

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

**ESTUDO DA LESÃO MEDULAR DE RATOS  
POR CRIOGENIA E O EFEITO  
NEUROPROTETOR DO CANABIDIOL**

**MARCELO KWIATKOSKI**

**RIBEIRÃO PRETO  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Marcelo Kwiatkoski**

**Estudo da Lesão Medular de Ratos por  
Criogenia e o Efeito Neuroprotetor do  
Canabidiol**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia  
Orientadora: Profa. Dra. Elaine Ap. Del Bel Belluz Guimarães.

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

### **Kwiatkoski, M**

Estudo da lesão medular em ratos por criogenia e o efeito Neuroprotetor do canabidiol. Ribeirão Preto, 2009.

p. 128 : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Del Bel, Elaine Aparecida.

1. Lesão Medular Criogênica. 2. Escala BBB. 3. Extensão da Lesão. 4. Canabidiol.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Marcelo Kwiatkoski**

Estudo da Lesão Medular de Ratos por Criogenia e o Efeito Neuroprotetor do Canabidiol.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora

*Prof. Dr.: Alexandre L. R. de Oliveira*

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Prof. Dr.: Guilherme de Araújo Lucas*

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Elaine Ap. Del Bel B. Guimarães*

Assinatura: \_\_\_\_\_

“Só a inocência e a ignorância são  
Felizes, mas não o sabem. São-no ou não?  
Que é ser sem no saber? Ser, como a pedra,  
Um lugar, nada mais.”

Fernando Pessoa

## Dedicatória

---

*Dedico:*

*Aos meus pais Luiz e Lourdes, pelo amor, compreensão, confiança e incentivo.*

*À minha amada esposa Roberta, pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos, e ao nosso filho Matteo que está para chegar.*

# Agradecimientos

---

## AGRADECIMENTOS

*“Como o não sabes ainda  
Agradecer é mistério”*

Fernando Pessoa

Antes de tudo preciso dizer que meus agradecimentos não são formais. Eu não me reconheceria neles se assim fossem. Quero agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, que foram solidárias, que torceram por mim. Mas bem sei que agradecer é sempre difícil. Posso cometer mais injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram do que fazer jus a todas que merecem.

De qualquer forma, todos os que realizam um trabalho de pesquisa sabem que não o fazem sozinhos, embora seja solitário o ato da leitura e o do escrever. O resultado de nossos estudos foi possível apenas pela cooperação e pelo esforço de outros antes de nós. Pesquisadores de vulto histórico como Isaac Newton já escreveram sobre o fardo que impomos aos ombros de gigantes que nos precederam. Isto me leva a questionar-me: quanto de mim sou eu, e quanto é dos outros com quem convivi e com quem convivo? A pergunta cabe porque sinto que este trabalho não é só meu. Pelos amigos que tenho e tive, pelos autores que li, pelos professores com quem tive aulas na graduação e pós-graduação, pelos colegas e amigos de mestrado que me fizeram aprender com as discussões e conversas e pelos comentários e sugestões feitos aos meus primeiros rabiscos da dissertação.

Se devo ser seletivo, então é melhor começar do início. Minha família merece as palavras que me são mais caras. Meu maior agradecimento é dirigido a meu pai (amigo e conselheiro) pelo exemplo de trabalho, dedicação, simplicidade, sinceridade, moralidade e amizade, que em todos momentos, mesmo estando distante se fez presente, nos conselhos ou nos puxões de orelha mostrando sempre o certo e errado; e a minha mãe que através de seu amor, carinho, compreensão (ou falta dela) soube me educar e me mostrar o caminho

certo. Graças à educação de vocês me tornei quem hoje sou, obrigado, amo muito vocês!

À minha irmã Luciana (Nâna) pela infância vivida, sorrisos, pelas horas de conversas, discussões e conselhos. Pelo apoio em minhas decisões, afinal, não chegaria “aqui” se não fosse por suas palavras. Por ter me dado dois sobrinhos lindos Caio e Mateus os quais tenho muito carinho e amor. Agradeço ao meu cunhado e amigo Marcelo (Baumann) pelas palavras de incentivo nos momentos alegres e também nos difíceis, sempre me fazendo refletir a respeito dos ensinamentos religiosos.

À minha amada esposa Roberta (Amorzinha) pelo amor, carinho, dedicação, cumplicidade, amizade e compreensão em todos os momentos por nós vividos. Pelas discussões que nos fazem crescer a cada dia. Obrigado pela fidelidade, companheirismo, estando sempre ao meu lado nas horas difíceis e de alegria me fazendo muito feliz. Pelo nosso filho Matteo, que está para chegar, mas já faz parte de nossas vidas e é tão amado desde o primeiro momento. Obrigado, minha amada esposa, por tanto amor dedicado ao nosso lar e a mim, “Amo Você”!

Agradeço ao Seu Marcos e a Dna Marilene que me acolheram em seu lar, me tratando como parte de sua família. Em especial a Seu Marcos pelas conversas, amizade, conselhos e por me fazer tomar gosto pela história da Grécia e Roma Antiga (que até hoje não entendo direito). Agradeço cada janta e almoço compartilhado, e também aos novos amigos que ganhei, Karla (Bruxinha) e Fernando (Nando) que tornam nossas refeições e idas à Campo Grande tão engraçadas.

Aos amigos de Campo Grande com quem convivi minha infância e adolescência Alex (Tetê), Claudiney, Lú, Wudson, Clébão, Lela, Nagib, Macarrão, Luizão, Paulo Coelho, Flávio (Xuxa), Elias (Rolias), Sílvia Paula e Alexander, que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e fizeram com que eu chegasse aonde cheguei. Agradeço aos novos e não menos importantes amigos de Ribeirão Preto João (Jão), Marina (Severina), Fernandinha (Lamparina), Gabí, Ernane, Andréia, Renatão, Sabrina (Bina), Fábio e Andresão. Em especial aos amigos, Beto (Ferreirinha), Marcelinho, Dawit, Eduardo (Dú), André e Cadu (meu Morrr), que sempre estiveram presentes em todos os

momentos, aconselhando e dando forças nos momentos mais turbulentos dessa jornada, obrigado!

À Célitcha, Seu Zé e toda sua família que sempre acolheu a mim e a Roberta com muito carinho e atenção. Agradeço pelos churrascos, pelas reuniões aos finais de semana, pelos ensinamentos técnicos no laboratório, aos conselhos e orientações e aos ensinamentos de vida. Agradeço também ao Marinho e a Mônica, que sempre nos acolheram, e hoje mais parece que são amigos de velhas datas. Obrigado por todas as horas de diversão e também pelos conselhos, que sempre serão acolhidos com muito carinho.

Aos colegas e amigos de laboratório Marcelinha, Margarete, Cristiane, Márcio Lazzarini, Melina, Angélica, Janaína e Danielle pela diversão, companheirismo, ensinamentos, discussões e auxílio durante as prévias. Em especial a “Valela” que sempre esteve disposta a me “orientar”, ensinar e discutir minhas dúvidas desde os primeiros dias de laboratório; a Carolzinha que com seu jeitinho atencioso e carinhoso corrigia meus erros de português, estatística e fazia sugestões valiosas para elaboração deste trabalho; a Nadia pelos ensinamentos de imunohistoquímica, microscopia, fotos, carinho e pela amizade; e ao Fernando pela amizade nas horas difíceis e idéias trocadas ao longo de nossos trabalhos; obrigado a todos!

Ao pessoal da secretaria da Fisiologia Claudia, Elisa, Fernando e Carlão que estiveram sempre à disposição para ajudar nos processos burocráticos que envolviam este trabalho, tornando esta tarefa menos árdua.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Elaine A. Del Bel por acolher a mim e a Roberta em seu laboratório dando-nos a oportunidade de início na vida científica; pelos ensinamentos, conselhos, orientação, formação científica e confiança depositada; tornando possível a realização de um sonho.

Aos professores Guilherme de Araújo Lucas e Alexandre L. R. de Oliveira, por suas sugestões, disponibilidade e gentileza ao participar desta banca examinadora.

Aos professores de graduação que tanto contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal, despertando questionamentos relacionados à ciência e saúde. Agradeço em especial a Jorge A. Barros que introduziu a Fisiologia em minha vida; a Serginaldo J. dos Santos; a Albert Schiaveto de Souza, pelos

ensinamentos, conselhos e amizade mostrando o caminho a ser seguido; a Karla T. C. Muller; a Mara L. dos Santos; a Nelson Kian; a Fernando Ferrari; e a Telma Chiarapa. Agradeço por depositarem sua confiança em mim e me apresentarem um novo mundo, obrigado!

Agradeço a CAPES, CNPq e FAPESP que com seu auxílio financeiro tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos animais utilizados nas pesquisas experimentais em nome da ciência, meu reconhecimento.

## RESUMO

Kwiatkoski M. **Estudo da Lesão Medular de Ratos por Criogenia e o Efeito do Canabidiol**. 2009. f 128. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

**Racional e Objetivos:** Neste estudo foi investigada a lesão medular em ratos realizada por meio da aplicação de nitrogênio líquido e os efeitos da administração do constituinte não psicoativo da *cannabis*, o canabidiol (CBD). A recuperação sensório-motora dos animais foi analisada por meio da escala de avaliação locomotora de Basso Beattie e Bresnahan (BBB) e teste de retirada de cauda. Para avaliação histológica da extensão da lesão foi utilizada a histoquímica para hematoxilina-eosina (HE), a expressão da proteína Fos-b e da proteína nuclear neuronal (Neu-N). **Material e Métodos** Ratos *Wistar* machos (280-300g) foram divididos nos grupos (n= 5-8/grupo) Controle (cont); laminectomia (lam): lesão+veículo (veíc); lesão+canabidiol 10mg (CBD 10) e lesão+canabidiol 20mg (CBD 20). A lesão foi induzida pela aplicação de jato de nitrogênio líquido durante 05 segundos na medula espinhal torácica, segmento 10. Foram realizadas aplicações (i.p.) do veículo ou do CBD 10mg e CBD 20mg imediatamente antes do procedimento cirúrgico, 3 horas após e por 6 dias consecutivos. A recuperação funcional foi avaliada um dia antes do procedimento cirúrgico, no primeiro, terceiro e sétimo dias pós-operatório (PO).

**Resultados:** A lesão medular por criogenia resultou em déficit motor significativo ( $P<0.05$ ). Analisado por meio da escala BBB, o tratamento com canabidiol 10mg/kg induziu recuperação 50% maior que o grupo veículo, 7 dias pós-lesão. O tratamento com canabidiol 20mg/kg induziu melhora da função motora de 75% no sétimo dia pós-lesão comparado ao veículo. Não foram observadas modificações significativas no teste de retirada de cauda. A análise histológica mostrou que o grupo lesão+CBD20, sete dias após o procedimento, apresentou redução significativa da extensão da lesão ( $P<0.05$ ) e da expressão da proteína Fos-b no corno ventral da medula espinhal ( $P<0.05$ ).

**Conclusão:** Ratos que sofreram lesão medular por meio da aplicação de jato de nitrogênio líquido apresentaram melhora funcional com a co-administração de Canabidiol que, portanto, exibiu efeito neuroprotetor.

**Palavras-chave:** lesão medular criogênica, escala BBB, extensão da lesão, canabidiol.

## ABSTRACT

Kwiatkoski M. **Study of Spinal Cord Injury in Rats by cryogeny: the Effect of Canabidiol**. 2009. f 128. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The effect of the non-psychoactive constituent of cannabis canabidiol (CBD) was investigated in the rat spinal cord injury performed by the application of liquid nitrogen. The sensory-motor recovery was evaluated by Basso Beattie, Bresnahan (BBB) Scale and tail flick test. The extent of injury was evaluated by hematoxylin eosin histochemistry and by the expression of Fos-b and the neuronal nuclear protein (Neu-N). Male *Wistar* rats (280-300g) were divided into groups (n = 5-8 rats/group) Control (cont); laminectomy (Lam); lesion + vehicle (vehic- application of liquid nitrogen 05 seconds, segment toracic 10, followed by i.p. injections of vehicle); lesion-canabidiol 10mg (CBD 10- cryogenic lesion + CBD 10mg/kg; lesion-canabidiol 20mg (CBD 20 cryogenic lesion + treatment with CBD 20mg/kg). The administration of vehicle, CBD 10mg and 20mg started before 3 hours after the surgical procedure, and once a day for 6 consecutive days. Functional recovery was assessed one day before the surgery and the first, third and seventh postoperative days (PO). The cryogenic lesion of spinal cord resulted in significant motor deficit (P <0.05). Treatment with canabidiol improved motor function, increasing the score in the BBB scale (vehic, CBD 10 and CBD 20 respectively: 1<sup>st</sup> PO- 0 ± 0, 0 ± 0 and 0 ± 0; 3<sup>rd</sup> PO- 1 ± 0.2; 1 ± 0.1; 2 ± 0.2; 7<sup>th</sup> PO- 4 ± 0.3; 6 ± 0.4; 7 ± 0.4; P <0.05). Moreover, there was a significant reduction in the extent of tissue injury (P <0.05) and Fos-b expression in the ventral horn of the spinal cord seven days after injury (P <0.05). In conclusion, this study demonstrated that the application of liquid nitrogen in the spinal cord of rats induce lesion with locomotor deficit. Additionally, the sub-chronic treatment with canabidiol increase animals recovery and reduced the extent of the injury.

**Keywords:** spinal cord injury, BBB scale, length of lesion, canabidiol.









## Lista de Abreviaturas

**2-AG** – 2-araquidonil-glicerol;

**AMPA** -  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazole-propionato

**AMPc** – Adenosina monofosfato cíclico;

**AMT** – Transportador de Membrana da Anandamida;

**BDNF** – Fator neurotrófico derivado do cérebro;

**BSA** – Soro Albumina Bovina;

**CA1** – Corno de Ammon, área 1;

**CB1** – Receptor Canabinóide do Tipo 1;

**CB2** – Receptor Canabinóide do Tipo 2;

**CBD** – Canabidiol;

**CNTF** – Fator Neurotrófico Ciliar;

**COBEA** – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

**Cu** – Cobre;

**DAB** – Diaminobenzidina;

**DAG** – Diacilglicerol;

**DAGL** – Diacilglicerol-Lipase;

**DNA** – Ácido desóxi-ribonucleico;

**EPM** – Erro padrão da média;

**FAAH** – Ácido Graxo Amina Hidroxilase;

**FCCP** – Carbonilcianido-p-trifluorometoxifenilidrazone;

**FOSB** - FBJ osteosarcoma murina oncogênese viral homologo B;

**GABA** – Ácido gama-amino butírico;

**GNDF** – Fator Neurotrófico Derivado da Glia;

**HE** – Hematoxilina-eosina;

**5HT<sub>1A</sub>** - 5-hidroxitriptamina 1A;

**IFN<sub>γ</sub>** – Citocina Pró-inflamatória Interferon;

**i.p** – Intraperitoneal;

**MAG** – **Glicoproteína associada à mielina;**

**N-ArPE** – N-araquidonilfosfatidiletanolamina;

**NAPE** – N-acilfosfatidiletanolamina;

**NAPE-PLD** – N-acilfosfatidiletanolamina–fosfolipase D;

**NAT** – N-aciltransferase;

**Neu-N** – Proteína Nuclear Neuronal;

**NGF** – Fator de crescimento derivado do nervo;

**NI-35** – Inibidor Neural;

**NI-250** – Nogo;

**NMDA** – N-metil-D-aspartato;

**NO** – Óxido nítrico;

**NOC 12** – Óxido Nítrico Cristalino A;

**NT** – Neurotrofinas;

**PBS** – Fosfato Salina Tamponada;

**PBST** - Fosfato Salina Tamponada + Triton X-100

**PFA** – Paraformaldeído;

**RNA<sub>m</sub>** – Ácido Ribonucleico Mensageiro;

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio;

**SN** – **Sistema nervoso;**

**SNC** – Sistema nervoso central;

**SNP** – Sistema nervoso periférico;

**$\Delta^9$  THC** -  $\Delta^9$ -Tetraidrocanabinol;

**TB** – Tampão Tris;

**TNF $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral;

**VR1** – Receptor Vanilóide do Tipo 1;

**Zn** – Zinco;

# Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. REGENERAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO

Até o início da década de 1980, a capacidade de regeneração do sistema nervoso central (SNC) era vista como praticamente impossível. Somente após o ano de 1990, é que o estudo nesta área começou a avançar e vem sendo tema de freqüentes investigações.

A capacidade de regeneração do sistema nervoso (SN) promovendo a reinervação do tecido alvo é diferente entre as espécies. Sabe-se que em vertebrados superiores. Já os axônios dos neurônios do SNP são capazes de crescer novamente por longas distâncias, restabelecendo suas conexões com os respectivos órgãos alvo. No entanto, no SNC o crescimento do axônio geralmente se limita a poucos milímetros e a regeneração não acontece de forma efetiva (Aguayo e cols., 1981 Nicholls e cols, 2001).

O SNC quando lesado tenta<sup>24</sup> restabelecer suas funções que dependem da reorganização de circuitos remanescentes. A formação de novas conexões e o restabelecimento de conexões em projeções pré-existentes são importantes para o processo de regeneração do SN (Raineteu e Schwab, 2001).

Várias pesquisas se desenvolveram na tentativa de compreender melhor a capacidade de regeneração do SN e as diferenças entre o SNC e o SNP.

Na década de 1940, Levi-Montacini, investigando o desenvolvimento neuronal, descreveu a existência de uma família de proteínas essenciais à sobrevivência de classes particulares de neurônios, presentes no desenvolvimento embrionário, no indivíduo adulto e após lesão. Dentre estas proteínas, o *nerve growth factor* (NGF) foi o primeiro a ser identificado. Em 1976, foi observado que os axônios de neurônios dos gânglios sensoriais de pintos em cultura proliferavam quando colocados em contato com o NGF.

Aguayo e colaboradores (1981) realizaram experimentos transplantando células da glia do SNP para o SNC e concluíram que os processos de regeneração do SN estavam relacionados com os substratos que o cerca, mais do que com as propriedades do próprio tecido nervoso central e periférico. Keirstead e cols. (1992), em estudos comparando o desenvolvimento embrionário em pintos e a capacidade de regeneração após lesão do SNC, demonstraram que após a mielinização essa capacidade era suprimida. Em 1985, Schwab e Thoenen descreveram a existência de fatores inibidores de crescimento neuronal no SNC presentes na substância branca, provavelmente relacionados à mielina. Estes fatores inibiam o crescimento neuronal mesmo na presença de fatores neurotróficos. Dentre eles foram encontrados o NI – 35 (*neurite inhibitor*), NI – 250 (Nogo) e a proteína MAG (*Myelin Associated Glycoprotein*, Tatagiba e cols., 1997; Grandpré e cols., 2000; Gao e cols., 2003).

Oudega e Hagg (1999) demonstraram que a administração exógena de NGF promovia a regeneração de axônios sensitivos em ratos adultos com lesão medular, provavelmente pela presença de receptores deste fator neurotrófico nos neurônios da raiz dorsal que se projetam para a substância cinzenta da medula espinhal. Hoje, existem muitas outras substâncias endógenas relacionadas ao desenvolvimento, crescimento e sobrevivência do SN, tais como as neurotrofinas (NT) -3, -4, -5, -6 e -7 (Boyd e Gordon, 2002), o *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), o fator neurotrófico ciliar (CNTF), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, Tatagiba e cols., 1997), aminoácidos excitatórios (ex. glutamato), e neurotransmissores, como a serotonina e o óxido nítrico (Saunders e cols., 1987; Barut e cols., 1993).

Desta forma, alguns estudos demonstram que o SNP e SNC apresentam capacidade de regeneração. O estudo das funções dessas substâncias que interferem nos processos pós-lesão é um importante caminho para se entender os processos envolvidos no reparo do SNC.

## **1.2. LESÃO MEDULAR**

Devido à crescente incidência da lesão medular e expectativa de vida quase inalterada, estima-se que existam aproximadamente 2,8 milhões de pacientes com lesão medular no mundo (*The National SCI Statistical Center, 2006*). Estudos epidemiológicos estimam que a lesão medular ocorra principalmente em homens (81%), com idade entre 16 a 30 anos, atingindo a fase mais produtiva de sua vida (McDonald e Sadowsky, 2002). Aproximadamente 40% dos pacientes sofrem tetraplegia/paresia e 60% paraplegia/paresia. As principais causas apontadas para a lesão medular são acidentes automobilísticos (36-48%), violência (5-29%), atividades de lazer (7-16%), quedas e ferimentos por armas de fogo (17-21%) (*The National SCI Statistical Center, EUA, 2006*). Não existem no Brasil estatísticas fiéis a respeito mas acredita-se que este número seja maior que aqueles apresentados pelos americanos.

Em aproximadamente 60% dos casos, a lesão do sistema sensorial e/ou motor é incompleta. Até o começo da segunda Grande Guerra, a taxa de sobrevivência dos pacientes com lesão medular aguda era menos de 5%. Graças ao desenvolvimento de novas técnicas para tratamento da lesão medular, desenvolvidas por Ernest Guttmann no ano de 1945, esta taxa foi aumentada para mais de 95%.

A lesão medular pode produzir perda completa (plegia) ou parcial (paresia) das funções motoras, sensoriais e vegetativas abaixo do ponto da lesão. Na fase inicial da lesão, conhecida como choque espinhal, as inervações vaso motoras e viscerais permanecem em completo silêncio. Isto resulta não somente em arritmia cardíaca, mas também em episódios de hipotensão e hipertensão (disreflexia autonômica). Além disso, ocorre atonia dos ductos eferentes urinários, estômago e intestino, juntamente com sintomas de paralisia do íleo, disfunções endócrinas, como hiperglicemia, do metabolismo eletrolítico e no controle da temperatura corpórea (Gerner, 1992; Teasell, 2000). Durante o declínio do choque espinhal, aproximadamente 4-6 semanas após o acidente, os reflexos patológicos e a espasticidade geralmente se desenvolvem devido à ausência de controle supra espinhal (Ditunno e cols, 2004).

Grande parte da lesão observada na medula espinhal é devida a eventos secundários que ocorrem de minutos a semanas após a lesão primária induzida pela contusão da medula espinhal (Schwab e cols., 2006). Há quatro mecanismos de lesão primária relacionados ao trauma raquimedular: o impacto associado à compressão persistente ocasionada por ruptura do disco intervertebral, fragmentos ósseos e fraturas com deslocamento, sendo estes mecanismos bastante comuns; impacto associado à compressão transitória, como nos casos de hiperextensão; distensões ocasionadas por forças relacionadas à flexão, extensão, rotação ou ao deslocamento, comprometendo o fluxo sanguíneo; por último, laceração ou transecção.

A compreensão dos mecanismos que sublinham processos secundários à lesão da medula espinhal é ainda incompleta constituindo-se de processos dinâmicos e complexos. A lesão celular mobiliza uma seqüência de modificações

moleculares e celulares que ampliam a gravidade da lesão. Dentre estas modificações estão: alterações no fluxo sangüíneo e isquemia, edema, acúmulo de cálcio intracelular e de potássio no espaço extracelular; hidrólise de fosfolípídeos, formação de radicais livres, liberação de aminoácidos excitatórios como glutamato e aspartato, migração de células inflamatórias, ativação da micróglia, presença de fatores inibitórios, entre outros (Schwab e Bartholdi, 1996). Neurônios que sofrem axotomia e tem o corpo celular localizado em núcleos distantes do sítio de lesão, também podem sofrer atrofia ou mesmo morrer. Essas respostas podem ser reguladas por processos endógenos tais como a produção de fatores neurotróficos. Além disso, sistemas descendentes remanescentes à lesão podem desempenhar um papel importante na recuperação (Basso e cols, 1996).

O prognóstico da lesão medular é dependente da neurodegeneração secundária, do tipo e da intensidade da agressão medular. O processo de cavitação é um dos fenômenos mais comuns que ocorre após a lesão medular impedindo a regeneração do SNC. De acordo com Fitch e cols (1999), a cavitação pode expandir-se e aumentar muito seu tamanho em relação à lesão inicial. Além disso, há evidências que a propagação da lesão seja devido à ativação de eventos bioquímicos, promovendo grande destruição celular e lesão excitotóxica (Hall e Springer, 2004; Schwab e cols., 2006).

Em poucas horas após a lesão ocorrem efeitos irreversíveis na substância cinzenta, sendo que tais efeitos podem demorar até 72 horas para atingir a substância branca (Dusart e Schwab, 1994). A lesão primária causa hemorragias pericapilares, principalmente na substância cinzenta, com edema observado mais rapidamente na substância branca. No nível da lesão, 8 horas após, já se

encontra isquemia global com conseqüente necrose irreversível da substância branca. A degeneração pode aumentar um ou dois níveis craniais ou caudais àqueles da lesão inicial, de modo que o aparecimento de tecido gliótico como resultado de áreas necróticas novas pode persistir levando a cavitações inicialmente preenchidas por fluído e circundadas por tecido cicatricial (Beattie e cols., 1997; Schwab e cols., 2006). No SNC, este tecido cicatricial é capaz de produzir moléculas que inibem o crescimento axonal e de servir como obstáculo físico ao crescimento dos axônios (Lu e Waite, 1999).

A lesão primária leva a ativação de fatores locais que intermedeiam a instalação da lesão secundária. Dentre eles estão a inflamação, os efeitos vasculares e a excitotoxicidade que agravam a lesão primária mecânica (Dumont e cols., 2001). Além da necrose secundária, processos ativos de apoptose podem ser importantes na produção da lesão secundária do SNC causadas tanto pela isquemia, quanto pelo trauma ( Schwab e cols., 2006).

Estudos em ratos (Li e cols., 1996; Liu e cols., 1997) mostram que tanto neurônios quanto células da glia podem entrar em processo de apoptose após lesão medular e que a progressão desses eventos pode se estender por semanas. Os mesmos processos foram observados em macacos (Crowe e cols., 1997) e em humanos (Emery e cols., 1998). Grande parte da morte celular que ocorre após a lesão está relacionada à degeneração Walleriana (Kalb e Strittmatter, 2000). A micróglia e o astrócito são as células que modulam o processo inflamatório no SNC. A ativação microglial ocorre durante o processo inflamatório no tecido nervoso central e, além de exercer funções macrofágicas, libera citocinas que são cruciais para ativação astrocitária (Magnus e cols., 2002).

Como já mencionado anteriormente, as alterações vasculares presentes durante a instalação da lesão secundária fornecem os principais mecanismos relacionados à isquemia, que é agravada pela vasoconstrição, pela perda da microcirculação ou pela hipoperfusão sistêmica. A hemorragia, por sua vez, deve-se à secção de vasos, levando à perda da microcirculação e interrupção da autoregulação (Dumont e cols., 2001). Com a perda da regulação vascular, o fluxo sanguíneo medular sofre alterações hemodinâmicas que levam à hipotensão e hipóxia, que compõem o quadro de isquemia focal (Amar e Levy, 1999). A perda da microcirculação sanguínea se estende consideravelmente nas direções proximal e distal do sítio de lesão (Tator e Fehlings, 1991). Além disso, é capaz de aumentar a lesão e a morte celular por suprir o local de radicais livres e outros bioprodutos tóxicos, por exemplo, óxido nítrico e radicais superóxidos que foram produzidos durante a isquemia. As espécies oxigênio-reativas agem como moléculas sinalizadoras que iniciam a progressão da inflamação pós-traumática e a apoptose (Hall e Springer, 2004; Schwab e cols., 2006). Deste modo, o estresse oxidativo fornece um mecanismo adicional à lesão secundária, interagindo com o processo inflamatório (Dumont e cols., 2001). As alterações da permeabilidade das membranas podem ser potencializadas pela diminuição da função mitocondrial, culminando com lesão celular irreversível. Ainda, o extravasamento de enzimas celulares e o influxo de cálcio podem contribuir para a lesão celular irreversível (Schwab e Bartholdi, 1996).

A progressão da lesão medular é ainda agravada pela liberação de neurotransmissores excitatórios. Este processo, denominado excitotoxicidade, depende principalmente da liberação do glutamato ou da facilitação da ligação deste com seus subtipos de receptores (NMDA ou AMPA-cainato) cujo

funcionamento também sofre alteração em função dos mecanismos lesivos relacionados (Sadowsky et al., 2002). A resultante mais importante destes eventos é o acúmulo de cálcio intracelular, que inicia uma série de efeitos deletérios. Dentre estes efeitos estão a ativação das sintases do óxido nítrico e a disfunção mitocondrial, que leva à falha do metabolismo energético aeróbico e acúmulo de lactato (Hall e Springer, 2004).

Até o momento não existem terapias disponíveis para a cura das vítimas de lesão medular. Conseqüentemente é necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para aumentar as possibilidades de regeneração dos neurônios e axônios medulares lesionados, melhorando a função sensorial e motora e, portanto a qualidade de vida dos pacientes com lesão medular (Sharma, 2005).

Intervenções farmacológicas são importantes para reduzir a lesão secundária que acentua os prejuízos funcionais, danos celulares e teciduais inicialmente causados pela injúria mecânica (Mallei e cols., 2005). Estas intervenções têm como objetivos principais a promoção da regeneração após lesão medular, procurando minimizar a progressão da lesão secundária, favorecer a condução axonal e fornecer ambiente permissivo ao crescimento axonal (Schwab e cols, 2006). Dentre essas intervenções a de maior impacto clínico até o momento é a aplicação do glicocorticóide metilprednisolona (Lim e Tow, 2007). Em lesões medulares agudas traumáticas os efeitos de antiinflamatórios como a metilprednisolona administrada imediatamente após a lesão demonstrou melhora no déficit sensório-motor de pacientes com lesão medular (Young e cols., 1994). Embora o mecanismo de ação da metilprednisolona sobre o SNC lesado não seja muito conhecido, existem vários efeitos benéficos incluindo supressão de edema,

aumento do fluxo sanguíneo da medula espinhal, estabilização da membrana dos lisossomas e atenuação da resposta inflamatória. A ação da metilprednisolona sobre o SNC pode regular a excitabilidade neuronal (Mellon e cols., 1996). Isto pode ocorrer devido à influência dos glicocorticóides nos eventos tróficos neuronais. Um dos fatores neurotróficos envolvidos no processo de sinalização de morte ou sobrevivência de neurônios da medula espinhal são os da família das neurotrofinas (Korsching e cols., 1993). Há receptores de neurotrofinas que estão mais ligados a apoptose neuronal denominados p-75. A lesão medular causa aumento no RNA mensageiro para o p-75 e o uso de dexametasona, um glicocorticóide sintético, atenua este aumento (Brandoli e cols., 2001). Acredita-se, ainda, que a maior parte destes efeitos sejam derivados da habilidade da metilprednisolona como antioxidante, inibidor da peroxidação lipídica, normalizador do fluxo sanguíneo e de prevenir o influxo de cálcio para o interior das células (Amar e Levy, 1999; Kalb e Strittmater, 2000). Além da metilprednisolona outras estratégias encontram-se em estudo a fim de minimizar os efeitos do trauma medular, dentre elas podemos citar o uso de fatores neurotróficos (neurotrofinas, BDNF e IGF), antagonistas opióides (dinorfina, hormônio liberador de tireotropina e naloxone), antagonistas de receptores de aminoácidos excitatórios endógenos (em especial antagonistas de receptores NMDA), bloqueadores de canal de cálcio, hormônio de crescimento e antioxidantes (Houweling e cols., 1998; Amar e Levy, 1999; Wada e cols., 1999; Belanger e Levi, 2000; Novikova e cols., 2002; Nyberg e Sharma, 2002; Carlson e cols., 2003; Hall e Springer, 2004; Liu e cols., 2006), existem também as terapias de transplante de células (células de Schwann - leucócitos, medula óssea, macrófagos ativados, precursores de oligodendrócitos e células tronco), terapias

para eliminação de inibidores do crescimento axonal; enxertos de nervo periférico, tecido de medula espinhal fetal e de material biocompatível livre de células ((Amar e Levy, 1999; Lu e Waite, 1999; Kwon e Tetzlaff, 2001; Geller e Fawcett, 2002; Reier, 2004; Schwab e cols., 2006).

Apesar dos vários estudos experimentais existentes, agindo em pontos diferentes da cascata de lesão, não existe abordagem terapêutica única que seria suficiente para alcançar a completa recuperação sensório motora após a lesão medular (Novikova e cols., 2002).

### **1.2.1. Modelos Animais de Lesão Medular**

Não há até o presente procedimento experimental simples ou bem definido disponível para a caracterização da severidade e para o estudo da recuperação após a lesão da medula espinhal. Os métodos utilizados para lesão imitam um aspecto particular de lesão que ocorre nos seres humanos (Basso, 1996).

Experimentos recentes envolvem desde células neuronais em cultura a segmentos anatomicamente intactos da medula espinhal sujeitos a vários tipos de insultos mecânicos ou isquêmicos, tais como aqueles produzidos por queda de peso, compressão focal ou circunferencial por balão extradural, estreitamento do canal vertebral, compressão por “clip” ou lesões térmicas (Collins e cols, 1986; Dimar e cols, 1999; Wu e cols, 2005, Usul e cols, 2006, Leung e cols, 2006). Estes métodos são estudados em vários animais como ratos, cães, coelhos, gatos, camundongos e macacos (Nystrom e Berglund, 1988; Wrathall, 1992; Delamarter e cols 1995; Beattie e cols., 1997; Dimar e cols., 1999; Kwon e Tetzlaff, 2001; Carlson e cols., 2003; Souza e cols., 2006). Apesar das limitações, a utilização

de modelos de laboratório tem se mostrado extremamente relevante no entendimento de lesões.

A determinação de método de indução de lesão medular que possa ser avaliado por método simples, por meio do comportamento sensório motor, assim como pela análise das modificações celulares induzidas, pode contribuir muito para a análise das conseqüências da lesão, assim como o processo de recuperação.

Aguayo e cols. (1981) pioneiramente demonstraram que o processo de regeneração do sistema nervoso está intimamente relacionado com o substrato que o cerca. Uma forma de se estudar a lesão do tecido nervoso central pode ser por meio do congelamento rápido, controlado, a baixas temperaturas de regiões determinadas da medula espinhal. Estudos semelhantes foram realizados por Collins e cols (1986), para estudar a lesão medular caracterizando a lesão por meio de microscopia eletrônica. Este modelo de lesão medular oferece várias vantagens para o estudo da lesão no sistema nervoso central. O primeiro efeito do congelamento sobre os axônios é similar ao efeito primário da lesão traumática (Balentine, 1978), porém sem o edema secundário e as mudanças nas estruturas medulares e vasculares associadas com o trauma, o que pode ser o maior problema no estudo da lesão medular. Ao mesmo tempo, a criolesão é semelhante à lesão por contusão não invasiva a qual corresponde à maioria das lesões medulares no homem. Não só as meninges, vasos sanguíneos e células remanescentes permanecem intactos mas toda descontinuidade física entre os segmentos rostral e caudal da lesão é evitada (Collins et al., 1986). Desta forma, pode-se diminuir a incidência de problemas associados com a lesão de vasos, tecido conjuntivo e estruturas que constituem a medula espinhal, favorecendo a

recuperação do tecido lesado. Este pode ser um meio de produzir modificação física tópica, em um espaço definido, evitando a constituição de uma barreira obstrutiva, podendo ser correlacionada a intensidade da lesão motora do animal com a lesão tecidual. Pontos importantes que podem ser investigados são (i) a vulnerabilidade do tecido ao congelamento dependendo da intensidade e, (ii) a evolução da recuperação dos animais após a lesão.

### **1.3. *CANNABIS SATIVA* E O SISTEMA CANABINÓIDE**

A planta *Cannabis sativa* (figura 1) conhecida popularmente como maconha é a droga ilícita mais consumida no mundo sendo seu consumo superado apenas pelo álcool e tabaco (Watson e cols., 2000). A maconha é muito utilizada por jovens principalmente na Europa, EUA e Austrália (Hall e cols., 2003).



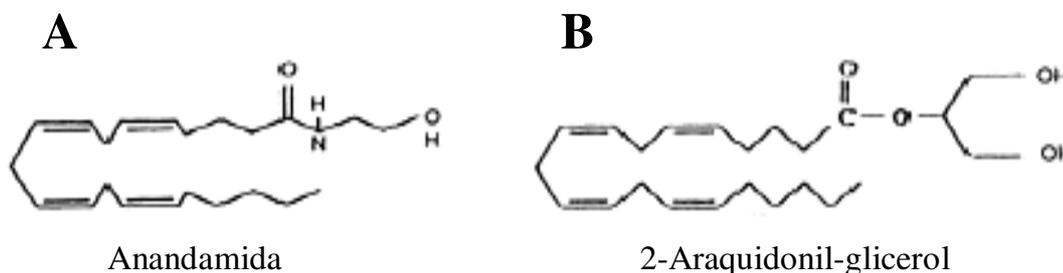
**Figura 1:** Arbusto da *Cannabis Sativa* (Maconha).

No Brasil, em apenas uma década, a prevalência de uso de maconha triplicou (Gauduroz e cols., 2004). Em um levantamento domiciliar feito na cidade de São Paulo com uma população de indivíduos maiores de 12 anos de idade, a maconha foi a droga ilícita mais frequentemente utilizada, seguida de longe pelos solventes e pela cocaína (Carlini e cols., 2002). Porém, a legalização para uso terapêutico tem sido alvo de discussões, devido ao seu potencial abuso e desenvolvimento de tolerância.

A *Cannabis sativa* possui mais de 400 componentes, sendo que aproximadamente 60 destes são componentes canabinóides, tendo como principal constituinte psicoativo o  $\Delta^9$  – Tetraidrocanabinol ( $\Delta^9$ -THC). Estes componentes canabinóides são lipofílicos e exercem seus efeitos centrais por se ligarem a receptores de membrana específicos. Vários processos neurobiológicos, tais como funções motoras e cognitivas, antinocicepção, sono e comportamento alimentar parecem ser modulados pelo sistema canabinóide endógeno, visto a distribuição anatômica de seus receptores e pelos efeitos farmacológicos conhecidos dos compostos relacionados aos canabinóides (Ameri, 1999; Fernandez-Ruiz e cols., 2000; Howlet e cols., 2002; Pertwee, 2001; Fride 2004). Outros estudos apontam também os canabinóides endógenos como moduladores do processo de desenvolvimento embrionário do encéfalo (Fernandez-Ruiz e cols., 2000; Ramos e cols., 2002; Leonelli e cols., 2005), propriedades neuroprotetoras em diversos modelos de neurotoxicidade (Grundy e cols., 2001; Mato e cols., 2003) e como mediador de processos de plasticidade em diversas estruturas do sistema nervoso central (Tagliaferro e cols., 2006; Hashimoto-dani e cols., 2007).

### 1.3.1. Endocanabinóides

Na década de 1990 foram identificados os ligantes endógenos para os receptores canabinóides, os chamados endocanabinóides. Sendo os principais identificados, até o momento, o araquidonil-etanolamida, também denominado anandamida (figura 2A), o 2-araquidonil-glicerol (2-AG – figura 2B), e por fim, um éter do ácido araquidônico, o 2-araquidonoil-glicerol-éter (Mechoulam e cols., 1998). As concentrações do tipo de endocanabinóides no tecido nervoso são diferentes. A concentração de 2-AG é, aproximadamente, 200 vezes maior que a de anandamida, porém, a distribuição deles no encéfalo é bastante parecida, pois ambos existem em maiores concentrações no tronco encefálico, estriado e hipocampo, e em menores concentrações no córtex, diencéfalo e cerebelo (Fride, 2002).



**Figura 2:** A – Estrutura da Anandamida; B – Estrutura do 2-Araquidonil-glicerol (2-AG).

Os endocanabinóides anandamida e 2-AG são derivados do ácido graxo  $\omega$ 6-polinsaturado proveniente da dieta, da qual deriva de outros ácidos graxos essenciais. O precursor da anandamida é N-araquidonilfosfatidiletanolamina (N-ArPE) que é formada através da ação da N-aciltransferase (NAT), uma enzima cálcio dependente. A N-ArPE é clivada pela N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE)-fosfolipase D específica (NAPE-PLD), originando anandamida e ácido fosfatídico. A síntese do 2-AG é iniciada pelo cálcio intracelular que induz a formação de

diacilglicerol (DAG) na membrana através da estimulação da via fosfatidil-inositol-fosfolipase (PI-PLC). O 2-AG é produto da DAG-lipase (DAGL) agindo na DAG (Di Marzo e Matias, 2005; Basavarajappa, 2007).

A maioria dos endocanabinóides é liberados por neurônios pós-sinápticos após estimulação e agem nos respectivos receptores de neurônios pré-sinápticos. Para inativação dos endocanabinóides, existe uma molécula transportadora de membrana, o transportador de anandamida da membrana celular (AMT), que a leva para dentro das células para que ocorra a degradação enzimática intracelular pela enzima ácido graxo amina hidroxilase (FAAH; Fride, 2002). O 2-AG também é transportado para dentro da célula através da AMT depois sofre degradação enzimática pela monoacilglicerol lípase (MAG L) ou pela FAAH. Altas concentrações de FAAH e AMT são encontradas nas áreas do encéfalo que possuem uma grande densidade de receptores canabinóides do tipo 1, tais como hipocampo, cerebelo e córtex cerebral (Fride, 2002; Basavarajappa, 2007).

### **1.3.2. Receptores Canabinóides**

Até o final da década de 1980, o mecanismo de ação dos canabinóides era ainda bastante obscuro. Nesta época, receptores específicos para os canabinóides foram identificados e clonados no cérebro de mamíferos. Pela ordem de descoberta, esses receptores foram denominados receptores canabinóides, do tipo 1 (CB1; Matsuda e cols., 1990) também conhecido anteriormente como o subtipo do sistema nervoso central, mas que também é encontrado em outras estruturas, tais como baço, pulmões e tonsila palatina, e em menor quantidade na glândula adrenal, útero, ovário, coração, testículos e nervos simpáticos e, tipo 2 (CB2; Munro e cols., 1993; Howlett e cols., 2002) que

era conhecido como subtipo periférico, que inicialmente foi encontrado apenas na periferia, em regiões marginais do baço, tonsila palatina, células hematopoéticas e sistema imune (Ameri, 1999). Posteriormente, os dois subtipos foram encontrados no SNC (Fowler e cols., 2001). Ambos são receptores pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrânicos, que ativada, por se tratar de uma proteína  $G_i$ , inibe a enzima adenilato ciclase e ativa proteínas quinases, aumentando a atividade de canais de potássio e inibindo canais de cálcio, modulando a liberação de outros neurotransmissores (Freud e cols., 2003).

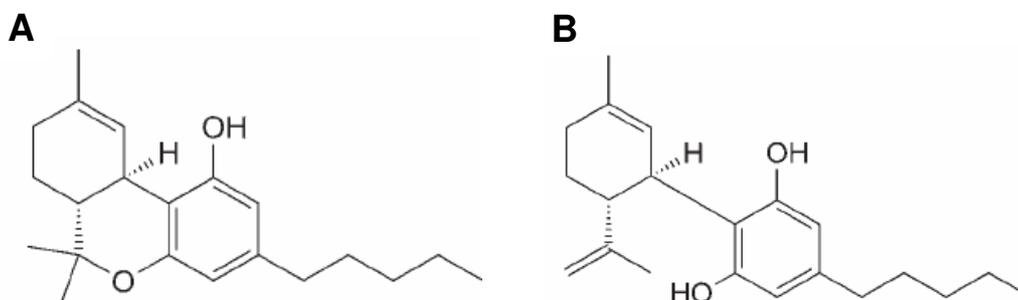
Estudos recentes demonstram que a anandamida, além de ser ligante dos receptores canabinóides CB1 e CB2, também é ligante de outros receptores como o receptor vanilóide 1 (VR1), canal de potássio TASK-1 e outros receptores não canabinóides acoplados a proteína G ainda não identificados (Szallasi e Di Marzo, 2000; Lutz, 2002; Di Marzo, 2005).

### **1.3.3. Canabinóides Exógenos**

Além dos canabinóides endógenos compostos exógenos como o  $\Delta^9$ -THC (figura 4A), também agem nos receptores canabinóides. Porém, existem diferenças farmacológicas entre os canabinóides exógenos e endógenos no SNC. Por exemplo, os efeitos da anandamida e do  $\Delta^9$ -THC são bastante similares, mas a anandamida possui uma ação *in vivo* mais curta quando comparada com o  $\Delta^9$ -THC, devido sua degradação enzimática rápida (Fride, 2002).

A influência do  $\Delta^9$ -THC no cérebro é complexa, dose-dependente e parece mediar o fenômeno ansiogênico, o que é compatível com o efeito de induzir em camundongos e ratos maior aversão aos braços abertos no teste do labirinto em

cruz elevado, similar ao produzido por agentes ansiogênicos (Onaivi e cols., 1990).



**Figura 3: A:** Estrutura do  $\Delta^9$  – Tetraidrocanabinol ( $\Delta^9$ -THC); **B:** estrutura do Canabidiol (CBD).

Outro componente da *Cannabis* representando aproximadamente 40% dos canabinóides encontrados na planta é o Canabidiol (CBD – figura 4B). O CBD que também apresenta atividade farmacológica é desprovido dos efeitos psicotrópicos típicos do  $\Delta^9$ -THC em humanos (Zuardi e cols., 1982). O CBD é um canabinóide com baixa ou nenhuma afinidade aos receptores CB1 e CB2 e, acredita-se que existam outros receptores ainda não identificados (Mishima e cols., 2005). Ao contrário do  $\Delta^9$ -THC, os alvos moleculares do CBD ainda não foram completamente elucidados; porém, alguns estudos mostram evidências de uma ação antagonista em receptores CB1 e CB2 (Petitet e cols., 1998;), agonista em receptores vanilóides (TRPV1), inibição do transporte e degradação do endocanabinóide anandamida (Bisogno e cols., 2001), inibição do transporte de adenosina (Carrier, Auchampach e hillard, 2006), bem como uma ação agonista em receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> (Russo e cols., 2005; Mishima e cols., 2005) e modulador alostérico de receptores  $\mu$  e delta opióides (Kathmann e cols., 2006).

Vários estudos demonstram que quando o CBD é administrado concomitante com o  $\Delta^9$ -THC, os efeitos deste último composto são antagonizados. Este antagonismo pode estar relacionado com as propriedades ansiolíticas do CBD (Zuardi e cols., 1982; Karniol e Carlini, 1973; Onaivi e cols., 1990; Guimarães e cols., 1990).

Além dos efeitos ansiolíticos produzidos pelo CBD, como já mencionado, outros estudos têm demonstrado efeitos anti-emético, anti-espasmódico, anti-náusea, anti-convulsivante, anti-inflamatório, anti-oxidativo e neuroprotetor (Mishima e cols., 2005).

Vários estudos têm demonstrado o CBD como potente neuroprotetor. Iuvone e cols (2004) demonstraram que o CBD promove inibição da proteína  $\beta$ -amilóide responsável por aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio na Doença de Alzheimer. Outro estudo desenvolvido por Garcia-Arencibia e cols. (2007) demonstrou que o CBD promovia aumento na produção de RNAm para a Cu/Zn-superóxido dismutase, diminuindo desta forma espécies reativas de oxigênio envolvidas na neurodegeneração da doença de Parkinson. Estudos demonstraram que o CBD promove uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias como o Interferon (IFN $\gamma$ ) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF $\alpha$ ), além da ativação de linfócitos T e macrófagos, em processos inflamatórios no SNC e outras regiões (Srivastava e cols., 1998; Braida e cols., 2003; Weiss e cols., 2006).

#### **1.3.4. Mecanismo de Ação dos Canabinóides**

Como já mencionado, de maneira geral, os canabinóides endógenos são liberados por neurônios pós-sinápticos e agem em receptores de neurônios pré-sinápticos. Quando os canabinóides se ligam aos receptores desencadeiam uma

série de mecanismos intracelulares característicos de receptores acoplados a proteína G<sub>i</sub>. Três eventos importantes são descritos 1) inibição da adenil ciclase, levando à uma diminuição dos níveis de AMPc intracelular e de proteínas quinases A; 2) estimulação de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase); 3) inibição de canais de cálcio dependente de voltagem do tipo N e P/Q, e estimulação de canais de potássio tipo A, o resultado é uma diminuição no influxo de cálcio, e um aumento no efluxo de potássio. Este processo promove uma redução da liberação de outros neurotransmissores como GABA (ácido gama-aminobutírico) e glutamato. Posteriormente, os canabinóides são levados para dentro da célula para serem degradados (Freund e cols., 2003; De Petrocellis e cols., 2004).

### **1.3.5. Neuroproteção e o Sistema Canabinóide**

Em diversos modelos experimentais o sistema canabinóide vem se mostrando um importante sistema para a neuroproteção. Vários estudos mostram a participação dos canabinóides endógenos e exógenos e dos receptores CB1 e CB2 nestes modelos (Srivastava e cols., 1998; Braida e cols., 2003; Mato e cols., 2003; Iuvone e cols., 2004; Mishima e cols., 2005; Gilbert e cols., 2007).

Alguns estudos têm demonstrado que o efeito neuroprotetor pode estar relacionado com a inibição da liberação sináptica de glutamato devido o fato do glutamato extracelular ser prejudicial em neurônios em cultura (Van Der Stelt e cols., 2002). Além disso, nesses estudos os efeitos de neuroproteção foram atenuados pelo SR141716A, um antagonista do receptor CB1 (Van Der Stelt e cols., 2002; Jackson e cols., 2005).

Panikashvili e colaboradores (2001) demonstraram um aumento significativo do 2-AG após lesão no encéfalo, mostrando um possível envolvimento deste no sistema de neuroproteção. Por outro lado, Hansen e cols, (2002) mostraram um aumento nos níveis do canabinóide endógeno anandamida e não do 2-AG, em lesões no encéfalo de ratos.

Portanto, receptores CB1 parecem ter papel importante na neuroproteção (Panikashvili e cols., 2001). Outros estudos apontam que os canabinóides agem na diminuição ou bloqueio da liberação de cálcio intracelular em concentrações neurotóxicas, sendo a neuroproteção baseada na diminuição da atividade da proteína quinase A dependente de AMPc, mediada por receptores CB1. Porém, existe controvérsia com relação à estas evidências pois estudos realizados em cultura de células mostraram que a ativação dos receptores CB1 não possui efeito neuroprotetor (Marsicano e cols., 2002).

Outro estudo demonstrou efeito neuroprotetor do CBD (canabinóide exógeno) em infarto cerebral após oclusão da artéria cerebral média de camundongos, sugerindo participação do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, visto que a utilização do antagonista para este receptor inibia o efeito neuroprotetor do CBD, o que não acontecia com a inibição dos receptores CB1 (Mishima e cols., 2005).

Apesar de trabalhos recentes defenderem os efeitos protetores dos canabinóides exógenos e endógenos em modelos experimentais de lesões do SNC e neurotoxicidade, os mecanismos exatos pelos quais estes processos ocorrem ainda não são muito conhecidos (Marsicano e cols., 2002).

De acordo com o exposto nossa hipótese é que o tratamento sub-crônico com canabidiol promove neuroproteção na lesão medular de ratos produzida pela aplicação de jato de nitrogênio líquido.

## Objetivos

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Analisar a lesão medular de ratos produzida por criogenia pela aplicação local de um jato de nitrogênio líquido. Avaliar o efeito do tratamento com Canabidiol neste modelo de lesão.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**1-** Analisar o comportamento sensório-motor dos animais nos períodos pré-teste, 1, 3 e 7 dias após o procedimento experimental, utilizando: o teste de retirada de cauda (Tail Flick) e a escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB);

**2-** Analisar as modificações teciduais na medula espinhal a médio prazo (7 dias), após lesão por meio de jato de nitrogênio líquido, utilizando a coloração de HE e a imunohistoquímica para Neu-N e Fos-b. A extensão da lesão e a porcentagem de tecido preservado foram estimadas utilizando-se a coloração de hematoxilina-eosina e a imunohistoquímica para Neu-N;

**3-** Analisar o efeito do tratamento sub-crônico com canabidiol na lesão medular de ratos produzida pela aplicação de jato de nitrogênio líquido analisando o comportamento sensório-motor e a atividade da proteína Fos-b na medula espinhal.

## Material e Métodos

---

### **3. MATERIAL**

#### **3.1. EQUIPAMENTOS**

**Balanças:** Os animais foram pesados em uma balança da marca Gehaka<sup>®</sup>, modelo BG1000, com divisão de 0,01g, e as drogas em uma balança da marca Scientech<sup>®</sup>, modelo SA210, com divisão de 0,0001g.

**Estereomicroscópio.** Os procedimentos cirúrgicos bem como as fotografias do ato cirúrgico, foram feitos por meio do auxílio de um estereomicroscópio Leica<sup>®</sup>, modelo M651, com as objetivas de 10X, 16X e 40X, com uma câmera fotográfica Olympus, modelo DP11, acoplada a ele.

**Aparelho para criocirurgia:** A criolesão foi realizada com o auxílio de um aparelho portátil, da marca CRY-AC<sup>®</sup> do Brasil, para criocirurgia com nitrogênio líquido. O nitrogênio era armazenado sob pressão de até 12 psi em uma garrafa de aço inox de 500ml, com duplo revestimento. Acoplado à tampa da garrafa há uma válvula de pressão que permite controlar, manualmente, a saída do jato de nitrogênio líquido. Uma ponteira de metal com diâmetro de orifício de 0,40mm foi parafusada à válvula de pressão para aplicação do líquido na medula dos animais.

**Criostato.** As medulas espinhais foram seccionadas (20 micrômetros) em um criostato da marca Leica<sup>®</sup>, modelo CM1850.

**Microscópios.** Os cortes histológicos foram analisados em microscópio óptico da marca Leica<sup>®</sup>, modelo DMRB.

**Analisador de imagens.** Para a análise de células positivamente marcadas nas regiões de interesse da medula espinhal o tecido foi corado pela técnica histoquímica de hematoxilina-eosina (HE) e imunohistoquímica para proteína nuclear neuronal (NeuN) e proteína Fos-b (Fos-b). As lâminas foram analisadas em um microscópio que possuía uma câmera de captura de imagem em tempo real da marca Olympus, modelo DP11. A câmera estava conectada a um sistema de edição e de transferência de imagem, conectado a um monitor colorido de vídeo Samsung®, modelo SyncMaster 700b, para visualização da imagem analisada. O sistema de edição e transferência de imagem era conectado a um computador Power Macintosh® 9600 de 233 Mhz, o qual possui um monitor de 20” de alta resolução (1240x1240 dpi).

O “software” utilizado, para a análise das imagens, foi o “NIH Image” (versão 1.60) desenvolvido pelo “U.S. National Institutes of Health” de domínio público e disponível na Internet no endereço <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.

**Digitalizador de imagens.** As imagens foram capturadas e processadas no aplicativo Nikon View 6.0 e Adobe® Photoshop CS2.

### **3.2. OUTROS EQUIPAMENTOS**

- agitador eletrônico com aquecimento da marca Barnstead/Thermolyne®, modelo Nuova SP18425;
- agitador/incubadora orbital da marca Amerex Instruments, Inc., modelo Gyromax™ 703R;

- banho-Maria da marca Precision Scientific<sup>®</sup>, modelo “shallow form shaking bath”, nº de categoria: 66799;

- bidestilador e deionizador da marca Sheldon Manufacturing<sup>®</sup>, Inc., modelo Fistreem<sup>™</sup> III e sistema de estocagem de água destilada, modelo A56290-857;

- estufa da marca Sheldon Manufacturing<sup>®</sup>, Inc., modelo 1500E;

- *freezer* –20° C da marca Brastemp<sup>®</sup>, modelo Clean 280;

- *freezer* –70° C da marca So-Low Environmental Equipment<sup>®</sup>, modelo U85-22;

- mesa agitadora da marca Tecnal<sup>®</sup>, modelo TE – 141, orbital;

- refrigerador da marca Brastemp<sup>®</sup>, modelo Clean 340.

- Ultra-som, com aquecimento, da marca Unique<sup>®</sup>, modelo Maxiclean 1400A.

#### 4. MÉTODOS

**Animais:** Foram utilizados ratos *Wistar* machos (280g – 300g) do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, USP. Os ratos foram alojados em grupos de 3-4 por gaiola, com livre acesso a água e ração, com temperatura controlada ( $24\pm 1^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 x 12 horas, sendo o início do período de claro às 7:00 horas. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências para cuidado e uso de animais de laboratório, baseado no “*National Institute of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals* (<http://links.jstor.org>)” e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal “COBEA” (<http://www.cobea.org.br>), protocolo nº 011/2007.

Os animais foram previamente pesados, identificados e numerados através de um código de marcas em suas caudas; o desenvolvimento dos animais foi acompanhado por meio de pesagens diárias. No total foram utilizados 44 ratos, durante toda a pesquisa.

**Anestesia:** Previamente ao procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com uma associação de Cloridrato de Cetamina e Xilazina, nas doses de 100mg/kg e 14mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal (i.p). Para a retirada dos tecidos para análise histológica, foi utilizado o anestésico Uretana 37,5% i.p. na dose de 1,5g/kg (volume 4ml/Kg).

**Lesão da Medula Espinhal por Criogenia:** Foi realizada a tricotomia da região dorsal torácica e uma pequena incisão ( $\pm 2\text{cm}$ ) na linha média do animal, na região correspondente à coluna torácica inferior. A musculatura foi divulsionada expondo-se as vértebras T8 – T12, que foram identificadas pela palpação dos

processos espinhosos. Em seguida a lâmina posterior da vértebra T10 foi cuidadosamente retirada (figura 4A). Após a laminectomia foi feita a aplicação do jato de nitrogênio líquido para a realização da criolesão com o auxílio de um aparelho portátil, da marca CRY-AC<sup>®</sup> do Brasil, específico para criocirurgia com nitrogênio líquido. Uma ponteira de metal com diâmetro de orifício de 0,40 milímetros, do tipo *Bent Spray*, foi parafusada à válvula de pressão para aplicação do líquido na medula dos animais. O jato de nitrogênio líquido foi aplicado a uma distância de, aproximadamente, 2 milímetros durante 05 segundos, diretamente na medula espinhal dos animais, para realização da criolesão (Figuras 4B e C; 5 e 6). Após a lesão a musculatura e pele foram suturadas separadamente.

#### **4.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS**

**4.1.1. Grupo controle** (n=04): Os animais deste grupo não sofreram procedimento cirúrgico sendo porém submetidos aos testes comportamentais e histológicos.

**4.1.2. Grupo laminectomia** (n=08): Neste grupo, após a anestesia de cada animal foi realizada a tricotomia da região dorsal torácica e uma pequena incisão ( $\pm$  2cm) na linha média do animal, na região correspondente à coluna torácica inferior. A musculatura foi então divulsionada expondo-se assim as vértebras T8 – T12 que foram identificadas pela palpação dos processos espinhosos. A seguir a lâmina posterior da vértebra T10 foi cuidadosamente retirada com o auxílio de uma lupa cirúrgica (figura 4A). Após a laminectomia a musculatura e a pele foram suturadas separadamente.

**4.1.3. Grupo lesão + veículo (n=08):** Neste grupo, após a laminectomia foi realizada a aplicação do nitrogênio líquido, durante 05 segundos, diretamente na medula espinhal, para realização da criolesão (figura 4B e C). Estes animais receberam, imediatamente antes ao procedimento cirúrgico, 3 horas após e durante 6 dias, injeções (i.p.) do veículo utilizado para a diluição do canabidiol (10% de propileno glicol, 1% de tween 80 e 89% de salina 0,9%, para um volume total de 1ml/kg).

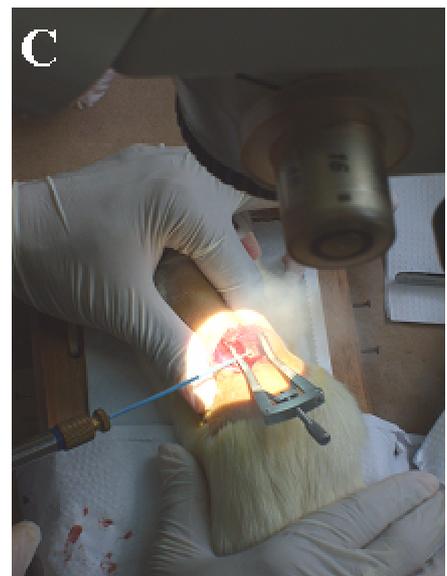
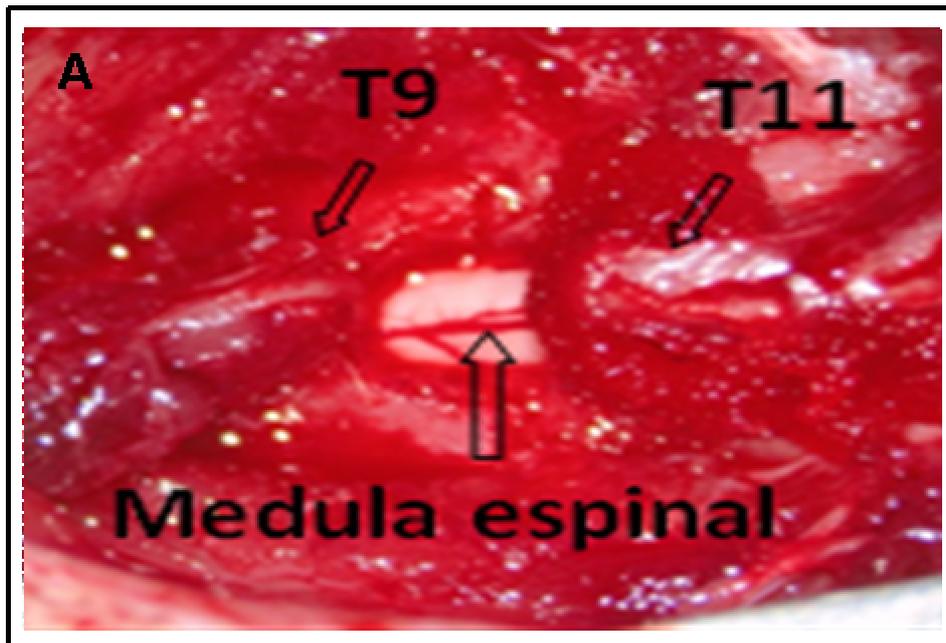
**4.1.4. Grupo lesão + canabidiol 10mg/kg (n=05):** Nos animais deste grupo foi realizado o mesmo procedimento do grupo lesão + veículo, sendo que estes animais, imediatamente antes ao procedimento cirúrgico, 3 horas após e durante 6 dias, receberam injeções (i.p.) de canabidiol na dose de 10mg/kg.

**4.1.5. Grupo lesão + canabidiol 20mg/kg (n=08):** Nos animais deste grupo, foi realizado o mesmo procedimento do grupo lesão + veículo sendo que estes animais, imediatamente antes ao procedimento cirúrgico, 3 horas após e durante 6 dias, receberam injeções (i.p.) de canabidiol na dose de 20mg/kg.

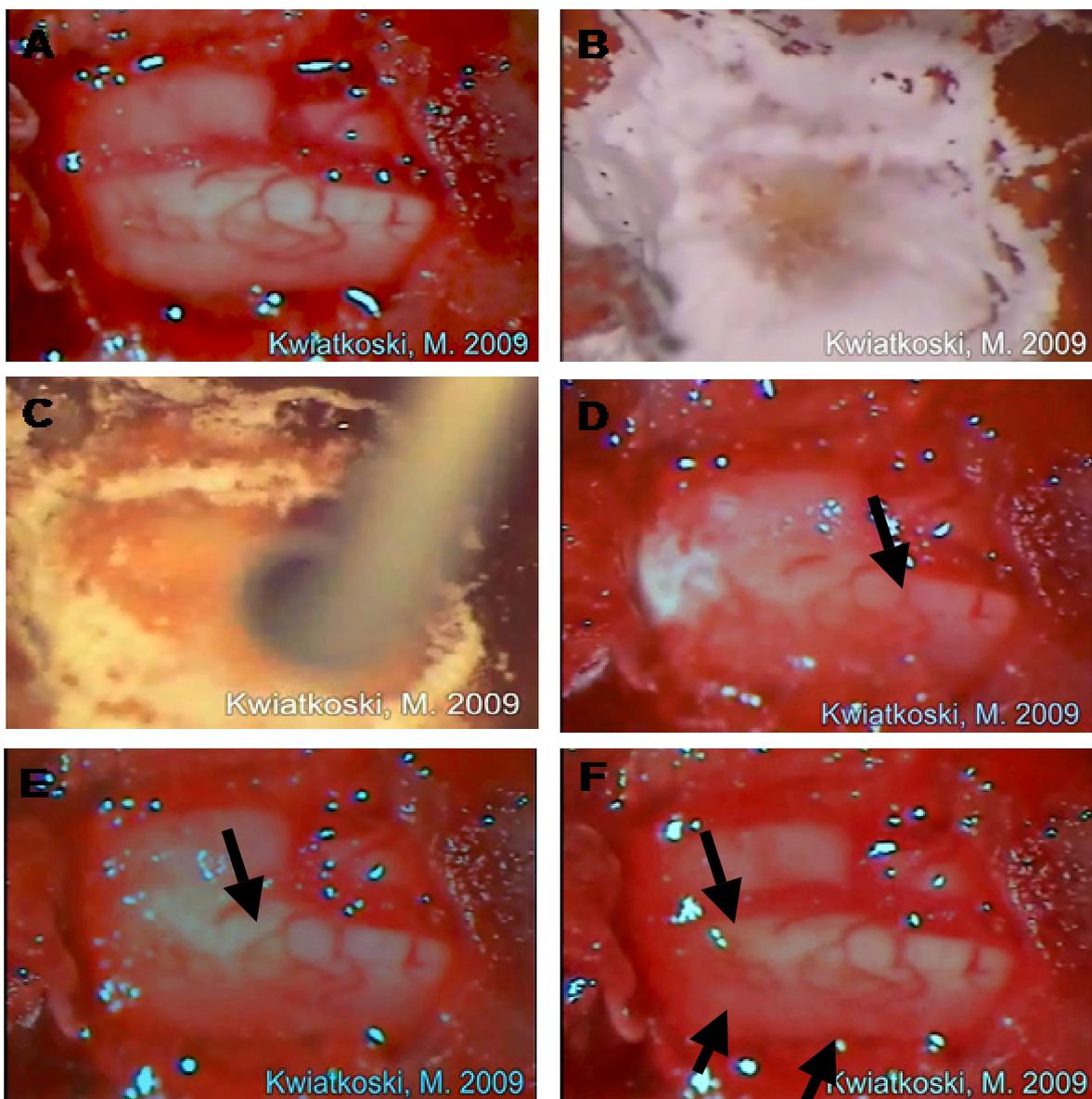
## **4.2. CUIDADOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS**

Dois dias antes e um dia após a cirurgia foi aplicada uma dose de pentabiótico (24000 UI das penicilinas estreptomicina e diidroestreptomicina Forte Dodge®; volume, 0,1ml/100g de peso do animal). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam por via subcutânea, solução salina a 0,9% (volume, 1 ml/kg), administrada em 2 aplicações, sendo a primeira logo ao término da cirurgia e a última após 3 horas”; e injeção subcutânea do analgésico “Flunixin

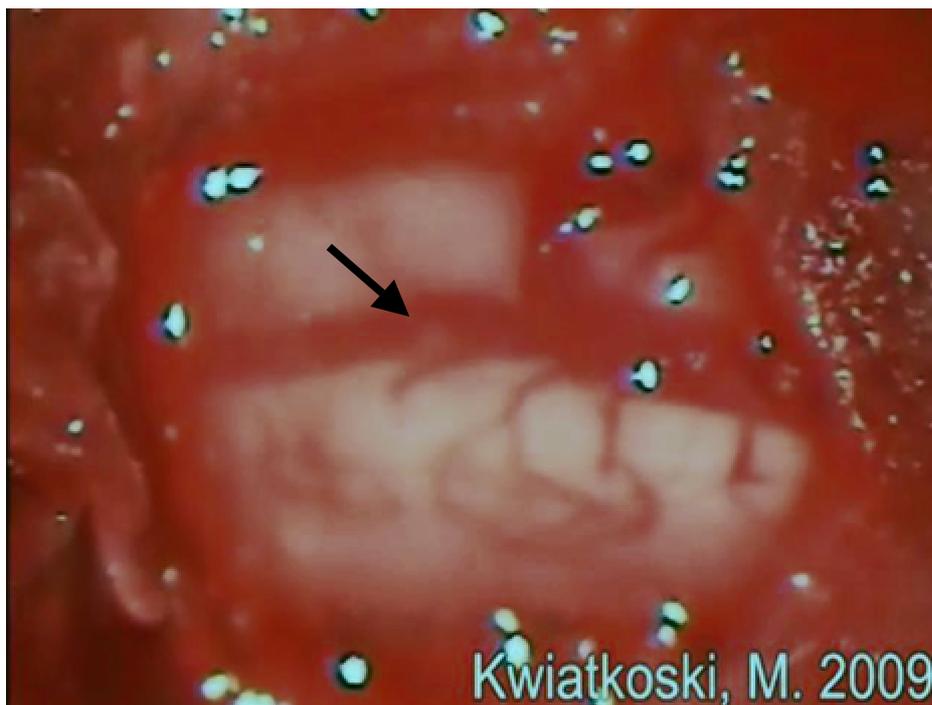
Meglumine (Banamine)”, na dose de 2,5mg/kg. Após os procedimentos os animais foram colocados em uma caixa aquecida e forrada com maravalha e, observados por algumas horas, até a completa recuperação da anestesia. Nos dias seguintes, os animais foram manipulados diariamente com massagem abdominal, para facilitar a eliminação de fezes; e esvaziamento de bexiga, duas a três vezes por dia, até que recuperassem o controle voluntário. Os animais eram inspecionados diariamente à procura de sinais de autotomia e infecções.



**Figura 4:** **A** - Fotografia ilustrativa do procedimento cirúrgico e laminectomia da décima vértebra torácica para exposição da medula espinhal. T9 e T11 – Nona e décima primeira vértebra torácica, respectivamente. **B** – Fotografia ilustrativa do procedimento cirúrgico e aparelho utilizado para criolesão. **C** – Fotografia ilustrativa do posicionamento e estabilização do animal no momento da aplicação de Nitrogênio líquido para realização da lesão medular.



**Figura 5:** Fotografias ilustrativas do momento da aplicação do jato de Nitrogênio líquido para a criolesão. **A** – Momento antes da aplicação do nitrogênio líquido, notar os grandes e pequenos vasos; **B** – Momento da aplicação do nitrogênio líquido; **C** – Imediatamente após a aplicação do nitrogênio líquido, demonstrando o congelamento do parênquima medular e regiões adjacentes; **D** – Descongelamento do parênquima medular e início da reperfusão tecidual; **E** – Progressão da reperfusão tecidual; e **F** – Reperfusão tecidual restabelecida. Notar em **D**, **E** e **F** (setas) a preservação do parênquima medular, meninges e vasos sanguíneos após o congelamento.



**Figura 6:** Fotografia ilustrativa após a lesão medular induzida por jato de nitrogênio líquido, mostrando a presença de trombos.

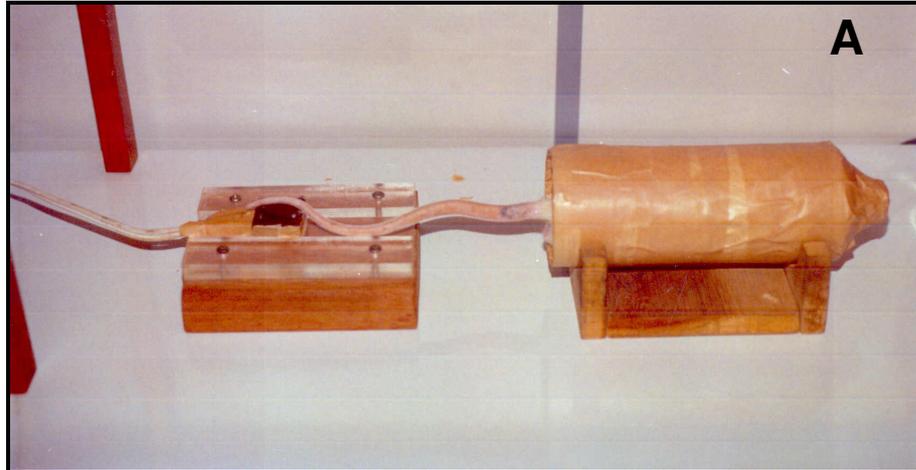
### **4.3. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS ANIMAIS**

A avaliação sensório-motora dos animais foi realizada por meio do teste de retirada da cauda (Tail Flick - D'amour e SMITH, 1941) e do comportamento locomotor, utilizando a escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan - BBB (1995). Os testes de comportamento foram feitos no pré-teste, 1, 3 e 7 dias após o procedimento experimental, sempre no mesmo horário e local, como descritos a seguir:

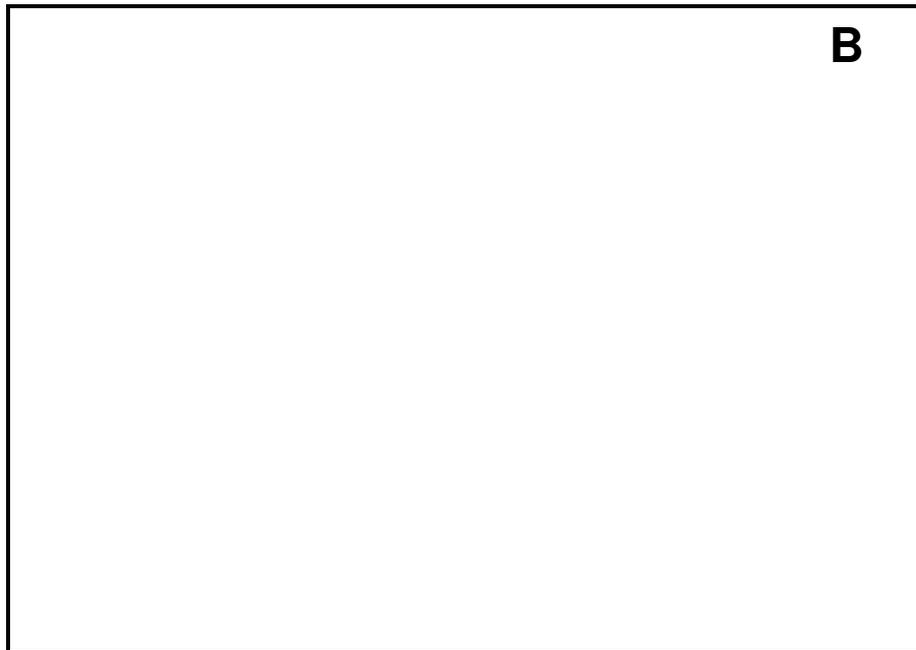
#### **4.3.1. Teste de Retirada da Cauda**

O teste de retirada da cauda foi realizado segundo o método descrito por D'Amour e Smith (1941). Neste teste o tempo de latência para a retirada da cauda de uma superfície aquecida é medido. Para a realização do teste, cada

animal era gentilmente imobilizado e sua cauda colocada sobre uma espiral de fio de níquel-cromo de 0,3mm de diâmetro, aquecida pela passagem de uma corrente elétrica (figura 7). A taxa de aquecimento da espiral de níquel cromo pela passagem da corrente elétrica foi padronizada em 9°C/s. Um pequeno ajuste da corrente foi ainda feito, no início do experimento, para que a latência de retirada da cauda ficasse entre 2,5 e 3,5 segundos, em três medidas consecutivas (Giglio e cols., 2006). Um tempo máximo de corte de 6 segundos foi estipulado, sendo então o aquecimento interrompido para evitar a ocorrência de lesão tecidual da cauda do animal. A média de três medidas, tomadas em intervalos de 5 minutos, foi utilizada como a latência para a retirada da cauda de cada animal, em cada tempo analisado.



SCHIAVETO DE SOUZA, 2004



SCHIAVETO DE SOUZA, 2004

**Figura 7:** Aparelho utilizado para a realização do teste de retirada da cauda. A) Visão geral do tubo plástico onde o rato é acomodado e do suporte onde a espiral de níquel-cromo está acoplada. B) Detalhe da cauda do rato colocada sobre a espiral de níquel-cromo.

#### **4.3.2. Escala de Avaliação Locomotora BBB**

Os animais também foram avaliados pela escala de avaliação locomotora BBB (Basso e cols., 1995). Esta escala tem por objetivo avaliar a evolução da recuperação funcional e motora dos animais através da observação de alguns parâmetros comportamentais, enquanto o animal se locomove livremente, durante 4 minutos, em um aparato utilizado para o teste do campo aberto. Essa avaliação leva em consideração o movimento do membro, o posicionamento da pata, o tipo de passo, a coordenação das passadas, a abertura dos dedos, a posição predominante da pata em relação ao corpo, a estabilidade do tronco e o posicionamento da cauda. Os parâmetros colhidos em cada teste eram anotados em tabelas individuais (figura 8) e posteriormente classificados por meio de uma escala que varia de 0 a 21 pontos (tabela 1), refletindo as condições locomotoras do animal, onde o escore 0 representa plegia do membro, enquanto que o escore 21 representa a atividade locomotora normal daquele membro. Pontuações entre 0 e 7 indicam o retorno de movimentos isolados de até três articulações (quadril, joelho e tornozelo). Pontuações entre 8 e 13 indicam o retorno dos passos plantares e coordenação dos movimentos entre patas posteriores e anteriores. Por fim, pontuações entre 14 e 21 mostram o retorno da abertura dos dedos durante a passada, posição predominante da pata em paralelo ao tronco, estabilidade de tronco e levantamento da cauda. Foi realizada uma análise cega sempre pelo mesmo examinador.

**Escala de classificação, de 21 pontos, de BASSO, BEATTIE e BRESNAHAN (BBB)**

- (00) - Nenhum movimento do membro posterior;
- (01) - Movimento discreto de uma ou duas articulações, usualmente o quadril e/ou joelho;
- (02) - Movimento amplo de uma articulação, ou movimento amplo de uma articulação e movimento discreto de outra articulação;
- (03) - Movimento amplo de duas articulações;
- (04) - Movimento discreto das três articulações do membro posterior;
- (05) - Movimento discreto de duas articulações e movimento amplo da terceira;
- (06) - Movimento amplo de duas articulações e movimento discreto da terceira;
- (07) - Movimento amplo das três articulações do membro posterior;
- (08) - Movimento em “varredura” do membro posterior para se realizar o passo, ou posicionamento plantar da pata, ambos sem sustentação de peso;
- (09) - Posicionamento plantar da pata com sustentação do peso do corpo, na posição estática somente, ou passos dorsais com sustentação de peso ocasional, freqüente, ou constante e sem passos plantares;
- (10) - Passos plantares ocasionais, com sustentação de peso, mas sem coordenação entre o membro anterior e posterior;
- (11) - Passos plantares com sustentação de peso, de freqüentes a constantes e sem coordenação entre o membro anterior e o posterior;
- (12) - Passos plantares com sustentação de peso, de freqüentes a constantes e coordenação ocasional entre o membro anterior e o posterior;
- (13) - Passos plantares com sustentação de peso, de freqüentes a constantes e coordenação freqüente entre o membro anterior e o posterior;
- (14) - Passos plantares com sustentação de peso constante, com coordenação constante entre o membro anterior e o posterior; posição da pata predominantemente rodada (externamente ou internamente) durante a locomoção, quando é feito o contato inicial com a superfície, bem como, justamente antes que ela seja levantada ao final da fase de apoio, ou passos plantares freqüentes, coordenação constante entre o membro anterior e o posterior, e passos dorsais ocasionais;
- (15) - Passos plantares e coordenação constantes entre o membro anterior e o posterior; sem abertura dos dedos, ou abertura ocasional dos dedos, durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao corpo no contato inicial;
- (16) - Passos plantares e coordenação constantes entre o membro anterior e o posterior, durante o andar; a abertura dos dedos ocorre freqüentemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial, e rodada ao ser levantada;
- (17) - Passos plantares e coordenação constantes entre o membro anterior e o posterior, durante o andar; a abertura dos dedos ocorre freqüentemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e ao ser levantada;
- (18) - Passos plantares e coordenação constantes entre o membro anterior e o posterior, durante o andar; a abertura dos dedos ocorre constantemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e rodada ao ser levantada;
- (19) - Passos plantares e coordenação constantes entre o membro anterior e o posterior, durante o andar; a abertura dos dedos ocorre constantemente durante o avanço do membro para frente; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e ao ser levantada; cauda está abaixada durante parte ou durante todo o tempo;
- (20) - Passos plantares constantes e andar constantemente coordenada; constante abertura dos dedos; a posição da pata é predominantemente paralela ao contato inicial e ao ser levantada; cauda constantemente erguida e tronco instável;
- (21) - Passos plantares constantes e andar coordenado; constante abertura dos dedos; a posição da pata é predominantemente paralela em todas as posições; estabilidade do tronco constante e cauda constantemente erguida.

**Tabela 1:** Escala de Avaliação Locomotora desenvolvida por Basso e cols., 1995, utilizada para a avaliação locomotora de ratos que sofreram lesão medular.

Rato # _____ Data: ____/____/____																						
TRC: ____/____/____						DPO: _____						Score D _____ E _____										
Movimento do membro						Posicionamento da pata				Passo				Coordenação	Abertura dedos		Posição predominante da pata				Instabilidade de tronco	Cauda
Coxa		Joelho		Tornoz.		Varredura	Suporte plantar		Dorsal		Plantar		Inicial				Final					
D	E	D	E	D	E		s/	c/	D	E	D	E	D		E	D	E					
∅	∅	∅	∅	∅	∅	D	D	D	N	N	N	N	N	N	N	I	I	I	I			
Di	Di	Di	Di	Di	Di	E	E	Es Mo	O	O	O	O	O	O	O	Ex	Ex	Ex	Ex			
A	A	A	A	A	A	E	E	E	F	F	F*	F*	F	F	F*	F*	P	P	P	P		
∅ - s/ movimento						D - direito				N - nunca (0%)				I - interna								
Di - movim. discreto						E - esquerdo				O - ocasional (≤ 50%)				Ex - externa								
A - movim. amplo						Es - estacionário				F - frequente (51-94%)				P - paralela								
						Mo - movimento				C - consistente (95-100%)				* mais que 4 repetições								

**Figura 8:** Modelo da folha de pontuação da escala BBB, para anotação dos dados observados durante a realização do teste de avaliação locomotora dos animais (segundo Basso e cols., 1995, modificado de Schiaveto de Souza, 2004).

#### **4.4. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS, PERFUSÃO, RETIRADA DAS MEDULAS ESPINHAIS E CONSERVAÇÃO DO TECIDO NERVOSO**

Em nosso experimento, no sétimo dia, cada rato foi anestesiado com uretana, na dose de 1,5g/kg, sendo a seguir submetidos à perfusão intracardíaca. A perfusão teve por objetivo a “lavagem” do sistema circulatório e a pré-fixação tecidual do animal. Isso foi realizado através da infusão de 300 mL de solução fosfato salina tamponada (PBS) a 0,01M, pH 7,4, seguida de 450mL de paraformaldeído (PFA) 4% em PB 0,1M, pH 7,4, onde o líquido foi empurrado com pressão e fluxo semelhantes aos valores fisiológicos do animal.

Ao término da perfusão, a região dorsal do rato foi dissecada e os processos espinhosos e transversos das vértebras retirados expondo-se a medula espinhal, a qual foi retirada cuidadosamente, após a secção das raízes nervosas bilateralmente. A medula foi fixada a um palito de madeira, para manter a posição anatômica e colocada em uma solução de PFA 4%, pH 7,4 por 2 horas para pós-fixação, seguida de solução de sacarose tamponada 30% por 18 horas (4 °C) para crioproteção dos tecidos. Decorridas 18 horas, as amostras foram mergulhadas em meio de inclusão para tecido congelado (Tissue-Tek®), congelados em gelo seco e mantidos em freezer à -70 °C para posterior análise.

#### **4.5. OBTENÇÃO DAS SECÇÕES DA MEDULA ESPINHAL**

Após o processo de conservação, a medula espinhal de cada animal foi seccionada em criostato, em secções de 20 µm de espessura, no sentido rostro-caudal, a uma temperatura de -20°C. Os cortes foram colhidos diretamente em lâminas para microscópio previamente gelatinizadas. Foram colhidos 3 conjuntos de 6 lâminas de cada medula espinal contendo aproximadamente 30 cortes em

cada uma. As secções foram colhidas de forma serial. Foi colocada uma secção em cada uma das seis lâminas do conjunto e descartadas seis secções. Em seguida, foi colocada outra secção em cada lâmina, ao lado daquela já colhida e assim, sucessivamente. Após o preenchimento de um conjunto, um novo conjunto foi iniciado. Desta forma, o primeiro conjunto recebeu os cortes rostrais à lesão, o segundo, o centro da lesão e o terceiro a região caudal à lesão. Após a coleta dos cortes, as lâminas foram mantidas em caixas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o dia do ensaio.

#### **4.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA**

As modificações histológicas decorrentes da lesão medular por criogenia e do tratamento sub-crônico com canabidiol foram analisadas por meio da coloração de HE (Emery e cols., 1998; Wada e cols., 1999) e pela imunohistoquímica para proteína nuclear neuronal (Neu-N) e proteína Fos-b (Fos-b). As modificações foram avaliadas 7 dias após o procedimento experimental.

##### **4.6.1. Coloração Hematoxilina-eosina**

A análise das secções coradas com HE permitiu uma visualização mais precisa das secções auxiliando a escolha das secções a serem incluídas nos ensaios imunohistoquímicos e foi utilizada para análise do tecido lesado.

Nesta coloração, a hematoxilina, age como corante natural, por meio de seu produto de oxidação, a hemateína. A oxidação química produz-se pelo uso de iodato de potássio ou óxido de mercúrio. Para corar o tecido, a hemateína necessita de um mordente (sais de alumínio, ferro, cromo, cobre ou tungstênio), prévio ou incorporado na própria solução de hematoxilina. Convencionalmente,

para que seja dado o contraste à coloração é usada uma solução de eosina logo após a aplicação de hematoxilina. Como resultado dessa coloração, os núcleos são corados em azul (hematoxilina), enquanto o citoplasma e a maioria dos outros tecidos ficam corados de rosado a vermelho (eosina).

A técnica da coloração consistiu em deixar as secções de tecido em contato com a hematoxilina de Harris por 90 segundos, lavar em água corrente por 5 minutos, colocar para azular, na solução de água amoniacal, por 15 segundos, lavar em água corrente por 5 minutos e corar com a solução de Eosina por 30 segundos. A seguir as lâminas passavam por uma bateria de álcoois em concentração crescente, uma mistura de álcool e xilol e xilol puro (3 minutos cada) para então serem montadas com *Entellan*.

#### **4.6.2. Imunohistoquímica para Proteína Nuclear Neuronal (Neu-N)**

O objetivo desta técnica foi observar a presença da proteína nuclear neuronal (Neu-N). A imunohistoquímica é um método usado para o estudo de proteínas mantendo-se seu contexto anatômico. Para tanto foram utilizados anticorpos específicos dirigidos aos antígenos de interesse. Primeiramente foi realizado a recuperação antigênica pelo aquecimento das secções durante 30 minutos em solução de tampão citrato, pH 6.0 em banho Maria a 90°C. Posteriormente foi realizado o arrefecimento das lâminas durante pelo menos 1 hora até alcançarem a temperatura ambiente. Seguiu-se: 1) lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS 0,1M, pH 7,4 contendo 0,15% de Triton X-100 (PBST - Ginestet e cols., 2007) para, por meio de sua atividade detergente, tornar a membrana celular permeável, melhorando o acesso do anticorpo ao antígeno;

2) bloqueio da atividade peroxidase endógena por meio da incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% em PBST, contendo também metanol 20%, durante 30 minutos; 3) lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em PBST; 4) bloqueio dos sítios inespecíficos com soro albumina bovina 2% (BSA - NGS, Jackson Immuno Research, E.U.A) em PBST contendo soro de cabra 5% durante 1 hora em temperatura ambiente; 5) lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em PBST; 6) incubação com anticorpo primário: as secções foram incubadas durante 18 horas com um anticorpo produzido em camundongo, específico para Neu-N (1:200000; mouse polyclonal IgG - Chemicon<sup>®</sup>). O anticorpo foi diluído em PBST contendo timerosal 0,02%; 7) lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em PBST para eliminar o excesso de anticorpo e aqueles ligados inespecificamente; 8) incubação com anticorpo secundário: para aumentar a visualização da ligação foi empregada a revelação com marcadores enzimáticos ou método de marcação indireta onde, o anticorpo secundário carrega um marcador, nesse caso, a biotina. O anticorpo secundário (1:400; goat anti-mouse IgG) marcado com biotina foi diluído em PBST e dirige-se contra a região constante do anticorpo primário que funciona como antígeno. A incubação foi feita durante 1 hora; 9) lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em PBST; 10) incubação das secções durante 2 horas com o complexo avidina - peroxidase biotinilada (solução A e B, Kit ABC, Vectastain, Vector Laboratories<sup>®</sup>), onde a avidina se liga às moléculas de biotina do anticorpo secundário. Esta solução foi preparada 1 hora antes para permitir a formação do complexo; 11) lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em PBST; 12) lavagem das secções 1 vez durante 5 minutos, em TB 0,25M, pH 7,4; 13) após o enxágüe, a atividade da enzima peroxidase foi revelada por adição do cromógeno tetrahidrocloreto de 3,3 diamino-benzidina 10mg (DAB, Sigma)

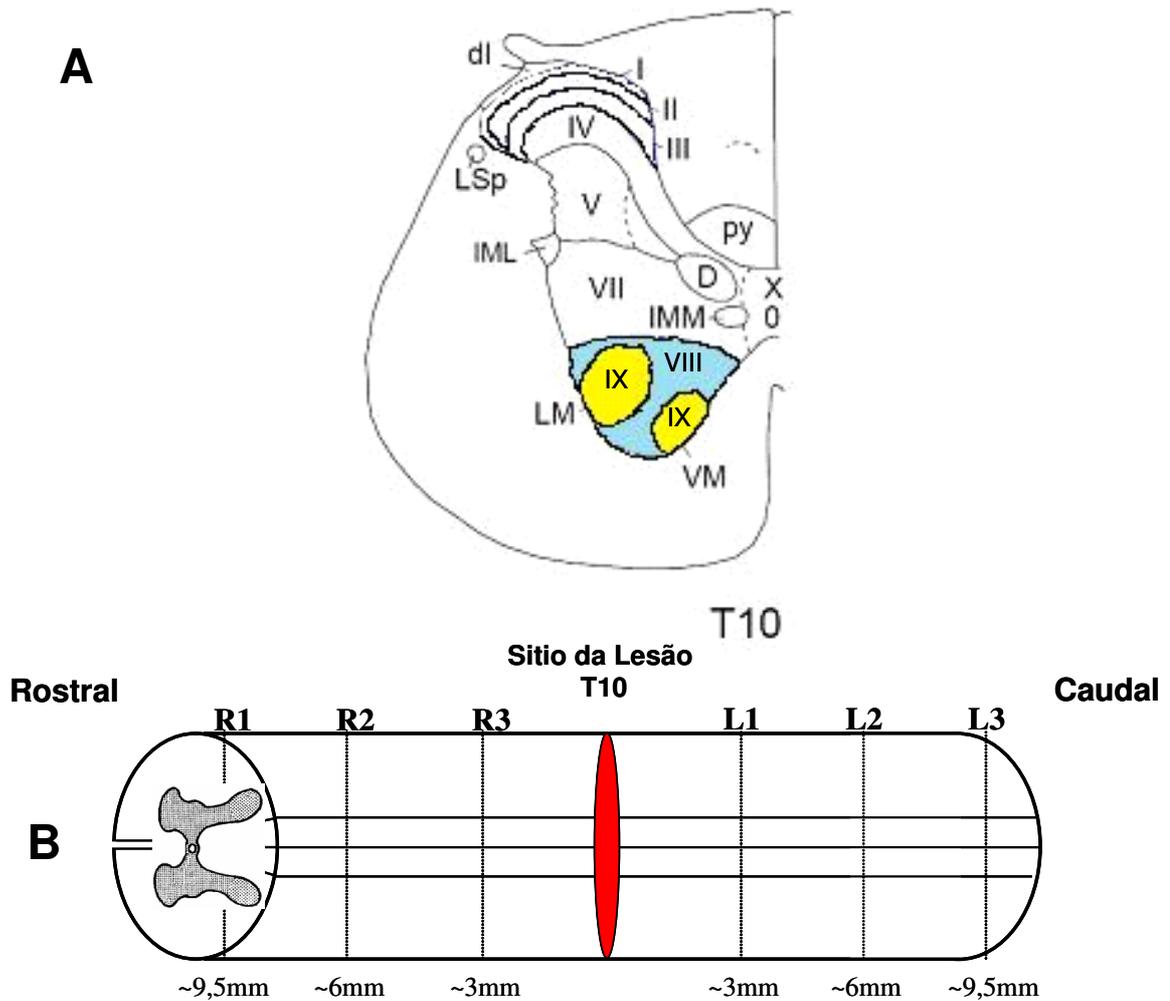
contendo peróxido de hidrogênio 30% (diluídos em 20ml de TB 0,1M, pH7,4), durante 10 minutos. Ocorre uma reação de oxidação, formando um composto insolúvel fortemente corado em marrom-róseo e elétrodenso, que se precipita marcando assim o sítio do complexo antígeno - anticorpo; 14) lavagem das secções 3 vezes, 5 minutos cada, em TB 0,25M, pH 7,4. Finalmente as secções passaram por uma série de concentrações crescentes de álcoois para que o tecido seja desidratado (70%, 95%, 100%, 100% + xilol) e logo após foram diafanizadas no xilol, duas vezes durante 3 minutos. Os cortes foram então montados utilizando solução de montagem, entellan e lamínulas. Neurônios que se apresentarem fortemente corados em coloração marrom-rósea indicam a presença da proteína nuclear neuronal. O protocolo utilizado foi o mesmo usado para Neu-N.

#### **4.6.3. Imunohistoquímica para Proteína Fos-b (Fos-b)**

Esta técnica consistiu em incubar o tecido com o anticorpo primário para Fos-b (rabbit polyclonal IgG – Santa Cruz<sup>®</sup>), diluição 1:2.000, a 18°C, por 18h, seguida pela incubação com o anticorpo secundário (anti-rabbit), diluição 1:400, também a 18°C, por 1h. O tecido foi então incubado com o complexo AB, por 1h em temperatura ambiente e revelado com níquel/DAB, na presença de peróxido de hidrogênio, por 10 minutos. As lâminas com os tecidos foram então desidratadas, diafanizadas e montadas com lamínulas e Entellan.

#### **4.6.4. Análise do Número de Células Marcadas para Fos-b**

O número de células marcadas para Fos-b foi medida no corno ventral (lâminas VIII e IX) da medula espinal, bilateralmente, dos animais dos grupos controle, laminectomia, lesão + veículo e lesão + CBD 20mg. As regiões foram identificadas de acordo com ilustrações apresentadas por Molander e cols., (1989 – T10 na figura 9A). Para análise, cada amostra de medula espinal foi dividida em seis segmentos (figura 9B): três rostrais e três caudais ao sítio de lesão (3 mm de comprimento cada – modificado de Trudrung e cols., 2000), totalizando aproximadamente 2cm, sendo 1cm rostral e 1cm caudal. A análise das células em cada região foi definida como o número de células coradas em uma área padronizada de  $100000 \mu\text{m}^2$  ( $0,1\text{mm}^2$ ). Os resultados foram expressos como média do número de células marcadas (células marcadas/ $0,1\text{mm}^2$  de estrutura)  $\pm$  erro padrão da média (EPM), em cada segmento somando-se os lados direito e esquerdo.

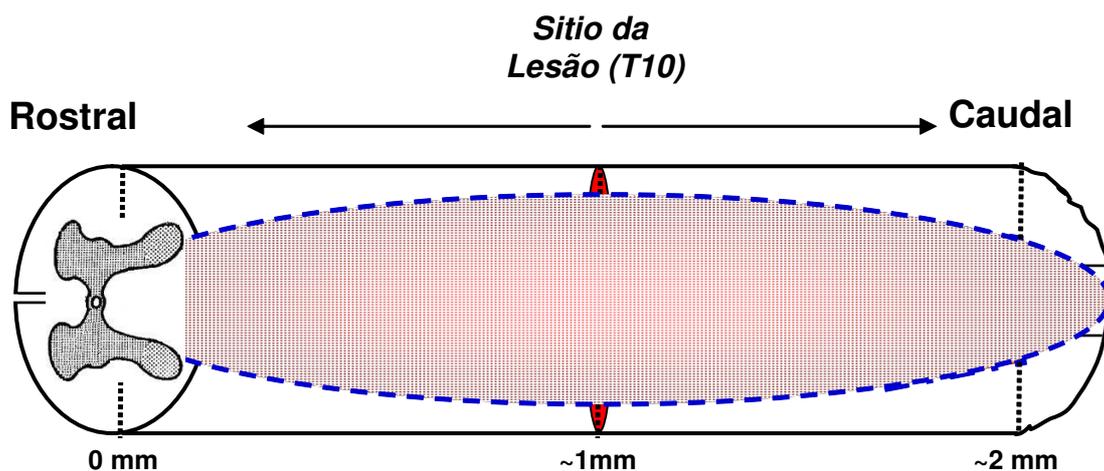


**Figura 9:** Regiões da medula espinhal analisadas. A - ilustração esquemática de hemisseção transversa da medula espinhal, com as regiões estudadas (lâminas de Rexed VIII e IX). B - divisão esquemática da medula espinhal usada para análise histológica. A medula espinhal foi separada em 6 segmentos, com 3 mm cada: três segmentos rostrais e três caudais ao epicentro da lesão. R1, R2 e R3 segmentos rostrais; C1, C2 e C3 segmentos caudais.

#### 4.6.5. Extensão Longitudinal da Lesão

Para avaliar a extensão longitudinal da lesão (figura 10) foi utilizada a coloração por HE. A extensão longitudinal da lesão medular foi estimada calculando-se a distância total (rostro-caudal) entre a primeira secção rostral e a última secção caudal contendo sinais de lesão (Kigerl e cols., 2006). Foram considerados os seguintes sinais de lesão para o cálculo: hemorragia, cavitação, presença de infiltrado celular, fragmentação tecidual ou citoarquitetura anormal e

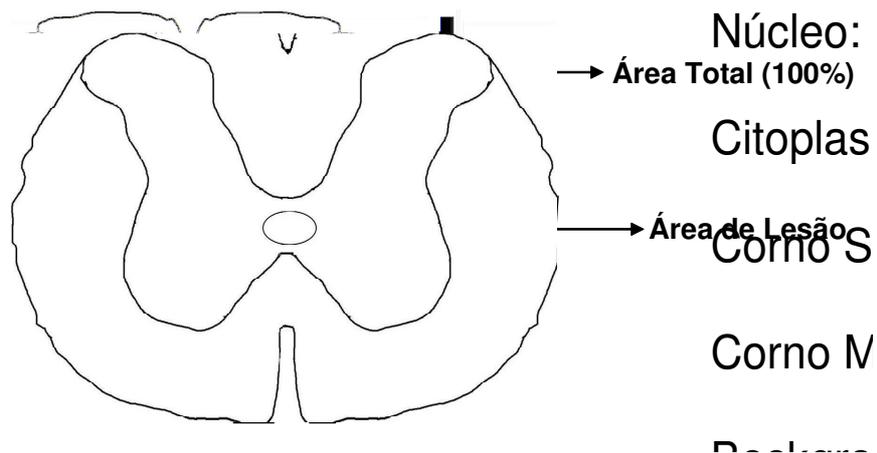
desorganização da substância cinzenta ou branca. Durante a secção da medula no criostato foram anotados os cortes perdidos e dispensados, para que o cálculo da distância entre as secções fosse mais acurado possível. Esses dados foram considerados no cálculo da extensão longitudinal da medula. Os resultados foram expressos como a extensão da lesão longitudinal em milímetros (mm).



**Figura 10:** Ilustração esquemática demonstrando a progressão da lesão longitudinal.

#### 4.6.6. Porcentagem de Tecido Preservado

Para quantificar a porcentagem de tecido preservado da lesão (figura 11) foram utilizadas secções coradas com HE. O tecido preservado foi definido como aquele livre de sinais de lesão, sendo considerados: cavitação, infiltrado celular, fragmentação tecidual ou citoarquitetura anormal e desorganização da substância cinzenta ou branca. A análise morfológica se concentrou na medida transversal do parênquima medular das últimas secções das regiões rostral e caudal da medula espinhal. As medidas de área total e área preservada (em  $\mu\text{m}$ ) foram transformadas em porcentagem e expressa em porcentagem de área preservada em relação à área total de cada secção analisada (Beattie e cols, 1995, 1996; Ma e cols, 2001; Basso 1996; Plemel e cols, 2008).



**Figura 11:** Ilustração esquemática demonstrando a progressão da lesão radial.

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da escala BBB e do teste de retirada de cauda foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) de três vias de medidas repetitivas, sendo considerados os fatores: lesão, tratamento e tempo. Após este teste, se houve efeito e/ou interação entre os fatores, as médias de cada fator foram comparadas por ANOVA de uma/duas vias (independente e/ou de medidas repetitivas), seguido pelo teste de múltiplas comparações de Duncan.

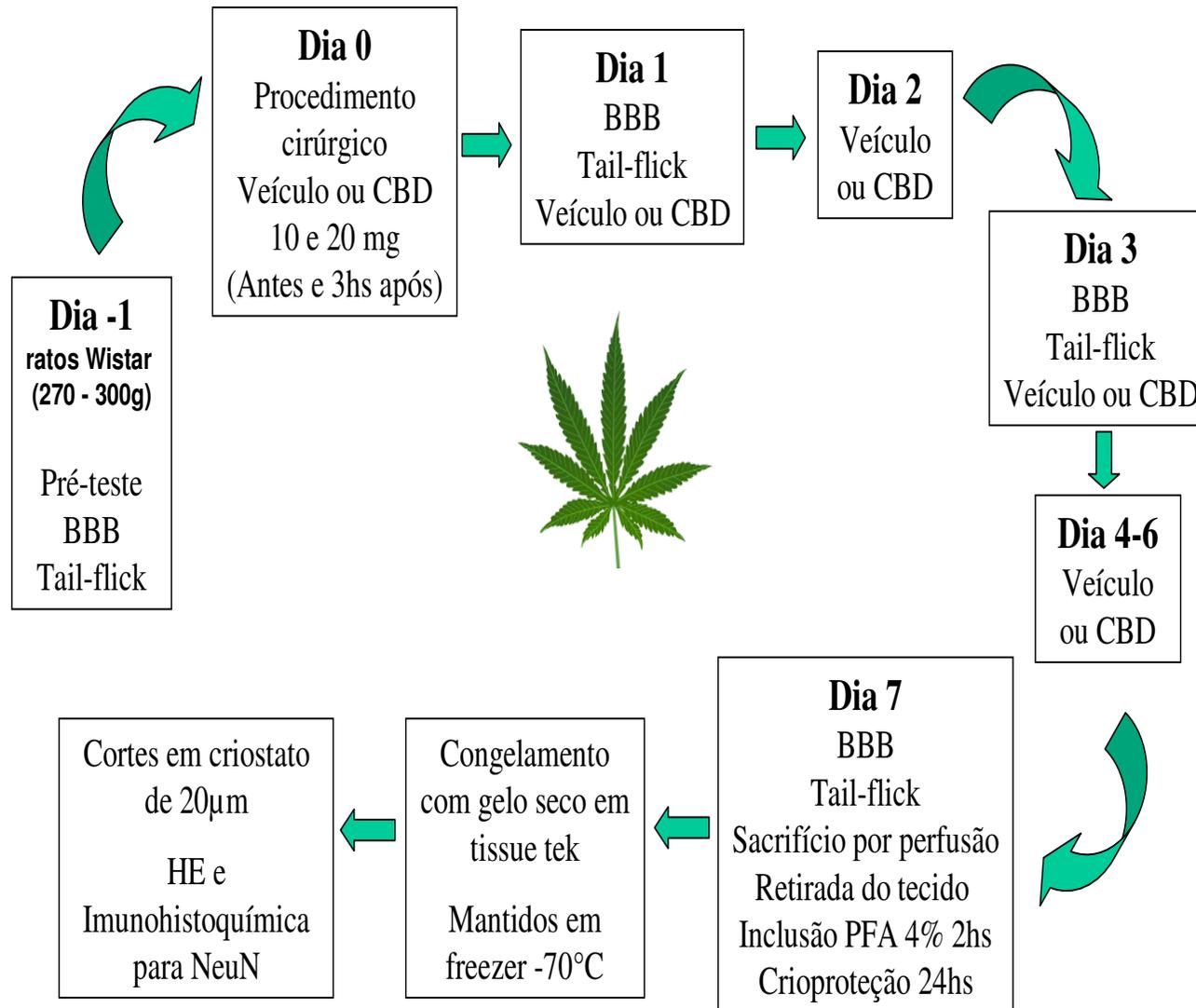
Os resultados da extensão longitudinal da lesão e da área de tecido preservado foram comparados por meio de ANOVA de duas vias, sendo considerados os fatores: lesão e tratamento. Após este teste, se houve efeito e/ou interação entre os fatores, as médias de cada fator foram comparadas por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Duncan. As análises foram realizadas nos “softwares” SPSS para Windows<sup>®</sup>, na versão 8.0. Em todos os testes utilizados foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças na qual o valor de  $p$  foi menor ou igual a 0,05.

# Desenho Experimental

---

---

## 5. DESENHO EXPERIMENTAL



# Resultados

---

---

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. RESULTADOS COMPORTAMENTAIS E HISTOLÓGICOS**

As conseqüências da lesão medular produzida pela aplicação de nitrogênio líquido foram determinadas por meio da análise do comportamento sensório motor e pela análise histológica da medula espinhal. Os animais foram avaliados nos períodos pré-teste, um, três e sete dias após o procedimento cirúrgico, utilizando: 1- a escala de avaliação locomotora BBB e 2- teste de retirada de cauda (Tail Flick). A lesão tecidual da medula espinhal foi analisada pela técnica histoquímica de hematoxilina eosina e pela imunohistoquímica para Neu-N e Fos-b, realizadas sete dias após o procedimento cirúrgico na região correspondente ao sítio da lesão e também 1cm rostral e 1cm caudal a este.

Os resultados serão apresentados a seguir.

#### **6.1.1. Escala de Avaliação Locomotora (BBB)**

Os resultados da Escala de Avaliação Locomotora (BBB) estão apresentados na figura 13.

No pré-teste não houve diferença entre os grupos controle, laminectomia, veículo, Canabidiol 10mg e Canabidiol 20mg ( $P > 0,05$ ), que apresentaram pontuação máxima (21 pontos) na Escala de Avaliação Locomotora. O escore, indicou função locomotora normal, o que constituía pré-requisito para inclusão nos grupos experimentais. Além disso, os animais do grupo controle e laminectomia apresentaram uma média de 21 pontos na escala BBB em qualquer dos tempos analisados, ou seja, nenhum déficit locomotor foi observado ao longo do experimento para estes grupos.

A lesão medular produzida pela aplicação de jato de nitrogênio líquido de maneira geral causou importante déficit locomotor em todas as avaliações no pós-operatório. Em todos os tempos pós-lesão analisados os grupos lesão+veículo,

lesão+Canabidiol 10mg e lesão+Canabidiol 20mg apresentaram pontuação na escala BBB significativamente menor em relação aos grupos controle e laminectomia ( $F_{(4,28)} = 7348,422; P < 0,01$ ) (figura 13).

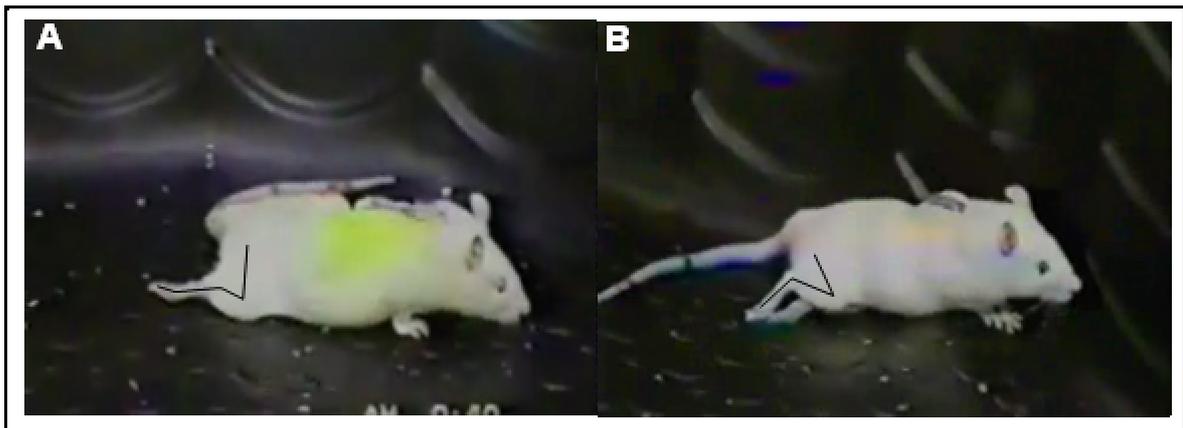
No primeiro dia pós-lesão todos os animais apresentaram pontuação zero na escala BBB (nenhum movimento dos membros posteriores), indicando perda funcional severa (figura 12A e 13). Não houve diferença entre os grupos veículo, Canabidiol 10mg e Canabidiol 20mg ( $P > 0,05$ ).

No terceiro dia pós-lesão os animais lesão+Canabidiol 20mg (escore = 2 pontos) apresentaram pontuação na escala BBB significativamente maior que os animais do grupo lesão+veículo (escore = 1 ponto;  $F_{(1,6)} = 10,417; P = 0,018$ ), lesão+Canabidiol 10mg (escore = 1 ponto;  $F_{(2,9)} = 6,30; P = 0,019$ ). O escore na escala BBB foi ainda significativamente maior que no primeiro dia pós-operatório ( $F_{(7,24)} = 812,17; P < 0,01$ , figura 12).

No sétimo dia pós-lesão foi observado aumento da pontuação na escala BBB dos animais lesão+Canabidiol 10mg (escore=6 pontos: movimento amplo de duas articulações e movimento discreto da terceira;  $F_{(1,6)} = 7,41; P = 0,03$ ) e lesão+Canabidiol 20mg (escore = 7 pontos: movimento amplo das três articulações dos membros posteriores – figura 10B;  $F_{(1,6)} = 10,41; P = 0,018$ ) quando comparado aos animais lesão+veículo (escore = 4 pontos: movimento discreto das três articulações do membro posterior).

Além disso, houve também aumento na pontuação da escala BBB em todos os grupos submetidos à lesão quando comparados aos respectivos tratamentos no primeiro e terceiro dia pós-operatório. O grupo lesão+Veículo passou de escore 1 (movimento discreto de uma ou duas articulações, usualmente o quadril e/ou joelho) no terceiro dia pós-operatório para escore 4 no sétimo dia pós-

operatório (movimento discreto das três articulações do membro posterior;  $F_{(2,9)} = 18,60$ ;  $P = 0,01$ ). O grupo lesão+Canabidiol 10mg passou de escore 1 no terceiro dia pós-operatório para escore 6 no sétimo dia (movimento amplo de duas articulações e movimento discreto da terceira;  $F_{(2,9)} = 159,60$ ;  $P < 0,01$ ). O grupo lesão+Canabidiol 20 mg que atingiu escore 2 na escala BBB no terceiro dia pós-operatório (movimento amplo de uma articulação, ou movimento amplo de uma articulação e movimento discreto de outra articulação) passou para escore 7 no sétimo dia pós-operatório (movimento amplo das três articulações do membro posterior;  $F_{(2,9)} = 55,69$ ;  $P < 0,01$ ; figura 12B e 13).



**Figura 12:** **A** - Foto ilustrativa do animal, no 1° PO, 0 (zero) pontos na escala BBB (nenhum movimento dos membros posteriores). **B** - Foto ilustrativa do animal, no 7° PO, 6 a 07 pontos na escala BBB (movimento amplo das três articulações dos membros posteriores).

**Figura 13:** Gráfico representando os resultados da pontuação na Escala de Avaliação Locomotora (BBB) para os grupos controle, laminectomia, lesão+veículo, lesão+CBD 10mg e lesão+CBD 20mg no primeiro (1° PO), terceiro (3°PO) e sétimo (7° PO) dias após o procedimento cirúrgico. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e laminectomia no respectivo dia pós-operatório; \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo no respectivo dia pós-operatório; + indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CBD 10mg no 3° PO; ° indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 20mg no 1°PO e # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao mesmo tratamento no 1° e 3° PO. Nível de significância  $P < 0,05$ .

### 6.1.2. Teste de Retirada de Cauda (Tail Flick)

A latência para a retirada da cauda após aplicação de um estímulo térmico no teste de retirada de cauda foi medida em segundos. Os resultados foram obtidos no pré-teste, primeiro, terceiro e sétimo dias pós-operatório e estão apresentados na tabela 2. Todos animais apresentaram um tempo de latência para a retirada da cauda dentro dos padrões de normalidade (2,5 a 3,5 segundos). No pré-teste e primeiro dia pós-operatório (tabela 2), a análise dos resultados mostrou que a latência para a retirada de cauda após o estímulo térmico, não apresentou diferença entre os grupos controle, laminectomia, lesão+veículo, lesão+Canabidiol 10mg e lesão+Canabidiol 20mg ( $P > 0,05$ ).

No terceiro dia pós-lesão foi observado um aumento modesto na latência para retirada de cauda no grupo lesão+Canabidiol 10mg comparado ao grupo laminectomia ( $F_{(4,28)} = 3,34; P = 0,023$ ). No sétimo dia esta diferença permaneceu. Além disso, também foi observado um aumento modesto na latência para a retirada de cauda deste grupo quando comparado aos animais do grupo lesão+Canabidiol 10mg ( $F_{(9,11)} = 4,86; P = 0,037$ ) no terceiro dia e aos animais dos grupos controle, laminectomia, lesão+veículo lesão+Canabidiol 20mg no sétimo dia ( $F_{(4,28)} = 3,34; P = 0,023$ ).

## Teste de Retirada de Cauda

### Lesão por Nitrogênio Líquido (05s)

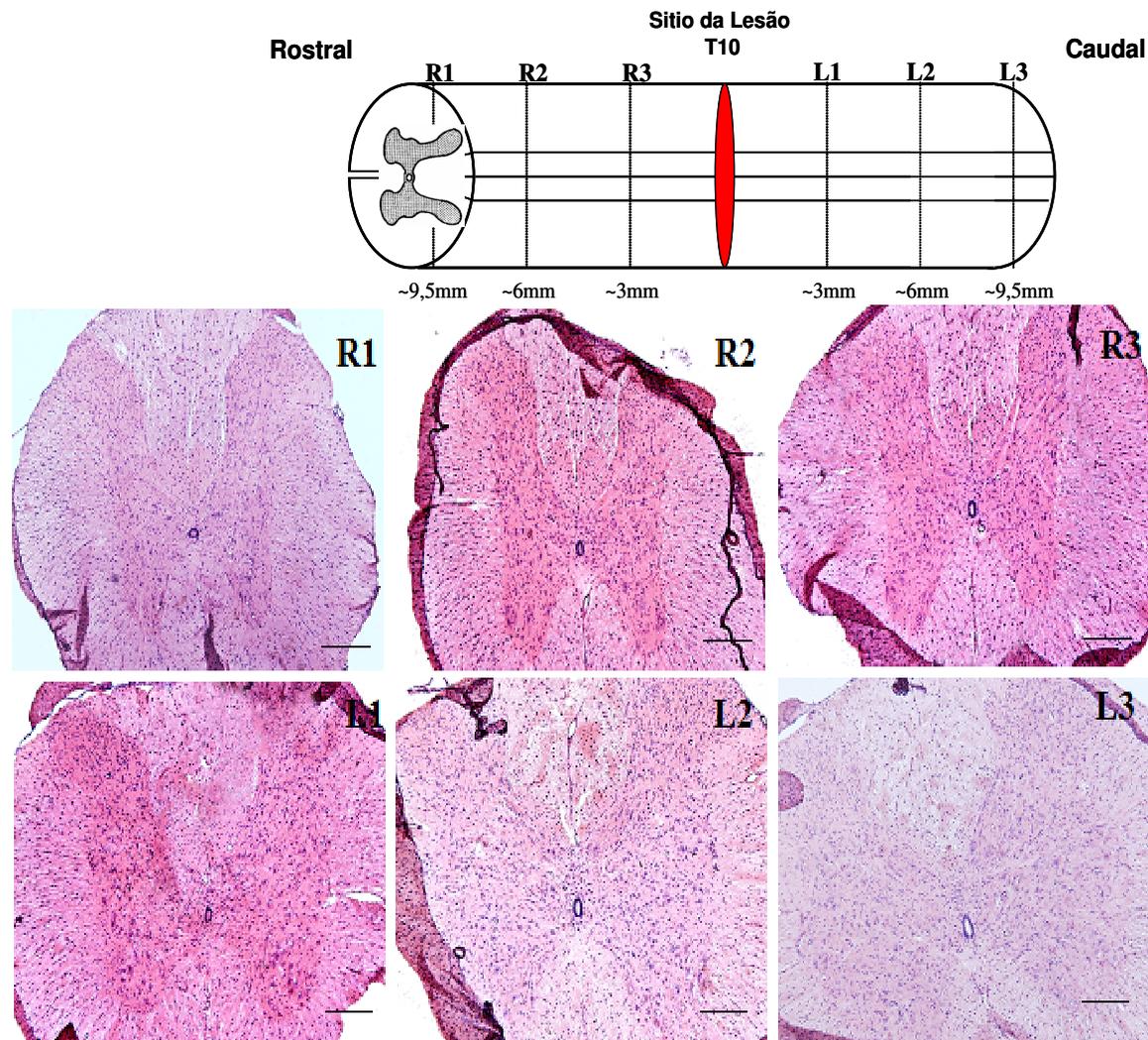
Tempo (dias)	Controle	Laminectomia	Veículo	CBD 10mg	CBD 20mg
<b>Pré-Teste</b>	2,74±0,03	2,74±0,06	2,64±0,04	2,89±0,06	2,74±0,05
<b>1° PO</b>	2,83±0,04	2,81±0,06	2,85±0,05	2,86±0,08	2,93±0,08
<b>3° PO</b>	2,90±0,04	2,78±0,05	2,86±0,05	*2,98±0,08	2,80±0,05
<b>7° PO</b>	2,77±0,03	2,80±0,05	2,80±0,05	#+3,16±0,04	2,82±0,03

**Tabela 2:** Tempo de Latência da Retirada de Cauda (Tail Flick) para os grupos controle, laminectomia, veículo, CBD 10mg e CBD 20mg no pré-operatório (pré-teste), primeiro (1° PO), terceiro (3°PO) e sétimo (7° PO) dias após o procedimento cirúrgico. Os valores representam a média de cada grupo ± EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo laminectomia 3° PO; # diferença significativa em relação ao grupo CBD 10mg no 3° PO; + diferença significativa em relação aos grupos controle, laminectomia, lesão + veículo e CBD 20mg no 7° PO. Nível de significância  $P < 0,05$ . Apesar da diferença encontrada, os grupos permaneceram dentro da faixa de normalidade, indicada pela linha tracejada no gráfico.

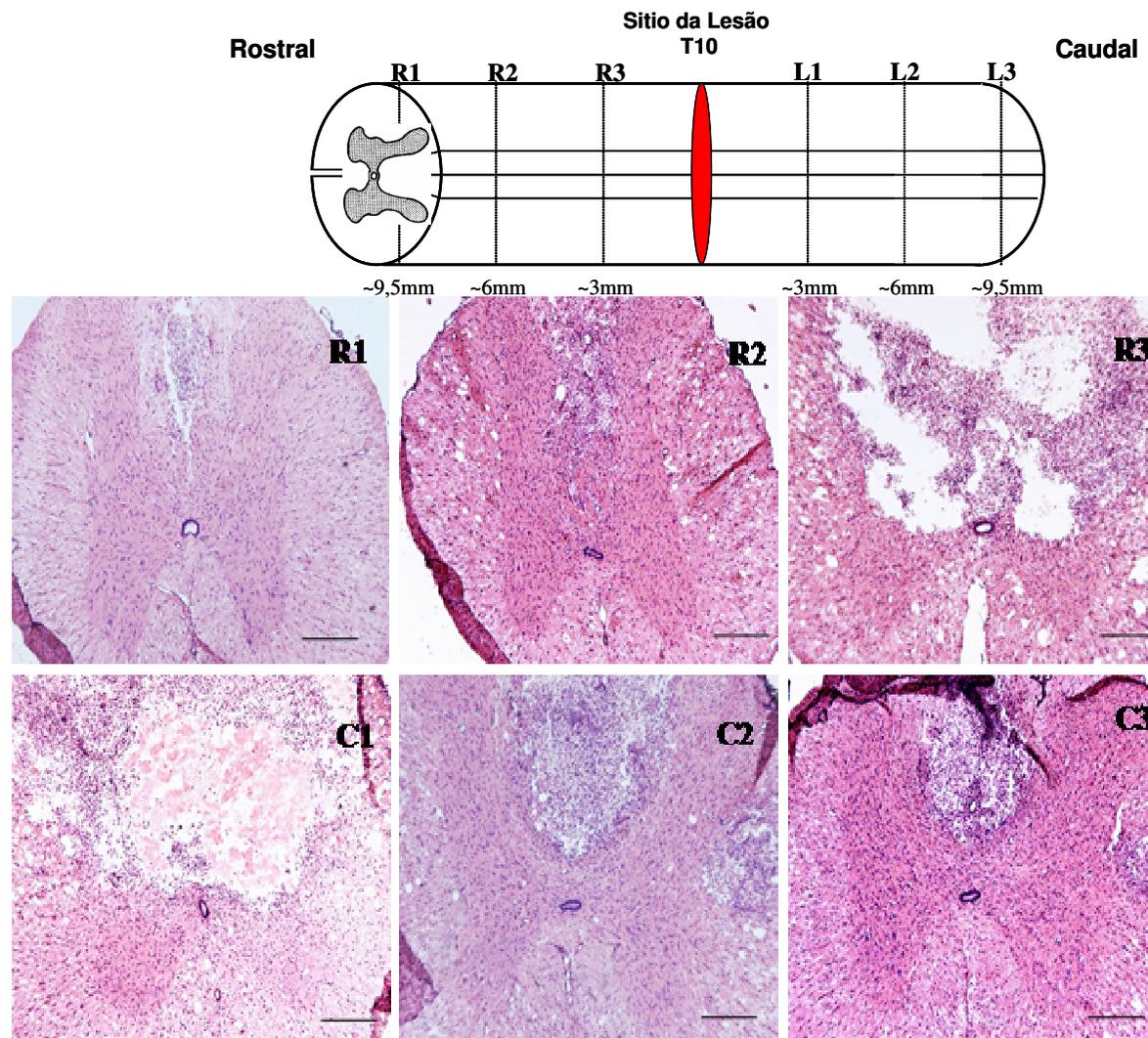
## 6.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

### 6.2.1. Histoquímica para Hematoxilina Eosina (HE)

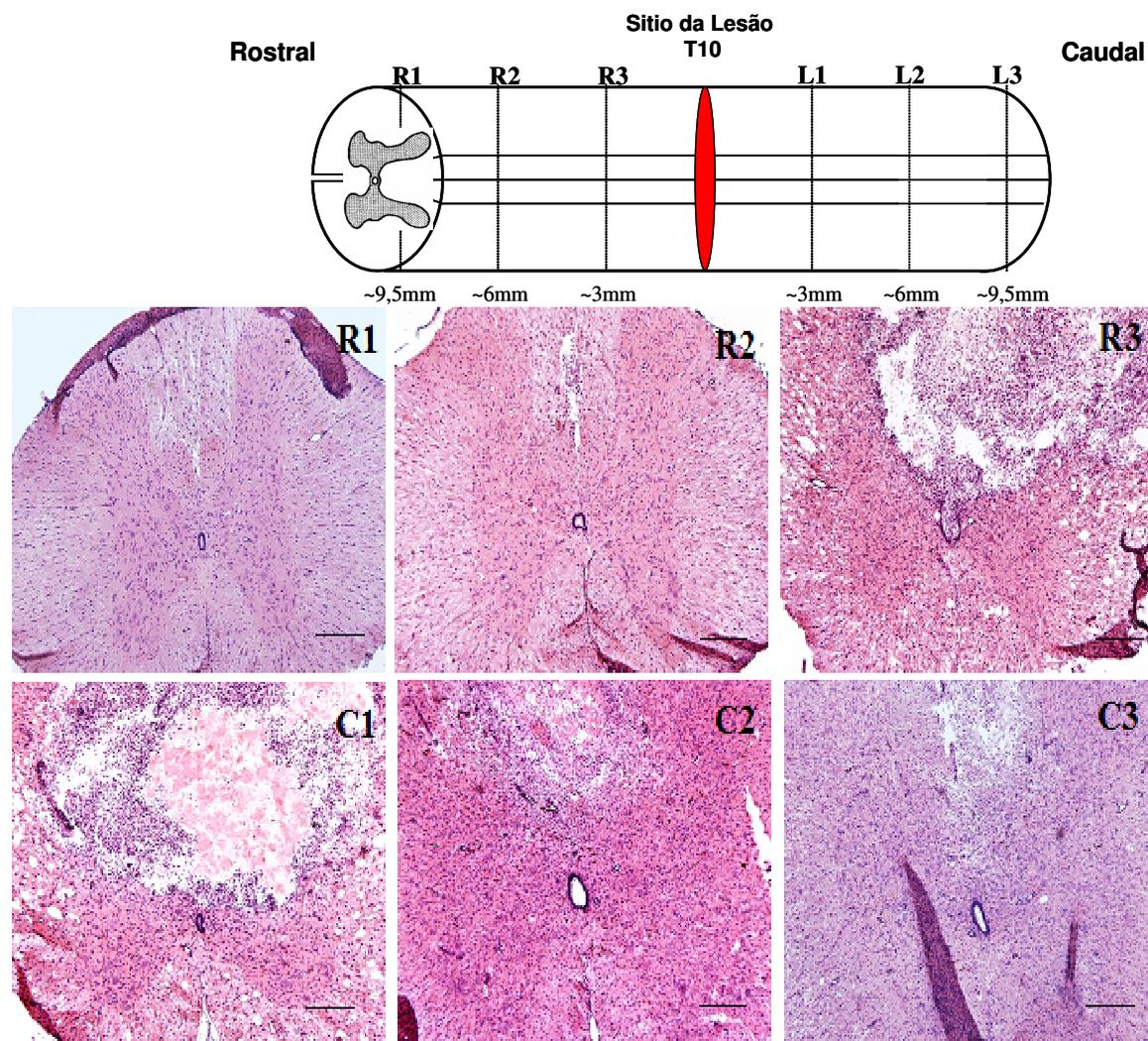
A análise histológica da medula espinhal realizada sete dias após a lesão com o auxílio da técnica histoquímica de hematoxilina eosina não revelou sinal de lesão ao longo da medula espinhal dos grupos controle (figura 14) e laminectomia. No sítio da lesão dos grupos lesão+veículo e lesão+canabidiol 20mg, a medula espinhal apresentou extensa área de cavitação, não apresentando neurônios que pudessem ser observados por meio da análise microscópica. Entretanto, foi possível observar arquitetura tecidual anormal ou fragmentada, desorganização da matéria cinzenta e branca, presença de áreas com sinais de cavitação e infiltrado celular ocorrendo principalmente nas secções adjacentes (rostro-caudal) ao local da aplicação do nitrogênio líquido (sítio da lesão) (figuras 15 e 16). Em secções transversais foi evidente a destruição tecidual nas regiões dorsal e central nos segmentos adjacentes ao sítio da lesão (ver figuras 15 e 16 regiões R3 e C1).



**Figura 14: Controle-** Esquema da medula espinhal com sítio da lesão e regiões adjacentes onde foram feitas a análise histológica; Fotomicrografias da histoquímica para HE na medula espinhal de um animal representativo do grupo controle em diferentes níveis adjacentes ao sítio da lesão; R1, R2 e R3- representam secções realizadas aproximadamente 9,5, 6 e 3mm, respectivamente, rostral ao sítio da lesão; C1, C2 e C3- representam secções realizadas aproximadamente 3, 6 e 9,5mm, respectivamente, caudal ao sítio da lesão. Barras representam 250µm.



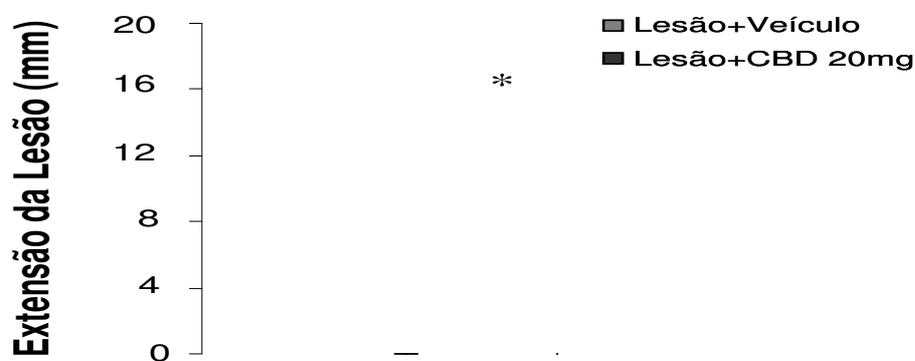
**Figura 15: Veículo-** Esquema da medula espinhal com sítio da lesão e regiões adjacentes onde foram feitas a análise histológica; Fotomicrografias da histoquímica para HE na medula espinhal de um animal representativo do grupo veículo em diferentes níveis adjacentes ao sítio da lesão; R1, R2 e R3- representam secções realizadas aproximadamente 9,5, 6 e 3mm, respectivamente, rostral ao sítio da lesão; C1, C2 e C3- representam secções realizadas aproximadamente 3, 6 e 9,5mm, respectivamente, caudal ao sítio da lesão. Barras representam 250µm.



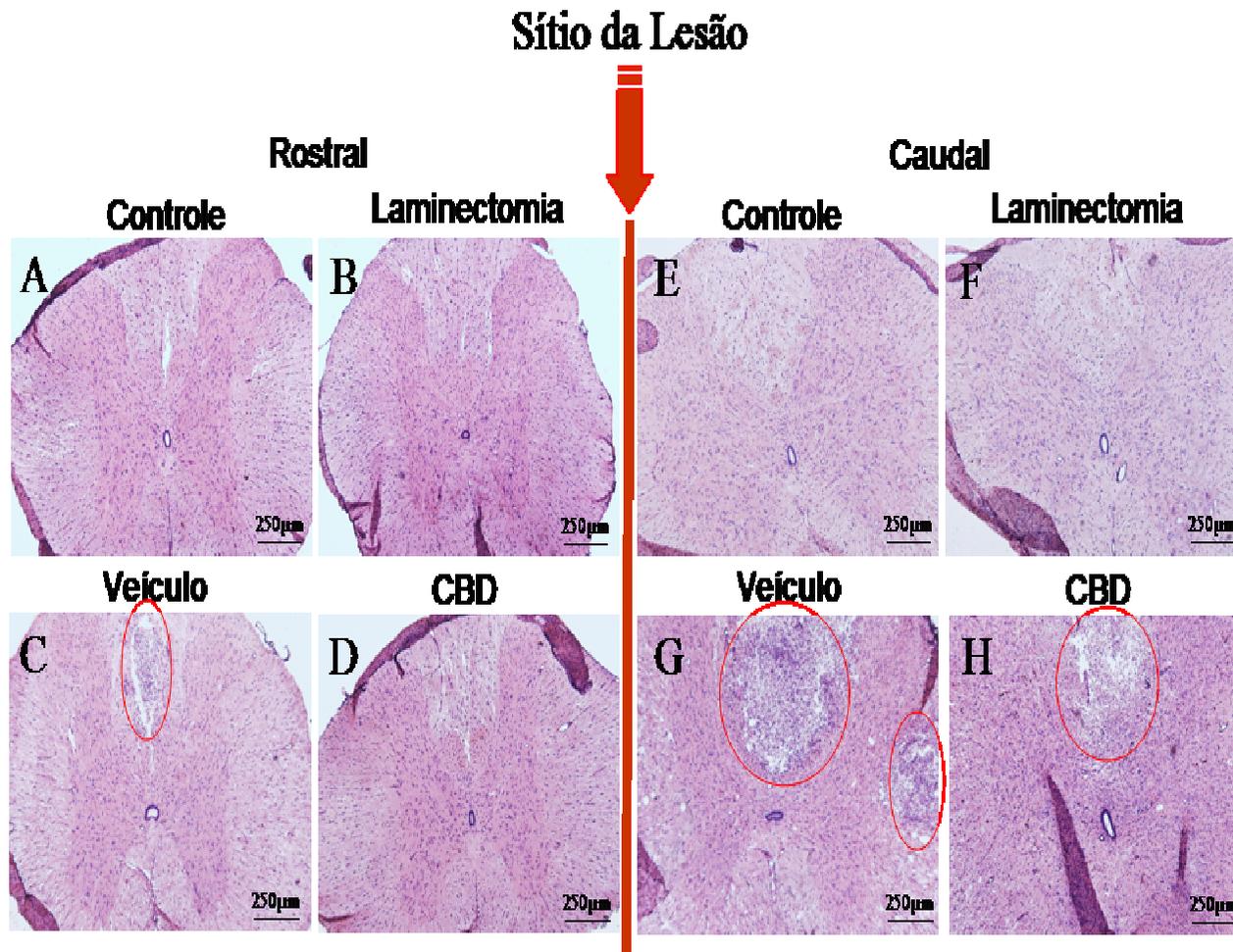
**Figura 16: Canabidiol 20mg-** Esquema da medula espinhal com sítio da lesão e regiões adjacentes onde foram feitas a análise histológica; Fotomicrografias da histoquímica para HE na medula espinhal de um animal representativo do grupo canabidiol 20mg em diferentes níveis adjacentes ao sítio da lesão; R1, R2 e R3- representam secções realizadas aproximadamente 9,5, 6 e 3mm, respectivamente, rostral ao sítio da lesão; C1, C2 e C3- representam secções realizadas aproximadamente 3, 6 e 9,5mm, respectivamente, caudal ao sítio da lesão. Barras representam 250µm.

### 6.2.2. Extensão da Lesão

A extensão longitudinal da lesão (rostro-caudal), estimada calculando a distância entre a primeira e a última secção contendo sinais de lesão, dos grupos lesão+veículo e lesão+canabidiol 20mg, no sétimo dia após procedimento cirúrgico é apresentada na figura 17. Na análise microscópica realizada com auxílio da histoquímica para HE, não houve diferença entre os grupos controle (figura 18) e laminectomia. Nenhum sinal de lesão foi observado ao longo da medula visto que os animais desses grupos não receberam aplicação de nitrogênio líquido. A análise estatística mostrou que os animais dos grupos lesão+veículo e lesão+canabidiol 20mg apresentaram diferença significativa em relação aos animais dos grupos controle e laminectomia ( $P < 0,05$ ). Além disso, a extensão longitudinal da lesão do grupo lesão+canabidiol 20mg foi significativamente menor quando comparada com o grupo lesão+veículo ( $F_{(1,7)} = 98,91; P < 0,01$ ) (figura 17 e 18).



**Figura 17:** Gráfico representando os resultados da extensão longitudinal da lesão (mm) para os grupos lesão + veículo e lesão + CBD 20mg no sétimo dia após o procedimento cirúrgico. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* diferença significativa em relação ao grupo lesão + veículo. Nível de significância  $P < 0,05$ .



**Figura 18:** Fotomicrografia da medula espinhal, da histoquímica para HE, de animais representativos dos grupos controle (A e E), laminectomia (B e F), veículo (C e G) e canabidiol 20mg (CBD; D e H). Fotomicrografias de A – D ilustram secções localizadas na região rostral, aproximadamente 9,5mm do sítio da lesão; E – H ilustram secções localizadas na região caudal, aproximadamente 9,5mm do sítio da lesão. Círculos demonstram áreas de lesão.

### 6.2.3. Porcentagem de Tecido Preservado

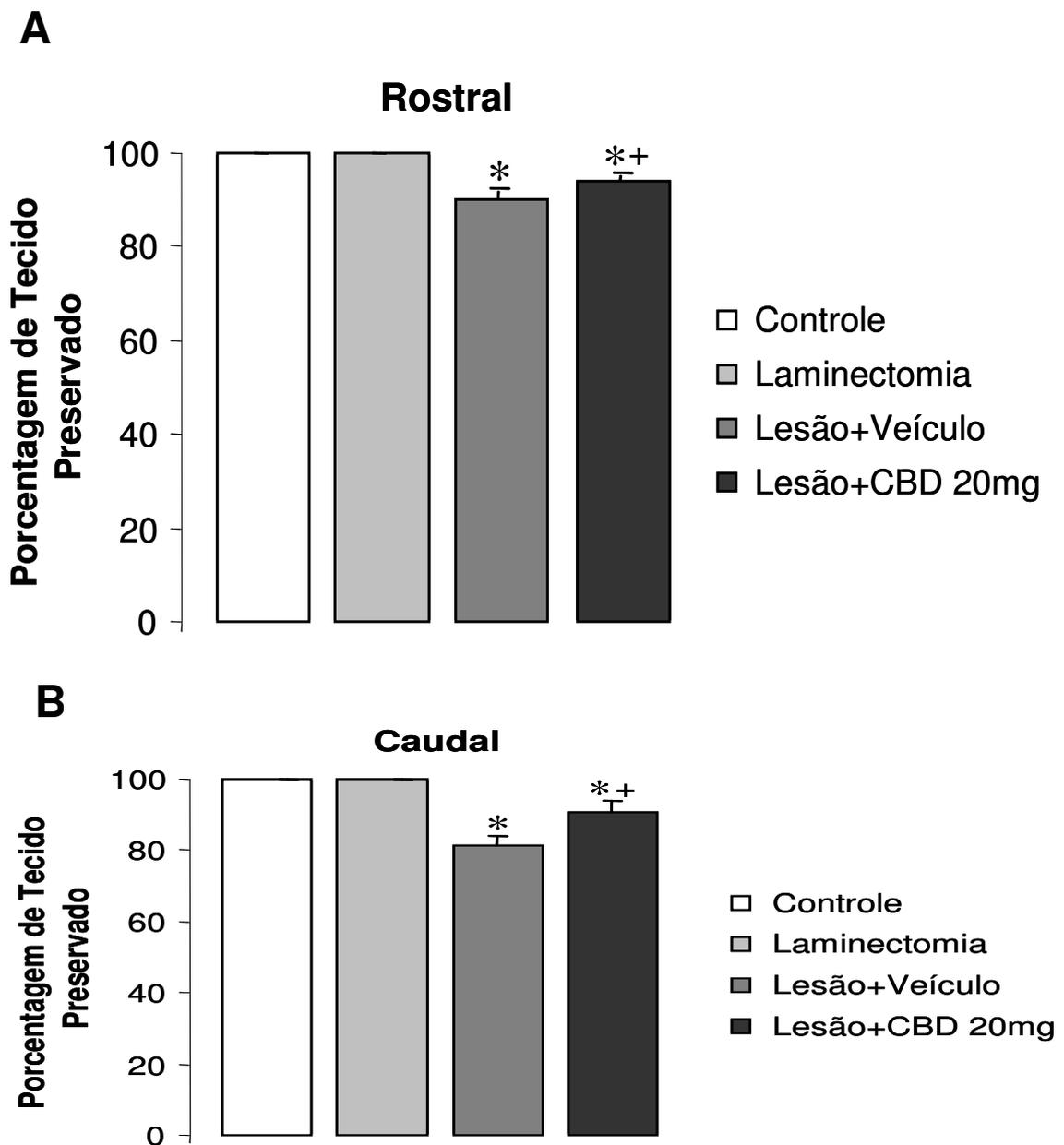
O tecido preservado foi definido como aquele livre de sinais de lesão, sendo considerados: cavitação, infiltrado celular, fragmentação tecidual ou citoarquitetura anormal e desorganização da substância cinzenta ou branca. A porcentagem de tecido preservado da lesão, em relação a área transversal da medula, no seguimento rostral e caudal de cada medula dos animais dos grupos controle, laminectomia, veículo e canabidiol 20mg, sete dias após o procedimento cirúrgico é demonstrada na figura 19, os dados brutos são demonstrados nas tabelas 3 e 4. A análise estatística mostrou que os animais dos grupos veículo e canabidiol 20mg, nas regiões rostral e caudal, apresentaram porcentagem de tecido preservado da lesão significativamente menor em relação aos grupos controle e laminectomia ( $F_{(3,47)} = 984; P < 0,01$ ) que, por sua vez, não apresentaram nenhum sinal de lesão. Os animais do grupo canabidiol 20mg apresentaram porcentagem de tecido preservado da lesão significativamente maior que os animais do grupo veículo nas regiões rostral e caudal ( $F_{(3,47)} = 984; P < 0,01$ ) (figura 18 e 19).

<b>Grupo Nitrogênio Líquido + Veículo</b>						
	<b>Início da Lesão</b>			<b>Fim da Lesão</b>		
	<b>Área Total (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área Lesada (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>% de Tecido Lesado</b>	<b>Área Total (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área Lesada (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>% de Tecido Lesado</b>
<b>Rato 1</b>	2625813	192220	7,3	3756754	1010822	26,9
	2131101	242114	7,7	3697581	1101183	29,8
	2697914	245330	9,2	3772203	1000571	26,5
<b>Rato 2</b>	2940782	246826	8,4	4876248	746039	15
	2892301	248131	8,5	4859930	758012	15,6
	2984639	289230	9,7	4945354	786391	15,9
<b>Rato 3</b>	2653293	224039	8,4	389732	583522	15
	2780013	258141	9,2	3777558	565991	15
	2818132	269432	9,6	3901524	671743	17,2
<b>Rato 4</b>	2670789	261827	9,8	3548177	668781	18,8
	2780741	263857	9,5	3589751	697181	19,4
	2693458	234911	8,7	3624711	797174	21

**Tabela 3:** Dados brutos utilizados para análise do tecido preservado nos animais do grupo lesão+veículo, sete dias após a lesão.

<b>Grupo Nitrogênio Líquido + Canabidiol 20mg</b>						
	<b>Início da Lesão</b>			<b>Fim da Lesão</b>		
	<b>Área Total (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área Lesada (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>% de Tecido Lesado</b>	<b>Área Total (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área Lesada (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>% de Tecido Lesado</b>
<b>Rato 1</b>	2232042	123596	5,6	3722195	187527	5
	2322144	125671	5,5	3798179	200178	5,3
	2294678	175741	7,6	3911214	211013	5,3
<b>Rato 2</b>	2537571	140918	5,5	3262923	218681	6,7
	2631527	148112	5,6	3321141	211620	6,3
	2612145	143578	5,5	3295879	205993	6,25
<b>Rato 3</b>	2657624	141131	5,3	4007622	213296	5,3
	2689141	151103	6,5	3931998	204112	6,1
	2911198	161153	6,5	3981057	221197	5,5
<b>Rato 4</b>	2568321	133151	5,1	3431545	217814	6,3
	2581174	140102	5,4	3520102	218109	6,2
	2601103	142172	5,4	3593179	221154	2,15

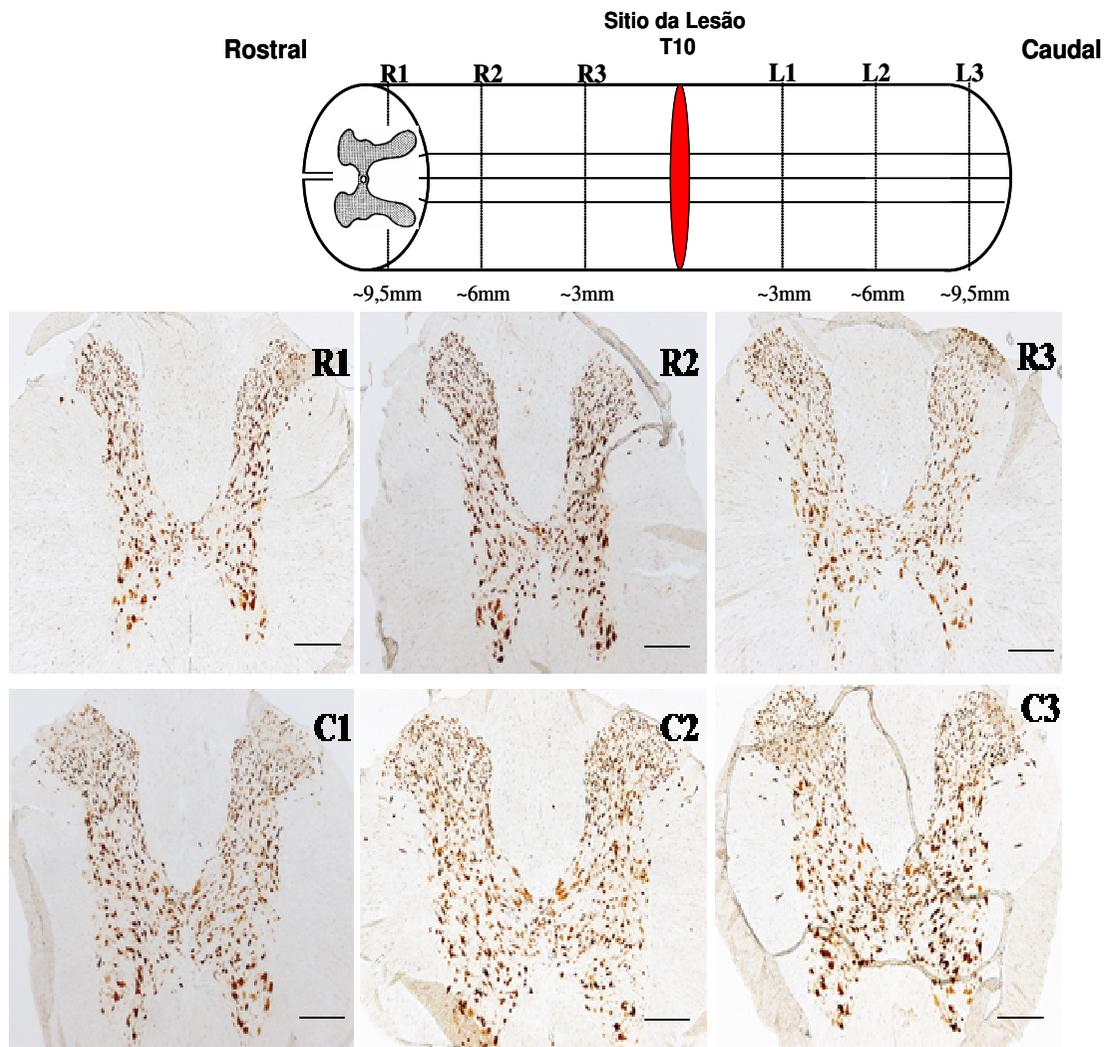
**Tabela 4:** Dados brutos utilizados para análise do tecido preservado nos animais do grupo lesão+canabidiol 20mg, sete dias após a lesão.



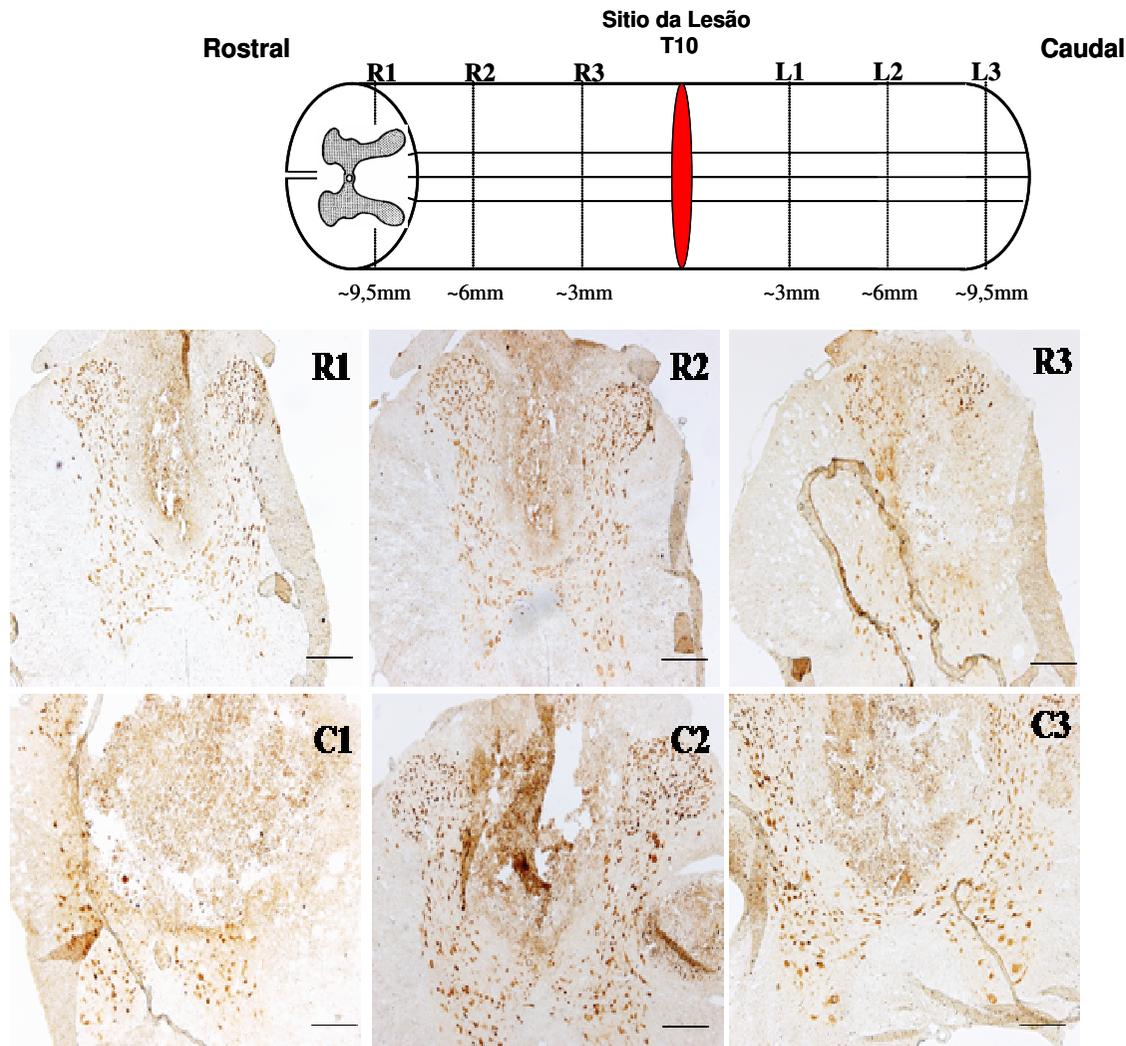
**Figura 19:** Gráfico representando os resultados da porcentagem de tecido preservado, em relação à área transversal da medula, nas regiões rostral (A) e caudal (B), para os grupos controle, laminectomia, lesão + veículo e lesão + canabidiol 20mg no sétimo dia após o procedimento cirúrgico. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* diferença significativa em relação aos grupos controle e laminectomia; + diferença significativa em relação ao grupo lesão + veículo. Nível de significância  $P < 0,05$ .

#### **6.2.4. Imunohistoquímica para Neu-N**

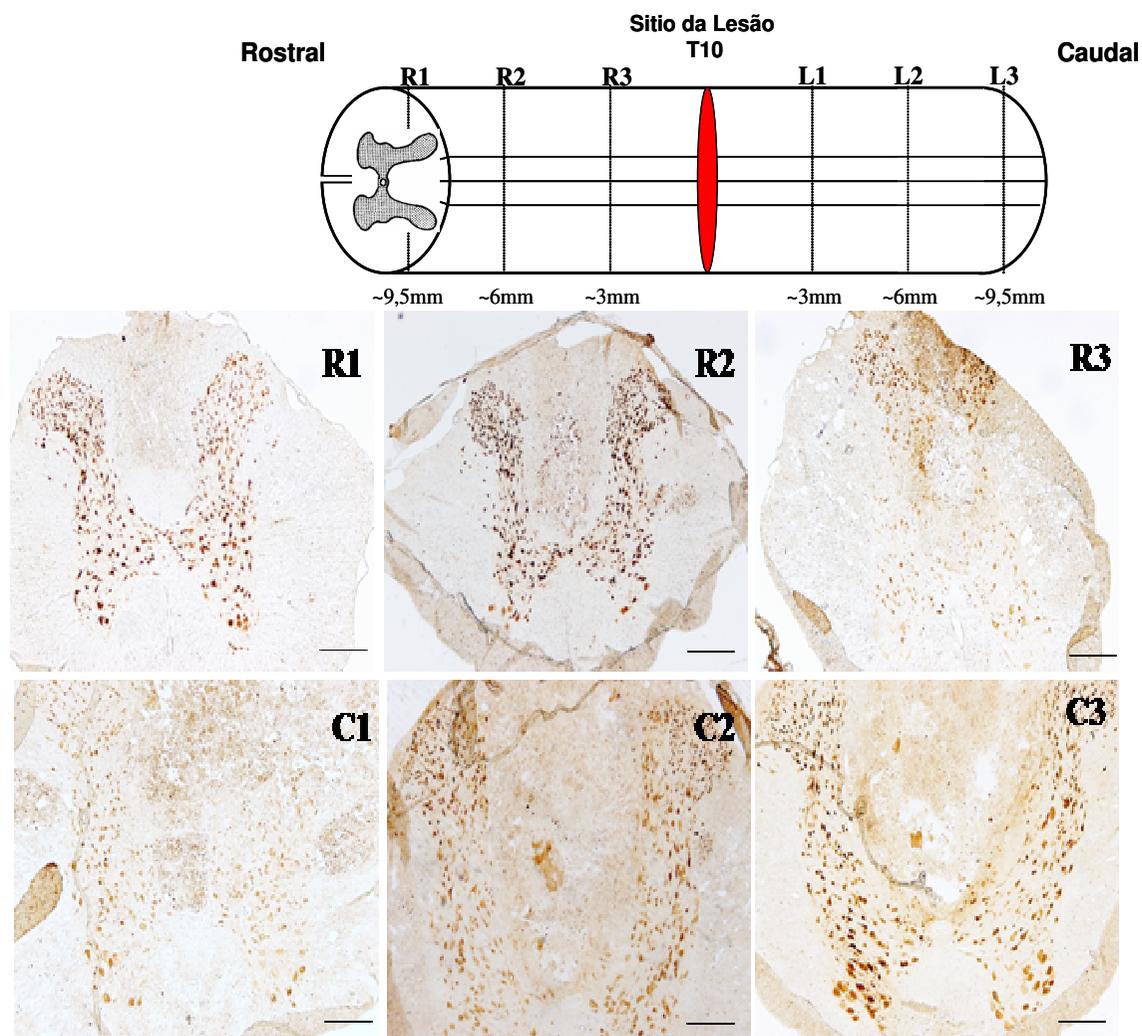
A análise histológica realizada por meio da técnica imunohistoquímica para Neu-N, na medula espinhal, sete dias após o procedimento cirúrgico, nos animais dos grupos controle (figura 20) e laminectomia mostrou áreas de citoarquitetura preservada na substância cinzenta e branca, corpos neuronais e núcleos de contornos regulares e ausência de sinais de lesão. Ao contrário, nos animais dos grupos lesão+veículo (figura 21) e lesão+canabidiol 20mg (figura 22), foi observada a presença de áreas com sinais de cavitação, arquitetura tecidual anormal ou fragmentada, desorganização da matéria cinzenta e branca, contornos celulares irregulares e desfragmentação nuclear. Estes sinais sugerem sofrimento celular ocorrendo, principalmente, nas seções adjacentes (rosto-caudal) ao local da aplicação do nitrogênio líquido (sítio da lesão), sete dias após a lesão (figuras 23 e 24). No sítio da lesão a medula espinhal não apresentava neurônios que pudessem ser observados mostrando extensas áreas de cavitação.



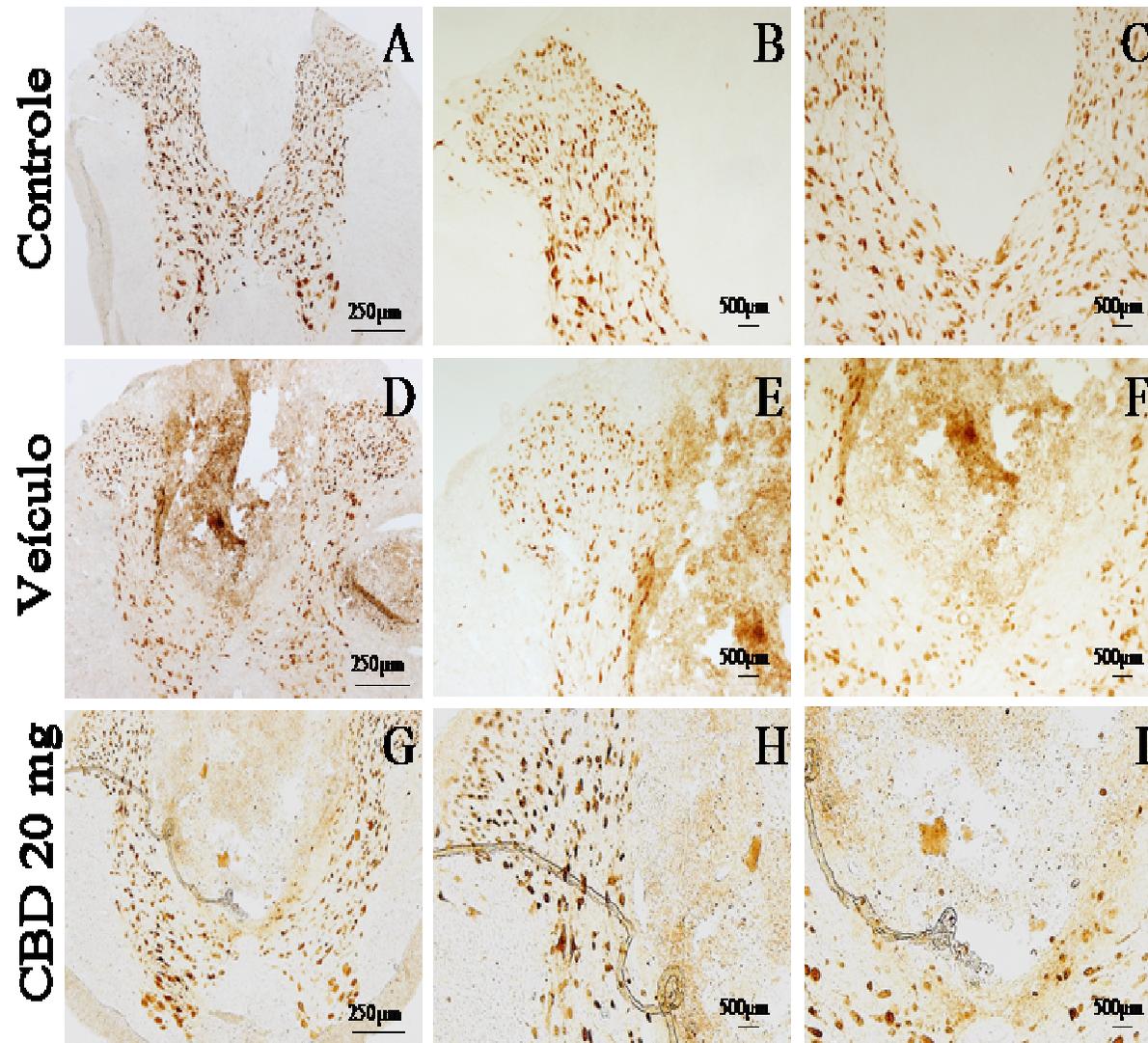
**Figura 20: Controle-** Esquema da medula espinhal com sítio da lesão e regiões adjacentes onde foram feitas a análise histológica; Fotomicrografias da imunohistoquímica para Neu-N na medula espinhal de um animal representativo do grupo controle em diferentes níveis adjacentes ao sítio da lesão; R1, R2 e R3- representam secções realizadas aproximadamente 9,5 6 e 3mm, respectivamente, rostral ao sítio da lesão; C1, C2 e C3- representam secções realizadas aproximadamente 3, 6 e 9,5mm, respectivamente, caudal ao sítio da lesão. Barras representam 250µm.



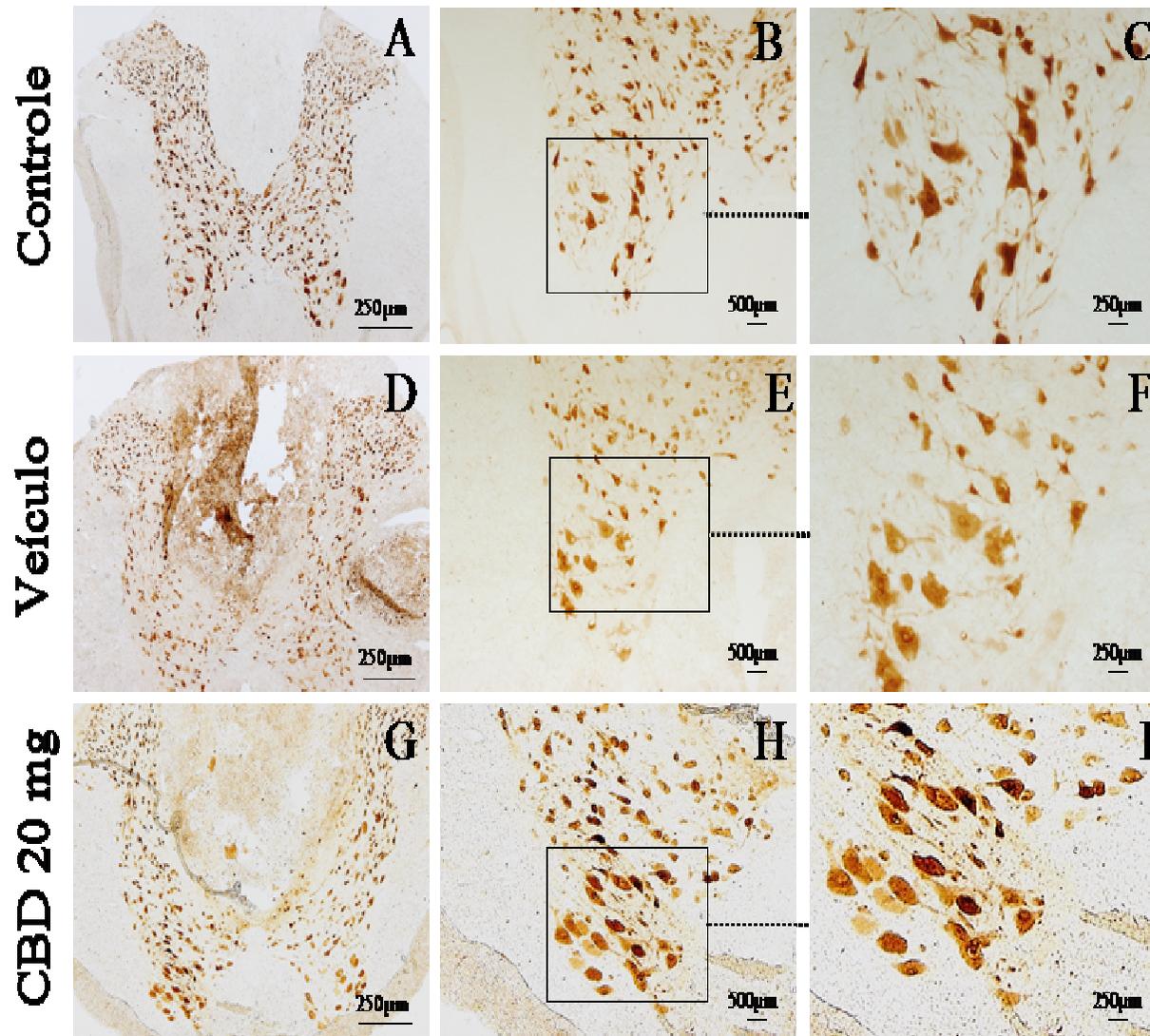
**Figura 21: Veículo-** Esquema da medula espinhal com sítio da lesão e regiões adjacentes onde foram feitas a análise histológica; Fotomicrografias da imunohistoquímica para Neu-N na medula espinhal de um animal representativo do grupo veículo em diferentes níveis adjacentes ao sítio da lesão; R1, R2 e R3- representam secções realizadas aproximadamente 9,5 6 e 3mm, respectivamente, rostral ao sítio da lesão; C1, C2 e C3- representam secções realizadas aproximadamente 3, 6 e 9,5mm, respectivamente, caudal ao sítio da lesão. Barras representam 250µm.



**Figura 22: Canabidiol 20mg-** Esquema da medula espinhal com sítio da lesão e regiões adjacentes onde foram feitas a análise histológica; Fotomicrografias da imunohistoquímica para Neu-N na medula espinhal de um animal representativo do grupo canabidiol 20mg em diferentes níveis adjacentes ao sítio da lesão; R1, R2 e R3- representam secções realizadas aproximadamente 9, 6 e 3mm, respectivamente, rostral ao sítio da lesão; C1, C2 e C3- representam secções realizadas aproximadamente 3, 6 e 9mm, respectivamente, caudal ao sítio da lesão. Barras representam 250µm.



**Figura 23:** Fotomicrografias de imunohistoquímica para Neu-N na medula espinhal, de animais representativos dos grupos controle (A-C), veículo(D-F) e canabidiol 20mg (CBD 20mg – G-I), aproximadamente 6mm caudal do sítio de lesão; A, D e G fotomicrografias panorâmicas da medula espinhal; B, E e H região do corno dorsal; C, F e I regiões dorsais da medula espinhal (fascículos grácil e cuneiforme).



**Figura 24:** imunohistoquímica para Neu-N na medula espinhal, de animais representativos dos grupos controle (A-C), veículo(D-F) e canabidiol 20mg (CBD 20mg – G-I), aproximadamente 6mm caudal do sítio de lesão; A, D e G fotomicrografias panorâmicas da medula espinhal; B, E e H regiões do corno ventral; C, F e I corno ventral da medula espinhal (motoneurônios).

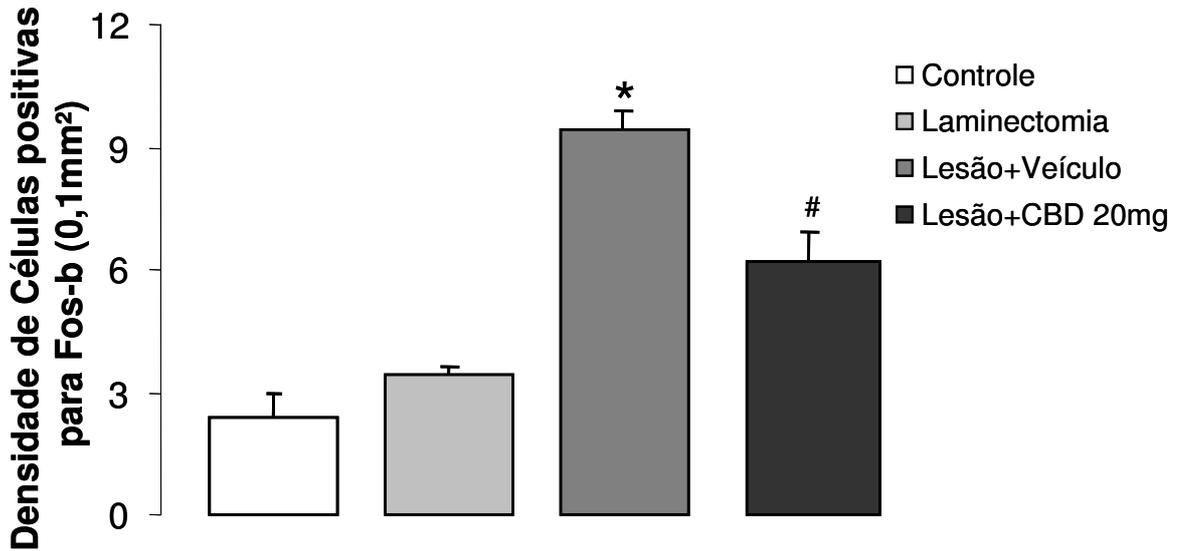
### 6.2.5. Densidade de Células Marcadas para Fos-b

O resultado da análise da densidade de células com expressão da proteína Fos-b no corno ventral (lâminas VIII e IX), bilateralmente, da medula espinhal dos animais dos grupos controle, laminectomia, lesão+veículo e lesão+canabidiol 20mg, sete dias após o procedimento cirúrgico, está apresentado na figura 25.

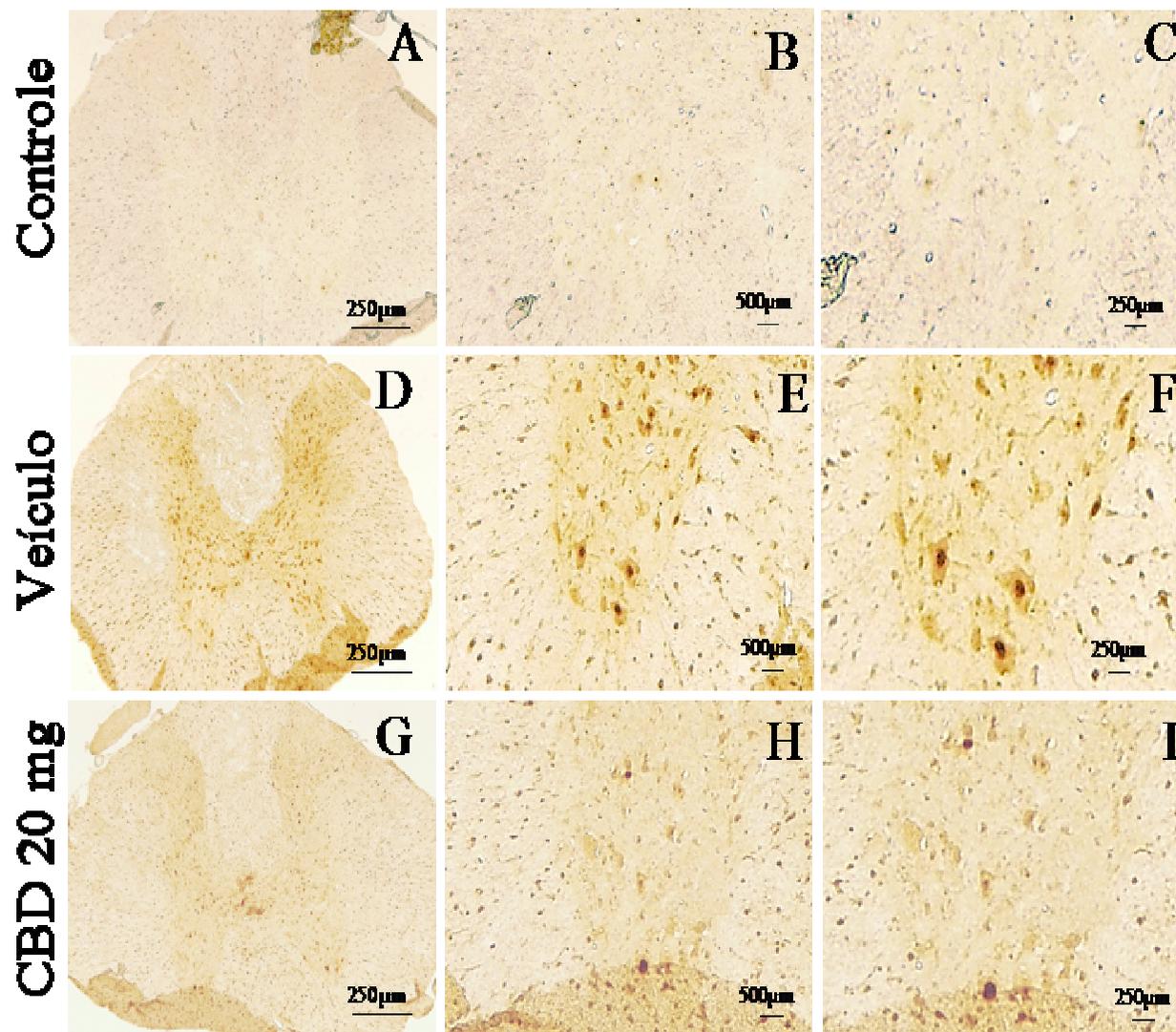
A análise estatística mostrou que os animais dos grupos controle e laminectomia não apresentaram diferença na densidade de células que expressavam proteína Fos-b quando comparados entre si ( $P > 0,05$ ). Os animais do grupo lesão+veículo apresentaram um aumento significativo na densidade de células que expressavam a proteína Fos-b nas lâminas VIII e IX no corno anterior, nos seguimentos rostral e caudal 3-9mm distantes do epicentro da lesão, quando comparados aos animais do grupo controle, laminectomia e lesão+canabidiol 20mg ( $F_{(3,49)} = 101; P < 0,001$ ). Além disso, o grupo lesão+canabidiol 20mg foi diferente dos grupos controle, laminectomia e lesão+veículo ( $F_{(3,49)} = 930; P < 0,001$ ) apresentando aumento na expressão de Fos-b, nas lâminas VIII e IX no corno anterior, nos seguimentos rostral e caudal 3-9mm distantes do epicentro da lesão, quando comparado aos grupos controle e laminectomia. Apresentaram ainda redução dessa expressão quando comparado ao grupo lesão+veículo.

Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal, marcadas pela imunohistoquímica para a proteína Fos-b, para os grupos controle, veículo e canabidiol 20mg estão apresentadas na figura 26.

## Média Fos-b Entre Grupos



**Figura 25:** Gráfico representando os resultados da densidade de células expressando proteína Fos-b por 0,1mm<sup>2</sup> nas lâminas VIII e IX, no corno ventral, na medula espinhal nos animais dos grupos controle, laminectomia, lesão + veículo e lesão + CBD 20mg no sétimo dia após o procedimento cirúrgico. As barras representam o valor médio de cada grupo  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação aos grupos controle, laminectomia e CBD 20mg. # indica diferença significativa em relação aos grupos controle, laminectomia e veículo. Nível de significância  $P < 0,05$ .



**Figura 26:** Fotomicrografias de imunohistoquímica para Fos-b na medula espinhal, de animais representativos dos grupos controle (A-C), veículo (D-F) e canabidiol 20mg (CBD 20mg – G-I), aproximadamente 6mm rostral do sítio de lesão; A, D e G fotomicrografias panorâmicas da medula espinhal; B, E e H regiões do corno ventral; C, F e I corno ventral da medula espinhal (motoneurônios).

# Discussão

---

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisada a lesão medular de ratos produzida por criogenia por meio da aplicação local de jato de nitrogênio líquido, associada ou não ao tratamento com Canabidiol. O comportamento sensório-motor foi avaliado por meio da escala de avaliação locomotora BBB e do teste de retirada de cauda. A resposta tecidual à lesão foi analisada por meio da histoquímica para hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para Neu-N e Fos-b.

Os resultados mostraram que a aplicação local do nitrogênio líquido induziu lesão medular grave que pôde ser constatada pelo déficit na avaliação locomotora por meio da escala BBB. A lesão pôde também ser verificada por meio de alterações morfológicas teciduais no sítio da lesão e em segmentos adjacentes observadas com o auxílio da histoquímica para hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para Neu-N e Fos-b. Não foi detectada alteração sensorial nos animais quando medida pelo teste de retirada de cauda.

O tratamento sub-crônico com Canabidiol 10 e 20mg/kg promoveu melhora da recuperação locomotora (no sétimo dia de avaliação: 50% e 75%, para as doses de 10 e 20 mg/kg, respectivamente, comparados ao veículo) constatado pelo aumento do escore da escala BBB. A aplicação de Canabidiol também atenuou as modificações histológicas da lesão na medula espinhal.

Os resultados serão discutidos em detalhes a seguir.

## **7.1. CRIOLESÃO**

Os fenômenos associados à lesão da medula espinhal consistem em diversos eventos e mudanças que se estendem desde o momento do contato do agente lesivo até o ponto em que o processo de reparo é finalizado. Na segunda metade do século passado muitos estudos foram direcionados à busca por um melhor entendimento da patogênese da lesão da medula espinhal, tentando reproduzir o

início dos eventos associados a lesões (Kao e Chang, 1977; Balentine, 1978; Noble e Wrathall, 1985). Outros foram direcionados para entender os processos regenerativos que se seguem a lesão (Guth e cols., 1981; 1985). Alguns desses trabalhos não obtiveram sucesso em promover a regeneração nervosa, porém, identificaram diversos fatores que poderiam contribuir para o insucesso da regeneração do tecido nervoso central como a inabilidade para o crescimento axonal (Kiernan, 1979), bloqueio por tecido conectivo (Krikorian e cols., 1981) ou glial (Estable-Puig e Estable-Puig, 1972) e mecanismos imunológicos (Berry e Riches, 1974). Entretanto, a inabilidade do tecido nervoso central para regeneração não seria um fator limitante, visto que foi demonstrado que ele era capaz de produzir novos brotamentos que podiam crescer por consideráveis distâncias com o auxílio de uma ponte utilizando nervos periféricos (Kao e cols., 1977; David e Aguayo, 1981; Richardson e cols., 1982). Com isso, surgiu a necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais que permitissem uma melhor análise e compreensão dos mecanismos envolvidos nos eventos iniciais da lesão e também dos processos regenerativos. Neste sentido, vários trabalhos têm demonstrado a eficiência de modelos que utilizam o frio ou o congelamento como técnicas para o estudo de lesões no tecido nervoso periférico e central.

Na década de 60 Cooper (1964) demonstrou que aplicação de  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto era suficiente para produzir necrose tecidual. Nesse tempo, um conjunto considerável de informações sobre os efeitos do congelamento estava disponível a partir de estudos de tecidos *in vitro* dirigidos a criopreservação e a partir de trabalhos experimentais e clínicos sobre congelamento (Kreyberg, 1949; Meryman, 1956; Mazur, 1963; Pegg, 1966;). Na literatura criocirúrgica durante os próximos anos, era freqüentemente afirmado que a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  era letal para as células e que

esta temperatura produzida no tecido poderia alcançar um efeito destrutivo (Poswillo, 1971; Spiller e Spiller, 1972).

Diversos procedimentos para induzir criolesão foram desenvolvidos como o congelamento rápido, descongelamento lento e a repetição do ciclo congelamento-descongelamento (Cooper, 1965; Gage e cols., 1965). A natureza da criolesão foi objeto de inúmeras investigações em um esforço para definir a temperatura apropriada e dosar o tempo adequado dos ciclos de congelamento-descongelamento. Criocirurgias experimentais ou terapêuticas exigem que um volume de tecido seja congelado, com a utilização de técnicas e instrumentos para controlar o processo de congelamento. O rápido e intenso congelamento do tecido *in situ*, como é feito em processos criocirúrgicos, produz uma localizada e bem demarcada ferida. A natureza da resposta tecidual varia com a intensidade da lesão, ou seja, uma menor lesão criogênica produz apenas uma resposta inflamatória e uma maior lesão criogênica produz destruição tecidual. Comumente a intenção do tratamento criocirúrgico é a de destruir tecidos, tais como neoplasias, o que justifica a necessidade de precisão do tratamento (Gage e Baust, 1998).

Os efeitos destrutivos do congelamento no tecido são devidos a uma série de fatores que podem ser agrupados em dois grandes mecanismos, um imediato e outro tardio. A causa imediata da lesão é o efeito direto do congelamento e dos ciclos de congelamento-descongelamento sobre as células. A causa da lesão tardia constitui a progressiva insuficiência da microcirculação e estase vascular (Gage e Baust, 1998). Os efeitos deletérios da baixa temperatura sobre as células começam quando a temperatura cai na faixa hipotérmica e a função e estrutura das células, incluindo seus constituintes protéicos e lipídicos, são estressados. Assim que a temperatura é reduzida, o metabolismo celular começa a reduzir progressivamente. Se a hipotermia permanecer, a célula é tão afetada negativamente que pode morrer

(Chang e Baust, 1995). À medida que a temperatura cai para o congelamento a água é cristalizada, o que implica em consequências mais graves do que o esfriamento (Gage e Baust, 1998). A formação de cristais de gelo ocorre primeiro no espaço extracelular. A retirada da água do sistema cria uma hiperosmolaridade extracelular que, por sua vez, promove a saída de água das células, predominantemente no congelamento moderado de até aproximadamente -20°C. Como o processo continua, cristais de gelo crescem, as células encolhem e membranas celulares e componentes são danificados. Dado o tempo suficiente, o aumento da concentração de eletrólito é suficiente para destruir as células (Mazur, 1984). Entretanto, esses efeitos deletérios da desidratação celular e concentração de soluto nem sempre são letais para as células, no entanto a formação de gelo intracelular é uma grave ameaça para a viabilidade da célula e é quase sempre letal (Mazur, 1963; 1984; Pegg, 1987). Dessa forma, o congelamento rápido, como é o caso da aplicação de nitrogênio líquido, tende a ser mais deletério que o esfriamento progressivo, pois não há tempo suficiente para que a água deixe as células, ocorrendo grande formação de cristais de gelo intracelular. Uma vez formado, o gelo intracelular lesa organelas e membranas celulares e a morte celular é praticamente certa (Mazur, 1984). Após completar o descongelamento, o tecido anteriormente congelado permanece hipotérmico por minutos e os tecidos danificados são sujeitos a continuação do desarranjo metabólico durante este tempo (Gage e Baust, 1998).

Como já mencionado, a insuficiência progressiva da microcirculação e a estase vascular constituem o efeito tardio da criolesão (Gage & Baust, 1998). A perda da circulação e a anóxia celular são considerados os principais causadores de danos neste tipo de lesão. Estudos *in vivo* demonstraram que após o descongelamento do tecido uma estase microcirculatória é rapidamente desenvolvida (Virgilio e cols. 1964; Zacarian e cols., 1970).

A resposta inicial dos tecidos ao frio é a vasoconstrição e uma diminuição do fluxo de sangue; com o congelamento a circulação cessa. Quando o tecido descongela e sua temperatura sobe mais que 0°C, a circulação volta, agora com vasodilatação. A resposta hiperêmica é breve e ocorre aumento da permeabilidade vascular dentro de poucos minutos. A lesão endotelial resulta em aumento da permeabilidade da parede capilar, edema, agregação plaquetária e formação de microtrombos (ver figura 6), o que resulta em estagnação da circulação por cerca de 30-45 minutos (Whittaker, 1984). Pequenos vasos sanguíneos são completamente ocluídos por trombos 4h após o descongelamento. Grandes arteríolas permanecem abertas por 24h (Adams-Ray e cols. 1956). A perda do fornecimento de sangue para as células impossibilita a sobrevivência resultando em necrose tecidual uniforme, exceto na periferia do tecido congelado. De acordo com Gage e Baust, (1998) essa uniformidade de morte celular tem convencido muitos pesquisadores de que o principal mecanismo para a morte dos tecidos na criocirurgia é a isquemia e sugere a dominância dos efeitos vasculares na criolesão.

Diversos trabalhos *in vivo* utilizam os métodos de lesão por criogenia para estudar alterações teciduais e moleculares envolvidos nos processos de lesão e reparo tecidual do sistema nervoso periférico (Bennet e Xie 1988; Jia e Pollock, 1997) e central (Cook e cols., 1998; Knerlich e cols., 1999; Quintana e cols., 2005, 2007). Jia e Pollock (1997) demonstraram que a agregação intravascular observada nos vasos nervosos após a aplicação de frio não-congelante é seguida por um fenômeno de não-reperfusão que culmina com dano endotelial e oclusão trombótica tardia. O mesmo grupo (Jia e cols., 1998) demonstrou também que a aplicação de frio não-congelante (3,5 °C) no nervo ciático promove bloqueio reversível da condução de potenciais de ação e destruição das fibras nervosas com maior

prejuízo das fibras mielinizadas, e que a gravidade desse comprometimento varia de acordo com o tempo de exposição do nervo ao frio.

Miroshnikova e Chumasov (1988) analisaram, por meio de microscopia eletrônica e de luz, a dinâmica da restauração estrutural do nervo ciático após três tipos de lesões diferentes, dentre elas o congelamento local (lesão por criogenia). Em comparação aos outros tipos de lesão, a lesão por criogenia foi considerada o melhor modelo para o estudo dos processos de reparação do tecido nervoso periférico. Outros estudos foram realizados utilizando a lesão por criogenia em nervos periféricos de ratos como modelo que reproduz neuropatia periférica e desordens na sensação dolorosa (Bennet e Xie 1988; Rochelle e cols., 1995).

A criolesão do córtex frontoparietal constitui um modelo experimental bem estabelecido (Cook e cols., 1998; Knerlich e cols., 1999; Quintana e cols., 2005, 2007) que leva a ruptura focal da barreira hemato-encefálica, edema cerebral, gliose, recrutamento de células inflamatórias, morte necrótica e apoptótica e aumento da expressão de genes na tentativa de aumentar a sobrevivência neuronal e promover a regeneração do parênquima cerebral (Sanz e cols., 2009).

Sirén e cols (2006) descreveram um modelo de neurodegeneração crônica, lento e progressivo, induzido pela criolesão parietal unilateral, realizada através do osso intacto de ratos jovens. Essa lesão resultou em atrofia cortical global e déficit cognitivo similar ao observado na esquizofrenia. Utilizando o mesmo modelo, Sargin e cols (2009) demonstraram que a pequena criolesão parietal iniciava um lento processo inflamatório que levava a neurodegeneração progressiva.

Politi e cols (1985) estudaram o efeito da dexametasona no acúmulo de ácido-graxos livres e diacilglicerol durante edema cerebral induzido por lesão criogênica no hemisfério direito de ratos. O mesmo modelo foi utilizado por Cook e

cols. (1998) que analisaram a expressão de 18 diferentes tipos de genes em 8 tempos diferentes, entre 1 hora e 28 dias no córtex e hipocampo de ratos.

Coolins e cols. (1986) utilizaram diferentes técnicas de criolesão para tentar estudar o processo de regeneração da medula espinhal através de microscopia eletrônica. Segundo alguns autores, este modelo oferece algumas vantagens para o estudo da lesão e regeneração do tecido nervoso (West e cols., 2001). O efeito primário do congelamento sobre os axônios foi bastante similar ao efeito primário da lesão traumática (Balentine e cols., 1978), sem entretanto, mudanças nas estruturas medulares e vasculares associadas ao trauma, o que pode ser o principal problema no estudo do trauma medular. Ao mesmo tempo o caráter não invasivo da lesão pelo frio é similar a lesão contusional não invasiva, que compreende a maioria das lesões medulares que ocorrem em seres humanos. Não apenas meninges e vasos sanguíneos permanecem intactos, mas toda a descontinuidade física entre os segmentos rostral e caudal da lesão é evitado. Adicionalmente, a variabilidade tanto na quantidade quanto na qualidade dos danos em função da temperatura e do tempo de exposição ao frio permite uma extensiva investigação dos mecanismos de lesão e reparo.

Nossos experimentos revelaram que após a aplicação do nitrogênio líquido na medula espinhal dos ratos, ainda durante o procedimento cirúrgico, era possível observar que vasos sanguíneos, meninge e a medula espinhal permaneciam visualmente intactos (ver figura 5), como descrito em outros trabalhos (Balentine e cols., 1978; Coolins e cols., 1986). Da mesma forma, Gage e Baust (1998) relataram que imediatamente após o descongelamento o tecido parece quase normal e a extensão do dano não pode ser previsto a partir de sua aparência. Por meio da análise histológica foi observado que a medula espinhal foi severamente destruída no sítio de aplicação do nitrogênio líquido e que a gravidade da lesão foi reduzida

progressivamente conforme o afastamento do sítio de aplicação do nitrogênio líquido, tanto na direção rostral quanto caudal. Esses dados estão em concordância com o trabalho de Haas e Taylor (1948) onde a lesão criogênica foi caracterizada por uma área acentuadamente lesada correspondente ao volume de tecido que foi previamente congelado. A parte central da lesão criogênica era constituída completamente por tecido com vasta lesão, mas a periferia apresentava uma pequena margem de tecidos danificados parcialmente onde a temperatura durante o congelamento não atingiu valores tão críticos. Gage e Baust (1998) também relataram que na periferia de tecidos previamente congelados existe uma mistura de células mortas e vivas e também que durante vários dias após a criolesão pode ser observada a morte de algumas células. Da mesma forma, nosso estudo demonstrou que a aplicação de nitrogênio líquido na medula espinhal de ratos é um modelo capaz de causar lesão focal evitando a descontinuidade física medular, possibilitando um estudo restrito da lesão e da recuperação locomotora dos animais.

## **7.2. AVALIAÇÃO LOCOMOTORA**

A escala de avaliação locomotora desenvolvida em meados dos anos 90 por Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) permite avaliar as habilidades locomotoras de ratos. O desenvolvimento da escala foi baseado na progressão natural da recuperação da locomoção de ratos após lesão medular torácica (Basso e cols., 1995). A escala BBB foi criada com o intuito de ampliar a escala criada por Tarlov e Klinger (1954) de 0-5 pontos para uma escala de 0-21 pontos, avaliando um maior repertório de movimentos. Na avaliação realizada por meio da escala BBB foi observada a função locomotora do animal caminhando livremente em uma arena semelhante a do Teste do Campo Aberto. A ausência dos movimentos nos membros posteriores é representado pela pontuação 0. As pontuações iniciais estão

relacionadas com movimentos articulares isolados dos membros posteriores. Desta forma, quanto maior o número de articulações exibindo movimentos, ou quando estes movimentos se tornam mais intensos, ocorre um aumento desta pontuação. À medida que os movimentos locomotores aumentam, uma maior pontuação é dada para o posicionamento plantar das patas, sustentação de peso e coordenação entre os membros anteriores e posteriores. A pontuação final é dada pela abertura dos dedos, estabilidade do tronco e posicionamento da cauda (Basso e cols., 1995).

Este sistema de pontuação usa uma escala ordinal onde a parte inicial da recuperação está relacionada a aspectos grosseiros da locomoção, enquanto as partes médias e superiores incluem aspectos discretos da habilidade motora dos animais (Metz e cols., 2000). Desta forma, a escala BBB pode ser dividida em três fases: 1) o ganho de movimentos das articulações dos membros posteriores sejam eles discretos ou em toda amplitude articular; 2) capacidade de dar passadas e ganho de qualidade na caminhada; e 3) ganho de posicionamento correto das patas e cauda, abertura dos dedos, estabilidade de tronco e elevação da cauda (Basso e cols., 1995). Além disso, a escala BBB demonstra relação com o grau de lesão e comprometimento histológico (Basso e cols., 1996) e alta reprodutibilidade com mínimas diferenças entre observadores (Basso e cols., 1995, 1996; Metz e cols., 2000). Assim, a escala de avaliação locomotora tornou-se muito utilizada em vários trabalhos e proporcionou parâmetros de comparação entre estudos de diferentes laboratórios na análise da lesão medular, mostrando relação entre o grau de comprometimento histológico e modificações no comportamento locomotor (Wrathall, 1992; Dimar e cols., 1999; Fouad e cols., 2000; Metz e cols., 2000; Brown, 2005; Mallei e cols., 2005; Schiaveto de Souza e cols., 2006; Yang, 2007; Saganová e cols., 2008).

Em nosso laboratório Schiaveto de Souza (2004 – tese de doutorado) utilizou a escala BBB para avaliação locomotora de ratos submetidos ao estreitamento do canal vertebral em 35 e 50%, demonstrando déficit locomotor proporcional ao grau de comprometimento medular na pontuação da escala BBB nos dias subsequentes ao procedimento cirúrgico. Esse trabalho demonstrou ainda alta correlação entre os resultados da escala BBB e o teste do plano inclinado. Utilizando o mesmo modelo de lesão medular por estreitamento do canal vertebral de 35%, Garcez (2008) fez uso da escala de avaliação locomotora e demonstrou que a descompressão associada a um doador de óxido nítrico (NOC 12) promoveu redução da extensão da lesão e um aumento na pontuação da escala BBB.

Em nosso estudo a avaliação dos animais por meio da escala de avaliação locomotora BBB mostrou que a lesão medular produzida pela aplicação de jato de nitrogênio líquido promoveu modificações no comportamento locomotor, e foi sensível ao tratamento subcrônico, via intraperitoneal, com canabidiol 10 e 20mg melhorando a recuperação dos animais. Os resultados da escala BBB neste estudo mostraram que a lesão por criogenia induziu lesão medular grave com importante déficit locomotor, de acordo com Basso e cols., (1996). Isto pode ser constatado em todas as avaliações pós-operatórias com a pontuação variando de 0 à aproximadamente 7 pontos nos grupos, lesão+canabidio 10mg e lesão+canabidiol 20mg. Um dia após a lesão medular, os animais lesão+veículo, lesão+canabidiol 10mg e lesão+canabidiol 20mg apresentavam pontuação na escala BBB igual a 0, ou seja, nenhum movimento dos membros posteriores. Com o decorrer do tempo os animais apresentaram recuperação progressiva, após 7 dias todos os grupos apresentavam déficits locomotores significativos.

O tratamento com canabidiol após a lesão medular de ratos melhorou, a recuperação locomotora dos animais, como mostrado pela pontuação na escala

BBB. O grupo tratado com canabidiol 20mg, no terceiro dia, apresentou uma melhora na função locomotora quando comparado aos grupos veículo e canabidiol 10mg, atingindo pontuação na escala BBB de aproximadamente 2 pontos (movimento amplo de uma articulação ou movimento amplo de uma articulação e movimento discreto de outra articulação) contra 1 ponto (movimento discreto de uma ou duas articulações) dos outros grupos. No sétimo dia os grupos tratados com canabidiol 10mg e 20mg apresentaram uma melhora na função locomotora atingindo uma pontuação de 6 (movimento amplo de duas articulações e movimento discreto da terceira) e 7 pontos (movimento amplo das três articulações do membro posterior), respectivamente, quando comparados com o grupo que recebeu veículo que atingiu 4 pontos (Movimento discreto das três articulações). Apesar da melhora dos animais todos os grupos se mantiveram na 1ª fase da escala, demonstrando incapacidade de sustentação de peso e realização de passos plantares, que é de fundamental importância para realização da caminhada. Por meio da análise da escala de avaliação locomotora nossos resultados sugerem que o tratamento com canabidiol auxilia a recuperação neurológica dos animais. Resultados semelhantes foram observados em modelos experimentais de neurodegeneração aguda e crônica (Mechoulam e cols., 2002; Iuvone e cols., 2004; Pertwee, 2001; Lastres-Becker e cols., 2005; Esposito e cols., 2006; Garcia-Arencibia e cols., 2007).

### **7.3. TESTE DE RETIRADA DA CAUDA (TAIL FLICK)**

Além do teste comportamental da escala BBB, nosso estudo avaliou também o teste de retirada de cauda após estímulo térmico. No terceiro dia após a lesão foi encontrado um aumento na latência para retirada de cauda do grupo lesão+canabidiol 10mg quando comparado com o grupo laminectomia no mesmo período. Além disso, sete dias após a lesão o grupo lesão+canabidiol 10mg teve um

aumento na latência para retirada de cauda quando comparado ao mesmo grupo no terceiro dia e aos outros grupos no sétimo dia. Apesar desta diferença os valores medidos em todos os grupos se mantiveram dentro da faixa de normalidade para a latência da retirada de cauda (2,5-3,5 segundos). Alguns estudos de lesão medular utilizam o teste para avaliar a nocicepção (Advokat, 2002; Schiaveto de Souza, 2004). Portanto, nossos resultados não demonstraram modificação no reflexo de retirada de cauda nos animais submetidos à lesão medular por criogenia que receberam ou não tratamento com Canabidiol. Merkler e cols., (2001) encontraram resultados semelhantes, utilizando o mesmo teste após hemissecção dorsal da medula espinhal. Isto pode ser explicado analisando a natureza anatômica do reflexo. O estímulo térmico provocado na cauda do animal durante o teste depende de um reflexo medular que envolve os segmentos sacrais da medula espinhal (Watson e cols., 2009). Nosso modelo de lesão medular por criogenia foi realizado a nível torácico, o que nos permite sugerir que provavelmente os segmentos responsáveis por este reflexo tenham sido mantidos intactos.

#### **7.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA**

A histoquímica para hematoxilina-eosina do tecido medular sete dias após a lesão por criogenia revelou, nas secções próximas ao sítio da lesão, a presença de infiltrado celular, necrose, cavitação e fragmentação da substância branca e cinzenta. Estes sinais se espalhavam por quase todo o parênquima medular. À medida que se distanciava do sítio da lesão estes achados diminuían e nos cortes analisados nas porções mais distantes do sítio da lesão foi observada a presença de pequenas áreas de infiltrado celular e cavitação, principalmente nas regiões córtico espinhal dorsal, fascículo grácil e fascículo dorso lateral (Watson e cols., 2009). Adicionalmente, a imunohistoquímica para Neu-N revelou na região do corno ventral

nas lâminas de Rexed VIII e XI, sinais de sofrimento celular, possivelmente relacionados com a morte neuronal. A lesão medular obtida nesse trabalho assemelhou-se aquela descrita em outros estudos que utilizaram modelos de lesão medular distintos (Basso e cols., 1996; Sharma e cols., 1996; Beattie e cols., 1997; Liu e cols., 1997; Carlson e cols., 2003).

#### **7.4.1. Imunohistoquímica para Fos-b**

O tratamento com canabidiol 20mg após lesão medular por criogenia induziu redução significativa no número de células que expressaram proteína Fos-b, nas lâminas VIII e IX do corno ventral, nos seguimentos rostral e caudal 3 – 9 mm distantes do epicentro da lesão, quando comparados com os animais do grupo que não receberam tratamento. Além disso, os animais que não sofreram lesão medular (grupos controle e laminectomia) tiveram fraca expressão desta proteína. Estes resultados corroboram àqueles encontrados por Xu e cols., (2001) em outro modelo de lesão medular. Além disso, outros autores encontraram resultados semelhantes com outra proteína da família Fos (Ruggiero e cols., 1997; Del Bel e cols., 2000; Xu e cols., 2001).

Após lesões medulares uma série de mudanças tanto moleculares quanto celulares ocorre (Schwab e cols., 2006). Genes de expressão imediata da família *Fos* e *Jun* aumentam sua expressão após lesão no SNC (An e cols., 1993; Yang e cols., 1994). Além disso, após lesão medular, ocorre a ativação da AP-1. A AP-1 é um dímero composto por várias proteínas da família Fos e Jun (Chiu e cols., 1988; Halazonets e cols., 1988), funciona como um fator de transcrição pró-inflamatório, ativando uma série de genes transcritos na inflamação, dentre esses encontra-se o MMPs (matriz metaloproteinase; Wisdom, 1999). A expressão excessiva de MMPs aumenta a permeabilidade capilar em numerosas desordens neurológicas como

esclerose múltipla, infecções e isquemia (Yong e cols., 1998). Da mesma forma, alterações na permeabilidade vascular e processos inflamatórios têm sido demonstrados na lesão medular (Hsu e cols., 1985). Desta forma, as modificações ocorridas no SNC após lesão medular estão relacionadas com o aumento da atividade de neurônios lesados bem como a indução funcional da proteína Fos-b. Nossos resultados não permitem concluir se a expressão de Fos-b está envolvida em processos regenerativos ou degenerativos do SNC. Entretanto, como houve uma diminuição da proteína Fos-b nos animais que apresentaram melhora da função locomotora, os resultados sugerem que esta expressão estaria associada à piora dos animais.

#### **7.5. EXTENSÃO DA LESÃO**

Diversos estudos foram realizados com o intuito de desenvolver formas de medidas da lesão medular para correlacionar a intensidade de lesão e os danos teciduais na medula, tais como: medidas de volume de lesão por ressonância magnética (Carlson e cols., 2003), medidas por reconstrução tridimensional (Beattie e cols., 1996; Kigerl, 2006; Popovich, 2006), medidas de tecido medular poupado da lesão (Basso e cols., 1996; Kigerl e Mcgaughy, 2006; Popovich, 2006), medidas da extensão longitudinal da lesão (Kigerl e Mcgaughy, 2006; Popovich, 2006), além de avaliações qualitativas de secções transversais e longitudinais (Dimar e cols., 1999; Beattie e cols., 1996). Nos resultados da extensão total da lesão, sete dias após a lesão medular, o tratamento com canabidiol 20mg foi capaz de reduzir significativamente a extensão longitudinal total da lesão em ratos, quando comparados com os animais que não receberam canabidiol. Foram realizadas ainda, medidas de tecido poupado de lesão, a partir de secções transversais, nas regiões rostral e caudal ao sítio da lesão, sete dias após a lesão criogênica. Os resultados

mostraram que o tratamento com canabidiol 20mg em ratos com lesão medular, promoveu uma diminuição na lesão tecidual, o que pode ser constatado pela maior área de tecido preservado, quando comparado aos animais que não receberam tratamento. Além disso, foi observado que quanto maior o volume de lesão, maior foi o prejuízo locomotor, o que está de acordo com outros trabalhos na literatura (Dimar e cols., 1999; Fouad e cols., 2000; Metz e cols., 2000; Brown, 2005; Brown e cols., 2005; Mallei e cols., 2005; Schiaveto de Souza e cols., 2006; Yang, Kim e Lee, 2007; Saganová e cols., 2008). Não existem dados de nosso conhecimento que demonstrem associação dos efeitos do tratamento com canabidiol após lesão medular e a redução da extensão da lesão. Porém, vários estudos têm relatado o seu efeito neuroprotetor em outras patologias do SNC, o que está de acordo com nossos resultados (Mechoulam e cols., 2002; Iuvone e cols., 2004; Pertwee, 2001; Mishima e cols., 2005; Lastres-Becker e cols., 2005; Esposito e cols., 2006; Garcia-Arencibia e cols., 2007).

## **7.6. CANABIDIOL**

Várias abordagens terapêuticas vêm sendo utilizadas na lesão medular a fim de reduzir a formação do edema, processo inflamatório, liberação de glutamato e de radicais livres. Dentre todas essas abordagens, a de maior impacto clínico até o momento é a aplicação do anti-inflamatório esteroide - metilprednisolona (Lim e Tow, 2007) que pode ser administrada durante a fase aguda da lesão (< 8hs) (Swab e cols., 2006). Porém, esse tipo de tratamento pode trazer complicações como feridas infecciosas, sangramento estomacal, pancreatite, pneumonia, entre outras. (Short e cols., 2000; Hulbert, 2001).

Em nosso estudo foi utilizado o tratamento sub-crônico com canabidiol a fim de reduzir os processos fisiopatológicos que ocorrem após a lesão medular. O efeito

protetor atribuído ao tratamento com canabidiol pode estar ligado a vários fatores como redução do dano isquêmico (Mishima e cols., 2005), ação anti-inflamatória (Malfait e cols., 2000), efeito anti-oxidante (Eshhar e cols., 1995; Hampson e cols., 1998) e neuroprotetor (Mechoulam e cols., 2002; Iuvone e cols., 2004; Malfait e cols., 2000; Lastres-Becker e cols., 2005; Esposito e cols., 2006; Garcia-Arencibia e cols., 2007). Segundo Zhang e Guth (1997) a lesão da vasculatura local na medula espinhal causa redução da perfusão apropriada do tecido, o que promove uma desorganização da estrutura e da função medular. Schiaveto de Souza e cols. (2006) demonstraram que a lesão medular induzida tanto por contusão quanto por estreitamento do canal vertebral reduz a vascularização da medula espinhal e esta redução é proporcional à intensidade da lesão. Mishima e cols., (2005) demonstraram uma significativa redução do dano isquêmico cerebral, induzido pela oclusão da artéria cerebral média, após tratamento com canabidiol. Este efeito não pode ser revertido quando utilizado antagonista de receptor canabinóide do tipo CB1 e antagonista de receptor vanilóide, porém, este efeito foi revertido, em parte, com o uso de um antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> (WAY100135), sugerindo que o efeito do canabidiol, no infarto cerebral, possa estar envolvido com estes receptores. Hayakawa e cols. (2006), utilizando o mesmo modelo de lesão, demonstraram que além do canabidiol o  $\Delta^9$ -THC também reduz o dano isquêmico induzido pela oclusão da artéria cerebral média, porém o tratamento repetitivo com  $\Delta^9$ -THC promove tolerância diminuindo seus efeitos, provavelmente por causar dessensibilização dos receptores CB1, o que não ocorreu com o uso do canabidiol. Além disso, demonstrou também que o efeito do canabidiol foi revertido com o uso do antagonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Estudo realizado por Braidá e cols. (2003), demonstrou que após a administração de canabidiol ocorria uma redução dos danos causados pela isquemia cerebral após oclusão bilateral da carótida em gerbis. Além

disso, o exame histológico mostrou completa sobrevivência dos neurônios CA1 no hipocampo, dos animais tratados com canabidiol. Esses estudos sugerem que o uso do canabidiol, em lesões isquêmicas do SNC, promove uma potente ação terapêutica, embora os seus mecanismos de ação não estejam claros e precisam ser elucidados.

A resposta inflamatória após a lesão medular é gerada pela ativação microglial e granulócitos, monócitos e linfócitos provenientes do sangue que migram entre a defeituosa barreira hemato-encefálica (Schwab e Bartholdi, 1996). Estas células secretam um conjunto de atrativos químicos, que induz o acúmulo de leucócitos, tanto no local da lesão quanto no lúmen do vaso aferente. Em seguida, ocorre esgotamento energético devido a crescente disfunção metabólica levando a morte celular (Schwab e cols. 2006). Estes eventos são gerados e mantidos por vários mediadores celulares denominados citocinas. Uma dessas citocinas é o Fator de Necrose Tumoral (TNF), que é particularmente importante na cascata de outras citocinas com participação no processo inflamatório (Feldmann, 2002). Além do TNF, espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas cujas atividades anti-tumoral e antimicrobiana são de grande importância na proteção de sistemas do organismo (Murray e cols. 1980). Porém, altos níveis de TNF e ROS podem causar inflamação, lesão celular e podem contribuir para o choque séptico, portanto, a principal terapêutica é a utilização de drogas que ativam o sistema imune e limitam os efeitos deletérios do TNF e ROS (Mechoulam e cols., 2002). Estudos *in vitro* têm demonstrado que canabinóides como o  $\Delta^9$ -THC possuem efeitos de modulação no sistema imunológico inibindo respostas proliferativas dos linfócitos T, atividade citotóxica celular, supressão e inibição de NO produzido pelos macrófagos, entre outros (Watzl e cols., 1991; Formukong e cols., 1988; Klein e cols., 1998). Além do  $\Delta^9$ -THC o canabidiol tem despertado grande interesse de pesquisadores por possuir

potentes propriedades anti-inflamatórias, sem efeitos psicotrópicos e com baixa toxicidade (Sumariwalla e cols., 2004). Malfait e cols. (2002) examinaram o efeito do canabidiol em dois modelos de artrite reumatóide e demonstraram que a administração de canabidiol, tanto oral quanto intraperitoneal, foi um efetivo tratamento no bloqueio da progressão da doença. O tratamento com canabidiol mostrou uma diminuição na produção de IFN- $\gamma$  (citocina pró-inflamatória) e do TNF, demonstrando ação anti-inflamatória e imunossupressora combinada. Outro estudo desenvolvido por Sumariwalla e cols. 2004 utilizando o mesmo método demonstrou que o HU-320, um material sintético derivado do canabidiol, produziu efeitos supressores na resposta imune e na produção de mediadores pró-inflamatórios, indicando a utilização do HU-320 como uma droga sintética sem efeitos psicoativos, com ação anti-inflamatória. Desta forma, o canabidiol tem demonstrado importantes efeitos no tratamento de manifestações patológicas decorrentes dos processos inflamatórios.

Além dos fatores discutidos até o momento que podem estar ocorrendo na lesão medular, outros fatores envolvendo alguns íons também são descritos. No início, após alguns minutos decorrentes da lesão, o potencial de membrana celular é perdido e, desta forma, os neurônios e células da glia tornam-se despolarizados. Isto promove a ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes resultando na liberação de aminoácidos excitatórios para o espaço extracelular (Lee e cols., 1999). A liberação de aminoácidos excitatórios promove a ativação de receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), induzindo uma nova sobrecarga neuronal de cálcio, resultando em um grande influxo de sódio e cloreto e um grande efluxo de potássio. Esse mecanismo promove a liberação intracelular de ROS e depleção de glutatona, contribuindo para a excitotoxicidade pós-traumática (Hall, 2004). Vários trabalhos tem demonstrado efeitos importantes do uso do canabidiol

em processos de neurodegeneração aguda e crônica, além de efeitos anti-oxidantes melhores que o ascorbato (vitamina C) e o tocoferol (vitamina E). Lastres-Becker e cols. (2005) estudaram os efeitos dos canabinóides após lesão por 6-hidroxi-dopamina, *in vivo* e *in vitro*, em modelos da doença de Parkinson. Primeiramente, esses autores demonstraram que a administração de canabinóides, *in vivo*, reduzia a neurodegeneração produzida pela injeção de 6-hidroxi-dopamina no feixe prosencefálico medial. Duas semanas após a aplicação da toxina ocorreu uma significativa depleção de dopamina e redução da atividade e do RNAm para tirosina hidroxilase na substância negra. A administração do  $\Delta^9$ -THC, após duas semanas, diminuiu significativamente a redução, porém falhou por afetar parâmetros dopaminérgicos em estruturas contralaterais. O efeito neuroprotetor do  $\Delta^9$ -THC também foi atingido com o uso do canabidiol, porém sem efeito adverso, sugerindo que as propriedades neuroprotetoras desses compostos não são mediadas por receptores canabinóides e podem estar ligadas a ações anti-inflamatórias. Outro estudo desenvolvido por Garcia-Arencibia (2007), utilizando o mesmo modelo de lesão demonstrou que a administração do canabidiol imediatamente após a lesão diminuiu a depleção dopaminérgica, porém este tratamento falhou quando iniciado uma semana após a lesão. Em adição, o mesmo trabalho mostrou que o efeito do canabidiol promove aumento do RNAm para Cu/Zn-superóxido dismutase (enzima endógena na defesa contra o estresse oxidativo) e que seu efeito não foi dependente de receptor canabinóide, demonstrando assim, importante efeito neuroprotetor na degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais que ocorre na doença de Parkinson. Iuvone e cols., (2004) estudaram, em cultura de células, um possível mecanismo neuroprotetor do canabidiol em modelo de neurodegeneração, induzida pela  $\beta$ -amilóide, que ocorre na doença de Alzheimer. Foi observada uma redução na sobrevivência de células

expostas a  $\beta$ -amilóide e esse efeito foi associado ao aumento da produção de ROS e peroxidação lipídica, tanto quanto ao aparecimento da caspase-3 (enzima sinalizadora da cascata de apoptose celular), fragmentação do DNA e aumento do cálcio intracelular. O tratamento das células com canabidiol, primeiramente, aumentou a sobrevivência das células expostas a  $\beta$ -amilóide e diminuiu a produção de ROS, peroxidação lipídica, os níveis da caspase-3, fragmentação do DNA e o cálcio intracelular. Esses resultados indicaram que o canabidiol exerce uma combinação de efeitos neuroprotetor, anti-oxidativo e anti-apoptótico contra a toxicidade induzida pela  $\beta$ -amilóide além de inibir a caspase-3, por inativação de seu precursor, a pró-caspase-3, estando o canabidiol envolvido na via de sinalização para a neuroproteção. Hampson e cols. (1998) estudaram os efeitos do canabidiol e de outros canabinóides em culturas de neurônios corticais expostas a níveis tóxicos do neurotransmissor excitatório glutamato e demonstraram que o canabidiol e o  $\Delta^9$ -THC reduziram a toxicidade promovida. Foi também demonstrado que esta proteção foi mediada pelos receptores NMDA e Kainato, receptores esses, ativados, em parte, por canais de cálcio voltagem-dependente. A neuroproteção observada não foi alterada por antagonista de receptor canabinóide e o canabidiol foi capaz de reduzir os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio, sendo seu efeito mais potente que o de outros anti-oxidantes como o ascorbato (ou ácido ascórbico) ou o  $\alpha$ -tocoferol. Em outro trabalho, o mesmo grupo estudando culturas de neurônios corticais, expostas a níveis tóxicos de glutamato, demonstrou que o uso do canabidiol reduziu a neurotoxicidade mediada por receptores NMDA, AMPA e Kainato, demonstrando um efeito anti-oxidante (Hampson e cols., 2000). Hamelink e cols (2005) demonstraram que o consumo de álcool, em ratos, induz importante neurodegeneração no hipocampo e no córtex entorrinal envolvendo a atividade de receptores NMDA e o uso do canabidiol promoveu neuroproteção nessas áreas,

similar ao efeito de outros anti-oxidantes. Em contraste, demonstraram também, que o uso de antagonistas de receptores NMDA não preveniu morte celular.

Estudos de neuroimagem em culturas hipocampais utilizando fluoróforo citosólico (fura-2 AM) sugerem que a regulação de cálcio mediada pelo canabidiol é bidirecional e dependente da excitabilidade das células. Ryan e cols., 2009 realizaram estudo caracterizando os mecanismos pelos quais o canabidiol regula a homeostase do cálcio e promove neuroproteção em preparações neuronais e demonstraram que, com níveis fisiológicos de potássio e cálcio, a administração de CDB causou um sutil aumento na concentração interna de cálcio, enquanto que, em condições de alta excitabilidade, o canabidiol reduziu as concentrações internas e preveniu as oscilações de cálcio. Os mesmos autores demonstraram também que a regulação da concentração interna de cálcio não foi mediada pelas interações com rianodina ou receptores IP3 do retículo endoplasmático. Com auxílio do fura-2 AM e do fluoróforo mitocondrial (Rhod-FF, AM) os autores mostraram que as mitocôndrias agem como fontes para a regulação da concentração interna de cálcio mediada pelo canabidiol. A aplicação de carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) e do inibidor do trocador sódio/cálcio mitocondrial, CGP 37157, impediu as respostas do cálcio induzidas pelo canabidiol. Em células humanas, do tipo neuroblastoma (SH-SY5Y), tratadas com toxinas mitocondriais, o canabidiol teve efeito neuroprotetor. Desta forma, foi sugerido que sob condições patológicas envolvendo disfunção mitocondrial e desregulação de cálcio, o canabidiol pode revelar-se benéfico na prevenção da sinalização apoptótica através da restauração da homeostase de cálcio.

Embora os mecanismos de ação do canabidiol permaneçam obscuros ele exhibe diversos efeitos, muitos deles de grande importância terapêutica nas patologias envolvendo o SNC. Neste modelo de lesão medular podemos sugerir que

o canabidiol promoveu um efeito neuroprotetor, como já descrito em outros estudos. Porém, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na ação do canabidiol neste tipo de lesão precisam ser melhor elucidados para o maior entendimento de sua ação.

## 8. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que:

- ✓ A aplicação de jato de nitrogênio líquido na medula espinhal de ratos induz déficit locomotor grave de acordo com a avaliação da escala BBB;
- ✓ O tratamento com canabidiol melhora a recuperação motora como revelado pelo aumento na pontuação da escala BBB;
- ✓ O tratamento com canabidiol reduz a extensão da lesão e diminui a expressão da proteína Fos-b no corno ventral da medula espinhal sete dias após a lesão;
- ✓ Estes resultados indicam que o tratamento com canabidiol promove redução da propagação da lesão e melhora da recuperação funcional após lesão medular pela aplicação de jato de nitrogênio líquido na medula espinhal.

# Referências Bibliográficas

---

---

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAYO, A. J.; DAVID, S.; BRAY, G. M. Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol*, v. 95, p. 231-240, 1981.

ADAMS-RAY J, BELLMAN S Vascular reactions after experimental cold injury; a microangiographic study of rabbit ears. *Angiology*, v. 7, n. 4, p.339-367, 1956.

ADVOKAT C. Spinal transection increases the potency of clonidine on the tail-flick and hindlimb flexion reflexes. *Eur J Pharmacol.*, v. 437, n. 1-2, p. 63-7.

AMAR, A. P.; LEVY, M. L. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*, v. 44, n. 5, p. 1027-1039, 1999.

AMERI A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* v. 58, p. 315-348,1999.

BALENTINE J.D. Pathology of experimental spinal cord trauma. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab. Invest.* v.39, p. 236-253, 1978.

BARUT, S.; CANBOLAT, A.; BILGE, T.; AYDIN, Y.; COKNESELI, B.; KAYA, U. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. *Neurosurg.Rev.*, v. 16, n.1, p. 53-59, 1993.

BASAVARAJAPPA B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein. Pept. Lett.*, v. 14, p. 237-246, 2007.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*, v. 139, n. 2, p. 244-256, 1996.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, v. 12, n. 1, p. 1-21, 1995.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C.; ANDERSON, D. K.; FADEN, A. I.; GRUNER, J. A.; HOLFORD, T. R.; HSU, C. Y.; NOBLE, L. J.; NOCKELS, P. L.; PEROT, P. L.; SALZMAN, S. K.; YOUNG, W. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. *J Neurotrauma*, v. 13, n. 7, p. 343-359, 1996.

BEATTIE P. The relationship between symptoms and abnormal magnetic resonance images of lumbar intervertebral disks. *Phys Ther.*, v. 76, n. 6, p. 601-608, 1996.

BEATTIE MS, BRESNAHAN JC, KOMON J, TOVAR CA, VAN METER M, ANDERSON DK, FADEN AI, HSU CY, NOBLE LJ, SALZMAN S, YOUNG W. Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp Neurol.*, v. 148, n. 2, p. 453-463, 1997.

BENNETT GJ, XIE YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, v. 33, n. 1, p.87-107, 1988.

YOUNG, W. Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp Neurol*, v. 148, n. 2, p. 453-463, 1997.

BELANGER, E.; LEVI, A. D. The acute and chronic management of spinal cord injury. *J Am Coll Surg*. v. 190, n. 5, p. 603-618, 2000.

BERRY M, RICHES AC. An immunological approach to regeneration in the central nervous system. *Br Med Bull*. v. 30, n. 2, p.135-140, 1974.

BISOGNO T.; HANUS L.; DE PETROCELLIS L.; TCHILIBON S.; PONDE D.E.; BRANDI I.; MORIELLO A.S.; DAVIS J.B.; MECHOULAM R.; DI MARZO V. Molecular targets for cannabidiol and its syntetic analogues: effect on vanilloid VR receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol.*, v. 134, n. 4, p. 845-852, 2001.

BOYD, J. G.; GORDON, T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci*, v. 15, p. 613-626, 2002.

BRAIDA D.; PEGORINI S.; ARCIDIACONO M.V.; CONSALEZ G.G.; CROCI L.; SALA M. Post-ischemic treatment with cannabidiol prevents electroencephalographic flattening, hyperlocomotion and neuronal injury in gerbils. *Neurosci Lett.*, v.346, n. 1-2, p. 61-64, 2003.

BRANDOLI C.; SHI B.; PFLUG.; ANDREWS P.; WRATHALL J. R.; MOCCHETTI I. Dexamethasone reduces the expression of p75 neurotrophin receptor and apoptosis in contused spinal cord. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v. 87, n. 1, p. 61-70, 2001.

BROWN, K. M.; WOLFE, B. B.; WRATHALL, J. R. Rapid functional recovery after spinal cord injury in young rats. *J Neurotrauma*, v. 22, n. 5, p. 559-574, 2005.

CARLINI E. A.; GAUDUROZ J.C.; NOTO A.R. ; NAPPO S.A.; I Levantamento domiciliary sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país. CEBRID: UNIFESP; 2002.

CARLSON, G. D.; GORDEN, C. D.; NAKAZAWA, S.; WADA, E.; SMITH, J. S.; LAMANNA, J. C. Sustained spinal cord compression: part II: effect of methylprednisolone on regional blood flow and recovery of somatosensory evoked potentials. *J Bone Joint Surg Am*, v. 85-A, n. 1, p. 95-101, 2003.

CARLSON, G. D.; GORDEN, C. D.; OLIFF, H. S.; PILLAI, J. J.; LAMANNA, J. C. Sustained spinal cord compression: part I: time-dependent effect on long-term pathophysiology. *J Bone Joint Surg Am*, v. 85-A, n. 1, p. 86-94, 2003.

CARRIER E.J.; AUCHAMPACH J.A.; HILLARD C.J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. sci USA*, v. 103, n. 20, p. 7895-7900, 2006.

CHANG Z, FINKELSTEIN JJ, MA H, BAUST J. Development of a high-performance multiprobe cryosurgical device. *Biomed Instrum Technol.*, v. 28, n. 5, p. 383-390, 1994.

CHIU R, BOYLE WJ, MEEK J, SMEAL T, HUNTER T, KARIN M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell.*, v. 54, n. 4, p. 541-552, 1998.

COLLINS G.H.; WEST N.R.; PARMELY J.D.; SAMSON F.M.; WARD D.A. The histopathology of freezing injury to the rat spinal cord. A light microscope study. Early degenerative changes. *J. Neurophatol and Exp. Neurol.*, v. 45, n. 6, p. 721-741, 1986

COOK DJ, ORSZULAK TA, DALY RC. Minimum hematocrit at differing cardiopulmonary bypass temperatures in dogs. *Circulation*, v. 98, n. 19, p. 170-174, 1998.

COOPER IS, GIOINO G. Temperature gradients during cooling and freezing in the human brain. *Cryobiology*, v. 1, n. 5, p. 341-344, 1965.

COOPER KE, JOHNSON RH, SPALDING JM. The effects of central body and trunk skin temperatures on reflex vasodilatation in the hand. *J Physiol.*, v. 174, p. 46-54, 1964.

CROWE M.J.; BRESNAHAN J. C.; SHUMAN L.; MASTERS J. N.; BEATTIE M.S. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat. Med.*, v. 3, p. 73-76, 1997.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Ther*, v. 72, p. 74-79, 1941.

DAVID S, AGUAYO AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science*, v. 214, n.4523, p. 931-933, 1981.

DE PETROCELLIS L.; CASCIO M.G.; DI MARZO V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol.*, v. 141, n. 5, p. 765-774, 2004.

DEL BEL, E. A.; BORGES, C. A.; DEFINO, H. L.; GUIMARAES, F. S. Induction of Fos protein immunoreactivity by spinal cord contusion. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 33, n.5, p. 521-528, May 2000.

DELAMARTER, R. B.; SHERMAN, J.; CARR, J.B. Pathophysiology of spinal cord injury. Recovery after immediate and delayed decompression. *J Bone Joint Surg Am*, v. 77, n. 7, p. 1042-1049, 1995.

DITUNNO J. F.; LITTLE J. W.; TESSLER A.; BURNS A. S. Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal cord*, v. 42, p. 383-395, 2004.

DIMAR, J. R. 2ND; GLASSMAN, S. D.; RAQUE, G. H.; ZHANG, Y. P.; SHIELDS, C. B. The influence of spinal canal narrowing and timing of decompression on neurologic recovery after spinal cord contusion in a rat model. *Spine*, v. 24, n. 16, p. 1623-1633, 1999.

DI MARZO V.; MATIAS I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.*, v. 8, p. 585-589, 2005.

DUMONT R. J.; OKONKWO D. O.; VERNA S.; HURBERT R. J.; BOULOS P.T.; ELLEGALA D.B. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin. Neuropharmacol.*, v. 24, n. 5, p. 254-264, 2001.

DUSART I.; SCHWAB M. E. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J. Neurosci.*, v. 6, n. 5, p. 712-724, 1994

EMERY, E.; ALDANA, P.; BUNGE, M. B.; PUCKETT, W.; SRINIVASAN, A.; KEANE, R. W.; BETHEA, J.; LEVI, A. D. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, v. 89, n. 6, p. 911-920, 1998.

ESHHAR N, STRIEM S, KOHEN R, TIROSH O, BIEGON A. Neuroprotective and antioxidant activities of HU-211, a novel NMDA receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, v. 283, n. 1-3, p. 19-29, 1999..

ESPOSITO G, DE FILIPPIS D, CARNUCCIO R, IZZO AA, IUUVONE T. The marijuana component cannabidiol inhibits beta-amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/beta-catenin pathway rescue in PC12 cells. *J Mol Med*. v. 84, n. 3, p. 253-258, 2006.

ESTABLE-PUIG JF, DE ESTABLE-PUIG R. Remyelination in the central nervous system: critical evaluation and presentation of a new experimental model. *Vie Med Can Fr.*, v. 1, n. 6, p. 593-594, 1972.

FERNANDEZ-RUIZ J.; BERRENDERO F.; HERNÁNDEZ M.L.; RAMOS J. A. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci.*, v. 23, p. 14-20, 2000.

FITCH M.T.; DOLLER C.; COMBS C. K.; LANDRETH G. E. ; SILVER J. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J. Neurosci.*, v. 19, n. 19, p. 8182-8192, 1999.

FORMUKONG EA, EVANS AT, EVANS FJ. Analgesic and antiinflammatory activity of constituents of *Cannabis sativa* L. *Inflammation* v. 12, n. 4, p. 361-371, 1988.

FOUAD, K.; METZ, G. A.; MERKLER, D.; DIETZ, V.; SCHWAB, M. E. Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. *Behav Brain Res*, v. 115, n. 1, p. 107-113, 2000.

FOWLER C.J.; NILSSON O.; ANDERSSON M.; DISNEY G.; JACOBSSON S.O.P.; TIGER G. Pharmacological properties of cannabinoid receptors in the avian brain: similarity of rat and chicken cannabinoid 1 receptor recognition sites and expression of cannabinoid 2 receptor-like immunoreactivity in the embryonic chick brain. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 88, p. 213-22, 2001.

FREUND T.F.; KATONA I.; PIOMELLI D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.*, v. 83, p. 1017-1066, 2003.

FRIDE E. Endocannabinoids in the central nervous system – an overview. *Prostaglandins Leukot Essent. Fatty Acids*, v. 66, p. 221-233, 2002.

FRIDE E. The endocannabinoid-CB(1) receptor system in pre- and postnatal life. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 500, p. 289-297, 2004.

GAGE A.A.; KOEPF S.; WEHRLE D.; EMMINGS F. Cryotherapy for cancer of the lip and oral cavity. *Cancer*, v.18, n.12, p. 1646-1651, 1965.

GAGE A.A, BAUST J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology*, 1998 v. 37, n. 3, p. 171-186, 1998.

GAO, Y.; NIKULINA, E.; MELLADO, W.; FILBIN, M. T. Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase dependent inhibition of phosphodiesterase. *J. Neuroscience*, v. 23, n. 37, p. 11770-11777, 2003.

GARCEZ, VF. Estudo experimental da descompressão do canal medular em ratos associada à injeção intratecal de NOC 12. 2008. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

GARCÍA-ARENCEBIA M.; GONZÁLEZ S.; DE LAGO E.; RAMOS JÁ.; MECHOULAM R.; FERNÁNDEZ-RUIZ J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res.*, v. 1134, n. 1, p. 162-170, 2007.

GAUDUROZ J.C.; NOTO A.R.; NAPO S. A.; CARLINE E. A. Trends in drug use among students in Brazil: analysis of four surveys in 1987, 1989, 1993 and 1997. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 37, n. 4, p. 523-531, 2004.

GELLER, H. M.; FAWCETT, J. W. Building a bridge: engineering spinal cord repair. *Exp Neurol*, v. 174, n. 2, p. 125-136, 2002.

GERNER H.J. Clinical Rehabilitation of the spinal cord injury patient-is the Guttman concept still valid? *Rehabilitation (Stuttg.)* v. 31, p. 143-146, 1992.

GIGLIO, C. A.; DEFINO, H. L.; DA-SILVA, C. A.; DE-SOUZA, A. S.; DEL BEL, E. A. Behavioral and physiological methods for early quantitative assessment of spinal cord injury and prognosis in rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 39, n. 12, p. 1613-1623, 2006.

GINESTET, L.; FERRARIO, JE; RAISMAN-VOZARI, R. HIRSCHI, EC.; DEBEIR, T. Donepezil induces a cholinergic sprouting in basocortical degeneration. *J. of Neuroche.*, v. 102, p. 434-440, 2007.

GILBERT G.L.; KIM H.J.; WAATAJA J.J.; THAYER S.A. Delta9-tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity. *Brain Res.*, v.1128, n. 1, p. 61-69, 2007.

GRANDPRÉ, T.; NAKAMURA, F.; VARTANIAN, T.; STRITTMATTER, S. M. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature*, v. 403, p. 439-444, 2000.

GRUNDY R.I.; RABUFFETTI M.; BELTRAMO M. Cannabinoids and Neuroprotection. *Mol. Neurobiol.*, v. 24, p. 29-51, 2001.

GUIMARÃES F.S.; CHIARETTI T.M.; GRAEFF F. G.; ZUARD A.W.; Anti anxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, v.100, n. 4, p. 558-559, 1990.

GUTH L, BARRETT CP, DONATI EJ, SMITH MV, LIFSON M, ROBERTS E. Enhancement of axonal growth into a spinal lesion by topical application of triethanolamine and cytosine arabinoside. *Exp Neurol.*,v. 88, n. 1, p. 44-55, 1985.

HALL W., PACULAR.L. Cannabis use and dependence: public health and public policy. Cambridge University Press, 2003

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

HALAZONETIS TD, GEORGOPOULOS K, GREENBERG ME, LEDER P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell*, v. 55, n. 5, p. 917-924, 1988.

HANSEN H.H.; AZCOITIA I.; PONS S.; ROMERO J.; GARCÍA-SEGURA L.M.; RAMOS J.A.; HANSEN H.S.; FERNÁNDEZ-RUIZ J. Blockade of cannabinoid CB(1) receptor function protects against in vivo disseminating brain damage following NMDA-induced excitotoxicity. *J Neurochem.*, v. 82, n. 1, p.154-158, 2002.

HAMELINK C, HAMPSON A, WINK DA, EIDEN LE, ESKAY RL. Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 314, n. 2, p. 780-788, 2005.

HAMPSON AJ, GRIMALDI M, AXELROD J, WINK D. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 95, n. 14, p. 8268-8273, 1998.

HAMPSON AJ, GRIMALDI M, LOLIC M, WINK D, ROSENTHAL R, AXELROD J. Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Ann N Y Acad Sci*, v. 899, p. 274-282, 2000.

HASHIMOTODANI I.Y; OHNO-SHOSAKU T.; KANO M. Endocannabinoids and Synaptic Function in the CNS. *Neuroscientisti*, v.13, p. 127-137, 2007.

HAYAKAWA K, MISHIMA K, NOZAKO M, OGATA A, HAZEKAWA M, LIU AX, FUJIOKA M, ABE K, HASEBE N, EGASHIRA N, IWASAKI K, FUJIWARA M. Repeated treatment with cannabidiol but not Delta9-tetrahydrocannabinol has a neuroprotective effect without the development of tolerance. *Neuropharmacology*, v. 52, n. 4, p. 1079-1087, 2007.

HSU CY, DIMITRIJEVIC MR. Methylprednisolone in spinal cord injury: the possible mechanism of action. *J Neurotrauma*, v. 7, n. 3, p. 115-119, 1990.

HOUWELING, D. A.; VAN ASSELDONK, J. T.; LANKHORST, A. J.; HAMERS, F. P.; MARTIN, D.; BÄR, P. R.; JOOSTEN, E. A.. Local application of collagen containing brain-derived neurotrophic factor decreases the loss of function after spinal cord injury in the adult rat. *Neurosci Lett*, v. 251, n. 3, p. 193-196, 1998.

HOWLLETT A.C.; BARTH F.; BONNER T.I.; CABRAL G.; CASELLAS PDEVANE W. A.; FELDER C.C; HERKENHAM M.; MACKIE K.; MARTIN B.R.; MECHOULAM R.; PERTWEE R. G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol. Rev.*, v. 54, p. 161-202, 2002.

HURLBERT RJ. The role of steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine.*, v. 26, n. 24, p. 39-46, 2001.

IUVONE T.; ESPOSITO G.; ESPOSITO R.; SANTAMARIA R.; DI ROSA M.; IZZO A.A. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem.*, v.89, n. 1, p. 134-141, 2004.

JACKSON S.J.; DIEMEL L.T.; PRYCE G. BAKER D. Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. *J Neurol Sci.*, v.233,n. 1-2, p. 21-25, 2005.

JIA J, POLLOCK M. The pathogenesis of non-freezing cold nerve injury. Observations in the rat. *Brain*, 1997 v. 120, n. 4, p. 631-646, 1997.

JIA J, POLLOCK M, JIA J. Cold injury to nerves is not due to ischaemia alone. *Brain*. v.121, n. 5, p. 989-1001, 1998.

KAO CC, CHANG LW, BLOODWORTH JM JR. The mechanism of spinal cord cavitation following spinal cord transection. Part 2. Electron microscopic observations. *J Neurosurg.*, v. 46, n. 6, p.745-756, 1977.

KALB, R. G.;STRITTMATTER, S. M. *Neurobiology of Spinal Cord Injury*. Humana Press, 2000.

KATHMANN M.; FLAU K.; REDMER A.; TRÄNKLE C.; SCHLICKER E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, v.372, n.5, p.354-361. 2006.

KARNIOL I.G.; CARLINI E.A. Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacologia*. v.33, n.1, p.53-70, 1973.

KEIRSTEAD, H. S.; HASAN, S. J.; MUIR, G. D.; STEEVES, J. D. Suppression of the onset of myelination extends the permissive period for the functional repair of embryonic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 89, p. 11664-11668, 1992.

- KIERNAN JA. Hypotheses concerned with axonal regeneration in the mammalian nervous system. *Biol Rev Camb Philos Soc.*, v.54, n.2 p.155-197, 1979.
- KIGERL, K. A.; MCGAUGHY, V. M.; POPOVICH, P. G. Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury. *J Comp Neurol*, v. 494, n. 4, p. 578-594, 2006.
- KLEIN TW, NEWTON C, FRIEDMAN H. Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol Today* v.19, n. 8, p. 373-381, 1998.
- KNERLICH F, SCHILLING L, GÖRLACH C, WAHL M, EHRENREICH H, SIRÉN AL. Temporal profile of expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1beta and interleukin converting enzyme after cryogenic lesion of the rat parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res.*, v. 68, n. 1-2, p. 73-87, 1999.
- KORSCHING S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci.*, v. 13, n. 7, p. 2739-2748, 1993.
- KREYBERG L. Development of acute tissue damage due to cold. *Physiol Rev.*, v. 29, n. 2, p.156-167, 1949.
- KRIKORIAN J.G.; GUTH L.; DONATI E.J. Origin of the connective tissue scar in the transected rat spinal cord. *Exp Neurol.*, v. 72, n. 3, p. 698-707, 1981.
- KWON, B. K.; TETZLAFF, W. Spinal cord regeneration: from gene to transplants. *Spine*, v. 26, n. S24, p. S13-22, 2001.
- LASTRES-BECKER I, MOLINA-HOLGADO F, RAMOS JA, MECHOULAM R, FERNÁNDEZ-RUIZ J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, v. 19, n. 1-2, p. 96-107, 2005.
- LEE JM, ZIPFEL GJ, CHOI DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, v. 399, n. 6738, p. 7-14, 1999.
- LEONELLI M.; BRITTO L. R.; CHAVES G. P.; TORRAO A.S. Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system. *Develop. Brain. Res.*, v.156, p. 176-182,2005.
- LEUNG P.Y.; WRATHALL J. R. Local and distal responses to injuru in the rapid functional recovery from spinal cord contusion in rats pups. *Exp. Neurol.*, v.202, p. 225-237, 2006.
- LEVI-MONTALCINI R.. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987; 237 (4819): 1154-62.
- LI G. L.; BRODIN G.; FAROOQUE M.; FUNA K.; HOLTZ A.; WANG W. L.; OLSSON Y. Apoptosis and expression of BCL-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J. neurophatol Exp. Neurol.*, v. 55, p. 280-289, 1996.

LIM, P. A.; TOW, A. M. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singapore*, v. 36, n. 1, p. 49-57, 2007.

LIU, F.; YOU, S. W.; YAO, L. P.; LIU, H. L.; JIAO, X. Y.; SHI, M.; ZHAO, Q. B.; JU, G. Secondary degeneration reduced by inosine after spinal cord injury in rats. *Spinal Cord*, v. 44, n. 7, p. 421-426, 2006.

LIU, X. Z.; XU, X. M.; HU, R.; DU, C.; ZHANG, S. X.; MCDONALD, J. W.; DONG, H. X.; WU, Y. J.; FAN, G. S.; JACQUIN, M. F.; HSU, C. Y.; CHOI, D. W. Neuronal and Glial Apoptosis after Traumatic Spinal Cord Injury. *J Neurosci*, v. 17, n. 14, p. 5395-5406, 1997.

LU, J.; WAITE, P. Advances in spinal cord regeneration. *Spine*, v. 24, n. 9, p. 926-930, 1999.

LUTZ B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, v. 66, p. 123-142, 2002.

MA, M.; BASSO, D. M.; WALTERS, P.; STOKES, B. T.; JAKEMAN, L. B. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57Bl/6 mouse. *Exp Neurol*, v. 169, n. 2, p. 239-254, 2001.

MAGNUS T.; CHAN A.; SAVILL J.; TOYKA K. V.; GOLD R. Phagocytotic removal of apoptotic, inflammatory lymphocytes in the central nervous system by microglia and its functional implications. *AACN Clin. Issues*, v. 11, n. 2, p. 1-9, 2002.

MALFAIT AM, GALLILY R, SUMARIWALLA PF, MALIK AS, ANDREAKOS E, MECHOULAM R, FELDMANN M. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 97, n. 17, p. 9561-9566, 2000.

MALLEI, A.; ADEN, S. A.; BACHIS, A.; BRANDOLI, C.; ONGINI, E.; MOCCHETTI, I. The nitrosteroid NCX1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. *Brain Res*, v. 1062, n. 1-2, p. 16-25, 2005.

MARSICANO G.; MOOSMANN B.; HERMANN H.; LUTZ B.; BEHL C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem.*, v.80, n. 3, p.448-456, 2002.

MATO S.; DEL OLMO E.; PAZOS A. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *Eur. J. Neurosci.*, v.17, p. 1747-1754, 2003.

MATSUDA L.A.; LOLAIT S.J.; BROWNSTEIN M.J.; YOUNG A.C.; BONNER T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v. 346, p.561-564, 1990.

MAZUR P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol.*, 1963 v.47, p. 347-69, 1963.

MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* v. 247, n. 3 Pt 1, p. 125-142, 1984.

MCDONALD J. W., SADOWSKY C. Spinal cord injury. *Lancet.* v. 359, n. 9304, p. 471-425, 2002.

MECHOULAM R. Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, v. 66. p. 93-99, 2002.

MELLON SH. Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 78, n. 5, p. 1003-1008, 1994.

MERYMAN HT. Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science*, v. 124, n. 3221, p. 515-521, 1956.

MERKLER, D.; METZ, G. A. S.; RAINETEAU, O.; DIETZ, V.; SCHWAB, M. E.; FOUAD, K. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor nogo-A. *J Neurosci*, v. 21, n. 10, p. 3665–3673, 2001.

METZ, G. A.; MERKLER, D.; DIETZ, V.; SCHWAB, M. E.; FOUAD, K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res*, v. 883, n. 2, p. 165-177, 2000.

MIROSHNIKOVA ME, CHUMASOV EI. Regeneration of the rat sciatic nerve after various experimental lesions (morphologic and morphometric analysis). *Arkh Anat Gistol Embriol.*, v. 95, n. 10, p. 30-35, 1988.

MISHIMA K.; HAYAKAWA K.; ABE K.; IKEDA T.; EGASHIRA N.; IWASAKI K.; FUJIWARA M. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-Hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanism. *American Heart Association*, v. 36, n. 5, p. 1071-1076, 2005.

MOLANDER, C.; XU, Q.; RIVERO-MELIAN, C.; GRANT, G. Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J Comp Neurol*, v. 289, n. 3, p. 375-385, 1989.

MUNRO R.J.; THOMAS K.L.; ABU-SHAAR M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v. 365, p. 61-65, 1993.

MURRAY HW, COHN ZA. Mononuclear phagocyte antimicrobial and antitumor activity: the role of oxygen intermediates. *J Invest Dermatol.*, v. 74, n. 5, p. 285-288, 1980.

NOVIKOVA, L. N.; NOVIKOV, L. N.; KELLERTH, J. O. Differential effects of neurotrophins on neuronal survival and axonal regeneration after spinal cord injury in adult rats. *J Comp Neurol*, v. 452, n. 3, p. 255-263, 2002.

NYBERG, F.; SHARMA, H. S. Repeated topical application of growth hormone attenuates blood-spinal cord barrier permeability and edema formation following

spinal cord injury: an experimental study in the rat using Evans blue, ([125]I)-sodium and lanthanum tracers. *Amino Acids*, v. 23, n. 1-3, p. 231-239, 2002.

NYSTRÖM, B.; BERGLUND, J. E. Spinal cord restitution following compression injuries in rats. *Acta Neurol Scand*, v. 78, n. 6, p. 467-472, 1988.

NOBLE L.J.; WRATHALL J.R. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol.*, v.88, n. 1, p.135-149 1985.

ONAIVI E.S.; GREEN M.R.; MARTIN B.R. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 253, n. 3, p. 1002-1009, 1990.

OUDEGA M., HAGG T.. Neurotrophins promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord. *Brain Res.* 1999; 818: 431-38

PANIKASHVILI D.; SIMEONIDOU C.; BEN-SHABAT S.; HANUS L.; BREUER A.; MECHOULAM R.; SHOHAMI E. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature*, v. 413, n. 6855, p. 527-531, 2001.

PEGG D.E. Close tolerance cooling apparatus for cryobiological studies. *Lab Pract.* v.15, n. 7, p.772-773, 1966.

PEGG D.E.; HUNT C.J.; FONG L.P. Osmotic properties of the rabbit corneal endothelium and their relevance to cryopreservation. *Cell Biophys.*, v. 10, n. 2, p. 169-89, 1987.

PERTWEE R.G. Cannabinoids receptors and pain. *Prog. Neurobiol.*, v.63, p. 569-611, 2001.

PETITET F.; JEANTAUD B.; REIBAUD M.; IMPERATO A.; DUBROEUCQ M.C. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci.*, v. 63, n. 1, p.1-6, 1998.

PLEMEL, J. R.; DUNCAN, G.; CHEN, K. W.; SHANNON, C.; PARK, S.; SPARLING, J. S.; TETZLAFF. W. A graded forceps crush spinal cord injury model in mice. *J Neurotrauma*, v. 25, n. 4, p. 350-370, 2008.

POLITI LE, RODRIGUEZ DE TURCO EB, BAZAN NG. Dexamethasone effect on free fatty acid and diacylglycerol accumulation during experimentally induced vasogenic brain edema. *Neurochem Pathol.*, v. 3, n. 4, p.249-269, 1985.

POSWILLO D.E. Cryosurgery and electrosurgery compared in the treatment of experimentally induced oral carcinoma. *Br Dent J.*, 1971 v. 131, n. 8, p. :347-352.

QUINTANA A, GIRALT M, ROJAS S, PENKOWA M, CAMPBELL IL, HIDALGO J, MOLINERO A. Differential role of tumor necrosis factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury. *J Neurosci Res*, v. 82, n. 5, p. 701-16, 2005.

QUINTANA A, GIRALT M, MOLINERO A, CAMPBELL IL, PENKOWA M, HIDALGO J. Analysis of the cerebral transcriptome in mice subjected to traumatic brain injury: importance of IL-6. *Neuroimmunomodulation*, v.14, n. 3-4, p. 139-143, 2007.

RAINETEU O., SCHWAB M.E.. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; 2(4): 263-73.

RAMOS J.A.; DE MIGUEL R.; CEBEIRA M.; HERNANDEZ-RUIZ J.J. Exposure to cannabinoids in the development of endogenous cannabinoid system. *Neurotox. Res.*, v. 4, p. 363-372, 2002.

REIER, P. J. Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and translational neurobiology. *NeuroRx*, v. 1, n. 4, p. 424-451, 2004.

RICHARDSON P.M.; ISSA V.M.; SHEMIE S. Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic nerve. *J Neurocytol.*, v. 11, n. 6, p. 949-966 1982.

ROCHELLE LG, MORANA SJ, KRUSZYNA H, RUSSELL MA, WILCOX DE, SMITH RP. Interactions between hydroxocobalamin and nitric oxide (NO): evidence for a redox reaction between NO and reduced cobalamin and reversible NO binding to oxidized cobalamin. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 275, n. 1, p.48-52, 1995.

RUGGIERO, D. A.; ANWAR, M.; KIM, J.; SICA, A. L.; GOOTMAN, N.; GOOTMAN, P. M. Induction of c-fos gene expression by spinal cord transection in the rat. *Brain Res.*, v. 763, n.1, p. 21-29, July 1997.

RUSSO E.B.; BURNETT A.; HALL B.; PARKER K.K. Agonistic properties of anabidiol at 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Neurochem. Res.*, v. 30, n. 8, p.1037-1047, 2005.

RYAN D, DRYSDALE AJ, LAFOURCADE C, PERTWEE RG, PLATT B. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *J Neurosci*, v. 29, n. 7, p. 2053-2063, 2009.

SADOWSKY C., VOLSHTEYN O., SCHULTZ L., MCDONALD J.W. Spinal cord injury. *Disabil Rehabil.* V. 24, n. 13, p. 680-687, 2002.

SAGANOVÁ, K.; ORENDÁCOVÁ, J.; CÍZKOVÁ, D.; VANICKÝ, I. Limited minocycline neuroprotection after balloon-compression spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett*, v. 433, n. 3, p. 246-249, 2008.

SANZ E, QUINTANA A, VALENTE T, MANSO Y, HIDALGO J, UNZETA M. Monoamine oxidase-B activity is not involved in the neuroinflammatory response elicited by a focal freeze brain injury. *J Neurosci Res.*, v. 87, n. 3, p.784-94, 2009.

SARGIN D, HASSOUNA I, SPERLING S, SIRÉN AL, EHRENREICH H. Uncoupling of neurodegeneration and gliosis in a murine model of juvenile cortical lesion. *Glia.*, v. 57, n. 7, p. 693-702, 2009.

SAUNDERS, R. D.; DUGAN, L. L.; DEMEDIUK, P.; MEANS, E. D.; HORROCKS, L. A.; ANDERSON, D. K. Effects of methylprednisolone and the combination of alpha-

tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J.Neurochem.*, v. 49, n.1, p. 24-31, July 1987.

SCHIAVETO DE SOUZA, A.; NEVES DO NASCIMENTO, L.; DA SILVA, C. A.; DEFINO, H. L. A.; DEL BEL, E. A. Vascular changes induced in the spinal cord by mechanical traumatism and permanent compression of the medullary canal in rats. *Rev Bras Ortop*, v. 41, n. 6, p. 221-226, 2006.

SCHIAVETO-DE-SOUZA, A. Estudo da lesão medular em ratos produzida pelo estreitamento do canal vertebral. 2004. 219 f. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

SCHWAB M. E.; BARTHOLDI D.; Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Reviews*, v. 76, n. 2, p. 319-369, 1996.

SCHWAB, J. M.; BRECHTEL, K.; MUELLER, C. A.; FAILLI, V.; KAPS, H. P.; TULI, S. K.; SCHLUESENER, H. J. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective. *Prog Neurobiol*, v. 78, n. 2, p. 91-116, 2006.

SCHWAB M.E.; THOENEN H. Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci.*, v. 5, n. 9, p. 2415-2423, 1985.

SHARMA, H. S. Neuroprotective effects of neurotrophins and melanocortins in spinal cord injury: an experimental study in the rat using pharmacological and morphological approaches. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1053, p. 407-421, 2005.

SHARMA, H. S.; WESTMAN, J.; OLSSON, Y.; ALM, P. Involvement of nitric oxide in acute spinal cord injury: an immunocytochemical study using light and electron microscopy in the rat. *Neurosci Res*, v. 24, n. 4, p. 373-384, 1996.

SHORT DJ, EL MASRY WS, JONES PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord*, v. 38, n. 5, p. 273-286, 2000.

SIRÉN AL, RADYUSHKIN K, BORETIUS S, KÄMMER D, RIECHERS CC, NATT O, SARGIN D, WATANABE T, SPERLING S, MICHAELIS T, PRICE J, MEYER B, FRAHM J, EHRENREICH H. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain*, v. 129, n. 2, p. 480-489, 2006.

SMEYNE, R. J.; SCHILLING, K.; OBERDICK, J.; ROBERTSON, L.; LUK, D.; CURRAN, T.; MORGAN, J. I. A fos-lac Z transgenic mouse that can be used for neuroanatomic mapping. *Adv.Neurol.*, v. 59, p. 285-291, 1993.

SOUZA, A. S.; NASCIMENTO, L. N.; SILVA, C. A.; DEFINO, H. L. A.; DEL BEL, E. A. Estudo experimental das alterações vasculares da medula espinhal induzidas por traumatismo mecânico e compressão do canal vertebral. *Rev Bras Ortop*, v. 41, n. 6, p. 221-226, 2006.

SPILLER WF. Cryosurgery in dermatologic office practice with special reference to basal cell carcinoma. *Tex Med.*, v. 68, n. 9, p. 84-88, 1972.

SRIVASTAVA M.D.; SRIVASTAVA B.I.; BROUHARD B. Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology*, v.40, n.3, p.179-185, 1998.

SUMARIWALLA PF, GALLILY R, TCHILIBON S, FRIDE E, MECHOULAM R, FELDMANN M. A novel synthetic, nonpsychoactive cannabinoid acid (HU-320) with antiinflammatory properties in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 50, n. 3, p. 985-998, 2004.

SZALLASI A.; DI MARZO V. New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci.*, v. 23, p. 491-497, 2000.

TAGLIAFERRO P.; JAVIER RAMOS A.; EVRARD S. G.; LUJILDE J.; BRUSCO A.R. Neuronal cytoskeleton and synaptic densities are altered after a chronic treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Brain Res.*, v. 1085, p. 163-176, 2006.

TARLOV, I. M.; KLINGER, H. Spinal cord compression studies. II. Time limits for recovery after acute compression in dogs. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, v. 71, n. 3, p. 271-290, 1954.

TATAGIBA, M.; BRÖSAMLE, C.; SCHWAB, M. E. Regeneration of injured axons in the adult mammalian central nervous system. *Neurosurgery*, v. 40, n. 3, p. 541-547, 1997.

TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, v. 75, n. 1, p. 15-26, 1991.

TEASELL R. W.; ARNOLD J.M.; KRASSIOUKOV A.; DELANEY G. A. Cardiovascular consequences of loss of supraspinal control of the sympathetic nervous system after spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* v. 81, p. 506-516, 2000.

TRUDRUNG, P.; WIRTH, U.; MENSE, S. Changes in the number of nitric oxide-synthesizing neurones on both sides of a chronic transection of the rat spinal cord. *Neurosci Lett*, v. 287, p. 125-128, 2000.

USUL H.; CAKIR E.; ARSLAN E.; PEKSOYLU B.; ALVER A.; SAYIN O.C.; TOPBAS M.; BAYCAL S. Effects of clotrimazole on experimental spinal cord injury. *Arch. Med. Res.*, v. 37, n. 5, p. 571-575, 2006.

VAN DER STELT M.; VELDHUIS W.B.; MACCARRONE M. BÄR P.R.; NICOLAY K.; VELDINK G.A.; DI MARZO V. VLIEGENTHART J.F. Acute neuronal injury, excitotoxicity, and the endocannabinoid system. *Mol Neurobiol.* v. 26 n. 2-3, p. 317-46 2002.

VIRGILIO R.W.; LONG D.M.; MUNDTH E.D.; MCCLENATHAN J.E. The effect of temperature and hematocrit on the viscosity of blood. *Surgery*, v. 55, p. 825-830, 1964.

XU J, KIM GM, AHMED SH, XU J, YAN P, XU XM, HSU CY. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury. *J Neurosci*. v. 21, n. 1, p. 92-97, 2001.

WADA, S.; YONE, K.; ISHIDOU, Y.; NAGAMINE, T.; NAKAHARA, S.; NIIYAMA, T.; SAKOU, T. Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg*, v. 91, n. S1, p. 98-104, 1999.

WADA, S.; YONE, K.; ISHIDOU, Y.; NAGAMINE, T.; NAKAHARA, S.; NIIYAMA, T.; SAKOU, T. Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg*, v. 91, n.1, p. S98-104, 1999.

WATSON S.J.; BENSON J.A.; JOY J.E. Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. *Arch. Gen. Psychiatry*, v. 57, n. 6, p. 547-552, 2000.

WATSON C.; PAXINOS G.; KAYALIOGLU G. The spinal cord. A Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas. Academic Press, San Diego, CA 92101-4495, USA, 2009.

WATZL B, SCUDERI P, WATSON RR. Marijuana components stimulate human peripheral blood mononuclear cell secretion of interferon-gamma and suppress interleukin-1 alpha in vitro. *Int J Immunopharmacol*, v. 13, n. 8, p. 1091-1097, 1991.

WEISS L.; ZEIRA M.; REICH S.; HAR-NOY M.; MECHOULAM R.; SLAVIN S.; GALLILY R. Cannabidiol lowers incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Autoimmunity*, v.39, n. 2, p.143-151, 2006.

WEST NR, LEBLANC V, COLLINS GH. Support of axonal regrowth by endogenous mechanisms following spinal cord injury in adult rats. *Neuropathology*, v. 21, n. 3, p.188-202, 2001.

WHITTAKER DK. Mechanisms of tissue destruction following cryosurgery. *Ann R Coll Surg Engl.*, v. 66, n. 5, p. 313-318, 1984.

WRATHALL, J. R. Spinal cord injury models. *J Neurotrauma*, v. 9, n. S1, p. S129-34, 1992.

WU D.; SHIBUYA S.; MIYAMOTO O.; ITANO T.; YAMAMOTO T. Increase of NG2-positive cells associated with radial glia following traumatic spinal cord injury in adult rats. *J. Neurocytol.*, v. 34, n. 6, p. 459-469, 2005.

YANG K, MU XS, XUE JJ, WHITSON J, SALMINEN A, DIXON CE, LIU PK, HAYES RL. Increased expression of c-fos mRNA and AP-1 transcription factors after cortical impact injury in rats. *Brain Res.*, v. 664, n. 1-2 , p. 141-147, 1994.

YANG, J. Y.; KIM, H. S.; LEE, J. K. Changes in nitric oxide synthase expression in young and adult rats after spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 45, n. 11, p. 731-738, 2007.

YONG VW, KREKOSKI CA, FORSYTH PA, BELL R, EDWARDS DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci.*, v. 21, n. 2, p. 75-80, 1998.

YOUNG W.; KUME K.J.; CONSTANTINI S. Glucocorticoid therapy of spinal cord injury. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, v. 743, n. 241, p. 241-263, 1994.

ZACARIAN SA, STONE D, CLATER M. Effects of cryogenic temperatures on microcirculation in the golden hamster cheek pouch. *Cryobiology*, v. 7, n. 1, p. 27-39, 1970.

ZHANG, Z.; GUTH, L. Experimental spinal cord injury: Wallerian degeneration in the dorsal column is followed by revascularization, glial proliferation, and nerve regeneration. *Exp Neurol*, v. 147, n. 1, p. 159-171, 1997.

ZUARDI A.W.; SHIRAKAWA I.; FINKELFARB E.; KARNIOL I.G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)*, v.76, n. 3, p. 245-250, 1982.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)