



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E DA ATIVIDADE
NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Pluchea sagittalis (LAM.) CABRERA, ASTERACEAE, NA
LESÃO MEDULAR EM RATOS**

CLEVERLAN NASCIMENTO SANTOS

Aracaju-SE

Março - 2014

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE.

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E DA ATIVIDADE
NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Pluchea sagittalis (LAM.) CABRERA, ASTERACEAE, NA
LESÃO MEDULAR EM RATOS**

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em
Saúde e ambiente da Universidade
Tiradentes – UNIT, Aracaju -
Sergipe.

Linha de concentração: Produtos
Naturais e Saúde.

CLEVERLAN NASCIMENTO SANTOS

Orientadores: Prof.^a Dr^a. Edna Aragão Farias Cândido.

Prof.^a Dr^a Margarete Zanardo Gomes.

Aracaju – SE

Março – 2014

CLEVERLAN NASCIMENTO SANTOS

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E DA ATIVIDADE
NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Pluchea sagittalis (LAM.) CABRERA, ASTERACEAE, NA
LESÃO MEDULAR EM RATOS**

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em
Saúde e ambiente da Universidade
Tiradentes – UNIT, Aracaju -
Sergipe.

Linha de concentração: Produtos
Naturais e Saúde.

Apresentação em: 18/ 03/ 2014.

Prof.^a Dr^a Edna Aragão Farias Cândido
(UNIT/ITP)
Orientadora

Prof.^a Dr^a Margarete Zanardo Gomes
(UNIT/ITP)
Orientadora

Prof.^o Dr^o Diogo Costa Garção
(UNIT/Aracaju)

Prof^a Dr^a Andressa Sales Coelho
(UNIT/ITP/Aracaju)

“O cansaço físico, mesmo que suportado forçosamente, não prejudica o corpo, enquanto o conhecimento imposto à força não pode permanecer na alma por muito tempo”

Platão.

Agradecimentos

A Deus por me mostrar ser forte e me guiar colocando pessoas maravilhosas e abençoadas em minha vida, abrindo meus caminhos e me dando momentos de glória e paz. Amém.

Aos meus pais, em especialmente minha Mãe Alvandir Nascimento pelos ensinamentos, carinho, dedicação, sempre me incentivando em minha jornada, aos meus Irmãos: Grace Kelly Nascimento, Cleverton Nascimento, Kelmony Nascimento e Cristophe-lee Nascimento, minhas cunhadas e meus sobrinhos, sem vocês não sou nada e sempre agradeço a Deus por vocês e pela família abençoada que colocou em minha vida, amo vocês.

As minhas orientadoras, Edna Aragão Farias Cândido e Margarete Zanardo Gomes, por terem paciência comigo e por me ajudar na construção do meu conhecimento científico, em especial a Edna por aceitar ser minha orientadora no momento mais difícil de minha pesquisa e clarear a minha vida, me dando um norte, sou eternamente grato.

Ao melhor amigo Mario Almeida pelos incentivos e ajuda nos momentos que mais precisei, aos outros amigos que é uma extensão de minha família, Hellen Rangel, tia Janie e tio Wilson vocês são especiais em minha vida, aos outros agregados em minha vida mas sei que são amigos para todas as horas, Karla Katuscia, Moab Henrique e Fabiana Vance.

À Sheyla Rodrigues, pela amizade, ajuda, incentivo e conselho, te admiro muito, você é um exemplo a ser seguido, por toda determinação, conhecimento e acima tudo pelo caráter.

Aos meus amigos do Costa Marina em especial a Patrick Novaes, Marina Albareda, Pedro Barcelos, Dona Rosimeire, Luciana Aguiar, Ana Lúcia, Daniel Saldanha, Cesar e sua esposa Cris, Marcio Cruz e Christiana Almeida, Rafael Piccoli e Lilibeth, vocês representam algo maravilhoso que aconteceu em minha vida, amo vocês.

Aos meus eternos amigos Wilker Sátiro, Alex Feitosa, Rafael Quirino, Juan David, Lucas Brunetto, Araken de Catro, Ygara Ferreira, Erica Januário, Denise Netto e Elis Cris,

apesar da distância sendo ela geográfica ou por alguma razão das atividades diárias, saibam que vocês serão amigos eternamente lembrados.

À Anderson Felix, por ceder um dos seus equipamento de estudo e trabalho para eu poder utiliza-lo em minha pesquisa, foi de grande importância no meu projeto.

Aos estagiários, Reinaldo Viana, Tassia Nunes e Tamara Nunes, vocês foram de importância grandíssima no desenrolar do projeto, em especial a Reinaldo Viana voce foi o braço direito desse projeto, agradeço todo tempo cedido por vocês no desenvolvimento dessa pesquisa.

A Cristiane e Gabriela por todo tempo cedido e por abrirem as portas da Universidade Federal Sergipe, permitindo que eu fizesse experimentos em seu laboratório.

Ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa e a Universidade Tiradentes pelo espaço concedido, onde tive a oportunidade de crescimento científico, onde pude conhecer pessoas maravilhosas, a exemplo de Nely que sempre nos ajuda e nos auxilia nas nossas pesquisas e também como amiga.

Aos meus mestres que me ajudaram e me mostraram a importância da pesquisa no mestrado, vocês serão sempre lembrados.

Ao Professor Jose Roque, que sempre foi um mestre e amigo me incentivando e auxiliando não só na minha vida acadêmica, mas como também na minha educação continuada.

E por fim, aos meus colegas de mestrado, Ana Carolina, Andre Moraes, Antonia Patricia, Fabiana Brito, Igor Soares, Jorge Rolemberg, Lorena Xavier, Lucas Rego, Madson Rodrigo, Patricia Almeida, Renata Priscila, Roberta Barbosa, Rodrigo Cavendish, Talita Bastos, Tatiana Torres, Ruth C. Torres e Roseane Lima, finalmente chegamos ao fim de uma jornada de dois anos, pensávamos que não passaria tão rápido, agradeço a todos pela amizade e companheirismo nos momentos que mais precisamos.

Muito Obrigado a Todos!

Cleverlan Nascimento Santos

“Querem que vos ensine o modo de

...chegar à ciência verdadeira?

...aquilo que se sabe, saber que se sabe;

...aquilo que não se sabe, saber que não se sabe;

...na verdade é este o saber”.

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação neuroprotetora do extrato etanólico da *Pluchea sagittalis* após hemissecção medular em ratos. O estudo é experimental com abordagem analítica quantitativa. Foram utilizadas 48 ratos adultos pesando entre 200-300g. As ratos foram lesionados por hemissecção direita na medula com auxílio de um bisturi e submetidos a gavagem com o extrato nas doses 10, 50 e 100mg/kg sendo que sua concentração foi 30% e do controle Dimetilsufóxido (DMSO) a 5%. Foram agrupadas em igual quantidade nos seguintes grupos: laminectomia e lesão ambos com quatro grupos (n6). Cada grupo foi avaliado com teste comportamental de Basson Beattie Bresnahan (BBB) nos tempos de 0 e 24 horas e 7, 14, 21 dias e em seguida submetidas a avaliação histológica e sua qualificação. Nos testes funcionais, o grupo lesão na dose de 50mg/kg mostrou melhor resultado na recuperação da atividade motora para $p < 0,05$ em relação aos grupos nas doses de 10 e 100mg/kg, como também, observou-se maior atividade de neuproteção na densidade celular dos neurônios e dos astrócitos em relação aos outros grupos que houve tratamento. O extrato na dose de 50mg/kg no grupo da lesão demonstrou melhor eficácia na recuperação funcional e na neuroproteção.

Palavras-chave: *Pluchea sagittalis*, Hemissecção, Lesão medular.

ABSTRACT

The present study aims to assess the neuroprotective action of ethanolic extract of *Pluchea sagittalis* in spinal hemisection in experimental model. The study is experimental with quantitative analytical approach. 48 adult rats were used for weighing between 200-300 g. The mice were injured by hemisection right in the marrow with a scalpel and subjected to gavage with the extract in doses 10, 50 and 100mg/kg being that its concentration was 30 and control Dimethylsulfoxide (DMSO) 5. Were grouped in equal quantity in the following groups: laminectomy and injury both with four groups (n6). Each group was evaluated with behavioral test of Basson Beattie Bresnahan (BBB) in the times of 0 and 12:0 am and 7, 14, 21 days and then subjected to histological evaluation and qualification. Functional tests, the dose of 50mg/kg injury group showed better result in recovery of motor activity to $p < 0,05$, neuproteção activity was observed in cell density of neurons and astrocytes. The extract at a dose of 50ml/kg in Group of the lesion showed a better effectiveness in behavioral and histological part.

Keywords: *Pluchea sagittalis*, hemisection, spinal cord injury.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURA 1: <i>Pluchea sagittalis</i> (Lam.) Cabrera.	20
QUADRO 1: Grupos experimentais.	22
FIGURA 2: Contenção e gavagem.	24
FIGURA 3: Análise funcional BBB após lesão medular (Pata direita).	25
FIGURA 4: Fixação da medula em formol.	26
FIGURA 5: Medula lesionada para processamento histológico.	26
FIGURA 6: Medula sadia para processamento histológico (controle).	26
FIGURA 7: Desempenho de recuperação funcional da pata inferior direita, avaliação através do teste BBB.	36
FIGURA 8: Comportamento das doses de tratamento.	37
FIGURA 9: Densidade astrocitária em área de $0,5\mu\text{m}^2$.	38
FIGURA 10: Densidade de motoneurônios por área de $0,5\mu\text{m}^2$.	38
FIGURA 11: Área de Lesão.	39
FIGURA 12: Visão geral do corte histológico direito da Medula.	39
FIGURA 13: Contagem diferenciada das células do tecido medular.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AACD: Associação de Assistência à Criança Deficiente.

BBB: Teste de Basso Beattie Bresnahan.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EXT: Extrato.

HE: Hematoxilina-eosina.

i.p.: Intraperitoneal.

LE: Lesão Espinhal.

LES: Lesão Espinhal.

LME: Lesão Medular Espinhal.

LTME: Lesão Traumática da Medular Espinhal.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

ONOO⁻: Ânion Peróxido Nitrito.

s.c.: Subcutânea.

SCI: Lesão Medular Espinhal.

SNC: Sistema Nervoso Central.

LISTA DE UNIDADES

°C: Graus Celsius.

mg: Miligrama.

Kg: Quilograma.

mm: Milímetros.

µm: Micrometros.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Lesão Medular	15
2.2 <i>Pluchea sagittalis</i>	18
2.OBJETIVOS:	21
2.1. Geral:	21
2.2. Específicos:	21
3. METODOLOGIA	21
3.1.Obtenção dos extratos	21
3.1.1. Material botânico	21
3.2. Determinação da amostra	22
3.4. LESÃO MEDULAR	24
3.5. Escala Basson Beattie Bresnahan (BBB)	25
3.6. Eutanásia e obtenção dos tecidos	26
3.7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	27
3.7.1. Coloração hematoxilina-eosina	27
3.7.2. Análise de imagens	27
3.7.3. Análise da densidade de células marcadas para HE	28
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4. RESULTADOS	29
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	36
9. ANEXOS	45
Anexo 1 – Registro da <i>P. sagittalis</i> no herbário da Universidade Federal de Sergipe em 1982.....	52
Anexo 2 – Registro da <i>P. sagittalis</i> no herbário da Universidade Federal de Sergipe em 1988.....	53
Anexo 3 – Cronograma de Atividades.....	54
Anexo 4 – Escala de pontuação do BBB.....	55
Anexo 5 – Parecer Consubstanciado do projeto de pesquisa do comitê de ética.....	57
Anexo 6 – Confirmação de submissão do artigo.....	59

1. INTRODUÇÃO

A lesão medular (LM) está relacionada com uma série de consequências físicas, sociais e psicológicas. Tal patologia tem sido cada vez mais frequente devido principalmente ao aumento da violência urbana. Dentre as causas, o acidente de trânsito e a agressão por arma de fogo são as mais comuns (CARNEIRO, 2012).

Os traumas em grande maioria é o principal causador das lesões medulares. De acordo com a Associação de Assistência à Criança Deficiente (AACD) (2007), os acidentes automobilísticos são responsáveis por 42% dos traumas medulares. Adultos jovens entre 16 e 30 anos são os mais acometidos por trauma medular (61%), sendo que 70% deles tornam-se paraplégicos por lesão medular torácica, lombar ou sacral, resultando em paralisia parcial ou completa de parte ou de ambos os membros inferiores e tronco, enquanto que 30% deles tornam-se tetraplégicos por lesão medular cervical, resultando em paralisia parcial ou completa do tronco e dos quatro membros (MEYER et al, 2003; SCHMITZ et al., 2004).

O trauma medular requer vários tipos de tratamentos paliativos como: fisioterapia, adaptação psicológica e fármacos para uma melhora significativa para melhor condição de vida do paciente. A lesão medular é uma síndrome neurológica altamente incapacitante que acomete uma média de 250.000 pacientes no Brasil, com uma ocorrência de cerca de 8.950 novos casos por ano (MEYER et al., 2003). A lesão traumática da medula espinhal (LTME) não compromete exclusivamente a vida do indivíduo após o incidente, como também todo núcleo familiar (NOGUEIRA, 2013).

As sequelas não apenas limitam em decorrência de mudanças expressivas do domínio físico e da independência funcional, como também exigem um longo processo de reabilitação, que ocasiona uma quebra rápida e dolorosa do modo de vida individual ao mesmo tempo que os pacientes necessitam desenvolver novas habilidades, também precisam integrar a realidade de vida às mudanças funcionais resultantes da lesão medular (KENNEDY et al, 2012).

Na história, as abordagens terapêuticas direcionadas às sequelas de uma lesão medular vêm apresentando transformações significativas. Até 1944, um traumatismo raquimedular era considerado intratável (DONOVAN, 2007). Foi apenas no século XX que esforços passaram a ser direcionados ao tratamento de pessoas com lesões medulares. Atualmente, diversas complicações adjacentes ao trauma medular são tratáveis, tais como

doença neoplásica, vascular, degenerativa, inflamatória ou traumática, minimizando a deterioração da saúde (ROTSHENKER, 2011).

Dentre os tratamentos indicados para o lesionado medular estão as terapias: Comportamental como a educação do paciente sobre o funcionamento dos rins bexiga e esfíncteres função do trato urinário inferior; Informações sobre mudanças no estilo de vida e na dieta; Sondagem vesical permanente e outros, terapia medicamentosa Dentre as drogas disponíveis temos: Oxibutinina, Tolterodina, Cloreto de Trospium, Darifenacin, Cloridrato de Imipramina, Duloxetine, Resineferatonina e Toxina Botulínica tipo A e a terapia cirúrgica que existem vários tratamentos cirúrgicos individualizados como Hiperdistensão vesical; Neuromodulação sacral (marca passo para a bexiga); Acupuntura do nervo tibial; Ampliação vesical; Injeção peri-uretral; Esfíncter artificial; Cistostomia e vesicostomia; Esfincterotomia; e Injeção de Botox na bexiga. O grande desafio da neurologia em todos os tempos tem sido vencer a falta de regeneração espontânea do SNC adulto após a perda de neurônios e/ou a interrupção de seus prolongamentos, os axônios (COMPSON, 1994).

As plantas medicinais são, apresentadas como um grande potencial para a origem de novos fármacos (CRAGG et al., 1997), pois são consideradas a maior fonte de novas substâncias bioativas, que variam suas atividades que vem desde antimicrobianos, anti-inflamatórios até substâncias antitumorais, muitas vezes utilizadas nas sociedades como complementares à medicina tradicional (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006). Entre as vantagens da utilização de espécies vegetais como fonte de desenvolvimento de novos fármacos, destaca-se a possibilidade de estudar mecanismos de ação ou receptores, ainda que estes não sejam conhecidos (FAUSTINO et al., 2010).

Sendo o Brasil uma das maiores biodiversidades do planeta sua flora é considerada uma das mais importantes, embora sua preservação esteja limitada dentro das ações realizadas. Em 1987, Hedberg expunha, metaforicamente, que a cada curandeiro tradicional que morre, uma grande biblioteca entra em chamas (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006).

Os pesquisadores de diversas áreas do conhecimento vêm com o objetivo de sanar a carência de informações científicas sobre plantas medicinais utilizadas popularmente como tratamento da lesão medular. Como a botânica, a química e a farmacologia, trabalharam em equipes multidisciplinares, com o apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS), na intenção de melhorar as condições de qualidade, eficácia e segurança desses medicamentos à base dessas plantas (SOARES et al., 2006).

Para surgimento de novas propostas de informações decisivas, para a descrição científica das propriedades terapêuticas de plantas medicinais, que podem resultar na

origem de novos fármacos, a importância do seu uso na população como também a sua necessidade em busca de qualidade de vida e de saúde em seu conceito. Essa necessidade faz movimentar as indústrias farmacêuticas e o mercado mundial, tendo em vista ainda a valorização de medicamentos a base de plantas, que em 2002 movimentou cerca de 20 a 40 bilhões de dólares, apenas com a comercialização de fitoterápicos pelo mercado farmacêutico mundial (PERECIN et al., 2002).

Pluchea sagittalis (Lam.) Cabrera é indicada no tratamento de dores, distúrbios gástricos, dispepsias nervosas e histerismo. O conhecimento científico sobre as ações farmacológicas desta planta relacionam-se principalmente à atividade anti-inflamatória, analgésica, antioxidante e antitumoral (LORENZI; MATOS, 2002).

Rodrigues (2011) relata que a *P. sagittalis* possui ação no Sistema Nervoso Central, sendo assim, ultrapassando a barreira hematoencefálica. Na triagem da atividade farmacológica de algumas plantas medicinais de origem brasileira, demonstrou-se que o extrato aquoso de *P. sagittalis* (Lam.) Cabrera possuía efeitos anti-inflamatórios, cicatrizantes e diarréicos, havendo descrição popular desta planta no tratamento destes males (SOUZA et al., 2006, FIGUEREDO et al., 2011)

O extrato etanólico da planta apresentou ação sobre a hematopoiese, durante infecção bacteriana induzida (QUEIROZ et al., 2000), atividade anti-inflamatória e antinociceptiva na dor induzida (BARROS et al., 2006), além da gastroproteção em animais tratados com o extrato e submetidos a lesão por etanol (FIGUEREDO et al., 2011).

Partindo do pressuposto que o extrato etanólico da *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera possa apresentar ação neuroprotetora, o presente trabalho, de caráter inédito, objetivou avaliar a ação neuroprotetora do extrato das folhas de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera na lesão medular por hemissecção em modelos experimentais, podendo assim, contribuir para o desenvolvimento econômico regional, inserindo-se no arranjo produtivo local da área de farmacobotânica, e do ponto de vista tecnológico e científico, no tocante ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas para lesões medulares, além de melhor compreensão da fisiopatologia da lesão medular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lesão Medular

Um problema clínico que impõe a saúde pública enormes responsabilidades e custos ao estado é a lesão da medula espinal (LME) ou lesão medular (LM), pois atinge principalmente uma população jovem, no auge de sua produtividade (*National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2006*).

A LME é causada com o deslocamento ou fratura vertebral que pode causar compressão ou secção medular (TATOR; FEHLINGS, 1991; DELAMARTER et al., 1995; ROSENBERG et al., 1997). Como consequência imediata à lesão mecânica segue-se uma cascata de eventos não restritos ao sítio da lesão (epicentro) que evoluem ao longo de horas e dias, expandindo a lesão vertical e horizontalmente (TATOR; FEHLINGS, 1991; SCHWAB et al., 2006; YANG; KIM; LEE, 2007).

A LME resulta no acentuado rompimento e reorganização de vias neurais ascendentes e descendentes, criando modificações substanciais nos aferentes primários, interneurônios e motoneurônios, influenciando dramaticamente a interação sensório-motora (FRIGON; ROSSIGNOL, 2006). Com a ruptura ou contusão dos axônios ocorre o desenvolvimento de hemorragia, isquemia e edema. A severidade e extensão da lesão secundária dependem da magnitude do insulto inicial e de um vasto número de fatores que tem influência sobre o fluxo sanguíneo, reação celular e do microambiente medular (TATOR; FEHLINGS, 1991; SHARMA et al., 1996; AMAR; LEVY, 1999).

No centro da lesão formam-se cavitações inicialmente preenchidas por fluido e posteriormente circundadas por tecido cicatricial (SCHWAB et al., 2006). Este consiste na cicatriz glial formada por astrócitos reativos, micróglia e fibroblastos. Ainda há a cicatriz fibrosa, formada por componentes extracelulares, como depósitos de matriz extracelular (FAWCETT; ASHER, 1999). No sistema nervoso central (SNC), este tecido cicatricial é capaz de produzir moléculas que inibem o crescimento axonal e de servir como obstáculo físico ao crescimento dos axônios (BATCHELOR, 2008).

Diante dos problemas iniciais para o indivíduo a lesão medular é caracterizada pelo rompimento dos tratos axonais desconectando o SNC com as estruturas alvo, que progride

com a degeneração, a lesão progressiva da microvasculatura e a cascata de eventos bioquímicos que leva à morte celular (MALLEI et al., 2005).

Os respectivos processos contribuem para instalação de deficiências permanentes. O estudo da lesão medular se focaliza na elucidação dos processos fisiopatológicos, no desenvolvimento de terapêutica para interrupção do processo secundário de lesão e reversão dos fatores que impedem o crescimento axonal no SNC (FAWCETT; ASHER, 1999).

Como se trata de uma enfermidade complexa e de graus diferentes de acordo com a lesão, terapias disponíveis para a cura e/ou recuperação dos pacientes vitimados a lesão medular ainda está em processo de pesquisa no desenvolvimento de novas terapias entre os cientistas. Conseqüentemente faz necessário seguir com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para aumentar as possibilidades de regeneração dos axônios medulares lesionados, melhorando a função sensorial e motora e a qualidade de vida dos pacientes com lesão medular (SHARMA, 2005).

São utilizados vários tratamentos para minimizar a gravidade da lesão medular, tratamentos incluindo clips para aneurisma, cateteres com balões, contusão por queda de peso, placas compressivas, transecção, dentre outros (DIMAR et al., 1999; CARLSON et al., 2003). Tais métodos são ou já foram testados em diferentes desenhos experimentais como ratos, cães, coelhos, gatos, camundongos e macacos (DIMAR et al., 1999; CARLSON et al., 2003; SOUZA et al., 2006). Sendo que estes estudos são de fundamental importância, para fornecerem informações essenciais para o entendimento da fisiopatologia da lesão medular e permitirem o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Após o trauma inicial a medula espinal está sujeita a uma série de eventos neurotóxicos, como influxo de íons, alterações no fluxo sanguíneo local, e processos inflamatórios que contribuem para a evolução da lesão neurológica (MALLEI et al., 2005). O evento mais imediato da cascata de lesão secundária é a indução mecânica da despolarização e a conseqüente abertura de canais iônicos voltagem-dependentes (canais de cálcio, sódio e potássio). Que ocasiona liberação de neurotransmissores no espaço extracelular, desencadeando a cascata de reações denominada lesão excitotóxica (NOVIKOVA; NOVIKOV; KELLERTH, 2002).

A liberação destes neurotransmissores excitatórios (em especial o glutamato) causa a abertura de canais iônicos operados por receptores dependentes de ligantes, como os

receptores N-metil-D-aspartato (NMDA - SCHWAB et al., 2006). A resultante mais importante dos eventos é o acúmulo de cálcio intracelular, que inicia uma série de efeitos deletérios. Dentre os efeitos estão a ativação das sintases do óxido nítrico e a disfunção mitocondrial, que leva à falha do metabolismo energético aeróbico e acúmulo de lactato (SPRINGER, 2004).

Uma das consequências dos dois eventos é a formação de espécies oxigênio reativas como o ânion peróxido nítrico (ONOO⁻). As espécies oxigênio-reativas agem como moléculas sinalizadoras que iniciam a progressão da inflamação pós-traumática e a apoptose (morte celular programada). (SPRINGER, 2004; SCHWAB et al., 2006).

O peróxido nítrico embora possa ativar diferentes mecanismos de dano celular, a peroxidação de lipídios da membrana celular parece ser o mais importante deles. Em fato a peroxidação de lipídios ocorre em neurônios e vasos sanguíneos, causando prejuízos diretos sobre a integridade e função da membrana axonal, danificando a microvasculatura o que causa isquemia e, indiretamente, contribui para a acentuação da lesão secundária (AMAR; LEVY, 1999; SPRINGER, 2004).

Relacionada com essa cascata de forma concomitante, tais eventos iniciados através da abertura dos canais iônicos, causa dano ao endotélio vascular da medula espinal e consequente redução ou interrupção do fluxo sanguíneo local. O dano vascular é o principal responsável pela necrose hemorrágica que ocorre após a lesão medular. Inicialmente ocorre espasmo de artérias e veias, seguida de agregação plaquetária e de fibrina, levando à formação de um trombo. Podendo causar oclusão vascular, estase venosa, distensão, perda da auto regulação vascular, ruptura de pequenos vasos e consequente hemorragia petequiral (SONNTAG; DOUGLAS, 1992; AMAR; LEVY, 1999).

Com a perda de regulação vascular, o fluxo sanguíneo medular sofre alterações hemodinâmicas que podem levar à hipotensão e hipóxia, que compõem o quadro de isquemia focal (AMAR; LEVY, 1999). A perda da microcirculação sanguínea se estende consideravelmente nas direções proximal e distal do sítio de lesão e os achados fisiopatológicos permitem o desenvolvimento de um grande repertório de abordagens terapêuticas, cada uma voltada para uma fase da recuperação da lesão (TATOR; FEHLINGS, 1991).

Grande parte das abordagens terapêuticas se concentra nas consequências agudas e crônicas da lesão medular e em terapias de reabilitação. Devido à complexidade da

casca da reação bioquímica envolvida na patogenia da lesão medular, numerosas abordagens farmacológicas têm sido desenvolvidas. Os principais objetivos destas estratégias na promoção da regeneração após lesão medular são: minimizar a progressão da lesão secundária (neuroproteção), favorecer a condução axonal (neurorestauração) e fornecer ambiente permissivo ao crescimento axonal (neuroregeneração). (SCHWAB et al., 2006).

Intervenções farmacológicas são importantes para reduzir a lesão secundária que acentua os prejuízos funcionais, danos celulares e teciduais inicialmente disparados pela injúria mecânica (MALLEI et al., 2005). Dentre essas intervenções a de maior impacto clínico até o momento é a aplicação do glucocorticosteroide metilprednisolona (LIM; TOW, 2007). Tal substância mostrou benefícios após lesão medular aguda, tanto em animais quanto em humanos, agindo provavelmente como anti-inflamatório e inibidor de peroxidação lipídica (AMAR; LEVY, 1999; HALL; SPRINGER, 2004).

Embora algumas terapias experimentais tenham exibido sucesso sobre alguns obstáculos à regeneração agindo em diferentes pontos da cascata de lesão, é evidente que uma única abordagem não seria suficiente para alcançar a completa recuperação após lesão medular (NOVIKOVA; NOVIKOV; KELLERTH, 2002). Além do trauma inicial e consequente lesão medular, muitos fatores participam da lesão secundária incluindo neuropeptídeos, monoaminas, células imunes, modificações em concentrações de cátions, aminoácidos e produtos da hidrólise de fosfolipídios como ácidos graxos insaturados, eucosanóides e radicais livres, dentre eles, o Óxido Nítrico (NO) (YANG; KIM; LEE, 2007).

2.2 *Pluchea sagittalis*

A *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, é conhecido vulgarmente como tabacarana, madre cravo ou quitoco (ver figura 1), planta da família Asteraceae, comum na região tropical, sendo facilmente encontrada nos países da América Latina, inclusive no Brasil (BARROS et al., 2006). É utilizada popularmente, na forma de chá das folhas e talos, como alternativa terapêutica para o tratamento de distúrbios digestivos, enfermidades estomacais e hepáticas, flatulências, dispepsias nervosas, inflamação uterina, renal e de bexiga, reumatismo e tratamento de distúrbios nervosos característicos da histeria (LORENZI; MATOS, 2002).

Várias espécies do gênero *Pluchea* são amplamente utilizadas como plantas medicinais, por apresentarem importantes propriedades medicinais. Em Cuba, as espécies *P. odorata* e *P. carolinensis* pode ser utilizado na medicina popular como digestivo e antipirético. Enquanto a *P. rosea* como vermífugo, além de possuir atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos etanólico e n-butanólico dessas plantas (CÓRDOVA et al, 2010). A *P. lanceolata* é utilizada na Índia como: antipirético, analgésico, antirreumático e calmante (KHAN et al., 2010). Estudos demonstraram a atividade indutora do sono e a diminuição da atividade locomotora de ratos tratados com extrato de *Pluchea indica* Less. (THONGPRADITCHOTE et al., 1999).

Dentre as várias atividades cientificamente comprovadas das espécies desse gênero, grande parte delas tem demonstrado potencial antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatório e ação no SNC como é o caso da *P. sagittalis* (RODRIGUES,2011). O extrato etanólico bruto foi previamente caracterizado e as respectivas frações aquosa, etanólica e acetônica de *P.sagittalis* demonstraram, na prospecção fitoquímica, a presença dos compostos: alcalóides, cumarinas, flavonóides, taninos, saponinas e triterpenos, compostos equivalentes aos compostos encontrados em outras espécies do mesmo gênero (RODRIGUES, 2011).

Estudos farmacológicos da *P. sagittalis* demonstraram a atividade anti-proliferativa em células tumorais humanas (MONKS et al., 2002), a contribuição do mecanismo antioxidante na atividade anti-inflamatória (PÉREZ-GARCÍA et al., 1996), a inibição da expressão da proteína hsp72 em neutrófilos humanos (PÉREZ-GARCÍA et al., 2001), além dos efeito analgésico e depressor central (RODRIGUES, 2007).

A atividade analgésica e anti-inflamatória das folhas de *Pluchea sagittalis*, é atribuída à presença das substâncias triterpênicas: stigmasterol, β -amirina, taraxasterol e pseudo-taraxasterol que foram isoladas das folhas desta planta (BURGER et al., 2000; BARROS et. al., 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da humanidade não têm acesso ao atendimento primário de saúde, por estarem muito distantes dos centros de saúde ou por não possuírem recursos para adquirir os medicamentos prescritos (VEIGA-JÚNIOR, 2008). A maior parte dessas pessoas encontra-se nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, e a utilização de plantas medicinais corresponde a melhor alternativa terapêutica (BARROS et al., 2006). A fitoterapia permite que o ser humano se reconecte

com o ambiente, acessando o poder da natureza, para ajudar o organismo a normalizar funções fisiológicas prejudicadas, restaurar a imunidade enfraquecida, promover a desintoxicação e o rejuvenescimento (FRANÇA et al., 2008). Se os países mais pobres utilizam as plantas medicinais por tradição e ausência de alternativas econômicas viáveis, nos países mais desenvolvidos observa-se um maior uso de fitomedicamentos, influenciado por modismos de consumo de produtos naturais (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005).

O extrato etanólico bruto foi caracterizado e as respectivas frações aquosa, etanólica e acetônica de *P.sagittalis* demonstraram, na prospecção fitoquímica, a presença dos compostos: alcalóides, cumarinas, flavonóides, taninos, saponinas e triterpenos compostos equivalentes aos compostos encontrados em outras espécies do mesmo gênero (RODRIGUES, 2011).

Partindo do princípio que a *Pluchea sagittalis* é uma planta que o extrato age no Sistema Nervoso Central, ultrapassando a barreira hemato-encefálica e possui atividade antioxidante e antiinflamatória, o presente projeto visou analisar a interação do extrato etanólico de *P. sagittalis* na lesão medular em ratos. No entanto, não há até o momento relatos na literatura sobre o efeito da *Pluchea sagittalis* ou seus componentes isolados na Lesão medular *in vivo*.



Figura 1 – *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera.
Fonte: <http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?t=176366>

2. Objetivos:

2.1. Geral:

Avaliar a ação comportamental e neuroprotetora do extrato etanólico da *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, na lesão medular por hemisseção direita em ratos.

2.2. Específicos:

- Obter o extrato etanólico de *P. sagittalis*;
- Mensurar a atividade motora dos animais.
- Analisar a ação da administração do extrato etanólico de *P. sagittalis*;
- Mensurar modificações morfológicas das células através de análise histológica;
- Quantificar neurônios e Astrócitos através da análise histológica.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção dos extratos

3.1.1. Material botânico

As espécimes de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera foram coletadas no Bairro Japãozinho, na Região metropolitana de Aracaju, estado de Sergipe. Após a coleta, foi realizada a identificação e confirmação da espécime pelo o herbário da Universidade Federal de Sergipe (ASE) através amostras oriundos da coleção do herbário com os registros de nº 02829 de 17/11/1982 e nº 03048 de 01/11/1988 (Anexos 1 e 2).

As folhas frescas foram selecionadas, limpas e secas em estufa com circulação de ar, à temperatura de 40°C, trituradas e colocadas em refluxo contínuo por 6h, com etanol 98% em aparelho do tipo Soxhlet. O extrato foi rotaevaporado para obtenção da amostra seca (RODRIGUES, 2011).

3.2. Determinação da amostra

Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do Biotério de Universidade Tiradentes separados em número máximo de 6 animais por caixa retangular padronizada de tamanho médio. O uso de animais foi realizado de acordo com as normas para a prática didático-científica de acordo com a Lei nº 9.605/1998, §1º e o Projeto de Lei nº 1.691, de 2003, que dispõe sobre o uso de animais para fins científicos e didáticos e após liberação do Comitê de Ética em Pesquisa através do protocolo de nº 010912 na seguinte data 01/10/2012 (Anexo 4). A amostra deste estudo foi composta de 48 ratos machos (250-300g), divididos em 08 grupos (n=6) (Quadro 1), todos provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes – UNIT e classificados de acordo com a etapa de execução descrita abaixo.

Quadro 1 - Grupos experimentais para o desenvolvimento do trabalho. DMSO: Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo. EEPS: Extrato Etanólico da *Pluchea sagittalis*;

Grupo (n=6)	Procedimento experimental	Tratamento Oral (Gavagem)
G1	Laminectomia (Controle)	DMSO a 5% (Salina)
G2	Laminectomia (Controle)	EEPS 10mg/kg
G3	Laminectomia (Controle)	EEPS 50mg/kg
G4	Laminectomia (Controle)	EEPS 100mg/kg
G5	Lesionados	DMSO a 5% (Salina)
G6	Lesionados	EEPS 10mg/kg
G7	Lesionados	EEPS 50mg/kg
G8	Lesionados	EEPS 100mg/kg

Os animais foram distribuídos em grupos e subgrupos com seis ratos (n=6/subgrupo) cada, sendo as distribuições aleatórias, conforme descrito a seguir. Todos os grupos são subdivididos em laminectomia e lesão.

Os grupos foram divididos em: GRUPO LAMINECTOMIA tratados com Dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% (salina) com o extrato etanólico de *pluchea sagittalis* nas doses 10, 50 e 100mg/kg na concentração de 30%. GRUPO LESÃO foram tratados com DMSO a 5% (salina) com o extrato etanólico de *Pluchea sagittalis* nas doses 10, 50 e 100mg/Kg na concentração de 30%. Foi administrado por gavagem (via oral) com a seringa específica de tal procedimento na quantidade de 1mL por dose, o animais foram contidos de forma manual e de acordo com o procedimento padrão descrito pela comissão de ética (CEUA), nos dias de avaliação comportamental a gavagem foi realizada após o procedimento de avaliação comportamental.

3.3. Desenho Experimental e Tratamento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos acima. Um dia antes da cirurgia, foi realizado o pré-teste para avaliação funcional da escala Basson Beattie Bresnahan (BBB). Então, todos os animais foram submetidos à laminectomia (cirurgia sem lesão medular) seguida ou não de hemissecção medular direita (Lesão) e receberam extrato etanólico por via oral (gavagem) da *Pluchea sagittalis*. As doses de 10, 50 e 100mg/kg na concentração de 30% foram administradas no dia da cirurgia e durante os vinte e um dias subsequentes (tratamento sub-crônico), por uma seringa apropriada para a gavagem na quantidade de 1mL (Figura 2). As concentrações de *Pluchea sagittalis* nos extratos foram determinadas com base nos resultados de estudos pilotos realizados anteriormente, a caracterização de suas atividades farmacológicas e toxicológicas desse extrato foi descrita por Rodrigues (2011).

A avaliação funcional da função motora foi realizada por meio de teste de comportamento 0 hora antecedendo a cirurgia e aos 1; 7; 14 e 21 dias, sendo que os animais foram eutanaziados aos 21 dias para análise histológica (Figura 3).



Figura 2: Contenção e gavagem.

3.4. Lesão medular

A hemisseção da medula a nível toracolombar de ratos foi primeiramente descrita em 1993 por Helgren e colaboradores. E tem sido amplamente utilizada como modelo de estudo da fisiopatologia da lesão e investigação de possíveis estratégias terapêuticas (GWAK; HULSEBOSCH 2009; ZHOU et al., 2009).

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de ketamina (100mg/Kg) e xilazina (14mg/Kg) via intraperitoneal (i.p.). Em seguida foi realizada a tricotomia da região dorsal torácica e uma incisão na região correspondente à coluna torácica inferior. A musculatura foi então divulsionada, expondo as vértebras T8 – T11, identificadas pela palpação das apófises espinhosas. Após a identificação das vértebras, a apófise espinhosa e a lâmina da vértebra T10 foram cuidadosamente retiradas, usando-se uma caneta de alta rotação com broca. A hemi-medula do lado direito foi seccionada com auxílio de bisturi. Os animais foram acomodados em sala climatizada para recuperação pós-cirúrgica, sendo constantemente monitorados quanto as condições de alimentação, e hidratação, excreção de fezes e urina. Ao final da cirurgia, foi aplicada injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Forte Dodge Saúde Animal LTDA, 0,5 ml) e os animais foram aquecidos por uma lâmpada de 60 W até recuperação da anestesia. O analgésico buprenorfina (0.01 mg/kg, s.c.) foi administrado diariamente por dois dias a cada 12 horas (SCHAAL et al.; 2012).



Figura 3: Análise funcional BBB após lesão medular (Pata direita).

3.5. Escala Basson Beattie Bresnahan, 1995 (BBB)

Esta escala tem por objetivo avaliar a evolução da recuperação funcional motora dos animais. Para isso, os animais são colocados um a um em uma arena de testes e observados durante 4 minutos, enquanto se locomovem livremente. A avaliação é realizada através da observação de alguns parâmetros comportamentais: o movimento do membro, a posição da pata, o tipo do passo, a coordenação da passada, a abertura dos dedos, a rotação predominante da pata, a estabilidade do tronco e a posição da cauda. Os parâmetros colhidos em cada teste foram anotados em tabelas individuais e posteriormente classificados por meio de uma escala que varia de 0 a 21 pontos (anexo 4). Os pontos refletem a condição motora dos animais, onde zero representa paralisia total do membro e 21 pontos representa função motora normal do membro (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995).

Pontuações entre 0 e 7 indicam o retorno de movimentos isolados de até três articulações (quadril, joelho e tornozelo). Pontuações entre 8 e 13 indicam o retorno dos passos plantares e coordenação dos movimentos entre patas posteriores e anteriores. Por fim, pontuações entre 14 e 21 mostram o retorno da abertura dos dedos durante a passada, posição predominante da pata em paralelo ao tronco, estabilidade de tronco e levantamento da cauda. O teste será realizado às cegas sempre pelo mesmo examinador. Durante o teste

os animais foram gentilmente estimulados a caminhar continuamente, sendo que os teste foram gravados para posterior análise se necessário em caso de dúvidas.

3.6. Eutanásia e obtenção do tecido medular

Os animais foram sacrificados por câmara de gás de CO₂. As medulas foram retiradas por dissecação (Figuras 4, 5 e 6) e o material foi desidratado em série alcoólico crescente, diafanizado em série de xilóis, e incluído em parafina sob a forma de blocos. Os blocos rígidos foram então levados ao micrótomo, para fornecer os cortes. Após serem seccionados, os cortes foram colocados para flutuar sobre uma superfície aquecida e colocados sobre lâminas de vidro e levados para estufa, onde aderem e posteriormente corados. Os cortes histológicos foram submetidos à coloração Hematoxilina e eosina (HE) (COELHO, 2009).



Figura 4: Fixação da medula em formol.



Figura 5: Medula lesionada para processamento histológico.



Figura 6: Medula sadia para processamento histológico (controle).

3.7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

3.7.1. Coloração hematoxilina-eosina

Nesta coloração, a hematoxilina, age como corante natural, por meio de seu produto de oxidação, a hemateína. A oxidação química produz-se pelo uso de iodato de potássio ou óxido de mercúrio. Para corar o tecido, a hemateína necessita de um mordente (sais de alumínio, ferro, cromo, cobre ou tungstênio), prévio ou incorporado na própria solução de hematoxilina. Convencionalmente, para que seja dado o contraste à coloração é usada uma solução de eosina logo após a aplicação de hematoxilina. Como resultado dessa coloração, os núcleos são corados em azul (hematoxilina), enquanto o citoplasma e a maioria dos outros tecidos ficam corados de rosado a vermelho (eosina) (VIOTTI e colaboradores, 1995).

A técnica da coloração consistirá em deixar as secções de tecido em contato com a hematoxilina de Harris por 90 segundos, lavar em água corrente por 5 minutos, colocar para azular, na solução de água amoniacal, por 15 segundos, lavar em água corrente por 5 minutos e corar com a solução de Eosina por 30 segundos. A seguir as lâminas passarão por uma bateria de álcoois em concentração crescente, uma mistura de álcool e xilol e xilol puro (3 minutos cada) para então serem montadas com *Entellan*. Por meio desta coloração serão avaliadas a densidade de células marcadas para HE no tecido medular (VIOTTI e colaboradores, 1995).

3.7.2. Análise de imagens

As quantificações serão realizadas por meio de análise de imagens utilizando microscópio acoplado à câmera fotográfica. As imagens serão digitalizadas para computador e será utilizado o software NIH 3.0 para análise.

Para que a análise histológica seja realizada às cegas, os códigos de identificação de cada lâmina serão cobertos por outro experimentador antes do início da análise e devem ser revelados após o término.

3.7.3. Análise da densidade de células marcadas para HE

A densidade de células marcadas para HE foi medida na medula espinal direita, nos cornos dorsal e ventral (lâminas I, XI, XXI e XXX) dos animais. As regiões foram identificadas de acordo com ilustrações apresentadas por Molander e colaboradores (1989). Para análise, cada amostra de medula espinal será dividida em quatro segmentos: dois rostrais e dois caudais ao sítio de lesão de 4 mm de comprimento cada – modificado de TRUDRUNG; WIRTH; MENSE (2000). Em cada segmento foram analisadas duas secções. A densidade de células em cada região analisada foi definida como o número de células coradas em uma área padronizada de 100000 μm^2 (0,1mm²). Os resultados foram expressos como média da densidade celular (número de células marcadas/0,1mm² de estrutura) \pm erro padrão da média (EPM), em cada segmento para o lado direito (VIOTTI e colaboradores, 1995).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise utilizou o programa GraphPad Prim 6.01. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade dos dados das variáveis estudadas, na análise das médias de mais de duas amostras não relacionadas entre grupos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o pós teste Dunn's. E para comparar o grupo controle dos demais grupos tratados, o pós teste Dunnett ou ANOVA TWO_WAY quando se comparou duas variáveis entre os grupos. Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

Os animais submetidos às lesões medulares foram tratados em tempos iguais e apresentaram resultados do comportamento motor diferenciados em relação ao grupo controle conforme o tratamento submetido a cada grupo. Neste estudo em decorrência de complicações atípicas, da totalidade dos animais da presente pesquisa, apenas 4 (quatro) animais vieram à óbito. Infecção, autofagia ou úlceras de pressão em função do uso de técnica anestésica com a xilanizina e a ketamina, técnica cirúrgica asséptica, manutenção dos ratos em ambiente com temperatura controlada e gaiolas forradas. Tais complicações provavelmente ocorreriam se os ratos fossem mantidos por períodos maiores.

Foi observado nos gráficos A1, A3, A5 e A7 (abaixo) referente aos grupos controle de Laminectomia, que houve apenas uma pequena variação no teste de 24 horas, de forma não significativa, isso se deve a relação do pós operatório e do comportamento relativo de cada animal nas cirurgias, já nas colunas de 7, 14 e 21 dias foi observado um padrão de estabilidade, isso porque não houve comprometimento da medula, resultando em uma rápida recuperação de forma significativa ($p < 0,01$), pois a cirurgia de laminectomia gera lesão na pele, no tecido muscular e tecido ósseo pois é retirada a lamina que protege a medula gerando desconforto ao animal.

Quando comparados nos gráficos A2, A4, A6 e A8 (abaixo) que são referente ao grupo da lesão medular e seus tratamentos, foi observado que o teste de BBB na coluna de 24 horas apresentam uma pequena diferença, mas sem importância realmente significativa, visto que o pós-cirúrgico os animais apresentam uma pequena relatividade em relação a recuperação, mas sem interferência nos tratamentos. Já no teste de BBB em 7, 14 e 21 dias como observado nas figuras apresentam diferenças significativas em relação em seus tratamentos, sendo que a gráfico A6 que é o grupo com tratamento com a dose 50mg/kg do extrato de *Pluchea sagittalis*, apresentou um melhor resultado em comparação aos outros grupos de lesão com melhora significativa em 14 e 21 dias ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) e os tratados com dose de 10 e 100mg/Kg (Gráficos A4 e A8) apresentaram resultado semelhante com melhora significativa em 21 dias.

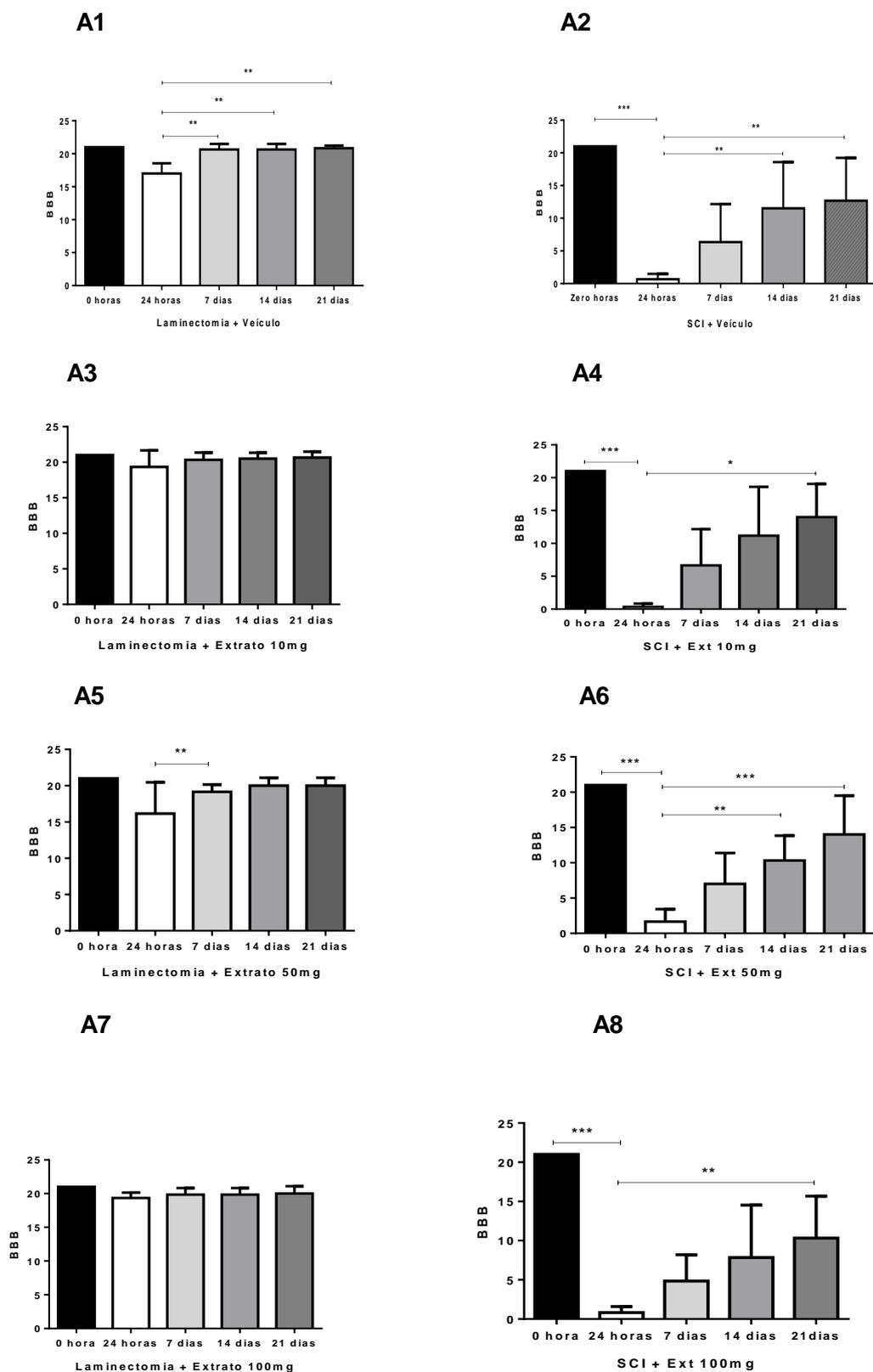


Figura 7: Média +/- desvios ou erro padrão dos desempenhos de recuperação funcional da pata inferior direita, avaliação através do teste Basson Beattie Bresnahan (BBB) após a cirurgia de Laminectomia e Cirurgia de lesão medular tratados com DMSO e extrato a 10, 50 e 100mg/kg em 0 e 24 horas e 7, 14 e 21 dias (Gráficos do A1 a A8). Na análise do

teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn's foi considerado com diferença significativa quando apresentou * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ou *** $p<0,001$.

No gráfico abaixo (figura 2), observa-se um padrão nos grupos de laminectomia com uma pequena variação no teste BBB de 24 horas o que é esperado, por motivos comportamentais relacionado com o pós-operatório e por não sofrer lesão direta na medula. Já nos grupos de lesão foi observado que a dose com 10 e 50mg/kg apresentaram um melhor resultado linear nos testes comportamentais de 7, 14 e 21 dias em relação as outras doses, enquanto o grupo 100mg/Kg, em 7 dias se apresentava com escores baixo de forma significativa em relação a 0 horas e resultado pior que o grupo veículo.

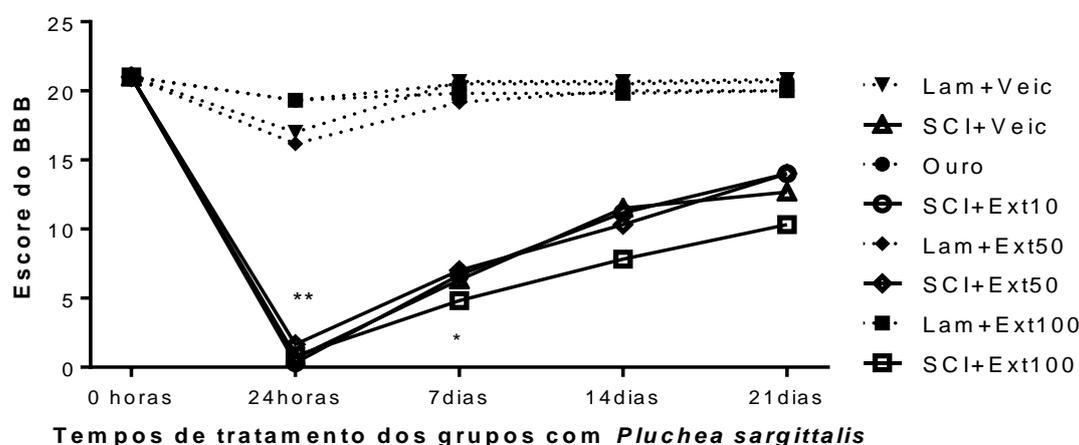


Figura 8: Comportamento das doses de tratamento nos grupos com extrato etanólico da *Pluchea sagittalis* e seus controles durante os tempos de tratamento (24 horas e 7, 14 e 21 dias). Foi considerado com diferença estatística os grupos Lesão (SCI) + Veículo, SCI+Ext10, SCI+Ext50 e SCI+Ext100 em 24 horas (* $p<0,01$) e SCI+Ext100 em 7 dias (* $p<0,05$).

Na Figura 3 (abaixo) foi observado que houve uma diferença significativa na densidade dos astrócitos entre a LAM+DMSO e a LES+DMSO, isso se deve porque o grupo LES+DMSO é um grupo lesionado e sem tratamento, já a LAM+DMSO e o grupo LES+EXT100mg/kg teve diferenças significativas devido ao fato que o aumento da dose atua como antagonista, já em relação a LES+DMSO e a LES+EXT50mg/Kg essa diferença significativa está relacionada com a eficiência da dose de 50mg/kg do extrato da *Pluchea sagittalis*, isso se deve pela ação de proteção ou na formação de novos astrócitos.

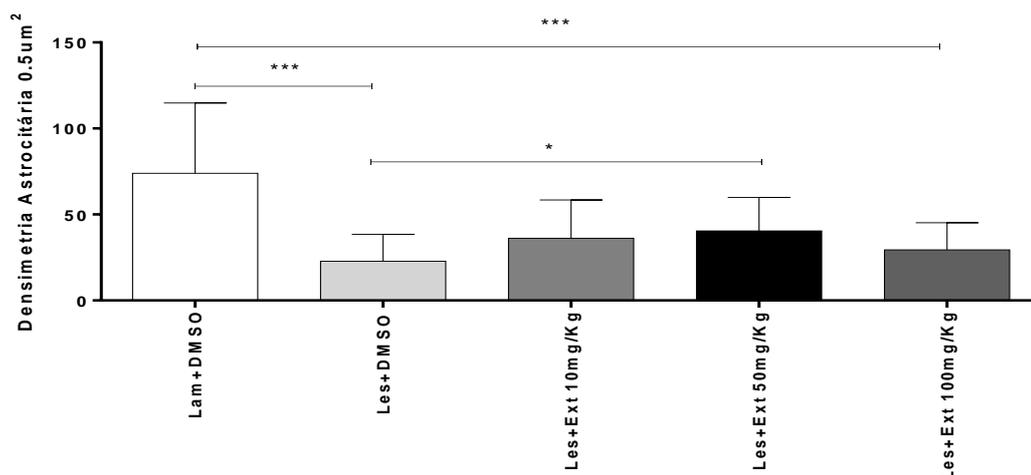


Figura 9: Média e desvio-padrão da Densidade astrocitária em área de $0,5\mu\text{m}^2$ nos grupos com extrato etanólico da *Pluchea sagittalis* e seus controles durante 21 dias de tratamento. Na análise no teste Kruskal-Wallis e o pós teste Dunn's foi considerado com diferença estatística os grupos: Laminectomia (Lam) e Lesão (Les) tratados com Dimetilsulfóxido (DMSO); Lam+DMSO e Les+ Extrato (Ext) 100%; e Lam+DMSO e Les+Ext100%, para * $p<0,05$, * $p<0,01$ e * $p<0,001$.

Na figura 4 (abaixo) observou-se a relação da densidade de neurônios mortos e vivos (sadios) de acordo com seu tratamento, observou que nos motoneurônios sadios houve uma diferença significativa leve entre o grupo de Lam+DMSO e Les+Ext10mg/kg e entre Lam+DMSO e Les+Ext50mg/kg houve diferença significativa forte, mostrando ação de neuroproteção na dose do extrato 50mg/kg. Já na densidade de motoneurônios mortos os grupos Les+Ext10mg/kg e Les+Ext100mg/kg obtiveram maior quantidade de motoneurônios mortos, nos grupos Lam+DMSO e Les+Ext50mg/kg apresentam uma relação em seus resultados mostrando mais uma vez que a dose do extrato 50mg/kg mostrou-se melhor resultado nas análises.

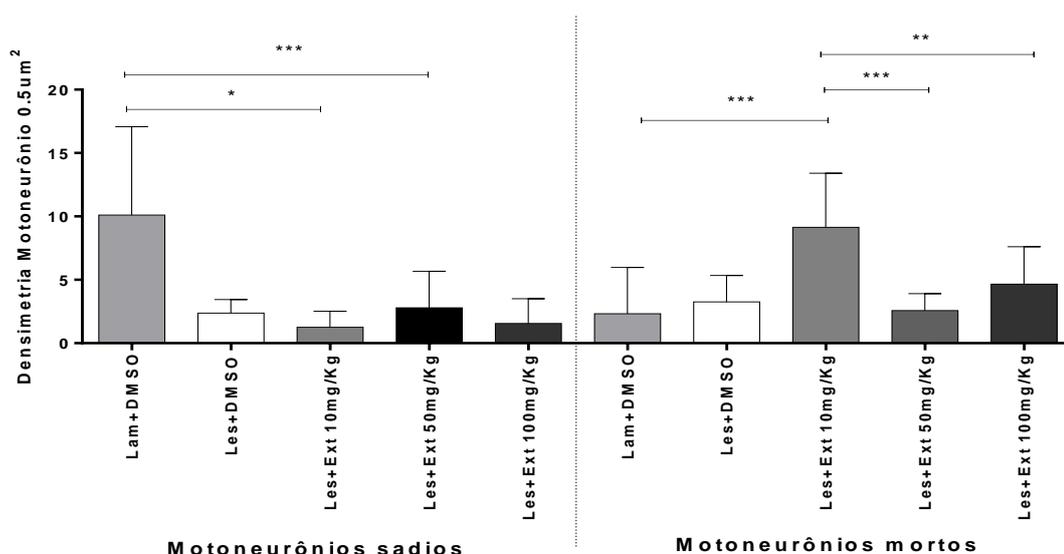


Figura 10: Média e desvio-padrão da Densidade de neurônios sadios e mortos em área de $0,5\mu\text{m}^2$ nos grupos com extrato etanólico da *Pluchea sagittalis* e seus controles durante 21 dias de tratamento. Na análise no teste Kruskal-Wallis e o pós teste Dunn's foi considerado com diferença estatística os grupos: Laminectomia (Lam) e Lesão (Les) tratados com Extrato (Ext) 10% e Ext 50% para os neurônios sadios; e nos neurônios mortos Lam+DMSO e Les Ext 10%; e Les Ext 10% em relação os grupos Les+Ext 50% e 100%, para * $p<0,05$, * $p<0,01$ e * $p<0,001$.

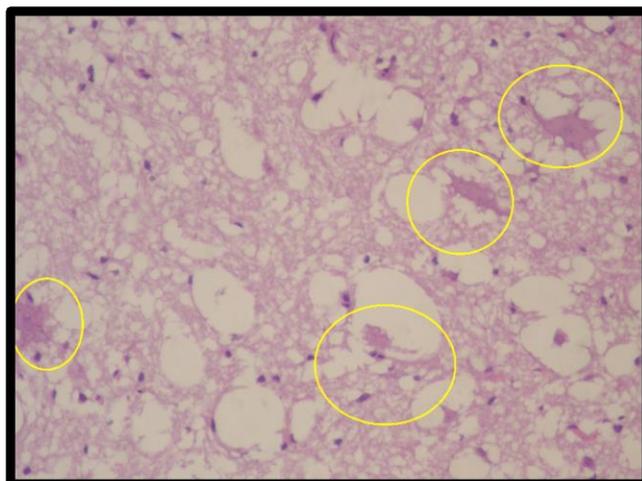


Figura 11 – Área de Lesão.

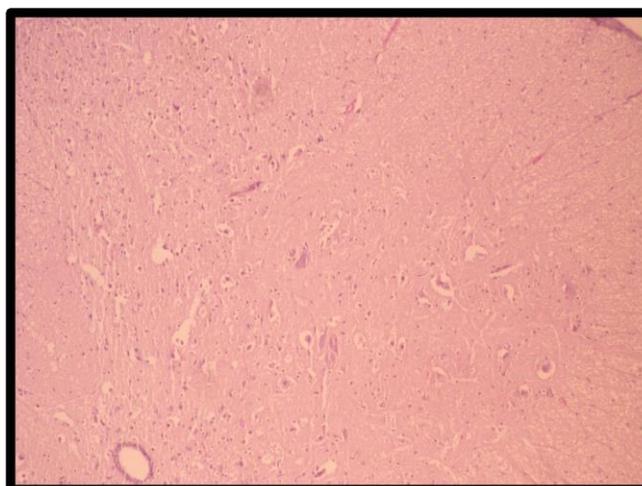


Figura 12 – Visão geral do corte histológico direito da Medula.

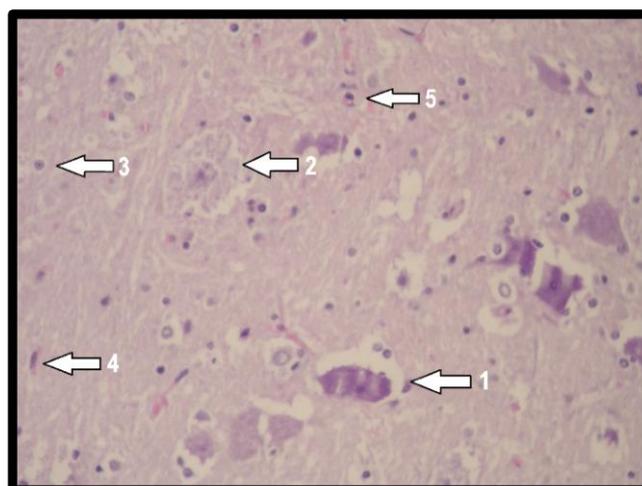


Figura 13 – Contagem diferenciada das células do tecido medular. 1-Neurônio vivo, 2-Neurônio morto, 3-Astrócito, 4- Micrógliia e 5-oligodendrócito.

5. DISCUSSÃO

Para Andrade e Machado (2013), a LM e suas sequelas vêm se tornando mais incidentes e prevalentes, principalmente as lesões traumáticas causadas pela violência urbana. A chance de sobrevivência do indivíduo, após a LM, aumentou com os avanços na área médica.

Entretanto, não existindo uma terapêutica eficaz, a fim de prevenir possíveis complicações, essa pessoa poderá conviver com alterações físicas, sensoriais e autonômicas e além de alterações psicossociais que diminuam sua qualidade de vida. Portanto, a sua reabilitação deve começar tão logo seja feito o diagnóstico da LM (ANDRADE; MACHADO, 2013).

Segundo Sousa e colaboradores (2008), a procura por outras alternativas terapêuticas no tratamento da lesão medular para impedir a lesão secundária a fim de resultar em uma maior eficácia com menos efeitos colaterais, demonstra um aumento de números de pesquisas utilizando plantas medicinais com essa finalidade nas últimas décadas.

São amplamente estudadas a família Asteraceae por possuir ações farmacológicas em decorrência de seus componentes químicos ao ponto de vista de interesse farmacológico a exemplo de poliacetilenos, lactonas, óleos essenciais e terpenos, do tipo sesquiterpenos (STEFANELLO, 1993). Já com relação ao gênero *Pluchea*, é descrita a presença de flavanóides e terpenos como compostos característicos do grupo (REYES-TREJO, JOSEPH-NATHAN, 1999), como arguticinina e pluchecinina (AHMAD et al., 1989).

O presente estudo empregou o método de laminectomia e lesão de hemimedula direita para adaptar-se aos objetivos deste primeiro trabalho da linha de pesquisa que consiste em analisar a ação da neuroproteção do extrato etanólico da *P. sagittalis* em modelos experimentais.

Optou-se pelo uso de ratos da raça *Wistar* em função de sua disponibilidade em nosso meio e das menores dificuldades técnicas no manuseio desses animais. A espécie preferencial para experimentos com lesão medular deveria ser a dos primatas, mas sua utilização é limitada em função do custo elevado, pouca disponibilidade, dificuldades de manuseio e considerações éticas (CRISTANTE, 2010). O rato é uma boa alternativa nestes experimentos posto que sua medula possui organização citoarquitetônica e vascularização similar ao humano (CRISTANTE, 2010).

O presente trabalho objetivou realizar as cirurgias em duas diferentes etapas: laminectomia grupo controle sem lesão medular e laminectomia com lesão medular por hemissecção direita que é o grupo tratado. A avaliação da escala locomotora BBB foi realizada 24 horas, bem como aos 07, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. A análise de variância com medidas repetitivas mostrou interação entre tratamento e tempo ($p=0,04$) e diferenças significantes para o fator tratamento ($p=0,001$). Em todos os tempos analisados, todos os grupos submetidos à Laminectomia mostraram valores significativamente iguais entre si ($p>0,05$).

Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico os grupos submetidos à LM por hemissecção mostraram valores médios significativamente menores em relação aos grupos laminectomia, independente do tratamento associado. Resultados deste tipo são observados devido à limitação na capacidade de regeneração do SNC após uma lesão (YU et al., 2012). Lesões severas geralmente levam a incapacidades permanentes, e as lesões moderadas são seguidas por certo grau de recuperação funcional espontânea (MAYER et al., 2008). Koppula et al. (2012) e Johnson et al. (2012) encontraram resultados semelhantes para os escores locomotores da escala BBB em ratos lesionados do primeiro ao 21º dia.

Foi verificado uma melhora significativa nos ratos lesionados que estava em tratamento especialmente na dose 50mg/kg, o que demonstra não só a ação de neuroproteção, mas como também ação antiinflamatória e antioxidante. A ação do extrato etanólico no SNC é confirmado por Rodrigues (2011).

Os requisitos para reparação anatômica e funcional após lesão medular são mais complexos que os requisitos para recuperação de outros danos neurológicos que geralmente requerem apenas restauração dos níveis de neurotransmissores para que haja importante recuperação funcional (BENEDETTI, 2013). Em comparação com o grupo lesão, o grupo controle (laminectomia) não apresentou lesão, onde resulta de uma maior pontuação no score BBB em todas as fases de análise.

Os astrócitos são responsáveis pela reparação, ativação das células de defesa e homeostase do tecido medular. Segundo Dong e Benveniste (2001) os astrócitos são células que respondem prontamente as lesão provocadas no tecido nervoso. Na densimetria astrocitária observou-se que dos grupos tratados o grupo Lesão com a dose de 50mg/kg obteve um melhor resultado em relação aos demais grupos. Os astrócitos desempenham um papel importante no aspecto mecânico dos oligodendrócitos na mielinização, e também quando relacionados aos fatores do neutrófilos, pois são importantes para o

desenvolvimento e manutenção da vida dos neurônios. Para Montgomery (1994) os astrócitos servem ainda como a maior fonte de produção de proteínas da matriz extracelular e de moléculas de adesão para o desenvolvimento e manutenção do SNC.

Na Densimetria dos motoneurônios observamos que o grupo Lesão com a dose de 50mg/kg obteve um melhor resultado com maior quantidade de neurônios sadias e menor quantidade de neurônios mortos, o que confirma a ação de neuroproteção do extrato na dose 50mg/kg. Já a neuroproteção tem objetivo de anular a cascata de eventos que conduz à morte celular, facilitando o resgate e proteção da zona de penumbra isquêmica. Por sua vez, ao limitar a extensão da necrose pela melhoria da perfusão sanguínea cerebral irá evitar lesões secundárias e complicações futuras (FERREIRA; MARQUES, 2011).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato etanólico da *Pluchea sagittalis* (Lam.) CABRERA, ASTERACEA, apresenta atividade na neuroproteção, tendo em vista que, apresentou dados significativos nos testes comportamentais (BBB) e na Densidade diferencial de motoneurônios e Astrócitos, principalmente na dose de 50mg, sem causar qualquer outra alteração notória de comportamento no modelo experimental. Não descartando que a ação antiinflamatória e antioxidante do extrato da *P. sagittalis* possa ajudar de forma pontencializadora a ação da neuroproteção, como também, evitando a progressão da lesão induzida pela inflamação.

Os resultados sugerem, portanto, uma ação neuroprotetora na dose de 50mg/kg do EEPS sobre a LM. Contudo, maiores estudos serão necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais o EEPS exerce tais efeitos no sistema.

7. REFERÊNCIAS

- AHMAD, V.U., FIZZA, K., SULTANA, A. -Isolation of two sesquiterpenes from *Pluchea arguta*, **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 3081, 1989.
- AMAR, Arun Paul; LEVY, Michael L. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. **Neurosurgery**, v. 44, n. 5, p. 1027-1039, 1999.
- ANDRADE, L. T.; MACHADO C. T. Validação de intervenções de enfermagem para pacientes com lesão medular e mobilidade física prejudicada. Revista Brasileira de Enfermagem, **Associação Brasileira de Enfermagem Brasília, Brasil**. v. 66, n. 5, p. 688-693, septiembre-octubre, 2013.
- ASSOCIAÇÃO DE ASSISTÊNCIA À CRIANÇA DEFICIENTE (AACD). Disponível em: <http://www.aacd60anos.com.br/>. Acesso em: 15 de Dezembro 2013.
- BARROS, I.M.C., LOPES, L.D.G., BORGES, M.O.R., BROGES, A.C.R., RIBEIRO, M.N.S., FREIRE, S.M.F. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Pluchea quitoc* (DC.) ethanolic extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, p. 317-320, 2006.
- BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 1995.
- BATCHELOR, P. E.; TAN, S.; WILLIS, T. E., *et al.* Comparison of inflammation in the brain and spinal cord follow mechanical injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 25, p. 1217-1225, 2008.
- BENEDETTI, E. M. La estimulación medular torácica es útil en el tratamiento del dolor post lesión medular cervical incompleta. **Rev. colomb. anestesiol.** vol. 41, n. 2, p. 0120-3347, 2013.
- BURGER, M.E., BALDISSEROTTO, B., TEIXEIRA, E.P., SOARES, J. Action of the extracts of *Pluchea sagittalis* on the absorptive characteristics of the gastrointestinal tract. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V. 43, n. 1, 2000.
- CARLSON, G. D.; GORDEN, C. D.; NAKAZAWA, S.; WADA, E.; SMITH, J. S.; LAMANNA, J. C. Sustained spinal cord compression: part II: effect of methylprednisolone on regional blood flow and recovery of somatosensory evoked potentials. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85-A, n. 1, p. 95-101, 2003.

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

CARNEIRO, V. M. B. et al. SEXUALITY IN WOMEN WITH SPINAL CORD INJURY. *Rev Pesq. Saúde*, v. 13, n. 1, p. 30-33, jan-abr, 2012.

COELHO, C. H. Análise da inibição da Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS) na liberação de vasopressina durante sepse experimental. Ribeirão Preto, 2009. **Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

COMPSTON, Alastair. Brain repair: an overview. **Journal of neurology**, v. 242, n. 1, p. S1-S4, 1994.

CÓRDOVA, W.H.P., TABART, J., QUESADA, A.G., SIPEL, A., HILL, A.L.P., KEVERS, C., DOMMES, J. Antioxidant capacity of three Cuban species of the genus *Pluchea* Cass. (Asteraceae). **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 249-261, 2010.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n.1, p. 52-60, 1997.

CRISTANTE, A. F. et al. Viabilidade de células do sistema nervoso central fetal no tratamento da lesão medular em ratos. **Acta ortop. bras., São Paulo**, v. 18, n. 5, 2010 .

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

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

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia, New York**, v. 36, n. 2, p. 180-190, 2001.

DONOVAN, W. H. (2007). Spinal cord injury: past, present, and future. **Journal of Spinal Cord Medicine**, 30, 85-100. Recuperado em 30/12/2011, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2031949/pdf/i1079-0268-30-285.pdf?tool=pmcentrez>.

FAUSTINO, T. T., ALMEIDA, R. B., ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 4, p. 429-436, 2010.

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

FERREIRA, A.; MARQUES, J. Fase Aguda do AVC isquêmico: a importância da neuroproteção e da reabilitação precoce. 2011. Disponível em: <<http://www.chbgarvio.min-saude.pt/pdf>> Acesso em: 24 jan.2013.

FIGUEREDO, S. M., NASCIMENTO, F. P., FREITAS, C. S., BAGGIO, C. H., SOLDI, C., PIZZOLATTI, M. G., IBAROLA, M. C. C., ARRUA, R. L. D., SANTOS, A. R. S. S. Antinociceptive and gastroprotective actions of ethanolic extract from *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. **Journal of Ethnopharmacology**, 1; v.135, n. 3, p. 603-609, 2011.

FRANÇA, I. S. X., SOUZA, J. A., BAPTISTA, R. S., BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 61(2): 201-208, 2008.

FRIGON, A.; ROSSIGNOL, S. Functional plasticity following spinal cord lesions. **Prog Brain Res**, v. 157, p. 231-260, 2006.

GWAK, Y.S.; HULSEBOSCH, C. E. Remote astrocytic and microglial activation modulates neuronal hyperexcitability and below-level neuropathic pain after spinal injury in rat. **Neuroscience**. v. 161, n. 3, p. 895-903, 2009

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

HELGREN M. E.; GOLDBERGER M. E. The recovery of postural reflexes and locomotion following low thoracic hemisection in adult cats involves compensation by undamaged primary afferent pathways. **Exp Neurol**. V. 123, n. 1, p. 17-34, 1993.

JOHNSON, W. L.; JINDRICH, D. L.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Quantitative metrics of spinal cord injury recovery in the rat using motion capture, electromyography and ground reaction force measurement. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 206, n. 1, p. 65-72, 2012.

KENNEDY, P., LUDE, P., ELSTRÖM, M. L., & SMITHSON, E. (2012). Appraisals, coping and adjustment pre and post SCI rehabilitation: a 2-year follow-up study, **Spinal Cord**, v. 50, p. 112-118, 2012.

KHAN, S., RAWAT, R., RAWAT, A.K.S., SHIRWAIKER, A. A report on the quality control parameters of aerial parts of *Pluchea lanceolata* (DC.) Oli. & Hiern, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 563-567, 2010.

KOPPULA, S.; KUMAR, H. KIM, I. S.; DONG-KUG CHOI. Reactive Oxygen Species and Inhibitors of Inflammatory Enzymes, NADPH Oxidase, and iNOS in Experimental Models of Parkinson's Disease. **Mediators of Inflammation**. v. 13, p. 16, 2012.

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

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil nativas e exóticas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA; São Paulo**: 2002.

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

MAYER, I. C.; BAUMANN, K.; THALLMAIR, M.; WEINMANN, O.; SCHOLL, J.; SCHWAB, M. E. Constraint-Induced Movement Therapy in the Adult Rat after Unilateral Corticospinal Tract Injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 38, p. 9386 - 9403, 2008.

MEYER, F., VIALLE, L.R., VIALLE, E.N., LEGGI-TORRES, L.F., RASERA, E., LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirúrgica brasileira**, v.18 p. 203-207, 2003.

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

MONKS, N. R., FERRAZ, A., BORDIGNON, S., MACHADO, K. R., LIMA, M. F. S., ROCHA, A. B., SCHWARTSMAN, N. In vitro Citotoxicity of Extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n.7, p. 494-500, 2002.

MONTGOMERY, David R.; DIETRICH, William E. A physically based model for the topographic control on shallow landsliding. **Water resources research**, v. 30, n. 4, p. 1153-1171, 1994.

NOGUEIRA, P. C. et al. Cuidadores de indivíduos com lesão medular: sobrecarga do cuidado. **Rev Esc Enferm USP**; v.47, n. 3, p. 607-14, 2013.

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

PERECIN, M. B., BOVI, O. A., MAIA, N. B. Pesquisa com plantas aromáticas, medicina e corantes: o papel do Instituto Agrônômico. **O Agrônomo**, v. 54, n. 2, p. 21-4, 2002.

PÉREZ-GARCÍA, F., MARIN, E., ADZET, T., CANIGUERAL, S. Activity of plant extracts on the respiratory burst and stress protein synthesis. **Phytomedicine**, v.8, n. 1, p. 21-8, 2001.

PÉREZ-GARCÍA, F., MARIN, E., CANIGUERAL, S., ADZET, T. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis*: involvement of an antioxidant mechanism. **Life Science**, v.59, n. 24, p. 2033-40, 1996.

QUEIROZ, M. L. S., JUSTO, G. Z., VALADARES, M. C., PEREIRA-DA-SILVA, F. R. R., MÜLLER, A. H. Adjuvant effect of *Pluchea* quitoc extract on the resistance of tumorbearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 23, p. 215-228, 2000.

REYES-TREJO, B., JOSEPH-NATHAN, P. Modhephene derivatives from *Pluchea sericea*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 75-78, 1999.

RODRIGUES, S. A. *Efeito ansiolítico do extrato etanólico de Pluchea sagittalis (Lam.) Cabrera, asteraceae, em modelos comportamentais – Aracaju, 2011. Tese apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da rede nordestina de Biotecnologia RENORBIO, Ponto Focal – São Cristóvão –Sergipe.*

RODRIGUES, S.A. Efeitos sobre o sistema nervosa central do extrato aquoso obtido das folhas de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (quitoco). **Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde do Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe**, 72p. 2007.

ROSENBERG, N.; LENGGER, R.; WEISZ, I.; STEIN, H. Neurological deficit in a consecutive series of vertebral fracture patients with bony fragments within spinal canal. **Spinal Cord**, v. 35, p. 92-95, 1997.

ROSSIGNOL S, DREW T, BRUSTEIN E, JIANG W. Locomotor performance and adaptation after partial or complete spinal cord lesions in the cat. **Prog Brain Res.**, v. 123, p. 349-65, 1999.

ROTSHENKER, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, p. 109, 2011.

SCHAAL SM, Garg MS, Ghosh M, Lovera L, Lopez M, Patel M, Louro J, Patel S, Tuesta L, Chan WM, Pearse DD, 2012.

SCHMITZ, T. J. Lesão Medular Traumática. In: *Fisioterapia Avaliação e Tratamento*. **Manole**: São Paulo, p. 874-87, 2004.

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

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

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

SONNTAG, V. K.; DOUGLAS, R. A. Management of cervical spinal cord trauma. **J Neurotrauma**, v. 9, n. S1, p. S385-396, 1992.

SOUSA, F. C. F. MELO, C.T.V., CITÓ, M. C. O., FÉLIX, F. H. C., VASCONCELOS, S. M. M., FONTELES, M. M. F., BARBOSA-FILHO J. M., VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p.642-654, 2008.

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

STEFANELLO, M. E. A. Avaliação estatística de plantas medicinais: química, farmacologia e sistemática. São Paulo. **Tese de doutorado em química –Universidade de São Paulo**. P. 208. 1993.

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

THONGPRADITCHOTE, S., MATSUMOTO, K., TEMSIRIRIRKKUL, R., TOHDA, M., MURAKAMI, Y. WATANABE, H. Neuropharmacological actions of *Pluchea indica* Less. Root extract in socially isolated mice. **Biological Pharmacology Bulletin**, v.19, n. 3, p. 379-83, 1999.

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

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 308-313, 2008.

VEIGA-JUNIOR, V. F., MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova** v. 28, p. 519-528, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S., MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **IHERINGIA, Série Botânica**, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, 2006.

VIOTTI, Neusa Maria Alves et al. Avaliação das técnicas de hematoxilina-eosina, imunofluorescência e peroxidase anti-peroxidase no diagnóstico post-mortem da toxoplasmose suína. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 16, n. 1, p. 107-114, 1995.

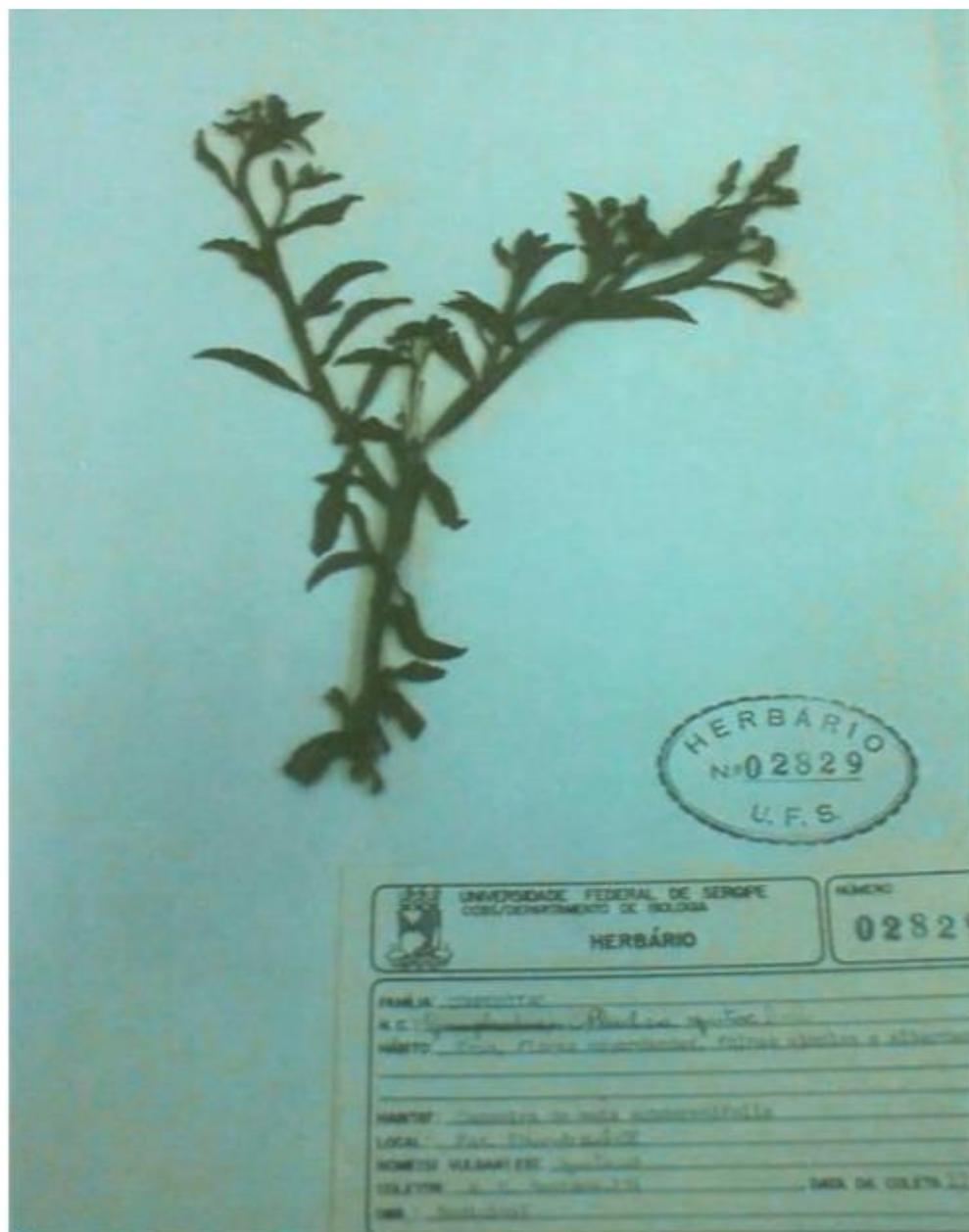
YANG, J. Y.; KIM, H. S.; LEE, J. K. Changes in nitric oxide synthase expression in young and adult rats after spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 45, n. 11, p. 731-738, 2007.

YU, T. S.; CHO, D.; KIM, K.; NAM, K.; CHO, H.; SUNG, J. Neuroprotective Effect of Treatment of Valproic Acid in Acute Spinal Cord Injury. **Journal Korean Neurosurgical Society**, v. 51, p.191-198, 2012.

ZHOU Z, PENG X, FINK DJ, MATA M. HSV-mediated transfer of artemin overcomes myelin inhibition to improve outcome after spinal cord injury. **Mol Ther**. v. 17, n. 7, p. 1173-9, 2009.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Registro da *P. sagittalis* no herbário da Universidade Federal de Sergipe em 1982.



Anexo 2 – Registro da *P. sagittalis* no herbário da Universidade Federal de Sergipe em 1988.



Anexo 3 – Cronograma de Atividades.

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO (Atividades que serão executadas a partir da aprovação pelo CEP)								
Atividades ou etapas	Mês 01-03	Mês 04-06	Mês 07-09	Mês 10-12	Mês 13-15	Mês 16-18	Mês 19-21	Mês 22-24
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X
Submissão do projeto ao Comitê de Ética		X						
Apresentação do primeiro seminário sobre o projeto		X						
Aquisição de materiais	X	X						
Testes da preparação final dos extratos selecionados em ratos submetidos à lesão (<i>in vivo</i>)			X	X				
Realização da eutanásia dos animais			X	X				
Processamento histológico				X	X			
Tabulação dos dados					X	X		
Submissão do Artigo à Qualificação								X
Defesa da Dissertação								X

Anexo 4 – Escala de pontuação do BBB.

Pontuação	Descrição
0	Não se observam movimentos de membro posterior (MP)
1	Movimentos suaves de 1 ou 2 articulações de membro posterior
2	Movimento extenso de 1 articulação e possível movimento suave de outra articulação no membro posterior
3	Movimento Extenso de 2 articulações do MP
4	Movimentos suaves de todas as 3 articulações
5	Movimentos suaves de 2 articulações, extenso da 3ª articulação do MP
6	Movimentos extensos de 2 articulações e movimento delicado da 3ª articulação do MP
7	Movimentos extensos das 3 articulações
8	Movimentos suaves, sem suportar o peso do corpo ou a pata apoiada sem suportar o peso do corpo
9	Apoio plantar com suporte do peso do corpo imóvel ou ocasional, frequente ou consistente suporte do peso do corpo com apoio dorsal
10	Passo sustentando o peso do corpo ocasionalmente, sem haver coordenação entre os membros anterior e posterior
11	De freqüente a consistentes passadas com suporte do peso sem coordenação entre os membros posteriores e anteriores
12	De freqüentes a consistentes passadas com suporte do peso do corpo e coordenação ocasional entre o os membros anteriores e membros posteriores
13	De freqüente a consistentes passadas com suporte do peso e freqüente coordenação entre o membro posterior e o membro anterior
14	Consiste coordenação da passada com apoio plantar e posição predominante da pata e de rotação no contato inicial e na elevação, freqüente passadas plantares,

	consistente coordenação entre o membro anterior e ocasionalmente com apoio dorsal
15	Passos plantares e coordenação constantes, sem abertura dos dedos, ou abertura ocasional dos dedos; posição da pata predominantemente paralela ao corpo no contato inicial
16	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, predominante posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação
17	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, predominante posição em paralelo da pata no contato inicial e na sua elevação
18	Coordenação consistente na passada com apoio plantar e consistente liberação do 1º dedo. Posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação
19	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, consistente liberação do 1º dedo. Posição paralela da pata no contato inicial e na elevação e o rabo está para baixo na maior parte do tempo
20	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, consistente liberação do 1º dedo. Posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação, o rabo consistentemente para cima e instabilidade de tronco.
21	Consistentemente coordenada na caminhada, consistente movimento do 1º dedo. Posição da pata paralela no apoio e na elevação. O rabo para cima Estabilidade consistente do tronco

Anexo 5 – Parecer Consubstanciado do projeto de pesquisa do comitê de ética.

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Efeito da administração do extrato etanólico de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, Asteraceae, na lesão medular em modelos murinos

Pesquisador Responsável Margarete Zanardo Gomes

Data da Versão 06/09/2012 Cadastro 010912 Data do Parecer 25/09/2013

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto
Testar os efeitos do tratamento com extratos de *Pluchea sagittalis* sobre a degeneração da morte celular decorrente da lesão espinal

Sumário do Projeto
 A lesão da medula espinal é um problema clínico sério que impõe responsabilidades e custos à sociedade, pois atinge principalmente a população jovem, no auge de sua produtividade. Para o indivíduo com lesão medular, o trauma inicial é caracterizado por rompimento dos tratos axonais, desconectando o sistema nervoso central (SNC) com as estruturas alvo, os quais não regeneram no adulto. No entanto, os chamados eventos secundários (a lesão progressiva da microvasculatura e a cascata de eventos bioquímicos como inflamação e oxidação que levam à morte celular) são especialmente importantes, pois contribuem para instalação de deficiências permanentes. O estudo da lesão medular se focaliza, portanto, (i) na elucidação dos processos fisiopatológicos, (ii) no desenvolvimento de terapêutica para interrupção do processo secundário de lesão e (iii) reversão dos fatores que impedem o crescimento axonal no SNC adulto. O extrato da planta *Pluchea sagittalis* apresenta propriedades antiinflamatória e antioxidante com ação no sistema nervoso central. Assim, a administração de extratos da *Pluchea sagittalis* pode representar uma nova estratégia para tratamento de doenças neurodegenerativas, que pode retardar a progressão da Lesão espinal. Neste trabalho nos propomos a testar os efeitos do tratamento com extratos da *Pluchea sagittalis*, produto com potencial biotecnológico, sobre a degeneração da morte celular decorrente da Lesão espinal. Neste trabalho nos propomos a testar os efeitos do tratamento com o extrato etanólico da *Pluchea sagittalis*, sobre a lesão medular em ratos. Os efeitos serão caracterizados após lesão medular por hemisseção em nível torácico, seguida da avaliação comportamental (recuperação funcional motora) e da análise histológica do tecido (modificações no SNC). O trabalho será desenvolvido no Instituto de Tecnologia e Pesquisa na Universidade Tiradentes, junto ao laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural e Laboratório de Biomateriais.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessária
Local de Realização	Própria Instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Introdução bem fundamentada e com referências atuais e pertinentes.

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Objetivos claros e pertinentes

Pacientes e Métodos	Situação
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 60 - Local unit
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado

Página 1-2

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
 Prof.ª *Maria Júlia Wardell*
 Comitê de Ética no Uso Animal
 Coordenadora

Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Critérios de inclusão e exclusão	Ausentes
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Não se aplica
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os Itens de Pacientes e Métodos

A quantidade de animais utilizados no experimento justifica-se devido ao desenho elaborado. Serão 10 grupos de 6 animais divididos em dois grupos (controle e lesionados) e cada subgrupo com tratamento oral diferenciado. As lesões serão realizadas por hemisseção da medula em nível torácico, após anestesia por ketamina e xilazina. A recuperação pós cirúrgica será realizada em local adequado. Os animais após o período de recuperação e tratamento serão eutanasiados por deslocamento cervical para a realização das análises histológicas.

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	mês 1
Data de término prevista	mês 24
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Referências atualizadas e pertinentes com o tema proposto

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto visa testar o extrato de *Pluchea sagittalis* sobre a degeneração da morte celular decorrentes de lesões medulares em modelos murinos. Projeto bem fundamentado e dimensionado adequadamente para o tempo proposto no cronograma.

UNIVERSIDADE TIRODENTES - UNIT
Prof.ª Maria Júlia Mandelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

Anexo 6 – Confirmação de submissão do artigo.

O artigo foi submetido a Revista Brasileira de Medicina do Esporte (Brazilian Journal of Sports Medicine) com fator de impacto 0,445 e Qualis B1 na área interdisciplinar e com ISSN 1517-8692 e a confirmação de envio segue abaixo.

De: **Fernanda Colmatti** <suporte.aplicacao@scielo.org>
Data: 10 de março de 2014 15:43
Assunto: [RBME] Agradecimento pela Submissão
Para: Dra Edna Aragão Farias Cândido <edna_aragao1@globo.com>

Dr. (a) Dra Edna Aragão Farias Cândido,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Pluchea sagittalis* (LAM.) CABRERA, ASTERACEAE, NA LESÃO MEDULAR EM MODELO EXPERIMENTAL" para Revista Brasileira de Medicina do Esporte. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://submission.scielo.br/index.php/rbme/author/submission/131769>

Login: edna_aragao1

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Fernanda Colmatti
Revista Brasileira de Medicina do Esporte
Fernanda Colmatti / Arthur T. Assis
Atha Comunicação e Editora
Tel/Fax:55-11-5579-5308
Revista Brasileira de Medicina do Esporte
<http://submission.scielo.br/index.php/rbme>