sensoriais e motoras. Fonte: modificado de Kjell et al., 2016. **Pág. 4.**

Figura 4 - 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 08/03/2017 do site: <http://servidoresjt.wordpress.com>. **Pág. 6.**

Figura 5 – Desenho esquemático da lesão medular traumática e suas consequências. O esquema demonstra a SCI e o rompimento de fibras dos tratos ascendentes e descendente por onde são propagadas as informações sensoriais e motoras aferentes e eferentes e as consequentes perdas sensoriais, motoras e autonômicas. Fonte: modificado de Brommer et al., 2016. **Pág.7**

Figura 6: Danos secundários e as suas interrelações 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 espinal. Como estes processos são interrelacionados frequentemente existe um feedback positivo entre eles piorando ainda mais a lesão. *Fonte: modificado de Kwon et al., 2004.* **Pág 8.**

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 à 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 de genes inflamatórios, podendo promover, p.ex., a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas. Fonte: modificado de Moynagh, 2005. **Pág.17.**

Figura 8: Cirurgia para indução da 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 (A – foto de autoria própria). Em **B e C**, formato e posição do cateter em relação às vértebras e da compressão sobre o tecido medular. Fonte: modificado de Vanický e colaboradores e Lonjon e colaboradores (VANICKÝ *et al.*, 2001; LONJON *et al.*, 2010). **Pág.28.**

Figura 9: Desenho esquemático dos acupontos. A figura acima ilustra a localização da combinação dos acupontos E36+VG3 que foram utilizados em todos os protocolos experimentais. *Fonte: modificado de Jiang e colaboradores (JIANG et al., 2014).* **Pág.29.**

Figura 10: Esquema ilustrativo geral dos protocolos experimentais realizados no presente estudo. **Pág.31.**

Figura 11: Esquema ilustrativo do Experimento 1. Experimento para avaliação do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a capacidade e coordenação locomotora após a SCI. **Pág.32.**

Figura 12: Esquema ilustrativo do Experimento 2. Experimento para avaliação do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a severidade do trauma. **Pág.33.**

Figura 13: Esquema ilustrativo do Experimento 3. Experimento para avaliação da influência do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a ativação de micróglia/macrófagos e de astrócitos. **Pág.33.**

Figura 14: Esquema ilustrativo do Experimento 4. Experimento para avaliação da influência do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a expressão de RNAm de marcadores da polarização de micróglia/macrófagos. **Pág.34.**

Figura 15: Esquema ilustrativo do Experimento 5: Experimento para avaliação da influência do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a expressão de RNAm de marcadores da polarização de micróglia/macrófagos. **Pág.35.**

Figura 16: Esquema ilustrativo do Experimento 6: Experimento para avaliação da influência do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre o processo de apoptose. **Pág.36.**

Figura 17: Esquema ilustrativo do Experimento 7: Experimento para avaliação da influência do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a neuroproteção de neurônios e oligodendrócitos. **Pág.36.**

Figura 18: Teste para avaliação do desempenho locomotor (Teste BBB) e Teste da passarela. **Em A,** O desenho esquemático representa um impacto sobre a medula espinal gerando uma extensa área de lesão, na qual ocorre o rompimento de nervos de fibras aferentes sensoriais e dos nervos de fibras motoras que inervam o tecido muscular que formam a musculatura dos membros posteriores de ratos. Assim, os animais submetidos a SCI, apresentam movimentos imprecisos durante o cruzamento da passarela (**em C**). **Em B,** animal submetido ao teste de avaliação do desempenho locomotor. *Fonte: A imagem da passarela gradeada usada neste trabalho foi criada por Breanna Arnolde do Western College of Veterinary Medicine e o desenho esquemático foi modificado de Brommer e colaboradores (BROMMER et al., 2016).* **Pág.39.**

Figura 19: Efeito da apipuntura na capacidade locomotora de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Ratos *Wistar* machos foram submetidos à lesão medular por compressão e ao imediato tratamento com apipuntura (VB-E36+VG3, n=9) ou apipuntura não ponto (VB-NP, n=10) ou não receberam nenhum tipo de manipulação terapêutica (CTL-SCI, n=9). A ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do pós-teste *Student Newman*

Keuls detectaram diferenças estatísticas entre os grupos $p < 0,05$. Valores foram apresentados como média \pm erro padrão da média a partir da média dos escores obtidos entre os grupos avaliados pelo teste BBB. # Indica diferença significativa do grupo *Sham* em relação aos demais grupos que sofreram lesão medular. * Indica diferença significativa do VB-E36+VG3 em relação ao CTL-SCI e em relação ao VB-NP. **Pág.46.**

Figura 20: Efeito da apipuntura sobre o déficit do motor descendente avaliado pelo teste da passarela gradeada em ratos submetidos à lesão medular por compressão. Em **A**, o gráfico representa a média de erros em três travessias dos grupos *Sham* (n=5), VB-E36+VG3 (n=6), VB-NP (n=7) e CTL-SCI, (n=5) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Valores foram apresentados como média \pm erro padrão da média. A ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste *Student Newman Keuls* detectou diferença estatística entre os grupos. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação ao grupo VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,05$). **Pág.47.**

Figura 21: Avaliação histopatológica da severidade do trauma 14 dias após a SCI. Em **A**, as imagens representativas de cortes longitudinais da medula espinal corados com hematoxilina e eosina para avaliar a área da lesão 14 dias após a lesão medular por compressão medular (barras de calibração = 500 μ m). Em **B**, o gráfico representa a comparação da área da lesão em relação à extensão do corte longitudinal do tecido medular dos grupos VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI de ratos submetidos à cirurgia por compressão 14 dias após a SCI. Por apresentar o tecido medular espinal íntegro, o grupo *Sham* não foi incluído na análise estatística, sendo apresentado no gráfico apenas de forma representativa. A mensuração da área da lesão foi realizada com o *software* Image J (USA). A ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste *Student Newman Keuls* detectou diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). As colunas e as barras verticais representam a média da área de lesão em mm^2 e o erro padrão da média, respectivamente. * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados ($p < 0,05$). **Pág.48.**

Figura 22: Correlação entre a severidade do trauma medular e a capacidade locomotora dos animais no 14º dia após lesão. Gráfico de regressão linear simples para correlação do volume total da lesão de cada medula dos grupos (*Sham* N= 3; VB-E36+VG3 N=4, VB-NP N=4, CTL-SCI N=4) com os respectivos escores BBB obtidos no 14º dia pós-lesão medular por compressão moderada. O teste de regressão linear evidenciou uma relação inversa positiva ($r=0,97$ e $p < 0,001$, admitindo-se um intervalo de confiança de 95%) entre a severidade da lesão medular e a capacidade locomotora dos animais. **Pág.49.**

Figura 23: A apipuntura influencia a ativação de micróglia/macrófagos no modelo de SCI. Em **A**, membrana representativa das bandas de proteínas do marcador de micróglia/macrófago IBA-1 pelos grupos *Sham*; CTL; VB-NP e VB-E36+VG3 realizada pela técnica de Western Blot, no qual as bandas foram mensuradas por densitometria óptica e normalizadas pela banda de β -actina. Em **B**, o gráfico representa a comparação do conteúdo de proteína relativa de IBA-1 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=6), apipuntura não ponto (VB-NP, n=6), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=6) e *Sham* (n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o SEM, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados $p < 0,05$. **Pág.50.**

Figura 24: A apipuntura influencia a ativação de astrócitos no modelo de SCI. Em **A**, membrana representativa com as bandas de proteínas do anticorpo marcador de astrócitos reativos GFAP pelos grupos Sham; CTL-SCI; VB-NP e VB-E36+VG3 realizada pela técnica de Western Blot, na qual as bandas foram mensuradas por densitometria óptica e normalizadas pela banda de β -actina. Em **B**, o gráfico representa a comparação do conteúdo de proteína relativa de GFAP no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=6), apipuntura não ponto (VB-NP, n=6), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=6) e *Sham* (n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o SEM, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p<0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados $p<0,05$. **Pág.51.**

Figura 25: A apipuntura impede a redução de NeuN e de CNPase no modelo de SCI. Em **A**, membrana representativa das bandas de proteínas de NeuN e CNPase pelos grupos *Sham*, CTL-SCI, VB-NP e VB-E36+VG3 mensurados por densitometria, normalizados pela β -actina. Em **B** e **C**, os gráficos representam a comparação do conteúdo proteico de NeuN e de anti-CNPase no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão sete dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=6), apipuntura não ponto (VB-NP, n=6), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=6) e *Sham* (n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *sham* ($p<0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados ($p<0,001$). **Pág.52.**

Figura 26: Conteúdo proteico relativo do BCL-2. Em **A**, membrana representativa com as bandas de proteínas do BCL-2 pelos grupos *Sham*, CTL-SCI, VB-NP e VB-E36+VG3 mensurados por densitometria, normalizados pela β -actina. Em **B**, o gráfico representa a comparação da expressão relativa de BCL-2 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão sete dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=6), apipuntura não ponto (VB-NP, n=6), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=6) e *Sham* (n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p<0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados ($p<0,001$). **Pág.53.**

Figura 27: Expressão de RNAm da Arginase-1 na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão de RNAm da Arginase-1 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p<0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados ($p<0,05$). **Pág.54.**

Figura 28: Expressão de RNAm de TGF- β na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão de RNAm de TGF- β no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais

controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo sham ($p<0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados ($p<0,05$). **Pág.55.**

Figura 29: Expressão de RNAm da iNOS na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão do RNAm da iNOS no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo Sham ($p<0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação ao CTL-SCI e VB-PTO, $p<0,001$. **Pág.56.**

Figura 30: Influência da apipuntura sobre as expressões relativas de RNAm dos marcadores do perfil M1 e M2 de micróglia/macrófagos. Em **A**, o gráfico representa a comparação da expressão relativa de RNAm da iNOS, Arg-1 e TGF- β no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão no 5º dia após o tratamento com apipuntura (VB-E36+VG3, n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. * Indica redução significativa da expressão relativa de RNAm da iNOS em relação à expressão de RNAm da Arg-1 e do TGF- β ($p<0,001$). # Indica a redução significativa de RNAm da iNOS e da Arg-1 em relação ao TGF- β . Em **B**, gráfico representativo demonstrando que a apipuntura apresenta maior influência sobre o perfil de polarização do fenótipo M1. **Pág.57.**

Figura 31: Expressão de RNAm da COX-2 na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão do RNAm da COX-2 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p<0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação ao CTL-SCI e VB-PTO, $p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente. **Pág.58.**

Figura 32: Expressão de RNAm do NF-kB na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão do RNAm do NF-kB no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo Sham ($p<0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação ao grupo VB-NP ($p<0,05$). **Pág.59.**

Figura 33: Expressão de RNAm da Caspase 3 na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão do RNAm da caspase 3 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p<0,05$). **Pág.60.**

Figura 33: 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 micróglia e outros mediadores inflamatórios (CHOI *et al.*, 2010). Além dos efeitos citados, nossos resultados indicaram que a apipuntura foi capaz de modular os fenotipos de polarização M1/M2. 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. Pág.73.*

LISTA DE ABREVIACOES

AMPA	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato
AMPc	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BBB	<i>BBB</i> é a abreviação das iniciais dos autores (Basso, Beattie e Bresnahan) que desenvolveram a escala de avaliação locomotora após a lesão medular em ratos.
BDNF	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
bFGF	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Fator de Crescimento do Fibroblasto Básico
COX-1	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Ciclooxygenase-1
COX-2	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Ciclooxygenase-2
CREB	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Proteína de Ligação de Elemento
CSPG	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Proteoglicano Sulfato de Condroitina
DP	Doença de Parkinson
DSPG	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Proteoglicano de Sulfato de Dermatano
ER	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Receptor de Estrogênio
ERE	Elemento Responsivo ao Estrogênio
ERK	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Kinase Regulada por Sinais Extracelulares
GDNF	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Fator Neurotrófico Derivado da Glia
GLAST	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Transportador para glutamato (karki, 2014)
GLT-1	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Transportador para glutamato (karki, 2014)

GPER	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Receptor de Estrogênio acoplado à proteína G
HE	Hematoxilina e Eosina
HSPG	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Proteoglicano de Sulfato de Heparano
IGF-1	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Fator de crescimento associado à insulina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
INF-γ	Interferon- γ
iNOS	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Óxido Nítrico Sintetase Induzível
Iκ-Bα	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Inibidor do NF κ B
JNK3	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa c-Jun N-terminal Kinase 3
KSPG	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Proteoglicano de Sulfato de Keratano
MAG	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Glicoproteína Associada à Mielina
MAPK	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Proteína Kinase Ativadora de Mitógeno
mER	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Receptor de Membrana do Estrogênio
NFκB	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Fator Nuclear kappa B
NGF	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Fator de Crescimento do Nervo
NMDA	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Óxido Nítrico Sintase
OMgp	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Glicoproteína da Mielina do Oligodendrócito
OVX	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Ovariectomia bilateral

PCR	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Fosfatidil Inositol 3-Kinase
PKA	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Proteína Kinase A
PPR	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Receptores de Reconhecimento Padrão
qRT-PCR/qPCR	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Reação em Cadeia da Polimerase da transcriptase reversa em tempo real quantitativo.
RhoA	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Família de genes homólogos à Ras, membro A
RNS	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Espécies Reativas de Oxigênio
SCI	Origem do <i>inglês</i> , <i>Spinal Cord Injury</i> , que significa lesão medular.
SERM	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno
SNC	Sistema Nervoso Central
TBI	Sigla de origem do <i>inglês</i> , <i>Traumatic Brain Injury</i> , que significa Lesão Cerebral Traumática
TGF-β	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Fator Transformador de Crescimento Beta
TLR	Receptor Toll-like
TNFR1	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Receptor do Fator de Necrose tumoral
TNF-α	Sigla de origem do <i>inglês</i> que significa Fator de Necrose Tumoral Alfa.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 <i>Visão geral da medula espinal</i>	2
2.2 <i>Dados epidemiológicos sobre lesões medulares</i>	5
2.3 <i>Visão geral sobre a lesão Medular.....</i>	5
2.4 <i>Neuroinflamação na lesão medular</i>	9
2.5 <i>Tipos celulares envolvidos na resposta neuroinflamatória</i>	10
2.6 <i>Fatores inflamatórios e a regulação da apoptose em Lesões Medulares.....</i>	15
2.7. <i>Tratamentos mais abordados na lesão Medular</i>	19
2.8 <i>Dificuldades para o desenvolvimento de terapias mais eficientes para o tratamento de lesões Medulares ...</i>	21
2.9 <i>Acupuntura e modalidades da acupuntura em lesões Medulares.....</i>	22
3. OBJETIVOS	26
3.1 <i>Objetivos Gerais.....</i>	26
3.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 <i>Animais.....</i>	27
4.2 <i>Procedimentos cirúrgicos para indução da lesão medular.....</i>	27
4.3 <i>Protocolos para o tratamento com apipuntura</i>	28
4.5 <i>Análises comportamentais após a SCI</i>	37
4.5.1 <i>Teste para avaliação do desempenho locomotor de ratos pós SCI (teste BBB).....</i>	37
4.6 <i>Análise histopatológica</i>	41
4.7 <i>Western Blot para IBA-1; GFAP; BCL-2; NeuN e CNPase.....</i>	42
4.8 <i>RT-qPCR para iNOS; Arg-1; TGF-β; NF-kB; COX-2; Caspase-3; GAPDH.</i>	42
4.9 <i>Análises Estatísticas</i>	44
5. RESULTADOS	45
5.1 – <i>Efeito da apipuntura sobre testes comportamentais em ratos submetidos à lesão medular por compressão moderada.....</i>	45
5.2 <i>Efeito da apipuntura sobre a severidade do trauma medular</i>	48
5.3 <i>Efeito da apipuntura sobre astrócitos reativos e micróglia/macrófagos</i>	50
5.4 <i>Efeito da apipuntura sobre a neuroproteção de neurônios e oligodendrócitos</i>	52
5.5 <i>Efeito da apipuntura sobre fator antiapoptótico</i>	53
5.6 – <i>Efeito da apipuntura sobre a expressão de RNAm dos fenótipos de polarização de micróglia/macrófagos</i>	54
5.7 – <i>Efeito da apipuntura sobre a expressão de RNAm de fatores inflamatórios.....</i>	58
5.8 <i>Efeito da apipuntura sobre a expressão de RNAm do fator apoptótico Caspase-3.....</i>	60

6. DISCUSSÃO	61
<i>6.1 – Modelo de lesão medular por compressão.....</i>	<i>61</i>
<i>6.2. Especificidade e estimulação dos acupontos na melhora da capacidade locomotora</i>	<i>62</i>
<i>6.3– Fatores inflamatórios influenciados pela apipuntura após a lesão medular.....</i>	<i>64</i>
<i>6.4– Tipos celulares influenciados pela apipuntura após a lesão medular.....</i>	<i>66</i>
<i>6.5 – A apipuntura influencia a polarização fenotípica de micróglia/macrófagos</i>	<i>68</i>
<i>6.6– A apipuntura influencia o aumento do fator antiapoptótico e a neuroproteção.</i>	<i>70</i>
7. CONCLUSÃO	73
8 REFERÊNCIA.....	74

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular¹ é considerada uma síndrome neurológica altamente incapacitante e irreversível, onde, o indivíduo terá que conviver com sequelas consequentes das reduções sensoriais, autonômicas e motoras (como a paraplegia ou tetraplegia), que na maioria das vezes são irreversíveis e que geram impactos físicos, sociais e econômicos sobre si mesmo e sobre a sua família (ESPOSITO e CUZZOCREA, 2011; MUNCE *et al.*, 2013; MALDONADO BOUCHARD e HOOK, 2014; AHUJA *et al.*, 2017). A prevalência mundial de SCI varia de 50 a 906 por milhão de habitantes, sendo que a taxa de incidência varia de 6,2 a 174 milhões de casos/ano (FURLAN *et al.*, 2016).

No Brasil, não existem dados epidemiológicos consistentes, estima-se a ocorrência de 16 a 26 casos por ano (ROUANET *et al.*, 2017). A SCI gera gastos orçamentários anuais de, aproximadamente, 300 milhões de reais para o Sistema Único de Saúde (SUS) com cirurgias e programas de reabilitações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Segundo o centro brasileiro de neuroreabilitação, a Rede Sarah, as principais etiologias de lesões medulares são ocasionadas por acidentes automobilísticos, violência urbana e acidentes domésticos.

Os estudos sobre os mecanismos fisiopatológicos após o trauma medular inicial deram origem ao entendimento de dois eventos cronológicos distintos: a lesão primária e a lesão secundária. A lesão primária, também denominada de dano primário, é iniciada pela fratura da coluna vertebral que gera um dano local e segmental no tecido da medula espinal. Já a lesão secundária, também referida como dano secundário, é produzida por uma série de eventos progressivos que são desencadeados pelo dano inicial, no qual, ocorrem alterações moleculares, celulares e bioquímicas que geram um ciclo de retroalimentação e promovem perdas de tecido medular que podem durar de meses a anos (OYINBO, 2011; GENSEL e ZHANG, 2015; AHUJA *et al.*, 2017).

Devido à cronificação dos eventos associados com a resposta inflamatória, as pesquisas sobre SCIs têm focado no estudo de tratamentos e terapias que sejam capazes de modificar a exagerada resposta inflamatória. A resposta inflamatória intensifica o dano secundário e a disfunção tecidual ao redor da lesão inicial já que, dificilmente ocorrerá a reposição do tecido perdido, (devido à limitada capacidade intrínseca do SNC em promover a neurogênese e a oligodendrogênese) assim como pela geração de um ambiente totalmente aversivo à regeneração (AHUJA *et al.*, 2017).

Os tratamentos atuais para SCIs são extremamente limitados, não existindo até o momento, nenhuma terapia que seja eficiente em minimizar as perdas neurológicas iniciais e tardias. A prática clínica com a acupuntura têm se tornado cada vez mais frequente no ocidente para aliviar as disfunções neurológicas em vários tipos de doenças degenerativas como na lesão medular, na Doença de Parkinson (PD) e na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Em pesquisas experimentais, diversas modalidades da acupuntura têm demonstrado resultados benéficos em diferentes modelos de doenças neurodegenerativas, entretanto, os mecanismos de ação da acupuntura ainda são pouco compreendidos.

Assim, o presente estudo investigou se a acupuntura, uma modalidade de acupuntura, poderia ser usada como terapia complementar capaz de minimizar os déficits gerados pela SCI. Para entender alguns dos possíveis mecanismos de ação associados com a acupuntura, foram avaliados os tipos celulares envolvidos, fatores da resposta inflamatória e a resposta apoptótica que poderiam ser influenciados pelo uso da acupuntura.

¹ Ao longo do texto, o termo lesão medular será substituído pela sigla SCI que vêm do inglês *spinal cord injury*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para entender a geração de déficits funcionais e motores após a SCI, uma breve revisão foi realizada sobre a organização da medula espinal, além de uma abordagem da dificuldade para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos eficientes e as possíveis vantagens do uso da acupuntura como terapia coadjuvante.

2.1 Visão geral da medula espinal

Por muitos séculos, a medula espinal foi considerada como apenas uma extensão do SNC, sendo uma estação intermediária entre o encéfalo e a periferia (MARKATOS *et al.*, 2017). Acreditava-se que essa estação intermediária fosse capaz apenas de responder de forma estereotipada a aferências de receptores sensoriais periféricos e projetasse os comandos descendentes do encéfalo à musculatura esquelética (PEARCE, 2008; MIELE *et al.*, 2012; KIEHN, 2016).

Na literatura atual encontra-se bem estabelecido que na medula espinal existem organizações de circuitos neurais que modulam e alteram sinais ascendentes periféricos e sinais descendentes do encéfalo, de forma que sua importância se torna ainda mais evidente quando ocorrem desordens que alteram a homeostase (MIELE *et al.*, 2012; KIEHN, 2016; KJELL e OLSON, 2016).

2.1.1 Anatomia, histologia e tipos celulares na medula espinal

Numa perspectiva macroscópica, a medula espinal é envolta e protegida por três membranas fibrosas denominadas meninges e por um estojo ósseo denominado coluna vertebral (WILTSE, 2000) (FIGURA 1). As três meninges que envolvem a medula espinal são a dura-máter, a aracnoide e a pia-máter. A membrana mais externa, espessa e resistente é a meninge dura-máter, a membrana intermediária é a meninge aracnoide e a membrana mais interna, e que fica intimamente aderida à superfície do tecido nervoso medular, é a meninge pia-máter (WILTSE, 2000; MIELE *et al.*, 2012) (FIGURA 1).

Numa visão estrutural anatômica, no tecido medular espinal é possível observar duas regiões distintas: uma região central mais escura chamada substância cinzenta que é circundada por uma região denominada substância branca (WILTSE, 2000; KIEHN, 2016) (FIGURA 1).

A substância cinzenta apresenta um formato que lembra a letra H e a coloração mais escura se deve, principalmente, à presença de corpos de neurônios (WILTSE, 2000). A organização citoarquitetônica da substância cinzenta forma 10 lâminas, as lâminas de *Rexed* (FIGURA 2). Essas lâminas estão dispostas em toda sua extensão, indo do corno dorsal ao corno ventral. O corno dorsal contém um arranjo ordenado de neurônios sensoriais que recebem aferências da periferia, e o corno ventral contém os núcleos de neurônios motores que inervam grupos de fibras musculares específicas (WILTSE, 2000; KIEHN, 2016; Miele, 2012).

A substância branca localiza-se periféricamente, rodeando a substância cinzenta, e nela estão contidos, principalmente, os feixes de axônios mielinizados que formam as vias ascendentes, longitudinais, através das quais a informação chega até o encéfalo, sendo, convencionalmente, dividida em funículos dorsal, lateral e ventral (WILTSE, 2000; KIEHN, 2016) (FIGURA 2).

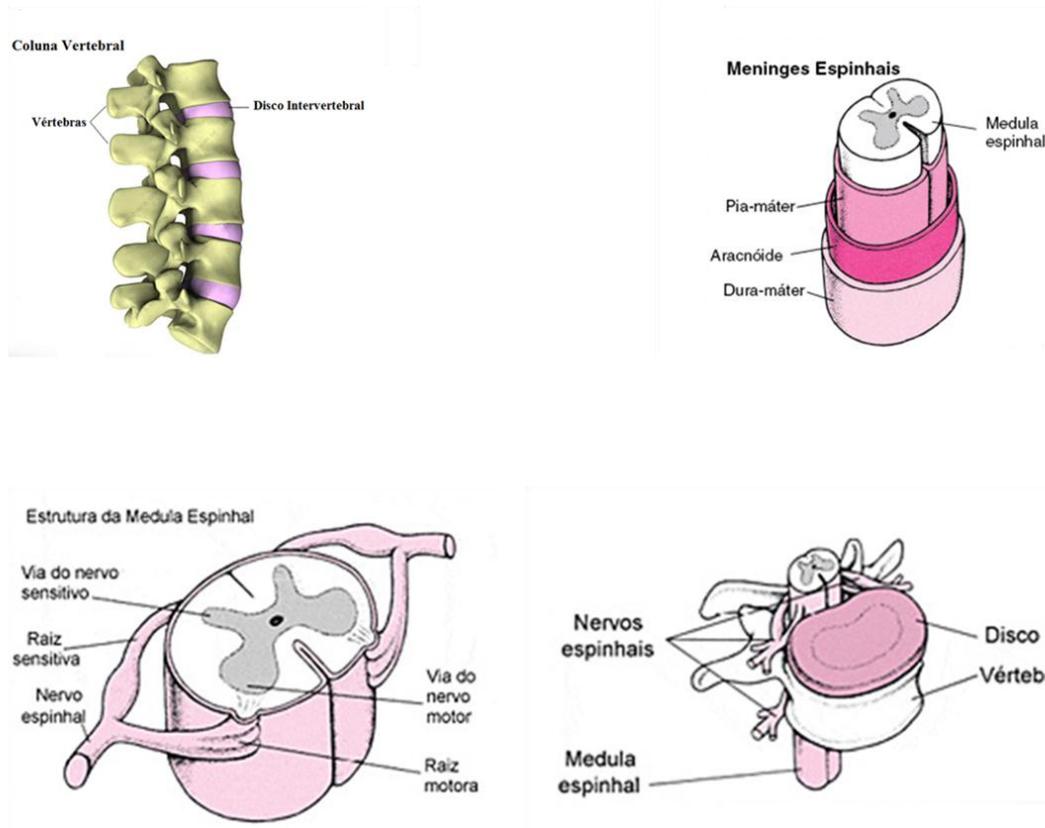


Figura 1 - Esquema ilustrando a coluna vertebral e a medula espinal humana. Estruturas externas e internas da medula espinal. Fonte: World Wide, no endereço eletrônico: <http://biosphera.com.br> e <http://msdonline.com.br>, pesquisado no dia 08/03/2017.

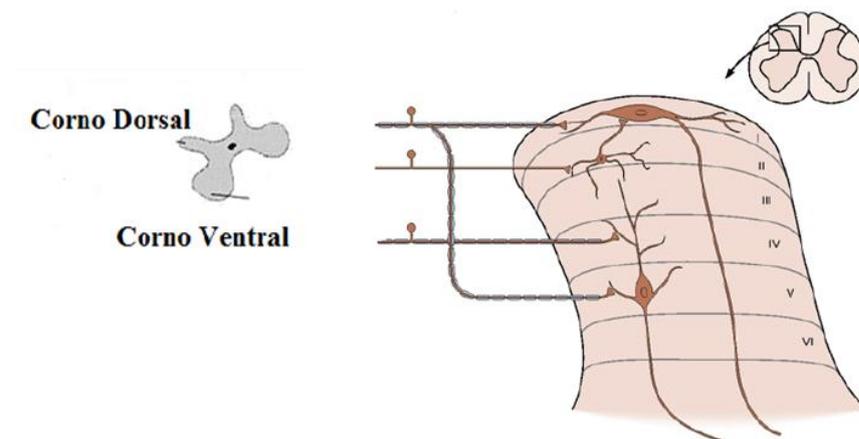


Figura 2- Desenho esquemático da organização citoarquitônica das lâminas de Rexed no corno dorsal da medula espinal. O esquema demonstra as subdivisões da substância cinzenta em corno dorsal e ventral e a entrada de diferentes fibras sensoriais periféricas no corno dorsal nas lâminas de Rexed na medula espinal. Fonte: modificado de Kandel, 2000.

Os tipos de celulares que compõem a substância cinzenta, branca e toda a extensão do tecido nervoso medular em si são divididos em duas classes principais de células: células

nervosas (neurônios) e células da glia (MIELE *et al.*, 2012; KIEHN, 2016; KJELL e OLSON, 2016)

As unidades funcionais do sistema nervoso são os neurônios. Os neurônios promovem conexões chamados sinapses, nas quais ocorre a liberação de sinais químicos, denominados neurotransmissores, que podem estimular ou inibir células nervosas ou outras células do organismo (GARNER *et al.*, 2000; MOTTAHEDIN *et al.*, 2017).

Por muitos séculos, as células da glia foram consideradas apenas como células de preenchimento do tecido nervoso. Atualmente, sabe-se que as células da glia desempenham complexas funções para a manutenção da homeostase no SNC (FREIRE-REGATILLO *et al.*, 2017). As células da glia são as células mais numerosas do SNC e aparecem circundando todas as estruturas que constituem as células neuronais (corpos celulares, axônios e dendritos) (JESSEN, 2004). As células da glia são divididas didaticamente em duas classes principais: micróglia e macróglia.

A micróglia reside no SNC e apresenta função equivalente aos macrófagos (CASANO e PERI, 2015; DAVID *et al.*, 2015). As macroglias são subdivididas em dois tipos celulares no SNC: oligodendrócitos e astrócitos. Os oligodendrócitos são as células que formam a bainha de mielina que envolve e isola os axônios dos neurônios, protegendo-os e tornando a propagação dos impulsos nervosos mais rápidas (JESSEN, 2004). Os astrócitos desempenham inúmeras funções como a formação da barreira hematoencefálica que protege o SNC, a manutenção da concentração iônica, a regulação atividade sináptica por captação de neurotransmissores (RANSOM *et al.*, 2003; JESSEN, 2004; PEKONY *et al.*, 2014).

Existe outro grupamento de célula da glia que são as células NG2. As células NG2 são células diferentes de oligodendrócitos e de astrócitos que, em algumas situações, podem se desdiferenciar em células progenitoras de oligodendrócitos ou em astrócitos (TRIPATHI *et al.*, 2010; HACKETT *et al.*, 2016).

Existe uma ampla semelhança morfológica e fisiológica da medula espinal dos humanos com a medula espinal dos roedores, inclusive em relação à localização dos tratos ascendentes e descendentes por onde são propagadas as informações sensoriais e motoras (VANICKÝ *et al.*, 2001; KWON *et al.*, 2004; KJELL e OLSON, 2016) (FIGURA 3). Devido a essa similaridade, modelos de estudos com roedores são muito utilizados em pesquisas científicas no âmbito do campo de estudo de SCIs (KJELL e OLSON, 2016).

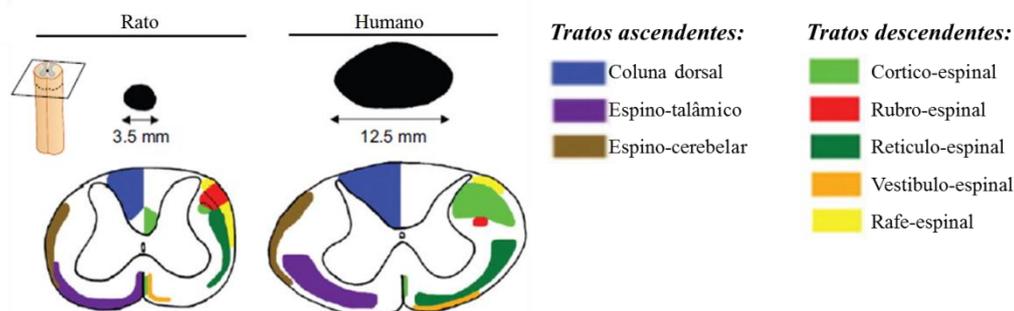


Figura 3- Desenho esquemático comparando o tecido medular espinal de ratos com o de humanos. O esquema demonstra a similaridade da medula espinal de ratos e de humanos, assim, como a localização dos tratos ascendentes e descendentes por onde são propagadas as informações sensoriais e motoras. Fonte: modificado de Kjell et al., 2016.

2.2 Dados epidemiológicos sobre lesões medulares

Apesar de a SCI ser considerada uma síndrome neurológica altamente incapacitante e irreversível, existe uma escassez mundial de dados epidemiológicos disponíveis (Lee et al., 2014; Furlan et al., 2016; Glennie et al., 2017).

Informações sobre a quantidade de pessoas vivendo em tal condição e da incidência de novos casos por ano são ínfimas (New et al., 2014; Jazayeri et al., 2015). Muitas regiões do mundo não possuem nenhum dado estatístico sobre os casos de lesões medulares, sendo a maioria dos dados apenas estimativa (Lee et al., 2014; New et al., 2014; Jazayeri et al., 2015; Furlan et al., 2016).

A estimativa mundial de indivíduos vivendo com SCI não é precisa. Os artigos de revisões sobre o tema apresentam variações bruscas que variam de 50 a 906 mil casos de SCIs/milhão de habitantes, sendo a estimativa de incidência de 6,2 a 174 mil novos casos/milhões de habitantes/ano (New et al., 2014; Jazayeri et al., 2015; Furlan et al., 2016).

No Brasil, também, não existem dados epidemiológicos consistentes sobre a SCI. Existe uma estimativa de 16 a 26 casos por ano (Rouanet et al., 2017). Segundo o Ministério da Saúde, SCIs geram gastos orçamentários de, aproximadamente, 300 milhões de reais para o Sistema Único de Saúde (SUS) com as cirurgias e os programas de reabilitações (Ministério da Saúde, 2013).

As etiologias mais comuns de SCIs são decorrentes de traumas, doenças na coluna vertebral ou na própria medula espinal que, dependendo da gravidade, podem afetar sua capacidade de mandar e receber informações, gerando deficiências sensoriais, motoras e autonômicas (OYINBO, 2011; MALDONADO BOUCHARD e HOOK, 2014).

Segundo informações no site do centro brasileiro de neuroreabilitação, a Rede Sarah¹, as principais etiologias de lesões medulares são as traumáticas ocasionadas por acidentes automobilísticos, violência urbana e acidentes domésticos, sendo um predomínio da ocorrência de lesão medular em indivíduos jovens do sexo masculino (Rede Sarah, 2016).

2.3 Visão geral sobre a lesão Medular

As lesões podem ser definidas como traumáticas e não traumáticas, herdando essas nomenclaturas de acordo com o seu fato gerador (KWON *et al.*, 2004; KJELL e OLSON, 2016). A lesão não traumática, geralmente, é decorrente de doenças no disco intervertebral, como hérnia, meningite, poliomielite e tumor (KWON *et al.*, 2004; KJELL e OLSON, 2016), enquanto a lesão medular traumática é gerada por impacto mecânico, no qual, quando muito intenso, não é totalmente amortecido pela estrutura óssea da coluna vertebral, afetando a medula espinal (KWON *et al.*, 2004) (FIGURA 4).

¹ Consulta realizada no dia 05/2/2017 no site <http://www.sarah.br/programas-educacionais/estudos-epidemiologicos/>.

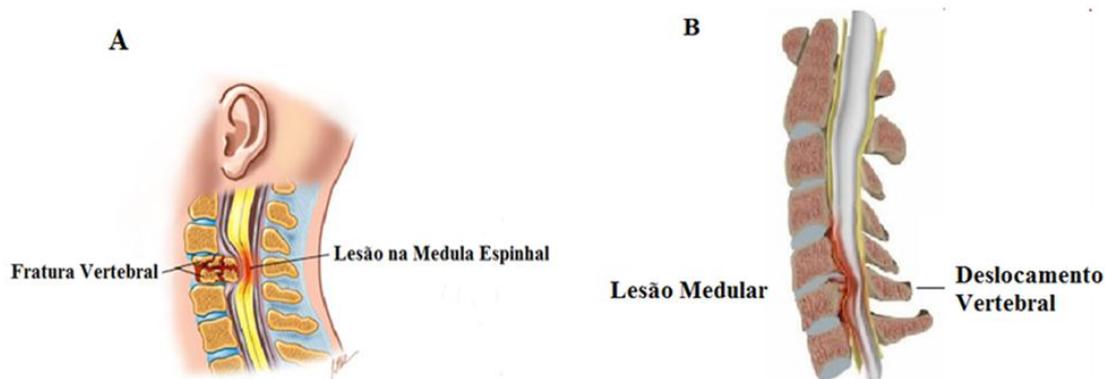


Figura 4 - Esquema ilustrando Lesão Traumática. Em A, o desenho esquemático ilustra uma fratura óssea promovendo uma lesão na medular. Em B, o desenho esquemático ilustra uma força compressiva também promovendo uma lesão medular. Fonte: retirado em 08/03/2017 do site: <http://servidoresjt.wordpress.com>.

Como citado anteriormente, a maioria das etiologias de SCI, no Brasil e no Mundo, é ocasionada por traumas (SCHWAB, 2002; KWON *et al.*, 2004; OYINBO, 2011; MORAIS *et al.*, 2013; THOMATY *et al.*, 2017). Por esse motivo, essa revisão concentra-se na SCI traumática e suas consequências.

Dependendo do nível e intensidade após SCI traumática, a medula espinhal perde sua capacidade de mandar para e receber informação do encéfalo, tendo como principal consequência a geração de tetraplegia (lesões abaixo das vértebras cervicais) (FIGURA 4A) ou paraplegia (lesões abaixo das vértebras lombares) (FIGURA 4B), que podem ser classificadas como completa, quando ocorre transecção total; ou incompleta, quando não há rompimento total da medula espinhal (KWON *et al.*, 2004; ESPOSITO e CUZZOCREA, 2011; OYINBO, 2011; THOMATY *et al.*, 2017).

Sendo a SCI completa ou não, a medula espinhal, que é o ponto de comunicação com os centros de integração encefálicos, fica interrompido, o que resulta numa perda da sensibilidade abaixo do nível da lesão (paraplegia ou tetraplegia) (ESPOSITO e CUZZOCREA, 2011). Nesse caso, a paralisia não significa que os músculos não possam funcionar, o que ocorre é que eles não podem ser controlados por comandos vindos de centros superiores no encéfalo, gerando perdas proprioceptivas e imprecisões na organização do comportamento motor (AHUJA *et al.*, 2017; THOMATY *et al.*, 2017).

Além do comprometimento motor, também podem ocorrer perdas de percepções sensoriais e autonômicas (Esposito e Cuzzocrea, 2011; Wilson e Buchowski, 2012; Nardone *et al.*, 2015; Brommer *et al.*, 2016; Kjell e Olson, 2016; Ahuja *et al.*, 2017).

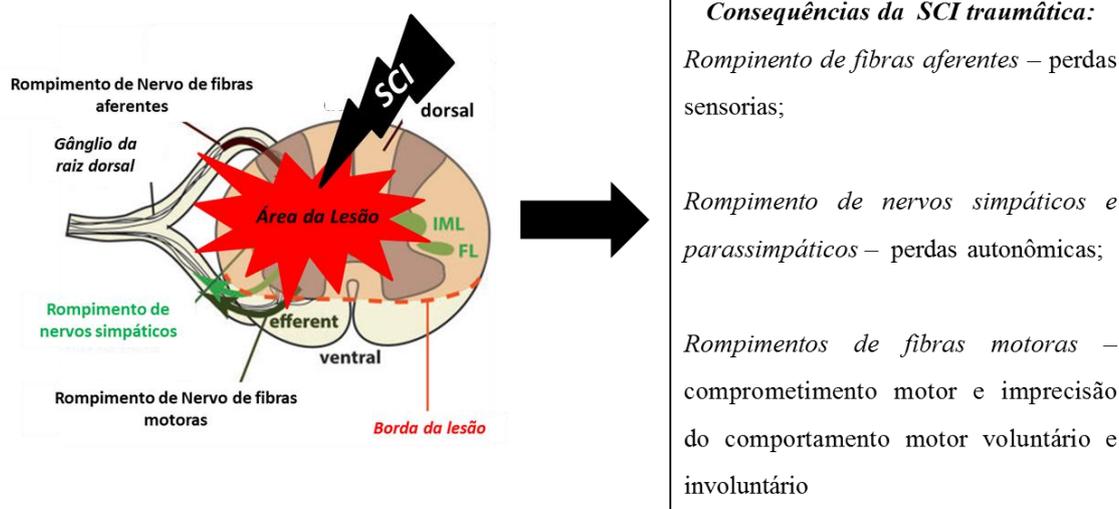


Figura 5 – Desenho esquemático da lesão medular traumática e suas consequências. O esquema demonstra a SCI e o rompimento de fibras dos tratos ascendentes e descendente por onde são propagadas as informações sensoriais e motoras aferentes e eferentes e as consequentes perdas sensoriais, motoras e autonômicas. Fonte: modificado de Brommer et al., 2016.

Paralelamente à intensa degeneração neurológica e consequente comprometimento motor e funcional também podem surgir complicações secundárias, como infecções urinárias, pneumonias, sepse, entre outras (ESPOSITO e CUZZOCREA, 2011; KJELL e OLSON, 2016).

Uma explicação plausível é que devido às interrupções de vias autonômicas ocorrem perdas da capacidade do SNC em modular o sistema imunológico principalmente por desregulação da via de glicocorticoides promovendo prejuízos do monitoramento pelo sistema imune sendo denominado como síndrome de imunodeficiência induzida por lesão no SNC (SCHWAB *et al.*, 2014; BROMMER *et al.*, 2016). A síndrome de imunodeficiência induzida por lesão no SNC é responsável por altas taxas de mortalidade entre indivíduos após a SCI (ESPOSITO e CUZZOCREA, 2011; BROMMER *et al.*, 2016; KJELL e OLSON, 2016; ULNDREAJ *et al.*, 2016).

2.3.1 Fisiopatologia da lesão Medular

Os estudos sobre os mecanismos fisiopatológicos após o trauma medular inicial deram origem ao entendimento de dois eventos cronológicos distintos: a lesão primária e a lesão secundária (OYINBO, 2011; AHUJA *et al.*, 2017)

A lesão primária, também denominada dano primário, refere-se ao impacto mecânico que gera a fratura na coluna vertebral e, subsequentemente, a lesão tecidual pela penetração de forças compressivas. Raramente após o impacto mecânico, ocorre a transecção total da medula espinhal (KWON *et al.*, 2004). Imediatamente após o dano primário, toda a arquitetura e a homeostase tecidual da medula espinhal são alteradas em decorrência da morte de neurônios, oligodendrócitos, rompimento de axônios e liberações de moléculas que irão desencadear o dano secundário (SCHWAB, 2002; KWON *et al.*, 2004; BAREYRE, 2008; ESPOSITO e CUZZOCREA, 2011; OYINBO, 2011; KJELL e OLSON, 2016; AHUJA *et al.*, 2017).

Na lesão secundária, também chamada dano secundário, existe uma subdivisão em: fase aguda, subaguda e crônica, que servem para elucidar o fato de que os danos secundários podem persistir por dias, meses e anos após o estímulo inicial (KWON *et al.*, 2004; OYINBO, 2011).

O dano secundário envolve alterações vasculares, celulares e moleculares, como isquemia, estresse oxidativo, morte de neurônios e oligodendrócitos por apoptose, necrose, autofagia e neuroinflamação (HAUSMANN, 2003; KWON *et al.*, 2004; OYINBO, 2011; SHI *et al.*, 2016; AHUJA *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2017). Essas alterações ocorrem num processo dinâmico e progressivo, no qual uma alteração pode intensificar a outra (KWON *et al.*, 2004; ESPOSITO e CUZZOCREA, 2011; OYINBO, 2011; LIPINSKI *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017) (FIGURA 6). Os principais danos secundários encontram-se resumidos na tabela 1.

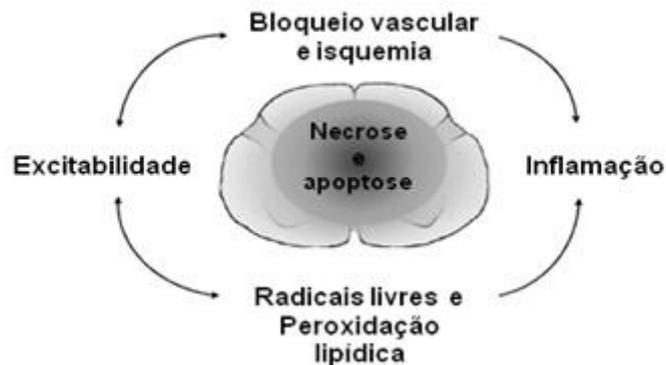


Figura 6: Danos secundários e as suas interações após a lesão medular. Seguido o trauma inicial uma complexa combinação de processos que incluem isquemia, inflamação, excitotoxicidade e danos oxidativos induzem uma maior perda de tecido neural ocorrendo assim necrose e morte celular por necrose na medula 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.*

PRINCIPAIS MECANISMOS SECUNDÁRIOS APÓS A SCI

Morte de neurônios e oligodendrócitos
Rompimento de axônios
Formação de cicatriz glial
Influxo celular de cálcio
Geração de espécies reativas de oxigênio
Bloqueio da condução neural e choque espinal
Desmielinização de axônios residuais e desmielinização de axônios intactos após a lesão
Desarranjo da homeostase iônica
Falha energética e diminuição da produção de ATP
Acumulação de fluidos / edema no local da lesão
Excitotoxicidade glutamatérgica
Invasão de células do sistema imunológico e liberação de citocinas
Inflamação
Isquemia / dano endotelial induzido pela reperfusão
Peroxidação lipídica / estresse oxidativo
Fatores inibitórios do crescimento de tecido neural
Excesso de óxido nítrico
Produção de citocinas e fatores inflamatórios

Tabela 1: Resumo dos principais danos secundários à lesão medular. Modificado de Oyinbo, 2011 e Hausmann, 2003.

Trabalhos experimentais e revisões recentes indicam que, dentre os danos secundários, a neuroinflamação e a sua cronificação são os maiores contribuintes para a promoção do aumento da extensão da área da lesão medular e progressiva disfunção tecidual, tornando-se o foco de pesquisas terapêuticas atuais (HAUSMANN, 2003; CONTI *et al.*, 2007; DAVID e KRONER, 2011; DAVID *et al.*, 2012; MALDONADO BOUCHARD e HOOK, 2014; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015). Assim, o principal dano secundário abordado nesta revisão será a dualidade da resposta da neuroinflamação e sua contribuição para o aumento de perdas teciduais perilesão que, na maioria das vezes, são irreversíveis.

2.4 Neuroinflamação na lesão medular

O termo neuroinflamação refere-se à resposta inflamatória que ocorre no encéfalo e na medula espinal (DISABATO *et al.*, 2016). A neuroinflamação é considerada como uma rede equilibrada de complexos processos pelos quais mudanças sutis podem determinar maiores ou menores neurodegenerações teciduais (GENSEL e ZHANG, 2015; DISABATO *et al.*, 2016; KEMPURAJ *et al.*, 2016). Sendo assim, o entendimento dos complexos mecanismos, que regem a resposta inflamatória na SCI, tornam-se essenciais para o desenvolvimento de terapias mais eficientes (DAVID *et al.*, 2012; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; MA *et al.*, 2015).

Em condições patológicas, como o trauma e doenças degenerativas, muitas evidências apontam uma natureza neurotóxica da resposta inflamatória. Contudo, outros estudos indicam que a neuroinflamação pode ser benéfica sob certas circunstâncias, por estimular o reparo da mielina, remover proteínas tóxicas e fagocitar restos celulares que prejudicam a regeneração do SNC (DAVID e KRONER, 2011; DAVID *et al.*, 2012; DISABATO *et al.*, 2016). Daí vem o ditado que diz que a resposta neuroinflamatória é uma “faca de dois gumes” que está intimamente associada à atividade de micróglia/macrófagos (CHEN *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2016).

Acredita-se que a resposta incontrolada e o extremo desbalanço imune sejam os responsáveis pela perda e pela disfunção celular, em que a resposta inflamatória exagerada, iniciada pela micróglia, tornando-se potencialmente piorada com a entrada de células imunes da periferia (DAVID *et al.*, 2012; RUBIO-PEREZ e MORILLAS-RUIZ, 2012; SCHWAB *et al.*, 2014; ANSARI, 2015; CHEN *et al.*, 2015; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015).

Neste tópico, serão abordadas as principais alterações celulares, moleculares e bioquímicas que ocorrem na resposta neuroinflamatória, dando ênfase sobre as microglia/macrófagos, que são as primeiras e principais células a orquestrar a resposta após a SCI.

2.5 Tipos celulares envolvidos na resposta neuroinflamatória

O grau de extensão dos danos neurológicos vai depender da inter-relação entre o trauma inicial, a resposta de células locais e o sistema imune periférico (CARSON *et al.*, 2006).

Células no sítio da lesão, como as células endoteliais, os neurônios, os oligodendrócitos, os astrócitos e a micróglia, podem responder ao dano inicial sintetizando e liberando citocinas próinflamatórias, quimiocinas e padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs), promovendo o recrutamento de células periféricas em resposta a esses fatores (DAVID *et al.*, 2012; DAVID *et al.*, 2012; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015).

A - Micróglia/Macrófagos

Os macrófagos são as principais células do sistema imune inato, responsáveis por manter a homeostase tecidual, gerando respostas a quaisquer desequilíbrios que ocorram no seu microambiente de monitoração (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; CHEN *et al.*, 2016; DISABATO *et al.*, 2016; LOANE e KUMAR, 2016; NORDEN *et al.*, 2016). Os macrófagos residentes são, ainda, as principais células a responderem a alterações no SNC. Vários tipos de macrófagos são encontrados no SNC e diferem quanto à morfologia, função e regiões que monitoram (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; TANG *et al.*, 2015).

Quanto à origem, a micróglia deriva de progenitores mielóides do saco vitelínico e são os fagócitos residentes no SNC (SAIJO *et al.*, 2013; BILIMORIA e STEVENS, 2015; DAVID *et al.*, 2015). Essas células são fundamentais durante a fase de desenvolvimento, visto que são as responsáveis pela remoção de células apoptóticas e de conexões neurais inapropriadas, pela formação de sinapses, sendo de grande importância para o amadurecimento do sistema nervoso (SCHAFER *et al.*, 2013; BILIMORIA e STEVENS, 2015).

Recentes trabalhos e revisões demonstram a sua participação na manutenção da homeostase do SNC através de um sistema de interação de sinapses quadripartites com neurônios e astrócitos (SCHAFER *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2015).

No sistema nervoso maduro, a micróglia é a principal célula-sentinela, atuando na defesa. Quando não está ativa durante a resposta inflamatória, o seu estado é denominado erroneamente como estado de repouso, uma vez que está em constante processo de varredura (DAVID *et al.*, 2015; DISABATO *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016). Alguns mecanismos são propostos por manterem o “estado de repouso” da microglia em situação de homeostase no SNC. O mecanismo mais bem compreendido ocorre pela liberação da quimiocina CX3CL1, por neurônios em contato sináptico com micróglia, modulando, assim, sua ativação (SAIJO *et al.*, 2013; BILIMORIA e STEVENS, 2015; WU *et al.*, 2015).

Esse elo de comunicação entre os neurônios e as células da glia, principalmente microglia, é de extrema importância para se torne polarizada apenas quando tiver que responder a algo que ponha em perigo a quebra da homeostase, por exemplo, as invasões por patógenos ou traumas, evitando, assim, o desenvolvimento de respostas inflamatórias

exageradas, como ocorre nas doenças neurodegenerativas (GAO e HONG, 2008; WU *et al.*, 2015; KEMPURAJ *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que, após a ocorrência de um trauma, os macrófagos no sítio da lesão podem ter origem a partir de micróglia residente ou macrófagos hematógenos (DAVID *et al.*, 2015; RITZEL *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2016). Quando em estado de repouso, a micróglia pode ser distinguida dos macrófagos hematógenos devido à baixa expressão do marcador CD45 (DAVID *et al.*, 2015). Quando ativas, expressam altos níveis do marcador CD45 e não podem ser distinguidas de macrófagos hematógenos apenas por sua morfologia e expressões de marcadores (DAVID *et al.*, 2015; RITZEL *et al.*, 2015; BENNETT *et al.*, 2016).

Dessa forma, torna-se evidente que a micróglia residente é a primeira célula a responder a desordens no SNC, mas isso não se deve apenas ao fato de residir no compartimento do sistema nervoso (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; NORDEN *et al.*, 2016). Para realizar essa função, a micróglia expressa uma variedade de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) – que incluem receptores *Toll-Like* (TLRs), como TLR4, inflamassomas¹, receptores purinérgicos (por exemplo, P2X7R) e receptores *scavenger* (por exemplo, CD86) (CHEN *et al.*, 2016; DE RIVERO VACCARI *et al.*, 2016; EUGENIN *et al.*, 2016).

Trabalhos experimentais evidenciaram que proteínas e fatores liberados a partir da ruptura celular após SCI, os DAMPs, podem ativar a micróglia por meio da estimulação de um conjunto de receptores (SAIJO *et al.*, 2013; LITTLE *et al.*, 2014). As placas β -amiloide e α -sinucleína que são depositadas na doença de Alzheimer (DA) e na doença de Parkinson (DP), respectivamente, são reconhecidas como DAMPs e junto com outros fatores, como as citocinas pró-inflamatórias (IL- β , TNF- α e IL-6), podem promover a polarização da micróglia (LITTLE *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016).

Após a lesão medular, altos níveis de glutamato atuam também como sinal de perigo, estimulando a ativação microglial (NAKAJIMA *et al.*, 2008). Esse neurotransmissor pode ativar receptores NMDA, AMPA e metabotrópico. Ao ativarem receptores AMPA, ocorre desbloqueio dos canais NMDA com influxo de cálcio (Ca²⁺) e abertura de canais de Ca²⁺ voltagem dependente, liberando ainda mais glutamato para o meio extracelular, que vai ativar neurônios remanescentes que, por sua vez, irão secretar glutamato (TUFAN *et al.*, 2008; OYINBO, 2011). Esse fenômeno é conhecido como excitotoxicidade (TUFAN *et al.*, 2008).

Todo esse ciclo de retroalimentação de excitotoxicidade promoverá a morte de neurônios por meio da ativação da cascata de apoptose (OYINBO, 2011). Ademais, o aumento do influxo de água, juntamente com a entrada de íons sódio (Na⁺), poderá promover a lise da célula (HAUSMANN, 2003; KWON *et al.*, 2004; OYINBO, 2011).

Pesquisas recentes em diversos campos da ciência, incluindo estudos sobre doenças neurais e não neurais, como as doenças causadas por infecções bacterianas e tumorais, revelaram que os macrófagos podem adquirir diversos estados de ativações (Wang *et al.*, 2014; David *et al.*, 2015; Disabato *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016). Citocinas e outros fatores liberados dentro do microambiente tecidual após a SCI ativam os macrófagos, direcionando-os num processo de diferenciação no qual podem se polarizar num fenótipo pró-inflamatório ou anti-inflamatório (Shechter e Schwartz, 2013; Murray *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2016).

A micróglia e os macrófagos podem, quando polarizados, exibir tanto propriedades protetoras e reparativas como deletérias, dependendo de toda uma dinâmica no contexto da doença (Shechter e Schwartz, 2013; Murray *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2016). Acredita-se que a plasticidade dessas células é a principal responsável pela dualidade da resposta inflamatória (SHECHTER e SCHWARTZ, 2013; DAVID *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2015; DISABATO *et al.*, 2016).

¹Inflamassomas são complexos gerados que compreendem ampla plataforma de moléculas para ativação da Caspase-1 e contribuem para a produção de IL-1 β .

- Paradigma M1/M2 (ativação clássica versus alternativa)

Os fenótipos M1/M2 são paradigmas simplificados na tentativa de decifrar as complexas respostas pro e anti-inflamatórias, no qual M1 é proinflamatório e M2 é anti-inflamatório (CZECH *et al.*, 2011).

Quando ocorre quebra da homeostase, essas células tornam-se ativas em resposta a fatores liberados, principalmente citocinas pro e anti-inflamatórias, DAMPs, direcionando-as num processo denominado “ativação clássica”, “ativação alternativa” ou “desativação adquirida” (CHEN *et al.*, 2015; DAVID *et al.*, 2015; DISABATO *et al.*, 2016; TANG e LE, 2016). Ainda não existem evidências de diferenças morfológicas nesses estados de ativação, porém existem evidências de diferentes marcadores fenotípicos expressos e que esses estados podem coexistir em diferentes fases da resposta inflamatória (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015).

Coletivamente, trabalhos e revisões literárias ilustram a presença dos dois perfis principais, M1 e M2, parecendo existir um predomínio do perfil M1 na SCI (GENSEL e ZHANG, 2015). Especula-se que essa ativação dessincronizada entre M1/M2 seja preponderante para intensificar perdas neurológicas, devido ao atraso para início da fase resolutive e podendo se prolongar por anos (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; KUMAR *et al.*, 2016; LOANE e KUMAR, 2016).

Durante o papel mais defensivo M1, as micróglia induzem a neurotoxicidade, devido à liberação de fatores proinflamatórios e vários mediadores da inflamação, atraindo células imunes da periferia e gerando um ciclo de retroalimentação positiva da inflamação que culmina com uma alta taxa de morte de neurônios e oligodendrócitos (DAVID *et al.*, 2015, GENSEL e ZHANG, 2015, HU *et al.*, 2015, DISABATO *et al.*, 2016). Após o início desse estado de ativação clássico, a fase anti-inflamatória deveria ser rapidamente iniciada para promover o correto processo de cicatrização e retorno da homeostase tecidual, sendo o fenótipo M2 o maior efetor para o reparo em potencial (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015).

Na “ativação alternativa” ou “desativação adquirida” existem complexos subtipos de ativação (M2a, M2b e M2c) que possuem uma natureza funcional muito complexa e pouco conhecida em seus detalhes (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; TANG e LE, 2016). Fenótipos M2 exibem propriedades reparativas, como a atenuação da produção de citocinas proinflamatórias (IL- β ; TNF- α ; IL-6) e menor produção de espécies ROS (espécies reativas de oxigênio). Ademais, também secretam citocinas imunossupressoras como IL-10 e quimiocinas CCL17, CCL18 e CCL22 para atrair leucócitos anti-inflamatórios, aumentando receptores para a fagocitose e estimulando-os a secretar fatores de crescimento (DISABATO *et al.*, 2016; TANG e LE, 2016; WASSER *et al.*, 2016).

O grande questionamento nas revisões sobre o tema é como modular, em meio à variedade e à complexidade fenotípicas exibidas por essas células, para que ocorra mínimo dano neurológico após o desencadeamento do processo neuroinflamatório em doenças neurodegenerativas e SCIs (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; HU *et al.*, 2015; DISABATO *et al.*, 2016; KEMPURAJ *et al.*, 2016).

- Marcadores dos fenótipos M1/M2

Geralmente, para associar microglia/macrófagos ativos com fenótipos M1/M2, faz-se o uso de IBA-1, CD86, CD45, MAC-1, OX-42, AIF-1, associados à marcação de iNOS, Arg-1, CD206, TGF- β , entre outros. Encontram-se listados abaixo alguns marcadores dos fenótipos M1/M2.

IBA-1 – ou molécula adaptadora do ligante de cálcio ionizado, é o marcador de micróglia e macrófagos, sendo mais expresso por essas células quando ativas. O marcador

IBA-1 é o mais difundido nas pesquisas experimentais, pois sua expressão apenas ocorre por essas células (HOOGLAND *et al.*, 2015; STANKOV *et al.*, 2015).

iNOS – é uma enzima muito utilizada como marcador para o fenótipo M1 (KIGERL *et al.*, 2009; CHERRY *et al.*, 2014). Existem três isoformas da NOS (óxido nítrico sintetase) que são a nNOS (óxido nítrico sintetase neuronal), eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial) e a iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) (MAGGIO *et al.*, 2017). A iNOS é a única isoforma induzida pelo processo inflamatório, sendo uma enzima-chave na resposta inflamatória e no estresse oxidativo (MAGGIO *et al.*, 2012). O produto final da atividade da iNOS é o óxido nítrico (NO), um gás produzido pela conversão de L-arginina em L-citrulina (CONTI *et al.*, 2007). Djab e colaboradores (2010) demonstraram que o NO produzido durante o processo inflamatório também é responsável pela conversão da microglia do estado de repouso para ativo, alterando sua morfologia ramificada em ameboide, indicando o NO como indutor direto na microgliose *in vivo*.

Arginase-1 – (Arg1) é um típico marcador do fenótipo M2 e seus níveis são muito aumentados na fase inflamatória aguda (GENSEL e ZHANG, 2015). Essa enzima participa do metabolismo da arginina, sendo sua produção induzida, principalmente, por IL-4 e IL-13 (DAVID *et al.*, 2015). A arginase-1 metaboliza a arginina em ureia e ornitina, que serão metabolizadas e darão origem a hidroxipolina, prolina e poliamina. A prolina e poliamina são importantes fontes de colágenos, podendo contribuir para o processo de cicatrização e deposição de matriz extracelular (TANG e LE, 2016). Entretanto, produções excessivas podem contribuir para aumento da inflamação no SNC (SOULET e RIVEST, 2003; BRONTE e ZANOVELLO, 2005; PUNTAMBEKAR *et al.*, 2011).

YM1 (também conhecido como Chi3l3) – é um marcador do fenótipo M2, induzido pela citocinas IL-4 e IL-13 por mecanismo STAT-6 dependente (WELCH *et al.*, 2002; TANG e LE, 2016). Essa proteína é sintetizada por macrófagos e atuam ligando-se a sacarídeos e sulfatos de heparina, protegendo a matrix extracelular (ECM). Ao se ligarem ao sulfato de heparina, bloqueiam a ação das heparinases que degradam matrix, evitando a perda de fatores de crescimento contidos nela que serão necessários para a reconstrução tecidual (ZHAO *et al.*, 2013).

CD206 – O CD 206 é um marcador para o fenótipo M2, pois a sua ação, além de diminuir TNF- α e IL-12, pode promover aumento de IL-10 e IL-1R α , estimulando o reparo após a lesão medular (MADSEN *et al.*, 2013). É uma glicoproteína transmembrana da família das lecitinas tipo-C, expressa por vários tipos de células imunes, como células dendríticas e macrófagos/microglia (TAYLOR *et al.*, 2005). O domínio N-terminal da cisteína dessa glicoproteína é importante para o reconhecimento de manoses, sulfatos de glicoproteína e proteoglicanos, encontrados em microorganismos, ajudando a removê-los da circulação (TAYLOR *et al.*, 2005). Durante a fase aguda inflamação, o CD206 é expresso em baixos níveis e tornam-se elevados, durante, a fase de resolução, no qual esses receptores interagem com células mortas e restos de mielina estimulando a sua remoção sem causar dano tecidual (TAYLOR *et al.*, 2005; KIGERL *et al.*, 2009; DAVID e KRONER, 2011). Foi demonstrado que este receptor, quando superexpresso, contribui para o agravamento da doença pulmonar congestiva (KAKU *et al.*, 2014).

CD86 – é um marcador para o fenótipo M1 (DAVID *et al.*, 2015); (KIGERL *et al.*, 2009). O CD86 é um receptor de manose, também, conhecido como receptor de manose tipo 1 ou MCR1. Essa molécula pode ser expressa por subpopulações de linfócitos B e macrófagos

(LIOI *et al.*, 2015; NOVA-LAMPERTI *et al.*, 2016). Atua como coestimulador de linfócitos T e fibroblastos (BIANCHETTI *et al.*, 2012). A interação desses receptores com os fibroblastos ativam-nos em fibrócitos que, por sua vez, sintetizam colágenos dos tipos I e III, contribuindo, para desordens fibróticas e perda de função tecidual, ainda, não está claro porque apresenta esse papel deletério no processo de remodelamento de matrix (BIANCHETTI *et al.*, 2012).

TGF- β – citocina usada como marcadora para o fenótipo M2, estando mais envolvido com o processo antiinflamatório na fase aguda e reparativa (subfenótipo M2a e M2c) (TANG e LE, 2016). Existem três isoformas, altamente homologas, que são o TGF- β 1, - β 2 e - β 3 (SHENG *et al.*, 2015). Dentre as três isoformas, o TGF- β 1 está, predominantemente, envolvido na resposta imune, manifestando uma potente imunorregulação capaz de estimular o perfil M2 e, até mesmo, ao estado de desativação (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; SHENG *et al.*, 2015). Em SCI, dependendo do contexto da resposta, pode estimular a reparação tecidual e finalização do processo inflamatório (GENSEL e ZHANG, 2015). Em contraponto, o TGF- β , atuando em sinergismo com a IL-10, pode estimular a agregação de astrócitos em microvasos do encéfalo e aumentar a deposição de placas β -amiloides na DA (ZHENG *et al.*, 2016).

B - Astrócitos

Existem vários subtipos de astrócitos, sendo encontrados, praticamente, em todas as regiões do SNC (RANSOM *et al.*, 2003; CARSON *et al.*, 2006). Em condições normais, participam da regulação de redes neurais, da plasticidade sináptica, do controle do fluxo sanguíneo e da manutenção do equilíbrio do meio, modulando neurotransmissores e íons (RANSOM *et al.*, 2003).

Apesar da participação de astrócitos na resposta neuroinflamatória, não é possível saber se essa resposta ocorre por uma conversa cruzada com a micróglia ou de forma direta por reconhecimento de DAMPs ou PAMPs. Estudos demonstraram que em culturas isoladas de astrócitos, *in vitro*, essas células não apresentaram habilidade em reconhecer estímulos da resposta imune inata induzida pelo LPS (CHEN *et al.*, 2015; LUKOVIC *et al.*, 2015; NORDEN *et al.*, 2016).

Após a SCI, em repostas ao aumento de ATP, ROS e outras moléculas secretadas por micróglia, os astrócitos tornam-se reativos (processo denominado de astrogliose), passando a expressar altos níveis de GFAP (proteína ácida fibrilar glial), vimetina e nestina (RANSOM *et al.*, 2003; FRANKE e ILLES, 2014). As respostas de astrócitos são controversas, sendo seus efeitos finais muito mais deletérios que benéficos em SCI (PEKNY *et al.*, 2014; LUKOVIC *et al.*, 2015). A formação da cicatriz glial é a principal resposta deletéria dos astrócitos, pois representa uma barreira física a regeneração neuronal (PEKNY *et al.*, 2014).

C - Neurônios

Os neurônios, por muito tempo, foram vistos como células incapazes de estimular uma resposta imune direta, acreditava-se que fossem capazes de ativar células imunes apenas pela liberação de DAMPs devido a sua lise ou pela liberação de glutamato no sítio da lesão de doenças degenerativas ou em SCIs (CARSON *et al.*, 2006; DAVID *et al.*, 2012; MCDONOUGH e WEINSTEIN, 2016).

Esse conceito foi revisto, atualmente, apesar dos neurônios não apresentarem resposta imune, sabe-se que eles são capazes de sintetizar TNF- α e expressar iNOS devido o aumento da expressão intrínseca de NF- κ B. Além disso, também, expressam superóxido dismutase em doenças neurodegenerativas, isquêmicas e em lesões no SNC (CARSON *et al.*, 2006; FLEMING *et al.*, 2006; DAVID *et al.*, 2012; MCDONOUGH e WEINSTEIN, 2016).

Apesar dos neurônios sintetizarem fatores que contribuam para resposta inflamatória, essa produção não é tão elevada como a que ocorre por células imunes (MCDONOUGH e WEINSTEIN, 2016). Sendo assim, reduções nas perdas de neurônios representam um alvo neuroprotetor importante, pois a sua morte acarreta perdas neurológicas irreversíveis, sendo a neurogênese muito baixa após a SCI (KWON *et al.*, 2004; LOANE e BYRNES, 2010; KUMAR *et al.*, 2013; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015).

D - Neutrófilos

Em SCI, a primeira célula imune, proveniente da circulação, a chegar ao sítio da lesão é o neutrófilo, sendo atraído por quimiocinas e citocinas proinflamatórias, secretadas pelas primeiras células a responderem ao trauma (FLEMING *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2016). Os neutrófilos atravessam a barreira hematoespinal interrompida, a partir de interações com células endoteliais, por volta de três a seis horas, sendo seu pico de concentração de 12-24 horas e desaparecem, aproximadamente, em cinco dias (FLEMING *et al.*, 2006; DAVID *et al.*, 2012).

Efeitos deletérios em SCI estão associados à produção de enzimas proteolíticas e oxidativas, como as mieloperoxidases (MPOs), que agem esterilizando o sítio da lesão e preparando-o para o subsequente “reparo” (DAVID *et al.*, 2012). Paralelamente, também produzem citocinas proinflamatórias, espécies reativas de oxigênio (ROS) e as próprias MPOs que contribuem para o aumento dos danos secundários (SHI *et al.*, 2016).

E - Linfócitos

Estudos demonstraram que a presença e a permanência de linfócitos T e B na medula espinal após a SCI variam entre as diferentes espécies (FLEMING *et al.*, 2006). Em humanos e em ratos, linfócitos CD8⁺ aparecem em pequeno número em até o terceiro dia após a lesão, já os linfócitos CD4⁺ foram encontrados meses após o trauma inicial, enquanto, linfócitos B são pouco detectáveis (PRUSS *et al.*, 2011). As participações dos linfócitos, ainda, são pouco compreendidas na SCI (DAVID *et al.*, 2012). Acredita-se que a principal participação dessas células seja no desencadeamento de respostas imunossupressoras sistêmicas, relacionadas com complicações secundárias, como infecções e pneumonias, que ocorrem por diversos fatores, inclusive por interrupções de vias de interações entre o sistema imune e o SNC (FLEMING *et al.*, 2006; PRUSS *et al.*, 2011; BROMMER *et al.*, 2016).

2.6 Fatores inflamatórios e a regulação da apoptose em Lesões Medulares

Como citado nos tópicos anteriores, fatores liberados, como citocinas, quimiocinas, ROS, aumento da expressão do NFκB, COX-2, entre outros, promovem conversas cruzadas entre células neurais e não neurais por meio da ativação de vias de sinalizações, podendo gerar respostas modulatórias de maiores ou menores ativações entre elas (PINEAU *et al.*, 2010; DAVID e KRONER, 2011; DAVID *et al.*, 2012).

Abaixo estão listados alguns dos principais fatores inflamatórios e apoptóticos que estão envolvidos na resposta neuroinflamatória na SCI.

2.6.1 – Fatores inflamatórios

A – Citocinas pro e antiinflamatórias

Existem mais de 100 citocinas identificadas que exibem funções variadas (STENKEN e POSCHENRIEDER, 2015). As citocinas são produzidas por vários tipos de células neurais, não neurais e, principalmente, por células imunes. São formadas de pequenas proteínas ou peptídeos, além de apresentarem glicoproteínas em sua estrutura e possuem baixo peso molecular. São classificadas, geralmente, com base em seu efeito final como proinflamatória ou anti-inflamatória (RUBIO-PEREZ e MORILLAS-RUIZ, 2012).

Quando secretadas em respostas neuroinflamatórias, as citocinas são os principais fatores que direcionam o fenótipo de polarização de micróglia/macrófagos (GENSEL e ZHANG, 2015; HU *et al.*, 2015; DISABATO *et al.*, 2016; TANG e LE, 2016; ZHENG *et al.*, 2016).

Vale salientar que, assim como em revisões sobre os fenótipos M1/M2 apresentados por microglia/macrófagos, existem tendências em rotularem citocinas proinflamatórias deletérias e anti-inflamatórias como benéficas. Se citocinas pro e anti-inflamatórias serão benéficas ou não, dependerá do contexto que promoveu a estimulação para sua síntese e liberação (GENSEL e ZHANG, 2015; ROE, 2017).

B - Fator Nuclear kappa B (NF-kB)

O NF-kB é considerado o principal inicializador do processo inflamatório, podendo ser expresso por diversos tipos celulares, incluindo micróglia/macrófagos, astrócitos e neurônios (CARSON *et al.*, 2006; ORTIZ *et al.*, 2013).

O fator transcricional NF-kB, em condições fisiológicas normais, encontra-se complexado no citosol das células por uma molécula inibitória o I κ B₁ formando assim o complexo NF-kB, no qual o I κ B₁ se liga a duas subunidades do NF-kB p65 e p50 ocultando os sinais de localização nuclear.

Após traumas medulares e encefálicos, ocorre o aumento do estresse oxidativo e a produção de citocinas proinflamatórias que estimulam a degradação do I κ B por um complexo de proteína quinase, denominado I κ B quinase. Após a fosforilação desse complexo, os sinais de localização nuclear ficam expostos e sofrem a translocação para o núcleo celular, onde acontece a transcrição de vários genes-alvo (MALDONADO BOUCHARD e HOOK, 2014). A superexpressão do NF-kB é induzida, principalmente, por ROS, sendo um fator de transcrição redox-sensível (LI, 2002).

Trabalhos experimentais demonstraram que o NF-kB pode codificar mais de 150 genes diferentes, que incluem genes proinflamatórios, moléculas de adesão, como a VCAM-1, vários tipos de enzimas, como a iNOS e a COX-2 (podendo induzir, além da sua síntese a sua ativação), citocinas proinflamatórias, como a IL-1 β ; TNF- α , IL-6, e quimiocinas como o MIP-1 (ORTIZ *et al.*, 2013; DAVID *et al.*, 2015).

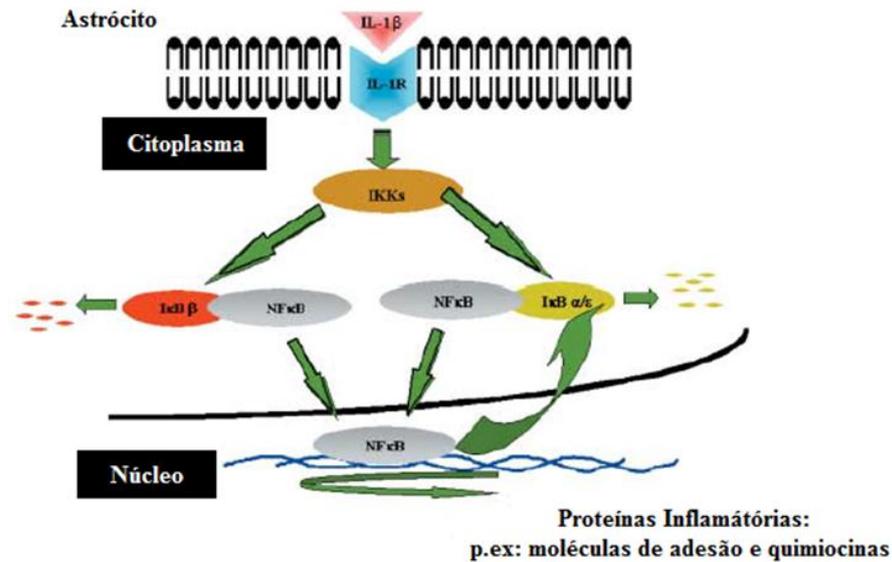


Figura 7: Modelo de ativação do NF-κB pela IL-1β em astrócitos. Esquema da cascata de ativação do NF-κB pela IL-1β, promovendo a produção de moléculas de adesão e quimiocinas. A interação da IL-1β com o seu receptor (IL-1R) leva à ativação da IκB quinase e sua subsequente fosforilação e degradação. Dessa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

C- Cicloxigenase-2 e Prostaglandinas

As enzimas cicloxigenase (COXs) presentes na membrana lipídica catalisam a síntese das prostaglandinas (PGs) PGG₂ e PGH₂ a partir do ácido araquidônico (VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). As PGs, produzidas pelas COXs, incluem a PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ e o TXA₂ que são mediadores lipídicos liberados em resposta a diversos estímulos, inclusive, para a manutenção da homeostase no SNC (VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). As duas principais isoformas da enzima cicloxigenase são a COX-1 e COX-2.

Nesta revisão, será dado enfoque sobre a COX-2, pois a sua expressão aumenta em condições neuroinflamatórias, inclusive em SCI, por estímulo da alta expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNF-α e IL-6), do NF-κB e de ROS (CHOI *et al.*, 2010; DULIN *et al.*, 2013; ORTIZ *et al.*, 2013).

Estudos indicam que o aumento da expressão de COX-2 via NADPH oxidase e ROS também estão envolvidas na diferenciação de monócitos em macrófagos hematógenos e na apoptose de neurônios e oligodendrócitos, apesar desses trabalhos experimentais não deixarem claro se estes mecanismos ocorreram por aumento de PGs (BARBIERI, 2003; CHOI *et al.*, 2010; AOKI e NARUMIYA, 2012; DULIN *et al.*, 2013; ORTIZ *et al.*, 2013).

D - Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS) em SCI

Em condições de homeostase, existe um equilíbrio da produção de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), e a neutralização por fatores antioxidantes. No entanto, durante o trauma medular agudo, desenvolve-se um quadro de estresse oxidativo com excessiva formação de radicais livres, especialmente de ROS, por células neurais e não neurais, sendo a maior produção mantida por micróglia, macrófagos e neutrófilos devido a uma super expressão da NADPH oxidase (pela subunidade NOX2) e de iNOS, em que a maquinaria enzimática antioxidante não é capaz de reverter o estresse oxidativo, o que gera um ciclo de auto propagação (KWON *et al.*, 2004; DIBAJ *et al.*, 2010; OYINBO, 2011; MAGGIO *et al.*, 2012; SPYCHALOWICZ *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2017).

Paralelamente, o processo inflamatório, após a SCI, também promove aumento da expressão da enzima iNOS em vários tipos celulares, sendo o NO o produto final da sua ativação (DIBAJ *et al.*, 2010; MAGGIO *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2017). O NO está envolvido em vários processos fisiológicos como neurotransmissão e vasodilatação (MAGGIO *et al.*, 2017).

Entretanto, num ambiente com alto estresse oxidativo, a produção de NO se torna persistente e elevada, ocorrendo reação desse gás com o radical superóxido, formando o potente agente oxidante apoptogênico, denominado de peroxinitrito. O peroxinitrito é uma molécula capaz de desativar enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, desnaturar proteínas e inibir a bomba de Na⁺/K⁺ ATPase. Todos esses fatores induzem um colapso metabólico e, conseqüentemente, necrose e apoptose celular (CHOI *et al.*, 2012; MAGGIO *et al.*, 2012; MAGGIO *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2017).

2.6.2 – Fatores apoptóticos e lesões Medulares

A apoptose é um processo de morte programada que requer a participação ativa da própria célula, sendo esse processo dependente de ATP (ZHAO *et al.*, 2017). Em condições de homeostase, o processo de apoptose é importante para o funcionamento equilibrado, devido à remoção de neurônios desnecessários, mantendo conexões sinápticas adequadas e a remoção de células que possam representar risco à homeostase tecidual, durante todas as fases da vida como no desenvolvimento, no amadurecimento e no envelhecimento, inclusive, em condições de inflamação no SNC (ZHAO *et al.*, 2017).

O processo apoptótico é mediado por duas vias principais, uma intrínseca e outra extrínseca, sendo essas vias influenciadas por diversos sinais intracelulares e extracelulares, inclusive por proteínas pro e antiapoptóticas (KENNEDY, 2015). As proteínas endógenas pro e antiapoptóticas, compreendem proteínas da família BCL-2, sendo os seus membros hetero (Bax, Bak e Bok) ou homodímeros (BCL-2, BCL-x1, BCL-w), essenciais para manter os processos apoptóticos em equilíbrio (MAES *et al.*, 2017).

A via intrínseca é desencadeada por sinais intracelulares, como o Ca²⁺, em que o citocromo C (Cyt-C), liberado da membrana externa mitocondrial, cliva enzimas proteolíticas, denominadas de caspases que, quando ativas, clivam uma variedade de substratos intracelulares de forma sequencial e coordenada até a clivagem do DNA com desregulação da fisiologia celular e morte da célula (SHALINI *et al.*, 2015). A via extrínseca é ativada pelo ligante Fas (FasL), um receptor denominado receptor de morte (Fas), relacionado com a via de sinalização do fator de necrose tumoral (TNF), em que a interação de fatores extracelulares, como o TNF- α e o ROS, resultam na ativação da cascata das caspases e apoptose (KENNEDY, 2015).

Após a SCI, ocorre uma massiva resposta inflamatória com alta produção de TNF- α , ROS, aumento das concentrações de Ca²⁺ e glutamato, desencadeando exagerado processo apoptótico de neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e micróglia, sendo as caspases 3, 8 e 9 as mais envolvidas nesse processo, tanto na via intrínseca como na via extrínseca, sendo o maior efetor da morte de células do SNC a caspase-3 clivada (ESPOSITO *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2017)

Após a lesão, também ocorre a desregulação do equilíbrio entre as proteínas BCL-2 e Bax, com aumento significativo da expressão de Bax, fator proapoptótico, que atua promovendo aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa através da formação de poros, desestabilizando-a e estimulando a liberação de citocromo C (LI *et al.*, 2014). O BCL-2 é uma importante proteína antiapoptótica, contrarreguladora do Bax, neutralizando-o e reduzindo, conseqüentemente, a liberação de fatores apoptóticos intrínsecos estimulados por ele (ESPOSITO *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2017).

2.7. Tratamentos mais abordados na lesão Medular

Clinicamente, após a SCI, geralmente são realizadas intervenções cirúrgicas para descompressão da região atingida e administração de corticoide nas primeiras horas. O uso de corticoide, para tratar paciente com trauma medular agudo, já é realizado há mais de 30 anos, sendo a metilprednisolona a principal escolha entre os médicos (KWON *et al.*, 2004; BOWERS *et al.*, 2016; ULNDREAJ *et al.*, 2016).

- Metilprednisolona

Metilprednisolona é um glicocorticoide (corticosteroide) sintético, sendo o seu uso proposto por inibir a cascata inflamatória, contribuindo para minimizar os danos secundários (BOWERS *et al.*, 2016). Como protocolo usual, os pacientes recebem um *bolus* inicial de 30mg/kg seguido por uma infusão de 2,5mg/kg, por hora, durante 10 dias (BOWERS *et al.*, 2016).

Apesar de apresentar pouca influência sobre o sistema cardiovascular, a metilprednisolona apresenta riscos colaterais, gerando grande controvérsia entre os autores quanto ao seu uso (BOWERS *et al.*, 2016). Várias revisões sobre esse fármaco relatam efeitos colaterais, como o aumento de infecções, a pneumonia, a sepse, as complicações diabéticas, o sangramento gastrointestinal e a demora no processo de cicatrização após procedimentos cirúrgicos (KWON *et al.*, 2004; ESPOSITO *et al.*, 2010; BOWERS *et al.*, 2016; BROMMER *et al.*, 2016; ULNDREAJ *et al.*, 2016; AHUJA *et al.*, 2017). Todos esses efeitos, juntos ou separados, aumentam substancialmente a possibilidade de morte entre os pacientes (CHIKUDA *et al.*, 2014). Ademais, existem grandes discrepâncias na resposta individual com o tratamento com a metilprednisolona, havendo alguns pacientes que apresentam melhor resposta neurológica do que outros (KWON *et al.*, 2004; ESPOSITO *et al.*, 2010; CHIKUDA *et al.*, 2014; MALDONADO BOUCHARD e HOOK, 2014; BOWERS *et al.*, 2016; BROMMER *et al.*, 2016; ULNDREAJ *et al.*, 2016; AHUJA *et al.*, 2017)

- Minociclina

Pesquisas experimentais e clínicas sobre o uso da minociclina, também ganharam destaque nos últimos anos. Testes clínicos já estão na fase três e, de acordo com os resultados obtidos nas demais fases, o tratamento com minociclina poderá ser proposto para SCIs em 2018 (ULNDREAJ *et al.*, 2016).

A minociclina é uma tetraciclina da família de antibióticos que apresentam uma alta capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica (MOLLER *et al.*, 2016). Um dos principais benefícios desse fármaco está associado à sua capacidade de inibição sobre a micróglia, por mecanismos ainda desconhecidos, em que uma menor resposta inflamatória e apoptótica foi observada em modelos *in vivo* e *in vitro* (OYINBO, 2011; DEVIVO, 2012; OUDEGA *et al.*, 2012; ULNDREAJ *et al.*, 2016; AHUJA *et al.*, 2017). Paralelamente, ocorre uma redução da liberação de citocinas proinflamatórias, como TNF- α ; IL-1 β , assim como a redução da ativação e síntese de COX-2, diminuição da infiltração de células inflamatórias, entre outros (ULNDREAJ *et al.*, 2016). Em contrapartida, também existem resultados clínicos e experimentais divergentes demonstrando piora ou uma insignificante resposta de animais experimentais e pacientes tratados com a minociclina (KWON *et al.*, 2004; SAGANOVÁ *et al.*, 2008; MOLLER *et al.*, 2016; AHUJA *et al.*, 2017).

Essa piora pode estar associada a uma inibição microglial e de macrófagos e a uma expressão de seus diferentes fenótipos, não ocorrendo o contrabalanço entre os perfis M1 e M2 associado com a plasticidade de suas respostas.

-Terapia Celular

Outra modalidade que tem sido bastante explorada no estudo de SCIs é a terapia celular. Alguns testes clínicos com esse tipo de tratamento estão sendo avaliados no momento, sendo muito precoce estabelecer um prognóstico quanto à sua eficiência (ULNDREAJ *et al.*, 2016).

Inicialmente, essa terapia parecia ser uma estratégia muito promissora, acreditava-se que a reposição tecidual por meio do transplante de células-tronco seria capaz de modificar todo o microambiente, permitindo a regeneração de circuitos neurais interrompidos (ULNDREAJ *et al.*, 2016). Porém, pesquisas clínicas e experimentais têm demonstrado resultados controversos desse tratamento, resultados esses que podem não ser tão benéficos. Uma vez adicionadas essas células ao ambiente aversivo após o trauma, não necessariamente haverá respostas imunomodulatórias, nem tampouco secreção apenas fatores de crescimento que darão origem apenas a tipos celulares desejados (VOLAREVIC *et al.*, 2013; MORTAZAVI *et al.*, 2015).

Algumas triagens clínicas com pacientes crônicos e agudos de diversas etiologias de SCIs, que receberam tratamento por via intravenosa ou direto na medula espinal de células-tronco mesenquimais e/ou progenitores neurais, revelaram diferentes graus de melhoras locomotoras e funcionais, como melhora da resposta autonômica e no controle vesicular da bexiga. Por outro lado, alguns pacientes também apresentaram sérias complicações, como dor neuropática e formações neoplásicas (VOLAREVIC *et al.*, 2013; MORTAZAVI *et al.*, 2015).

- Reabilitação Física

A reabilitação física por meio da fisioterapia só é iniciada quando a lesão já está bem estabilizada (ULNDREAJ *et al.*, 2016). Essa terapia já demonstrou benefícios após a SCI, como a melhora do sistema imunológico e no bem-estar geral do paciente, sendo amplamente usada para tentar maximizar a recuperação funcional, assim como para promover a reabilitação social do paciente no novo contexto social no qual viverá (MALDONADO-BOUCHARD *et al.*, 2016; ULNDREAJ *et al.*, 2016). A questão mais difícil para sua aplicação é a definição do melhor momento para iniciá-la, levando em consideração que, quanto mais cedo, maiores os benefícios (ULNDREAJ *et al.*, 2016).

O estado motivacional do paciente também influencia significativamente na resposta, já que 60% dos pacientes sofrem depressão pós-traumática, podendo resultar em melhoras muito sutis, devido à demora em iniciar o tratamento. Ademais, esses sutis resultados da melhora motora e funcional, independentemente do estado emocional dos pacientes, podem demorar muito tempo para aparecer, às vezes, meses ou anos (MALDONADO-BOUCHARD *et al.*, 2016; ULNDREAJ *et al.*, 2016).

- Hipotermia terapêutica

A hipotermia terapêutica é outra terapia não farmacológica muito usada em SCI (DIETRICH *et al.*, 2009; ALKABIE e BOILEAU, 2016; MARTIROSYAN *et al.*, 2017; MARTIROSYAN *et al.*, 2017). Ela foi desenvolvida na década de 1940, podendo ser aplicada sistemicamente ou apenas no sítio do trauma, sendo o seu uso local mais frequente (ALKABIE e BOILEAU, 2016; MARTIROSYAN *et al.*, 2017). Limitações dessa terapia são o tempo e a dificuldade da manutenção da temperatura na faixa ideal (MARTIROSYAN *et al.*, 2017).

A Associação de Lesões Medulares das Américas (ASIA)¹ preconiza, como protocolo de hipotermia moderada, a faixa de temperatura de 33-30°C por 18-48 horas, e para hipotermia profunda, 28-26°C por 12-24 horas. O tratamento deve ser iniciado nas primeiras

¹ ASIA, do inglês, *American Spinal Injury Association*.

24 horas, após esse período, sua contribuição para melhora neurológica é significativamente reduzida (MARTIROSYAN *et al.*, 2017).

Existem dados controversos em relação ao uso dessa terapia. Resultados experimentais demonstram que a atenuação da inflamação é o mecanismo mais influenciado, sendo relatadas reduções na ativação de micróglia e astrócitos, citocinas próinflamatórias IL-1 β , IL-18, TNF- α , além de reduções dos níveis teciduais de NO e do radical hidroxila (DIETRICH *et al.*, 2009; MARTIROSYAN *et al.*, 2017). Entretanto, também existem dados na literatura que demonstram a contribuição dessa terapia para o aumento da liberação de cyt-C e apoptose neuronal (ZHAO *et al.*, 2007; DIETRICH *et al.*, 2009).

2.8 Dificuldades para o desenvolvimento de terapias mais eficientes para o tratamento de lesões Medulares

Realizando um retrospecto de toda a revisão de literatura abordada nos tópicos anteriores, o trauma medular inicial é decorrente de situações que não podem ser previstas, no qual após o impacto medular inicial, ocorre o desencadeamento de uma cascata secundária inter-relacionada e de alta complexidade que por ser tratar de um processo dinâmico pode ser alterado e resultar numa maior ou menor perda funcional e motora (KJELL e OLSON, 2016).

O fracasso das terapias atuais também pode estar associado ao processo inflamatório crônico, a cicatriz glial que é formada por vários fatores inibitórios a regeneração, a persistência de restos de mielina degenerada inibitória ao crescimento axonal, a atrofia de neurônios, no qual em conjunto prejudicam o reparo endógeno (OUDEGA *et al.*, 2012; KJELL e OLSON, 2016).

Devido a toda essa complexidade, não existe até o momento terapia farmacológica e não farmacológica ou associação delas que seja eficiente para o tratamento da SCI, no qual na maior parte dos casos os resultados finais são o desenvolvimento de paraplegia ou tetraplegia e que pode ser acompanhado de complicações secundárias que ocasionam altas taxas de mortalidade (ESPOSITO e CUZZOCREA, 2011; OUDEGA *et al.*, 2012; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; DISABATO *et al.*, 2016; KJELL e OLSON, 2016). Existem especulações que todo contexto social e as experiências emocionais anteriores ao trauma, também possam contribuir negativamente para as repostas individuais aos tratamentos (MALDONADO BOUCHARD e HOOK, 2014).

A partir do que foi relatado, fica evidente que a compreensão dos fenômenos celulares e moleculares subjacentes lesão medular podem contribuir para a consolidação de tratamentos mais direcionados, e promover, assim, melhora do quadro clínico (CIZKOVA *et al.*, 2011). Para a obtenção do sucesso terapêutico, faz-se necessário que as terapias sejam voltadas para a redução da perda de tecido neural prevenindo-a e revertendo-a, por meio da estimulação da capacidade regenerativa intrínseca dos axônios, assim como a neurogênese e remielinização, neutralização de substratos inibitórios no sítio lesionado, e, por fim, que axônios encontrem alvos sinápticos renovando os circuitos neurais destruídos, de forma a tornar todos os processos anteriores válidos (BECKER e MCDONALD, 2012; OUDEGA *et al.*, 2012).

Por esse motivo, questiona-se por que não usar a acupuntura ou variações dela como tratamento coadjuvante, uma vez que apresentam poucos efeitos colaterais e vários benefícios neurológicos relatados tanto em pesquisas experimentais como em triagens clínicas em SCI (ZHAO, 2008; CHOI *et al.*, 2010; DORSHER e MCINTOSH, 2011).

2.9 Acupuntura e modalidades da acupuntura em lesões Medulares

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aprova a utilização de diferentes modalidades da acupuntura como terapia coadjuvante para o tratamento de várias doenças e o seu uso vem se tornando cada vez mais popular em países do ocidente (ZHAO, 2008; ZHANG *et al.*, 2013).

Baseado no contexto histórico, a acupuntura é uma das terapias da Medicina Tradicional Chinesa, no qual existem relatos do seu uso prático há pelo menos cinco mil anos no continente asiático, mais especificamente pela China (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001; ZHAO, 2008). A teoria geral da acupuntura é baseada na premissa de que há um padrão de fluxo de sangue e energia (chamada "Qi-Xue") através do corpo, essenciais para uma saúde perfeita e que quando ocorre à estagnação do fluxo de sangue e energia, as enfermidades acontecem (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001; ZHAO, 2008; ZHANG *et al.*, 2016).

A acupuntura tem como técnica básica à inserção de finas agulhas de metal em pontos anatômicos específicos do corpo, denominados acupontos com propósitos terapêuticos (ZHAO, 2008). Existem, aproximadamente, 361 acupontos, nos quais esses acupontos foram mapeados empiricamente ao longo de milhares de anos através da prática médica e encontram-se distribuídos em diferentes regiões, localizados, principalmente, na pele e nos músculos totalizando (SCOGNAMILLO-SZABÓ e BECHARA, 2001; ZHAO, 2008; ZHANG *et al.*, 2013).

Estudos revelaram que nas regiões onde os acupontos estão localizados existem altas concentrações de terminações aferentes de fibras A α , β , δ e C (respectivamente, os grupos de fibras I, II, III e IV) e que quando estimuladas podem estimular diretamente o SNC e induzirem diferentes respostas fisiológicas, como a analgesia, a liberação de endorfinas, a redução da resposta imune, a alteração na resposta autonômica, a liberação de fatores neurotróficos, entre outros (ZHAO, 2008; KAGITANI *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2014).

Existem formas diferentes de como os acupontos são estimulados, no qual a forma como o acuponto é estimulado determina o tipo da modalidade de acupuntura empregada na prática clínica. As modalidades de acupuntura mais difundidas pela MTC são a acupuntura manual, eletroacupuntura e em menor escala de utilização a apipuntura (CAI *et al.*, 2015; KHALIL *et al.*, 2015).

Na acupuntura manual, os acupontos na pele e/ou no músculo são estimulados por movimentos rotacionais (ZHAO, 2008; CHOI *et al.*, 2010). A apipuntura é considerada como uma modalidade de fármaco-acupuntura, na qual a dessensibilização do acuponto ocorre pela aplicação do veneno de abelha (VB) (CAI *et al.*, 2015). Na eletroacupuntura, a agulha no acuponto é estimulada por um aparelho eletroestimulador com intensidade e duração de ondas elétricas pré-definidas (ZHAO, 2008). Apesar de serem técnicas com abordagens totalmente diferentes, existe certa confusão da eletroacupuntura (EA) com a estimulação elétrica transcutânea (TENS). O TENS é colocado no músculo próximo à região dolorosa, enquanto na eletroacupuntura ocorre a estimulação elétrica da agulha no acuponto (ZHAO, 2008).

Quando avaliamos o efeito da acupuntura em lesões medulares devemos considerar duas condições distintas que são as relacionadas a lesões incompletas com sintomas de gravidade leve a moderada e as lesões medulares completas com gravidades mais severas. Dores, deficiências motoras e sensoriais decorrentes de algum tipo de compressão de nervo provocado por hérnias de disco são queixas comuns em consultórios de acupuntura (DORSHER e MCINTOSH, 2011).

Existem dados consistentes relacionados a patologias do disco intervertebral, onde o efeito do uso da acupuntura se mostrou eficiente no tratamento dessa patologia tanto em humanos (LONGWORTH e MCCARTHY, 1997) como em animais (HAYASHI *et al.*, 2007). Em relação ao uso da acupuntura em SCIs mais severas, no qual o paciente apresenta uma

deficiência motora permanente, os dados científicos são mais escassos, mas os autores sugerem que a acupuntura possa ser muito útil para estes pacientes (PAOLA e ARNOLD, 2003; DORSHER e MCINTOSH, 2011). Nos casos de SCIs mais severas não se propõe que a terapia contribua para a recuperação total dos pacientes e sim que produza alguma melhora motora e sensorial, melhorando a dor, o tônus muscular, o tônus do sistema nervoso autônomo, o controle dos esfínteres, 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 (2011) analisaram o efeito da acupuntura no tratamento de sequelas de SCIs 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.

Trabalhos experimentais têm demonstrado o efeito positivo de modalidades da acupuntura em modelos de SCI em ratos.

CHOI *et al.* (2010) demonstraram que a acupuntura manual nos acupontos VG26 e VB34 foi capaz de reduzir a apoptose 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 diminuir a ativação da micróglia residente, reduzir citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. A acupuntura também reduziu mediadores inflamatórios como a COX-2, NOS, a enzima metaloprotease-9 e enzima da cascata apoptótica, 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. A partir desses resultados, os autores concluíram que a neuroproteção proferida pela acupuntura sobre a SCI ocorreu pelo controle dos danos secundários através de uma redução parcial da inflamação e da inibição microglial.

TU *et al.* (2017) investigaram o efeito da eletroacupuntura nos acupontos do vaso governador na combinações dos acupontos: VG 20 (Baihui) + VG16 (Fengfu) e VG14 (Dazhui) e VG4 (Mingmen) e constataram que a combinação dos acupontos VG14 e VG4 induziram melhora da capacidade locomotora e que essa melhora parece estar relacionada com uma promoção parcial da regeneração axonal.

DING *et al.* (2009) demonstraram que a eletroacupuntura nos acupontos do vaso governador: VG1 (Changqiang), VG2 (Yaoshu), VG6 (Jizhong) e VG9 (Zhiyang) 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.

Nesta mesma linha de pesquisa, LIU *et al.* (2012) também demonstraram que o tratamento com a eletroacupuntura 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.

LI *et al.* (2010) demonstraram que a eletroacupuntura na combinação dos acupontos VG6 + VG9 foi capaz de aumentar a expressão da proteínas ANXA5, proteína que tem um potente efeito anti-inflamatório por inibir a ação da enzima fosfolipase A2 (PLA₂), e CRMP2, proteína exclusiva do SNC que está envolvida com o crescimento axonal, no modelo de SCI e relacionaram o aumento destas proteínas aos efeitos neuroprotetores proferidos pela acupuntura.

ZHAO *et al.* (2017) demonstraram que a eletroacupuntura nos acupontos VG6 e VG9 foi capaz de induzir a neuroproteção por reduzir a resposta inflamatória através das modulações dos fenótipos M1 e M2, além de aumentar o fator neurotrófico NT-3.

A acupuntura também tem demonstrado promover resultados positivos em trabalhos

que abordam outros modelos experimentais de doença neurodegenerativas como DP (Doença de Parkinson), ELA (esclerose amiotrófica lateral) e isquemia cerebral.

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

KANG *et al.* (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 e na expressão do iNOS.

Usando um modelo de isquemia e reperfusão (LI/R) que gera danos oxidativos ao encefálo, disfunção cognitiva e diminuição da taxa de sobrevivência em ratos, CHEN *et al.* (2012) demonstraram que o tratamento prévio com EA antes da LI/R foram capaz de reduzir os danos causados pela isquemia e reperfusão nesse modelo e por previamente reduzir a ativação microglial e atenuar o estresse oxidativo. Assim os autores propõem que o pré-tratamento com EA tem um grande potencial como uma terapia neuroprotetora.

A partir dos dados apresentados acima, modalidades da acupuntura demonstraram respostas benéficas por influenciar diversos mecanismos fisiológicos ainda pouco compreendidos (DORSHER e MCINTOSH, 2011; MA *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016; YE *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2017). Acreditamos que essa maior influencia possa estar relacionada com a modulação da resposta inflamatória.

- Apipuntura e lesão medular

O VB, da espécie *Apis mellifera*, possui ao redor de 18 componentes ativos como enzimas, peptídeos, proteínas de baixo peso molecular e aminas, sendo os principais componentes a histamina, a noradrenalina, a PLA₂, a hialuronidase, a melitina e a apamina (SON *et al.*, 2007; ELIEH ALI KOMI *et al.*, 2017). A melitina é o componente mais abundante do VB, constituindo 40-60%, do extrato seco total (CHEN e LARIVIERE, 2010; YANG *et al.*, 2010; TEOH *et al.*, 2016). Vale salientar que o VB apresenta entre seus componentes a PLA₂ e a histamina que possuem alto potencial alergênico, segundo a Sociedade Internacional de Imunologia, sendo capazes, assim, de induzir produção de IgE em indivíduos mais suscetíveis (TEOH *et al.*, 2016). Acredita-se que a melitina seja o maior componente bioativo que induza o efeito antiinflamatório e antinociceptivo quando aplicado no acuponto (SON *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2010; TEOH *et al.*, 2016).

O uso terapêutico do VB e da melitina já é uma prática comum na MTC, sendo realizada a sua administração por via sistêmica ou na estimulação química de acupontos (SU *et al.*, 2015). Na apipuntura, a substância tem o papel apenas de causar uma “irritação” local e estimular acupontos, produzindo um efeito mais intenso e duradouro que o agulhamento simples (SU *et al.*, 2015). A apipuntura é proposta para o tratamento de vários tipos de doenças, como artrite reumatoide, DP, ELA e outras doenças neurodegenerativas (KANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2015).

Os resultados em estudos experimentais demonstram um efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antitumoral (SON *et al.*, 2007). Modelos experimentais demonstram que o tratamento com apipuntura é capaz de reduzir a neuroinflamação, o estresse oxidativo, a dor neuropática e a apoptose nos modelos de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), DP, SCI e ELA (YANG *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; CAI *et al.*, 2015; KANG *et al.*, 2015; KHALIL *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016). A maior partes desses trabalhos demonstram que a

apipuntura reduz a ativação microglial, a expressão de iNOS, NF- κ B, os marcadores de ROS, COX-2, a caspase-3, as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , e aumenta a taxa de BCL-2 em relação ao Bax, o que promove a preservação de tecido nervoso e a melhora da performance em testes comportamentais (YANG *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; CAI *et al.*, 2015; KANG *et al.*, 2015; KHALIL *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016).

Recentemente, YE *et al.* (2016) demonstraram que o tratamento com PLA₂ derivada do veneno de abelha (bvPLA₂) foi capaz de alterar, *in vitro* e *in vivo*, o fenótipo de microglia BV2 do perfil M1 para M2 no modelo de camundongos transgênicos para o desenvolvimento espontâneo da PD. Os resultados demonstraram uma redução da marcação de CD86 em relação ao marcador do fenótipo M2, Arg-1, uma redução da expressão de iNOS e TNF- α . Nesse trabalho, não foi avaliado o efeito do veneno de abelha, apenas, de um constituinte dele.

Num estudo anterior ao estudo proposto, realizou-se em nosso laboratório um protocolo experimental para comparar o efeito da acupuntura manual diária e da apipuntura semanal com diferentes combinações de acupontos no modelo de SCI por compressão moderada. O critério de escolha para a seleção da melhor combinação de acupontos e do tipo de estimulação foi totalmente baseado no teste comportamental que avaliou a melhora da capacidade locomotora dos animais. Nossos resultados indicaram não existir diferença entre a acupuntura manual diária e a apipuntura semanal e que a combinação E36+VG3 foi a mais eficiente para a recuperação locomotora em relação às combinações ID3+B62 e VG3+VG9 (SOUZA, 2012). Além disso, a apipuntura aplicada nos acupontos E36+VG3 demonstrou influência sobre o balanço de citocinas inflamatórias, no qual foi possível observar uma redução da citocina pró-inflamatória IL-6 e um aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (SOUZA *et al.*, 2017).

Em razão desses prévios resultados, utilizou-se a associação dos acupontos E36+VG3 com o veneno de abelha em todas as etapas experimentais no presente estudo. Não existe, até o momento, estudo experimental que avalie o efeito da apipuntura sobre a alteração dos fenótipos M1 e M2 de micróglia/macrófagos no modelo de lesão medular. Dessa forma, o principal objetivo, deste estudo, foi avaliar se o tratamento com apipuntura na combinação dos acupontos E36+VG3 seria capaz de reduzir a neuroinflamação, por meio da influência sobre alterações fenotípicas de micróglia/macrófagos em M1/M2 e se essa terapia apresenta efeito antiapoptótico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral do presente estudo consistiu em avaliar se a apipuntura nos acupontos E36+VG3 poderia influenciar o processo neuroinflamatório por meio de uma modulação da dinâmica temporal de polarização de micróglia/macrófagos em M1/M2, assim como se seria capaz de reduzir a apoptose e promover a neuroproteção de neurônios e de oligodendrócitos no modelo de lesão medular por compressão em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

Para compreender a influência da apipuntura sobre os mecanismos propostos nos objetivos gerais, avaliou se a apipuntura nos acupontos E36+VG3:

- Melhora a coordenação e a capacidade locomotora após a SCI;
- Reduz o volume da área da lesão medular após a SCI;
- Atenua a ativação de micróglia/macrófagos e astrócitos no sítio da lesão medular;
- Influencia a polarização de fenótipos de micróglia/macrófagos M1/M2 no sítio da lesão medular;
- Reduz a expressão de fatores inflamatórios no sítio da lesão medular;
- Influencia o processo de apoptose no sítio da lesão medular;
- Induz a neuroproteção de neurônios e oligodendrócitos no sítio da lesão medular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas nacionais e internacionais de uso de animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (23083.005880/2013)

Para a execução do protocolo experimental, foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, provenientes do biotério de criação do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, pesando entre 270 e 290 gramas, mantidos em ciclo de claro/escuro de 12 horas, sob temperatura constante de 21°C, com água e comida *ad libitum*.

4.2 Procedimentos cirúrgicos para indução da lesão medular

Para induzir a lesão moderada por compressão, utilizou-se o modelo desenvolvido em 2001, por Vanicky e colaboradores (VANICKÝ *et al.*, 2001). Os animais foram inicialmente anestesiados com quetamina (75mg/kg, i.p., Ventil®) e xilazina (25mg/kg, i.p., Syntec®). Após a constatação da chegada do animal no plano anestésico, foi realizada uma tricotomia extensa do dorso.

Com o uso de um bisturi, foi realizada uma incisão longitudinal na pele, na linha média do dorso, de aproximadamente 3 a 4cm sobre os processos espinhosos T7 a T11. Posteriormente, dissecou-se a musculatura inserida nos processos espinhosos de T7 a T11, possibilitando a abertura de um pequeno orifício de dois milímetros de diâmetro na região cranial do processo espinhoso T11. Para fazer o pequeno orifício no osso da vertebra T11, utilizou-se uma mini furadeira, na qual, estava inserida uma broca dental.

No orifício na vertebra T11 foi introduzido, cranialmente por aproximadamente 1cm, a ponta de um cateter de embolectomia pediátrica no espaço epidural, de forma que o centro do balão ficasse entre T8 e T9. Contudo, vale ressaltar que nem o pequeno orifício no osso da vertebra, nem a introdução do cateter romperam a dura-máter.

O modelo de cateter de embolectomia pediátrica usado neste experimento foi o cateter Fogarty 2F (*Edwards Lifesciences*®). Esse cateter foi previamente conectado a uma microseringa Hamilton de 50µl, previamente preenchida com água destilada. Dessa forma, quando a seringa Hamilton era acionada, a água destilada usada para preencher os espaços era deslocada para a ponta do cateter, adquirindo essa ponta a forma de um pequeno balão (FIGURA 8).

Com o cateter posicionado corretamente entre as vértebras T8 e T9, o balão era inflado com um volume definido de 15µl durante cinco minutos, gerando a lesão medular por compressão com gravidade intermediária em nível torácico. Após esse período de cinco minutos, o cateter era desinflado e removido cuidadosamente, seguido da sutura do tecido muscular e da pele em camadas anatômicas.

Para a cirurgia de lesão medular do grupo falso operado (grupo *Sham*), realizou-se apenas um pequeno orifício no osso da vertebra T11 seguido da sutura do tecido muscular e da pele (STROWIG *et al.*, 2012; SCHAFFER *et al.*, 2013; SCHAEFER, 2014).

4.2.1 Formação dos grupos experimentais submetidos à SCI por compressão

Após a realização do procedimento cirúrgico para a indução da SCI por compressão, os animais, aleatoriamente, poderiam receber três diferentes tipos de tratamentos, a saber: animais submetidos ao tratamento com apipuntura, formando o **grupo VB-E36+VG3**; ou animais submetidos à aplicação do VB em regiões que não fossem acupontos, formando o **grupo VB-NP**; ou animais submetidos apenas à cirurgia de lesão medular sem receber

nenhum tipo de manipulação terapêutica até o fim dos experimentos, formando o **grupo CTL-SCI**.

4.2.2 Cuidados pós-cirúrgico

Imediatamente após o procedimento cirúrgico para indução da lesão medular ou da falsa cirurgia, administrou-se uma dose profilática de antibiótico (pentabiótico, 40.000UI/kg, Fort Dodge®) por via intramuscular e 3mL de uma solução de dextrose e salina, por via subcutânea. Os animais foram mantidos em ambiente aquecido para recuperação e retorno do plano anestésico e duas horas após a cirurgia receberam a administração do analgésico Fentanil (0,032mg/kg) por via subcutânea.

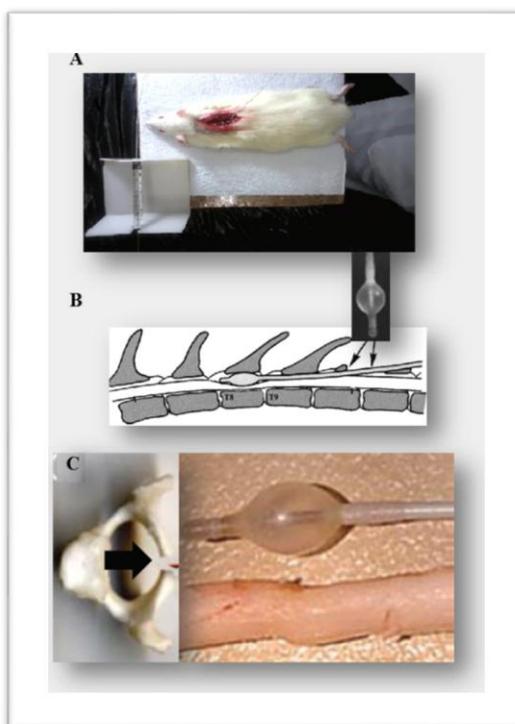


Figura 8: *Cirurgia para indução da lesão medular por compressão*. Em **A**, fotografia do animal sendo submetido à lesão medular por compressão através da inflação do balão de um cateter Fogarty tipo 2 de embolectomia (A – foto de autoria própria). Em **B e C**, formato e posição do cateter em relação às vértebras e da compressão sobre o tecido medular. Fonte: modificado de Vanický e colaboradores e Lonjon e colaboradores (VANICKÝ *et al.*, 2001; LONJON *et al.*, 2010).

4.3 Protocolos para o tratamento com apipuntura

4.3.1 Estimulação de pontos de acupuntura

No presente estudo, a modalidade de acupuntura usada foi a apipuntura, que se baseia no uso do veneno de abelha para estimular os acupontos em pontos específicos do corpo presentes principalmente nas regiões subcutâneas (SON *et al.*, 2007; HWANG *et al.*, 2015). Para a escolha da combinação dos acupontos, a indicação da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), os dados da literatura e os prévios resultados experimentais desenvolvidos no nosso laboratório foram levados em consideração (*para revisão SOUZA, 2012*).

4.3.2 Localizações dos acupontos e dos não-pontos

- **Acupontos:** a combinação de acupontos foram o E36+VG3 (FIGURA 9)

E36 (denominado, **Zusanli**): acuponto bilateral localizado, aproximadamente, a 5mm do tubérculo lateral entre a tíbia e a fíbula (YIN *et al.*, 2008; ZHAO, 2008; YANG *et al.*, 2010).

VG3 (denominado, **Yaoyangquan**): acuponto unilateral localizado na linha média dorsal entre o processo espinhoso da última vértebra lombar e a primeira sacral (YIN *et al.*, 2008).

- **Não Pontos:** as regiões não pontos utilizadas foram regiões próximas aos acupontos E36+VG3 e que estivessem no mesmo dermatomo, ou seja, regiões que aparentemente fossem inervadas pelos mesmos ramos de nervos espinais.

E36+VG3 não ponto: para o acuponto bilateral E36, o VB foi injetado na região localizada a 4mm da linha média posterior da perna e para o acuponto unilateral VG3, o VB foi injetado a cerca de 5mm na lateral direita ao ponto VG3.

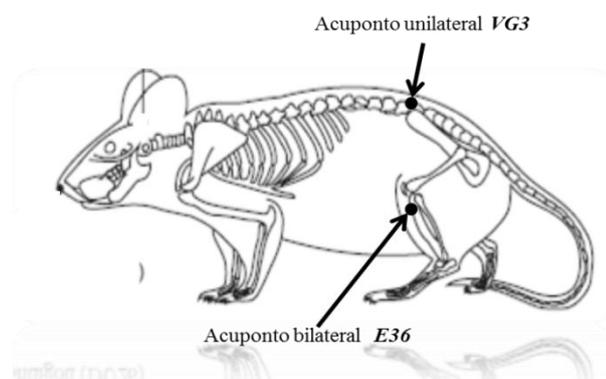


Figura 9: Desenho esquemático dos acupontos. A figura acima ilustra a localização da combinação dos acupontos E36+VG3 que foram utilizados em todos os protocolos experimentais. *Fonte: modificado de Jiang e colaboradores (JIANG *et al.*, 2014)*

4.3.3 Administração do Veneno de Abelha nos acupontos e nas regiões não ponto

A escolha da dose do VB foi baseada no trabalho experimental de Kim e colaboradores que utilizaram a dose de 0,08 mg/kg diluídos em 20 μ L de salina (KIM *et al.*, 2005). Com base na média de peso corporal dos animais, foram usados, aproximadamente, 0,024 mg de VB diluídos em 20 μ L de salina, e cada acuponto ou região não ponto recebeu uma injeção subcutânea de 20 μ L do VB diluído (*Apis mellifera*, Sigma®, USA).

- **Injeção da solução do VB nos acupontos E36+VG3:** os animais que receberam a injeção subcutânea do VB nos acupontos E36+VG3, formaram o grupo apipuntura denominado de **VB-E36+VG3**.

- **Injeção da solução de VB nas regiões não ponto:** os animais que receberam a injeção subcutânea da solução do VB nas regiões não ponto, formaram o grupo controle da apipuntura denominado de **VB-NP**.

O grupo VB-NP foi tratado com a mesma solução de VB que o grupo VB-E36+VG3, e as administrações da solução do VB nos grupos VB-E36+VG3 e VB-NP ocorreram imediatamente após a cirurgia de SCI em todos os protocolos experimentais. Para a realização do protocolo dos testes comportamentais, esses tratamentos nos grupos VB-E36+VG3 e VB-NP se repetiram uma vez por semana, no dia anterior à realização do teste BBB e da passarela gradeada, até que fossem completadas cinco semanas após a SCI.

4.4 Delineamentos dos protocolos experimentais

Para realização dos objetivos específicos, este trabalho experimental foi dividido em oito protocolos experimentais, nos quais, antes do início de cada experimento, os ratos foram submetidos à falsa lesão da medula espinal ou a lesão medular espinal moderada por compressão (FIGURA 10).

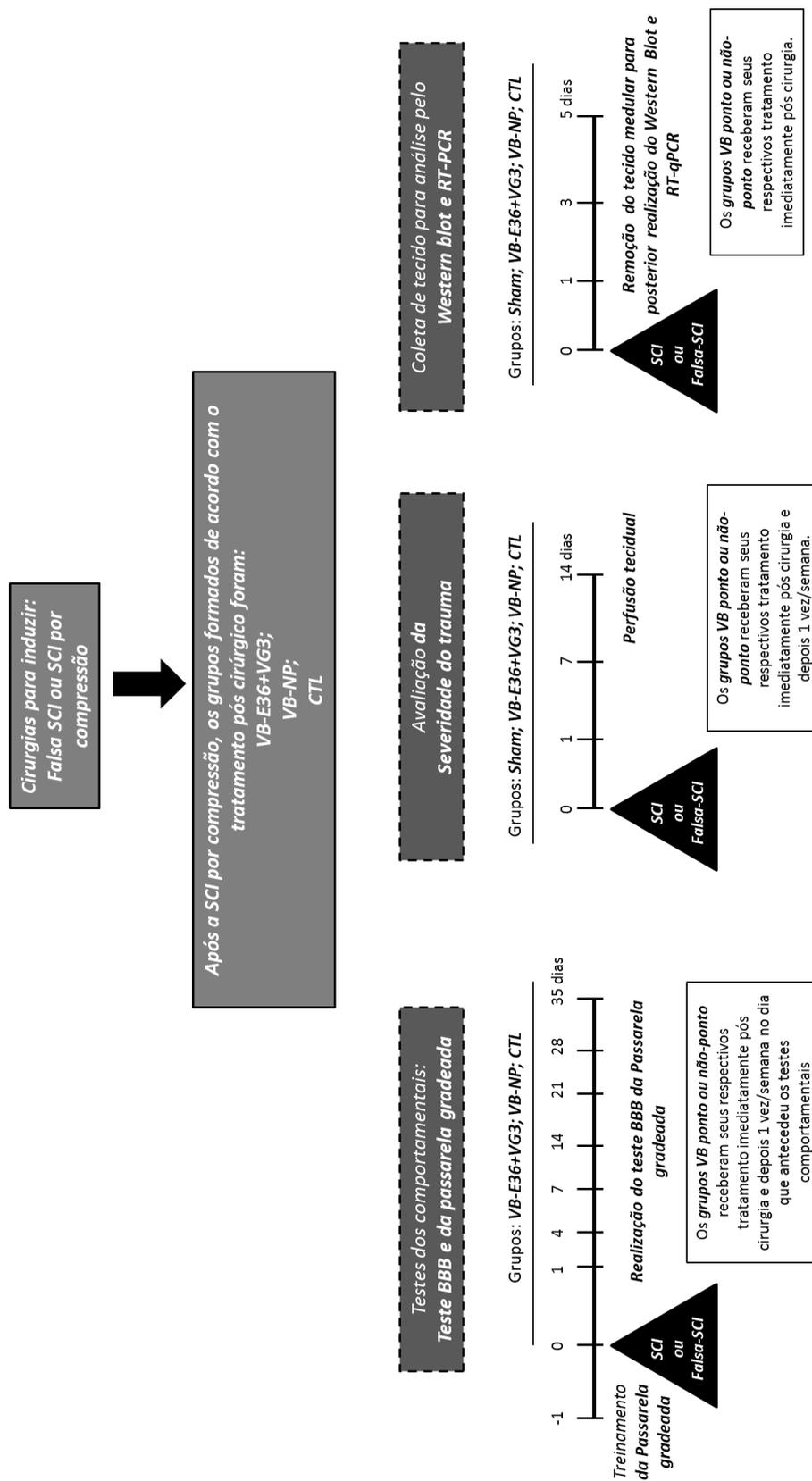


Figura 10: Esquema ilustrativo geral dos protocolos experimentais realizados no presente estudo.

Experimento 1: Avaliar se a apipuntura nos acupontos E36+VG3 melhora a coordenação e a capacidade locomotora após a SCI.

O experimento 1 foi realizado com a finalidade de avaliar por 35 dias se a apipuntura seria capaz de promover a melhora da capacidade e da coordenação locomotora dos membros posteriores de ratos submetidos à SCI por compressão (FIGURA 11)

Após o procedimento cirúrgico, os animais submetidos à lesão medular foram divididos em três grupos de acordo com o tratamento recebido:

Grupo VB-E36+VG3 – grupo que recebeu o tratamento com apipuntura, em que o VB foi injetado na dose de 0,08mg/kg diluído em 20µL de salina (\cong 0,024mg de VB em 20µL salina) nos acupontos subcutâneos E36+VG3;

Grupo VB-NP – grupo controle da apipuntura, no qual o VB foi aplicado na mesma dose e volume, em regiões subcutâneas que não fossem acupontos;

Grupo CTL-SCI – grupo submetido apenas à cirurgia de lesão medular sem receber nenhum tipo de manipulação terapêutica.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico e uma vez por semana, um dia antes da realização dos testes comportamentais, os grupos VB-E36+VG3 e VB-NP receberam o VB no ponto ou em região não ponto, respectivamente. O grupo CTL-SCI, apesar de ser submetido aos testes comportamentais não recebeu nenhum tipo de manipulação terapêutica.

A avaliação da capacidade locomotora pelo teste do BBB foi realizada em todos os grupos nos 1°, 4°, 7°, 10°, 14°, 21°, 28° e 35° dias, enquanto a avaliação da coordenação locomotora pela passarela gradeada foi realizada no 35° dia.

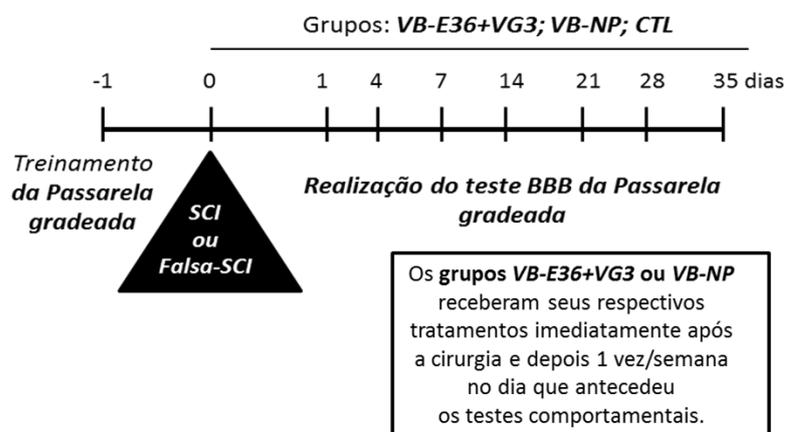


Figura 11: Esquema ilustrativo do Experimento 1. Experimento para avaliação do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a capacidade e coordenação locomotora após a SCI.

Experimento 2: Avaliar se a apipuntura nos acupontos E36+VG3 reduz o volume da área da lesão medular após a SCI.

O experimento 2 foi conduzido com a finalidade de avaliar se a apipuntura seria capaz de alterar o volume da lesão (severidade do trauma) de ratos submetidos à SCI por compressão (FIGURA 12). No 14° dia, após a realização do teste BBB, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca e tiveram o tecido medular coletado e preparado para análise histopatológica.

Nesse experimento, foi incluído o grupo falso operado (grupo Sham) com a finalidade de comparar o tecido medular íntegro em relação aos grupos VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI que foram submetidos à lesão medular.

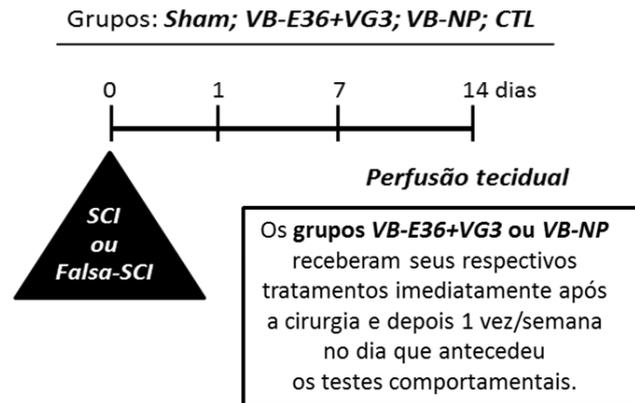


Figura 12: *Esquema ilustrativo do Experimento 2.* Experimento para avaliação do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a severidade do trauma.

Experimento 3: *Avaliar se a apipuntura nos acupontos E36+VG3 atenua a ativação de micróglia/macrófagos de astrócitos no sítio da lesão medular.*

Através da técnica do *Western Blot* foi realizada a mensuração do conteúdo de proteína no homogenato do tecido medular espinal, contendo o sítio da SCI, para a quantificação de marcadores expressos por micróglia/macrófagos (anticorpo IBA-1) e por astrócitos reativos (anticorpo GFAP). O grupo *Sham* foi incluído para comparação do conteúdo de proteína basal de IBA-1 e do GFAP em relação aos grupos VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI que foram submetidos à lesão medular.

A coleta do tecido medular ocorreu nos 1^o, 3^o e 5^o dias após a cirurgia (FIGURA 13).

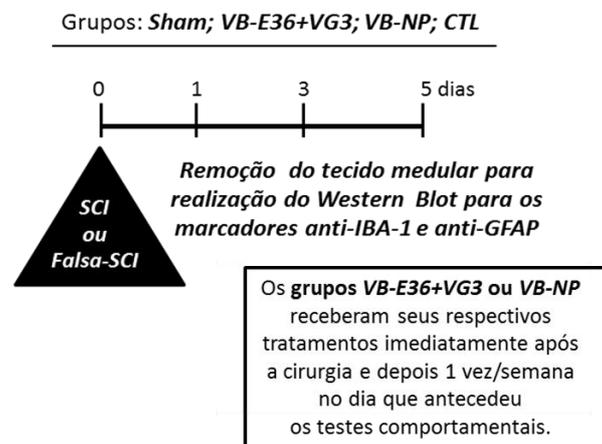


Figura 13: *Esquema ilustrativo do Experimento 3.* Experimento para avaliação da influência do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a ativação de micróglia/macrófagos e de astrócitos.

Experimento 4: Avaliar se a apipuntura nos acupontos E36+VG3 influencia a polarização de fenótipos de micróglia/macrófagos M1/M2 no sítio da lesão medular.

Para avaliar a influência da apipuntura sobre a polarização M1/M2, a técnica do qPCR foi realizada para a mensuração da expressão de RNAm das enzimas iNOS e Arg-1 e da citocina TGF- β no homogenato do tecido medular, contendo o sítio da lesão, coletados nos tempos de 1, 3 e 5 dias após a lesão medular. A expressão de RNAm da enzima iNOS foi usada como marcador do fenótipo de polarização M1, enquanto a expressão de RNAm da Arg-1 e do TGF- β foram usados como marcadores do fenótipo M2.

Neste experimento, o grupo *Sham* foi incluído para a comparação da mensuração da expressão basal de RNAm da iNOS, Arg-1 e TGF- β em relação à expressão de RNAm pelos grupos VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI (FIGURA 14).

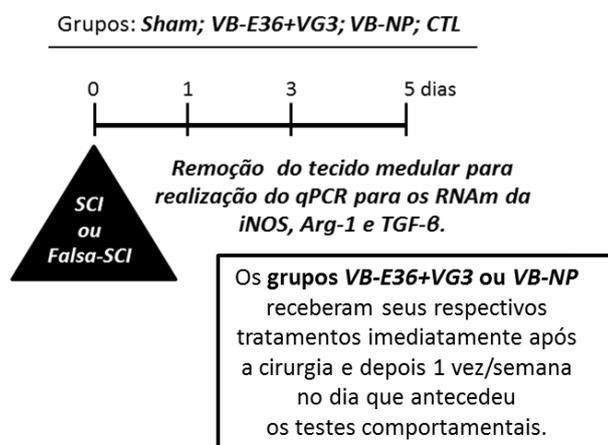


Figura 14: Esquema ilustrativo do Experimento 4. Experimento para avaliação da influência do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a expressão de RNAm de marcadores da polarização de micróglia/macrófagos.

Experimento 5: Avaliar se a apipuntura nos acupontos E36+VG3 reduz a expressão de fatores inflamatórios no sítio da lesão medular.

Para avaliar a influência da apipuntura sobre a expressão de fatores inflamatórios, a técnica do qPCR foi realizada para a mensuração da expressão de RNAm da enzima COX-2 e do NF- κ B no homogenato do tecido medular, contendo o sítio da lesão, coletados nos tempos de 1, 3 e 5 dias após a lesão medular.

Neste experimento, o grupo *Sham* foi incluído para a comparação da mensuração da expressão basal de RNAm da COX-2 e do NF- κ B em relação à expressão de RNAm pelos grupos VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI (FIGURA 15)

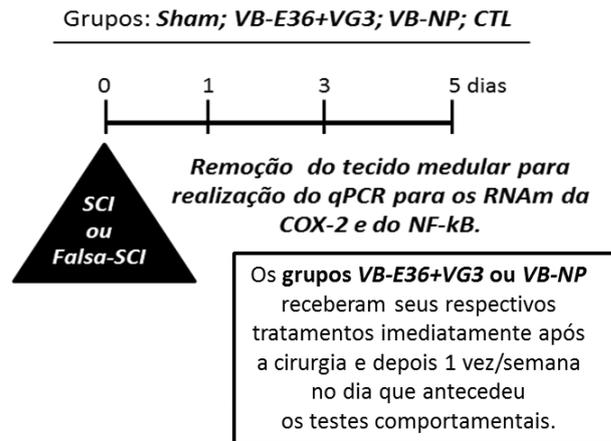


Figura 15: *Esquema ilustrativo do Experimento 5:* Experimento para avaliação da influência do tratamento com a acupuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a expressão de RNAm de marcadores da polarização de micróglia/macrófagos.

Experimento 6: Avaliar se a acupuntura nos acupontos E36+VG3 influencia o processo de apoptose no sítio da lesão medular.

O tecido medular dos grupos VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI, contendo o sítio da lesão, foi coletado nos tempos de 1, 3 e 5 dias para analisar a expressão de RNAm da caspase-3 (enzima efetora da apoptose celular), enquanto o conteúdo proteico de BCL-2 (proteína antiapoptótica) foi mensurado pelo Western Blot utilizando o anticorpo BCL-2.

O grupo *Sham* foi incluído para mensuração basal da expressão de RNAm da caspase-3 e do conteúdo proteico do BCL-2 em relação aos grupos VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI (FIGURA 16).

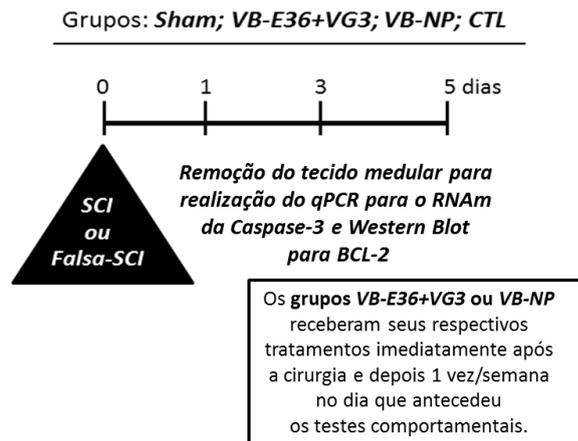


Figura 16: Esquema ilustrativo do Experimento 6: Experimento para avaliação da influência do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre o processo de apoptose.

Experimento 7: Avaliar se a apipuntura nos acupontos E36+VG3 induz a neuroproteção de neurônios e oligodendrócitos no sítio da lesão medular.

Através da técnica do *Western Blot* foi realizada a mensuração do conteúdo de proteína no homogenato do tecido medular espinal, contendo o sítio da SCI, para a quantificação do marcador expresso por neurônios (anticorpo NeuN, marcador de neurônio maduro) e para a quantificação do marcador expresso por oligodendrócitos (anticorpo CNPase, marcador da enzima expressa por oligodendrócitos). O grupo *Sham* foi incluído para comparação do conteúdo de proteína basal de NeuN e de CNPase em relação aos grupos *VB-E36+VG3*, *VB-NP* e *CTL-SCI*.

A coleta do tecido medular ocorreu no 7º dia após a cirurgia (FIGURA 17)

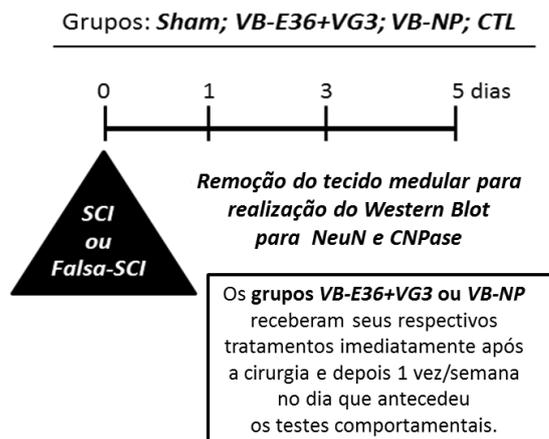


Figura 17: Esquema ilustrativo do Experimento 7: Experimento para avaliação da influência do tratamento com a apipuntura nos acupontos E36+VG3 sobre a neuroproteção de neurônios e oligodendrócitos.

4.5 Análises comportamentais após a SCI

No presente estudo, os testes comportamentais da passarela gradeada e do teste BBB foram realizados para a avaliação da coordenação e do desempenho locomotores, os quais, em conjunto, indicaram se o uso da apipuntura foi capaz de promover a melhora da capacidade locomotora em relação aos grupos controle no modelo de SCI por compressão.

Previamente à cirurgia de indução para lesão medular, os animais foram submetidos a um treinamento para atravessar a passarela e os erros durante a travessia foram raramente observados.

No protocolo experimental para análise dos testes comportamentais, os animais só realizaram o teste da passarela gradeada ao final de 35 dias e o teste do BBB foi realizado nos 1°; 4°; 7°; 10°; 14°; 21°; 28° e 35° dias após a SCI.

4.5.1 Teste para avaliação do desempenho locomotor de ratos pós SCI (teste BBB)

O teste para a avaliação da capacidade locomotora foi desenvolvido pelos pesquisadores Basso, Beattie e Bresnahan, por isso, recebe o nome de teste BBB ou escala BBB (BASSO *et al.*, 1995). Em pesquisas terapêuticas experimentais, o teste BBB tem sido uma importante ferramenta para avaliação da recuperação locomotora a curto, médio e longo prazos em ratos submetidos a SCI (KOOPMANS *et al.*, 2005) (TABELA 2).

Este teste comportamental se baseia no uso da escala BBB que é formada de escores progressivos que variam de 0-21, em que zero indica nenhum movimento observável no membro posterior e 21 indica movimentação normal dos membros posteriores. Esses escores categorizam sequências de padrões na recuperação locomotora dos membros posteriores como a movimentação do joelho, o suporte de peso, a estabilização do tronco durante as passadas, a coordenação dos membros posteriores com os anteriores, a posição das patas, a liberação dos dedos do solo e a posição da cauda (BASSO *et al.*, 1995).

Para a execução do teste no presente estudo, dois pesquisadores, cegos aos tratamentos, observaram cada animal individualmente numa caixa de acrílico transparente de 80x80x30cm com fundo antiderrapante, durante o tempo máximo de quatro minutos (FIGURA 18). O movimento voluntário dos membros posteriores, direito e esquerdo, foram comparados aos escores da escala BBB e uma média final da pontuação dos dois membros posteriores foi calculada.

Os resultados dessa análise foram representados por cada grupo experimental (VB-E36+VG3; VB-NP; CTL) como a média \pm erro padrão da média.

4.5.1 – Teste para avaliação da coordenação locomotora de ratos pós-SCI (teste da passarela gradeada)

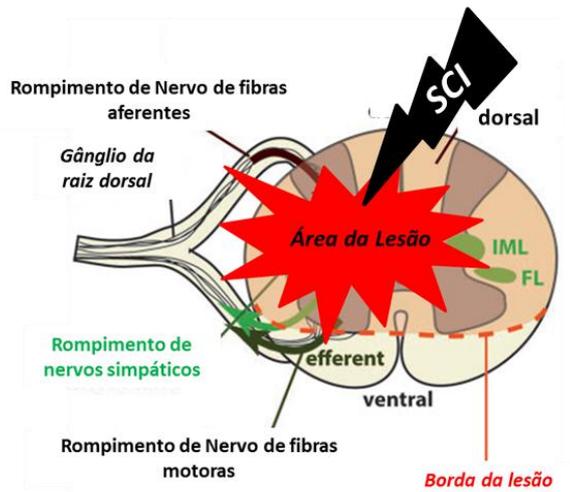
O teste da passarela gradeada avalia falhas na coordenação dos membros posteriores de animais ao realizarem a sua travessia (METZ *et al.*, 2000). Para a execução da travessia da passarela gradeada, é necessário controle, precisão e força muscular dos membros posteriores que são prejudicados após a SCI devido ao rompimento de nervos de fibras aferentes e descendentes dos sistemas sensorial e motor, que gera imprecisão no posicionamento da pata do animal sobre a barra metálica que forma a passarela gradeada (METZ *et al.*, 2000; GIANARIS *et al.*, 2016).

Para a execução do teste da passarela gradeada, os animais tiveram que atravessar as barras metálicas posicionadas perpendicularmente à passarela, na qual dez barras foram distribuídas ao longo de um metro da passarela. Para evitar a habituação quanto ao posicionamento, todas as barras tiveram suas posições alteradas a cada seção sempre respeitando o espaço máximo de 1-4 cm (METZ *et al.*, 2000).

Neste trabalho, o pesquisador observou as imprecisões na realização do movimento dos membros posteriores que geraram erros quanto à colocação das patas sobre as barras. Toda vez que o animal não fosse capaz de fixar sua pata sobre a barra metálica, ele escorregava e o seu erro era contabilizado (FIGURA 18). Os animais que não apresentassem movimento em seus membros traseiros recebiam a penalidade de dois erros por barra, como a passarela era formada por dez barras, o número total máximo de erros seria de 20 erros por travessia. Cada animal realizou um total de três cruzamentos (METZ *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2010). Nesse teste comportamental, quanto menor o número de erros durante as travessias melhor a precisão para realização do movimento locomotor e, conseqüentemente, melhor a capacidade locomotora do animal.

O resultado final foi a média do número de erros após três cruzamentos. Essa média do número de erro total foi tomada como valor de referência para a realização da análise estatística posterior.

A



B



C



Figura 18: Teste para avaliação do desempenho locomotor (Teste BBB) e Teste da passarela. Em A, O desenho esquemático representa um impacto sobre a medula espinhal gerando uma extensa área de lesão, na qual ocorre o rompimento de nervos de fibras aferentes sensoriais e dos nervos de fibras motoras que inervam o tecido muscular que formam a musculatura dos membros posteriores de ratos. Assim, os animais submetidos a SCI, apresentam movimentos imprecisos durante o cruzamento da passarela (em C). Em B, animal submetido ao teste de avaliação do desempenho locomotor. Fonte: A imagem da passarela gradeada usada neste trabalho foi criada por Breanna Arnolde do Western College of Veterinary Medicine¹ e o desenho esquemático foi modificado de Brommer e colaboradores (BROMMER et al., 2016).

¹ Fotografia do rato realizando o teste da passarela gradeada retirado do site <http://words.usask.ca/wcvm/2015/03/low-oxygen-may-help-repair-nerve/>.

Escore	Definições operacionais de categorias e atributos
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, frequente 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 frequente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior
12	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior
13	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente 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 frequente, 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 frequente 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 frequente 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.

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

4.6 Análise histopatológica

4.6.1 Perfusão tecidual

Para a realização da técnica de análise histopatológica, a perfusão tecidual foi realizada em todos os grupos no 14º dia após a SCI e após a realização do teste BBB.

Os animais foram submetidos à anestesia com thiopental sódico (50 mg/kg, i.p., Cristália). Após a constatação da ausência de reflexos musculares e corneanos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, sendo realizada uma incisão a partir do processo Xifoide para ambos os lados contornando o gradil costal. Em seguida, desinseriu-se o diafragma para a exposição completa do coração na cavidade torácica. No ápice do ventrículo esquerdo foi inserida uma agulha acoplada a um cateter que estava conectado a uma bomba peristáltica que foi imediatamente ligada.

Por este procedimento, foram impulsionados 300 mL de solução de salina com heparina (Parinex, Hipolabor, 0,2 mL/1000 mL de solução salina 0,9%) por aproximadamente 15 minutos, em seguida, a salina foi substituída pela infusão de 700 mL de paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato pH 7,4 a 4°C durante 35 minutos. O fluxo foi de 20 mL/min.

Imediatamente após o término da infusão do PFA, a medula espinal de cada animal foi cuidadosamente removida do canal vertebral e pós-fixadas por quatro horas na mesma solução de perfusão. Após as quatro horas, a medula espinal foi imersa numa solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M (PB 0,1M) e mantida sob refrigeração a 4°C até o momento do corte.

4.6.2 Análise da severidade do trauma medular

Após a perfusão, aproximadamente 1,5 cm de tecido medular contendo o sítio da lesão foi removido da coluna vertebral para avaliação da área de lesão (severidade do trauma). Os tecidos medulares removido foram processados para inclusão em parafina e posteriormente fatiados no micrótomo em cortes seriados longitudinais com 5 µm de espessura.

Para cada corte obtido, 15 µm de tecido medular foram desprezados, sendo obtidos, aproximadamente, 80 cortes no total. Os cortes foram coletados sequencialmente em lâminas de microscopia, sendo oito cortes por lâmina – num total de 10 lâminas –, que foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas ao microscópio óptico de luz (Nikon®).

Para análise histopatológica dos cortes, foi realizado um estudo para identificar em quais das 10 lâminas estaria o corte com o epicentro da lesão. Após a identificação do epicentro da SCI, foram selecionadas duas lâminas anteriores e duas posteriores à lâmina que continha o epicentro da lesão. Dessa forma, cinco lâminas tiveram a imagem de todos os cortes capturados na objetiva de 10x por um microscópio óptico (Nikon®) acoplado ao sistema de aquisição de imagens.

A partir das imagens, a análise quantitativa da área da lesão foi realizada por meio da mensuração dos dois primeiros cortes de cada lâmina pelo *software* Image J® (Maryland, USA), no qual foi realizada a calibração com uma barra de 1 mm. Para calcular a área relativa da lesão, foi realizada a mensuração da área total da medula que foi considerada como 100% em relação à área do tecido que apresentou apenas a lesão.

A média da área da lesão calculada a partir da análise dos 10 cortes de cada animal foi utilizada para a análise estatística.

4.7 Western Blot para IBA-1; GFAP; BCL-2; NeuN e CNPase

Para a realização do Western Blot, 1 cm do tecido medular contendo o sítio da lesão removido foi lisado e homogeneizado manualmente em tampão *Rippa Buffer* contendo inibidor de protease (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets* – Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 14000RPM, durante 10 minutos, a 4°C e dosado por Bradford para determinação da concentração total de proteína.

Após a dosagem de proteína, as amostras dos homogenatos foram desnaturadas a 100°C durante quatro minutos e aplicadas nos poços de gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese. Depois de separadas, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,2µm através do sistema de transferência em tanque sob voltagem constante de 150 V por 1 hora e 30 minutos (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas e incubadas com o anticorpo primário, *overnight*, e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário conjugado a HRP. As membranas foram reveladas no aparelho ChemiDoc da BioRad, após a adição do reagente revelador do kit de amplificação de quimiluminescência da BioRad (ECL, BioRad).

As bandas de proteínas reveladas foram quantificadas por densitometria óptica, utilizando o programa ImageLab da BioRad. Os valores das bandas de proteínas obtidos nessa análise foram normalizados pela densitometria da banda de proteína da β-actina, proteína constitutiva, utilizada em todo o protocolo experimental do Western Blot.

Na tabela abaixo (TABELA 3), encontram-se descritos os anticorpos primários e secundários usados nesse experimento.

Anticorpo 1°	Peso Molecular	Alvo	Lote	Anticorpo 2°	Lote
Anti-IBA-1 1:500	17-25 kda	Micróglia/Macrófago	SC-28530 Santa Cruz	Anti-Goat 1:1000	Ab6741 Abcam
Anti-GFAP 1:1000	49-57 kda	Astrócito	Ab7260 Abcam	Anti-Mouse 1:2000	Ab97046 Abcam
Anti-BCL-2 1:500	17-25 kda	BCL-2	SC-7382 Santa Cruz	Anti-Mouse 1:1000	Ab97046 Abcam
Anti-NeuN 1:1000	55-65 kda	Neurônios	ABN78 Millipore	Anti-Rabbit 1:5000	Ab6721 Abcam
Anti-CNPase 1:750	46-55 kda	Oligodendrócitos	MAB326 Millipore	Anti-Mouse 1:2000	Ab97046 Abcam
Anti-β-actina 1:3000	35-40 kda	β-actina	Ab8227 Abcam	Anti-Rabbit 1:1000	Ab6721 Abcam

Tabela 3: Descrição dos anticorpos usados neste experimento.

4.8 RT-qPCR para iNOS; Arg-1; TGF-β; NF-kB; COX-2; Caspase-3; GAPDH.

No intuito de avaliar se a apipuntura interfere no processo neuroinflamatório, na polarização da micróglia/macrófagos M1/M2 e no processo de apoptose, foi realizada a técnica de qPCR para detecção da expressão gênica de RNAm da iNOS; Arg-1; TGF-β; NF-kB; COX-2; Caspase-3. Os animais pertencentes aos grupos *Sham*; VB – E36+VG3; VB-NP e CTL-SCI foram eutanasiados 1, 3 e 5 dias após a lesão.

A eutanásia para coleta da medula espinal, contendo o sítio da lesão, foi realizada sob condições estéreis e em local *RNAase free*. Para tal, todo material utilizado na coleta foi autoclavado e a bancada de experimentação foi previamente esterilizada com álcool a 70%, preparado com água destilada autoclavada. Foi removido 1cm de tecido medular e acondicionado em tubo tipo Eppendorf *RNAase free*, sendo imediatamente congelado em nitrogênio líquido e enviado para o Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

- Obtenção do RNAm total e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total, 100 mg do tecido foram pesados e transferidos para um tubo *RNAase e DNAase free* contendo 1 mL do reagente de lise QIAzol, onde foram mecanicamente fragmentados com auxílio do aparelho *Tissue Ruptor*. O tecido lisado permaneceu em temperatura ambiente por cinco minutos.

Após esse tempo, adicionou-se 0,2mL de clorofórmio, realizando-se, em seguida, uma forte agitação por 15 segundos e incubação de dois a três minutos em temperatura de 15-30°C.

Após esse período, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g, por 10 minutos, a 2-8°C. Após a centrifugação, observou-se a separação da mistura em três partes distintas, sendo a fase aquosa superior separada e transferida para um novo tubo onde foi adicionado 0,5mL de álcool isopropílico para a precipitação do RNAm da amostra. Em seguida, as amostras foram incubadas a 15-30 °C, durante 10 minutos, e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos, a 2-8°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuscitado com 1 mL de álcool etílico 75% e foi novamente centrifugado a 7500 x g, por 5 min a 4°C.

O RNA precipitado foi então diluído em 20µL de água ultrapura (água DEPC) e quantificado no Nanodrop (*Thermo Scientific*, USA). A partir de amostras equivalentes em 500ng de RNA, sintetizou-se cDNA com *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, USA), na presença de primer randômico, de acordo com a recomendação do fabricante.

-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR ou qPCR):

Para a amplificação de produtos de RNAm, foi utilizado o *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), reagente que contém a enzima DNA polimerase, o intercalante de DNA *SYBR Green*, nucleotídeos, MgCl₂ 5mM e o corante passivo ROX, que funciona como normalizador de fluorescência na reação. A qPCR foi realizada a 95°C, por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto.

As sequências dos primers utilizados foram obtidos no banco de dados GenBank do NLM/NCBI, localizado no *National Institutes of Health* (NIH) e se encontram descritas na tabela abaixo (TABELA 4) O controle endógeno utilizado nas reações foi o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Gapdh). A ciclagem foi feita no equipamento *Applied Biosystems[®] Viia 7 Real-Time PCR*, utilizando o *software* Via 71.2.1. Os dados foram analisados pelo *software* ABI Prism SDS v1.3.1.

Primers	Sequência do Primer Senso	Sequência do Primer Reverso
GAPDH	CCATCAACGACCCCTTCATT	GACCAGCTTCCCATTCTCAG
iNOS	GGAGCAGGTTGAGGATTACTTC	TCAGAGTCTTGTGCCTTTGG
NF-kB	AACGCTCAGGAGCAGAAGTC	AGAGGTGTCGTCATCGTA
Arginase-1	ATAICTGCCAAGGACATCGTG	AGGTCTCTCCATCACTTGC
Caspase 3	TCTGACTGGAAAGCCGAAAC	GAGTAAGCATAAGGAAGTCGG
Cox-2	TCAAGGGAGTCTGGAACATTG	GCTTCCCAACTTTGTAAACCG
TGF- β	TGGCGTTACCTTGTAACC	GGTGTGAGCCCTTCCAG

Tabela 4: Sequência dos primers usados neste experimento.

4.9 Análises Estatísticas

Nos testes comportamentais da passarela gradeada e do teste BBB as médias dos resultados entre os grupos (*Sham*; VB-E36+VG3; VB-NP e CTL-SCI) foram expressas como média \pm erro padrão da média. No teste BBB e no teste da passarela, as distribuições das médias dos escores passaram no teste de normalidade, sendo que no teste BBB as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, enquanto que no teste da passarela gradeada, as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela ANOVA de uma via. Tanto para o teste BBB como para o teste da passarela, o pós-teste de comparações múltiplas gradeada foi o *Student Newman Keuls*.

Na avaliação da análise histopatológica, as médias da área total de lesão passaram no teste de normalidade o que indicou uma distribuição normal. A diferença estatística entre os grupos experimentais foi detectada pela ANOVA de uma via e foi realizado o pós-teste de comparações múltiplas *Student Newman Keuls*.

Os resultados do Western Blot e qPCR foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para avaliar se havia distribuição normal entre os grupos, realizou-se o teste *Komolgorov-Smirnov*. Para grupos com distribuição normal foi realizada a ANOVA de uma via e o pós-teste *Student Newman Keuls* para comparações múltiplas. Para grupos com distribuição fora da curva normal, foi realizado o teste não paramétrico *Kruskall Wallis*, seguido pelo pós-teste *Dunn's*.

Para todas as análises, a diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SigmaStat 3.5 e as apresentações gráficas dos resultados foram obtidas pelo programa GraphPad Prism 6.0.

5. RESULTADOS

5.1 – Efeito da apipuntura sobre testes comportamentais em ratos submetidos à lesão medular por compressão moderada.

A finalidade do experimento 1 foi avaliar se a aplicação aguda e crônica da apipuntura na combinação dos acupontos E36+VG3 apresentaria efeitos capazes de promover a melhora da capacidade locomotora através do teste BBB e do teste da passarela gradeada.

Após a SCI por compressão moderada e recuperação da anestesia, todos os animais dos grupos VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI apresentaram paraplegia e/ou paresia dos membros posteriores.

5.1.1 A Apipuntura influencia a capacidade locomotora

- Teste BBB

A análise estatística detectou diferença significativa nos fatores: grupo (*Sham*; CTL-SCI; VB-NP; VB-E36+VG3;) ($F_{(3,22)} = 327,24$; $p < 0,001$), tempo (antes da lesão, 1°, 4°, 7°, 10°, 14°, 21°, 28° e 35° dias após lesão) ($F_{(8,22)} = 512,82$; $p < 0,001$) e interação ($F_{(24,22)} = 54,67$; $p < 0,001$).

Os resultados demonstraram que do primeiro até o quarto dia após a lesão não houve diferença significativa entre os grupos submetidos à SCI (CTL-SCI; VB-NP; VB-E36+VG3). As médias no primeiro dia dos escores BBB entre os grupos CTL-SCI; VB-NP; VB-E36+VG3 variaram de 0-1, o que configura uma paraplegia ou paresia dos membros posteriores, ou seja, os animais não demonstraram movimentos espontâneos e, quando apresentaram algum tipo de movimento, era muito sutil em uma ou duas articulações dos membros posteriores (FIGURA 19)

O grupo VB-E36+VG3, já na primeira semana, apresentou uma melhora significativa da capacidade locomotora em relação aos demais grupos, sendo essa melhora é mais evidente até o término do experimento. No final da quinta semana, o grupo VB-E36+VG3 apresentou uma média de 12 pontos, o que indica que esse grupo foi capaz de executar o passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior, enquanto, os grupos VB-NP e CTL-SCI apresentaram uma média de quatro pontos, o que indica apenas movimentos discretos de suas articulações posteriores.

A	SHAM	VB-E36+VG3	VB-NP	CTL-SCI
1° dia	21 ± 0,0	0,4 ± 0,15	0,4 ± 0,13	0,3 ± 0,12
4° dia	21 ± 0,0	2,0 ± 0,49	1,2 ± 0,18	0,9 ± 0,23
7° dia	21 ± 0,0	5,7 ± 0,35	1,6 ± 0,35	2,4 ± 0,39
10° dia	21 ± 0,0	7,3 ± 0,69	1,9 ± 0,30	2,7 ± 0,373
14° dia	21 ± 0,0	8,4 ± 0,86	2,2 ± 0,33	3,1 ± 0,36
21° dia	21 ± 0,0	9,8 ± 1,09	2,8 ± 0,25	3,4 ± 0,38
28° dia	21 ± 0,0	10,6 ± 1,19	4,0 ± 0,55	3,8 ± 0,41
35° dia	21 ± 0,0	12,2 ± 0,64	4,6 ± 0,54	4,2 ± 0,27

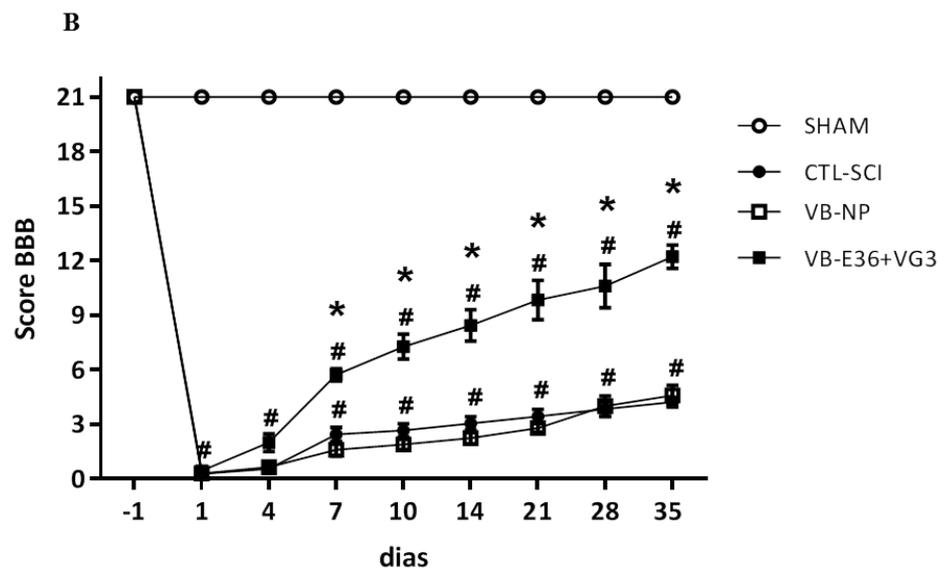


Figura 19: Efeito da apipuntura na capacidade locomotora de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Ratos *Wistar* machos foram submetidos à lesão medular por compressão e ao imediato tratamento com apipuntura (VB-E36+VG3, n=9) ou apipuntura não ponto (VB-NP, n=10) ou não receberam nenhum tipo de manipulação terapêutica (CTL-SCI, n=9). A ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do pós-teste *Student Newman Keuls* detectaram diferenças estatísticas entre os grupos $p < 0,05$. Valores foram apresentados como média \pm erro padrão da média a partir da média dos escores obtidos entre os grupos avaliados pelo teste BBB. # Indica diferença significativa do grupo *Sham* em relação aos demais grupos que sofreram lesão medular. * Indica diferença significativa do VB-E36+VG3 em relação ao CTL-SCI e em relação ao VB-NP.

- Teste da passarela gradeada

A análise estatística detectou diferença significativa entre os grupos (*Sham*; CTL-SCI; VB-NP; VB-E36+VG3) ($F_{(3,23)} = 141,046$; $p < 0,001$).

Os grupos CTL-SCI; VB-NP; VB-E36+VG3 apresentaram dificuldades motoras ao atravessar as grades da passarela gradeada, tendo em vista que os movimentos das patas traseiras eram imprecisos, resultando numa elevada média de erros em três cruzamentos (CTL-SCI = $9,73 \pm 0,45$; VB-NP = $10 \pm 0,36$; VB-E36+VG3 = $6,33 \pm 0,43$), enquanto o grupo *Sham* apresentou uma baixa média de erros ($1,18 \pm 0,29$) ($p < 0,05$) (FIGURA 20).

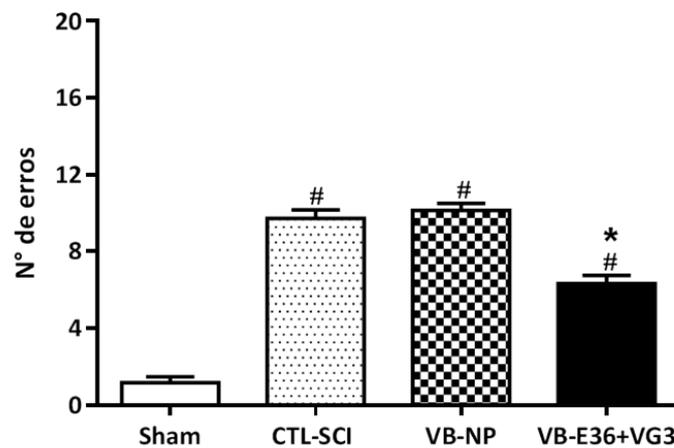


Figura 20: Efeito da apipuntura sobre o déficit do motor descendente avaliado pelo teste da passarela gradeada em ratos submetidos à lesão medular por compressão. Em A, o gráfico representa a média de erros em três travessias dos grupos *Sham* (n=5), VB-E36+VG3 (n=6), VB-NP (n=7) e CTL-SCI, (n=5) de ratos submetidos à lesão medular por compressão. Valores foram apresentados como média ± erro padrão da média. A ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste *Student Newman Keuls* detectou diferença estatística entre os grupos. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação ao grupo VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,05$).

5.2 Efeito da apipuntura sobre a severidade do trauma medular

No 14^o dia após a SCI, avaliou-se a área da lesão através da análise histopatológica, na qual os resultados indicaram diferença significativa entre todos os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI) no tempo estudado ($F(2,15) = 4,770$, $p=0,025$). O grupo VB-E36+VG3 apresentou uma redução significativa da área da lesão em relação aos seus controles VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,05$) (FIGURA 21).

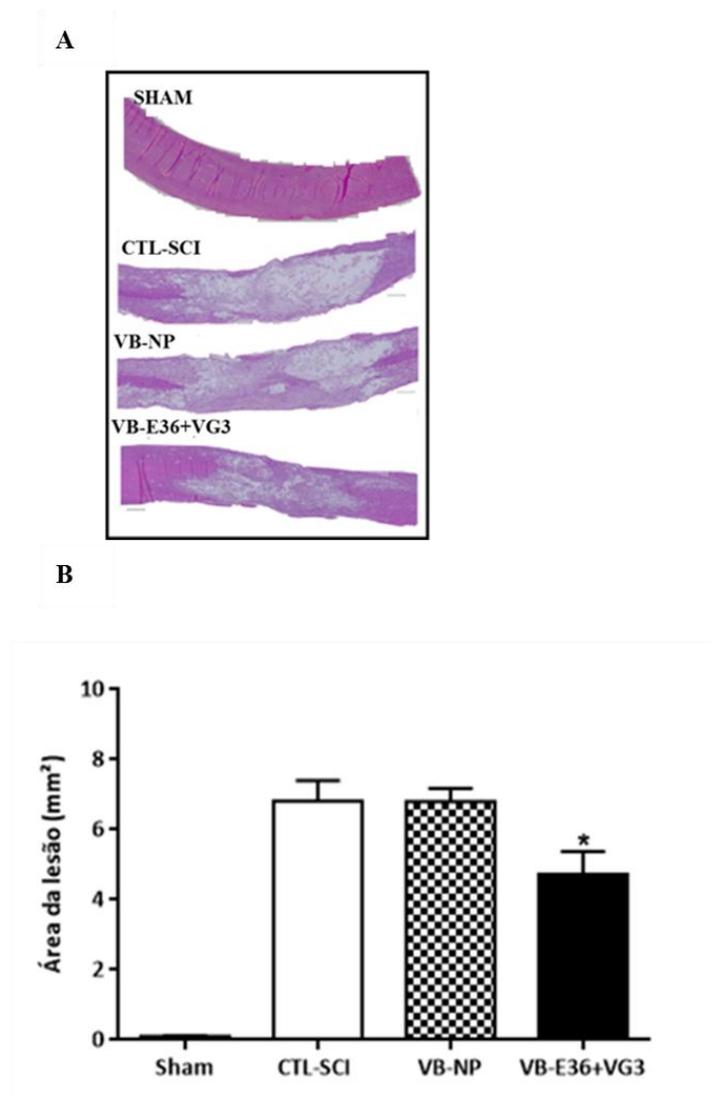


Figura 21: Avaliação histopatológica da severidade do trauma 14 dias após a SCI. Em A, as imagens representativas de cortes longitudinais da medula espinal corados com hematoxilina e eosina para avaliar a área da lesão 14 dias após a lesão medular por compressão medular (barras de calibração = 500 μ m). Em B, o gráfico representa a comparação da área da lesão em relação à extensão do corte longitudinal do tecido medular dos grupos VB-E36+VG3, VB-NP e CTL-SCI de ratos submetidos à cirurgia por compressão 14 dias após a SCI. Por apresentar o tecido medular espinal íntegro, o grupo *Sham* não foi incluído na análise estatística, sendo apresentado no gráfico apenas de forma representativa. A mensuração da área da lesão foi realizada com o *software* Image J (USA). A ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste *Student Newman Keuls* detectou diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). As colunas e as barras verticais representam a média da área de lesão em mm² e o erro padrão da média, respectivamente. * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados ($p < 0,05$).

5.2.1 Correlação da severidade do trauma com o teste BBB após SCI.

Com a finalidade de avaliar a existência de uma correlação entre severidade do trauma medular e a capacidade locomotora dos animais, realizou-se uma regressão linear simples, utilizando as médias da área total da lesão com suas respectivas médias dos escores BBB no 14º dia pós-SCI. Admitindo-se um intervalo de confiança de 95%, o teste de regressão linear simples detectou uma relação inversamente proporcional entre as médias dos escores BBB e as médias da área total da lesão ($r^2=0,97$, $p<0,001$). Este resultado indicou que quanto maior a área da lesão menor o escore BBB (FIGURA 22).

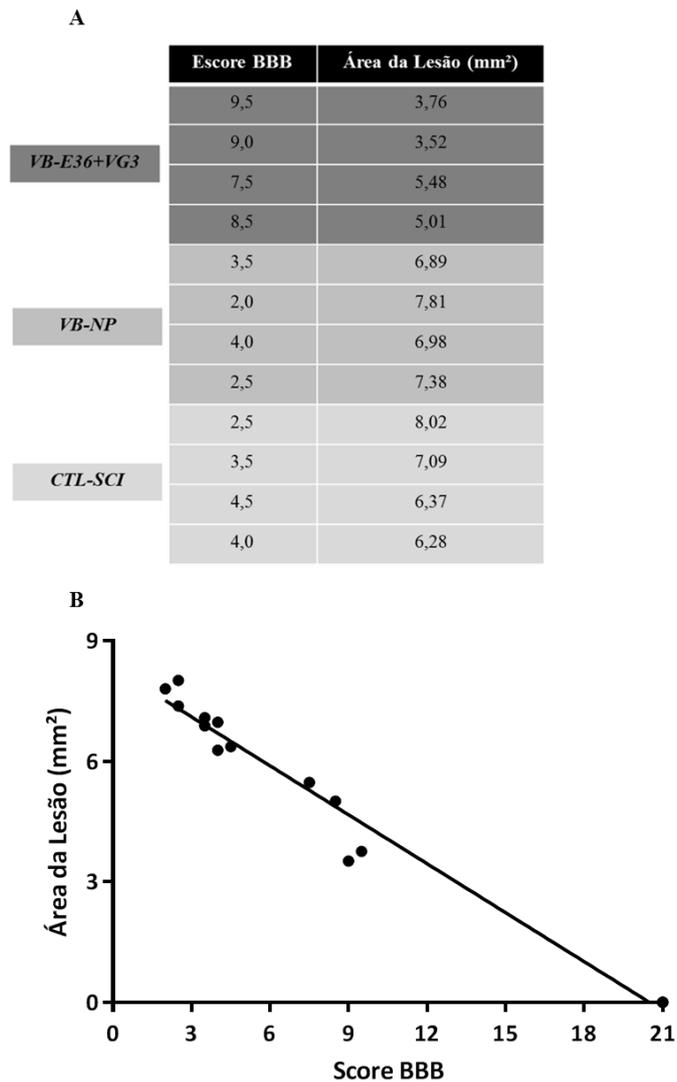


Figura 22: Correlação entre a severidade do trauma medular e a capacidade locomotora dos animais no 14º dia após lesão. Gráfico de regressão linear simples para correlação do volume total da lesão de cada medula dos grupos (*Sham* N= 3; VB-E36+VG3 N=4, VB-NP N=4, CTL-SCI N=4) com os respectivos escores BBB obtidos no 14º dia pós-lesão medular por compressão moderada. O teste de regressão linear evidenciou uma relação inversa positiva ($r=0,97$ e $p<0,001$, admitindo-se um intervalo de confiança de 95%) entre a severidade da lesão medular e a capacidade locomotora dos animais.

5.3 Efeito da apipuntura sobre astrócitos reativos e micróglia/macrófagos

5.3.1 Quantificação relativa do conteúdo proteico de Iba-1

Em todos os tempos estudados, a análise estatística detectou diferença significativa do conteúdo de proteína do IBA-1 (1° dia, $F_{(3,20)} = 13,991$, $p < 0,001$; 3° dia, $F_{(3,20)} = 59,443$, $p < 0,001$ e 5° dia, $F_{(3,20)} = 18,816$; $p < 0,001$), mostrando que a quantificação do conteúdo de proteína IBA-1 pelo grupo VB-E36+VG3 foi significativamente menor em relação aos seus controles VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,001$) (FIGURA 23).

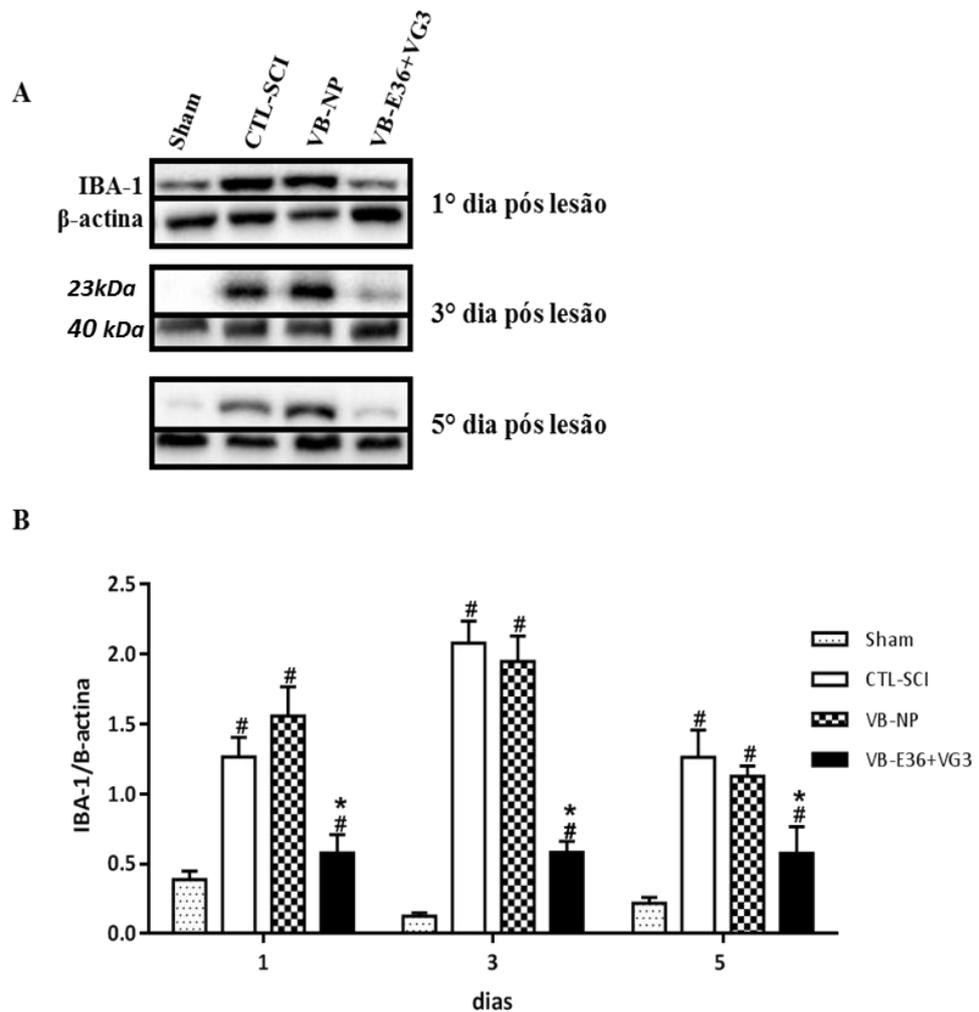


Figura 23: A apipuntura influencia a ativação de micróglia/macrófagos no modelo de SCI. Em A, membrana representativa das bandas de proteínas do marcador de micróglia/macrófago IBA-1 pelos grupos Sham; CTL; VB-NP e VB-E36+VG3 realizada pela técnica de Western Blot, no qual as bandas foram mensuradas por densitometria óptica e normalizadas pela banda de β -actina. Em B, o gráfico representa a comparação do conteúdo de proteína relativa de IBA-1 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=6), apipuntura não ponto (VB-NP, n=6), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=6) e Sham (n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o SEM, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados $p < 0,05$.

5.3.2 Quantificação relativa do conteúdo proteico de GFAP

Apenas no 3º dia, a análise estatística detectou diferença significativa do conteúdo de proteína do anticorpo GFAP (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e sham, $F_{(3,20)} = 47,777$, $p < 0,001$), em que o grupo VB-E36+VG3 apresentou um conteúdo da proteína GFAP significativamente reduzido em relação ao VB-NP ($p < 0,05$) e CTL-SCI ($p < 0,001$) (FIGURA 24).

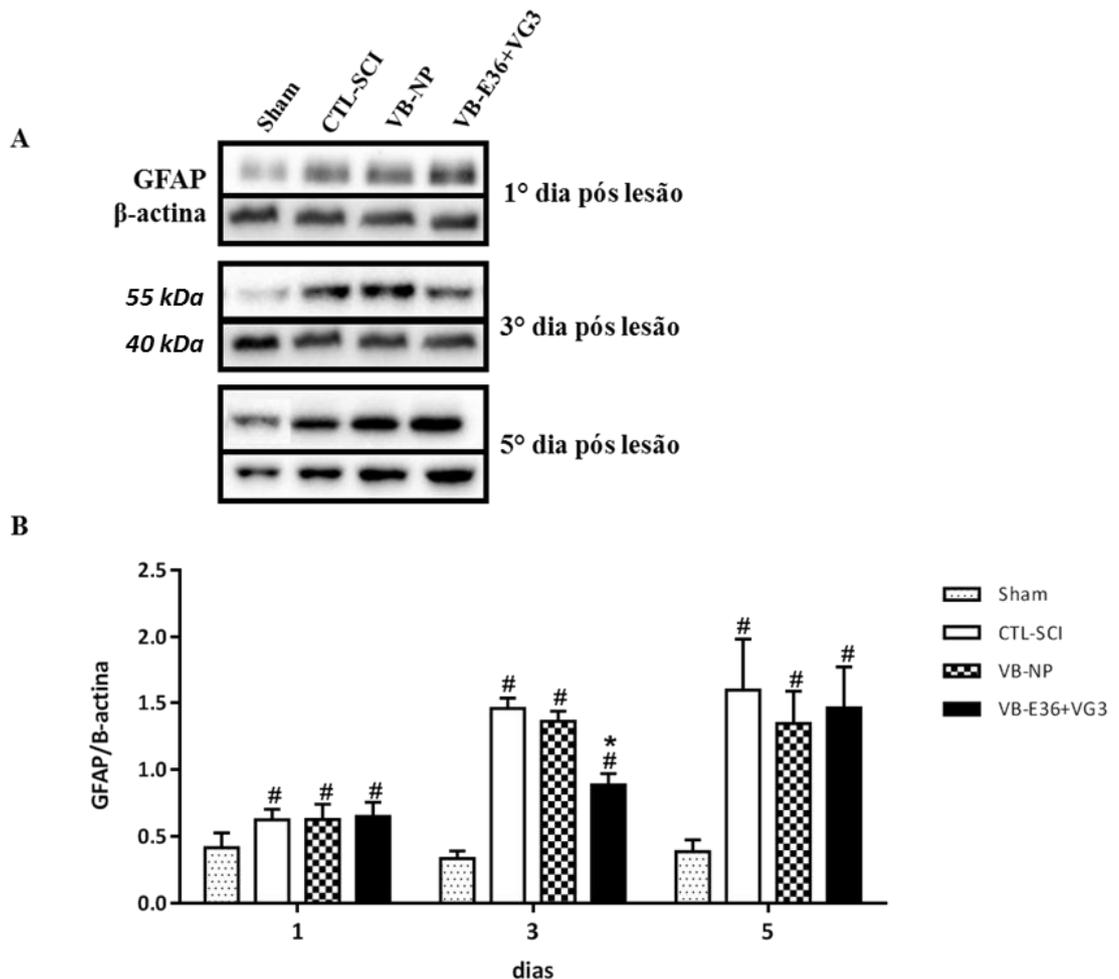


Figura 24: A apipuntura influencia a ativação de astrócitos no modelo de SCI. Em **A**, membrana representativa com as bandas de proteínas do anticorpo marcador de astrócitos reativos GFAP pelos grupos Sham; CTL-SCI; VB-NP e VB-E36+VG3 realizada pela técnica de Western Blot, na qual as bandas foram mensuradas por densitometria óptica e normalizadas pela banda de β-actina. Em **B**, o gráfico representa a comparação do conteúdo de proteína relativa de GFAP no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=6), apipuntura não ponto (VB-NP, n=6), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=6) e Sham (n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o SEM, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados $p < 0,05$.

5.4 Efeito da apipuntura sobre a neuroproteção de neurônios e oligodendrócitos

5.4.1 Quantificação relativa do conteúdo proteico de NeuN

A análise estatística indicou que houve diferença significativa do conteúdo da proteína NeuN entre todos os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e *Sham*) no tempo estudado ($F_{(3,20)} = 14,799$, $p < 0,001$). Os resultados indicaram que o grupo VB-E36+VG3 apresentou um conteúdo proteico significativamente maior de NeuN em relação aos seus controles VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,001$) (FIGURA 25B).

5.4.2 Quantificação relativa do conteúdo proteico de CNPase

A análise estatística indicou que ocorreu diferença significativa do conteúdo da proteína CNPase entre todos os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e *Sham*) no tempo estudado ($F_{(3,20)} = 19,451$, $p < 0,001$). Os resultados indicaram que o grupo VB-E36+VG3 apresentou um conteúdo proteico significativamente maior de CNPase em relação aos seus controles VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,001$) (FIGURA 25C).

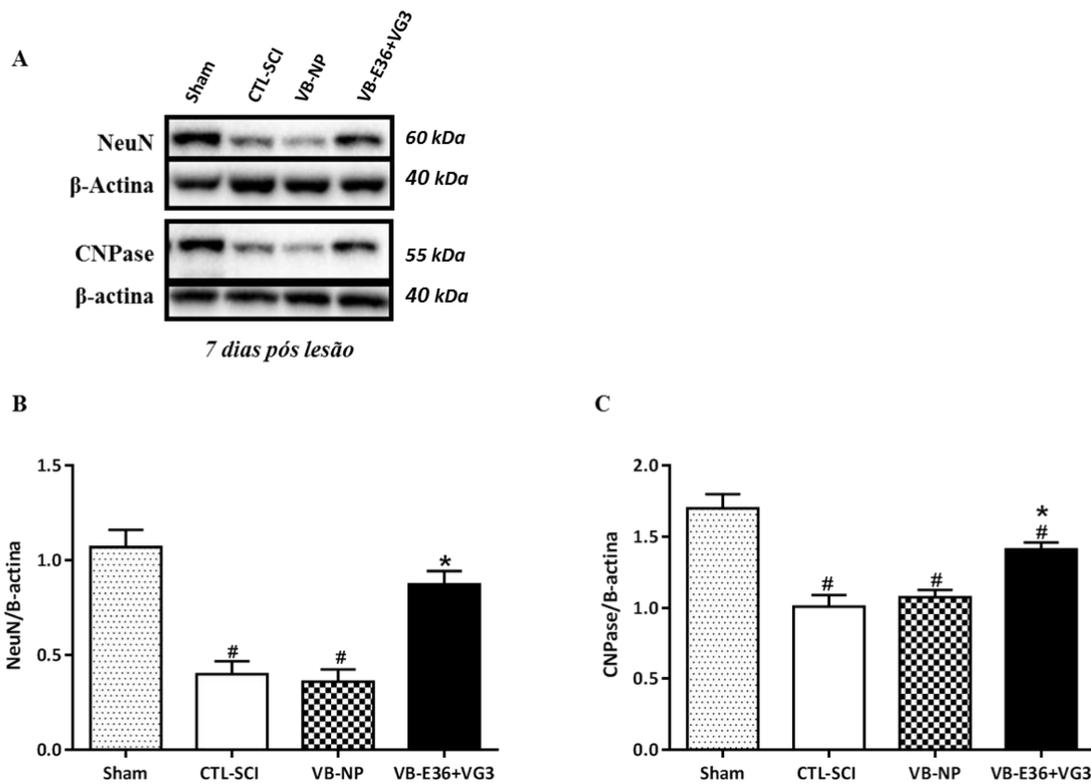


Figura 25: A apipuntura impede a redução de NeuN e de CNPase no modelo de SCI. Em A, membrana representativa das bandas de proteínas de NeuN e CNPase pelos grupos *Sham*, CTL-SCI, VB-NP e VB-E36+VG3 mensurados por densitometria, normalizados pela β -actina. Em B e C, os gráficos representam a comparação do conteúdo proteico de NeuN e de anti-CNPase no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão sete dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=6), apipuntura não ponto (VB-NP, n=6), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=6) e *Sham* (n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo sham ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados ($p < 0,001$).

5.5 Efeito da apipuntura sobre fator antiapoptótico

5.5.1 Quantificação relativa do conteúdo proteico de BCL-2

Em todos os tempos avaliados, a análise estatística detectou diferença significativa entre os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e *Sham*) com relação ao conteúdo da proteína BCL-2 que é uma proteína antiapoptótica (1° dia - $F_{(3,20)} = 5,559$, $p < 0,006$; 3° dia - $F_{(3,20)} = 8,005$, $p < 0,001$; 5° dia - $F_{(3,16)} = 48,752$; $p < 0,001$). No 5° dia, a apipuntura demonstrou uma influência significativa sobre o aumento do conteúdo da proteína BCL-2 em relação aos grupos VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,001$) (FIGURA 26).

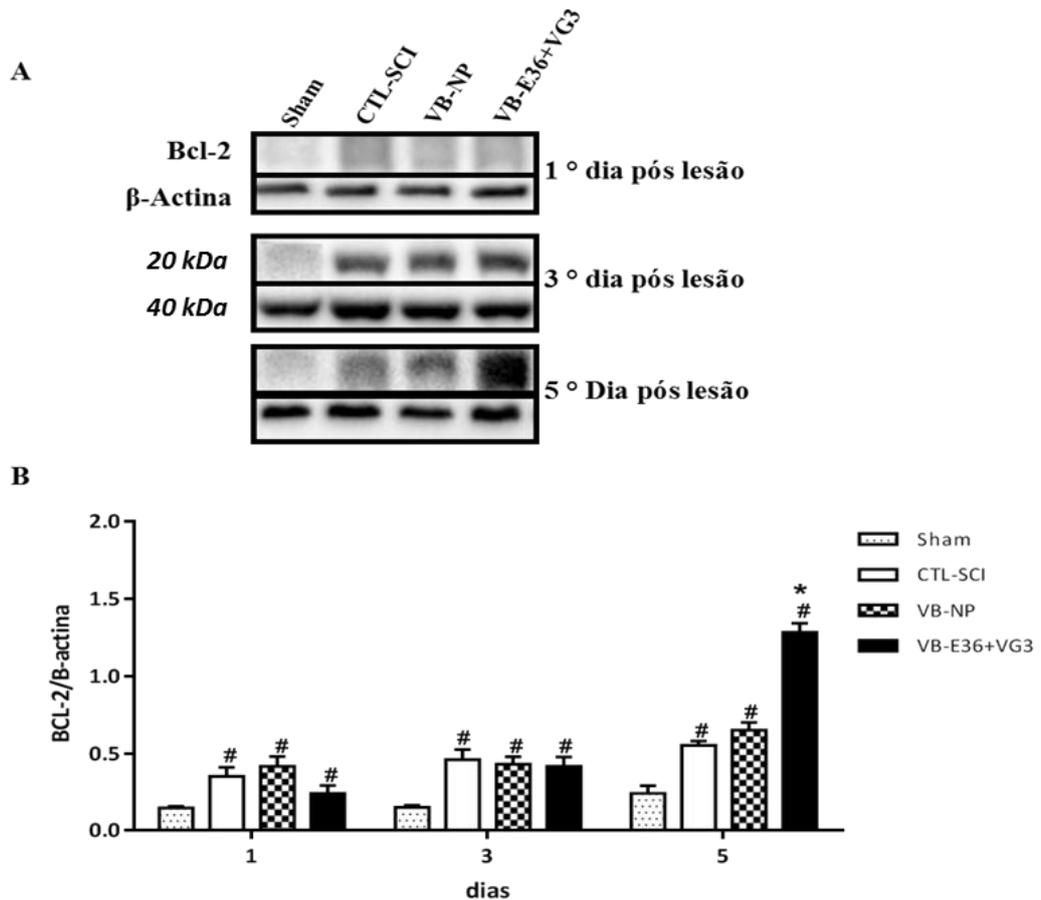


Figura 26: Conteúdo proteico relativo do BCL-2. Em A, membrana representativa com as bandas de proteínas do BCL-2 pelos grupos *Sham*, CTL-SCI, VB-NP e VB-E36+VG3 mensurados por densitometria, normalizados pela β -actina. Em B, o gráfico representa a comparação da expressão relativa de BCL-2 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão sete dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=6), apipuntura não ponto (VB-NP, n=6), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=6) e *Sham* (n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados ($p < 0,001$).

5.6 – Efeito da apipuntura sobre a expressão de RNAm dos fenótipos de polarização de micróglia/macrófagos

5.6.1 Quantificação de RNAm da Arginase-1 (marcador do fenótipo M2)

Em todos os tempos estudados, a análise estatística não paramétrica detectou diferença significativa entre os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e *Sham*) com relação à expressão de RNAm da enzima Arg-1, que é um marcador que indica a polarização de micróglia/macrófagos no perfil anti-inflamatório M2 (1° dia K= 10,943, p = 0,012; 3° dia K= 12,166, p= 0,007; 5° dia K= 15,594; p= 0,001), na qual, no quinto dia, a expressão de RNAm da Arg-1 estava significativamente reduzida no grupo VB-E36+VG3 em relação aos grupos VB-NP e CTL-SCI (p<0,05) (FIGURA 27).

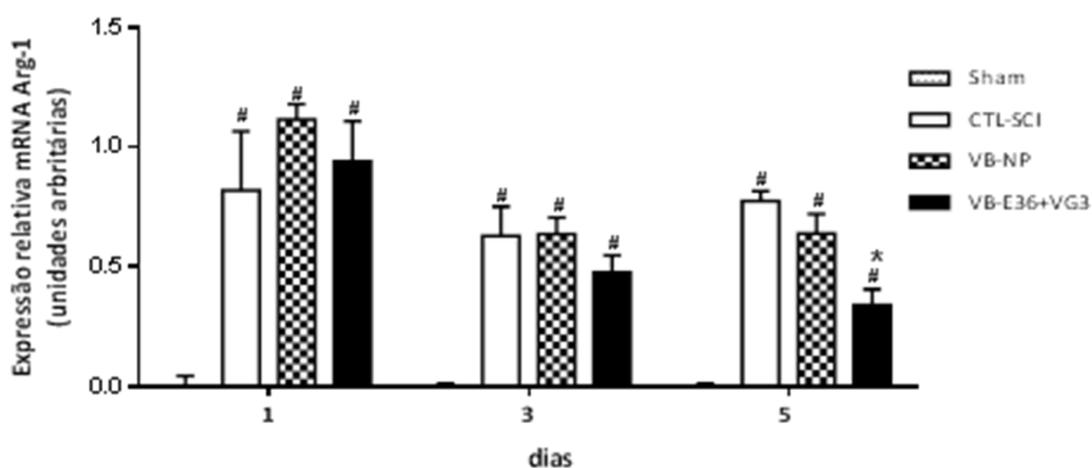


Figura 27: Expressão de RNAm da Arginase-1 na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão de RNAm da Arginase-1 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* (p<0,05); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados (p<0,05).

5.6.2 – Quantificação de RNAm do TGF- β (marcador do fenótipo M2)

Em todos os tempos estudados, a análise estatística detectou diferença significativa entre os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e *Sham*) com relação à expressão de RNAm da citocina TGF- β , que é um marcador que indica a polarização de micróglia/macrófagos no perfil anti-inflamatório M2 (1° dia - $F_{(3,16)} = 17,807$, $p < 0,001$; 3° dia - $F_{(3,16)} = 36,875$, $p < 0,001$; 5° dia - $F_{(3,16)} = 85,545$; $p < 0,001$), mostrando que, no quinto dia, a expressão de RNAm do TGF- β estava significativamente reduzida no grupo VB-E36+VG3 em relação aos grupos VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,05$) (FIGURA 28).

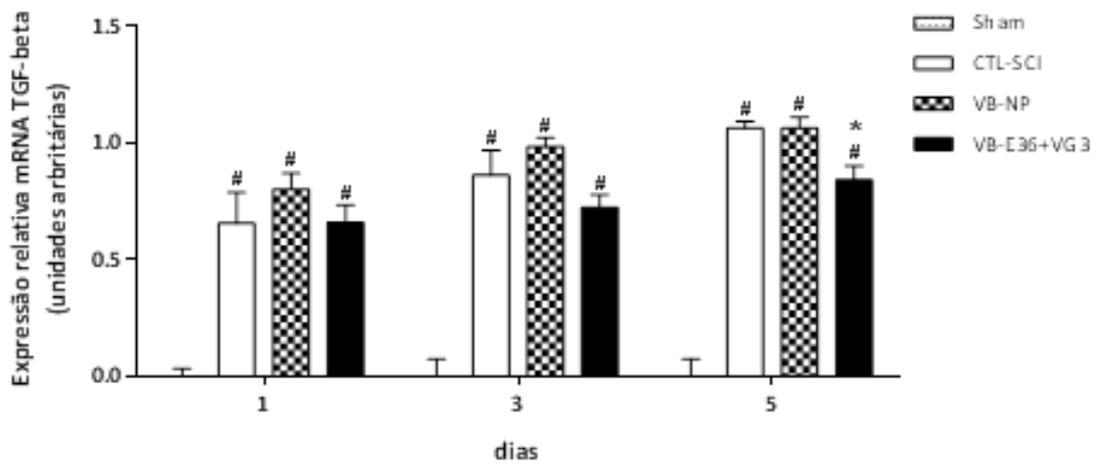


Figura 28: Expressão de RNAm de TGF- β na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão de RNAm de TGF- β no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apituntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apituntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo sham ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação aos demais grupos operados ($p < 0,05$).

5.6.3 Quantificação de RNAm da iNOS (marcador do fenótipo M1)

No 3° e 5° dias, a análise estatística demonstrou diferença significativa entre os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e *Sham*) com relação à expressão de RNAm da iNOS que é um marcador que indica a polarização de micróglia/macrófagos no perfil anti-inflamatório M1 (3 dias - $F_{(3,16)} = 6,529$, $p = 0,004$; 5 dias - $F_{(3,16)} = 19,838$; $p < 0,001$), no qual, tanto no 3° quanto no 5° dia a expressão de RNAm da iNOS estava significativamente reduzida no grupo VB-E36+VG3, em relação aos grupos VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,001$) (FIGURA 29).

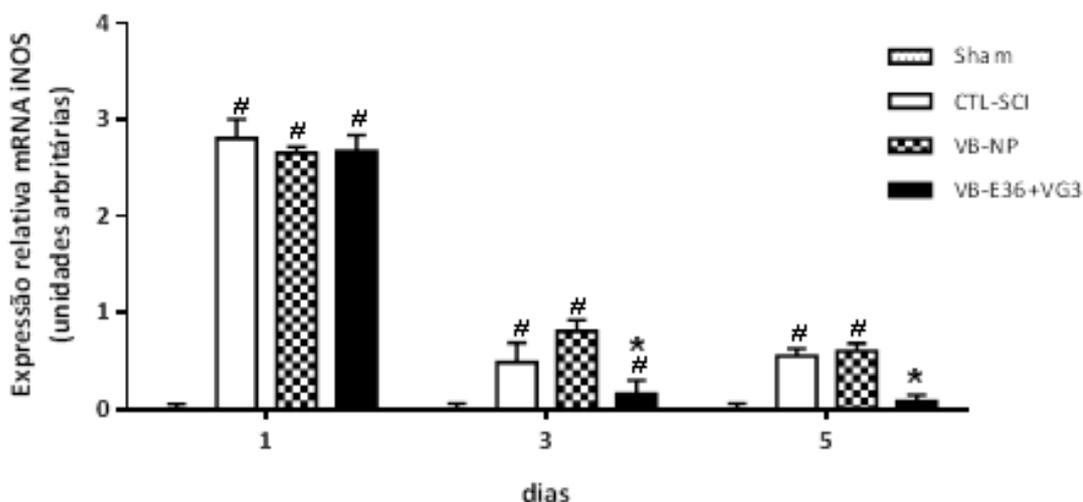


Figura 29: Expressão de RNAm da iNOS na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão do RNAm da iNOS no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam à média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação ao CTL-SCI e VB-PTO, $p < 0,001$.

5.6.4 Influência da apipuntura sobre as expressões de RNAm dos marcadores do perfil M1 e M2 de micróglia/macrófagos

Em razão dos resultados da qPCR sobre a expressão de RNAm da Arg-1 e TGF- β , marcadores M2, e da expressão de RNAm da iNOS, marcador M1, indicarem que o tratamento com a apipuntura foi capaz de interferir na expressão gênica de todos os fatores associados com o perfil de polarização de micróglia/macrófagos no 5º dia, uma análise estatística foi realizada para avaliar sobre qual marcador a apipuntura foi capaz de apresentar maior influência. O resultado desta análise indicou que a apipuntura exerceu maior influência sobre a expressão de RNAm da iNOS do que em relação à expressão de RNAm da Arg-1 e do TGF- β ($p < 0,001$) (FIGURA 30).

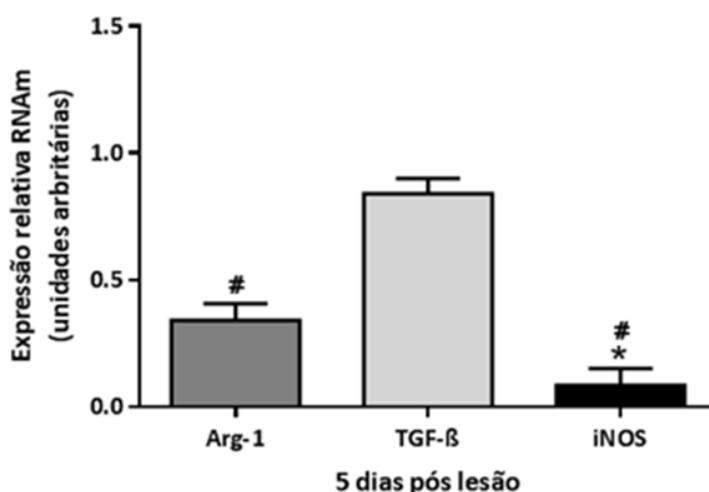


Figura 30: Influência da apipuntura sobre as expressões relativas de RNAm dos marcadores do perfil M1 e M2 de micróglia/macrófagos. Em **A**, o gráfico representa a comparação da expressão relativa de RNAm da iNOS, Arg-1 e TGF- β no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão no 5º dia após o tratamento com apipuntura (VB-E36+VG3, n=6). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. * Indica redução significativa da expressão relativa de RNAm da iNOS em relação à expressão de RNAm da Arg-1 e do TGF- β ($p < 0,001$). # Indica a redução significativa de RNAm da iNOS e da Arg-1 em relação ao TGF- β . Em **B**, gráfico representativo demonstrando que a apipuntura apresenta maior influência sobre o perfil de polarização do fenótipo M1.

5.7 – Efeito da apipuntura sobre a expressão de RNAm de fatores inflamatórios

5.7.1 - Quantificação da expressão de RNAm da COX-2

Em todos os tempos estudados, a análise estatística detectou diferença significativa entre os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e *Sham*) com relação à expressão de RNAm da COX-2, que é uma enzima induzida e que participa ativamente da resposta inflamatória após a SCI estudada (1° dia, $F_{(3,16)} = 74,028$, $p < 0,001$; 3° dia, $F_{(3,16)} = 21,285$, $p < 0,001$; 5° dia, $F_{(3,16)} = 39,560$; $p < 0,001$). Os resultados demonstram que no 1° e 5° dias, a apipuntura reduziu significativamente a expressão de RNAm da COX-2 em relação aos grupos VB-NP e CTL-SCI ($p < 0,05$) (FIGURA 31).

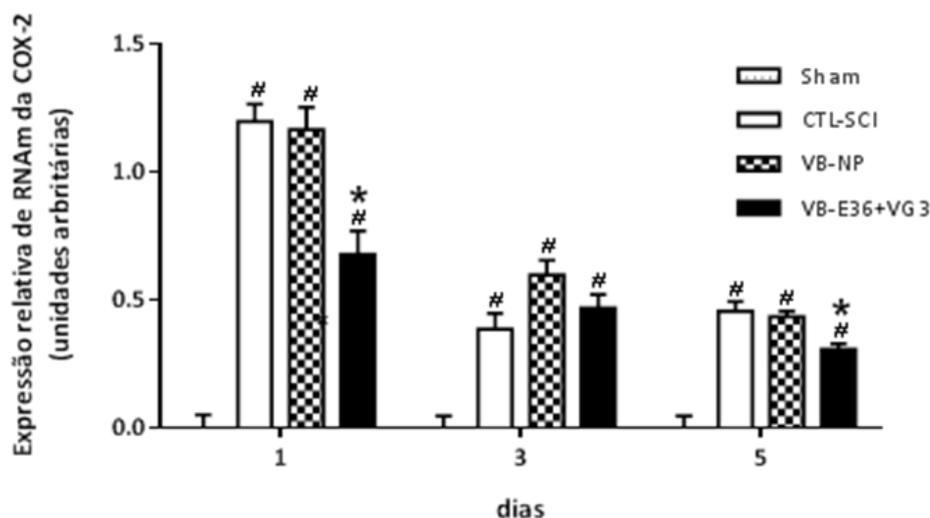


Figura 31: Expressão de RNAm da COX-2 na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão do RNAm da COX-2 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação ao CTL-SCI e VB-PTO, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente.

5.7.2 - Quantificação da expressão de RNAm do NF-kB

Em todos os tempos estudados, a análise estatística detectou diferença significativa entre os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e *Sham*) com relação à expressão de RNAm do NF-kB que é um fator de transcrição gênica considerado como o maior inicializador da resposta inflamatória (1° dia - $F_{(3,15)} = 3,411$, $p = 0,045$; 3° dia - $F_{(3,16)} = 8,801$, $p < 0,001$; 5° dia - $F_{(3,16)} = 18,353$, $p < 0,001$). Os resultados demonstram que no 3° dia, a apipuntura reduziu significativamente a expressão de RNAm do NF-kB em relação ao grupo VB-NP ($p < 0,05$), mas não em relação ao CTL-SCI ($p > 0,05$) (FIGURA 32).

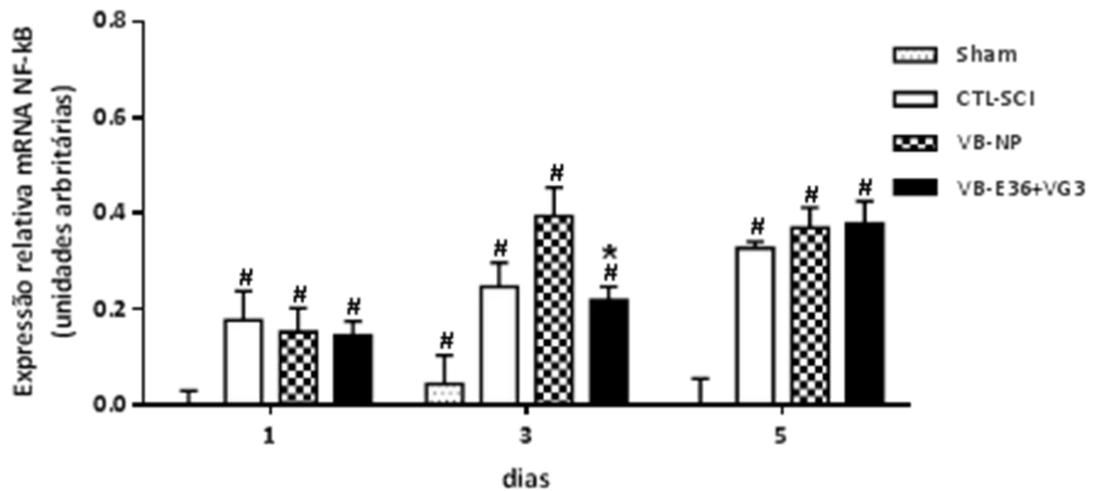


Figura 32: Expressão de RNAm do NF-kB na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão do RNAm do NF-kB no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa do grupo VB-E36+VG3 em relação ao grupo VB-NP ($p < 0,05$).

5.8 Efeito da apipuntura sobre a expressão de RNAm do fator apoptótico Caspase-3

5.8.1 Quantificação de RNAm da Caspase 3

Em todos os tempos estudados, a análise estatística detectou diferença significativa entre os grupos (VB-E36+VG3, VB-NP, CTL-SCI e *Sham*) com relação à expressão de RNAm da caspase-3 (1° dia - $F_{(3,15)} = 1,830$, $p < 0,05$; 3° dia - $F_{(3,16)} = 26,808$, $p < 0,001$; 5° dia - $F_{(3,16)} = 26,130$, $p < 0,001$), mas a apipuntura não demonstrou influência sobre a expressão de RNAm da caspase-3 em nenhum dos tempos avaliados ($p > 0,05$) (FIGURA 33).

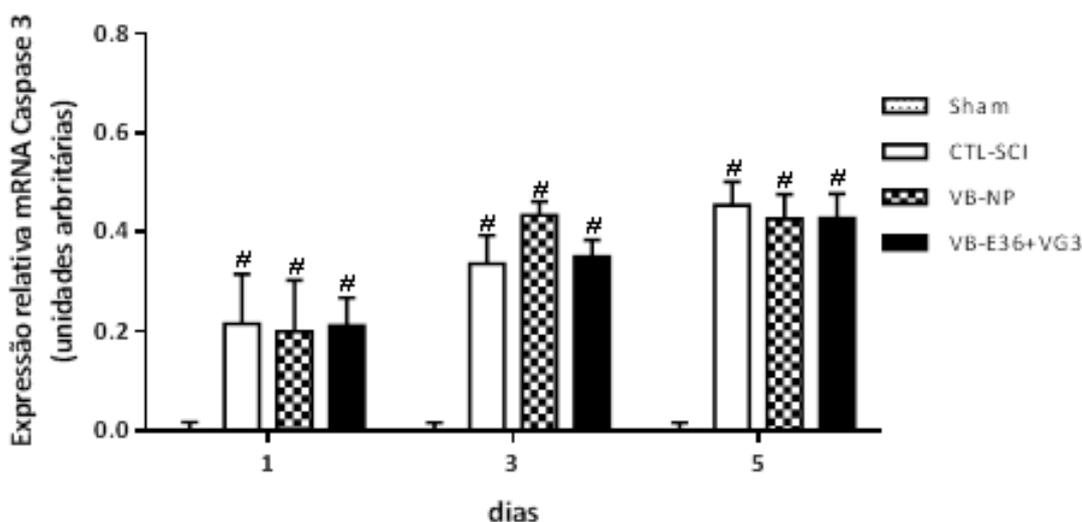


Figura 33: Expressão de RNAm da Caspase 3 na medula espinal após a SCI. O gráfico representa a comparação da expressão do RNAm da caspase 3 no sítio da lesão na medula espinal de ratos submetidos à cirurgia por compressão 1, 3 e 5 dias após o tratamento com apipuntura no ponto (VB-E36+VG3, n=5), apipuntura não ponto (VB-NP, n=5), animais controle sem manipulação (CTL-SCI, n=5) e *Sham* (n=5). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão, respectivamente. # Indica diferença significativa em relação ao grupo *Sham* ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento com a apipuntura foi capaz de reduzir a perda de tecido nervoso na medula espinal e promover significativa recuperação parcial da capacidade locomotora. Os resultados sugerem que a melhora parcial da capacidade locomotora avaliada pelos testes comportamentais e a redução da severidade do trauma possam estar associados à ação neuroprotetora da apipuntura pela preservação de neurônios e oligodendrócitos no tecido da medula espinal após a SCI.

A apipuntura promoveu uma redução da resposta neuroinflamatória através de influência sobre a polarização de fenótipos de micróglia/macrófagos, redução da ativação de astrócitos e na redução fatores inflamatórios. Por fim, os resultados sugeriram que a apipuntura não influenciou a expressão de RNAm do fator apoptótico, caspase-3, mas promoveu aumento significativo da expressão da proteína antiapoptótica, Bcl-2.

6.1 Modelo de lesão medular por compressão

Na lesão medular traumática, o intenso impacto mecânico primário gera o deslocamento dos ossos da coluna vertebral e discos intervertebrais, ocasionando uma força compressiva na medula espinal e, conseqüentemente, o dano medular (ESPOSITO e CUZZOCREA, 2011; KJELL e OLSON, 2016; AHUJA *et al.*, 2017). Alguns modelos experimentais de SCI foram desenvolvidos na tentativa de mimetizar ao máximo o trauma mecânico que ocorrem em acidentes para possibilitar uma melhor compreensão dos eventos secundários após a SCI (KJELL e OLSON, 2016).

O desenvolvimento de modelos de SCIs experimentais tem tornado possível a compreensão sobre as complexidades associadas às alterações fisiopatológicas geradas pelos danos secundários que resultam em severas e irreversíveis sequelas neurológicas (KWON *et al.*, 2004; GENOVESE *et al.*, 2007; SAGANOVA *et al.*, 2008; LONJON *et al.*, 2010; KJELL e OLSON, 2016; FORGIONE *et al.*, 2017).

Nas pesquisas terapêuticas, os modelos experimentais de indução da SCI por contusão e por compressão são os modelos mais usados (LONJON *et al.*, 2010). A preferência do uso destes dois modelos pode ser explicada por serem os modelos que mais se aproximam dos acidentes que promovem a SCI em humanos, nos quais a ocorrência transecção total na medula espinal do é rara (KWON *et al.*, 2004; LONJON *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, o modelo experimental de contusão por queda de peso tem sido muito explorado. Este modelo consiste na geração do impacto primário na medula espinal exposta após uma laminectomia. O impacto ocorre pela queda de uma estrutura metálica com peso conhecido através de um tubo a uma distância fixa controlada por sistema computadorizado, assim, uma instantânea deformação mecânica é gerada sobre o tecido medular (KWON *et al.*, 2004). O questionamento sobre a técnica de contusão é que o impacto é gerado e não há a permanência de forças compressivas sobre o tecido medular como ocorre na maioria dos acidentes reais (LONJON *et al.*, 2010).

No modelo experimental de compressão medular, a SCI é induzida por uma força compressiva duradoura que pode ser gerada pela pressão com balonete inflável e clip de aneurisma, mimetizando a persistência de uma força compressiva sobre a medula espinal, que é o que de fato ocorre na maioria das lesões medulares em humanos (GENOVESE *et al.*, 2007; SAGANOVA *et al.*, 2008; LONJON *et al.*, 2010).

Independentemente do modelo experimental escolhido para indução da SCI, este deve gerar confiabilidade e reprodutibilidade aos experimentos para propiciar ao pesquisador a possibilidade de reproduzir as mesmas gravidades de lesão e, assim, confiar nos resultados

terapêuticos do tratamento estudado (VANICKÝ *et al.*, 2001; LONJON *et al.*, 2010; KJELL e OLSON, 2016).

No presente estudo, o modelo experimental utilizado foi o modelo de lesão medular por compressão moderada por meio da inflação do balão de um cateter de embolectomia pediátrico padronizado por Vanický e colaboradores (VANICKÝ *et al.*, 2001). Este modelo de lesão medular por compressão apresenta vantagens, como o desenvolvimento gradual da lesão, reprodutividade, baixo custo, além de fácil execução cirúrgica (VANICKÝ *et al.*, 2001; SAGANOVÁ *et al.*, 2008).

Durante o prévio período de padronização deste modelo no nosso laboratório, os resultados pós-cirúrgicos entre os animais foram muito similares (SOUZA, 2012). Os resultados da capacidade locomotora e da severidade do trauma neste estudo indicaram uma correlação significativa da área da lesão com o escore do teste BBB. Assim, quanto maior a área de lesão menor a capacidade locomotora do animal que parece associada principalmente a morte de motoneurônios que constituem o tecido da medula espinal (ZHAO *et al.*, 2017).

Dessa forma, o modelo se adequa perfeitamente à investigação terapêutica proposta neste trabalho. Além disso, as respostas celulares e a mensuração de fatores inflamatórios e apoptóticos estavam mais elevados nos grupos submetidos à lesão medular em relação ao grupo falso operado.

6.2. Especificidade e estimulação dos acupontos na melhora da capacidade locomotora

No presente estudo, a escolha da combinação dos E36+VG3 foi baseada a partir de resultados anteriores em nosso laboratório, no qual, inicialmente, foram testadas as combinações E36+VG3, ID3+B62 e VG3+VG9 no mesmo modelo de SCI por compressão. Assim, nós identificamos que a combinação dos acupontos E36+VG3 se mostrou mais eficiente na recuperação locomotora em comparação as outras duas combinações (SOUZA, 2012).

Paralelamente neste estudo, nós também testamos duas formas diferentes de estimulação dos acupontos que foram o agulhamento seco diário através da acupuntura manual e a aplicação do veneno de abelha uma vez por semana. Os animais submetidos à combinação dos acupontos E36+VG3 tanto na acupuntura manual quanto na apipuntura apresentaram resultados significativamente melhores na recuperação locomotora. Além disso, nossos resultados também demonstraram que não houve diferença entre a utilização da acupuntura manual e a apipuntura como formas de estimular os acupontos, sendo assim, os dois métodos de estimulação dos acupontos se mostraram eficiente em promover a recuperação parcial da capacidade locomotora após a SCI por compressão (SOUZA, 2012).

Devemos ressaltar que apesar do reconhecimento da importância da eletroacupuntura e da acupuntura como método de estimulação em estudos experimentais, devemos considerar que estes tipos de estimulação, invariavelmente geram estresse em animais de experimentação, pois envolvem a imobilização do animal por pelo menos 20 minutos para que haja a permanência das agulhas nos acupontos afim de que o objetivo terapêutico seja alcançado (MEDEIROS, 2001). Enquanto que a estimulação com o veneno de abelha nós acupontos E36+VG3 promoveram resultados semelhantes ao da acupuntura manual apenas com uma aplicação semanal no acuponto (SOUZA, 2012). A partir desses resultados iniciais, nosso grupo optou por prosseguir as investigações do efeito da apipuntura no modelo de lesão medular utilizando a combinação dos acupontos E36+VG3.

A prática clínica da MTC indica o uso dos acupontos do vaso-governador no tratamento da SCI, pois segundo a MTC, na SCI ocorre à interrupção do fluxo de energia pelo meridiano do vaso-governador, sendo assim, a estimulação de pontos como o VG3, o VG9 e o VG6 pode contribuir para “melhorar do fluxo de energia das costas e o movimento das

pernas”. Nas pesquisas experimentais, o uso desses acupontos não é muito recorrente e o uso do acuponto VG3 é ínfimo. Yoon e colaboradores demonstraram que a estimulação do acuponto VG3 foi capaz de reduzir a dor neuropática induzida pela oxaliplatina, uma droga usada no tratamento de quimioterapia à base de platina (YOON *et al.*, 2015).

Com relação à escolha de acupontos do meridiano vaso-governador para investigações terapêuticas no modelo de lesão medular, deve-se levar em consideração que a maioria dos acupontos desse meridiano está localizada na linha média, ao longo da coluna vertebral, sendo assim, talvez seja interessante considerar o uso de acupontos que se localizem em regiões mais afastadas do sítio da SCI.

O acuponto E36 é indicado pela MTC para o tratamento de vários tipos de doenças, inclusive doenças neurológicas, pois sua estimulação causa dispersão da estagnação de *Qi* (energia vital) e a dispersão da estagnação do *Xue* (sangue). Em pesquisas experimentais, o acuponto E36 é o mais usado e existem vários resultados que demonstraram que a sua estimulação foi capaz de induzir a redução de fatores que estimulam o processo inflamatório, a redução de espécies reativas de oxigênios e o aumento de fatores neurotróficos não só no modelo de lesão medular, mas também em diversos modelos de doenças neurodegenerativas (YANG *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; LEUNG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento com a apipuntura induziu melhora significativa do desempenho locomotor avaliado pelo teste BBB já na primeira semana, que se manteve até o término dos experimentos. Na quinta semana, a apipuntura também induziu a melhora da coordenação locomotora. Juntos, o teste BBB e o teste da passarela indicaram uma melhora geral da capacidade locomotora. Na segunda semana, os resultados indicaram que o uso da apipuntura promoveu uma significativa redução da área de lesão no tecido medular.

Levando em consideração apenas a melhora da capacidade locomotora em virtude do tempo, os presentes resultados demonstraram maior eficiência em relação aos resultados divulgados por Choi e colaboradores com o uso de acupuntura manual. Segundo os resultados do grupo de Choi, o uso da acupuntura manual diariamente, durante duas semanas, apenas induziu a melhora locomotora no 21º dias após a lesão medular (CHOI *et al.*, 2010). A comparação entre a acupuntura manual e a apipuntura realizada neste estudo não demonstrou diferença significativa no desempenho locomotor em nenhum dos tempos analisados. Essa discrepância entre os resultados pode ser explicada pela combinação de pontos, uma vez que o grupo de Choi utilizou a associação VG26 + GB34 (CHOI *et al.*, 2010). O critério para a escolha da combinação VG26 + GB34 foi a contagem de neurônios remanescentes quatro dias após a lesão e tratamento com a apipuntura manual. Esse critério de seleção pode não ser seguro, pois neurônios motores remanescentes podem não estar funcionais.

Não existe na literatura nenhum trabalho conclusivo sobre qual seja a melhor modalidade de estimulação dos acupontos. O que tem sido discutido nos trabalhos de revisões de acupuntura é que a associação das várias formas de estimulação possa promover um resultado terapêutico final mais eficiente do que o uso das modalidades de forma isolada (ZHAO, 2008). Nesse sentido, apesar de não ter sido realizada a associação de modalidades diferentes de acupuntura, sugere-se que a associação de diferentes estímulos possa ativar uma diversidade maior de terminações sensoriais intensificando a propagação de informações sensoriais, gerando, assim, respostas fisiológicas mais eficientes.

Recentemente, Zhao e colaboradores sugeriram que a eletroacupuntura foi capaz de melhorar o escore do teste BBB no modelo de lesão medular por transecção do segmento espinal na vértebra T10, entretanto, o protocolo experimental de eletroacupuntura realizado pelo grupo não deixa claro se a melhora locomotora foi promovida pela eletroestimulação dos acupontos VG9 e VG6 que estão localizados, respectivamente, na linha média da 11ª e 7ª

vértebras, ou se a melhora foi por eletroestimulação transcutânea (TENS) próxima ao local do trauma medular (ZHAO *et al.*, 2017). Já existem dados experimentais e clínicos sobre os benefícios promovidos pelo TENS tanto em lesões medulares como em doenças neurodegenerativas que comprometem o desenvolvimento locomotor (SJÖLUND, 2002; ZHAO, 2008; DINGU *et al.*, 2016).

A principal hipótese sobre o resultado da apipuntura é que o veneno de abelha, nos acupontos, intensifica seus próprios efeitos (SON *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2015; HWANG *et al.*, 2015).

Com base nesse princípio, a outra proposta apresentada por nosso grupo foi comparar o efeito da aplicação do VB no acuponto em relação à aplicação em regiões não ponto, pois já foi demonstrado em trabalhos experimentais que o VB apresenta propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antitumorais (SON *et al.*, 2007). Além disso, vale ressaltar que até o momento da realização deste estudo, a menor dose descrita na literatura que foi capaz de estimular o acuponto foi de 0,08mg/Kg diluído em 20µL de salina/acuponto (KIM *et al.*, 2005). O cuidado com relação à escolha da dose foi no intuito de garantir que o VB apenas ocasionasse uma estimulação no local do acuponto.

Nossos resultados indicaram que a melhora da capacidade locomotora está associada à aplicação do veneno de abelha no acuponto E36+VG3, pois o grupo que recebeu o veneno de abelha em região não apresentou uma melhora tão significativa. O fato dos resultados aqui demonstrados indicarem que a melhora do desempenho locomotor foi especificamente associado à estimulação dos acupontos também contribui para reforçar o princípio da acupuntura, que se baseia numa técnica milenar, na qual o efeito final é totalmente dependente da especificidade dos acupontos que estão distribuídos ao longo do corpo (YIN *et al.*, 2008; ZHAO, 2008).

Trabalhos experimentais no campo da acupuntura revelaram que regiões mapeadas pela MTC como acupontos, são regiões que apresentam altas concentrações de terminações nervosas de fibras A α , β , δ e C, assim, quando esses acupontos são estimulados, informações sensoriais são propagadas, promovendo importantes alterações fisiológicas (ZHAO, 2008; KAGITANI *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2014).

Kang e colaboradores demonstraram que a apipuntura no acuponto bilateral E36 com a dose de 0,25mg/Kg do veneno de abelha diluído em 20µL salina promoveu melhora do desempenho locomotor no modelo de lesão medular, mas como no grupo controle foi realizada a injeção do veículo salina e não a administração subcutânea do VB, não é possível afirmar que o efeito final foi pela estimulação do acuponto ou pelo efeito do veneno em si (KANG *et al.*, 2015).

Em virtude dos resultados apresentados até aqui, uma investigação mais aprofundada foi iniciada no intuito de uma melhor compreensão dos mecanismos que poderiam ser proferidos pela apipuntura que poderiam estar associados à redução da área da lesão e com melhora observada nos testes comportamentais.

6.3– Fatores inflamatórios influenciados pela apipuntura após a lesão medular

Após o impacto mecânico sobre o tecido medular, ocorre a morte e danos de celulares com à liberação de DAMPs que estimulam uma complexa cascata multifatorial de danos secundários como a liberação e a ativação de fatores inflamatórios, a produção de radicais livres, a excitotoxicidade (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015; VISAVADIYA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; AHUJA *et al.*, 2017; MAGGIO *et al.*, 2017). Dentre os danos secundários, a resposta neuroinflamatória tem se tornado o principal foco das pesquisas sobre o tema, pois essa resposta pode perdurar por anos após a SCI (TANG *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2016; AHUJA *et al.*, 2017).

Nas primeiras horas os danos ao tecido medular podem gerar disfunções mitocondriais que contribuem para uma alta produção de ROS (VISAVADIYA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; MAGGIO *et al.*, 2017). Por sua vez, essas alterações bioquímicas com altas concentrações de ROS geram desequilíbrio redox (VISAVADIYA *et al.*, 2016). Em condições fisiológicas normais, o NF-kB encontra-se inibido no citosol pelo I κ B, no qual, a subunidade p65 e a p50 ocultam os sinais de localização nuclear, entretanto, em condições com altas concentrações de ROS como após a SCI, o NF-kB por ser um fator redox sensível acaba sendo superexpresso por vários tipos celulares (LA ROSA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2016). Essa pode ter sido a razão da apipuntura não ter influencia sobre a expressão de RNAm nas primeiras 24 horas. Visavadiya e colaboradores demonstraram que o pico da produção de ROS após a SCI ocorre principalmente nas primeiras 24 horas, principalmente, devido a danos aos neurônios que são ricos em mitocôndrias, as maiores fontes de ROS (VISAVADIYA *et al.*, 2016).

Em resultados anteriores, foram demonstrados que a apipuntura nos acupontos E36+VG3 foi capaz de influenciar o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, no qual induziu um aumento da citocina antiinflamatória, IL-10, enquanto, induziu uma redução da citocina próinflamatória IL-6 (SOUZA *et al.*, 2017).

Nossos resultados atuais indicaram no 3º dia após a SCI, o tratamento terapêutico com apipuntura foi capaz de reduzir de forma significativa a expressão do NF-kB em relação ao grupo controle da apipuntura. Contudo, não podemos afirmar se a redução da expressão do NF-kB ocorreu especificamente por redução da produção de ROS, pois outros fatores também podem estimular a ativação do NF-kB (GENSEL e ZHANG, 2015).

Apesar dos nossos resultados não apresentarem diferença significativa do grupo apipuntura em relação ao grupo controle da SCI, ainda assim os resultados sugerem que talvez a apipuntura seja capaz de modular esse fator transcricional. O NF-kB é considerado como o maior inicializador da resposta inflamatória, pois pode estimular a transcrição de diversos tipos genes próinflamatórios como a IL-1 β , TNF- α , IL-6, assim como a estimular a síntese e ativação das enzimas iNOS e COX-2 (ORTIZ *et al.*, 2013; MALDONADO BOUCHARD e HOOK, 2014; ZHAN *et al.*, 2016). Assim, terapias que sejam capazes de inibir a ativação desse fator transcricional representam uma importante ferramenta terapêutica.

Segundo revisões de literatura, existem evidências de que a estimulação de determinados acupontos possam promover o aumento do tônus vagal com aumento da liberação de acetilcolina que ao se ligar em receptores colinérgicos $\alpha 7$ nicotínicos ($\alpha 7$ nAChR) presente nos macrófagos, ocorra a inibição desse fator transcricional e paralelamente a redução da síntese de citocinas pró inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α , IL-6 (KAVOUSSI e ROSS, 2007; ZHAO, 2008). Existem alguns trabalhos experimentais que também evidenciaram que modalidades de acupuntura reduziram a expressão de NF-kB através da inibição da translocação das subunidades p65 e p75 (RENFU *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

Os resultados também indicaram que a apipuntura foi capaz de reduzir a expressão de RNAm da COX-2 no 1º e no 5º dia após a SCI. Em alguns tecidos a COX-2 é constitutiva, mas na maioria das vezes a COX-2 é induzida durante o processo inflamatório, inclusive em condições neuroinflamatórias como na lesão medular e na esclerose múltipla (HOFFMANN, 2000; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001; MICHAEL-TITUS, 2007; ORTIZ *et al.*, 2013).

O maior produto gerado pela COX-2 durante a resposta inflamatória é a prostaglandina PGE₂ que ao atuarem em subtipos de receptores de prostaglandina E, presente em células endoteliais estimulem a ativação do NF-kB que por sua vez estimula a transcrição nuclear de quimiocinas como MIP-1 que vai atrair macrófagos hematógenos para o sítio da lesão. Alguns autores sugerem que todo esse processo de retroalimentação positiva via a indução da COX-2-PGE₂-EP2-NF-kB possa contribuir para a cronificação da resposta inflamatória em

algumas situações (VANEGAS e SCHAIBLE, 2001; AOKI e NARUMIYA, 2012; WANG *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que uma das consequências principais após a SCI é o desenvolvimento de uma resposta inflamatória crônica, no qual, revisões sobre tem sugerido que a cronificação da resposta inflamatória está associada à permanência dos macrófagos hematógenos no sítio da lesão por longos períodos (SCHWAB *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015). Apesar de não ter sido comprovada que haja o envolvimento da COX-2 na cronificação da resposta inflamatória após a SCI, acreditamos que terapias que sejam capazes de reduzir a expressão da COX-2 possam contribuir para a redução da resposta inflamatória aguda e consequentemente para a redução da morte de neurônios e oligodendrócitos.

Corroborando com os nossos resultados, Choi e colaboradores demonstraram que a acupuntura manual foi capaz de reduzir a expressão da COX-2 24 horas após a SCI (CHOI *et al.*, 2010). Ji e colaboradores também demonstram que a EA foi capaz de a expressão de COX-2 no modelo de dor neuropática (JI *et al.*, 2016).

6.4– Tipos celulares influenciados pela apipuntura após a lesão medular

Visto que a apipuntura foi capaz de reduzir a expressão de RNAm de fatores inflamatórios como a COX-2 e o NF-kB, que é considerado como o principal fator inicializador da resposta inflamatória após o trauma, foi realizada uma investigação com a proposta de avaliar se a apipuntura seria capaz de modular micróglia/macrófagos e astrócitos, células capazes de secretar esses fatores e intrinsecamente envolvidas com o desencadeamento e a estimulação da resposta inflamatória.

Os resultados do presente estudo sugeriram que o uso da apipuntura foi capaz de reduzir significativamente a ativação de micróglia/macrófagos, enquanto pareceu exercer apenas uma modulação temporária sobre os astrócitos após a SCI.

Os resultados do Western Blot da mensuração do conteúdo da proteína IBA-1 (marcador específico de micróglia/macrófagos) demonstraram que a apipuntura nas primeiras 24 horas após a SCI reduziram significativamente o conteúdo da proteína IBA-1, o que sugere que o tratamento possa ter reduzido de forma aguda a ativação dessas células, o que se manteve até o último dia de avaliação.

A micróglia é a primeira célula a responder após a SCI, produzindo fatores proinflamatórios, quimiocinas e ROS que estimulam primeiramente os astrócitos, por já estarem mais próximos ao sítio da lesão e pela ruptura da barreira hematoespinal, que acaba estimulando também a migração de células imunes periféricas, atraídas pelos fatores liberados pela micróglia (HU *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016; NORDEN *et al.*, 2016).

As primeiras células imunes a chegar ao sítio da lesão são os neutrófilos, que permanecem por aproximadamente três dias apenas. Já os macrófagos hematógenos, começam a migrar por volta do terceiro ao quinto dias e permanecem por meses a anos no sítio da lesão (SHECHTER e SCHWARTZ, 2013; SCHWAB *et al.*, 2014; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015). Acredita-se que a presença prolongada de macrófagos no local da lesão seja a principal causa para a resposta inflamatória se tornar crônica (SCHWAB *et al.*, 2014; CASANO e PERI, 2015; CHEN *et al.*, 2015; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015).

Corroborando com esses resultados, diversas modalidades de acupuntura demonstraram ser capazes de reduzir a ativação de micróglia/macrófagos nos modelos de DP e ELA (CHOI *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011). Recentemente, Zhao e colaboradores demonstraram que a EA foi capaz de reduzir a ativação microglial no modelo de lesão medular (ZHAO *et al.*, 2017).

Trabalhos da literatura científica têm demonstrado que os astrócitos não são capazes de gerar uma resposta inflamatória direta por não apresentarem receptores de reconhecimento

padrão do sistema imune inato. Os astrócitos são capazes de responder, se tornar reativos em resposta a ROS, altas concentrações de ATP e a fatores inflamatórios e, ainda, secretar mais fatores pró-inflamatórios, glutamato, ATP, ROS, contribuindo assim para a retroalimentação positiva da resposta inflamatória (HU *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016; NORDEN *et al.*, 2016).

Durante a astrogliose, os astrócitos expressam altos níveis de filamentos intermediários do citoesqueleto como o GFAP, vimetina e nestina (RANSOM *et al.*, 2003). Neste estudo, para avaliar se a apipuntura seria capaz de modular a astrogliose, o anticorpo GFAP foi usado como marcador, pois essa proteína, uma vez que é expressa apenas por astrócitos reativos, acaba se tornando um indicativo de astrócitos reativos mediante um desafio (SILVER e MILLER, 2004; PINEAU *et al.*, 2010).

Com base nos resultados encontrados, não foi possível determinar o momento em que ocorreu a astrogliose e nem se essa ativação foi secundária à ativação microglial, mas os resultados indicaram que nas primeiras 24 horas houve um aumento discreto do conteúdo de proteínas do GFAP comparado ao conteúdo de IBA-1 pelos grupos submetidos à SCI, tornando-se maior nos dias subsequentes.

A questão temporal da astrogliose é importante após a SCI, principalmente, por dois motivos: o primeiro é que os astrócitos também são capazes de expressar NF- κ B, produzir fatores pró-inflamatórios, ROS, contribuindo para a retroalimentação da resposta inflamatória; o segundo é que após o trauma ocorrem mudanças na organização e na arquitetura estrutural da medula espinhal, nas quais os astrócitos participam ativamente (KWON *et al.*, 2004; SOFRONIEW, 2009; PEKONY *et al.*, 2014; LUKOVIC *et al.*, 2015).

Os resultados do Western Blot indicaram que a apipuntura foi capaz de reduzir o conteúdo de GFAP apenas no terceiro dia. A partir desses resultados não foi possível concluir se a modulação sobre a astrogliose foi diretamente influenciada pela apipuntura ou por redução de fatores inflamatórios que estimulam a reatividade dos astrócitos (SOFRONIEW, 2009).

Tang e colaboradores também demonstraram resultados parecidos com EA no modelo de TBI. Os autores demonstraram que a EA foi capaz de reduzir a reatividade dos astrócitos 72 horas após o TBI e através da realização de uma imunofluorescência com co-localização e puderam observar a redução da astrogliose e de TNF- α no sítio da lesão, o que sugere que a astrogliose pode ter sido reduzida em consequência da redução do fator pró-inflamatório, reduzindo, paralelamente, a produção de fatores inflamatórios (TANG *et al.*, 2016).

O envolvimento dos astrócitos na alteração organizacional da medula espinhal após a SCI está voltado para a formação da cicatriz glial que altera todo o tráfego de informações da região que sofreu o dano e que inclusive pode ter dimensões maiores no sítio da lesão inicial (SOFRONIEW, 2009; AHUJA *et al.*, 2017).

A cicatriz glial apresenta um papel protetor para isolar a área lesada, mas por ser constituída de moléculas inibitórias como CSPG, metaloproteases e moléculas repulsivas ao crescimento de axônios formam uma barreira física e química que impossibilita a neurogênese, a gliogênese e inutiliza áreas remanescentes perilesão que acarretam maiores perdas neurológicas (KWON *et al.*, 2004; CREGG *et al.*, 2014). Ela começa a ser produzida na fase aguda do trauma, os astrócitos são estimulados por sinais periféricos de células imunes como a IL-1 β , o TGF- β IL-6 que os induzem a expressar a molécula EphB2, uma molécula fundamental para a interação com fibroblastos meningeais e a formação da cicatriz glial (RANSOM *et al.*, 2003; CREGG *et al.*, 2014).

Com bases nos resultados obtidos, não se pode afirmar que essa modulação inicial foi capaz de reduzir a formação da cicatriz glial, pois, apesar da formação da cicatriz glial ser iniciada nas primeiras horas após o trauma, sua completa consolidação ocorre mais tardiamente. A grande questão é que, uma vez que a cicatriz esteja estabelecida, ela se torna irreversível, assim, terapias que modulem a astrogliose na fase aguda podem ser úteis para

minimizar a inativação de áreas do tecido medular que levam a maiores danos neurológicos, dessa forma, realizar um prognóstico clínico após a SCI é bastante difícil (SILVER e MILLER, 2004; AHUJA *et al.*, 2017).

Existem embasamentos na literatura científica de que a acupuntura foi capaz de reduzir a astrogliose e a cicatriz glial. Han e colaboradores demonstraram que a EA foi capaz de reduzir a astrogliose no 7º, 14º e 28º dias e adicionalmente reduziu alterações morfológicas e histológicas provenientes da formação da cicatriz glial. Paralelamente, os animais apresentaram menor perda de coordenação motora e menor perda sensorial no modelo de isquemia cerebral (HAN *et al.*, 2010).

Choi e colaboradores demonstraram que a acupuntura manual foi capaz de reduzir a expressão da enzima MMP-9, que é uma enzima da matriz extracelular, sintetizada principalmente por astrócitos após a SCI e que contribui para a formação da cicatriz glial, além de ser um de seus componentes (CHOI *et al.*, 2010).

Com base na discussão dos resultados acima, em que os resultados indicaram que a apipuntura exerceu uma maior modulação sobre a micróglia/macrófagos, foi realizada uma investigação sobre se a apipuntura seria capaz de influenciar a polarização dessas células.

6.5 – A apipuntura influencia a polarização fenotípica de micróglia/macrófagos

Para investigar a influência da apipuntura sobre a polarização fenotípica de micróglia/macrófagos, realizou-se a quantificação através da qPCR sobre a expressão de RNAm da iNOS (marcador do fenótipo M1) e da Arg1 e TGF- β (marcadores dos fenótipo M2).

A maioria das revisões e dos trabalhos experimentais sobre a resposta neuroinflamatória sugere que o bloqueio total da resposta inflamatória acaba gerando mais prejuízos neurológicos do que quando esse bloqueio não ocorre (KWON *et al.*, 2004; MOSSER e EDWARDS, 2008; SAGANOVÁ *et al.*, 2008; DAVID e KRONER, 2011; DAVID *et al.*, 2012; DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015).

A principal hipótese para essa piora está intrinsicamente associada à complexidade das polarizações fenotípicas que os macrófagos podem adquirir, que, ora podem expressar estados mais citotóxicos, ora estados mais neuroprotetores (DAVID *et al.*, 2015; GENSEL e ZHANG, 2015). Em SCIs, assim como em outras doenças neuroinflamatórias ocorre uma desregulação entre esses estados de polarizações, provocando maior morte de neurônios, oligodendrócitos e, conseqüentemente, maior seqüela neurológica (GENSEL e ZHANG, 2015).

Os marcadores mais utilizados nas pesquisas atuais para indicar os fenótipos de ativação *in vivo* são: o marcador IBA-1 para micróglia/macrófagos ativos, associado com a iNOS e a Arg-1 (KIGERL *et al.*, 2009; DAVID e KRONER, 2011; CHERRY *et al.*, 2014; GREENHALGH *et al.*, 2016). Uma das dificuldades encontradas pelos pesquisadores é a distinção entre macrófagos hematógenos e micróglia residente ativa que requer um conjunto de vários marcadores e técnicas mais sensíveis como a citometria de fluxo (ANSARI, 2015; DISABATO *et al.*, 2016).

Zhao e colaboradores investigaram se a eletroacupuntura seria capaz de influenciar a proporção de micróglia/macrófagos M1 e M2, no modelo de lesão medular, através da marcação de CD86 e CD206, marcadores para os fenótipos M1 e M2, respectivamente (ZHAO *et al.*, 2017). Um ato falho, nesse artigo, é que os autores utilizaram como marcador principal, de micróglia/macrófagos ativos, o CD68, que já foi demonstrado ser expresso por monócitos, neutrófilos, basófilos e amplamente por linfócitos (STANKOV *et al.*, 2015). Um marcador muito usado por ser estritamente expresso por micróglia/macrófagos ativos é a molécula IBA-1 (molécula adaptadora para ligação de cálcio ionizado tipo 1) (DAVID e KRONER, 2011;

STANKOV *et al.*, 2015). Com a utilização do CD68 não se pode afirmar se ocorreu apenas a marcação de micróglia/macrófagos ativos.

Os marcadores usados neste trabalho representam um conjunto relativamente simples, porém fidedignos, da ativação e do estado de polarização de micróglia/macrófagos. O IBA-1 foi usado para avaliar a ativação, enquanto para a distinção dos fenótipos foram utilizados a enzima iNOS e Arg-1, além do TGF- β . Existem trabalhos na literatura que demonstram certa confiabilidade para uso desses marcadores (CHERRY *et al.*, 2014). Bonaparte e colaboradores demonstraram que existe uma relação inversa entre essas duas enzimas pelo fato de utilizarem um substrato em comum para a síntese de seus produtos finais (BONAPARTE *et al.*, 2006).

Observou-se que o tratamento com a apipuntura só foi capaz de apresentar influência significativa sobre a expressão de RNAm da Arg1 e do TGF- β no quinto dia pós-lesão, enquanto a influência sobre a iNOS ocorreu a partir do terceiro e se estendeu até o quinto dia pós-lesão. Acredita-se que a influência da apipuntura sobre a expressão destes marcadores se estenderia por mais tempo, mas a investigação foi encerrada para a realização da qPCR, no quinto dia. Portanto, na análise do tratamento da apipuntura sobre a modulação do fenótipo M1 e M2, levou-se em consideração a influência da apipuntura até o quinto dia.

Os resultados sugerem que a apipuntura foi capaz de influenciar a ativação microglial, já que houve redução da expressão de IBA-1, como foi visto em outros modelos inflamatórios (HUANG *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2017). Quanto à polarização dos fenótipos, M1 e M2, a apipuntura também demonstrou ter influência. Os resultados indicaram forte modulação sobre a expressão da iNOS, marcador do fenótipo M1, enquanto, paralelamente, diminuí a expressão de Arg1 e TGF- β , marcadores do fenótipo M2. Vale ressaltar, que no terceiro dia, já ocorreu uma redução significativa do marcador do fenótipo M1, diferentemente dos marcadores do fenótipo M2. Logo, a apipuntura parece modular a ativação microglial tanto do fenótipo M1 quanto do M2, mas parece que essa modulação é mais intensa inicialmente sobre o fenótipo M1.

O grupo esperava que o tratamento com a apipuntura influenciasse o balanço M1/M2, favorecendo o aumento de M2 em relação a M1, mas isso não foi observado nos resultados. A apipuntura parece gerar uma modulação inicial sobre M1, mas que, com o tempo, também modula o fenótipo M2.

Algumas revisões sobre o tema mostram-se tendenciosas ao enfatizar que o fenótipo M1 estará sempre associado a efeitos deletérios, enquanto a ativação em M2 sempre proverá efeitos benéficos. Já foram demonstrados resultados que reforçam que isso não é uma verdade absoluta e o efeito final vai depender de todo o contexto que induziu à polarização dessas células.

Como exemplos, existem resultados que demonstram que a formação de gliomas e outros tipos de tumores, o aumento da obstrução congestiva por pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, o aumento de fatores que estimulam a fibrose nas doenças cardiovasculares, a obesidade, a asma, entre outros, estão intrinsecamente associados com a sobreposição do perfil M2 sobre M1 (MOSSER e EDWARDS, 2008 ; SICA *et al.*, 2008; SICA e MANTOVANI, 2012; FERNANDEZ-VELASCO *et al.*, 2014 ; KAKU *et al.*, 2014; DRAIJER *et al.*, 2016; MIGNOGNA *et al.*, 2016).

O que revisões, trabalhos e trabalhos experimentais defendem, na verdade, é que o ideal seria que as terapias fossem capazes de uma modulação adequada dos fenótipos M1 e M2 (ANSARI, 2015).

Existem trabalhos que relataram os efeitos deletérios do fenótipo M2 promovidos tanto por aumento da expressão da Arg1 como por aumento da citocina, TGF- β . Soulet e Rivest demonstraram que produtos da via da Arg1, quando em excesso, desencadeiam resposta inflamatória com a migração de macrófagos para o SNC (SOULET e RIVEST, 2003). Wasser e colaboradores demonstraram que a expressão de Arg1 por macrófagos no estado

alternativo de ativação (M2) parece estar envolvida na propagação da primeira fase da neuroinflamação e pode estar diretamente associada com a progressão da encefalomielite autoimune experimental (WASSER *et al.*, 2016). Existem relatos que afirmam que o estado alternativo de ativação pode ser deletério em tipos de doenças tumorais, como gliomas, apresentando o TGF- β como um dos principais desencadeadores (SICA *et al.*, 2008; SAIJO e GLASS, 2011).

O TGF- β também foi usado como marcador do fenótipo M2, neste trabalho. Esta citocina também apresenta um pleiotropismo em seus mecanismos de ação (ZHENG *et al.*, 2016). O TGF- β tem sido considerado como uma das principais citocinas que promovem a progressão na doença de Alzheimer (LEE *et al.*, 2010). Ademais, também há relatos sobre essa citocina estimular o crescimento de vários tipos de tumores, inclusive, o glioma (SICA *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010; SHENG *et al.*, 2015).

6.6– A apipuntura influencia o aumento do fator antiapoptótico e a neuroproteção.

Após os resultados indicarem que a apipuntura foi capaz de influenciar a redução da área da lesão, a melhora da capacidade locomotora e a resposta inflamatória, investigou-se dois parâmetros do processo apoptótico, já que a exagerada resposta neuroinflamatória acaba induzindo a apoptose de neurônios e oligodendrócitos após a lesão medular.

Os resultados indicaram que a apipuntura não apresentou influência sobre a expressão de RNAm da caspase-3 nos tempos de 1, 3 e 5 dias. Apesar disso, os resultados do Western Blot indicaram que a apipuntura foi capaz de induzir uma menor redução do conteúdo proteico de NeuN, marcador nuclear de neurônio maduro, e também induziu a uma menor redução do conteúdo proteico de CNPase, marcador de enzima que só é expressa na bainha de mielina dos oligodendrócitos na primeira semana após a SCI. Portanto, em conjunto, esses dados indicaram que a apipuntura foi capaz de preservar neurônio e oligodendrócitos mesmo com a enzima efetora da morte celular se mantendo elevada.

Vale ressaltar que a expressão da caspase-3 foi investigada apenas até o quinto dia pós-lesão, enquanto o conteúdo de proteína do NeuN e da CNPase só foram analisadas até o sétimo dia. Provavelmente, a apipuntura não demonstrou influência sobre a expressão de RNAm da caspase-3, pela ocorrência não só da morte de neurônios e oligodendrócitos, mas também de outros tipos de células da glia e de células endoteliais que formam o tecido medular espinal.

Além disso, inúmeros fatores como ROS, TNF- α , excesso de Ca²⁺ e o glutamato podem estimular os receptores de morte celular, promovendo a clivagem sequencial da cascata das caspases até a clivagem caspase-3, efetora da morte celular. Após a SCI, também ocorre o desequilíbrio entre as proteínas pro e antiapoptóticas com a prevalência da proteína proapoptótica, BAX, que estimula o dano mitocondrial através de poros na sua membrana com a liberação do citocromo C (cyt-C) que estimula a clivagem da caspase-3. O processo de apoptose não é regulado apenas por fatores inflamatórios, mas também por fatores intrínsecos (ESPOSITO *et al.*, 2010; MAES *et al.*, 2017).

O BCL-2 é uma importante proteína antiapoptótica, contrarreguladora do BAX, que atua neutralizando-o e reduzindo, conseqüentemente, a estimulação de fatores apoptóticos intrínsecos que podem ser estimulados por ele (ESPOSITO *et al.*, 2010; MAES *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2017).

O resultado do conteúdo proteico do BCL-2 demonstrou que, apesar dos níveis terem se mantido constantes, no quinto dia a apipuntura induziu um aumento significativo do BCL-2. Assim, o aumento do BCL-2 juntamente com a modulação do processo inflamatório proferido pela apipuntura pode ter contribuído para a sobrevivência dos neurônios e dos oligodendrócitos e, conseqüentemente, para uma menor área de lesão no tecido medular o que refletiu numa melhor capacidade locomotora.

Além de todos os resultados apresentados no presente estudo, acreditamos que a acupuntura também possa prover os mecanismos que já foram demonstrados na literatura científica.

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 demonstram que a acupuntura no ponto E36 foi capaz de atenuar a neuroinflamação desencadeada por TNF- α e reduzir significativamente ativação microglial tanto na medula espinal como no tronco encefálico no modelo de esclerose amiotrófica lateral (YANG *et al.*, 2010).

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; OYINBO, 2011). 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). Chen e colaboradores demonstraram 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 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. Hwang e colaboradores 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 níveis plasmáticos 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 (FIGURA 33).

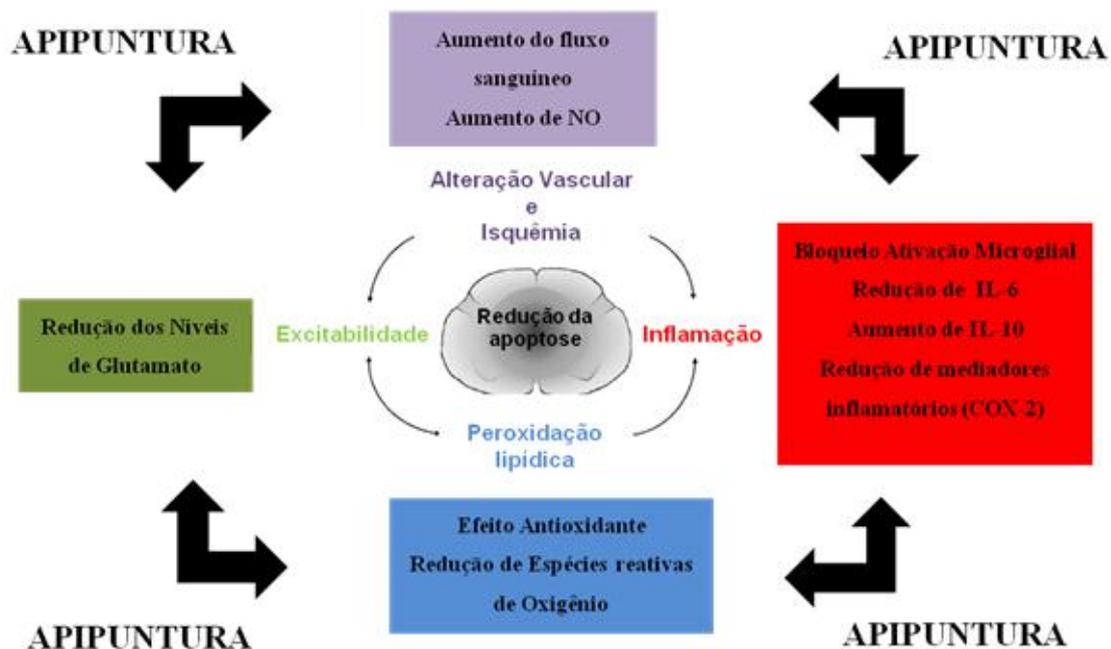


Figura 33: Desenho esquemático da hipótese dos possíveis mecanismos da apipuntura na lesão medular. Baseado em estudos prévios, acredita-se que a acupuntura possa ter efeito sobre os danos secundários após a SCI na diminuição dos níveis de glutamato contribuindo para a redução da excitotoxicidade (CHOI *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 microglia e outros mediadores inflamatórios (CHOI *et al.*, 2010). Além de todos esses efeito, nossos resultados indicaram que a apipuntura foi capaz de modular os fenotipos de polarização M1/M2. 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. CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo, conclui-se que o uso terapêutico da acupuntura nos acupontos E36+VG3:

- Promove melhora parcial da recuperação locomotora, redução de déficits do sistema motor, redução da perda de tecido medular e aumento da sobrevivência de neurônios e oligodendrócitos após a SCI por compressão;

- Reduz a ativação de astrócitos, micróglia/macrófagos e fatores inflamatórios deletérios após a SCI;

- Demonstra influência sobre a modulação da expressão de RNAm de marcadores da polarização dos fenótipos M1/M2 de micróglia/macrófagos, onde parece exercer maior modulação sobre os fenótipos M1;

- O tratamento com a acupuntura não demonstra influência sobre a expressão de RNAm do fator da cascata apoptótica, caspase-3, mas, em contrapartida, influencia o aumento da expressão da proteína antiapoptótica, BCL-2.

Por fim, acreditamos que esses resultados possam ajudar a expandir a corrente de conhecimento pouco compreendida sobre os mecanismos de ação envolvidos com os benefícios do uso terapêutico de modalidades da acupuntura em doenças no Sistema Nervoso Central.

8 REFERÊNCIA

1. Ahuja C S, Wilson J R, Nori S, Kotter M R N, Druschel C, Curt A, Fehlings M G (2017) Traumatic spinal cord injury. **Nature Reviews Disease Primers** 3:17018.
2. Alkabie S, Boileau A J (2016) The Role of Therapeutic Hypothermia After Traumatic Spinal Cord Injury--A Systematic Review. **World neurosurgery** 86:432-449.
3. Almeida R T, Galdino G, Perez A C, Silva G, Romero T R, Duarte I D (2017) St36 electroacupuncture activates nNOS, iNOS and ATP-sensitive potassium channels to promote orofacial antinociception in rats. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society** 68:27-33.
4. Ansari M A (2015) Temporal profile of M1 and M2 responses in the hippocampus following early 24h of neurotrauma. **Journal of the neurological sciences** 357:41-49.
5. Aoki T, Narumiya S (2012) Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends in pharmacological sciences** 33:304-311.
6. Barbieri S (2003) Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Research** 60:187-197.
7. Bareyre F M (2008) Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. **Journal of the neurological sciences** 265:63-72.
8. Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **Journal of neurotrauma** 12:1-21.
9. Becker D, McDonald J W, 3rd (2012) Approaches to repairing the damaged spinal cord: overview. **Handbook of clinical neurology** 109:445-461.
10. Bennett M L, Bennett F C, Liddel S A, Ajami B, Zamanian J L, Fernhoff N B, Mulinyawe S B, Bohlen C J, Adil A, Tucker A, Weissman I L, Chang E F, Li G, Grant G A, Hayden Gephart M G, Barres B A (2016) New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 113:E1738-E1746.
11. Bianchetti L, Barczyk M, Cardoso J, Schmidt M, Bellini A, Mattoli S (2012) Extracellular matrix remodelling properties of human fibrocytes. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** 16:483-495.
12. Bilimoria P M, Stevens B (2015) Microglia function during brain development: New insights from animal models. **Brain research** 1617:7-17.
13. Bonaparte K L, Hudson C A, Wu C, Massa P T (2006) Inverse regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase I by the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in CNS glia. **Glia** 53:827-835.
14. Bowers C A, Kundu B, Rosenbluth J, Hawryluk G W J (2016) Patients with Spinal Cord Injuries Favor Administration of Methylprednisolone. **PloS one** 11:e0145991.

15. Brommer B, Engel O, Kopp M A, Watzlawick R, Müller S, Prüss H, Chen Y, Devivo M J, Finkenstaedt F W, Dirnagl U, Liebscher T, Meisel A, Schwab J M (2016) Spinal cord injury-induced immune deficiency syndrome enhances infection susceptibility dependent on lesion level. **Brain : a journal of neurology** 139:692-707.
16. Bronte V, Zanovello P (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature reviews Immunology** 5:641-654.
17. Cai M, Choi S M, Yang E J (2015) The effects of bee venom acupuncture on the central nervous system and muscle in an animal hSOD1G93A mutant. **Toxins** 7:846-858.
18. Carson M J, Thrash J C, Walter B (2006) The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. **Clinical neuroscience research** 6:237-245.
19. Casano A M, Peri F (2015) Microglia: multitasking specialists of the brain. **Developmental cell** 32:469-477.
20. Chen J, Lariviere W R (2010) The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: a double-edged sword. **Progress in neurobiology** 92:151-183.
21. Chen S H, Oyarzabal E A, Hong J S (2016) Critical role of the Mac1/NOX2 pathway in mediating reactive microgliosis-generated chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Current opinion in pharmacology** 26:54-60.
22. Chen S H, Oyarzabal E A, Sung Y F, Chu C H, Wang Q, Chen S L, Lu R B, Hong J S (2015) Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. **Glia** 63:118-131.
23. Chen Y, Zhou J, Li J, Yang S B, Mo L Q, Hu J H, Yuan W L (2012) Electroacupuncture pretreatment prevents cognitive impairment induced by limb ischemia-reperfusion via inhibition of microglial activation and attenuation of oxidative stress in rats. **Brain research** 1432:36-45.
24. Chen Y J, Zhu H, Zhang N, Shen L, Wang R, Zhou J S, Hu J G, Lu H Z (2015) Temporal kinetics of macrophage polarization in the injured rat spinal cord. **Journal of neuroscience research** 93:1526-1533.
25. Cherry J D, Olschowka J A, O'banion M K (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **Journal of neuroinflammation** 11:98-98.
26. Chikuda H, Yasunaga H, Takeshita K, Horiguchi H, Kawaguchi H, Ohe K, Fushimi K, Tanaka S (2014) Mortality and morbidity after high-dose methylprednisolone treatment in patients with acute cervical spinal cord injury: a propensity-matched analysis using a nationwide administrative database. **Emergency medicine journal : EMJ** 31:201-206.
27. Choi B T, Kang J, Jo U B (2005) Effects of electroacupuncture with different frequencies on spinal ionotropic glutamate receptor expression in complete Freund's adjuvant-injected rat. **Acta histochemica** 107:67-76.

28. Choi D C, Lee J Y, Lim E J, Baik H H, Oh T H, Yune T Y (2012) Inhibition of ROS-induced p38MAPK and ERK activation in microglia by acupuncture relieves neuropathic pain after spinal cord injury in rats. **Experimental neurology** 236:268-282.
29. Choi D C, Lee J Y, Moon Y J, Kim S W, Oh T H, Yune T Y (2010) Acupuncture-mediated inhibition of inflammation facilitates significant functional recovery after spinal cord injury. **Neurobiology of disease** 39:272-282.
30. 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. **Journal of neurotrauma** 28:1951-1961.
31. Conti A, Miscusi M, Cardali S, Germanò A, Suzuki H, Cuzzocrea S, Tomasello F (2007) Nitric oxide in the injured spinal cord: Synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation. **Brain Research Reviews** 54:205-218.
32. Cregg J M, Depaul M A, Filous A R, Lang B T, Tran A, Silver J (2014) Functional regeneration beyond the glial scar. **Experimental neurology** 253:197-207.
33. Czeh M, Gressens P, Kaindl A M (2011) The yin and yang of microglia. **Developmental neuroscience** 33:199-209.
34. David S, Greenhalgh A D, Kroner A (2015) Macrophage and microglial plasticity in the injured spinal cord. **Neuroscience** 307:311-318.
35. David S, Kroner A (2011) Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. **Nature reviews Neuroscience** 12:388-399.
36. David S, Lopez-Vales R, Wee Yong V (2012) Harmful and beneficial effects of inflammation after spinal cord injury: potential therapeutic implications. **Handbook of clinical neurology** 109:485-502.
37. David S, Zarruk J G, Ghasemlou N (2012) Chapter Five - Inflammatory Pathways in Spinal Cord Injury. In: International review of neurobiology, vol. Volume 106 (Jeffrey LG and Ephraim FT, eds), pp 127-152: Academic Press.
38. David S, Zarruk J G, Ghasemlou N (2012) Inflammatory pathways in spinal cord injury. **International review of neurobiology** 106:127-152.
39. De Rivero Vaccari J P, Dietrich W D, Keane R W (2016) Therapeutics targeting the inflammasome after central nervous system injury. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine** 167:35-45.
40. Devivo M J (2012) Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. **Spinal cord** 50:365-372.
41. Dibaj P, Nadrigny F, Steffens H, Scheller A, Hirrlinger J, Schomburg E D, Neusch C, Kirchhoff F (2010) NO mediates microglial response to acute spinal cord injury under ATP control in vivo. **Glia** 58:1133-1144.

42. Dietrich W D, Atkins C M, Bramlett H M (2009) Protection in Animal Models of Brain and Spinal Cord Injury with Mild to Moderate Hypothermia. **Journal of Neurotrauma** 26:301-312.
43. Ding Y, Yan Q, Ruan J W, Zhang Y Q, Li W J, Zhang Y J, Li Y, Dong H, Zeng Y S (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 neuroscience** 10:35.
44. Dingu N, Deumens R, Taccola G (2016) Electrical Stimulation Able to Trigger Locomotor Spinal Circuits Also Induces Dorsal Horn Activity. **Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society** 19:38-46.
45. Disabato D J, Quan N, Godbout J P (2016) Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of neurochemistry** 139 Suppl 2:136-153.
46. Dorsher P T, Mcintosh P M (2011) Acupuncture's Effects in Treating the Sequelae of Acute and Chronic Spinal Cord Injuries: A Review of Allopathic and Traditional Chinese Medicine Literature. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM** 2011:428108.
47. Draijer C, Boorsma C E, Robbe P, Timens W, Hylkema M N, Ten Hacken N H, Van Den Berge M, Postma D S, Melgert B N (2016) Human asthma is characterized by more IRF5+ M1 and CD206+ M2 macrophages and less IL-10+ M2-like macrophages around airways compared with healthy airways. **The Journal of allergy and clinical immunology**.
48. Dulin J N, Moore M L, Grill R J (2013) The dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor licoferone attenuates p-glycoprotein-mediated drug resistance in the injured spinal cord. **Journal of neurotrauma** 30:211-226.
49. Elieh Ali Komi D, Shafaghat F, Zwiener R D (2017) Immunology of Bee Venom. **Clinical reviews in allergy & immunology**.
50. Esposito E, Cuzzocrea S (2011) Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. **Trends in pharmacological sciences** 32:107-115.
51. Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Impellizzeri D, Bramanti P, Cuzzocrea S (2010) Olprinone attenuates the acute inflammatory response and apoptosis after spinal cord trauma in mice. **PloS one** 5:e12170.
52. Eugenin J, Vecchiola A, Murgas P, Arroyo P, Cornejo F, Von Bernhardi R (2016) Expression Pattern of Scavenger Receptors and Amyloid-beta Phagocytosis of Astrocytes and Microglia in Culture are Modified by Acidosis: Implications for Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD** 53:857-873.
53. Fernandez-Velasco M, Gonzalez-Ramos S, Bosca L (2014) Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases. **The Biochemical journal** 458:187-193.
54. Fleming J C, Norenberg M D, Ramsay D A, Dekaban G A, Marcillo A E, Saenz A D, Pasquale-Styles M, Dietrich W D, Weaver L C (2006) The cellular inflammatory

- response in human spinal cords after injury. **Brain : a journal of neurology** 129:3249-3269.
55. Forgione N, Chamankhah M, Fehlings M G (2017) A Mouse Model of Bilateral Cervical Contusion-Compression Spinal Cord Injury. **Journal of neurotrauma** 34:1227-1239.
 56. Franke H, Illes P (2014) Nucleotide signaling in astrogliosis. **Neuroscience letters** 565:14-22.
 57. Freire-Regatillo A, Argente-Arizón P, Argente J, García-Segura L M, Chowen J A (2017) Non-Neuronal Cells in the Hypothalamic Adaptation to Metabolic Signals. **Frontiers in Endocrinology** 8:51.
 58. Furlan J C, Craven B C, Massicotte E M, Fehlings M G (2016) Early Versus Delayed Surgical Decompression of Spinal Cord after Traumatic Cervical Spinal Cord Injury: A Cost-Utility Analysis. **World neurosurgery** 88:166-174.
 59. Gao H M, Hong J S (2008) Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. **Trends in immunology** 29:357-365.
 60. Garner C C, Kindler S, Gundelfinger E D (2000) Molecular determinants of presynaptic active zones. **Current Opinion in Neurobiology** 10:321-327.
 61. Genovese T, Mazzon E, Esposito E, Muia 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 (Augusta, Ga)** 27:258-265.
 62. Gensel J C, Zhang B (2015) Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. **Brain research** 1619:1-11.
 63. Gianaris A, Liu N-K, Wang X-F, Oakes E, Brenia J, Gianaris T, Ruan Y, Deng L-X, Goetz M, Vega-Alvarez S, Lu Q-B, Shi R, Xu X-M (2016) Unilateral microinjection of acrolein into thoracic spinal cord produces acute and chronic injury and functional deficits. **Neuroscience** 326:84-94.
 64. Glennie R A, Batke J, Fallah N, Cheng C L, Rivers C S, Noonan V K, Dvorak M F, Fisher C G, Kwon B K, Street J (2017) Rural and Urban Living in Persons with Spinal Cord Injury and Comparing Environmental Barriers, Their Health and Quality of Life Outcomes. **Journal of neurotrauma**.
 65. Greenhalgh A D, Passos Dos Santos R, Zarruk J G, Salmon C K, Kroner A, David S (2016) Arginase-1 is expressed exclusively by infiltrating myeloid cells in CNS injury and disease. **Brain, behavior, and immunity** 56:61-67.
 66. Hackett A R, Lee D H, Dawood A, Rodriguez M, Funk L, Tsoulfas P, Lee J K (2016) STAT3 and SOCS3 regulate NG2 cell proliferation and differentiation after contusive spinal cord injury. **Neurobiology of disease** 89:10-22.
 67. Han X, Huang X, Wang Y, Chen H (2010) A study of astrocyte activation in the periinfarct region after cerebral ischemia with electroacupuncture. **Brain injury** 24:773-779.

68. Hausmann O N (2003) Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. **Spinal cord** 41:369-378.
69. Hayashi A M, Matera J M, Da Silva T S, Pinto A C, Cortopassi S R (2007) Electroacupuncture and Chinese herbs for treatment of cervical intervertebral disk disease in a dog. **Journal of veterinary science** 8:95-98.
70. Hoffmann C (2000) COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use. **Current medicinal chemistry** 7:1113-1120.
71. Hoogland I C, Houbolt C, Van Westerloo D J, Van Gool W A, Van De Beek D (2015) Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **Journal of neuroinflammation** 12:114.
72. Hu X, Leak R K, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J (2015) Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. **Nature reviews Neurology** 11:56-64.
73. Huang S, Tang C, Sun S, Cao W, Qi W, Xu J, Huang J, Lu W, Liu Q, Gong B, Zhang Y, Jiang J (2015) Protective Effect of Electroacupuncture on Neural Myelin Sheaths is Mediated via Promotion of Oligodendrocyte Proliferation and Inhibition of Oligodendrocyte Death After Compressed Spinal Cord Injury. **Molecular neurobiology** 52:1870-1881.
74. Hwang D S, Kim S K, Bae H (2015) Therapeutic Effects of Bee Venom on Immunological and Neurological Diseases. **Toxins** 7:2413-2421.
75. Hwang H S, Kim Y S, Ryu Y H, Lee J E, Lee Y S, Yang E J, Choi S M, Lee M S (2011) Electroacupuncture Delays Hypertension Development through Enhancing NO/NOS Activity in Spontaneously Hypertensive Rats. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM** 2011:130529.
76. Jazayeri S B, Beygi S, Shokraneh F, Hagen E M, Rahimi-Movaghar V (2015) Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. **European Spine Journal** 24:905-918.
77. Jessen K R (2004) Glial cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 36:1861-1867.
78. Ji L-L, Guo M-W, Ren X-J, Ge D-Y, Li G-M, Tu Y (2016) Effects of electroacupuncture intervention on expression of cyclooxygenase 2 and microglia in spinal cord in rat model of neuropathic pain. **Chinese Journal of Integrative Medicine** 1-7.
79. Jiang S H, Tu W Z, Zou E M, Hu J, Wang S, Li J R, Wang W S, He R, Cheng R D, Liao W J (2014) Neuroprotective effects of different modalities of acupuncture on traumatic spinal cord injury in rats. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM** 2014:431580.
80. Kagitani F, Uchida S, Hotta H (2010) Afferent nerve fibers and acupuncture. **Autonomic neuroscience : basic & clinical** 157:2-8.

81. Kaku Y, Imaoka H, Morimatsu Y, Komohara Y, Ohnishi K, Oda H, Takenaka S, Matsuoka M, Kawayama T, Takeya M, Hoshino T (2014) Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on Alveolar Macrophages in the Lungs of Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **PLOS ONE** 9:e87400.
82. Kang J M, Park H J, Choi Y G, Choe I H, Park J H, Kim Y S, Lim S (2007) Acupuncture inhibits microglial activation and inflammatory events in the MPTP-induced mouse model. **Brain research** 1131:211-219.
83. Kang S Y, Roh D H, Choi J W, Ryu Y, Lee J H (2015) Repetitive Treatment with Diluted Bee Venom Attenuates the Induction of Below-Level Neuropathic Pain Behaviors in a Rat Spinal Cord Injury Model. **Toxins** 7:2571-2585.
84. Kavoussi B, Ross B E (2007) The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. **Integrative cancer therapies** 6:251-257.
85. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru P A, Selvakumar G P, Saeed D, Zahoor H, Zaheer S, Iyer S S, Zaheer A (2016) Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **Journal of neurology, neurosurgery and spine** 1:1003.
86. Kennedy P G (2015) Viruses, apoptosis, and neuroinflammation--a double-edged sword. **Journal of neurovirology** 21:1-7.
87. Khalil W K, Assaf N, Elshebiney S A, Salem N A (2015) Neuroprotective effects of bee venom acupuncture therapy against rotenone-induced oxidative stress and apoptosis. **Neurochemistry international** 80:79-86.
88. Kiehn O (2016) Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. **Nature reviews Neuroscience** 17:224-238.
89. Kigerl K A, Gensel J C, Ankeny D P, Alexander J K, Donnelly D J, Popovich P G (2009) Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience** 29:13435-13444.
90. Kim H W, Kwon Y B, Han H J, Yang I S, Beitz A J, Lee J H (2005) Antinociceptive mechanisms associated with diluted bee venom acupuncture (apipuncture) in the rat formalin test: involvement of descending adrenergic and serotonergic pathways. **Pharmacological research** 51:183-188.
91. Kim J I, Yang E J, Lee M S, Kim Y S, Huh Y, Cho I H, Kang S, Koh H K (2011) Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. **The International journal of neuroscience** 121:209-217.
92. Kjell J, Olson L (2016) Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. **Disease models & mechanisms** 9:1125-1137.
93. Koopmans G C, Deumens R, Honig W M, Hamers F P, Steinbusch H W, Joosten E A (2005) The assessment of locomotor function in spinal cord injured rats: the importance of objective analysis of coordination. **Journal of neurotrauma** 22:214-225.

94. Kumar A, Alvarez-Croda D M, Stoica B A, Faden A I, Loane D J (2016) Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury. **Journal of neurotrauma** 33:1732-1750.
95. Kumar A, Stoica B A, Sabirzhanov B, Burns M P, Faden A I, Loane D J (2013) Traumatic brain injury in aged animals increases lesion size and chronically alters microglial/macrophage classical and alternative activation states. **Neurobiology of aging** 34:1397-1411.
96. Kwon B K, Tetzlaff W, Grauer J N, Beiner J, Vaccaro A R (2004) Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. **The spine journal : official journal of the North American Spine Society** 4:451-464.
97. La Rosa G, Cardali S, Genovese T, Conti A, Di Paola R, La Torre D, Cacciola F, Cuzzocrea S (2004) Inhibition of the nuclear factor— κ B activation with pyrrolidine dithiocarbamate attenuating inflammation and oxidative stress after experimental spinal cord trauma in rats. **Journal of Neurosurgery: Spine** 1:311-321.
98. Lee B B, Cripps R A, Fitzharris M, Wing P C (2014) The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. **Spinal cord** 52:110-116.
99. Lee M H, Lin S R, Chang J Y, Schultz L, Heath J, Hsu L J, Kuo Y M, Hong Q, Chiang M F, Gong C X, Sze C I, Chang N S (2010) TGF-beta induces TIAF1 self-aggregation via type II receptor-independent signaling that leads to generation of amyloid beta plaques in Alzheimer's disease. **Cell death & disease** 1:e110.
100. Lee M J, Jang M, Choi J, Lee G, Min H J, Chung W-S, Kim J-I, Jee Y, Chae Y, Kim S-H, Lee S J, Cho I-H (2016) Bee Venom Acupuncture Alleviates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Upregulating Regulatory T Cells and Suppressing Th1 and Th17 Responses. **Molecular Neurobiology** 53:1419-1445.
101. Leung S B, Zhang H, Lau C W, Lin Z-X (2016) Attenuation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats by acupuncture was associated with reduction oxidative stress and improvement from endothelial dysfunction. **Chinese Medicine** 11:38.
102. Li L (2002) Oxidative Stress and Cyclooxygenase-2 Induction Mediate Cyanide-Induced Apoptosis of Cortical Cells. **Toxicology and Applied Pharmacology** 185:55-63.
103. Li W C, Jiang R, Jiang D M, Zhu F C, Su B, Qiao B, Qi X T (2014) Lipopolysaccharide preconditioning attenuates apoptotic processes and improves neuropathologic changes after spinal cord injury in rats. **The International journal of neuroscience** 124:585-592.
104. Li W J, Pan S Q, Zeng Y S, Su B G, Li S M, Ding Y, Li Y, Ruan J W (2010) Identification of acupuncture-specific proteins in the process of electro-acupuncture after spinal cord injury. **Neuroscience research** 67:307-316.
105. Lioi A B, Ferrari B M, Dubyak G R, Weinberg A, Sieg S F (2015) Human beta Defensin-3 Increases CD86 Expression on Monocytes by Activating the ATP-Gated Channel P2X7. **Journal of immunology** 195:4438-4445.

106. Lipinski M M, Wu J, Faden A I, Sarkar C (2015) Function and Mechanisms of Autophagy in Brain and Spinal Cord Trauma. **Antioxidants & redox signaling** 23:565-577.
107. Little J P, Simtchouk S, Schindler S M, Villanueva E B, Gill N E, Walker D G, Wolthers K R, Klegeris A (2014) Mitochondrial transcription factor A (Tfam) is a pro-inflammatory extracellular signaling molecule recognized by brain microglia. **Molecular and cellular neurosciences** 60:88-96.
108. 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. **Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology** 40:331-337.
109. Loane D J, Byrnes K R (2010) Role of microglia in neurotrauma. **Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics** 7:366-377.
110. Loane D J, Kumar A (2016) Microglia in the TBI Brain: The Good, The Bad, And The Dysregulated. **Experimental neurology** 275:316-327.
111. Longworth W, Mccarthy P W (1997) A review of research on acupuncture for the treatment of lumbar disk protrusions and associated neurological symptomatology. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, NY)** 3:55-76.
112. Lonjon N, Kouyoumdjian P, Prieto M, Bauchet L, Haton H, Gaviria M, Privat A, Perrin F E (2010) Early functional outcomes and histological analysis after spinal cord compression injury in rats. **Journal of neurosurgery Spine** 12:106-113.
113. Lu J, Shao R H, Jin S Y, Hu L, Tu Y, Guo J Y (2017) Acupuncture ameliorates inflammatory response in a chronic unpredictable stress rat model of depression. **Brain research bulletin** 128:106-112.
114. Lukovic D, Stojkovic M, Moreno-Manzano V, Jendelova P, Sykova E, Bhattacharya S S, Erceg S (2015) Concise review: reactive astrocytes and stem cells in spinal cord injury: good guys or bad guys? **Stem cells** 33:1036-1041.
115. Ma R, Liu X, Clark J, Williams G M, Doi S A (2015) The Impact of Acupuncture on Neurological Recovery in Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of neurotrauma** 32:1943-1957.
116. Ma S F, Chen Y J, Zhang J X, Shen L, Wang R, Zhou J S, Hu J G, Lu H Z (2015) Adoptive transfer of M2 macrophages promotes locomotor recovery in adult rats after spinal cord injury. **Brain, behavior, and immunity** 45:157-170.
117. Madsen D H, Leonard D, Masedunskas A, Moyer A, Jürgensen H J, Peters D E, Amornphimoltham P, Selvaraj A, Yamada S S, Brenner D A, Burgdorf S, Engelholm L H, Behrendt N, Holmbeck K, Weigert R, Bugge T H (2013) M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway. **The Journal of cell biology** 202:951.

118. Maes M E, Schlamp C L, Nickells R W (2017) BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. **Progress in retinal and eye research** 57:1-25.
119. Maggio D M, Chatzipanteli K, Masters N, Patel S P, Dietrich W D, Pearse D D (2012) Acute Molecular Perturbation of Inducible Nitric Oxide Synthase with an Antisense Approach Enhances Neuronal Preservation and Functional Recovery after Contusive Spinal Cord Injury. **Journal of neurotrauma** 29:2244-2249.
120. Maggio M D, Singh A, Iorgulescu B J, Bleicher H D, Ghosh M, Lopez M M, Tuesta M L, Flora G, Dietrich D W, Pearse D D (2017) Identifying the Long-Term Role of Inducible Nitric Oxide Synthase after Contusive Spinal Cord Injury Using a Transgenic Mouse Model. **International journal of molecular sciences** 18.
121. Maldonado-Bouchard S, Peters K, Woller S A, Madahian B, Faghihi U, Patel S, Bake S, Hook M A (2016) Inflammation is increased with anxiety- and depression-like signs in a rat model of spinal cord injury. **Brain, behavior, and immunity** 51:176-195.
122. Maldonado Bouchard S, Hook M A (2014) Psychological stress as a modulator of functional recovery following spinal cord injury. **Frontiers in neurology** 5:44.
123. Markatos K, Laios K, Korres D, Tzivra A, Tsoutsos S, Androutsos G (2017) Gerard Blaes (Blasius) (1627-1682): The Dutch Physician and Chemist, his Work and his Description of the Spinal Cord. **World neurosurgery**.
124. Martirosyan N L, Patel A A, Carotenuto A, Kalani M Y, Bohl M A, Preul M C, Theodore N (2017) The role of therapeutic hypothermia in the management of acute spinal cord injury. **Clinical neurology and neurosurgery** 154:79-88.
125. Mcdonough A, Weinstein J R (2016) Neuroimmune Response in Ischemic Preconditioning. **Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics** 13:748-761.
126. Medeiros MA. (2001) **Mapeamento através da expressão de c-Fos das estruturas encefálicas envolvidas na acupuntura analgésica (ponto Zusanli) em animais imobilizados**. p 129. Tese (Departamento de Psicobiologia). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo.
127. Metz G a S, Merkler D, Dietz V, Schwab M E, Fouad K (2000) Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. **Brain research** 883:165-177.
128. Michael-Titus A T (2007) Omega-3 fatty acids and neurological injury. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** 77:295-300.
129. Miele V J, Panjabi M M, Benzel E C (2012) Anatomy and biomechanics of the spinal column and cord. **Handbook of clinical neurology** 109:31-43.
130. Mignogna C, Signorelli F, Vismara M F, Zeppa P, Camastra C, Barni T, Donato G, Di Vito A (2016) A reappraisal of macrophage polarization in glioblastoma: Histopathological and immunohistochemical findings and review of the literature. **Pathology, research and practice** 212:491-499.

131. Moller T, Bard F, Bhattacharya A, Biber K, Campbell B, Dale E, Eder C, Gan L, Garden G A, Hughes Z A, Pearse D D, Staal R G, Sayed F A, Wes P D, Boddeke H W (2016) Critical data-based re-evaluation of minocycline as a putative specific microglia inhibitor. **Glia** 64:1788-1794.
132. Morais D F, Spotti A R, Cohen M I, Mussi S E, Melo Neto J S D, Tognola W A (2013) Perfil epidemiológico de pacientes com traumatismo raquimedular atendidos em hospital terciário. **Coluna/Columna** 12:149-152.
133. Mortazavi M M, Harmon O A, Adeeb N, Deep A, Tubbs R S (2015) Treatment of spinal cord injury: a review of engineering using neural and mesenchymal stem cells. **Clinical anatomy** 28:37-44.
134. Mosser D M, Edwards J P (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews Immunology** 8:958-969.
135. Mottahedin A, Ardalan M, Chumak T, Riebe I, Ek J, Mallard C (2017) Effect of Neuroinflammation on Synaptic Organization and Function in the Developing Brain: Implications for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience** 11:190.
136. Munce S E, Perrier L, Tricco A C, Straus S E, Fehlings M G, Kastner M, Jang E, Webster F, Jaglal S B (2013) Impact of quality improvement strategies on the quality of life and well-being of individuals with spinal cord injury: a systematic review protocol. **Systematic reviews** 2:14.
137. Murray P J, Allen J E, Biswas S K, Fisher E A, Gilroy D W, Goerdts S, Gordon S, Hamilton J A, Ivashkiv L B, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez F O, Mege J L, Mosser D M, Natoli G, Saeij J P, Schultze J L, Shirey K A, Sica A, Suttles J, Udalova I, Van Ginderachter J A, Vogel S N, Wynn T A (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity** 41:14-20.
138. Nakajima K, Yamamoto S, Kohsaka S, Kurihara T (2008) Neuronal stimulation leading to upregulation of glutamate transporter-1 (GLT-1) in rat microglia in vitro. **Neuroscience letters** 436:331-334.
139. Nardone R, Holler Y, Brigo F, Orioli A, Tezzon F, Schwenker K, Christova M, Golaszewski S, Trinka E (2015) Descending motor pathways and cortical physiology after spinal cord injury assessed by transcranial magnetic stimulation: a systematic review. **Brain research** 1619:139-154.
140. New P W, Cripps R A, Bonne Lee B (2014) Global maps of non-traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository. **Spinal cord** 52:97-109.
141. Norden D M, Trojanowski P J, Villanueva E, Navarro E, Godbout J P (2016) Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. **Glia** 64:300-316.
142. Nova-Lamperti E, Fanelli G, Becker P D, Chana P, Elgueta R, Dodd P C, Lord G M, Lombardi G, Hernandez-Fuentes M P (2016) IL-10-produced by human

- transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+T-cell responses. **Scientific reports** 6:20044.
143. Ortiz G G, Pacheco-Moises F P, Bitzer-Quintero O K, Ramirez-Anguiano A C, Flores-Alvarado L J, Ramirez-Ramirez V, Macias-Islas M A, Torres-Sanchez E D (2013) Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. **Clinical & developmental immunology** 2013:708659.
 144. Oudega M, Bradbury E J, Ramer M S (2012) Chapter 38 - Combination therapies. In: Handbook of Clinical Neurology, vol. Volume 109 (Joost V and John WM, eds), pp 617-636: Elsevier.
 145. Oudega M, Bradbury E J, Ramer M S (2012) Combination therapies. **Handbook of clinical neurology** 109:617-636.
 146. Oyinbo C A (2011) Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. **Acta neurobiologiae experimentalis** 71:281-299.
 147. Paola F A, Arnold M (2003) Acupuncture and spinal cord medicine. **The journal of spinal cord medicine** 26:12-20.
 148. Pearce J M S (2008) The Development of Spinal Cord Anatomy. **European Neurology** 59:286-291.
 149. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M (2014) The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience letters** 565:30-38.
 150. Pineau I, Sun L, Bastien D, Lacroix S (2010) Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. **Brain, behavior, and immunity** 24:540-553.
 151. Pruss H, Kopp M A, Brommer B, Gatzemeier N, Laginha I, Dirnagl U, Schwab J M (2011) Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): indices and resolution plateau. **Brain pathology** 21:652-660.
 152. Puntambekar S S, Davis D S, Hawel L, 3rd, Crane J, Byus C V, Carson M J (2011) LPS-induced CCL2 expression and macrophage influx into the murine central nervous system is polyamine-dependent. **Brain, behavior, and immunity** 25:629-639.
 153. Ransom B, Behar T, Nedergaard M (2003) New roles for astrocytes (stars at last). **Trends in neurosciences** 26:520-522.
 154. Renfu Q, Rongliang C, Mengxuan D, Liang Z, Jinwei X, Zongbao Y, Disheng Y (2014) Anti-apoptotic signal transduction mechanism of electroacupuncture in acute spinal cord injury. **Acupuncture in Medicine** 32:463.
 155. Ritzel R M, Patel A R, Grenier J M, Crapser J, Verma R, Jellison E R, Mccullough L D (2015) Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke. **Journal of neuroinflammation** 12:106.

156. Roe C (2017) Unwrapping Neurotrophic Cytokines and Histone Modification. **Cellular and molecular neurobiology** 37:1-4.
157. Rouanet C, Reges D, Rocha E, Gagliardi V, Silva G S (2017) Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update. **Arquivos de neuro-psiquiatria** 75:387-393.
158. Rubio-Perez J M, Morillas-Ruiz J M (2012) A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. **TheScientificWorldJournal** 2012:756357.
159. Saganová K, Orendáčová J, Čížková D, Vanický I (2008) Limited minocycline neuroprotection after balloon-compression spinal cord injury in the rat. **Neuroscience letters** 433:246-249.
160. Saijo K, Crotti A, Glass C K (2013) Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. **Glia** 61:104-111.
161. Saijo K, Glass C K (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nature reviews Immunology** 11:775-787.
162. Saúde M D (2013) Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular. vol. 1ª edição (SAÚDE MD, ed), pp 1-37 Brasil: Biblioteca virtual em Ministério da Saúde.
163. Schaefer L (2014) Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. **The Journal of biological chemistry** 289:35237-35245.
164. Schafer D P, Lehrman E K, Stevens B (2013) The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. **Glia** 61:24-36.
165. Schwab J M, Zhang Y, Kopp M A, Brommer B, Popovich P G (2014) The paradox of chronic neuroinflammation, systemic immune suppression, autoimmunity after traumatic chronic spinal cord injury. **Experimental neurology** 258:121-129.
166. Schwab M E (2002) Repairing the injured spinal cord. **Science** 295:1029-1031.
167. Scognamillo-Szabó M V R, Bechara G H (2001) Acupuntura: bases científicas e aplicações. **Ciência Rural** 31:1091-1099.
168. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S (2015) Old, new and emerging functions of caspases. **Cell death and differentiation** 22:526-539.
169. Shechter R, Schwartz M (2013) Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. **The Journal of pathology** 229:332-346.
170. Sheng J, Chen W, Zhu H-J (2015) The immune suppressive function of transforming growth factor- β (TGF- β) in human diseases. **Growth Factors** 33:92-101.
171. Shi L-B, Tang P-F, Zhang W, Zhao Y-P, Zhang L-C, Zhang H (2016) Naringenin inhibits spinal cord injury-induced activation of neutrophils through miR-223. **Gene** 592:128-133.

172. Shi Y, Quan R, Li C, Zhang L, Du M, Xu J, Yang Z, Yang D (2016) The study of traditional Chinese medical elongated-needle therapy promoting neurological recovery mechanism after spinal cord injury in rats. **Journal of ethnopharmacology** 187:28-41.
173. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro M G, Rimoldi M, Biswas S K, Allavena P, Mantovani A (2008) Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in cancer biology** 18:349-355.
174. Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation** 122:787-795.
175. Silver J, Miller J H (2004) Regeneration beyond the glial scar. **Nature reviews Neuroscience** 5:146-156.
176. Sjölund B H (2002) Pain and rehabilitation after spinal cord injury: the case of sensory spasticity? **Brain Research Reviews** 40:250-256.
177. Sofroniew M V (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends in neurosciences** 32:638-647.
178. Son D J, Lee J W, Lee Y H, Song H S, Lee C K, Hong J T (2007) Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & therapeutics** 115:246-270.
179. Soulet D, Rivest S (2003) Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. **The Journal of cell biology** 162:257-268.
180. Souza, Raquel. (2012) **Efeito anti-inflamatório da acupuntura no modelo de lesão medular por compressão em ratos**. p 72. Dissertação (Departamento de Ciências Fisiológicas). Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
181. Souza R D N, Silva F K, Alves De Medeiros M (2017) Bee venom acupuncture reduces IL-6, increases IL-10 and induces locomotor recovery in a model of spinal cord compression. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies** 1:1.
182. Spychalowicz A, Wilk G, Sliwa T, Ludew D, Guzik T J (2012) Novel therapeutic approaches in limiting oxidative stress and inflammation. **Current pharmaceutical biotechnology** 13:2456-2466.
183. Stankov A, Belakaposka-Srpanova V, Bitoljanu N, Cakar L, Cakar Z, Rosoklija G (2015) Visualisation of Microglia with the use of Immunohistochemical Double Staining Method for CD-68 and Iba-1 of Cerebral Tissue Samples in Cases of Brain Contusions. In: PRILOZI, vol. 36, p 141.
184. Stenken J A, Poschenrieder A J (2015) Bioanalytical chemistry of cytokines – A review. **Analytica chimica acta** 853:95-115.
185. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R (2012) Inflammasomes in health and disease. **Nature** 481:278-286.

186. Su Y F, Lin C L, Lee K S, Tsai T H, Wu S C, Hwang S L, Chen S C, Kwan A L (2015) A modified compression model of spinal cord injury in rats: functional assessment and the expression of nitric oxide synthases. **Spinal cord** 53:432-435.
187. Tang S H, Yu J G, Li J J, Sun J Y (2015) Neuroprotective effect of ketamine on acute spinal cord injury in rats. **Genetics and molecular research : GMR** 14:3551-3556.
188. Tang W-C, Hsu Y-C, Wang C-C, Hu C-Y, Chio C-C, Kuo J-R (2016) Early electroacupuncture treatment ameliorates neuroinflammation in rats with traumatic brain injury. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 16:470.
189. Tang Y, Le W (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Molecular neurobiology** 53:1181-1194.
190. Tang Y, Le W (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Molecular neurobiology** 53:1181-1194.
191. Tang Y, Yin H Y, Rubini P, Illes P (2016) Acupuncture-Induced Analgesia: A Neurobiological Basis in Purinergic Signaling. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry** 22:563-578.
192. Taylor P R, Gordon S, Martinez-Pomares L (2005) The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. **Trends in immunology** 26:104-110.
193. Taylor P R, Gordon S, Martinez-Pomares L (2005) The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. **Trends in immunology** 26:104-110.
194. Teoh A C, Ryu K H, Lee E G (2016) One-Step Purification of Melittin Derived from *Apis mellifera* Bee Venom. **Journal of microbiology and biotechnology**.
195. Thomaty S, Pezard L, Xerri C, Brezun J M (2017) Acute granulocyte macrophage-colony stimulating factor treatment modulates neuroinflammatory processes and promotes tactile recovery after spinal cord injury. **Neuroscience** 349:144-164.
196. Tripathi R B, Rivers L E, Young K M, Jamen F, Richardson W D (2010) NG2 glia generate new oligodendrocytes but few astrocytes in a murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of demyelinating disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience** 30:16383-16390.
197. Tu W Z, Jiang S H, Zhang L, Li S S, Gu P P, He R, Hu J, Gao L P, Sun Q S (2017) Electro-acupuncture at Governor Vessel improves neurological function in rats with spinal cord injury. **Chin J Integr Med**.
198. Tufan K, Oztanir N, Ofluoglu E, Ozogul C, Uzum N, Dursun A, Pasaoglu H, Pasaoglu A (2008) Ultrastructure protection and attenuation of lipid peroxidation after blockade of presynaptic release of glutamate by lamotrigine in experimental spinal cord injury. **Neurosurgical focus** 25:E6.

199. Uldreaj A, Chio J C, Ahuja C S, Fehlings M G (2016) Modulating the immune response in spinal cord injury. **Expert review of neurotherapeutics** 16:1127-1129.
200. Vanegas H, Schaible H-G (2001) Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in neurobiology** 64:327-363.
201. Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, Čížková D, Gálik J (2001) A Simple and Reproducible Model of Spinal Cord Injury Induced by Epidural Balloon Inflation in the Rat. **Journal of neurotrauma** 18:1399-1407.
202. Visavadiya N P, Patel S P, Vanrooyen J L, Sullivan P G, Rabchevsky A G (2016) Cellular and subcellular oxidative stress parameters following severe spinal cord injury. **Redox Biology** 8:59-67.
203. Volarevic V, Erceg S, Bhattacharya S S, Stojkovic P, Horner P, Stojkovic M (2013) Stem cell-based therapy for spinal cord injury. **Cell transplantation** 22:1309-1323.
204. Wang J, Gao Y, Chen S, Duanmu C, Zhang J, Feng X, Yan Y, Liu J, Litscher G (2016) The Effect of Repeated Electroacupuncture Analgesia on Neurotrophic and Cytokine Factors in Neuropathic Pain Rats. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM** 2016:8403064.
205. Wang N, Liang H, Zen K (2014) Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Frontiers in immunology** 5:614.
206. Wang Z, Chen T, Long M, Chen L, Wang L, Yin N, Chen Z (2017) Electroacupuncture at Acupoint ST36 Ameliorates Inflammation and Regulates Th1/Th2 Balance in Delayed-Type Hypersensitivity. **Inflammation** 40:422-434.
207. Wang Z H, Xie Y X, Zhang J W, Qiu X H, Cheng A B, Tian L, Ma B Y, Hou Y B (2016) Carnosol protects against spinal cord injury through Nrf-2 upregulation. **Journal of receptor and signal transduction research** 36:72-78.
208. Wasser B, Pramanik G, Hess M, Klein M, Luessi F, Dornmair K, Bopp T, Zipp F, Witsch E (2016) Increase of Alternatively Activated Antigen Presenting Cells in Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology** 11:721-732.
209. Welch J S, Escoubet-Lozach L, Sykes D B, Liddiard K, Greaves D R, Glass C K (2002) TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. **The Journal of biological chemistry** 277:42821-42829.
210. Wilson J, Buchowski J M (2012) Post-traumatic deformity: prevention and management. **Handbook of clinical neurology** 109:369-384.
211. Wiltse L L (2000) Anatomy of the extradural compartments of the lumbar spinal canal. Peridural membrane and circumneural sheath. **Radiologic clinics of North America** 38:1177-1206.

212. Wu Y, Dissing-Olesen L, Macvicar B A, Stevens B (2015) Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. **Trends in immunology** 36:605-613.
213. Yang E J, Jiang J H, Lee S M, Yang S C, Hwang H S, Lee M S, Choi S M (2010) Bee venom attenuates neuroinflammatory events and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis models. **Journal of neuroinflammation** 7:69.
214. Ye M, Chung H S, Lee C, Hyun Song J, Shim I, Kim Y S, Bae H (2016) Bee venom phospholipase A2 ameliorates motor dysfunction and modulates microglia activation in Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice. **Experimental & molecular medicine** 48:e244.
215. Yin C S, Jeong H S, Park H J, Baik Y, Yoon M H, Choi C B, Koh H G (2008) A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research in veterinary science** 84:159-165.
216. Yoon H, Kim M J, Yoon I, Li D X, Bae H, Kim S K (2015) Nicotinic Acetylcholine Receptors Mediate the Suppressive Effect of an Injection of Diluted Bee Venom into the GV3 Acupoint on Oxaliplatin-Induced Neuropathic Cold Allodynia in Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 38:710-714.
217. Yu Y P, Ju W P, Li Z G, Wang D Z, Wang Y C, Xie A M (2010) Acupuncture inhibits oxidative stress and rotational behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rat. **Brain research** 1336:58-65.
218. Zhan J, Qin W, Zhang Y, Jiang J, Ma H, Li Q, Luo Y (2016) Upregulation of neuronal zinc finger protein A20 expression is required for electroacupuncture to attenuate the cerebral inflammatory injury mediated by the nuclear factor-kB signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats. **Journal of neuroinflammation** 13:258.
219. Zhang A, Sun H, Yan G, Cheng W, Wang X (2013) Systems biology approach opens door to essence of acupuncture. **Complementary therapies in medicine** 21:253-259.
220. Zhang A, Yan G, Sun H, Cheng W, Meng X, Liu L, Xie N, Wang X (2016) Deciphering the biological effects of acupuncture treatment modulating multiple metabolism pathways. **Scientific reports** 6:19942.
221. Zhang J, Huang K, Zhong G, Huang Y, Li S, Qu S, Zhang J (2016) Acupuncture Decreases NF-κB p65, miR-155, and miR-21 and Increases miR-146a Expression in Chronic Atrophic Gastritis Rats. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM** 2016:9404629.
222. Zhao H, Chen S, Gao K, Zhou Z, Wang C, Shen Z, Guo Y, Li Z, Wan Z, Liu C, Mei X (2017) Resveratrol protects against spinal cord injury by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the SIRT1/AMPK signaling pathway. **Neuroscience** 348:241-251.
223. Zhao H, Wang J Q, Shimohata T, Sun G, Yenari M A, Sapolsky R M, Steinberg G K (2007) Conditions of protection by hypothermia and effects on

- apoptotic pathways in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. **Journal of neurosurgery** 107:636-641.
224. Zhao J, Lv Z, Wang F, Wei J, Zhang Q, Li S, Yang F, Zeng X, Wu X, Wu Z (2013) Ym1, an eosinophilic chemotactic factor, participates in the brain inflammation induced by *Angiostrongylus cantonensis* in mice. **Parasitology Research** 112:2689-2695.
225. Zhao J, Wang L, Li Y (2017) Electroacupuncture alleviates the inflammatory response via effects on M1 and M2 macrophages after spinal cord injury. **Acupuncture in Medicine**.
226. Zhao Y, Xiao Z, Chen B, Dai J (2017) The neuronal differentiation microenvironment is essential for spinal cord injury repair. **Organogenesis** 0.
227. Zhao Z-Q (2008) Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in Neurobiology** 85:355-375.
228. Zhao Z Q (2008) Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in neurobiology** 85:355-375.
229. Zheng C, Zhou X-W, Wang J-Z (2016) The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . **Translational Neurodegeneration** 5:7.