



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

Adriano Guimarães Santos

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO
ÓLEO-RESINA DE *Copaifera reticulata* DUCKE APÓS LESÃO
EXCITOTÓXICA DO CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS**

BELEM
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Adriano Guimarães Santos

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO
ÓLEO-RESINA DE *Copaifera reticulata* DUCKE APÓS LESÃO
EXCITOTÓXICA DO CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal.

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Pereira Jr.

BELÉM
2010

Adriano Guimarães Santos

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO
ÓLEO-RESINA DE *Copaifera reticulata* DUCKE APÓS LESÃO
EXCITOTÓXICA DO CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal.

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Pereira Jr.

Data de aprovação:

Banca examinadora:

Wallace Gomes Leal
Professor Doutor
Universidade Federal do Pará

– Orientador

José Luiz Fernandes Vieira
Professor Doutor
Universidade Federal do Pará

José Luiz Martins do Nascimento
Professor Doutor
Universidade Federal do Pará

Para minha mãe **D. Iná**, e minha esposa

Maria do Socorro

Cujas realidades dos seus encantos
superam os primeiros da arte

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e aos colegas Ijair Rogério e Diego Siqueira, Rafael Lima e pelo apoio técnico.

Ao Professor José Luis Vieira, e aos doutores Maria das Graças Bichara Zoghbi e Osmar Lameiras pelas valiosas contribuições.

RESUMO

A resposta inflamatória pode exacerbar o processo lesivo após desordens neurais agudas. O óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke, uma planta medicinal amazônica popularmente utilizada como anti-inflamatório e cicatrizante, apresenta efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes após lesão aguda de tecidos não neurais. No entanto, não existem investigações sobre os possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do óleo-resina de copaíba (ORC) em modelos experimentais de desordens neurais agudas. No presente estudo, investigou-se os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do ORC em ratos adultos submetidos à lesão aguda induzida por N-Metil-D-Aspartato (NMDA) no córtex motor. Quatro grupos experimentais foram delineados: Animais do primeiro grupo (Grupo 1, N= 5) foram lesados com NMDA, e tratados com dose única de 400 mg/Kg (i.p) de ORC logo após a cirurgia, e perfundidos 24 horas após a indução de lesão excitotóxica. Como controle deste grupo (Grupo 2, N=5), os animais foram injetados apenas com o veículo do ORC. Em um outro grupo experimental, (Grupo 3) os animais foram injetados com NMDA e tratados, no dia seguinte, com duas doses diárias de 200 mg/kg (i.p) de 12 em 12 horas até o terceiro dia pós-lesão excitotóxica. Como controle deste grupo (Grupo 4), os animais receberam apenas o veículo do ORC. A análise histopatológica geral foi realizada em secções coradas pela violeta de cresila. Neutrófilos e macrófagos foram identificados por imunistoquímica com anticorpos específicos para estas células inflamatórias (anti-MBS1 e ED1, respectivamente). Realizou-se contagem de neutrófilos, micróglia/macrófagos ativados e corpos neuronais nos grupos experimentais mencionados. O tratamento com ORC induziu conspícuos efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores nos animais dos grupos 1 e 3. Houve cerca de 40% de diminuição do número de neutrófilos (Grupo 1 = $34,06 \pm 3,5$; Grupo 2 = $55,56 \pm 4,55$; $P < 0,01$) e 60 % de diminuição do número de macrófagos/micróglia ativados (Grupo 3 = $28,70 \pm 2,14$; Grupo 4 = $75,59 \pm 3,19$; $P < 0,01$) após tratamento com ORC. Houve diminuição de cavidades corticais nos animais tratados com ORC, 4 dias após a lesão excitotóxica. Os resultados sugerem que o tratamento com ORC possui efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores após lesão aguda do sistema nervoso central. Estudos futuros devem investigar os efeitos do ORC, com diferentes concentrações e tempos de sobrevida, sobre outras células inflamatórias, bem como os eventos moleculares subjacentes aos efeitos anti-inflamatório e neuroprotetores descritos

Palavras-Chave: Copaíba, NMDA, Excitotoxicidade, Neutrófilos, Macrófagos, Córtex Motor

Apoio Financeiro: FAPESPA/CNPQ

ABSTRACT

The inflammatory response may exacerbate the damage process after acute neural disorders. The oil-resin of *Copaifera reticulata* Ducke, an Amazonian medicinal plant popularly used as possessing both anti-inflammatory and healing activity, presents anti-inflammatory and anti-oxidants effects after acute disorders in non-neural tissues. However, there are no investigations on the possible anti-inflammatory and neuroprotective roles of Copaiba oil-resin (COR) in experimental models of acute neural disorders. In this study, was investigated the anti-inflammatory and neuroprotective effects of the COR in adult rats submitted to acute injury induced by N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) in the motor cortex. Four experimental groups were devised: Animals of the first group (Group 1, N = 5) were injected with NMDA, treated with a single dose of 400 mg/ kg (ip) of COR soon after surgery, and perfused 24 hours after induction of excitotoxic injury. As a control group (Group 2, N = 5), animals were injected with the COR vehicle only. In another experimental group (Group 3), animals were injected with NMDA and treated in the next day with two daily doses of 200 mg/kg (ip) from 12 to 12 hours up to the third day after excitotoxic injury. As a control group (Group 4), the animals received the COR vehicle only. The gross histopathological analysis was performed in sections stained with cresyl violet. Neutrophils and macrophages were identified by immunohistochemistry using antibodies specific to these inflammatory cells (anti-MBS1 and ED1, respectively). Countings of the number of neutrophils, activated macrophages/microglia and neuronal cell bodies were performed in the experimental groups. Treatment with COR induced conspicuous anti-inflammatory and neuroprotective effects and in animals belonging to groups 1 and 3. There was around of 40% decrease in the number of neutrophils (Group 1 = 34.06 ± 3.5 , Group 2 =, 55.56 ± 4.55 , $P < 0.01$) and 60% decrease in the number of activated macrophages/microglia (Group 3 = $28.70 \pm 2, 14$, Group 4 = 75.59 ± 3.19 , $P < 0.01$) after COR treatment. There was a decrease of cortical cavities in animals treated with COR at 4 days after excitotoxic injury. These results suggest that treatment with COR induces both anti-inflammatory and neuroprotective activities after acute damage of the central nervous system. Future studies should investigate the effects of COR, using different concentrations and survival times, on other inflammatory cells, as well as the molecular events underlying the anti-inflammatory and neuroprotective effects here described.

Key-Words: Copaiba, NMDA, Excitotoxicity, Neutrophils, Macrophages, Motor Cortex

Financial Support: FAPESPA/CNPQ

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Análise histopatológica revelada pela coração com violeta de cresila cresila37
- FIGURA 2** - O tratamento com copaíba diminui o recrutamento de neutrófilos após lesão aguda do córtex motor, como revelado por imuno-histoquímica específica para estas células inflamatórias.....38
- FIGURA 3** - Análise histopatológica revelada pela coração com violeta de cresila cresila40
- FIGURA 4** - O tratamento com copaíba diminui a ativação microglial/macrofágica após lesão aguda do córtex motor, como revelado por imuno-histoquímica específica para estas células inflamatórias.....41
- FIGURA 5** - Diminuição da cavitação cortical pelo tratamento com copaíba após lesão do córtex motor.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual do óleo-resina de <i>C. reticulata</i>	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVENC	Acidente Vascular Encefálico
CNS	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
IL-1	Interleucina-1
ICAM	Moléculas de Adesão Intercelular
MadCAM-1	Molécula de Adesão Celular de Adressina da Mucosa
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular
PECAM	Molécula de Adesão Celular Endotélio-Plaquetária

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DESORDENS NEURAIS AGUDAS	13
1.2 FISIOPATOLOGIA DAS DESORDENS NEURAIS AGUDAS	14
1.2.1 Glutamato e Excitotoxicidade.....	14
1.2.2 Estresse Oxidativo	16
1.2.3 Inflamação e Doenças do Sistema Nervoso Central.....	17
1.2.3.1 Aspectos Moleculares.....	17
1.2.3.2 Resposta Inflamatória Celular e Desordens Neurais Agudas.....	19
<i>Neutrófilos.....</i>	<i>19</i>
<i>Micróglia/Macrófagos.....</i>	<i>20</i>
1.3 MORTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSE)	23
1.4 A COPAÍBA: SUAS APLICAÇÕES FITOTERÁPICAS E O PARADIGMA EXPERIMENTAL.....	24
1.5 OBJETIVOS.....	27
1.5.1 Geral.....	27
1.5.2 Específicos.....	27
2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	28
2.1 MODELO DE LESÃO EXCITOTÓXICA ATRAVÉS DE MICROINJEÇÕES DE NMDA.....	28
2.2 TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE C. RETICULATA.....	29
2.2.1 Análise do Tratamento Com Copaíba Sobre O Recrutamento de Neutrófilos.....	29
2.2.2 Análise do Tratamento Com Copaíba Sobre A Ativação Microglial Macrofágica.....	30
2.3 PERFUSÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	30
2.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	31
2.4.1 Análise da área de lesão.....	31
2.4.2 Estudos Imuno-histoquímicos.....	31
2.5 ANÁLISE QUALITATIVA.....	33
2.6 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	33
2.6.1 Contagem de Células.....	33
2.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ...	34
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34

3 RESULTADOS	35
3.1 AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS COMPONENTES VOLATÉIS DA AMOSTRA DE OLEO-RESINA DE C. RETICULATA.....	35
3.2 PERDA TECIDUAL COM CARACTERÍSTICAS NECRÓTICAS E INTENSA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDAS POR NMDA SÃO MINIMIZADAS PELO TRATAMENTO COM COPAÍBA.....	36
3.3 INIBIÇÃO DO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PELO TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA APÓS LESÃO AGUDA DO CÓRTEX MOTOR....	36
3.4 O TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA INIBE TAMBÉM O RECRUTAMENTO DE MACRÓFAGOS APÓS LESÃO AGUDA DO CÓRTEX MOTOR.....	39
4 DISCUSSÃO.....	43
4.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS E A IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	43
4.2 DIMINUIÇÃO DO INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS PELO TRATAMENTO COM COPAIBA APÓS LESÃO AGUDA DO CÓRTEX MOTOR	44
4.3 DIMINUIÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL/MACROFÁGICA PELO TRATAMENTO COM COPAÍBA APÓS LESÃO AGUDA DO CÓRTEX MOTOR ...	45
5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIA.....	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DESORDENS NEURAIS AGUDAS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil ocupa a sexta posição na ocorrência de desordens neurais agudas. Desde a década de 60, a morbidade por doenças cerebrais e cardíacas suplantou as mortes por doenças infecciosas, com a maior incidência na América latina (LOTUFO, 2005a; LOTUFO, 2005b; LOTUFO; BENSENOR, 2007). Nos Estados Unidos da América (EUA) e Reino Unido, cerca de 5,5 milhões de pessoas morrem em consequência destas doenças, correspondendo a aproximadamente 10% de todos os óbitos registrados anualmente (TAYLOR et al., 1996). Número considerável de sobreviventes apresenta sequelas neurológicas permanentes. Apesar do relevante impacto epidemiológico e clínico, apenas um tratamento farmacológico utilizando o ativador de plasminogênio tecidual recombinante (tissue plasminogen activator – tPA) foi aprovado pelo FDA. Este tratamento não beneficia a maioria dos pacientes, além de apresentar graves efeitos colaterais, incluindo o risco de indução de acidente vascular encefálico (AVENC) hemorrágico durante tratamentos prolongados (GILMAN, 2006; LEES; DAWSON, 2007).

A faixa demográfica mais vulnerável as desordens neurais agudas, como o AVENC, é a de idosos (HICKEY et al., 2009), e estima-se que o número atual de 16,5 milhões de brasileiros com 60 anos, ou mais, (ONU, 2007) exceda seu dobro, até 2025, atingindo 34,5 milhões, o que equivale a 15,1% da população. Tal dimensão significativa de idosos, com tendência crescente, justifica a necessidade e a importância de estudos específicos para este grupo etário (IBGE, 2006), incluindo novas terapias através de abordagens experimentais para a elaboração de ensaios clínicos que possam contribuir para a melhoria da qualidade de vida de pessoas acometidas por desordens neurais agudas.

1.2 FISIOPATOLOGIA DAS DESORDENS NEURAIS AGUDAS

Os danos causados pelas doenças agudas do sistema nervoso central caracterizam-se por uma complexa sequência de eventos fisiopatológicos espaciais e temporais que duram desde algumas horas, até vários dias. No caso do AVENC, o fenômeno patológico se inicia pela redução permanente, ou transitória, do fluxo sanguíneo ao encéfalo, na maioria das vezes, causada por uma oclusão tromboembólica das principais artérias que o suprem (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003). Do ponto de vista morfológico, distinguem-se duas regiões: o centro do infarto (núcleo isquêmico) e uma zona periférica, chamada de penumbra isquêmica ou região peri-infarto. Nestas regiões, ocorrem diferentes tipos de morte celular, incluindo necrose e apoptose. Os principais mecanismos patológicos da lesão isquêmica incluem a despolarização peri-infarto, excitotoxicidade, necrose e morte celular programada (LO et al., 2003; MEAIRS et al., 2006; PRASS et al., 2006; WANG, 2007). Estes eventos induzem lesão primeiramente no centro isquêmico, e a seguir na região peri-infarto, através de um mecanismo conhecido como degeneração secundária (TATOR; FEHLINGS, 1991; YAMAURA et al., 2002). Podem alcançar células inicialmente ilesas, ou que foram afetadas apenas parcialmente pela anóxia, ou hipóxia. Mesmos neurônios e axônios apenas parcialmente afetados pela isquemia podem degenerar posteriormente se não forem submetidos a intervenções neuroprotetoras (TATOR; FEHLINGS, 1991; YAMAURA et al., 2002).

1.2.1 Glutamato e Excitotoxicidade

A atividade neuroexcitatória do glutamato, nos mamíferos, tornou-se conhecida na década de 50 (HAYASHI, 1952). Anos depois, passou a ser reconhecido como o principal transmissor excitatório nos vertebrados, por meio de sua ligação pós-sináptica a três receptores ionotrópicos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido 2 α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e kainato (HOLLMANN et al., 1989)

A excitotoxicidade foi um termo criado para designar a degeneração neuronal causada por aminoácidos excitatórios. Este evento induz instabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), e edema das células neurais (por exemplo, retina) em animais submetidos à administração de kainato, um composto de estrutura similar à do glutamato (OLNEY, 1969).

Um fato bem estudado é o efeito prejudicial do acúmulo excessivo e prolongado de aminoácidos excitatórios na fenda sináptica e meio extracelular, o que sabidamente ocorre durante desordens neurais agudas e crônicas (GOMES-LEAL et al., 2004; 2005; MELDRUM, 1994). Em casos específicos, como na isquemia, o mecanismo excitotóxico pode ser exacerbado por um possível efeito bloqueador do lactato sobre as proteínas transportadoras de glutamato, tornando a utilização da via glicolítica mandatória para obtenção de energia, mesmo com a redução do fluxo sanguíneo encefálico que restringe a distribuição de oxigênio e glicose. Porém, o lactato, no cenário isquêmico, atua apenas como agravante à incapacidade celular, no momento de manter o gradiente iônico que é responsável pelo funcionamento das ATPases removedoras do glutamato acumulado no espaço interneuronal após ser liberado pelas vesículas sinápticas (CAMACHO; MASSIEU, 2006; WANG et al., 2007; XIANG et al., 2004).

Apesar do seu papel neuropatológico, o glutamato é imprescindível em processos naturais da fisiologia neural, como aprendizado e aquisição de novas memórias, visto nas sinapses químicas do hipocampo e do cerebelo. Porém, sua concentração na fenda sináptica precisa ser regulada, devido aos riscos da excitotoxicidade, existem pelo menos cinco variedades de ATPases para a remoção do glutamato no CNS de mamíferos. Estas enzimas regulam a liberação do glutamato para o meio extracelular. Duas destas enzimas estão presentes nas células gliais e o restante nos neurônios (MELDRUM, 1994). As concentrações das ATPases são superiores àquelas dos receptores AMPA e NMDA, possibilitando desta forma, uma remoção rápida dos aminoácidos excitatórios, o que previne a excitotoxicidade (SEAL; AMARA, 1999). É sabido que as áreas de maior densidade sináptica química são mais suscetíveis à isquemia, o que evidencia claramente o potencial deletério da disfunção glutamatérgica na desordem neural aguda (PULSINELLI; BRIERLEY; PLUM, 1982).

Ativação dos receptores AMPA – que são canais iônicos permeáveis ao sódio – permite a despolarização rápida dos neurônios pós-sinápticos, o que é importante para o processo de aprendizado (CAMACHO; MASSIEU, 2006). No entanto, a entrada excessiva de Na^+ induz uma elevada passagem passiva de água para a célula, levando à formação de edemas que representam uma das causas primárias de deterioração clínica (BOUNDS et al., 1981; HURTADO et al., 2006; MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL, 2004).

Em uma fase seguinte do processo excitotóxico, o influxo excessivo de Ca^{++} inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares que resultam em lesão tecidual (CHOI, 1992). Estes eventos podem envolver ativação das enzimas proteolíticas (catepsinas, calpaínas, fosfolipases, endonucleases) que degradam as proteínas do citoesqueleto (por exemplo actina e espectrina) e/ou proteínas da matriz extracelular (laminina) (LO et al., 2003; WANG et al., 2007).

1.2.2 Estresse Oxidativo

Durante uma desordem neural aguda, como AVENC, são produzidos diversos radicais livres, tais como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (LEWÉN; MATZ; CHAN, 2000; LO et al., 2003; LOVE, 1999), as quais também servem como importantes moléculas sinalizadoras que desencadeiam inflamação e apoptose (IADECOLA; ALEXANDER, 2001). As espécies reativas derivadas do oxigênio são mediadoras de dano tecidual após reperfusão em muitos órgãos, incluindo coração, rins e encéfalo (LEWÉN et al., 2000; LO et al., 2003; LOVE, 1999). Alterações mitocondriais possuem papel importante neste fenômeno, devido à produção excessiva de superóxido durante o transporte de elétrons e à inibição dos mecanismos de transporte mitocondrial de elétrons pelos radicais livres, exacerbando a produção das espécies reativas derivadas do oxigênio. A elevação dos níveis de Ca^{++} , Na^+ e ADP nas células isquêmicas estimula a produção excessiva de radicais livres mitocondriais que também são gerados durante as conversões enzimáticas, tais aquelas dependentes de ciclooxygenase, do ácido araquidônico em prostanóides, e a degradação de hipoxantina, especialmente durante a reperfusão (LEWÉN et al., 2000; LO et al., 2003; LOVE, 1999; WANG et al., 2007).

Os níveis das enzimas antioxidantes endógenas (incluindo superóxido dismutase, catalase e glutatona) e vitaminas antioxidantes (por exemplo, α -tocoferol e ácido ascórbico) estão reduzidos durante alterações patológicas, o que contribui para a inativação insuficiente do excesso de radicais livres (LEWÉN et al., 2000; LO et al., 2003; LOVE, 1999; WANG et al., 2007).

A produção de espécies reativas de oxigênio como superóxido e radicais hidroxila após isquemia danifica diretamente lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos. A formação de Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPTP) é aumentada na presença de Ca^{2+} e das espécies reativas de oxigênio, o que dissipa a força próton motiva que é requerida para a fosforilação oxidativa e geração de ATP (LOVE, 1999). Como resultado, a mitocôndria libera seus constituintes, como a enzima citocromo C, o que ativa as procaspases 9 nas membranas mitocondriais interna e externa. A geração de espécies reativas de oxigênio, e MPTP, pode ocorrer após reperfusão e renovação do oxigênio tecidual devido às disfunções mitocondriais (ATLANTE et al., 2000; ATLANTE et al., 2001).

As espécies reativas de oxigênio e o óxido nítrico (NO) produzem danos também ao material genético mitocondrial exigindo a síntese da enzima de reparo poli-(ADP-ribose) polimerase (PARP1) que catalisa sua própria síntese quebrando o β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) em nicotinamida e poli(ADP-ribose). Como na isquemia a fragmentação do DNA exacerba-se com a síntese de PARP1, a quebra de NAD^+ se torna excessiva, anulando ainda mais as fontes energéticas da célula (SUGAWARA et al., 2004a; SUGAWARA et al., 2004b).

1.2.3 Inflamação e Doenças do Sistema Nervoso Central

1.2.3.1 Aspectos Moleculares

As moléculas de adesão celular que estão relacionadas com a adesão leucócito-endotélio são divididas em três famílias: as seletinas, a super-família de genes de imunoglobulina, e as integrinas. Selectinas mediam o rolamento dos leucócitos no endotélio das vênulas pós-capilares (CARLOS; HARLAN, 1994). A selectina-E (CD62E) é sintetizada após o estímulo por citocinas como o fator de

necrose tumoral α (TNF- α) e a Interleucina-1 (IL-1) e expressa na membrana celular endotelial após poucas horas. A selectina-P (CD62P) está constitutivamente presente na membrana das células endoteliais e das plaquetas. Desta maneira, ela pode ser expressa na porção externa das membranas celulares imediatamente à ativação celular por estímulos como trombina ou histamina. As células alvo de ambas as selectinas E e P são neutrófilos e monócitos. Os contrarreceptores destas células brancas são glicoproteínas de membrana e a selectina-L (CD62L) que está presente nos linfócitos, neutrófilos e monócitos. Após a ativação celular, são liberadas das membranas celulares por clivagem proteolítica (BECKER et al., 2001; BURNE-TANEY; RABB, 2003; LINDSBERG et al., 1996; DEL ZOPPO et al., 2000).

A super-família das imunoglobulinas media a adesão firme dos leucócitos à parede endotelial e sua ativação. As células do endotélio expressam cinco tipos de moléculas pertencentes a esta família: Moléculas de Adesão Intercelular-1 e -2 (ICAM-1 e ICAM-2), Moléculas de Adesão de Células Vasculares-1 (VCAM-1), Molécula de Adesão de Células endoteliais e Plaquetas-1 (PECAM-1), e a Molécula de Adesão Celular de Adressina da Mucosa (MadCAM-1). As CAMs estão envolvidas na adesão dos leucócitos ao produzirem uma ligação mais forte dos mesmos à parede endotelial. A selectina ICAM-1 (CD54) ocorre em baixa quantidade nas membranas celulares das células endoteliais, leucócitos, células epiteliais, e fibroblastos, mas sua expressão aumenta sob estímulo das citocinas. ICAM-2 (CD102) é um receptor de membrana de células endoteliais, cuja expressão não é influenciada após estímulos. A expressão de VCAM-1 (CD106) sobre as células endoteliais é induzida por TNF- α e IL-1. PECAM-1 (CD31) tem o papel de adesão entre as células endoteliais, na adesão de leucócitos, e, particularmente, na diapedese. Sua expressão não é aumentada por citocinas em células endoteliais (CARLOS; HARLAN, 1994).

A selectina-P é expressa sobre o endotélio vascular após 90 minutos da isquemia cerebral, a ICAM1 em 4 horas, e a selectina-E dentro de 24 horas. A inibição de ambas as selectinas e moléculas de adesão, bem como a ativação do complemento, reduzam a lesão cerebral e suprimem o acúmulo dos neutrófilos e das plaquetas após a isquemia focal em camundongos (BERNARDES-SILVA et al., 2001). Observou-se diminuição da área de infarto em camundongos knock-out de ICAM1 (DEL ZOPPO et al., 2000).

1.2.3.2 Resposta Inflamatória Celular e Desordens Neurais Agudas

Diversas doenças do CNS envolvem inflamação, que pode ser a causa de dano tecidual como ocorre na esclerose múltipla, doença de Alzheimer, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, lesão do cérebro e medula espinal, além de AVENC (ESIRI, 2007; LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006), mas pode possuir efeitos benéficos (SCHWARTZ et al., 2006; SCHWARTZ; YOLES, 2006).

O papel da resposta inflamatória durante doenças do CNS ainda é controverso (SCHWARTZ et al., 2003; SCHWARTZ; YOLES, 2006). Existem evidências que a resposta inflamatória possui tantos efeitos deletérios (BANATI et al., 1993; BLIGHT, 1994; GIULIAN; VACA; CORPUZ, 1993; GIULIAN; VACA; NOONAN, 1990; GOMES-LEAL et al., 2005; MONJE; TODA; PALMER, 2003; POPOVICH et al., 1999), quanto benéficos (BUTOVSKY et al., 2005; KNOLLER et al., 2005; LAZAROV-SPIEGLER et al., 1996; RAPALINO et al., 1998).

Após lesão neural aguda experimental, ou em seres humanos, ocorre uma resposta inflamatória caracterizada pelo recrutamento dos neutrófilos e linfócitos em uma fase inicial e intensa ativação microglial/macrofágica nas fases tardias (ARUMUGAM; GRANGER; MATTSON, 2005; CAMPANELLA et al., 2002; CLARK et al., 1993; PRICE et al., 2006; SCHROETER et al., 1997; SCHROETER et al., 1994; WANG et al., 2007).

Neutrófilos

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias recrutadas no processo inflamatório agudo, tanto nos tecidos neurais quanto nos não neurais, sendo este fenômeno mais tardio no CNS. Após lesão, o pico máximo de recrutamento destas células inflamatórias ocorre em torno de 6h em tecidos não neurais como a pele e em cerca de 24h no CNS (BOLTON; PERRY, 1998; GOMES-LEAL et al., 2005; KATO et al., 1996; SCHNELL et al., 1999). Os neutrófilos atuam como células fagocitárias, mas se acredita que podem contribuir para o agravamento da lesão traumática e isquêmica, tanto nos tecidos neurais como nos tecidos não neurais, em animais de experimentação e seres humanos (BECKER et

al., 2001; HIROSE et al., 2000; TAOKA et al., 1998; TAOKA et al., 1997). Estas células podem secretar enzimas líticas como elastases e radicais livres que podem contribuir para lesão aguda da medula espinhal, por exemplo degradando a BHE (BECKER et al., 2001; HIROSE et al., 2000; TAOKA et al., 1998; TAOKA et al., 1997). Inibidores de elastases são neuroprotetores após lesão aguda da medula espinhal (BECKER et al., 2001; HIROSE et al., 2000; TAOKA et al., 1998; TAOKA et al., 1997).

Neutrófilos são recrutados para o parênquima do cérebro e da medula espinhal de roedores após lesão isquêmica (HIROSE et al., 2000; KATO et al., 1996; LOVE, 1999). No parênquima neural, estas células podem contribuir para a expansão da lesão no centro isquêmico, bem como para os processos lesivos ulteriores na penumbra isquêmica através da liberação das enzimas líticas e NO. A proteína C reativa reduz a lesão isquêmica após reperfusão na medula espinhal de ratos através do bloqueio da ativação dos neutrófilos. No cérebro do rato, existem inúmeras demonstrações de que os neutrófilos são recrutados para o parênquima neural após isquemia experimental (HIROSE et al., 2000; KATO et al., 1996; LOVE, 1999), mas Hughes et al. (2003) relataram ausência deste recrutamento tanto no córtex parietal como no striatum após isquemia focal induzida por microinjeções de endotelina-1 (ET-1). No entanto, utilizando o mesmo modelo experimental, o grupo de pesquisa do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE) encontrou neutrófilos após lesão isquêmica estriatal (SOUZA-RODRIGUES et al., 2008).

Estudos recentes confirmaram que o recrutamento dos neutrófilos após lesão isquêmica possui efeitos deletérios, pois a fagocitose destas células pela micróglia induz neuroproteção após isquemia (NEUMANN et al., 2008). Neste estudo, o bloqueio da fagocitose dos neutrófilos pela micróglia induz efeitos deletérios como o aumento da morte celular.

Micróglia/Macrófagos

Na medula óssea, existem células precursoras que geram monoblastos, os quais se transformam em monócitos quando entram na corrente sanguínea. Durante o processo inflamatório agudo, os monócitos, que são células

indiferenciadas, são recrutados ao parênquima tecidual, onde são ativados, tornando-se células epitelióides ou células gigantes nas condições patológicas de tecidos não neurais. Além dos macrófagos derivados dos monócitos sanguíneos, há uma população de macrófagos residentes que recebe denominações específicas dependendo do tecido onde são encontrados, como células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares no pulmão, osteoclastos nos ossos e micróglia no sistema nervoso (ABBAS; JANEWAY, 2000; PERRY; GORDON, 1991; PERRY; HUME; GORDON, 1985). Estas células derivam de monócitos sanguíneos que penetram no CNS durante o desenvolvimento do sistema nervoso (PERRY et al., 1991).

Os macrófagos participam da fase final da inflamação, fagocitando patógenos (no caso de infecção) e detritos celulares, ou contribuindo para o reparo tecidual através da liberação de citocinas que induzem neovascularização ou recrutamento de fibroblastos com a subsequente formação da matriz extracelular (LEIBOVICH ; ROSS, 1975; PERRY et al., 1998; PERRY; BROWN; GORDON, 1987). Macrófagos podem reconhecer, fagocitar e degradar bactérias opsonizadas (envolvidas por proteínas do complemento) durante o processo infeccioso. Estas células do sistema imune inato são consideradas as principais células efetoras da resposta imune (RANSOHOFF; PERRY, 2009).

Macrófagos são recrutados e/ou ativados no CNS nas condições patológicas agudas, trauma cerebral, da medula espinhal e condições neurodegenerativas crônicas como a esclerose múltipla e doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer (GOMES-LEAL et al., 2005; POPOVICH et al., 1999; SCHROETER et al., 1997; SCHROETER; JANDER; STOLL, 2002; SCHROETER et al., 1999; SCHROETER et al., 2001; TOWN; NIKOLIC; TAN, 2005).

No parênquima do CNS, os macrófagos ativados derivam da micróglia residente e dos monócitos sanguíneos que são recrutados para o sítio de lesão durante estas alterações patológicas (PERRY et al., 1985; POPOVICH; HICKEY, 2001; SCHROETER et al., 1997). Este fenômeno envolve alterações morfológicas e o aumento da expressão de diversos receptores da membrana de lisossomas, por exemplo, o antígeno glicosilado citoplasmático que é marcado pelo anticorpo ED1, do receptor C3 do complemento (DIJKSTRA et al., 1985; REID et al., 1993), dos receptores CD4 e CD8 (JANDER et al., 1998; SCHROETER et al., 1999;

SCHROETER et al., 2001), além das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade I e II (KATO et al., 1996; SCHROETER et al., 1999).

Existem evidências tanto de ação prejudicial (BLIGHT, 1985; GOMES-LEAL et al., 2005; POPOVICH et al., 2002) quanto benéfica (BUTOVSKY et al., 2005; KNOLLER et al., 2005; LAZAROV-SPIEGLER et al., 1996; RAPALINO et al., 1998; SCHWARTZ et al., 2006) para as ações de macrófagos durante doenças neurodegenerativas agudas e crônicas.

Foi demonstrada a depleção de macrófagos em roedores submetidos à lesão aguda da medula espinhal através da injeção intraperitoneal de pó de sílica (BLIGHT, 1994), ou intravenosa de lipossomas de clodronato (POPOVICH et al., 1999), uma toxina específica para monócitos sanguíneos, induz melhor preservação tecidual e recuperação motora. Durante epilepsia experimental, o bloqueio da ativação de macrófagos/microglia com minociclina aumenta a neurogênese endógena no hipocampo (EKDAHL et al., 2003) ou na zona sub-ventricular dos ventrículos laterais (HOEHN; PALMER; STEINBERG, 2005), as duas principais regiões neurogênicas do cérebro adulto.

O papel dos macrófagos nos mecanismos lesivos durante as desordens neurodegenerativas ainda é controverso, pois se demonstrou que estas células podem possuir um papel benéfico para o prognóstico lesivo (LAZAROV-SPIEGLER et al., 1996; RAPALINO et al., 1998). O implante de macrófagos pré-incubados *ex vivo*, em segmentos do nervo ciático, no nervo óptico (LAZAROV-SPIEGLER et al., 1996), ou na medula espinhal de ratos (RAPALINO et al., 1998), submetidos à lesão mecânica induz melhor preservação tecidual e regeneração axonal quando comparado ao grupo de ratos controle usando solução salina estéril. Outro estudo mostrou que na medula espinhal, o mesmo efeito neuroprotetor é obtido quando os macrófagos são pré-incubados na pele (BOMSTEIN et al., 2003). Neste estudo, acredita-se que o ambiente dos tecidos que possuem capacidade regenerativa, como a pele e nervos periféricos, induzem um fenótipo neuro-protetor nos macrófagos, os quais podem liberar mais fatores neurotróficos e remover de forma mais eficaz as substâncias inibitórias da neuro-regeneração, como aquelas liberadas pela bainha de mielina (por exemplo, NOGO) durante processos lesivos (SCHWARTZ; YOLE, 2006).

A ativação microglial é um evento patológico importante após inúmeras desordens neurais, incluindo AVENC (LALANCETTE-HÉBERT et al., 2007; MORIOKA; KALEHUA; STREIT, 1993; STREIT; WALTER; PENNELL, 1999; WANG et al., 2007). Demonstrou-se que o bloqueio da ativação microglial com minociclina, uma tetraciclina sintética, induz neuroproteção tecidual significativa, correspondendo a até 65% de diminuição da área de infarto cortical e a 45 % da área de infarto estriatal (YRJÄNHEIKKI et al., 1999). No entanto, estudos recentes sugerem um papel neuro-protetor para a ativação microglial após a lesão aguda encefálica (LALANCETTE-HÉBERT et al., 2007; NEUMANN et al., 2006).

Estudos sugeriram que o estímulo é uma variável importante para o fenótipo microglial que contribui para neurodegeneração, ou reparo neural (BUTOVSKY et al., 2005; SCHWARTZ et al., 2006). Fatores como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), ou beta amiloide ($\alpha\beta$), podem induzir um fenótipo microglial que contribui para degeneração, enquanto que baixas doses de interferon γ ou interleucina 4 (IL-4) são mais propensos à indução do reparo tecidual. Portanto, dependendo do estímulo, e do tipo de condição patológica, a inflamação pode ser benéfica, ou deletéria. Nas doenças neurodegenerativas, o bloqueio inflamatório deve ser sutil, de modo a preservar os fatores benéficos relacionados ao processo inflamatório e inibir os efeitos deletérios (BUTOVSKY et al., 2005; SCHWARTZ; YOLEN, 2006).

1.3 MORTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSE)

A morte celular programada, cujo aspecto morfológico é conhecido como apoptose, começa horas após o início da isquemia e permanece durante dias (EKSHYYAN; AW, 2004; ELDADAH; FADEN, 2000). Ocorre principalmente na região da penumbra isquêmica (mas também no centro isquêmico) sendo temporal, espacial e molecularmente diferente da morte glial e neuronal rápida (minutos a horas) que ocorre principalmente no centro isquêmico por necrose (SYNTICHAKI; TAVERNARAKIS, 2003; SYNTICHAKI; TAVERNARAKIS, 2002).

As caspases são proteases – enzimas proteolíticas – que, nas situações patológicas, catalisam a destruição da célula. As caspases 1, 3, 8 e 9 estão

envolvidas na isquemia encefálica (SCHULZ; WELLER; MOSKOWITZ, 1999; XIA et al., 2006). As caspases 8 e 9 iniciam a cascata de morte, ao final ativando caspases executoras, tais como a caspase 3. A caspase 1 está envolvida na ativação das citocinas (MARQUARDT et al., 2005). A caspase 3 possui uma participação central na cascata de sinalização apoptótica, não apenas na isquemia encefálica, como também em outras doenças neurodegenerativas. A inibição genética, assim como o bloqueio farmacológico da caspase 3, induz neuro-proteção em modelos de isquemia (ELDADAH; FADEN, 2000; SCHULZ et al., 1999; XIA et al., 2006).

1.4 A COPAÍBA: SUAS APLICAÇÕES FITOTERÁPICAS E O PARADIGMA EXPERIMENTAL

Segundo a edição de 1996 do Index Kewensis, *Copaifera* L. possui 72 espécies, sendo que dezesseis existem somente no Brasil. São encontradas facilmente na região Amazônica, principalmente as da espécie *C. reticulata* Ducke. Popularmente conhecidas como copaibeiras, ou pau d'óleo, são árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. A primeira espécie de copaíba, foi descrita em 1760, por Jacquin que descreveu detalhadamente a espécie *Copaiva officinalis* Jacq. mas, sem a descrição dos frutos, resultando em erros que foram posteriormente corrigidos por Carl von Linné, renomeando corretamente para *Copaifera officinalis*, levando à descrição oficial do gênero *Copaifera* L. Alguns trabalhos , principalmente das espécies amazônicas, foram feitos por Adolpho Ducke, que é o responsável pela descrição da espécie *C. reticulata*. (LEITE; LLERAS, 1993; MORS; RIZZINI, 1976; PIO CORRÊA, 1931).

O líquido viscoso exsudado da casca das copaibeiras apresenta tanto compostos voláteis (óleo) quanto ácidos resinosos (resina) o que lhe confere a designação mais adequada de óleo-resina (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002 apud BRUNETON, 1987). Caracterizando como improcedente a qualificação de bálsamo de copaíba, devido a ausência de derivados do ácido benzoico ou cinâmico (PIO CORRÊA, 1931).

A prática de coleta menos agressiva utiliza uma abertura feita no tronco à cerca de 1 metro de altura do chão, sendo evitados problemas com infecções por fungos ou cupins pela vedação do orifício com argila que pode ser facilmente retirada, permitindo que varias coletas possam ser feitas no mesmo espécime, obtendo-se quantidade de óleo igual ou mesmo superior a da primeira retirada. A produtividade de uma única árvore pode gerar de 40 a 50 litros de óleo-resina por ano (ALENCAR, 1982; PIO CORRÊA, 1931; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

O óleo-resina de copaíba é um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom. Para uso farmacológico, os óleos mais escuros e viscosos são os preferidos (DUCKE, 1939; SILVA, 1911), sendo *C. reticulata* a espécie mais utilizada para a produção de óleo-resina, e a mais estudada da região amazônica (LAWRENCE, 1980), pertencendo ao gênero *Copaifera* L. que, pela classificação de Engler, pertence à família Leguminosae Juss., sub-família Caesalpinoideae Kunth. Contudo pelo sistema de classificação de Cronquist pertence à família Caesalpiniaceae R.Br. A classificação apenas como Fabaceae também é encontrada em alguns livros (HARBORNE; BOULTER; TURNER, 1971).

Os trabalhos realizados sobre o gênero estão, em sua maioria, relacionados com o óleo-resina. Desde os primeiros anos do descobrimento do Brasil, este óleo vem sendo indicado para diversos fins, e muitos estudos foram realizados sobre o gênero. Porém, apesar dos mais de 200 trabalhos publicados em diversas línguas, muitos dados sobre sua atividade farmacológica são contraditórios. Há equívocos desde a identificação botânica até a composição química dos óleos de copaíba, que são também frequentemente misturados a outros óleos e adulterados (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

O óleo da copaíba é utilizado como anti-inflamatório e cicatrizante pela medicina popular. Existem evidências científicas de efeitos anti-inflamatórios, cicatrizantes e anti-proliferativos do óleo de copaíba em tecidos não neurais, como os do fígado, intestino e estômago (PAIVA et al., 1998; PAIVA et al., 2002; PAIVA et al., 2004). Também pode induzir proteção tecidual após lesão isquêmica do mesentério e este efeito, parece estar relacionado á diminuição da peroxidação lipídica e resposta inflamatória por meio do mesmo tratamento (PAIVA et al., 2004). Porém não existem estudos que tenham investigado os possíveis papéis neuro-protetores do óleo de copaíba após lesão aguda do CNS.

No presente estudo, foi investigado experimentalmente os possíveis efeitos neuro-protetores do óleo resina do tronco de *C. reticulata*, que é popularmente usado como anti-inflamatório e cicatrizante, em um modelo experimental de desordem neural aguda induzida por micro-injeções de NMDA no córtex motor de ratos adultos (SOUZA-RODRIGUES et al., 2008).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Geral

Investigar os possíveis efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios de injeções intraperitoneais do óleo-resina de copaíba (*C. reticulata*) após lesão excitotóxica aguda do córtex motor de ratos adultos induzida por microinjeções de NMDA.

1.5.2 Específicos

- a. Descrever a composição química da amostra de óleo-resina utilizada no trabalho.
- b. Descrever os padrões histopatológicos na fase aguda após o dano excitotóxico induzido por NMDA do grupo tratado com óleo de copaíba, e do controle
- c. Descrever os padrões de recrutamento de neutrófilos no córtex motor 24h após a lesão no grupo tratado com copaíba, e no controle.
- d. Descrever os padrões de ativação microglial/macrofágica nos grupos 72 horas após a lesão no grupo tratado com copaíba, e no controle.
- e. Analisar comparativamente o grupo tratado com o grupo controle de cada padrão especificado acima.

2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

2.1 MODELO DE LESÃO EXCITOTÓXICA ATRAVÉS DE MICROINJEÇÕES DE NMDA

Com base em estudos anteriores foi determinado o modelo experimental de lesão excitotóxica que foi utilizado nessa investigação. Foram usados os efeitos lesivos do NMDA para induzir dano focal no córtex motor de ratos adultos, segundo protocolo adaptado de Gomes-Leal et al. (2004; 2005). Ratos adultos machos da raça Wistar (N= 6, por tempo de sobrevivência) foram utilizados no presente estudo. Os animais foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p) de cloridrato de cetamina (72 mg/kg) e Xilazina (9 mg/kg). Os reflexos corneanos e de retração do membro à dor foram testados, antes de qualquer procedimento cirúrgico. Após a checagem que os mesmos estavam profundamente anestesiados, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico (Insight, Brasil). Utilizando um motor de baixa rotação para cirurgia odontológica foi feita uma pequena abertura no crânio dos animais de ambos os grupos, de acordo com coordenadas estereotáxicas específicas para injeções do NMDA (80 nmol diluídos em 1 µl de solução salina estéril) no córtex motor. Estas coordenadas, foram, em relação ao Bregma: Antero-posterior: 1,2; médio-lateral: 2,3; dorso-ventral: 0,5. Nos animais controle, injetou-se o mesmo volume do veículo sem a cocaína (N= 5 por tempo de sobrevivência). O corante azul colanil foi adicionado ao diluente para a identificação do epicentro da lesão (GOMES-LEAL et al., 2004; 2005).

Após a cirurgia, os animais foram mantidos com água e comida *ad libitum* durante o tempo de sobrevivência de 24h. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas sugeridas pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da UFPA (CEPAE) e de acordo com normas internacionais, como as sugeridas pela Society for Neuroscience e National Institutes of Health.

2.2 TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE *C. reticulata*.

A matéria prima (óleo-resina de *C. reticulata*) foi gentilmente cedida pelo Professor Osmar Lameira da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Pará (EMBRAPA-PA). Das folhas, sementes, frutos e casca do espécime de onde o óleo-resina foi coletado, foram escolhidos tipos representativos para a montagem de exsiccatas que foram depositadas no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi.

O óleo-resina de copaíba foi diluído em Tween a 5% e aplicado intraperitonealmente (i.p.), em uma dose de 400 mg/Kg, nos grupos experimentais descritos abaixo. A dose escolhida foi baseada em estudos prévios que demonstraram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do óleo-resina de copaíba em modelos de lesão aguda em tecido não neural (PAIVA et al., 2004).

2.2.1 Análise do Tratamento Com Copaíba Sobre O Recrutamento de Neutrófilos

Para avaliar o efeito do óleo-resina sobre o recrutamento dos neutrófilos após lesão neural aguda, foram delineados dois grupos experimentais. No primeiro (grupo 1) foram realizadas microinjeções corticais de NMDA (80 nmol/ μ l), diluídos em solução salina estéril, para induzir a lesão cortical aguda que foi tratada i.p com uma dose única de solução de copaíba (400 mg/Kg) aplicada logo após o término da cirurgia (N=5).

Os animais do grupo controle (grupo 2) foram submetidos a procedimentos similares de indução excitotóxica e de tratamento, mas receberam apenas Tween diluído a 5% (N=5).

Ambos os grupos foram perfundidos 24h após a indução da lesão excitotóxica, de acordo com dados anteriores que estabelecem que o pico máximo de recrutamento dos neutrófilos ocorre em cerca de 24h após desordens neurais agudas, incluindo lesão cortical, estriatal e da medula espinhal (SCHNELL et al., 1999; GOMES-LEAL et al., 2005; LIMA et al., 2008; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008).

2.2.2 Análise do Tratamento Com Copaíba Sobre A Ativação Microglial Macrofágica

Para avaliar o efeito do óleo-resina sobre a ativação microglial/macrofágica, delineamos dois grupos experimentais. No primeiro grupo experimental (grupo 3), os animais foram submetidos à lesão cortical induzida pelo NMDA, como descrito anteriormente, e foram tratados i.p com uma dose total de 1200 mg/Kg de copaíba, divididos em duas doses diárias de 200 mg/Kg cada (N=5), tendo o tratamento sido iniciado 24 horas depois da cirurgia de indução da lesão cortical, e então prosseguido por 3 dias.

Os animais controle (grupo 4) foram submetidos aos mesmos procedimentos para indução lesiva do córtex motor realizada no grupo tratado com óleo-resina, mas receberam apenas Tween diluído a 5% (N=5) usando um período de tempo similar.

Ambos os grupos foram perfundidos 72h após a indução da lesão excitotóxica, de acordo com o que foi estabelecido em outros trabalhos que o pico máximo de ativação microglial/macrofágica ocorre de três a sete dias após lesão do CNS, incluindo isquemia e lesão aguda da medula espinhal (SCHNELL et al., 1999; GOMES-LEAL et al., 2005; LIMA et al., 2008; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008).

2.3 PERFUSÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os animais foram profundamente anestesiados com Vetanarcol® (cloridrato de cetamina, 72 mg/kg – Laboratórios Koning S.A.) aplicado juntamente com Kenzol® (cloridrato de xilazina, 9 mg/kg - Laboratórios Koning S.A.). Após a abolição dos reflexos corneano e de retirada da pata após estímulo aversivo, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina a 0,9% heparinizada, seguida de paraformaldeído a 4% (Sigma Company, USA) diluído em tampão fosfato 0,2M (pH 7,4).

Após a craniotomia, os encéfalos foram pós-fixados por 24 horas e crioprottegidos em uma solução de glicerol com concentrações de sacarose a 25%,

50% e 100%. Os encéfalos foram embebidos em Tissue Tek para congelamento à -55°C em câmara de criostato (Microm HM 505 E) equipado com Efeito Peltier. Secções coronais com 20 ou 50 μm de espessura foram obtidas diretamente em lâminas gelatinizadas durante a microtomia. Para aumento da aderência às lâminas, as secções permaneceram à temperatura ambiente por no mínimo 24 horas antes de qualquer outro procedimento histológico. Após este período, as mesmas foram mantidas em um *freezer* à temperatura de -20°C aguardando a realização de imunocitoquímica, e demais procedimentos histológicos.

2.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

2.4.1 Análise da área de lesão

Para a detecção e avaliação da área de lesão, foi utilizada a coloração de violeta de cresila em secções com espessura de 20 e 50 μm . Nestas secções, obtidas de regiões anteriores, no sítio da injeção de NMDA, e posteriores a este, delimitou-se a evolução ântero-posterior do processo lesivo de modo a fazer a análise histopatológica no epicentro da lesão excitotóxica. As secções foram avaliadas para a observação de palor, perda tecidual e inflamação, que são eventos histopatológicos comuns após lesão excitotóxica (GOMES-LEAL et al., 2004, 2005; LIMA et al., 2008).

2.4.2 Estudos Imuno-histoquímicos

Para marcar neutrófilos, utilizou-se o anticorpo anti-MBS1 (CNS Inflammation Group, 1:500), gentilmente cedido pelo professor Victor Hugh Perry da Universidade de Southampton (Inglaterra). Este anticorpo reconhece epítomos presentes na membrana da população geral de neutrófilos (GOMES-LEAL et al., 2004; GOMES-LEAL et al., 2005; SCHNELL et al., 1999). Microglia/macrófagos ativados foram identificados por imuno-histoquímica para o anticorpo ED1 (1:500,

Serotec) que reconhece um epítipo na membrana de lisossomas do citoplasma de macrófagos/micróglia ativados (DIJKSTRA et al., 1985). O protocolo de imunistoquímica foi adaptado de GOMES-LEAL, 2002.

As secções foram imersas em tampão borato 0,2 M (pH 9,0), previamente aquecido a 70 °C em banho maria, por 30 minutos. A temperatura foi mantida constante durante este período, após o qual as secções foram resfriadas (ainda no tampão borato) por 20 minutos, em temperatura ambiente a seguir, as secções de 20µm foram submetidas à imuno-histoquímica, segundo o seguinte protocolo adaptado de Gomes-Leal (2002):

- a. Lavagem (5 min) em PBS;
- b. Incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 30%/metanol (1ml de H₂O₂/100 ml de metanol) durante 20 minutos;
- c. Lavagem em PBS/Tween (1 ml de Tween 20 (Sigma)/ litro de PBS) - 3 vezes de 5 minutos;
- d. Bloqueio nos soros normais (a 10%) de cabra para MBS1 e de cavalo para ED1 diluídos em PBS – 1 hora;
- e. Após o bloqueio em soro normal, o excesso do mesmo foi removido, sem nova lavagem, e as secções foram incubadas nos anticorpos primários coelho anti-MBS1 (1:500) e camundongo anti-ED1 (1:500), diluídos em PBS, até o outro dia (overnight);
- f. Lavagem PBS/Tween– 3 vezes de 5 minutos;
- g. Incubação nos anticorpos secundários biotinizados (Laboratórios Vector) anti-coelho feito em cabra (1:200) para MBS1; Anti-camundongo feito em cavalo (1:100) para ED1 por 2 horas;
- h. Lavagem – 3 vezes durante 5 minutos;
- i. Incubação no complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC, Laboratórios vector) por 2h (uma gota da solução A, mais uma gota da solução B para 5ml de PBS). Esta solução tem que ficar em repouso, pelo menos, 30 minutos antes de ser utilizada;
- j. Lavagem – 4 vezes de 5 minutos;
- l. Reação em diamino benzidina (DAB, Sigma) para a revelação do antígeno na presença da enzima peroxidase.

Esta fase consistiu nas seguintes etapas: alíquotas de 5ml de DAB (25 mg/ml) foram descongeladas e diluídas em 250 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2-7,4). Antes do início da reação, acrescentou-se à solução de DAB 130 µl de H₂O₂. As secções montadas em lâminas alojadas em uma cesta histológica foram imersas na solução de DAB/H₂O₂ e monitoradas com auxílio de um microscópio até que o padrão da reação fosse satisfatório.

Em seguida, as secções foram lavadas em tampão fosfato 0,1M (por 2 vezes de 5 minutos) desidratadas e montadas entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merk).

2.5 ANÁLISE QUALITATIVA

Todas as secções coradas pelos diferentes métodos histológicos e imuno-histoquímicos foram inspecionadas em microscópio óptico utilizando objetivas de 10x e 40x (Bioval L200C). Imagens das secções contendo os campos mais ilustrativos dos animais do grupo experimental e controle foram obtidos com o uso de microscópio óptico trilocular (Olympus BX41) com câmera digital acoplada (Olympus Evolt E-330).

2.6 ANÁLISE QUANTITATIVA

2.6.1 Contagem de Células

Para avaliação quantitativa dos padrões histopatológicos, o número de neutrófilos (MBS1); macrófagos/micróglia ativados (células ED1+); foi contado usando um microscópio binocular Bioval L200C, com retículo de contagem (1 x 1 cm²) na ocular, utilizando-se a objetiva Plan 40x. As contagens foram realizadas em três campos: um campo central, um à esquerda e outro localizado à direita da lesão. A média das contagens e os desvios padrão obtidos foram plotados em coordenadas cartesianas.

2.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

A composição química foi obtida por meio de cromatografia feita no Laboratório de Fitoquímica Adolpho Ducke em um equipamento CG-EM, em sistema Finnigan Mat INCOS XL, equipado com coluna capilar de sílica DB-5MS (30 cm x 0,25 mm; 0,25 μ m de espessura de filme) nas seguintes condições operacionais: gás de arraste: hélio, em velocidade linear de 32 cm/s (medida a 100°C); tipo de injeção: “splitless”, (2 μ l de uma solução 2:1000 de hexano); temperatura do injetor e do detetor: 250°C; programa de temperatura: 60°C –240 °C (3°C/min); EM: impacto eletrônico, 70eV; temperatura da fonte de íons e partes de conexão: 180°C. Os componentes foram identificados através da comparação dos seus espectros de massas e índices de retenção (IR) com os de substâncias padrão, existentes nas bibliotecas do sistema e, com dados da literatura (ADAMS, 2001). Os IR foram obtidos utilizando a série homologa dos *n*-alcanos. A quantificação dos componentes foi obtida através de CG, HP5890-II, equipado com detetor de ionização de chama (DIC), e acoplado a um integrador HP3396-II nas mesmas condições operacionais, exceto o gás de arraste que foi o hidrogênio.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste *t* de student para amostras independentes para comparação entre os grupos experimentais e controle, com nível de significância $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em gráficos como média (\pm erro padrão da média).

3 RESULTADOS

3.1 AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS COMPONENTES VOLATÉIS DA AMOSTRA DE OLEO-RESINA DE *C. reticulata*.

O principal componente encontrado foi o já esperado β -cariofileno, contudo em uma concentração inferior àquelas encontradas em outros estudos sobre óleo-resina de *C. reticulata* (37,3%), chamando atenção para elevada quantidade de β -bisaboleno (14,5%).

Tabela 1. Composição percentual do óleo-resina de *C. reticulata*.

Constituintes	Junho
ciclosativeno	0.9
α -copaene	0.5
β -elemeno	3.2
α -gurjuneno	0.7
β-cariofileno	37.3
<i>trans</i> - α -bergamoteno	9.0
aromadendreno	0.9
α -humuleno + (E)- β -farneseno	5.4
β -chamigreno	1.0
γ -gurjuneno	0.6
γ -curcumeno	0.6
β -selineno	4.8
α -selineno	3.0
(Z)- α -bisaboleno	1.8
α -bulneseno	2.2
β-bisaboleno	14.5
β -curcumeno	0.4
β -sesquifelandreno	1.2
(E)- γ -bisaboleno	1.4
β -bisabolol	0.2

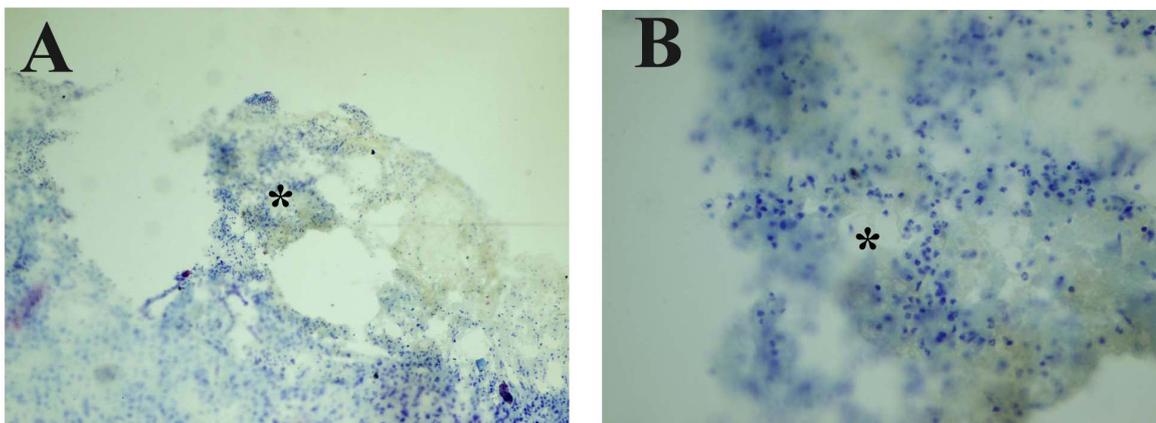
3.2 PERDA TECIDUAL COM CARACTERÍSTICAS NECRÓTICAS E INTENSA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDAS POR NMDA SÃO MINIMIZADAS PELO TRATAMENTO COM COPAÍBA

A injeção de 80 nmol de NMDA no córtex motor de ratos Wistar adultos induziu perda tecidual, com características necróticas, acompanhada de intensa resposta inflamatória, no primeiro e no quarto dia após a lesão excitotóxica cortical nos animais dos Grupos 2 (Figura 1A-B) e 4 (Figura 2A-B), respectivamente. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios (GOMES-LEAL et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2008; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008). Nestes tempos de sobrevivência, as células inflamatórias apresentaram características predominantes de células polimorfonucleares (sobrevivência de 1 dia) ou mononucleares (sobrevivência de 4 dias), como revelado pela coloração com violeta de cresila (Figuras 1 e 2). Nos Grupos 1 e 4, nos quais os animais foram tratados com copaíba, houve menor perda tecidual e infiltrado inflamatório no córtex lesado (Figuras 1C-D e 2C-D).

3.3 INIBIÇÃO DO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PELO TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA APÓS LESÃO AGUDA DO CÓRTEX MOTOR

Para avaliar a presença de neutrófilos no córtex motor lesado, realizamos imuno-histoquímica para MBS1, um anticorpo que marca a população geral dos neutrófilos (GOMES-LEAL et al., 2005). A injeção de NMDA no córtex motor induziu recrutamento massivo de neutrófilos, 24h após o processo lesivo (Figura 2A-B). Contudo, o tratamento com 400 mg/kg de óleo-resina de copaíba induziu uma diminuição significativa do recrutamento de neutrófilos (Figura 2C-D). Estes resultados foram confirmados por análise quantitativa (Figura 2E). A densidade média de neutrófilos por campo em animais tratados com copaíba foi quase 40% menor comparada àquela dos animais tratados com veículo ($55,56 \pm 4,55EP$; $34,06 \pm 3,5EP$, respectivamente) (Figura 2E).

NMDA - Veículo



NMDA - Copaíba

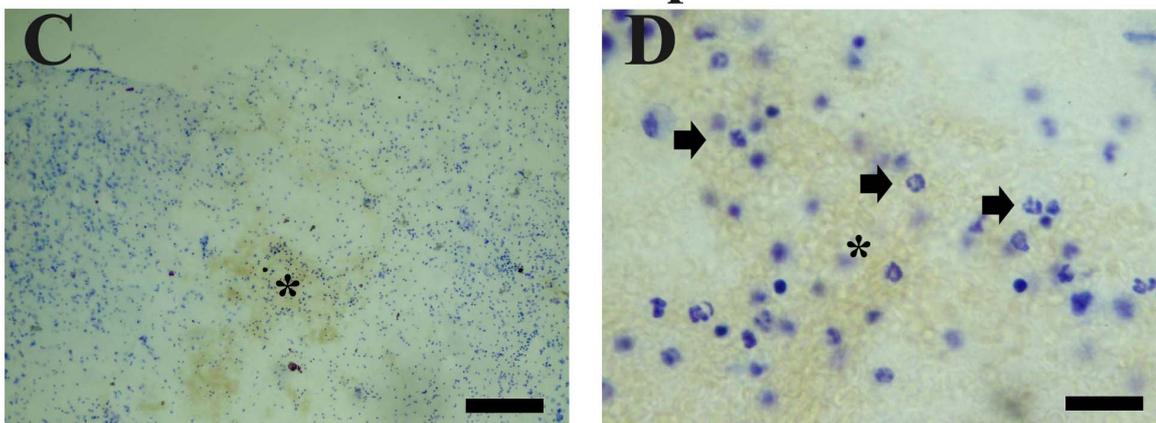


FIGURA 1. Análise histopatológica revelada pela coração com violeta de cresila cresila. Perda tecidual e infiltrado de polimorfonucleares em animais injetados com NMDA e tratados com solução de Tween a 5% (A-B) ou copaíba (400 mg/Kg, C-D). Houve menor perda tecidual e infiltrado inflamatório após o tratamento com copaíba (C-D). O asterisco aponta para o centro da lesão. As setas apontam para células polimorfonucleares (neutrófilos). Escalas: A,C (300 μ m); B, D (50 μ m)

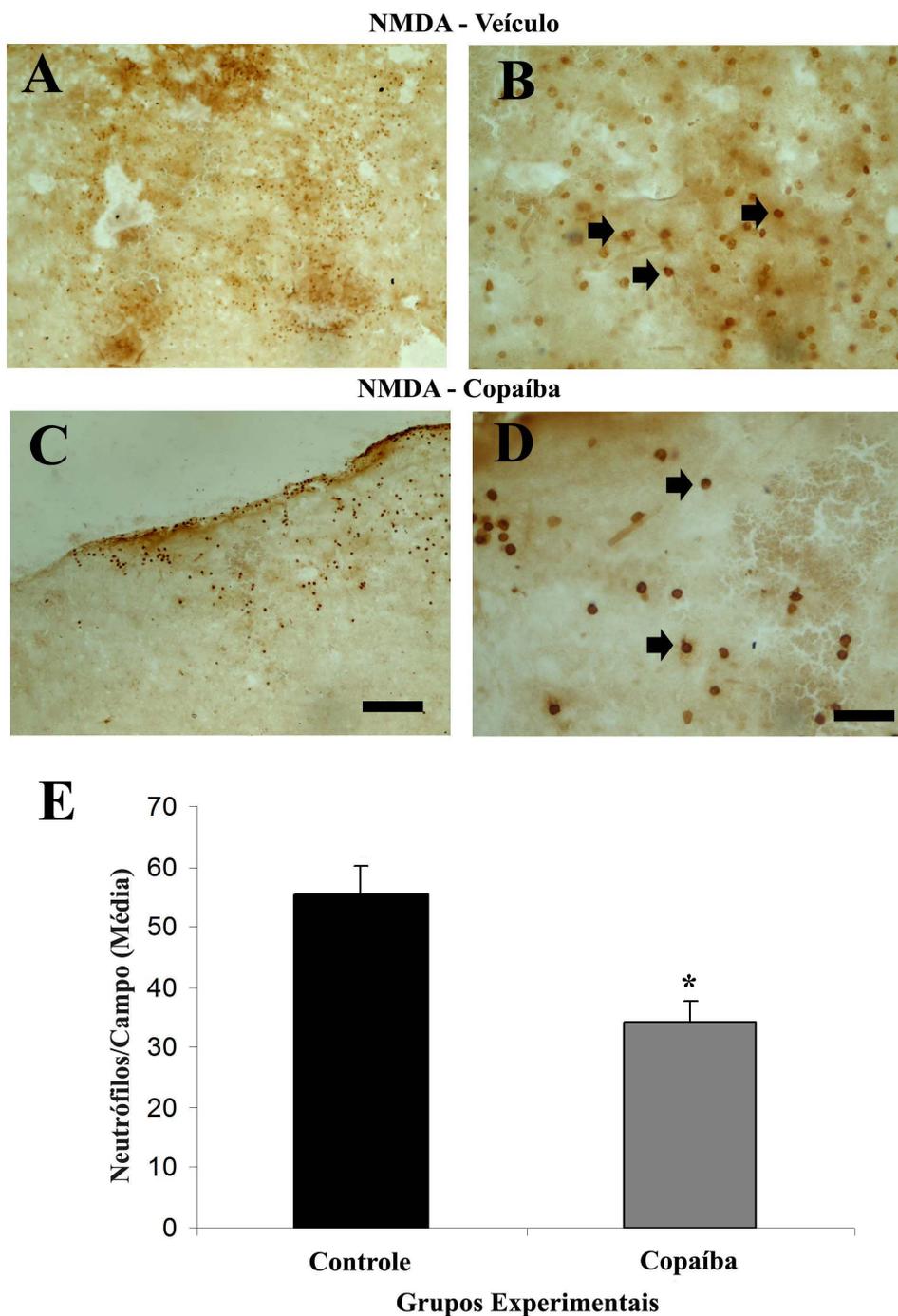
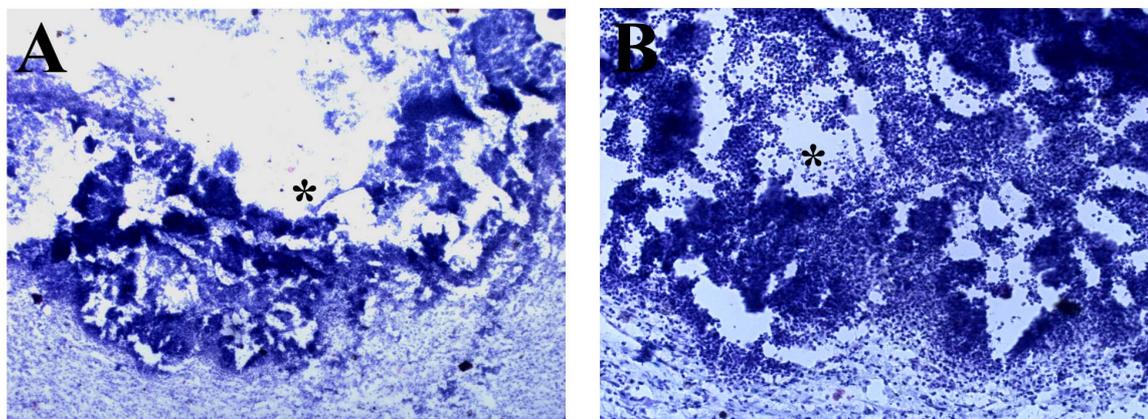


FIGURA 2. O tratamento com copaíba diminui o recrutamento de neutrófilos após lesão aguda do córtex motor, como revelado por imunohistoquímica específica para estas células inflamatórias. Cérebros de animais tratados com veículo (A-B) ou copaíba (400 mg/Kg) (C-D). Houve diminuição do infiltrado neutrofílico no córtex de animais tratados com copaíba (C e D). Densidade de neutrófilos examinada 24 horas após a lesão excitotóxica (E). Notar que o animal tratado com copaíba exibiu menor quantidade de neutrófilos no córtex motor lesado (E). Os asteriscos mostram o epicentro da lesão excitotóxica. As setas apontam para neutrófilos. Escalas: A, C = 300 μ m; B, D = 50 μ m.

3.4 O TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA INIBE TAMBÉM O RECRUTAMENTO DE MACRÓFAGOS APÓS LESÃO AGUDA DO CÓRTEX MOTOR

Em seguida, utilizando um tempo de sobrevida mais extenso (4 dias) para avaliação da presença de macrófagos no córtex motor lesado, realizamos imunohistoquímica para ED-1, um anticorpo que marca a população geral de neutrófilos (GOMES-LEAL et al., 2005). A injeção de NMDA no córtex motor também promoveu a esperada infiltração intensa de macrófagos ativados (Figura 3A-B). Contudo, o grupo tratado com óleo-resina de copaíba apresentou uma dramática diminuição do recrutamento de macrófagos (Figura 3C-D). A densidade média de macrófagos por campo no grupo tratado apresentou aproximadamente 37,97% da densidade média de células ED1+ observada no grupo controle ($75,59 \pm 3,19EP$; $28,70 \pm 2,14EP$, respectivamente) (Figura 3E).

NMDA-Veículo



NMDA-Copaíba

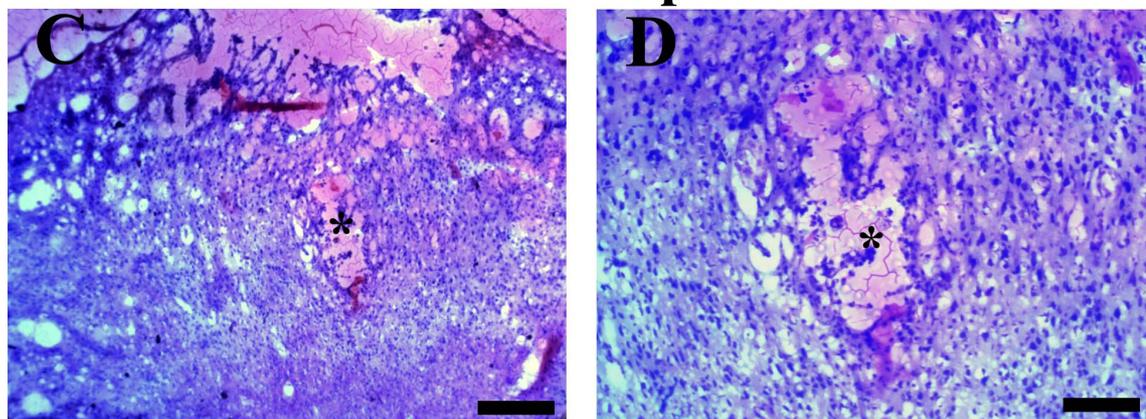


FIGURA 3. Análise histopatológica revelada pela coração com violeta de cresila cresila. Perda tecidual e ativação de microglia/macrófagos em animais injetados com NMDA e tratados com solução de Tween a 5% (A-B) ou copaíba (400 mg/Kg, C-D). Houve menor perda tecidual e ativação microglial/macrofágica após o tratamento com copaíba (C-D). O asterisco aponta para o centro da lesão. Notar o grande número de células inflamatórias em B. Escalas: A,C (300µm); B,D (50µm).

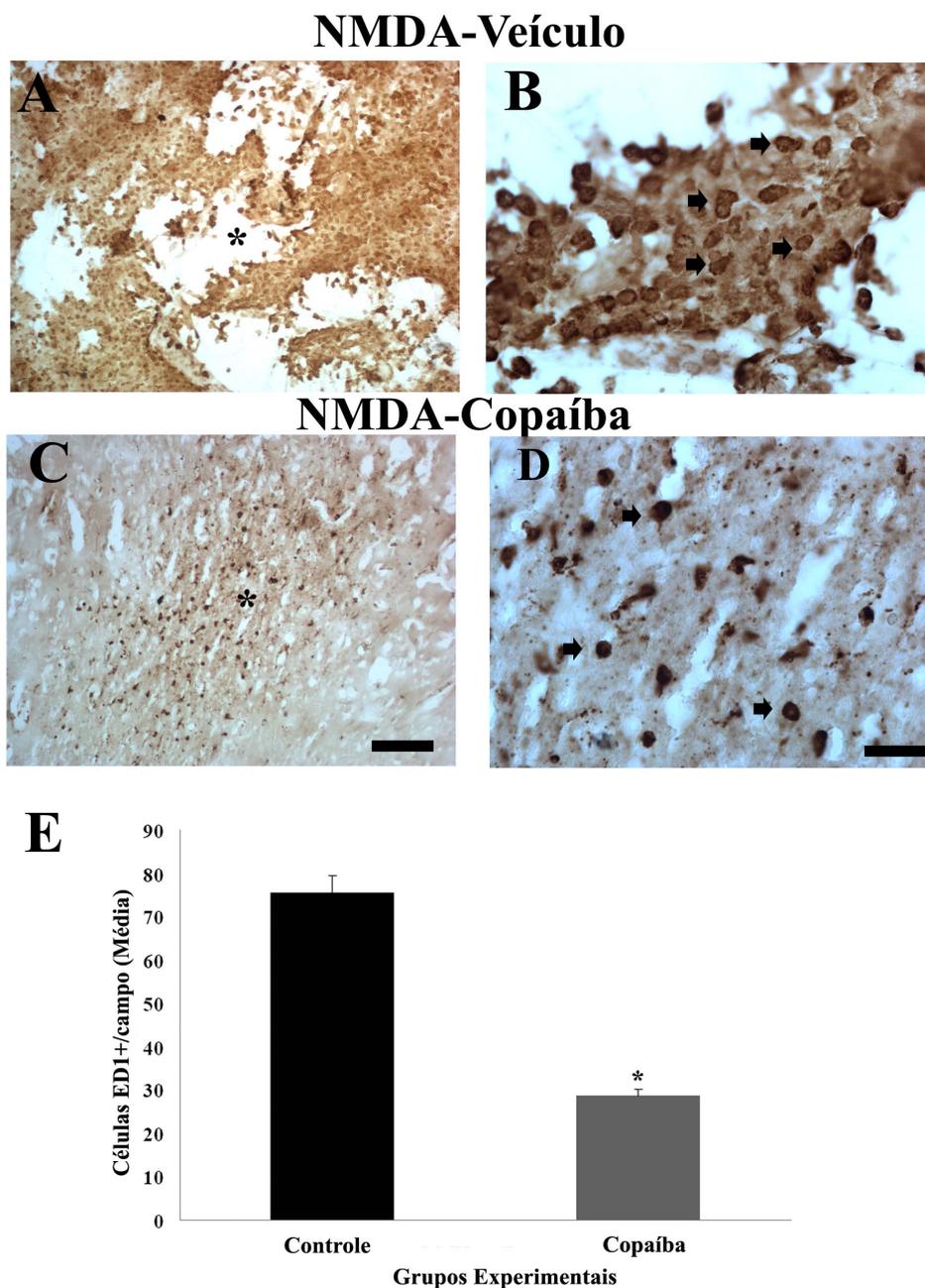


FIGURA 4. O tratamento com copaíba diminui a ativação microglial/macrofágica após lesão aguda do córtex motor, como revelado por imunistoquímica específica para estas células inflamatórias. Cérebros de animais tratados com veículo (A-B) ou copaiba (400 mg/Kg) (C-D). Houve diminuição da ativação microglial/macrofágica no córtex de animais tratados com copaíba (C e D). Densidade média de microglia/macrófagos ativados examinada 4 dias após a lesão excitotóxica (E). Notar que o animal tratado com copaíba exibiu menor quantidade de microglia/macrófagos ativados no córtex motor lesado (E). Os asteriscos mostram o epicentro da lesão excitotóxica. As setas apontam para microglia/macrófagos ativados (células ED1+). Escalas: A, C = 300 μ m; B, D = 50 μ m.

NMDA-Veículo



NMDA-Copaíba

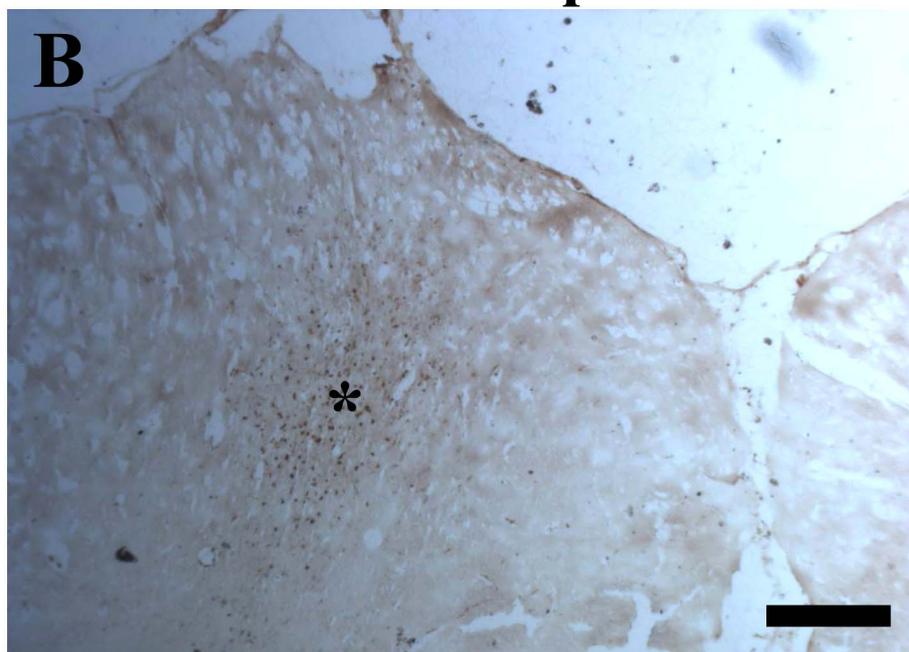


FIGURA 5. Diminuição da cavitação cortical pelo tratamento com copaíba após lesão do córtex motor. Animal do grupo 4 apresentando grande cavidade cortical 4 dias após a lesão excitotóxica (A). Diminuição da cavitação nos animais tratados durante 3 dias com copaiba (400mg/Kg ao dia, dividido em duas doses). O asterisco aponta o epicentro da lesão. Escala = 300 μ m

4 DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS E A IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

No presente estudo, induzimos microinjeções do agonista glutamatérgico NMDA no córtex motor de ratos adultos para a indução de lesão neural aguda. Este modelo de lesão química induz características histopatológicas, incluindo perda tecidual necrótica e intensa inflamação, similares às obtidas em modelos experimentais de trauma e isquemia (GOMES-LEAL et al., 2004, 2005; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2008; SCHNELL et al., 1999). O referido modelo experimental é utilizado de rotina em nosso laboratório (GOMES-LEAL et al., 2004; 2005; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2008; LIPTON, 1999; WINDLE et al. 2006). Estes eventos histopatológicos são similares aos que ocorrem em humanos após trauma e acidente vascular encefálico (TATOR, 1991; TATOR; KOYANAGI, 1997). Estes resultados podem ser interpretados pelo fato de que existem fortes evidências experimentais que o acúmulo de aminoácidos excitatórios é um evento fisiopatológico comum em diversas desordens neurais, tanto em animais de experimentação como humanos (MELDRUM, 1994)

Neste estudo, investigamos os efeitos de injeções intraperitoniais de 400 mg/kg do óleo-resina da *C. reticulata* sobre ratos adultos submetidos a lesão excitotóxica. Avaliamos os animais, em duas janelas temporais: 24 horas após o processo lesivo, o que é adequado ao estudo da influência do tratamento sobre o recrutamento de neutrófilos, e 96 horas (4 dias), o que permite uma melhor investigação dos efeitos do tratamento sobre a ativação microglial/macrofágica (GOMES-LEAL, 2004; GOMES-LEAL, 2005; LIMA et al., 2008). Os resultados sugerem que o tratamento utilizado possui conspícuo efeito anti-inflamatório e neuroprotetor no modelo experimental em questão.

Apesar do uso tradicional da copaíba na medicina popular como anti-inflamatório e cicatrizante, e das evidências científicas disponíveis sugerindo estes efeitos em tecidos não neurais, o potencial terapêutico da copaíba não havia sido ainda investigado em modelo de lesão aguda do CNS. Para a escolha da

concentração de copaíba usada na presente investigação, nos baseamos em investigações prévias que mostram um claro efeito antioxidante e anti-inflamatório do óleo-resina de copaíba (200-400 mg/Kg) após lesão aguda de tecido periférico, incluindo lesão mecânica de tecido epitelial (PAIVA et al., 2002), colite induzida por injeção de ácido acético (PAIVA et al., 2004) e lesão isquêmica epitelial (de LIMA SILVA et al., 2009).

A concentração utilizada neste estudo está na faixa superior das concentrações utilizadas nos trabalhos em tecidos periféricos. Em estudos futuros, deve-se investigar os efeitos aqui apresentados para concentrações menores do óleo-resina de copaíba.

4.2 DIMINUIÇÃO DO INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS PELO TRATAMENTO COM COPAIBA APÓS LESÃO AGUDA DO CÓRTEX MOTOR

Os resultados mostraram que o tratamento com copaíba reduziu o infiltrado de neutrófilos 24h após a indução da lesão excitotóxica. Após lesão aguda do CNS, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias recrutadas e acumulam no centro lesivo, nas primeiras 24 horas (GOMES-LEAL, 2004; GOMES-LEAL, 2005; SCHNELL et al., 1999; LIMA et al., 2008).

Os neutrófilos são células fagocitárias e desempenham um papel benéfico de combate à infecção (fagocitando patógenos) ou de limpeza tecidual do tecido lesado (GOMES-LEAL, 2002; ABBAS E JANEWAY, 2000). No entanto, inúmeras evidências experimentais sugerem que estas células inflamatórias podem contribuir para eventos lesivos, tanto em tecidos neurais (TAOKA e OKAJIMA, 1998; TAOKA et al., 1998; TAOKA et al., 1997; LIAO et al., 2001), como tecido não neurais (LIPTON et al., 2001).

Neutrófilos parecem contribuir para a lesão por reperfusão isquêmica no coração (LIPTON et al., 2001). Relatou-se neuronofagia por neutrófilos após lesão por compressão da medula espinha do gato (MEANS; ANDERSON, 1983) e estas células inflamatórias possuem um importante papel lesivo após lesão experimental da medula espinha de ratos (TAOKA et al., 1997). Neste modelo experimental, o bloqueio do recrutamento de neutrófilos com anticorpos anti-seletinas (TAOKA et al., 1997), inibidores de elastases (TONAI et al., 2001), cinases proteicas (HARA et al.,

2000) ou anti-coagulantes fisiológicos (HIROSE et al., 2000) induzem neuroproteção. Em humanos, a contagem de células brancas do sangue, principalmente linfócitos e neutrófilos, é elevada após lesão neural aguda, incluindo trauma cerebral e da medula espinhal (TRAVLOS et al., 1994). Recentemente, também demonstrou-se que o acúmulo excessivo de neutrófilos contribui significativamente para a indução de morte neuronal após isquemia experimental (NEUMANN et al., 2008). Nestas circunstâncias, os neutrófilos podem liberar diversas substâncias lesivas, incluindo citocinas pró-inflamatórias e proteases, como elastases, que podem exacerbar a perda tecidual após lesão do tecido nervoso.

Considerando os dados descritos acima, a diminuição do recrutamento excessivo de neutrófilos pelo tratamento com copaíba após lesão aguda do SCN, pode ter um considerável efeito benéfico. Efeito similar foi mostrado em um modelo experimental de colite por injeção de ácido acético (PAIVA et al., 2004). Neste estudo, observou-se considerável diminuição do infiltrado inflamatório e efeitos antioxidantes após a indução de colite experimental com o uso de 200-400 mg/Kg de óleo-resina de copaíba. Considerável inibição de leucócitos foi observada em um modelo experimental de pleurisia induzida pela injeção de zymosan (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Neste estudo, o tratamento com *C. reticulata* e *C. multijuga* Hayne diminuíram o infiltrado de leucócitos com doses entre 100-400 mg/Kg.

Os mecanismos pelos quais a copaíba inibe o recrutamento de neutrófilos após lesão cortical aguda não são conhecidos. Talvez componentes do óleo-resina bloqueiem a adesão destas células ao endotélio vascular, ou bloqueiem diretamente os receptores da membrana de neutrófilos associados à adesão dos mesmos ao endotélio vascular. Estes mecanismos devem ser estabelecidos em estudos futuros.

4.3 DIMINUIÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL/MACROFÁGICA PELO TRATAMENTO COM COPAÍBA APÓS LESÃO AGUDA DO CÓRTEX MOTOR

O tratamento diário de ratos com lesão excitotóxica durante 3 dias com 400 mg/Kg de copaíba diminuiu significativamente (em torno de 60%) a ativação microglial/macrofágica após lesão aguda do córtex motor. Esta redução foi mesmo mais intensa que a obtida pela minociclina, uma tetraciclina semi-sintética

que comprovadamente inibe a ativação microglial após isquemia, lesão da medula espinhal e outras desordens neurais agudas (YRJÄNHEIKK et al., 1999; TIKKA et al., 2001; WASSERMANN et al., 2007; LAMPL et al., 2007; HAYAKAWA et al., 2008; KIN; SUH, 2009).

A ativação microglial/macrofágica ocorre em tempos mais tardios (1-2 semanas) após desordens neurais agudas (MORIOKA et al., 1993; CLARK et al., 1993; GOMES-LEAL et al., 2004, 2005; THORED et al., 2009), incluindo lesão excitotóxica (BOLTON; PERRY, 1998; LIMA et al., 2008). Esta ativação perdura por muitas semanas após o início do processo lesivo (THORED et al., 2009). A resposta inicial se deve á ativação da microglia residente, mas, em tempos mais tardios, a presença de macrófagos hematogênicos, aqueles derivados da corrente sanguínea, parece contribuir mais significativamente na cena lesiva (SCHROETER et al., 1997; SCHILLING et al., 2003, 2005).

A intensa ativação microglial após desordens neurais agudas é fisiologicamente relacionada a eventos fagocitóticos, que são importantes para a remoção de requeiros de células mortas por necrose e apoptose (STREIT, 1999). Mesmo neutrófilos são fagocitados durante esta fase do processo lesivo (NEUMANN et al., 2008). Este papel fagocítico das células microgliais é benéfico e contribui para a resolução do processo inflamatório, contribuindo para regeneração e neuroproteção (PERRY et al., 1987; NEUMANN et al., 2006, 2008; LALANCETTE-HERBET et al., 2007). No entanto, inúmeras evidências experimentais sugerem que uma ativação microglial excessiva, não controlada, das células microgliais é extremamente deletéria e intensifica o processo lesivo (POPOVICH et al., 1998; YRJÄNHEIKK et al., 1999; BLOCK, 2007; HAYAKAWA et al., 2008).

Células ED+ são macrófagos extremamente ativados, derivados tanto da microglia residente como de células hematogênicas (POPOVICH; HICKEY, 2001). A considerável diminuição do número destas células implementada pelo tratamento com copaíba pode ter contribuído para a neuroproteção observada no presente estudo. Nos animais controle, tratados apenas com o veículo da solução de copaíba, observou-se intensa cavitação cortical no tempo de sobrevivência de 4 dias. No entanto, o fenômeno de cavitação praticamente desapareceu após o tratamento com o óleo-resina de copaíba.

O mecanismo pelo qual o tratamento com copaíba diminui a ativação microglial e induz neuroproteção não é conhecido. No entanto, alguns estudos mostram uma grande concentração de sesquiterpenos e outros terpenos no óleo-resina de copaíba (PEDREIRA, 2007; GOMES et al., 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2007; SANTOS et al., 2008). Entre os sesquiterpenos, o β -cariofileno pode perfazer de 40 a 86% do total da constituição química do espécime, sendo o principal componente do perfil químico de *C. reticulata* (PEDREIRA, 2007; GOMES et al., 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2007; SANTOS et al., 2008). A considerável presença de β -cariofileno lhe torna razoável indicação a princípio ativo, e sugere um caminho interessante para a descrição das possíveis vias moleculares anti-inflamatórias do óleo resina de *C. reticulata* que ainda precisam ser mapeadas.

Inexistem estudos que tenham investigado o papel do β -cariofileno no tratamento de AVENC experimental. Contudo, sua propriedade canabinóide restrita ao receptor CB(2), que é anti-inflamatório e não psicoativo, já é estudado como uma potencial estratégia terapêutica para processos inflamatórios, dor, aterosclerose e osteoporose (GERTSCH et al., 2008). O uso oral de β -cariofileno reduz intensamente a inflamação causada por carragenina em camundongos do tipo selvagem, porém não em nocautes para CB(2), propondo uma dependência do do CB(2) para a atividade do β -cariofileno (GERTSCH et al., 2008). É sugerido que o mecanismo envolva a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico e também a redução do fosforilamento de Erk1/2 e JNK1/2 em monócitos, ambas estimuladas por LPS e responsáveis pelo fenótipo microglial considerado prejudicial (GERTSCH et al., 2008).

Outra proposta de mecanismo de ação anti-inflamatória do receptor CB2 envolve a inibição do TNF- α , que parece possuir efeitos benéficos como prejudiciais no contexto da lesão neural. Basicamente, os receptores TNF-p55 são considerados pela maioria dos autores como benéficos dentro de um ambiente de lesão aguda, em paralelo com a tolerância isquêmica neuronal induzida pelo TNF- α em episódios de curta duração hipóxica, ou anóxica (LAMBERTSEN et al., 2009; PRADILLO et al., 2005; TAOUIK et al., 2008). Outros autores, consideram o TNF- α como lesivo, através da ação em receptores TNFR1 (WANG et al., 2004). A atividade supressora do β -cariofileno sobre o TNF- α de papel lesivo poderia estar envolvida nos efeitos neuroprotetores aqui descritos. Contudo, em estudos futuros deve-se

investigar os efeitos de componentes específicos do óleo da copaíba, como o β -cariofileno, sobre a via de liberação de TNF- α .

A inibição de TNF- α causada por agonistas de CB(2), observada em culturas de parede vascular aórtica, indica que, através de um mecanismo indireto, componentes do óleo de copaíba podem suprimir moléculas de adesão celular, a proteína quimioatratadora de monócitos, e, portanto, interferir com a migração e adesão de monócitos e outros leucócitos (RAJESH et al.,2007)

Os efeitos do tratamento com copaíba, com diferentes concentrações e tempos de sobrevida, sobre outras células inflamatórias, pore exemplo linfócitos, bem como os eventos moleculares envolvidos, devem ser investigados em estudos futuros para a compreensão dos mecanismos de ação dessa planta no CNS lesado.

5 CONCLUSÃO

O tratamento com óleo-resina de copaiba *C. reticulata*, na concentração de 400 mg/kg em uma dose única, diminui em cerca de 40% o recrutamento de neutrófilos para o córtex motor de ratos adultos após lesão excitotóxica aguda. O tratamento destes animais com três doses diárias de 400 mg/Kg (divididas em duas aplicações de 200 mg/Kg) diminui em cerca de 60% a ativação microglial/macrofágica no modelo experimental proposto. Os efeitos anti-inflamatórios foram associados à conspícua neuroproteção, evidenciada pela diminuição de perda tecidual, por exemplo, a diminuição de cavidades corticais. Os efeitos do tratamento com copaíba, com diferentes concentrações e tempos de sobrevida, sobre outras células inflamatórias, por exemplo linfócitos, bem como os eventos moleculares envolvidos, devem ser investigados em estudos futuros para a compreensão dos mecanismos de ação dessa planta no CNS lesado.

REFERÊNCIA

ADAMS, R. P. **Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publ Corp., 2001.

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

ANNESER, J. Molecular basis of treatment in motor neurone disease. **Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 21, p. S913-8, , 2000.

ARUMUGAM, T.; GRANGER, D.; MATTSON, M. Stroke and t-cells. **NeuroMolecular Medicine**, v. 7, p. 229-242, , 2005.

ATLANTE, A.; CALISSANO, P.; BOBBA, A.; AZZARITI, A.; MARRA, E.; PASSARELLA, S. Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ros)-dependent fashion and can operate as a ros scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, p. 37159-37166, Nov, 2000.

ATLANTE, A.; CALISSANO, P.; BOBBA, A.; GIANNATTASIO, S.; MARRA, E.; PASSARELLA, S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. **FEBS letters**, v. 497, p. 1-5, May, 2001.

BANATI, R. B.; GEHRMANN, J.; SCHUBERT, P.; KREUTZBERG, G. W. Cytotoxicity of microglia. **Glia**, v. 7, p. 111-118, Jan, 1993.

BECKER, K.; KINDRICK, D.; RELTON, J.; HARLAN, J.; WINN, R. Antibody to the alpha4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 32, p. 206-211, Jan, 2001.

BERNARDES-SILVA, M.; ANTHONY, D. C.; ISSEKUTZ, A. C.; PERRY, V. H. Recruitment of neutrophils across the blood-brain barrier: the role of e- and p-selectins. , v. , , Sep, 2001.

BLIGHT, A. R. Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. **Central nervous system trauma : journal of the American Paralysis Association**, v. 2, p. 299-315, , 1985.

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

BLOCK, F.; DIHNÉ, M.; LOOS, M. Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. **Progress in neurobiology**, v. 75, p. 342-365, Apr, 2005.

BOLTON, S. J.; PERRY, V. H. Differential blood–brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. **Experimental Neurology**, v. 154, p. 231–240-231–240, , 1998.

BOMSTEIN, Y.; MARDER, J. B.; VITNER, K.; SMIRNOV, I.; LISAEY, G.; BUTOVSKY, O.; FULGA, V.; YOLES, E. Features of skin-coincubated macrophages that promote recovery from spinal cord injury. **Journal of neuroimmunology**, v. 142, p. 10-16, Sep, 2003.

BOUNDS, J.; WIEBERS, D.; WHISNANT, J.; OKAZAKI, H. Mechanisms and timing of deaths from cerebral infarction. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 12, p. 474-477, Jul, 1981.

BURNE-TANEY, M. J.; RABB, H. The role of adhesion molecules and t cells in ischemic renal injury. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 12, p. 85-90, Jan, 2003.

BUTOVSKY, O.; HAUBEN, E.; SCHWARTZ, M. Morphological aspects of spinal cord autoimmune neuroprotection: colocalization of t cells with b7--2 (cd86) and prevention of cyst formation. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, p. 1065-1067, Apr, 2001.

BUTOVSKY, O.; TALPALAR, A. E.; BEN-YAAKOV, K.; SCHWARTZ, M. Activation of microglia by aggregated β -amyloid or lipopolysaccharide impairs mhc-ii expression and renders them cytotoxic whereas ifn- γ and il-4 render them protective. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 29, p. 381-393, Jul, 2005.

CAMACHO, A.; MASSIEU, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. **Archives of medical research**, v. 37, p. 11-18, Jan, 2006.

CAMPANELLA, M.; SCIORATI, C.; TAROZZO, G.; BELTRAMO, M. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 33, p. 586-592, Feb, 2002.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, p. 2068-2101, Oct, 1994.

CHOI D Stroke. **Neurobiology of Disease**, v. 7, p. 552-558, Oct, 2000.

CHOI, D. W. Excitotoxic cell death. **Journal of neurobiology**, v. 23, p. 1261-1276, Nov, 1992.

CLARK, R. K.; LEE, E. V.; FISH, C. J.; WHITE, R. F.; PRICE, W. J.; JONAK, Z. L.; FEUERSTEIN, G. Z.; BARONE, F. C. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. **Brain research bulletin**, v. 31, p. 565-572, , 1993.

DEL ZOPPO, G.; GINIS, I.; HALLENBECK, J. M.; IADECOLA, C.; WANG, X.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and inos in brain response to ischemia. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 10, p. 95-112, Jan, 2000.

DIJKSTRA, C. D.; DÖPP, E. A.; JOLING, P.; KRAAL, G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ed1, ed2 and ed3. **Immunology**, v. 54, p. 589-599, Mar, 1985.

DOS SANTOS, C. D. PICANÇO-DINIZ, C. W.; GOMES-LEAL, W. Differential patterns of inflammatory response, axonal damage and myelin impairment following excitotoxic or ischemic damage to the trigeminal spinal nucleus of adult rats. **Brain Research**, v. 1172, p. 130-144. 2007

EKDAHL, C. T.; CLAASEN, J.; BONDE, S.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 13632-13637, Nov, 2003.

EKSHYYAN, O.; AW, T. Y. Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders. **Current neurovascular research**, v. 1, p. 355-371, Oct, 2004.

ELDADAH, B. A.; FADEN, A. I. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and cns injury. **Journal of neurotrauma**, v. 17, p. 811-829, Oct, 2000.

ESIRI, M. M. The interplay between inflammation and neurodegeneration in cns disease. **Journal of neuroimmunology**, v. 184, p. 4-16, Mar, 2007.

FERGUSON, B.; MATYSZAK, M. K.; ESIRI, M. M.; PERRY, V. H. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. **Brain : a journal of neurology**, v. 120 (Pt 3), p. 393-399, Mar, 1997.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE, X. Q.; ALTMANN, K. H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **PNAS**, Washington, v. 105, p. 9099-9104, jul. 2008.

GILMAN, S. Pharmacologic management of ischemic stroke: relevance to stem cell therapy. **Experimental Neurology**, v. 199, p. 28-36, May, 2006.

GIULIAN, D.; VACA, K.; CORPUZ, M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 13, p. 29-37, Jan, 1993.

GIULIAN, D.; VACA, K.; NOONAN, C. A. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with hiv-1. **Science**, v. 250, p. 1593-1596, Dec, 1990.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils, **Journal of Ethnopharmacology**, Londres, n. 2007, v. 109, p. 486-492, 2006.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; FREIRE, M. A.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; PERRY, V. H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Experimental neurology**, v. 190, p. 456-467, Dec, 2004.

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

HARA, M.; TAKAYASU, M.; WATANABE, K.; NODA, A.; TAKAGI, T.; SUZUKI, Y.; YOSHIDA, J. Protein kinase inhibition by fasudil hydrochloride promotes neurological recovery after spinal cord injury in rats. **J Neurosurg**, v. 93, p. 94-101, 2000

HARBORNE, J. B.; BOULTER, D.; TURNER, B. L. **Chemotaxonomy of the leguminosae**. Academic press London and New York: , 1971.

HAYASHI, T. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. **The Japanese journal of physiology**, v. 3, p. 46-64, Nov, 1952.

HELDMANN, U.; THORED, P.; CLAASEN, J.; ARVIDSSON, A.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Tnf-alpha antibody infusion impairs survival of stroke-generated neuroblasts in adult rat brain. **Experimental neurology**, v. 196, p. 204-208, Nov, 2005.

HIROSE, K.; OKAJIMA, K.; TAOKA, Y.; UCHIBA, M.; TAGAMI, H.; NAKANO, K.; UTOH, J.; OKABE, H.; KITAMURA, N. Activated protein c reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. **Annals of surgery**, v. 232, p. 272-280, Aug, 2000.

HOEHN, B. D.; PALMER, T. D.; STEINBERG, G. K. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. **Stroke**, v. 36, p. 2718-2724, Dec, 2005.

HOLLMANN, M.; O'SHEA-GREENFIELD, A.; ROGERS, S. W.; HEINEMANN, S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. **Nature**, v. 342, p. 643-648, Dec, 1989.

HOSSMANN, K. A. Perinfarct depolarizations. **Cerebrovascular and brain metabolism reviews**, v. 8, p. 195-208, , 1996.

HURTADO, O.; PRADILLO, J. M.; ALONSO-ESCOLANO, D.; LORENZO, P.; SOBRINO, T.; CASTILLO, J.; LIZASOAIN, I.; MORO, M. A. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, v. 21 Suppl 2, p. 54-63, , 2006.

HICKEY, A.; O'HANLON, A.; MCGEE, H.; DONNELLAN, C.; SHELLEY, E.; HORGAN, F.; O'NEILL, D. Stroke awareness in the general population: knowledge of stroke risk factors and warning signs in older adults, **BMC Geriatrics**, v. 9, n. 35, p. 1-8, 2009.

IADECOLA, C.; ALEXANDER, M. Cerebral ischemia and inflammation. **Current opinion in neurology**, v. 14, p. 89-94, Feb, 2001.

IBGE **Síntese de indicadores sociais**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão: Rio de Janeiro, 2006.

JANDER, S.; SCHROETER, M.; D'URSO, D.; GILLEN, C.; WITTE, O. W.; STOLL, G. Focal ischaemia of the rat brain elicits an unusual inflammatory response: early appearance of cd8+ macrophages/microglia. **The European journal of neuroscience**, v. 10, p. 680-688, Feb, 1998.

JACQUIN; **Enum. Pl. Carib.** p. 65, 1760,.

KATO, H.; KOGURE, K.; LIU, X. H.; ARAKI, T.; ITOYAMA, Y. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. **Brain research**, v. 734, p. 203–212-203–212, , 1996.

KNOLLER, N.; AUERBACH, G.; FULGA, V.; ZELIG, G.; ATTIAS, J.; BAKIMER, R.; MARDER, J. B.; YOLES, E.; BELKIN, M.; SCHWARTZ, M.; HADANI, M. Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase i study results. **Journal of neurosurgery. Spine**, v. 3, p. 173-181, Sep, 2005.

LALANCETTE-HÉBERT, M.; GOWING, G.; SIMARD, A.; WENG, Y. C.; KRIZ, J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, p. 2596-2605, Mar, 2007.

LAMBERTSEN, K. L.; CLAUSEN, B. H.; BABCOCK, A. A.; GREGERSEN, R.; FENGER, C.; NIELSEN, H. H.; HAUGAARD, L. S.; WIRENFELDT, M.; NIELSEN, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; BLUETHMANN, H.; FÆRGEMAN, N. J.; MELDGAARD, M.; DEIERBORG, T.; FINSEN, B. Microglia Protect Neurons against Ischemia by Synthesis of Tumor Necrosis Factor. **The Journal of Neuroscience**, Washington, n. 5, v. 29, p. 1319 –1330, fev. 2009.

LAZAROV-SPIEGLER, O.; SOLOMON, A. S.; ZEEV-BRANN, A. B.; HIRSCHBERG, D. L.; LAVIE, V.; SCHWARTZ, M. Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. **The FASEB journal**, v. 10, p. 1296-1302, Sep, 1996.

LEES, K. R.; DAWSON, J. Advances in emerging therapies 2006. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 38, p. 219-221, Feb, 2007.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. a study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **The American journal of pathology**, v. 78, p. 71-100, Jan, 1975.

LEITE, A. M. C.; LLERAS, E. Áreas prioritárias na amazônia para a conservação dos recursos genéticos de espécies florestais nativas: fasepreliminar. **Acta Botânica Brasilica**, v. 7, p. 61-64, , 1993.

LEWÉN, A.; MATZ, P.; CHAN, P. H. Free radical pathways in cns injury. **Journal of**

neurotrauma, v. 17, p. 871-890, out. 2000.

LIAO, S. L., W. Y. CHEN et al. Association of immune responses and ischemic brain infarction in rat. **Neuroreport**. v. 12, n. 9, p. 1943-1947, 2001.

LINDSBERG, P. J.; CARPÉN, O.; PAETAU, A.; KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L.; KASTE, M. Endothelial icam-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. **Circulation**, v. 94, p. 939-945, sep. 1996.

LIPTON, B. P.; DELCARPIO, J. B.; MCDONOUGH, K. H. Effects of endotoxin on neutrophil-mediated ischemia/reperfusion injury in the rat heart in vivo. **Exp Biol Med**, Maywood, v. 226, n. 4, p. 320-327, 2001.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, p. 399-415, May, 2003.

LOTUFO, P. A. Stroke in brazil: a neglected disease. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 123, p. 3-4, Jan, 2005a.

LOTUFO, P. A. Why brazil does not have an epidemic of chronic diseases: some answers from cardiovascular diseases. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 123, p. 47-48, Mar, 2005b.

LOTUFO, P. A.; BENSENOR, I. M. Improving who steps stroke in brazil. **Lancet neurology**, v. 6, p. 387-8; author reply 388-9, May, 2007.

LOVE, S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 9, p. 119-131, Jan, 1999.

LUCAS, S.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in cns injury and disease. **British journal of pharmacology**, v. 147 Suppl 1, p. S232-240-S232-240, Jan, 2006.

MARQUARDT, L.; RUF, A.; MANSMANN, U.; WINTER, R.; BUGGLE, F.; KALLENBERG, K.; GRAU, A. J. Inflammatory response after acute ischemic stroke. **Journal of the neurological sciences**, v. 236, p. 65-71, Sep, 2005.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Local neuroinflammation and the progression of alzheimer's disease. **Journal of NeuroVirology**, v. 8, p. 529-538-529-538, , 2002.

MEAIRS, S.; WAHLGREN, N.; DIRNAGL, U.; LINDVALL, O.; ROTHWELL, P.; BARON, J.; HOSSMANN, K.; ENGELHARDT, B.; FERRO, J.; MCCULLOCH, J.; KASTE, M.; ENDRES, M.; KOISTINAHO, J.; PLANAS, A.; VIVIEN, D.; DIJKHUIZEN, R.; CZLONKOWSKA, A.; HAGEN, A.; EVANS, A.; DE LIBERO, G.; NAGY, Z.; RASTENYTE, D.; REESS, J.; DAVALOS, A.; LENZI, G. L.; AMARENCO, P.; HENNERICI, M. Stroke research priorities for the next decade--a representative view of the european scientific community. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, v. 22, p. 75-82, , 2006.

MEANS, E. D.; ANDERSON, D. K. . Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 42, n. 6, p. 707-19. 1983

MELDRUM, B. S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology**, v. 44, p. S14-23-S14-23, Nov, 1994.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metabolic brain disease**, v. 19, p. 151-167, Dec, 2004.

MONJE, M. L.; TODA, H.; PALMER, T. D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, v. 302, p. 1760-1765, Dec, 2003.

MORIOKA, T.; KALEHUA, A. N.; STREIT, W. J. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. **The Journal of comparative neurology**, v. 327, p. 123-132, Jan, 1993.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T. **Botânica econômica brasileira**. Epu/Edusp: São Paulo, 1976.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. Neun, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development (Cambridge, England)**, v. 116, p. 201-211, Sep, 1992.

NEUMANN, J.; GUNZER, M.; GUTZEIT, H. O.; ULLRICH, O.; REYMANN, K. G.; DINKEL, K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, p. 714-716, Apr, 2006.

NEUMANN, J.; SAUERZWEIG, S. RONICKE, R.; GUNZER, F.; DINKEL, K.; ULLRICH, O.; GUNZER, M.; REYMANN, K. G. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. **J Neurosci** v. 28, n. 23, p. 5965-5975, 2008.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, p. 719-721, May, 1969.

ONU **World population prospects - the 2006 revision**. Department of Economic and Social Affairs, Population Division: Nova Iorque, 2007.

PAIVA, L. A. F.; DE ALENCAR CUNHA, K. M.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 737-739, Nov, 2002.

PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; DE SOUSA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of *copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 93, p. 51-56, 2004.

PAIVA, L. A.; RAO, V. S.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 62, p. 73-78, 1998.

PEDREIRA, Erick Nelo. **Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo resina de Copaíba in natura (*Copaifera reticulata*) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal experimental Dmba induzida**. 2007. 85 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

PERRY, V. H.; BOLTON, S. J.; ANTHONY, D. C.; BETMOUNI, S. The contribution of inflammation to acute and chronic neurodegeneration. **Research in immunology**, v. 149, p. 721-725, Oct, 1998.

PERRY, V. H.; GORDON, S. Macrophages and the nervous system. **International review of cytology**, v. 125, p. 203-244, 1991.

PERRY, V. H.; HUME, D. A.; GORDON, S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. **Neuroscience**, v. 15, p. 313-326, Jun, 1985.

PERRY, V.; BROWN, M.; GORDON, S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury. a possible role for macrophages in regeneration. **J. Exp. Med**, v. 165, p. 1218-1223, Apr, 1987.

PIO CORRÊA, M. **Diccionario das plantas uteis do brasil e das exoticas**

cultivadas. Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, 1931.

POPOVICH, P. G.; HICKEY, W. F. Bone marrow chimeric rats reveal the unique distribution of resident and recruited macrophages in the contused rat spinal cord. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 60, p. 676-685, Jul, 2001.

POPOVICH, P. G.; GUAN, Z.; MCGAUGHY, V.; FISHER, L.; HICKEY, W. F.; BASSO, D. M. The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 61, p. 623-633, Jul, 2002.

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

POPOVICH, P. G.; HICKEY, W. F. Bone marrow chimeric rats reveal the unique distribution of resident and recruited macrophages in the contused rat spinal cord. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 60, p. 676-685, Jul, 2001.

PRADILLO, J. M.; ROMERA, C; HURTADO, O; CÁRDENAS, A; MORO MA, L. J. C.; DÁVALOS, A; CASTILLO, J; LORENZO, P; LIZASOAIN, I. TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, Berlin, v. 25, p. 193–203, 2005.

PRASS, K.; BRAUN, J. S.; DIRNAGL, U.; MEISEL, C.; MEISEL, A. Stroke propagates bacterial aspiration to pneumonia in a model of cerebral ischemia. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 37, p. 2607-2612, out. 2006.

PRICE, C. J. S.; WANG, D.; MENON, D. K.; GUADAGNO, J. V.; CLEIJ, M.; FRYER, T.; AIGBIRHIO, F.; BARON, J.; WARBURTON, E. A. Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 37, p. 1749-1753, Jul, 2006.

PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B.; PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Annals of neurology**, v. 11, p. 491-498, May, 1982.

RAJESH, M.; MUKHOPADHYAY, P.; BÁTKAI, S.; HASKÓ, G.; LIAUDET, L.; HUFFMAN, J. W.; CSISZAR, A.; UNGVARI, Z; MACKIE, K.; CHATTERJEE, S.;

PACHER, P. CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 293, n. 4, p. 2210-2218, out. 2007.

RAPALINO, O.; LAZAROV-SPIEGLER, O.; AGRANOV, E.; VELAN, G.; YOLES, E.; FRAIDAKIS, M.; SOLOMAN, A.; GEPSTEIN, R.; KATZ, A.; BELKIN, M.; HADANI, M.; SCHWARTZ, M. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. **Nature medicine**, v. 4, p. 814-821, Jul, 1998.

REID, D. M.; PERRY, V. H.; ANDERSSON, P. B.; GORDON, S. Mitosis and apoptosis of microglia in vivo induced by an anti-cr3 antibody which crosses the blood-brain barrier. **Neuroscience**, v. 56, p. 529-533, Oct, 1993.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; A. C. PINTO; NAKAMURA, C. V.. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*, Journal of Ethnopharmacology, **Journal of Ethnopharmacology**, Londres, n. 2008, v. 120, p. 204–208, 2008.

SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M. E.; PERRY, V. H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 3648–3658-3648–3658, , 1999.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; HUITINGA, I.; WITTE, O. W.; STOLL, G. Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. the role of resident microglia. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 28, p. 382-386, Feb, 1997.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; STOLL, G. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. **Journal of neuroscience methods**, v. 117, p. 43-49, May, 2002.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; WITTE, O. W.; STOLL, G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. **Journal of neuroimmunology**, v. 55, p. 195-203, Dec, 1994.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; WITTE, O. W.; STOLL, G. Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 89, p. 1367-1377, , 1999.

SCHROETER; M SCHROETER; JANDER; S JANDER; HUITINGA; I HUITINGA; STOLL; G STOLL Cd8+ phagocytes in focal ischemia of the rat brain: predominant origin from hematogenous macrophages and targeting to areas of pannecrosis. **Acta Neuropathologica**, v. 101, p. 440-448, May, 2001.

SCHULZ, J. B.; WELLER, M.; MOSKOWITZ, M. A. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. **Annals of neurology**, v. 45, p. 421-429, Apr, 1999.

SCHWARTZ, M.; BUTOVSKY, O.; BRÜCK, W.; HANISCH, U. Microglial phenotype: is the commitment reversible?. **Trends in neurosciences**, v. 29, p. 68-74, Feb, 2006.

SCHWARTZ, M.; SHAKED, I.; FISHER, J.; MIZRAHI, T.; SCHORI, H. Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity. **Trends in neurosciences**, v. 26, p. 297-302, Jun, 2003.

SCHWARTZ, M.; YOLES, E. Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond. **Journal of neurotrauma**, v. 23, p. 360-370, Apr, 2006.

SEAL, R. P.; AMARA, S. G. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 39, p. 431-456, , 1999.

SIGMA-ALDRICH. Specification Sheet. Saint Louis. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/acaro/sp/>>. Acesso em: 23. Janeiro 2010.

SOUZA-RODRIGUES, R. D.; COSTA, A. M. R.; LIMA, R. R.; DOS SANTOS, C. D.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; GOMES-LEAL, W. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. **Brain research**, v. 1200, p. 78-88, Mar, 2008.

STOLL G; JANDER S; SCHROETER M Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. **Progress in Neurobiology**, v. 56, p. 149-171, Oct, 1998.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in neurobiology**, v. 57, p. 563-581, Apr, 1999.

SUGAWARA, R.; HIKICHI, T.; KITAYA, N.; MORI, F.; NAGAOKA, T.; YOSHIDA, A.; SZABO, C. Peroxynitrite decomposition catalyst, fp15, and poly(adp-ribose) polymerase inhibitor, pj34, inhibit leukocyte entrapment in the retinal microcirculation of diabetic rats. **Current eye research**, v. 29, p. 11-16, Jul, 2004a.

SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G. W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C. M.; CHAN, P. H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 1, p. 17-25, Jan, 2004b.

SYNTICHAKI, P.; TAVERNARAKIS, N. Death by necrosis. uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?. **EMBO reports**, v. 3, p. 604-609, Jul, 2002.

SYNTICHAKI, P.; TAVERNARAKIS, N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, p. 672-684, Aug, 2003.

TAOKA, Y.; OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; JOHNO, M.; NARUO, M. Role of neutrophil elastase in compression-induced spinal cord injury in rats. **Brain research**, v. 799, p. 264-269, Jul, 1998.

TAOKA, Y.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M.; MURAKAMI, K.; KUSHIMOTO, S.; JOHNO, M.; NARUO, M.; OKABE, H.; TAKATSUKI, K. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. **Neuroscience**, v. 79, p. 1177-1182, Aug, 1997.

TAOUFIK, E; PETIT, E; DIVOUX, D; TSEVELEKI, V; MENGOZZI, M; ROBERTS, M. L.; VALABLE, S.; GHEZZI, P.; QUACKENBUSH, J.; BRINES, M.; CERAMI, A.; PROBERT, L. TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. **PNAS**, Washington, n. 6, v. 105, p. 185-190, 2008

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

TAYLOR, T. N.; DAVIS, P. H.; TORNER, J. C.; HOLMES, J.; MEYER, J. W.; JACOBSON, M. F. Lifetime cost of stroke in the united states. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 27, p. 1459-1466, Sep, 1996.

TIKKA, T., FIEBICH, B. L.; GOLDSTEINS, G.; KEINANEN, R.; KOISTINAHO, J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 8, p. 2580-2588, 2001.

TONAI, T.; SHIBA, K.; TAKETANI, Y.; OHMOTO, Y.; MURATA, K.; MURAGUCHI, M.; OHSAKI, H.; TAKEDA, E. NISHISHO, T. A neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) reduces neurologic damage after spinal cord injury in rats. **J Neurochem**, v.

78, n. 5, p. 1064-1072, 2001

TOWN, T.; NIKOLIC, V.; TAN, J. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. **Journal of neuroinflammation**, v. 2, p. 24-24, Oct, 2005.

TRAPP, B. D.; BO, L.; MORK, S.; CHANG, A. Pathogenesis of tissue injury in ms lesion. **Journal of neuroimmunology**, v. 98, p. 49–56-49–56, , 1999.

TRAPP, B. D.; PETERSON, J.; RANSOHOFF, R. M.; RUDICK, R.; MORK, S.; BO, L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. **The New England journal of medicine**, v. 338, p. 278-285, Jan, 1998.

TRAVLOS, A.; ANTON, H. A.; WING, P. C. Cerebrospinal fluid cell count following spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 75, n.3, p. 293-6, 1994

TROOST, D.; VAN DEN OORD, J. J.; VIANNEY DE JONG, J. M. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 16, p. 401-410, Oct, 1990.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* I.the *Copaifera* I. genus. **Quím Nova**, v. 25, p. 273-286, , 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne— A comparative study, **Journal of Ethnopharmacology**, Londres, n. 2007, v. 112, p. 248–254, 2007.

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **Journal of neuroimmunology**, v. 184, p. 53-68, Mar, 2007.

XIA, C. F.; YIN, H.; YAO, Y. Y.; BORLONGAN, C. V.; CHAO, L.; CHAO, J. Kallikrein protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and inflammation and promoting angiogenesis and neurogenesis. , v. , , Feb, 2006.

XIANG, Z.; YUAN, M.; HASSEN, G. W.; GAMPEL, M.; BERGOLD, P. J. Lactate induced excitotoxicity in hippocampal slice cultures. **Experimental neurology**, v. 186, p. 70-77, Mar, 2004.

YAMAURA, I.; YONE, K.; NAKAHARA, S.; NAGAMINE, T.; BABA, H.; UCHIDA, K.;

KOMIYA, S. Mechanism of destructive pathologic changes in the spinal cord under chronic mechanical compression. **Spine (Philadelphia, Pa. : 1986)**, v. 27, p. 21-26, Jan, 2002.

YRJÄNHEIKKI, J.; TIKKA, T.; KEINÄNEN, R.; GOLDSTEINS, G.; CHAN, P. H.; KOISTINAHO, J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 13496-13500, nov. 1999.

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](#)