

UNIVERSIDADE TIRADENTES
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

ANNE LEANDRA SILVA LIMA
LAIANY LIMA DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DA *Pluchea sagittalis* (Lam) CABRERA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR**

Aracaju
2020

ANNE LEANDRA SILVA LIMA
LAIANY LIMA DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DA *Pluchea sagittalis* (Lam) CABRERA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Tiradentes como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Fisioterapia.

ORIENTADORA: DRA. EDNA
ARAGÃO FARIAS CÂNDIDO

Aracaju
2020

AValiação DO EFEITO TERAPêUTICO DO EXTRATO ETANóLICO DA *Pluchea sagittalis* (Lam) CABRERA EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR

Anne Leandra Silva Lima; Laiany Lima da Cruz; Edna Aragão Farias Cândido

RESUMO

A *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (*P. sagittalis*) é uma planta medicinal encontrada na América do Sul, raramente utilizada como opção terapêutica. Alguns estudos evidenciam sua ação antinoceptiva e anti-inflamatória, e poucos estudos analisam essa ação sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). O objetivo foi avaliar o efeito terapêutico do extrato etanólico da *P. sagittalis* em modelo experimental de lesão medular. Trata-se de um estudo pré-clínico randomizado, do tipo intervencional, com abordagem analítica quantitativa. A pesquisa foi composta por 30 ratos *Wistar*, divididos em 5 grupos experimentais: grupo Lamsalina e Lesão foram tratados com salina diluída em 5% Dimetilsulfóxido (DMSO) e os tratados com o Extrato Etanólico da *P. sagittalis* (via oral), com concentração de 30% nas doses de 10, 50, 100 mg/kg⁻¹. A indução da lesão foi por hemissecção direita na medula. O teste comportamental foi realizado por meio da escala de *Basso, Beattie e Bresnahan* (BBB), em seguida realizada a eutanásia para avaliação histológica quantitativa. Esta foi realizada no *software ImageJ*. A análise estatística utilizou o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, para os dados paramétricos utilizou ANOVA (*one-way*), seguida do pós teste de *Tukey* ou *Kruskal-Wallis* com *Dunn's* para dados não paramétricos, considerando $p < 0,05$ como significativo. Em 24 horas, o grupo lesão com dose a 50 mg/kg⁻¹, nos tempos 14 e 21 dias, aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade locomotora em relação aos grupos com dose de 10 mg/kg⁻¹ e 100 mg/kg⁻¹. Quando analisado em relação à proteção neuronal, o grupo da dose a 50 mg/kg⁻¹ apresentou melhor resultado ($p < 0,05$), assim como na atividade metabólica, os grupos com dose a 10 mg/kg⁻¹ e a 50 mg/kg⁻¹ apresentaram maior atividade ($p < 0,05$) se comparados ao grupo lesão com dose a 100 mg/kg⁻¹. O extrato etanólico da *P. sagittalis* na dose de 50 mg/kg⁻¹ apresenta ação na melhora da capacidade motora e das alterações histomorfológicas.

Palavras-chave: Lesão Medular. Anti-inflamatório. Antioxidante. Fitoterapia

EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFECT OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF *Pluchea sagittalis* (Lam) CABRERA IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF SPINAL INJURY

Anne Leandra Silva Lima; Laiany Lima da Cruz; Edna Aragão Farias Cândido

ABSTRACT

Pluchea sagittalis (Lam.) Cabrera (*P. sagittalis*) is a medicinal plant found in South America, rarely used as a therapeutic option. Some studies show its antinociceptive and anti-inflammatory action, and few studies analyze this action on the Central Nervous System (CNS). The objective was to evaluate the therapeutic effect of the ethanolic extract of *P. sagittalis* in an experimental model of spinal cord injury. This is a randomized, pre-clinical, interventional study with a quantitative analytical approach. The research consisted of 30 Wistar rats, divided into 5 experimental groups: Sham and Lesion group were treated with saline diluted in 5% Dimethylsulfoxide (DMSO) and those treated with *P. sagittalis* Ethanol Extract (orally), with concentration of 30% at doses of 10, 50, 100 mg / kg⁻¹. The lesion was induced by right hemisection in the spinal cord. The behavioral test was performed using the *Basso, Beattie and Bresnahan* (BBB) scale, followed by euthanasia for quantitative histological evaluation. This was done using the *ImageJ software*. The statistical analysis used the *Shapiro-Wilk* normality test, for parametric data used ANOVA (*one-way*), followed by the *Tukey* or *Kruskal-Wallis* post test with *Dunn's* for nonparametric data, considering $p < 0.05$ as significant. In 24 hours, the injury group with a dose of 50 mg/kg⁻¹, at times 14 and 21 days, significantly increased ($p < 0.05$) locomotor activity compared to groups with a dose of 10 mg/kg⁻¹ and 100 mg/kg⁻¹. When analyzed in relation to neuronal protection, the 50 mg/kg⁻¹ dose group showed the best result ($p < 0.05$), as well as in metabolic activity, the 10 mg / kg⁻¹ and 50 dose groups mg/kg⁻¹ showed greater activity ($p < 0.05$) when compared to the injury group with a dose of 100 mg/kg⁻¹. The ethanolic extract of *P. sagittalis* at a dose of 50 mg/kg⁻¹ has an action in improving motor capacity and histomorphological changes.

Keywords: Spinal cord injury. Anti-inflammatory. Antioxidant. Phytotherapy

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular (LM) é um trauma que pode resultar em compressão, lesão ou laceração da medula espinhal (NUNES; MORAIS; FERREIRA, 2017). Quanto ao tipo, caracteriza-se como atraumática, traumática ou congênita. A lesão traumática é proveniente de traumas diretos na medula, como ferimento por armas e acidentes automobilísticos, que podem gerar perda de alguns graus sensitivos e motores, e resulta em implicação clínica (FEHLINGS *et al.*, 2014; ONI-ORISAN *et al.*, 2016; DAVID *et al.*, 2019).

A fisiopatologia da LM traumática na sua fase primária, e em sua forma aguda, é chamada de choque medular. O comprometimento das funções neurológicas é abaixo do nível da lesão. Na fase secundária, ocorrem acúmulos de radicais livres e glutamato, peroxidação lipídica, migração de células inflamatórias e conseqüentemente produção de mediadores dessa inflamação, que causam danos teciduais (LIU *et al.*, 2006; ALIZADEH *et al.*, 2019; HIGUCHI *et al.*, 2019).

Assim como na LM, os processos patológicos, em geral, têm como consequência uma resposta inflamatória, sendo necessária a utilização de alguns fármacos em seu tratamento. Entre os possíveis alvos de pesquisa estão os fitofármacos e os fitoterápicos. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% das pessoas em todos os países são dependentes das plantas para complementar suas necessidades medicinais (SIMÕES, *et al.*, 2007; WHO, 2019).

Vários estudos confirmam a ação anti-inflamatória e antinoceptiva de plantas medicinais. Ademais, pesquisas que utilizam extratos de plantas são de suma importância para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos como terapia complementar. Nesse sentido, o extrato etanólico da *P. sagittalis* tem sido alvo de estudos científicos para observar seus efeitos, uma vez que são relatadas suas ações terapêuticas (STEFFANI, 2003).

A *P. sagittalis* é uma planta medicinal encontrada na América do Sul, a qual é utilizada em forma de chá de suas folhas ou talos. Os compostos encontrados em suas partes são: 1,8 cineol-eucaliptol, copaeno, β - cariofileno, α - silenonafitaleno, nafitalenol e fito. Estes possuem ação farmacológica na inibição da degradação de corticóides e atividade corticomimética, que interfere no metabolismo de mediadores inflamatórios (SOUZA, 2004; SILVA *et al.*, 2017).

Segundo Souza *et al.* (2004), o extrato etanólico *P. sagittalis* é utilizado como opção terapêutica ou complementar contra doenças no aparelho digestivo e inflamações. Outros efeitos farmacológicos da *P. sagittalis* são sua ação ansiolítica (RODRIGUES, 2011), anti-inflamatória, antioxidante (PÉREZ-GARCÍA, 1996), antinoceptiva (BARROS *et al.*, 2006), analgésica e depressora central (RODRIGUES, 2007).

O presente trabalho tem como justificativa esclarecer a relação dos efeitos do extrato etanólico da *P. sagittalis* na lesão medular em ratos, uma vez que há escassez em estudos que permitam a relação entre eles. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito terapêutico do extrato etanólico da *P. sagittalis* em modelo experimental de lesão medular.

2 METODOLOGIA

2.1 DESENHO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo pré-clínico randomizado, do tipo intervencional com abordagem analítica quantitativa.

OS PROCEDIMENTOS RELATADOS ABAIXO FORAM REALIZADOS NA DISSERTAÇÃO CONCLUÍDA POR SANTOS (2014).

O estudo realizado por Santos (2014) foi iniciado no Laboratório de Estudos Biológicos e Produtos Naturais (LBPN), mesmo grupo em que integram os discentes do presente trabalho.

2.2 MATERIAL BOTÂNICO

A espécime de *P. sagittalis* foi coletada no Bairro Japãozinho, na Região metropolitana de Aracaju, estado de Sergipe. Após a coleta e exsicata, foi realizada a identificação e confirmação dessa espécime pelo herbário da Universidade Federal de Sergipe (UFS), em registros de nº 02829 de 17/11/1982 e nº 03048 de 01/11/1988.

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*. Além disso, o extrato foi rotaevaporado para obtenção da amostra seca (RODRIGUES, 2011).

Na análise cromatográfica gasosa, os compostos químicos encontrados no óleo essencial da *P. sagittalis* extraído das folhas e caule, acoplada a espectrometria de massa 1,8 cineol-eucaliptol, copaeno, β - cariofileno, α -silenonafitaleno, nafitalenol, fitol, todos tratados nas diferentes concentrações de 50 a 12,5% Concentração Inibitória Mínima (MIC). Foram utilizadas, no mesmo estudo, doses de 1 e 2 g/kg⁻¹ do extrato etanólico (RODRIGUES, 2011).

2.3 ENSAIO BIOLÓGICO

2.3.1 Comitê de Ética no Uso de Animais

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes, Aracaju/SE, e aprovado sob protocolo nº

010912 (ANEXO). A amostra foi composta por 30 ratos da raça *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* machos, com massa corporal de 250-300g, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado com controle de temperatura, com ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso a água e a comida.

2.3.2 Grupos Experimentais

A amostra foi composta por 30 ratos, divididos em 5 grupos (n=6) experimentais e assim definidos:

- Grupo Lamsalina: tratados com Dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% (salina);
- Grupo Lesão: tratados com Dimetilsulfóxido DMSO a 5% (salina);
- Grupo Lesão: tratados com Extrato Etanólico da *P. sagittalis* (EEPS) na dose 10 mg/kg⁻¹;
- Grupo Lesão: tratados com Extrato Etanólico da *P. sagittalis* (EEPS) na dose 50 mg/kg⁻¹;
- Grupo Lesão: tratados com Extrato Etanólico da *P. sagittalis* (EEPS) na dose 100 mg/kg⁻¹.

2.3.3 Indução da Lesão

Os animais foram pesados e foram administrados cloridrato de ketamina (100 mg/kg⁻¹), relaxante muscular, e cloridrato de xilazina (14 mg/kg⁻¹), anestésico, via intraperitoneal (i.p). Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral, e realizada a tricotomia na região dorsal torácica. Posteriormente, foram identificadas por meio da palpação do último par das costelas flutuantes e seguiu-se em direção aos processos espinhosos de T12, contou-se de forma decrescente até as apófises espinhosas das vértebras T8 – T10 e nessa região foi realizada uma incisão de aproximadamente 5cm. Ao ser exposto, o processo espinhoso da

vértebra T10 foi retirado com caneta de alta rotação com broca. Foi realizada a exposição e hemiseção a direita da medula espinhal, com o auxílio do bisturi.

Logo após, foi realizada sutura com fio 3.0 de poliamida monofilamento absorvível e, ao final da cirurgia, foi aplicada injeção intramuscular de pentabiótico (Forte Dodge Saúde Animal LTDA, 0,5 mL) via intramuscular e foram colocados em um ambiente aquecido por uma lâmpada de 60 W até a recuperação da anestesia. O analgésico buprenorfina (0,01 mg/kg⁻¹, s.c) foi administrado por dois dias a cada 12 horas (SCHAAL *et al.*, 2012).

2.3.4 Tratamento

Os animais foram submetidos aos respectivos tratamentos após a lesão durante 21 dias subsequentes.

Para os animais tratados com o extrato etanólico da *P. sagittalis*, foi utilizada a concentração de 30% nas doses de 10, 50, 100 mg/kg⁻¹, já os animais dos grupos Lamsalina e Lesão foram tratados com salina diluída em 5% Dimetilsulfóxido (DMSO). Os tratamentos foram administrados por gavagem (via oral) com a seringa ideal para o procedimento utilizando 1 mL por dose.

2.4 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

A avaliação comportamental foi realizada antes do procedimento cirúrgico e no 1º; 7º; 14º e 21º dia pós operatório (D.P.O).

2.3.1 Avaliação da capacidade locomotora

Avaliação da capacidade locomotora pós-lesão medular: a escala de *Basso, Beattie e Bresnahan* (BBB) foi desenvolvida e validada para avaliar a capacidade locomotora após lesão medular. Possui como vantagens: a facilidade de execução, ausência de ambiguidades dos termos e observação da função

motora do animal, desde a paralisia completa à movimentação normal. Para tanto, o animal foi colocado em uma arena de campo aberto durante 4 minutos, e foi avaliado por mais de um examinador. No caso de discordância de resultados, foi adotado o menor escore (SANTOS *et al.*, 2011). O teste apresenta escores que variam de 0 a 21, para quantificação da recuperação motora após LM (MOLINA *et al.*, 2015).

Os itens avaliados foram: os movimentos das patas, sua coordenação, firmeza e comportamento do tronco. Já seus subitens foram: movimento do membro posterior, posição do tronco, abdome, posição da pata, caminhada, posição predominante da pata, instabilidade do corpo e rabo (BASSO *et al.*, 1995).

2.5 EUTANÁSIA

Após o teste comportamental no 21^o dia os animais foram levados para eutanásia em câmara de dióxido de carbono (CO₂) e, posteriormente, foi colhido o material histológico da medula para análise.

2.6 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

A medula foi posta no formol a 10% para a fixação e melhor subsequência do processamento e, em seguida, foi fixada na parafina para os cortes histológicos. Desparafinar com xilóis I, II e III; desidratar com os álcoois (absoluto, 95%, 80% e 70%); água para reidratar.

Foi utilizada a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), para a visualização do núcleo e citoplasma, respectivamente, das células neuronais Hematoxilina, Eosina e, para a finalização, retorna para os banhos nos álcoois e xilóis; por fim, a montagem da lâmina (VIOTTI *et al.*, 1995).

PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS RECENTEMENTE REALIZADOS

2.7 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS IMAGENS

As imagens foram capturadas das lâminas por meio de uma câmera fotográfica *Olympus C-7070*, com aumento de 10X e/ou 40X acoplada a microscópio *Olympus CX3*. Posteriormente, as imagens foram transferidas para o microcomputador.

O primeiro uso dessas imagens foi na demarcação de perímetro da área das estruturas histológicas para contagem de neurônios. A realizada da marcação foi em μm^2 pelo software *AxioVision*.

No software *ImageJ* e as imagens foram quantificadas com padronização *Threshold Colour*, passaram por macros que dependem do campo de visualização previamente uniformizadas. Foi feita a marcação da imagem e quantificou-se o número de neurônios vivos, mediante a diferenciação das estruturas presentes no tecido de acordo com a coloração utilizada. Também foi realizada análise por intensidade da cor cinza na escala preto e branco com o valor da média de *pixels*, que variam do 0% (cinza escuro) e o valor próximo a 255% (cinza claro), denominado densidade integrada. Por meio da contagem de partículas por *background*, as células neuronais foram contadas em um tamanho de 20 μm até infinito, na área do local de lesão medular, uniformizada para os grupos (CALVI *et al.*, 2011).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizar as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism 6.01*, e utilizou-se o teste *Shapiro-Wilk* para normalizar os dados. Após o teste de normalidade, foi utilizado ANOVA (*One-way*) com o pós-teste *Tukey* para os dados paramétricos ou *Kruskal-Wallis* com o pós-teste *Dunn's* para os dados não paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente

significativos.

3 RESULTADO

Para avaliar as alterações referentes às perdas motoras induzidas pela lesão medular, foram utilizados tratamentos com três doses diferentes do EEPS: 10 mg/kg⁻¹, 50 mg/kg⁻¹ e 100 mg/kg⁻¹. Após 21 dias de tratamento foram avaliados: capacidade locomotora, número de neurônios vivos e densidade integrada de atividade neuronal.

Na avaliação BBB entre grupos nos tempos 24 horas, 7, 14 e 21 dias (Figura 1), foi possível observar melhora da atividade locomotora de forma significativa ($p < 0,05$) do score do BBB do grupo Lamsalina nos dias 7, 14, 21 em comparação a 24 horas. No grupo Lesão, a função motora melhorou em 14 e 21 dias em relação a 24 horas de forma significativa ($p < 0,05$). No grupo EEPS 10 mg/kg⁻¹, aumentou significativamente ($p < 0,05$) a locomoção em 21 dias em comparação a 24 horas. No grupo EEPS 50 mg/kg⁻¹, nos tempos 14 e 21 dias aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade locomotora em relação a 24 horas. Enquanto isso, no grupo EEPS 100 mg/kg⁻¹, houve melhora da função motora em 21 dias quando comparado a 24 horas ($p < 0,05$). Desse modo, percebe-se que o grupo EEPS 50 mg/kg⁻¹ apresenta melhor dose na avaliação deste parâmetro.

As figuras das análises histológicas representam o tecido medular dos grupos Lamsalina, Lesão, e tratados EEPS 10, 50 e 100 mg/kg⁻¹. É possível observar na imagem 1a do grupo Lamsalina a preservação das células neuronais quando comparada com a imagem 1b do grupo Lesão. O grupo tratado com EEPS 50 mg/kg⁻¹, representado na imagem 1d, apresentou maior preservação neuronal em comparação aos demais grupos tratados.

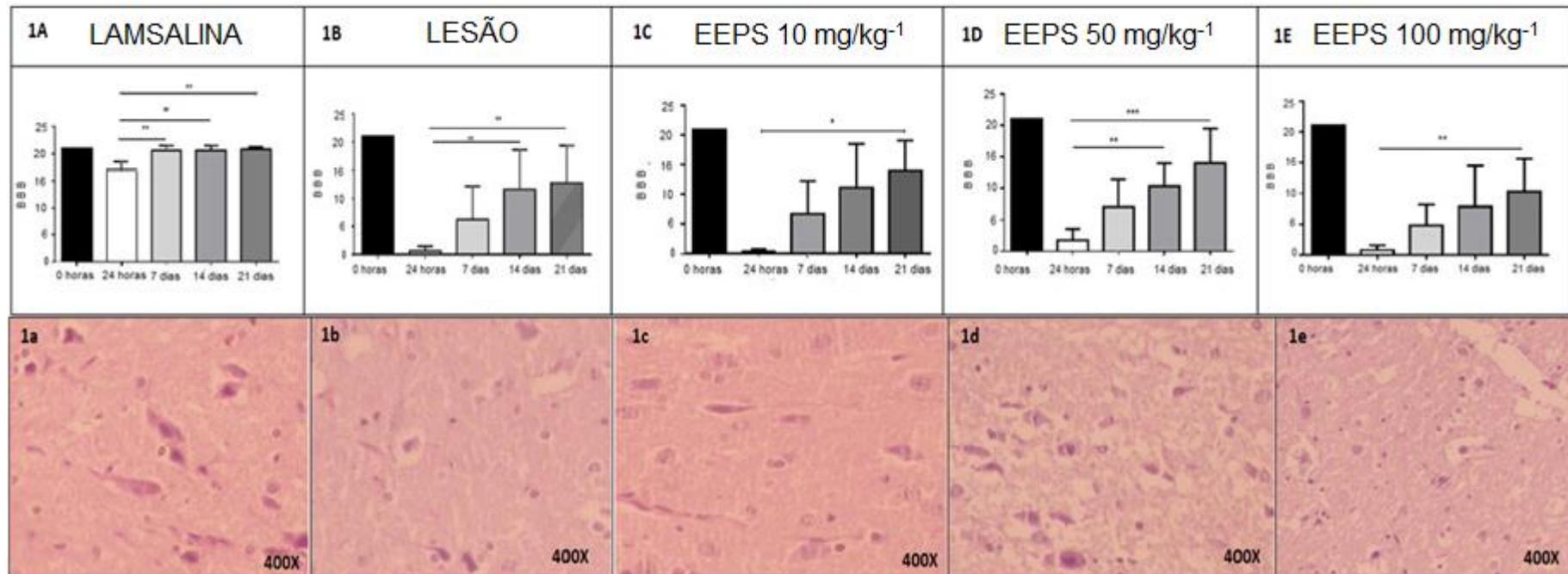


Figura 1: Análise da atividade locomotora após lesão medular, por meio da escala *Basso Beattie e Bresnahan* (BBB). A linha superior representa as médias dos escores referentes à locomoção após 21 dias tratamento com Extrato Etanólico da *P. sagittalis*. A linha inferior apresenta as imagens da medula em corte transversais (400X) correspondentes nos grupos Lamsalina (Figuras 1A e 1a), Lesão (Figuras 1B e 1b), e nas doses de 10 mg/kg⁻¹ (Figuras 1C e 1c), 50 mg/kg⁻¹ (Figuras 1D e 1d) e 100 mg/kg⁻¹ (Figuras 1E e 1e). Legenda: Lamsalina: Laminectomia Salina; EEPS: Extrato Etanólico da *P. sagittalis*. Teste Anova *One-Way* com pós teste *Tukey*, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Na figura 2, observa-se que os grupos Lesão ($73,00 \pm 28,93$), EEPS 100 mg/kg^{-1} ($90,73 \pm 40,20$) e EEPS 10 mg/kg^{-1} ($69,53 \pm 24,72$) apresentaram redução significativa do número de neurônios motores em relação ao grupo Lamsalina ($134,70 \pm 73,71$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$, respectivamente). Entretanto, o grupo EEPS 50 mg/kg^{-1} ($111,0 \pm 53,86$) encontra-se semelhante ao grupo Lamsalina. Isso demonstra, portanto, que a dose intermediária possivelmente apresentou melhor resultado de proteção neuronal em relação aos demais grupos lesionados.

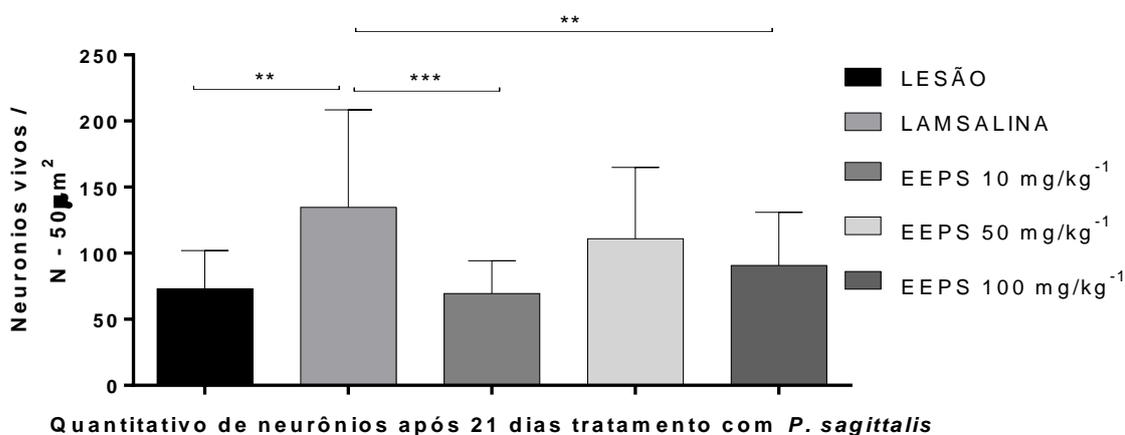


Figura 2: Análise da contagem de neurônios após 21 dias de tratamento com Extrato Etanólico da *P. sagittalis* nas doses de 10 mg/kg^{-1} , 50 mg/kg^{-1} e 100 mg/kg^{-1} . Legenda: LAMSALINA: Laminectomia Salina; EEPS: Extrato Etanólico da *P. sagittalis*. Teste Anova *One- Way* com pós teste *Tukey*, onde $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

Na figura 3, observa-se que os grupos Lamsalina ($3,570e+006 \pm 98024$); EEPS 10 mg/kg^{-1} ($3,000e + 006 \pm 195711$); EEPS 50 mg/kg^{-1} ($3,000e + 006 \pm 158202$) reduziram significativamente o parâmetro da densidade integrada e evidenciaram maior atividade metabólica quando comparados com o grupo Lesão ($4,450e + 006 \pm 381252$; $***p < 0,001$), uma vez que esse apresenta-se com menor atividade metabólica, menor coloração em hematoxilina e conseqüentemente maior escala de cinza claro. Os grupos EEPS 10 mg/kg^{-1} ($3,000e + 006 \pm 195711$) e EEPS 50 mg/Kg^{-1} ($3,000e+006 \pm 158202$), respectivamente, ($*p < 0,05$ e $**p < 0,01$)

apresentaram melhor atividade metabólica quando comparados ao grupo EEPS 100 mg/kg⁻¹ (3,690e + 006±129858).

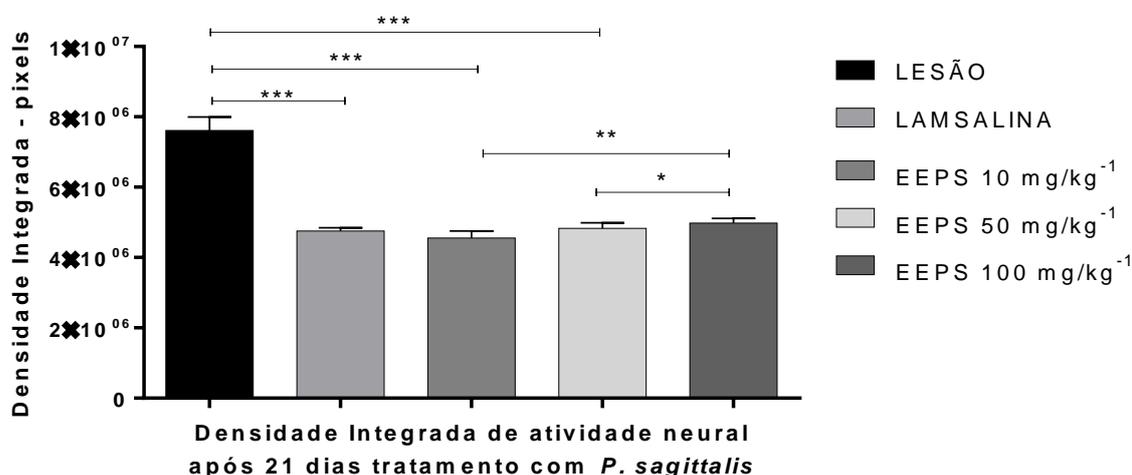


Figura 3: Análise da densidade integrada em relação a atividade neuronal após 21 dias de tratamento com Extrato Etanólico da *P. sagittalis*, nas doses de 10 mg/kg⁻¹, 50 mg/kg⁻¹ e 100 mg/kg⁻¹. Legenda: Lamsalina: Laminectomia Salina; EEPS: Extrato Etanólico da *P. sagittalis*. *Kruskall-Wallis* com pós teste *Dunn's*, onde **p*<0,05; ***p*<0,01 e ****p*<0,001.

4 DISCUSSÃO

A lesão medular causa danos estruturais no tecido neuronal, que causam alterações parciais ou totais nas vias de condução sensório-motoras (WANG *et al.*, 2018). Além disso, provoca comprometimentos na inibição de impulsos nervosos ao aparelho músculo-esquelético em relação ao movimento e, ainda, ocasiona disfunções na capacidade locomotora (YIN *et al.*, 2019).

Em estudos experimentais de lesão medular, Arvanian *et al.* (2009) e Dias *et al.* (2018) afirmam que, lesões em nível medular torácico geram declínio significativo na atividade das vias motoras, associado à desmielinização de axônios e degeneração neuronal. Em consequência, há perda do potencial de regeneração

dos neurônios motores, que promove redução da função motora e desempenho em teste comportamental.

Segundo Rodrigues *et al.* (2012), dois dias após lesão medular o teste comportamental BBB apresenta baixa pontuação, o que significa que houve redução do desempenho da capacidade locomotora. Este dado assemelha-se ao presente estudo, posto que foi observado déficit locomotor em 24 horas após lesão medular.

De acordo com Jia *et al.* (2015), após 7 e 14 dias de lesão medular, na escala BBB, houve redução da função motora das patas traseiras. No atual estudo, foram observados resultados semelhantes no grupo Lesão. Em contrapartida, após 14 dias, o grupo tratado com EEPS 50 mg/kg⁻¹ apresentou recuperação funcional. Esse efeito parece ocorrer devido ao mecanismo de ação anti-inflamatória e antioxidante da *P. sagittalis* em amenizar os danos causados pelos radicais livres (SILVA *et al.*, 2017), que podem desempenhar melhora funcional após lesão medular.

Conforme os resultados, após 21 dias, os grupos tratados com EEPS 10 mg/kg⁻¹, 50 mg/kg⁻¹ e 100 mg/kg⁻¹ apresentaram melhores habilidades locomotoras dos membros posteriores. Estas doses se mostraram eficazes com maior tempo de tratamento; e segundo Rodrigues *et al.* (2011) é possível que tenha havido melhora neuroprotetora a nível do SNC nas doses 1 e 2 g/kg. Consoante ao estudo de Bouchard *et al.* (2015), após 21 dias de lesão medular, o grupo Lesão apresentou limitações importantes do desempenho locomotor, dado que se relaciona ao presente estudo com o mesmo período de lesão.

No estudo de Zheng *et al.* (2019), o composto 1,8 cineol apresenta efeitos anti-inflamatório, antioxidante e ação na dor neuropática central e periférica. O mesmo composto é encontrado no extrato etanólico da *P. sagittalis*, e parece apresentar os mesmos efeitos, de forma significativa, após lesão medular.

Em estudo experimental de Espírito Santo *et al.* (2019), os animais do grupo Lamsalina apresentaram medula espinhal preservada, sem prejuízo locomotor nos períodos de 7, 14, 21 dias, como esperado, enquanto no grupo Lesão houve perdas motoras consideráveis. No mais, observa-se que ao 7° e 14° dias, no período do processo de recuperação, houve melhoras simultâneas, mas ainda com baixa eficácia motora, da mesma forma que no presente estudo.

No experimento de Abdanipour *et al.* (2018), evidencia-se que os animais do grupo Lesão apresentaram grandes números de neurônios apoptóticos, degeneração neuronal, que reduz o quantitativo de neurônios motores vivos. No presente estudo, isso também é evidenciado no grupo lesão. Em contraste, observa-se que há pouca morte neuronal no grupo tratado EEPS 50 mg/kg⁻¹.

Segundo Liu *et al.* (2011), as alterações patológicas decorrentes da LM a nível celular podem induzir a apoptose excessiva de neurônios e oligodendrócitos, ocorrendo degeneração neuronal. Quando progressiva, afeta diretamente a excitação dos impulsos nervosos devido à ativação excessiva dos receptores de glutamato no local da lesão, aumentando as disfunções neurológicas que podem repercutir em disfunções motoras ao nível da lesão. Outrossim, Dumont *et al.* (2019) afirmam que, quando esse processo ativo que ocorre a nível molecular e celular pode ser reversível e modificável, há restauração da função neuronal com os neurônios que ainda estão presentes, resultando na melhora da capacidade locomotora.

Segundo Duan *et al.* (2019), após seis semanas de lesão medular, a quantidade de neurônio está relacionada à extensão e ao tamanho da lesão para recuperação funcional. O grupo Lesão reduziu a quantidade de neurônios, assim como no presente estudo com 21 dias pós-cirúrgico, que também reduziu a quantidade de neurônios.

Ademais, de acordo com Xu *et al.* (2016), após 28 dias de lesão medular, na transição entre a fase subaguda e crônica, houve redução da quantidade de neurônio motor. Os efeitos apresentados pelos grupos tratados em fase subaguda após 21 dias de lesão, nas doses de EEPS 10 mg/kg⁻¹ e 100 mg/kg⁻¹, parecem assemelhar-se com o estudo supracitado, que apresenta perdas em números de neurônios. Em contraste, o grupo Lamsalina se apresenta sem alterações morfológicas, com preservação na sua quantidade de neurônio. O grupo EEPS 50 mg/kg⁻¹ parece se comportar da mesma forma que o grupo Lamsalina, de modo que essa condição pode ter influência na proteção neuronal em relação aos demais grupos tratados.

Segundo Jia *et al.* (2015), a falta de fluxo sanguíneo afeta o metabolismo celular da densidade integrada. Esse metabolismo influencia os mecanismos das atividades celulares para mantê-las em funcionamento. Abraham e Brewer (2001) afirmam que a densidade integrada do tecido medular pós-lesão apresenta características de intensidade de cor na escala de cinza mais próxima ao branco. Mediante isso, há uma redução na atividade das células neuronais. Da mesma forma, o grupo Lesão do presente estudo apresentou aumento da densidade integrada, que torna o desempenho da sua atividade comprometedor.

Em contrapartida, o grupo Lamsalina apresenta redução da densidade integrada, portanto, a sua intensidade de cor está mais próxima de cinza mais escuro (mais perto do zero) e a atividade de suas células, conservada. Em conformidade, os grupos tratados com EEPS 10 mg/kg⁻¹, 50 mg/kg⁻¹ e 100 mg/kg⁻¹ também obtiveram redução da atividade metabólica (com pixels de cinza mais claro) e parece que a *P. sagittalis* pode apresentar um papel neuroprotetor na atividade metabólica, se considerarmos as habilidades expressadas no estudo pré-clínico.

5 CONCLUSÃO

Dado o andamento do presente trabalho, conclui-se que o extrato etanólico *P. sagittalis* melhora a capacidade motora e as alterações histomorfológicas por suas ações anti-inflamatória e antioxidante. E parecem atuar diretamente potencializando a neuroproteção na lesão, destacando-se a dose intermediária de EEPS 50 mg/kg⁻¹ com melhor eficácia. Diante dos resultados, faz-se necessário que sejam realizados mais estudos a fim de elucidar os efeitos em nível SNC.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, K.E.; BREWER, K.E. Expression of c-fos mRNA is increased and related to dynorphin mRNA expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Neuroscience Letters*, v.307, p.187-191, 2001.

ALIZADEH, A.; DYCK, S. M.; KARIMI-ABDOLREZAEI, S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in neurology*, v.10, p.1-76, 2019.

ARVANIAN, V. L.; SCHNELL, L.; LOU, L.; GOLSHANI, R.; HUNANYAN, A.; GHOSH, A. et al. Chronic spinal hemisection in rats induces a progressive decline in transmission in uninjured fibers to motoneurons. *Experimental Neurology*, v. 216, p. 471-80, 2009.

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

BARROS, I.M.C., Lopes, L.D.G., Borges, M.O.R., Borges, A.C.R., Ribeiro, M.N.S., Freire, S.M.F. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Pluchea quitoc* (DC.) ethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.106, p.317-320, 2006.

BOUCHARD, S.M.; PETERS, K.; WOLLER, S.A.; MADAHIAN, B.; FAGHIHI, U.; PATEL, S. et al. Inflammation is increased with anxiety- and depression-like signs in a rat model of spinal cord injury. *Brain Behavior and Immunity*, v.51, p.176-195, 2016.

DUAN, F.X.; SHI, Y.J.; CHEN, J.; DING, S.Q.; WANG, F.C.; TANG, J. et al. Neuroprotective effects of P7C3 against spinal cord injury in rats. *Experimental Biology and Medicine*, v. 1, p. 1-8, 2019.

DUMONT, C.M.; CARLSON, M.A.; MUNSELL, M.K.; CICIRIELLO, A.J.; STRNADOVA, K.; PARK,J., et al. Aligned hydrogel tubes guide regeneration following spinal cord injury. *Acta Biomaterialia*, v. 86, p. 312-322, 2019.

ECKERT, M.J.; MARTIN, M.J. Trauma: Spinal Cord Injury. *Surgical the clinics*, v. 97, p.1031-1045, 2017.

ESPÍRITO SANTO, C.C.; FIORIN, F.S.; ILHA, J.; DUART. M.M.F.; DUART,T.; SANTOS, A.R.S. Spinal cord injury by clip-compression induces anxiety and depression-like behaviours in female rats: The role of the inflammatory response. *Brain Behavior and Immunity*, v. 78, p.91-104, 2019

FIGUEREDO, S.M.; NASCIMENTO, F.P.; FREITAS, C.S.; BAGIO, C.H.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G. et al. Antinociceptive and gastroprotective actions of ethanolic extract from *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. *Journal of Ethnopharmacology*, v.135, p.603-609, 2011.

JIA, Y-F.; GAO, H-L.; MA, L-J.; LI, J. Effect of nimodipine on rat spinal cord injury. *Journal Genetics and Molecular Research*, v. 14, p. 1269-1276, 2015.

KANG, Y.; DING, H.; ZHOU, H.X.; WEI, Z.; LIU, L.; PAN, D. et al. Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. *Journal of Neurorestoratology*, v.6, p.1-9, 2018.

LACAILLE-DUBOIS, M.A. et al. A review of the biological and pharmacological. *Activities of Saponins Phytomedicine*, v. 2, n. 4, p. 363-386,1996.

LIU, C.; SHI, Z.; FAN, L.; ZHANG, C.; WANG, K.; WANG,B. Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury. *Brain Research*, v.1374, p. 100-109, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular. *Secretaria de Atenção à Saúde – Departamento de Ações Programáticas Estratégicas*. 1ª edição, Brasília – DF. 2013.

MOLINA, A.E.I.S.; CRISTANTE, A.F.; FILHO, T.E.P.B.; MOLINA, M.S.; MOLINA, T.P.. A Computerized system for the application of basso, beam and bresnahan scale in wistar rats. *Acta Ortopédica Brasileira*, v.23, p.179-183, 2015.

PÉREZ-GARCÍA, F.M.S.; CANIGUERAL, S.A.T. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis* involvement of an antioxidant mechanism. *Life Sciences*, v.59, p.2003-2040, 1996.

RODRIGUES, L.P.; IGLESIAS, D.; NICOLA, F.C.; STEFFENS, D.; VALENTI, L.; WITCZAK, A., et al. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. *Journal of Medical and Biological Research*, v. 45, p. 49-57, 2012.

RODRIGUES, S.A. Efeito ansiolítico do extrato etanólico de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, asteraceae, em modelos comportamentais. Tese Universidade Federal de Sergipe, 2011.

RODRIGUES, S.A. Efeitos sobre o sistema nervosa central do extrato aquoso obtido das folhas de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (*quitoco*). Dissertação Universidade Federal de Sergipe, 2007.

ROSSATO, L.V.; NICOLOSO, F.T.; FARIAS, J.G.; CARGNELLUTI, D.; TABALDI, L.A.; GOLDSCHMIDT, F. et al. Effects of lead on the growth, lead accumulation and physiological responses of *Pluchea sagittalis*. *Ecotoxicology*, v.21, p. 111-123, 2012.

SANTOS, G.B.; CRISTANTE, A.F.; MARCON, R.M.; SOUZA, F.I.; FILHO, T.E.P.B.; DAMASCENO, M.L. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. *Acta Ortopédica Brasileira*, v.19, p.87-91, 2011.

SCHAAL, S.M.; GARG, M.S.; GHOSH, M.; LOVERA, L.; LOPEZ, M.; PATEL, M. The therapeutic profile of rolipram, PDE target and mechanism of action as a neuroprotectant following spinal cord injury. *Therapeutic Profile of Rolipram after*. v.7, p. 1-22, 2012.

SILVA, F. A. N.; FREIRE, S.M.F.; BORGES, M.O.R.; BARROS, F.E.V.; SOUZA, M.; RIBEIRO, M.N.S., et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Triterpenes from *Pluchea quitoc DC. Aerial Parts*. *Pharmacognosy Reasearch*, v.1, n. 9, p. 1-4, 2017.

TOMÉ, V.D.N. Variables clínicas asociadas a Adaptabilidad y Cohesión familiar en pacientes con lesión medular. *Revista Interacciones*. v.6, p.1-6, 2020.

VIOTTI, N.M.A 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.

WANG, C.; WANG, Q.; LOU, Y.; XU, J.; FENG, Z.; CHEN, Y., et al. Salidroside attenuates neuroinflammation and improves functional recovery after spinal cord injury through microglia polarization regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 22, p. 1148-1166, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO Global Report on Traditional and Complementary Medicine 2019. World Health Organization; (2019).

XU,C.; SHI,D.; ZHI, Z.; AO, R.; YU, B. Melatonin ameliorates spinal cord injury by suppressing the activation of inflammasomes in rats. *Journal of cellular Biochemistry*, v. 120, p. 5183-5192, 2018.

YIN, J.; YIN,Z.; WANG.; ZHU,C.; LIU,X.; GONG,G. Angiotensin-1 Protects Spinal Cord Ischemia and Reperfusion Injury by Inhibiting Autophagy in Rats. *Neurochemical Research*, v.44, p. 2746-2754, 2019.

ANEXOS

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 necessita |
| 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 | |
|-------------------------------|---------------------|
| Delineamento | Adequado |
| Tamanho de amostra | Total 60 Local unit |
| Cálculo do tamanho da amostra | Adequado |

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
 Prof.ª Maria Júlia Wardelli
 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 TRADENTES - UNIT

Prof.ª Maria Júlia Wardelli

Comitê de Ética no Uso Animal

Coordenadora