



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

KELLY CORREA LIMA

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE
CIPÓ-PUCÁ (*Cissus verticillata*) APÓS LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL DE
RATOS ADULTOS**

BELÉM-PA

2019

KELLY CORREA LIMA

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE
CIPÓ-PUCÁ (*Cissus verticillata*) APÓS LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL DE
RATOS ADULTOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Co orientadora: Prof. Dra. Edna Cristina Santos Franco

BELÉM-PA

2019

KELLY CORREA LIMA

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE CIPÓ-PUCÁ (*Cissus verticillata*) APÓS LESÃO AGUDA DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS ADULTOS

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

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Co orientadora: Prof. Dra. Edna Cristina Santos Franco

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal (ICB/UFPA) - Orientador

Profa. Dra. Soraia Valeria de Oliveira Coelho Lameirão (IEMCI - UFPA) - Examinadora

Profa. Dra. Celice Cordeiro de Souza (CESUPA) – Examinadora

Profa. Dra. Rosana Telma Lopes Afonso (CESUPA) – Suplente

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732e

Lima, Kelly Correa.

Efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato de cipó-pucá (*Cissus verticillata*) após lesão aguda da medula espinhal de ratos adultos / Kelly Correa Lima, . — 2019.

53 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Coorientação: Prof^ª. Dra. Edna Cristina Santos Franco

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Medula espinhal - Ferimentos e lesões - Tratamento. 2. *Cissus* - Uso terapêutico. 3. Neuroproteção. 4. Plantas medicinais - Amazônia - Uso terapêutico. I. Título.

CDD 617.482

A DEUS por me dar força!

Certamente, enquanto tiver **Deus** na minha vida sei que nada me faltará e não haverá dificuldade impossível de superar!

Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei. (Salmos 91:2).

Aos meus pais, **Wanda Maria Munier Correa** e **Juvenal Ferreira Lima Neto** por me incentivar e apoiar na busca dos meus sonhos. Todos os dias penso como retribuir tudo o que fizeram por mim. Mãe, pai, vocês são tudo pra mim!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisas, sua generosidade, paciência e afeição as quais sempre fez questão de transmitir aos seus orientandos.

Minha co-orientadora, Prof. Dr. Edna Cristina Santos Franco, que participou diretamente da execução desse projeto, fazendo pontuações e ponderações importantes sobre os métodos e resultados deste trabalho. Foi um presente de Deus em minha vida, além de uma amiga para a vida, conte comigo. Tenho muito a lhe agradecer, tentarei retribuir no mesmo nível.

Ao Prof. Dr. Manoel Filho agradeço por ter me mostrado que haveriam muitas pedras no caminho, me fez perceber a ciência em minha vida, por sua amizade, atenção, me ensinou que deveria seguir sempre com honestidade, sabedoria e responsabilidade.

Ao Prof. MSc. Ijair Santos pelo apoio, seu coração de ouro, momentos de descontração, pela amizade, por ter me guiado nos momentos de dificuldade. Muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE): Michelle Nerissa, Paulo Rodrigo, Jonabeto, Carol Ramos, Iury, Karla, Nayara, e os demais que possivelmente eu não tenha citado.

Ao seu Reginaldo, ao sr. Amarildo e seu Sérgio pelo apoio que foi essencial.

Ao Silvio Veras, por seu amor, cuidado e paciência em todos os momentos.

Serei eternamente grata. Obrigada!

“A grandeza vem não quando as coisas sempre vão bem para você, mas a grandeza vem quando você é realmente testado, quando você sofre alguns golpes, algumas decepções, quando a tristeza chega. Porque apenas se você esteve nos mais profundos vales você poderá um dia saber o quão magnífico é se estar no topo da mais alta montanha”.

(Richard Nixon)

RESUMO

A lesão aguda da medula espinhal (LAME) é uma grave condição patológica que acomete vários indivíduos em diversas regiões do mundo e que pode causar sequelas físicas e/ou psicológicas. O tratamento disponível é ineficaz, o que demanda o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. O desenvolvimento de agentes neuroprotetores é de fundamental importância para a preservação tecidual após LAME. Na Amazônia, há uma diversidade de plantas medicinais cujos potenciais efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores não foram investigados. Embora o cipó-pucá (*Cissus verticillata*) seja popularmente empregado para o tratamento de sequelas de acidente vascular encefálico, seus efeitos foram pouco investigados. Neste estudo, investigou-se os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato supercrítico de cipó-pucá em um modelo experimental de LAME em ratos adultos. O extrato de folhas de cipó-pucá foi obtido através de extração com fluido supercrítico. Os animais foram submetidos a cirurgia de secção da medula espinhal (ME) a nível torácico (T8), tratados com o extrato de cipó-pucá (50 mg/Kg) logo após a lesão, perfundidos 24 horas pós-lesão e a medula espinhal removida e preservada em soluções com concentrações crescentes de sacarose. A análise histopatológica para visualização do padrão de lesão foi feita por coloração de hematoxilina-eosina (HE). A análise imunohistoquímica para visualização de neurônios, microglia, astrócitos e neutrófilos foi realizada utilizando anticorpos contra NeuN, CD68, caspase-3 e MBS-1, respectivamente. A análise quantitativa demonstrou preservação neuronal, redução do número de células apoptóticas, microglia ativada e infiltrado inflamatório (neutrófilos) nos animais tratados quando comparados ao grupo controle sugerindo um efeito neuroprotetor e anti-inflamatório do extrato supercrítico de cipó-pucá em modelo de LAME.

Palavras-Chave: Lesão aguda da medula espinhal, Cipó-pucá, Neuroinflamação, Neuroproteção.

ABSTRACT

Acute spinal cord injury (aSCI) is a serious pathological condition that affects several individuals in different regions of the world and may cause physical and/or psychological sequelae. The available treatment is ineffective, which demands on development of new therapeutic approaches. The development of neuroprotective agents is of fundamental importance for the tissue preservation after aSCI. In the Amazon rain forests there are a multitude of medicinal plants, whose potential anti-inflammatory and neuroprotective effects have not been investigated. Cipó-pucá (*Cissus verticillata*) is used for treatment of stroke in folk medicine, but its effects are not scientifically proven and have not been investigated after aSCI. In this study, we investigated the anti-inflammatory and neuroprotective effects of the supercritical extract of cipó-pucá in an experimental model of aSCI in adult rats. The extracts of leaves of cipó-pucá were obtained by extraction with supercritical fluid. The animals underwent partial hemisection surgery of the spinal cord and were treated with extract of cipó-pucá (50 mg / kg) or vehicle. They were perfused at 24 hours postinjury. The gross histopathology was performed by hematoxylin-eosin staining. Immunohistochemical analysis for visualization of neurons, microglia, astrocytes and neutrophils were performed using antibodies against NeuN, CD68, caspase-3 and MBS-1, respectively. The quantitative analysis showed neuronal preservation and, reduction of the apoptotic cells, activated microglia and inflammatory infiltrate (neutrophils) in treated animals compared to the control group, suggesting a neuroprotective and anti-inflammatory effect of the supercritical extract of cipó-pucá in the aSCI model.

Key words: Acute spinal cord injury, Cipó-pucá, Neuroinflammation, Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Esquema de segmentação e estruturas de proteção da medula espinhal	11
Figura 2. Corte histológico de uma secção transversal da medula espinhal	12
Figura 3. Danos motores de acordo com o local da lesão na medula espinhal	14
Figura 4. <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E. Jarvis	22
Figura 5. Método de contagem usado no trabalho	27
Figura 6. Aspecto geral de lâmina de LAME coradas com HE.....	28
Figura 7. Fotomicrografia de imunohistoquímica para células NeuN+	29
Figura 8. Análise quantitativa do número de células NeuN+ por campo de contagem	30
Figura 9. Fotomicrografia de imunohistoquímica para células caspase-3 +.....	31
Figura 10. Análise quantitativa do número de células caspase-3+ por campo de contagem	32
Figura 11. Fotomicrografia de imunohistoquímica para células MBS-1.....	33
Figura 12. Análise quantitativa do número de células MBS-1+ por campo de contagem.....	33
Figura 13. Fotomicrografia de imunohistoquímica para células CD68+.....	34
Figura 14. Análise quantitativa de células CD68+ por campo de contagem	35
Quadro 1 - Grupos experimentais e procedimentos aplicados	24
Quadro 2 - Anticorpos primários utilizados	26

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase
ASIA	American Spinal Injury Association
AVE	Acidente Vascular Encefálico
CPN	Células Progenitoras Neurais
CTM	Células-Tronco Mesenquimais
DAB	Diaminobenzidina
DASN	Divisão Autônoma do Sistema Nervoso
IFN- γ	Interferon Gama
IL-1- β	Interleucina 1 Beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
LAME	Lesão Aguda da Medula Espinhal
ME	Medula Espinhal
MP	Metilprednisolona
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
PBS	Tampão Fosfato-Salino

PEG	Polietilenoglicol
PVA	Álcool Polivinílico
SFE	Extração com Fluido Supercrítico
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRM	Trauma Raquimedular
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	MORFOLOGIA DA MEDULA ESPINHAL	10
1.2	EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DA LESÃO MEDULAR	13
1.2.1	Epidemiologia	13
1.2.2	Fisiopatologia.....	15
1.3	TRATAMENTO PARA LESÃO DA MEDULA ESPINHAL	18
1.3.1	Tratamentos Convencional e Farmacológico Disponíveis	18
1.3.2	Fitoterápicos.....	20
1.4	JUSTIFICATIVA	22
1.5	OBJETIVOS	23
1.5.1	Objetivo Geral.....	23
1.5.2	Objetivos Específicos.....	23
2	MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE CIPÓ- PUCÁ.....	24
2.2	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
2.3	MODELO DE LESÃO MEDULAR	24
2.4	PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	25
2.5	IMUNOHISTOQUÍMICA	25
2.6	ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA	27
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
3	RESULTADOS	28
3.1	ANÁLISE DA ÁREA DE LESÃO	28
3.2	ANÁLISE DA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS NEURONAIS	28
3.2	ANÁLISE DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS	30
3.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO DE CIPÓ-PUCÁ	32
3.3.1	Análise Do Recrutamento De Neutrófilos	32
3.3.2	Análise De Células Microgliais Ativadas	33

4	DISCUSSÃO	36
4.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO DE LESÃO MEDULAR	36
4.2	UTILIZAÇÃO DE FITOTERÁPICOS NO TRATAMENTO DE LESÕES AGUDAS DO SNC.....	38
4.3	POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO EXTRATO DE CIPÓ-PUCÁ.....	39
5	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 MORFOLOGIA DA MEDULA ESPINHAL

O Sistema Nervoso (SN) é responsável por receber e transmitir informações para todo o organismo. Dividido anatomicamente em sistema nervoso central (SNC) - composto pelo encéfalo e a medula espinhal (ME) e sistema nervoso periférico (SNP) - o qual consiste dos nervos espinhais, suas raízes e seus ramos e dos nervos cranianos e seus ramos (SILVA, 2014).

O SNC encontra-se protegido por estruturas ósseas (crânio e vértebras), e meninges (dura-máter, aracnoide e pia-máter). A coluna vertebral, bem como os ligamentos, tendões e músculos circundantes, em conjunto, isola a medula espinhal do ambiente externo. Além disso, o tecido neural também precisa ser protegido de traumas contra as paredes ósseas da coluna. Para isso, membranas especializadas denominadas meninges e o líquido cefalorraquidiano são responsáveis por fornecer a estabilidade física e a absorção de impactos. Nutrientes e oxigênio chegam à medula espinhal através de vasos sanguíneos que brotam de dentro das meninges. As meninges são membranas fibrosas que envolvem a medula, denominadas pia-máter, aracnoide e dura-máter. A pia-máter é a membrana mais delicada e mais interna que está aderida intimamente ao tecido superficial da medula e penetra na fissura mediana anterior. Quando a medula termina, no cone medular, a pia-máter continua caudalmente formando um filamento esbranquiçado denominado filamento terminal. A pia-máter encontra-se separada da aracnoide pelo espaço subaracnóideo, que é preenchido pelo líquido cefalorraquidiano (líquor). (KANDEL, 2014).

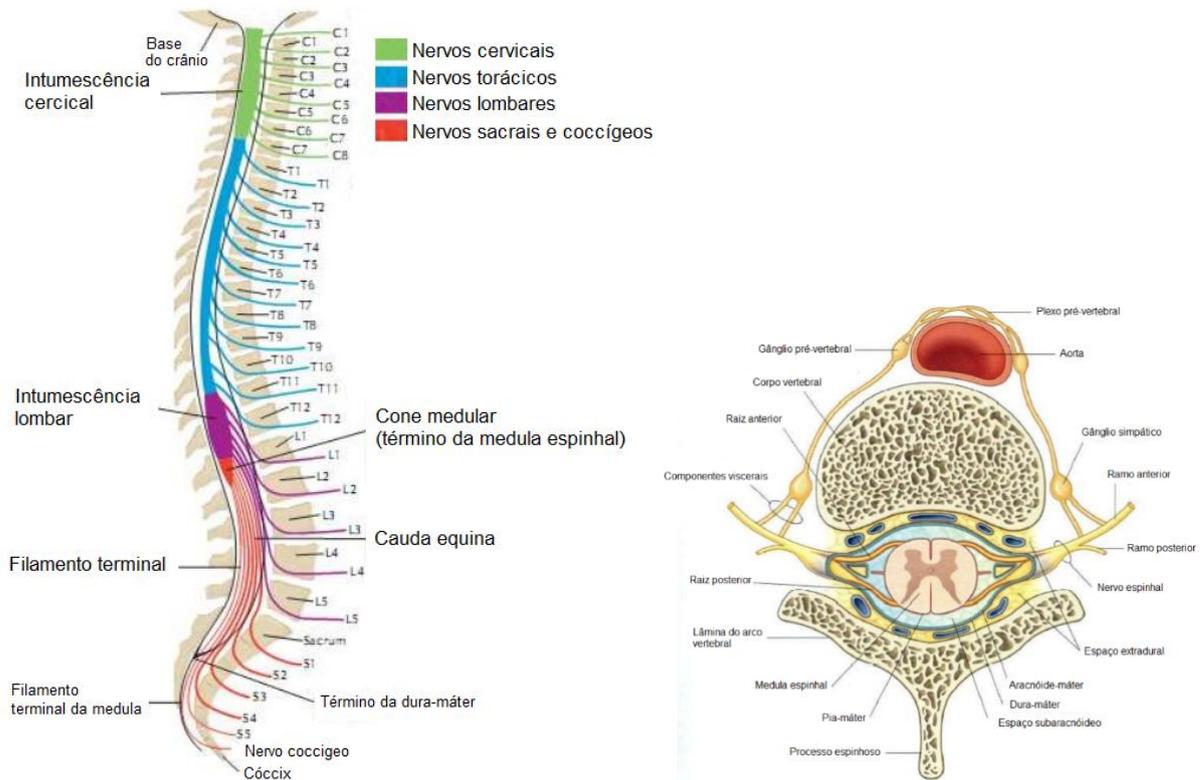


Figura 1. Esquema de segmentação (esquerda) e estruturas de proteção (direita) da medula espinhal. Fonte: Adaptado de <https://www.slideshare.net/lauramontouro/neuroanatomia-fameca-medula-espinhal-2016>.

Anatomicamente a medula espinhal é constituída de substância branca (SB), externamente e de substância cinzenta (SC) na porção mais central, formando uma espécie de um “H”. A SC medular apresenta duas regiões funcionalmente distintas, os cornos ventrais (motores) e os dorsais (sensoriais). Já a SB possui três colunas orientadas rostrocaudalmente nas quais axônios ascendem ou descendem: dorsal, ventral e lateral. No centro da SC medular encontra-se o canal central da medula (ependimário), representante do sistema ventricular, como mostra a figura 2 com corte histológico de uma secção transversal da medula espinhal abaixo. (MARTIN, 2003).



Figura 2. Corte histológico de uma secção transversal da medula espinhal. Na figura observa-se a substância cinzenta da medula localizada na região central e a substância branca ao seu redor. Filamentos anteriores e posteriores também podem ser visualizados os quais se unem dando origem aos nervos espinhais. Fonte: Adaptado de Martin (2003).

ME possui os tipos celulares característicos do sistema nervoso: neurônios e células da glia. As células da glia abrangem a maior porcentagem de todo tecido nervoso, auxiliam no suporte e na arquitetura do tecido, e também fornecem suporte funcional ao neurônio (KANDEL, 2014). Elas são classificadas em: astrócitos, oligodendrócitos, células ependimárias e micróglia. Os astrócitos são células com muitos prolongamentos, associadas aos processos de: suporte metabólico, secreção e captação de neurotransmissores e sustentação estrutural. Estão associadas também à resposta a danos ao sistema nervoso através de modificação do seu potencial, nestes casos são chamados de astrócitos reativos (BURDA et al., 2016). Possuem um importante papel na manutenção da água e do fluxo sanguíneo para o funcionamento do neurônio (RANSOM et al., 2003). Oligodendrócitos estão relacionados aos mecanismos de produção da bainha de mielina para os neurônios. A perda destas células pode causar desmielinização além de obstrução axonal e, inclusive, morte celular (MATUTE, 2010). Estudos recentes mostram a existência de um quarto tipo celular glial de forma estrelada, conhecido como oligodendrócito progenitor, o qual estaria ligado aos processos de formação de novos oligodendrócitos (FERNANDEZ-CASTANEDA e GAULTIER, 2016). As células ependimárias compõem uma camada epitelial simples de células colunares ciliadas que revestem os ventrículos e o plexo coroide (barreira hematoencefálica), produzindo o líquido cerebrospinal (BRUNI, 1998). No entanto, esta camada não é apenas um “forro” neuroepitelial inerte, está associada a regulação do transporte de íons, de pequenas moléculas e de água entre o líquido cerebrospinal e o parênquima nervoso.

Atua como uma barreira funcional a fim de proteger o tecido contra a ação de patógenos (HAUWEL et al., 2005). Muitos estudos associam as células ependimárias dos ventrículos laterais com a produção de células tronco no cérebro adulto, em situações patológicas (HAUWEL et al., 2005; MARTINO et al., 2001). As células microgliais são macrófagos residentes do SNC e, como células do sistema imune inato, fazem parte da resposta primária à infecção e são responsáveis por iniciar o processo inflamatório (CHERRY et al., 2014). As células da micróglia são vigilantes constantes do SNC, fazendo uma varredura completa deste sistema contribuindo para a homeostase tecidual através de movimentos estocásticos de seus finos e longos processos (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHN et al., 2005; GLASS et al., 2010), além de participar ativamente do processo inflamatório (GOMES-LEAL, 2012). As células da micróglia respondem a danos ao SNC, com ações benéficas e prejudiciais (GOMES-LEAL, 2012).

Várias citocinas são capazes de estimular a micróglia (neurotransmissores e neurotoxinas, proteases e moléculas da matriz extracelular, por exemplo) provenientes, em grande parte, de locais do sistema nervoso que estejam sofrendo alguma agressão. Desta forma, vão funcionar como células apresentadoras de antígenos, interagindo com linfócitos T que atravessam a barreira hematoencefálica e penetram no SNC (MATUTE, 2010).

1.2 EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DA LESÃO MEDULAR

1.2.1 Epidemiologia

De acordo com a American Spinal Injury Association (ASIA), a lesão aguda da medula espinal (LAME) é uma agressão que pode ocasionar danos neurológicos, classificados como alterações da função motora, sensorial e autônoma. Quando a lesão se localiza na região cervical da medula, tem-se como seqüela a tetraplegia caracterizado pelo comprometimento dos membros superiores, tronco e membros inferiores. Porém, se a lesão ocorrer na região torácica, lombar ou sacral, o paciente apresenta um quadro clínico de paraplegia - comprometimento de tronco e/ou membros inferiores (Figura 3). (ASIA, 2011).

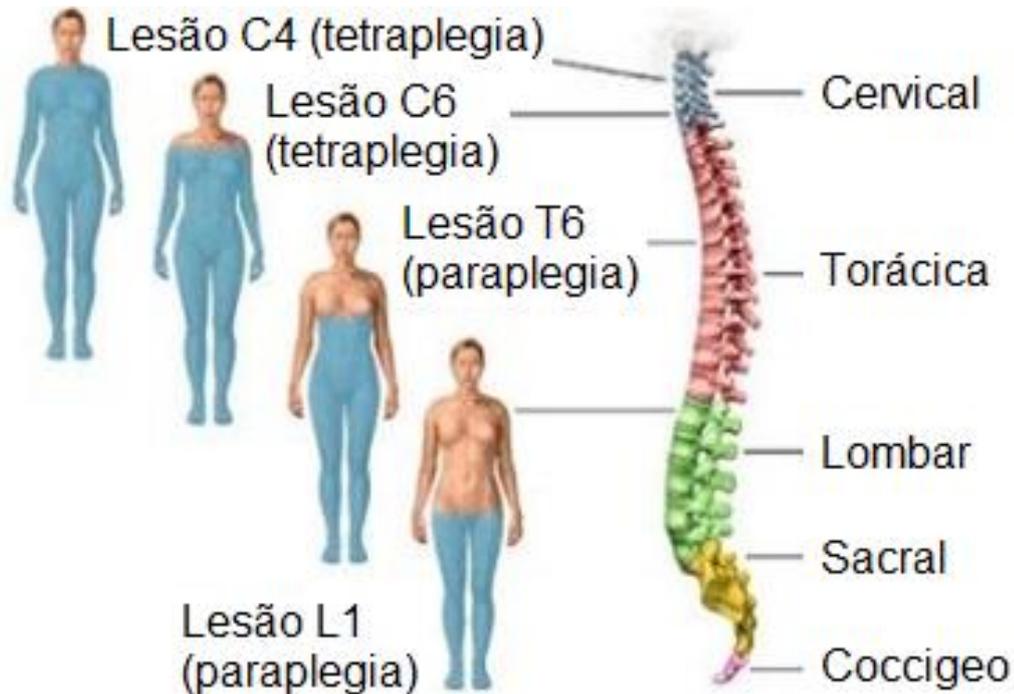


Figura 3. Danos motores de acordo com o local da lesão na medula espinhal. Fonte: Adaptado do Guia do fisioterapeuta, 2011.

Lesões medulares ocorrem principalmente nas regiões entre a 5ª e a 7ª vértebras cervicais, a 12ª vértebra torácica e a 1ª vértebra lombar (FALAVIGMA; PASSIAS, 2018). Os danos à medula podem variar entre uma concussão transitória, da qual o paciente recupera-se completamente, até uma transecção completa, que culmina na paralisia do paciente abaixo do nível da lesão (Figura 3) (BRUNI *et al.*, 2004). A LAME ocorre, preferencialmente, em indivíduos do sexo masculino, na proporção de 4 homens para 1 mulher, na faixa etária entre 15 a 40 anos. Dentre as principais causas estão os acidentes automobilísticos, queda de altura, acidente por mergulho em águas rasas e ferimentos por arma de fogo ou objetos perfurocortantes (MÜLLER, 1997; FALAVIGMA; PASSIAS, 2018). Com algumas exceções, esse tipo de lesão é passível de prevenção e poderia apresentar redução de sua incidência por meio de campanhas educativas junto à população (MÜLLER, 1997; GREVE, 1997; DEFINO, 1999). Segundo RODRIGUES *et al* (2010), as lesões medulares podem ser classificadas em: lesão completa – caracterizada pela perda das funções motora e sensitiva abaixo dos 3 segmentos caudais consecutivos ao nível da lesão; lesão incompleta sensorial – caracterizada pela preservação da atividade motora e de parte da sensibilidade; lesão incompleta motora não funcional – caracterizada pela ausência ou redução da função motora e lesão incompleta motora funcional – caracterizada pela preservação da função motora abaixo do nível da lesão.

Em todo o mundo cerca de 2,5 milhões de pessoas vivem com LAME, com mais de 130.000 novas lesões sendo relatadas a cada ano. A LAME ocorre em cerca de 15 a 20% das fraturas da coluna vertebral e a incidência desse tipo de lesão apresenta variações nos diferentes países. Estima-se que, na Alemanha, ocorram anualmente 17 casos novos por milhão de habitantes. Nos EUA, o número varia de 32 a 52 casos novos anuais por milhão de habitantes e, no Brasil, cerca de 40 casos novos anuais por milhão de habitantes, perfazendo um total de 06 a 08 mil novos casos por ano os quais geram um custo para o governo de aproximadamente U\$ 300,000,000,00 (MASINI, 2000; DOBKIN E HAVTON, 2004).

Uma pesquisa desenvolvida no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP sobre o perfil de pacientes com lesão traumática da medula espinhal identificou que a grande maioria eram indivíduos jovens do sexo masculino, sendo que 36,2% tinham entre 21 a 30 anos de idade. Em 44,7% dos casos a lesão ocorreu devido a ferimentos por arma de fogo, seguido de acidentes automobilísticos – colisão, capotamento, atropelamento e acidentes com motocicletas – com 31,9%. A maioria das lesões ocorreu na região torácica (44,7%), seguida da região cervical (40,4%) (NOGUEIRA, 2006).

Em pesquisa sobre o perfil de pacientes com traumatismo raquimedular atendidos nos hospitais de pronto atendimento da cidade de Porto Alegre/RS no período entre janeiro de 2005 a janeiro de 2010, 63,3% dos pacientes eram do sexo masculino, com média de idade de $47,02 \pm 19,60$ anos e as causas que prevaleceram foram: queda de altura (27,2%), acidente de trânsito (25,8%) e quedas (13,2%). Os níveis da coluna vertebral mais acometidos foram a região lombar (35,6%), torácica (21,9%) e cervical (20,5%) (JACKSON, 2004; KOCH, 2007; PIROUZMAND, 2010; FRISON, 2013).

No Estado do Pará, PEREIRA *et al* (2015) fizeram um levantamento sobre os pacientes com trauma raquimedular vítimas de disparos por arma de fogo atendidos no Hospital Metropolitano de Urgência e Emergência do Estado do Pará. De acordo com este estudo, dos 972 casos atendidos entre 2008 e 2013, 89 foram causados por arma de fogo (9,15%). A ocorrência foi consideravelmente maior em homens, correspondendo a 86,5% dos pacientes com faixa etária entre 21 a 30 anos, o tempo de internação médio foi de 21,3 dias e a taxa de mortalidade foi de 18%.

1.2.2 Fisiopatologia

O processo fisiopatológico da lesão medular advém de dois eventos distintos: a lesão mecânica (lesão primária) e a lesão endógena (lesão secundária) que é consequência da primeira (TATOR, 1979). A lesão primária ocorre através do impacto seguido de compressão

ou por laceração por objeto afiado que ocasiona morte das células por necrose e liberação de eletrólitos, em especial potássio, metabólitos e enzimas (GOODKIN E CAMPBELL, 1969; BALENTINE, 1978; TATOR, 1979; MCDONALD E SADOWSKY, 2002; ROWLAND *et al.*, 2008; OYINBO, 2011; AHUJA; PADILLA-ZAMBRANO, 2017). A lesão secundária inicia minutos após o trauma mecânico ter ocorrido, sendo dividida em: fase aguda, subaguda e crônica. A fase aguda – onde ocorre desequilíbrio iônico e alterações vasculares, como hemorragia, formação de edema e vasoespasmos, que também induz a necrose nas células atingidas diretamente e promove acúmulo de neurotransmissores na região da lesão; Na fase subaguda – que acontece minutos após a lesão ter ocorrido e pode durar semanas a meses e culmina com a expansão significativa da lesão, formação de radicais livres, ativação da resposta imune, peroxidação lipídica, indução de apoptose e inflamação; Já na fase crônica – que acontece por volta de seis meses após o evento primário da lesão e perdura por anos. Há formação da cicatriz glial e de cavitação. Nesta fase processos regenerativos podem ser eventualmente observados (TATOR E FEHLINGS, 1991; TATOR E KOYANAGI, 1997; MCDONALD E SADOWSKY, 2002; ROWLAND *et al.*, 2008; OYINBO, 2011; AHUJA; PADILLA-ZAMBRANO, 2017).

A lesão secundária envolve uma série de eventos complexos, tais como, mudanças bioquímicas, edema, inflamação, isquemia, reperfusão, liberação de fatores de crescimento, metabolismo do Ca^{+2} e peroxidação lipídica. Em situações experimentais, demonstrou-se que estes mecanismos contribuem para a morte neuronal (MCDONALD E SADOWSKY, 2002; LIMA, 2007; PADILLA-ZAMBRANO, 2017).

As alterações vasculares resultantes da lesão em uma região da medula espinhal leva à hemorragia, principalmente na substância cinzenta, reduz significativamente o fluxo sanguíneo local, promove vasoespasmos, alterações na permeabilidade vascular devido à perda de autorregulação, edema - proveniente do acúmulo de líquido na área lesionada, quebra da barreira hemato-medular e entrada de células pró-inflamatórias, o que pode ocasionar trombose, isquemia e morte celular por necrose (KWON *et al.*, 2004).

A excitotoxicidade ocorre devido a lise celular causada pelo impacto mecânico. Ela inicia nos primeiros quinze minutos após o trauma e promove aumento das concentrações extracelulares de glutamato e outros aminoácidos excitatórios de 6 a 8 vezes acima da concentração homeostática (GARCIA *et al.*, 2016; HULSEBOSCH, 2002). O excesso de glutamato - principal neurotransmissor excitatório do SNC – promove a hiperativação de receptores ionotrópicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e também de receptores metabotrópicos, causando influxo excessivo de cálcio (Ca^{2+}). A grande concentração de Ca^{2+}

intracelular causa desequilíbrio no metabolismo celular, ativação de enzimas líticas, disfunção mitocondrial e produção de radicais livres, resultando em morte neuronal por apoptose (GOMES-LEAL, 2002; KWON *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2007). O influxo de sódio precede o de cálcio causando edema. Além disso, o Ca^{2+} ativa enzimas proteolíticas, tais como caspases, fosfolipases e enzimas, cujas atividades levam a degradação dos componentes celulares e a morte celular. Essas concentrações altas de Ca^{2+} no citosol e na mitocôndria desencadeiam alguns processos dependentes de cálcio e que alteram, invariavelmente, o metabolismo celular. Esses processos incluem a ativação de enzimas líticas, como as calpaínas, fosfolipase A2 e lipoxigenase, a geração de radicais livres e a desregulação da fosforilação oxidativa mitocondrial, promovendo a morte das células nervosas por apoptose (KWON *et al.*, 2004).

Em relação ao íon sódio, a falta de regulação influencia também, de forma particular, o aumento da lesão dos axônios e de componentes gliais da substância branca. O aumento da concentração intracelular de sódio é provocado pela ativação glutamatérgica dos receptores NMDA, AMPA e cainato e pela ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem. Normalmente, a propagação do potencial de ação das células nervosas é produzida pelo influxo de sódio através da ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem. Contudo, em situações patológicas, a despolarização intensa e a perda de adenosina tri-fostato (ATP) necessário para mover o sódio de volta ao meio extracelular, levam a um acúmulo tóxico de sódio (e água) nos axônios (KWON *et al.*, 2004).

O glutamato também pode ser tóxico em uma fase mais crônica da degeneração da substância branca, processo que envolve a secreção de glutamato através do transporte desse neurotransmissor pelos canais dependentes de sódio, com subsequente ativação dos receptores AMPA e morte de oligodendrócitos (FAROOQUI, ONG, & HORROCKS, 2008).

A hiperativação dos receptores AMPA é um dos principais mecanismos para a lesão da substância branca na LAME. Essa manifestação, causada pelo excesso de glutamato no espaço extracelular, causa dano funcional irreversível, principalmente nas regiões dorsais da substância branca, onde os aminoácidos excitatórios são tóxicos (LI & STYS, 2000).

A morte neuronal pode ser motivada por mecanismos passivos ou ativos, necrose ou apoptose, respectivamente. A morte por necrose é um evento que envolve desbalanço na homeostasia da célula, levando ao edema de compartimentos celulares como a mitocôndria e outras organelas, a qual resulta em depleção de ATP a nível incompatível com a sobrevivência celular. Ela é caracterizada por vacuolização citoplasmática, ruptura da membrana citoplasmática e extravasamento do conteúdo intracelular, dano mitocondrial intenso e indução de inflamação ao redor da célula em destruição, atribuída pela liberação de conteúdos celulares

e moléculas pró-inflamatórias (SASTRY & RAO, 2000; DANIAL & KORSMEYER; EDINGERN & THOMPSON, 2004).

Na morte celular por apoptose, não são observadas alterações de permeabilidade celular. As organelas permanecem geralmente intactas e a carga energética da célula é mantida. A apoptose requer a síntese de novas moléculas responsáveis pela condensação da cromatina e fragmentação do DNA em frações internucleossomais. O processo de apoptose envolve a ativação de caspases – proteases dependentes de cisteína que reconhecem sítios específicos ricos em aspartato em suas proteínas alvo (SASTRY & RAO, 2000). Esse tipo de morte celular programada é um processo fisiológico no qual programas moleculares intrínsecos à célula são ativados para causar sua destruição, uma propriedade fundamental de todos os organismos multicelulares que é crucial para o seu desenvolvimento, morfogênese dos órgãos, homeostase dos tecidos e defesa contra células infectadas ou danificadas. A importância da apoptose é enfatizada pelo seu notável grau de conservação evolutiva. No entanto, quando ocorre de forma excessiva pode causar morte celular injustificada (VILA, 2003).

A via extrínseca da apoptose ocorre especialmente em condições patológicas nas quais a inflamação é uma característica proeminente. Uma vez que há uma crescente apreciação de que a inflamação é uma característica da neurodegeneração com potencial significado patogênico, a abordagem da via extrínseca de morte celular programada em doenças neurodegenerativas é uma abordagem garantida (VILA, 2003). Na via intrínseca da apoptose, os estímulos independentes dos receptores de morte podem desencadear a morte programada induzindo a translocação de moléculas pró-apoptóticas para as mitocôndrias, com a subsequente liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais (como o citocromo *c*) para o citosol (VILA, 2003).

Pesquisas têm sido realizadas no intuito de encontrar novos fármacos e/ou terapias capazes de controlar os eventos fisiopatológicos secundários que ocorrem a partir do trauma mecânico e, conseqüentemente, possibilitar o seu controle, permitindo uma recuperação funcional da medula espinal pós-traumatismo mais eficiente (STIRLING *ET AL.*, 2004; ESPOSITO *ET AL.*, 2011; FONSECA, 2015).

1.3 TRATAMENTO PARA LESÃO DA MEDULA ESPINHAL

1.3.1 Tratamentos Convencional e Farmacológico Disponíveis

O tratamento para pacientes que sofreram lesão medular consiste, basicamente, na descompressão cirúrgica da medula espinal, estabilização e fusão de vértebras instáveis após o trauma, manejo de complicações secundárias como, por exemplo, a instabilidade

autônômica, além da reabilitação sensório-motora. Todas essas medidas aumentaram a sobrevivência dos pacientes com lesão medular, porém ainda não há tratamento eficaz para a diminuição dos déficits neurológicos e recuperação das funções perdidas (ANDRADE e GONÇALVES, 2007).

A Metilprednisolona (MP), um corticosteróide sintético com propriedades anti-inflamatórias é um dos principais fármacos utilizados no tratamento da inflamação aguda causada por LAME (DEMOPOULOS *et al.*, 1982; HALL *et al.*, 1992). Os primeiros experimentos foram realizados em gatos e se observou que a administração intravenosa de altas doses de MP (30mg/kg) era capaz de inibir a peroxidação lipídica (HALL e BRAUGHLER, 1981). Estudos posteriores demonstraram que a administração de MP não apenas previne a peroxidação lipídica, mas também que é eficaz para inibir a isquemia pós-traumática contribuindo na manutenção do metabolismo energético aeróbico (YOUNG *et al.*, 1982; HALL, 2011). Se aplicada em até 8h após a ocorrência da lesão, a MP promove melhora da recuperação neuronal. Entre os efeitos terapêuticos observados estão o aumento no nível de fatores de crescimento neurais, diminuição da atividade de caspases, redução da morte de oligodendrócitos e inibição de peroxidação lipídica (DO VALE RAMOS; ALEGRETE, 2015). No entanto, a administração sistêmica de MP em altas doses pode levar a efeitos colaterais como pneumonia, infecções em feridas, miopatia aguda induzida por corticosteróides e sangramento gástrico. Uma alternativa à administração sistêmica é a injeção de MP diretamente no local do trauma, porém várias aplicações são necessárias para manter a concentração efetiva do medicamento, o que leva a novas lesões devido às múltiplas perfurações. Outra opção seria a administração via injeção intratecal (uso de cateteres para levar MP até o local pelo canal raquidiano), entretanto esse método também poderia exacerbar o dano através de compressão da medula ou de infecção (CHVATAL *et al.*, 2008). Além disso, a eficácia terapêutica de MP no tratamento da inflamação tem sido questionada por diversos estudos. Tais complicações podem fazer com que o fármaco cause mais efeitos adversos do que benéficos, sendo recomendado que MP (especialmente em altas doses) não seja usado como terapia padrão, mas sim como opção até que tratamentos mais eficientes sejam desenvolvidos (BYDON *et al.*, 2014).

A minociclina é uma alternativa que vem sendo estudada para o tratamento de LAME. Observou-se que este fármaco, amplamente utilizado em humanos como antibiótico, possui atividade neuroprotetora através de imunomodulação da proliferação da micróglia, redução de excitotoxicidade, neutralização de radicais livres, inibição da produção de óxido nítrico e principalmente estabilização mitocondrial, o que leva à redução de apoptose (KABU

et al., 2015). Estudos comportamentais realizados em ratos, assim como estudos pré-clínicos, mostraram que além dos efeitos fisiológicos, também foi observada redução da dor e melhora nas funções motoras. No entanto, assim como no caso de MP, há trabalhos que revelam resultados contrários aos citados anteriormente, em que não foram obtidos benefícios significativos e houve limitação na atividade neuroprotetora (KWON *et al.*, 2011). Ensaio clínicos de fase II foram feitos para estabelecer doses seguras e adequadas para o tratamento de LAME, porém fases mais avançadas devem verificar a efetividade da minociclina (KABU *et al.*, 2015).

1.3.2 Fitoterápicos

A Organização Mundial da Saúde (2016) considera como planta medicinal toda aquela que é cultivada e utilizada para prevenção, tratamento, alívio de sintomas ou diagnóstico de doenças. Os fitoterápicos são usados no tratamento de diversas enfermidades desde o início da humanidade e por serem eficazes, de baixo custo e acessíveis possuem suma importância para uma expressiva parte da população (SANTOS *et al.*, 2011).

Algumas pesquisas baseadas no conhecimento popular analisam a possibilidade de utilizar fitoterápicos como vias de tratamento para LAME. Na China, por exemplo, pesquisou-se o uso da raiz da planta *Angelica sinensis* – uma planta utilizada pela medicina popular chinesa para tratar doenças ginecológicas e também em pacientes com câncer para diminuir os efeitos danosos causados pela radiação nos tecidos, tendo efeitos clinicamente comprovados. Em ensaio com modelos animais, foi constatado que a raiz atuou na diminuição de expressão de citocinas pró-inflamatórias, resultando em menor dano ao tecido quando comparado com o modelo não tratado (XU *et al.*, 2015).

Uma planta da Índia chamada *Curcuma longa*, cúrcuma, ou açafrão-da-Índia tem sido estudada principalmente pelas propriedades de seu pigmento amarelo (curcumina) por ter característica anti-inflamatória. Em diversos estudos, este composto mostrou ter atividade medicinal no SNC, sendo possivelmente aplicável como medicamento para LAME devido a sua ação analgésica e de combate à inflamação (SANIVARAPU *et al.*, 2016).

O óleo-resina de Copaíba (ORC) extraído do tronco da árvore de copaíba. é usado tradicionalmente pela medicina popular amazônica como um anti-inflamatório. Ele apresenta diversas propriedades medicinais, cosméticas e industriais, sendo uma das plantas com uso medicinal mais conhecida e utilizada no Brasil, o óleo é encontrado na forma farmacêutica de pomadas, óleos in natura, cápsulas, emulsões, entre outros (MACIEL; VEIGA

JUNIOR, 2002). O principal produto que constitui o óleo copaíba é o cariofileno. O beta-cariofileno possui ação antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiendêmica, e o beta-bisaboleno, analgésico e antiinflamatório (PIERRI; MUSSI; MOREIRA, 2009). O ORC tem efeito neuroprotetor e antiinflamatório. Provavelmente, o principal responsável por esses resultados seja o β -cariofileno (GUIMARAES *et al.*, 2012).

Uma trepadeira da família das Vitáceas denominada *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis, popularmente conhecida por cipó-pucá, tem sido usada por povos da Amazônia devido a sua atividade hipoglicemiante a qual lhe rendeu o apelido de “insulina vegetal” (Figura 4) (BARBOSA *et al.*, 2002). O cipó-pucá é consumido normalmente na forma de chá ou usado no preparado de garrafadas para ingestão, em conjunto, com outras ervas medicinais. De acordo com o conhecimento popular, além da sua atividade hipoglicemiante, ele pode ser utilizado para tratar sequelas de AVE, alívio de dores nas pernas, dor de dente e para dormências causada por picada de inseto (COELHO-FERREIRA *et al.*, 2011).

Pesquisas com as folhas de *C. verticillata* (L.) demonstraram a presença de compostos, tais como taninos, compostos redutores, triterpenos, esteróides, aminoácidos, compostos graxos e flavonóides (LIZAMA *et al.*, 2000, MACHADO, 2008). Ensaios biológicos usando combinações isoladas revelam que os flavonóides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório, antiplaquetário (PELZER *et al.*, 1998; MACHADO, 2008). As atividades biológicas dos flavonóides tem ação antioxidante que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004) já que em certas condições o oxigênio pode ser transformado nas seguintes espécies: ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são responsáveis por danos celulares (CODY; MIDDLETON; HARBONE, 1986), essa formação dos radicais livres ocorre durante o processo oxidativo biológico, a partir de compostos endógenos (MARRONI; MARRONI, 2002) ou em circunstâncias patológicas como reações inflamatórias, câncer, distúrbios cardiovasculares, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, catarata e diabetes (CODY; MIDDLETON; HARBORNE, 1986), onde a peroxidação lipídica resulta em danos à membrana celular que causam troca na carga líquida da membrana provocando mudanças de pressão osmótica que resultam em lise celular, pois os radicais livres podem agir sobre vários mediadores inflamatórios contribuindo para uma inflamação geral responsável por danos aos tecidos (NIJVELDT *et al.*, 2001).



Figura 4. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis. Aspectos da planta trepadeira conhecida como cipó-pucá, cotina-japonesa, anil trepador. Fonte: Jaqueline Durigon, 2009; Sérgio Campestrini, 2011 (Adaptado UFRGS/fitoecologia).

1.4 JUSTIFICATIVA

A LAME é uma das causas mais comuns de morte e de incapacidade física da atualidade no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2013) a LAME acomete principalmente indivíduos jovens, na faixa de 20 a 29 anos de idade, do sexo masculino, prejudica funções motoras e sensoriais. Os traumas medulares, causados principalmente por acidentes de trânsito, quedas ou por violência, são condições patológicas graves que podem causar sequelas físicas e/ou psicológicas. Além de ser significativamente onerosa para o sistema público de saúde, a LAME também tem um alto impacto financeiro na vida dos pacientes e de seus familiares que precisam custear os tratamentos hospitalares e os cuidados especiais que os pacientes necessitam (PEDRAM, 2010; ANWAR, AL SHEBABI e EID, 2016). Múltiplos estudos analisam a possibilidade de utilizar fitoterápicos como vias de tratamento para lesões agudas do SNC (LIZAMA *et al.*, 2000; MACIEL; BARBOSA *et al.*; VEIGA JUNIOR, 2002; PIERRI; MUSSI; MOREIRA, 2009; COELHO-FERREIRA *et al.*, 2011; GUIMARAES *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2015; SANIVARAPU *et al.*, 2016), sendo tais pesquisas frequentemente baseadas no conhecimento tradicional advindo de diversas partes do mundo. Tendo em vista que a comunidade amazônica utiliza o cipó-pucá (*C. verticillata*) para tratar pacientes vítimas de AVE (BARBOSA *et al.*, 2002), o presente trabalho tem por objetivo investigar os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetor do extrato de cipó-pucá em um modelo de LAME, contribuindo, conseqüentemente, para o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas para desordens agudas do SNC.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

- Investigar o potencial anti-inflamatório e neuroprotetor do extrato supercrítico de cipó-pucá (*Cissus verticillata* (L). Nicolson & Jarvis) em ratos Wistar adultos submetidos à lesão experimental da medula espinhal.

1.5.2 Objetivos Específicos

- a. Investigar o efeito neuroprotetor a partir da análise qualitativa e quantitativa do efeito terapêutico do cipó-pucá na preservação de neurônios e redução do número de células apoptóticas;
- b. Analisar qualitativa e quantitativamente o efeito terapêutico do cipó-pucá sobre o infiltrado de leucócitos (neutrófilos) no sitio da lesão;
- c. Investigar o efeito do cipó-pucá sobre os padrões de ativação microglial após LAME.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE CIPÓ- PUCÁ

O extrato do cipó- pucá (*Cissus verticillata* (L.) (Nicolson & C. E. Jarvis)) utilizado neste estudo foi doado pelo Laboratório de Extração da Faculdade de Engenharia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Pará (UFPA). O mesmo foi obtido a partir das folhas desta planta utilizando a técnica com fluido supercrítico (SFE) usando as seguintes variáveis independentes: pressão (400 bar), temperatura (50°C) e porcentagem de co-solvente (EtOH) (10%) para um melhor rendimento e retirada de compostos hidrofílicos. A pressão e o percentual de co-solvente foram os fatores que influenciaram nesta técnica. A triagem fitoquímica dos extratos de *Cissus verticillata* foi realizada por cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC).

2.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Utilizou-se 13 (dez) ratos Wistar machos adultos com peso entre 250 -300 g. Os animais foram divididos em 02 grupos experimentais: grupo controle (n=4) e grupo tratado (n=9) ambos com tempo de sobrevivência de 24 horas (Quadro 1). Após o procedimento cirúrgico para a indução da lesão medular, os animais do grupo controle foram tratados, por via intraperitoneal (i.p.), com solução de Tween 5%. Os animais do grupo tratado receberam solução contendo extrato supercrítico de cipó-pucá na concentração de 50mg/kg também via i.p. A concentração usada foi escolhida baseando-se no estudo de VIANA *et al* (2004). O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPA. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em concordância com as diretrizes estabelecidas pelo CEPAE-UFPA e em obediência às normas internacionais sugeridas pelo *National Institute of Health* e *Society for Neuroscience*.

Grupos	Descrição do tratamento	Quantidade
Controle	Animais machos com lesão medular tratados com solução de tween a 5%. Sobrevida de 24 horas.	4
Tratado	Animais machos com lesão medular tratados com solução contendo extrato de cipó-pucá a 50 mg/kg. Sobrevida de 24 horas.	9

Quadro 1 - Grupos experimentais e descrição dos procedimentos aplicados.

2.3 MODELO DE LESÃO MEDULAR

Para realização da cirurgia de indução da lesão medular, os animais foram anestesiados (i.p.) com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanacol[®], Köning; 72 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Kensol[®], Köning; 9 mg/kg). Após abolição dos reflexos corneano e de retirada da pata, os ratos foram posicionados em um estereotáxico para estabilização da cabeça do animal. Em seguida, realizou-se uma incisão de aproximadamente 2 cm na região dorsal do animal. Parte do tecido subcutâneo foi removida e a musculatura paravertebral foi rebatida para que se pudesse expor a coluna vertebral. Realizou-se uma laminectomia ao nível T8 da medula espinhal com o auxílio de um alicate de unha a fim de promover a visualização do tecido nervoso o qual foi seccionado usando o bisel de uma agulha descartável (25x0,8). Os procedimentos de laminectomia e lesão medular foram realizados com o auxílio de microscópio cirúrgico. Após confirmação da lesão, a musculatura do animal foi suturada com fio catgut[®] 5/0 e a pele do dorso foi suturada com fio de ácido poliglicólico nº 3.0.

2.4 PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Depois de passado o tempo de sobrevida descrito anteriormente, os animais foram profundamente anestesiados através de injeção i.p. de uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanacol[®], Köning; 72 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Kensol[®], Köning; 9 mg/kg). Após abolição dos reflexos do animal, realizou-se rápida toracotomia para a visualização do coração. Uma cânula foi introduzida no ventrículo esquerdo e um corte foi feito na aurícula direita. Os animais foram perfundidos com 400 mL de tampão fosfato salina heparinizada (PBS 0,9% pH 7,2- 7,4) seguido de 400 mL de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PFA 4% pH 7,2- 7,4). A coluna vertebral foi removida, as vértebras cortadas e as medulas espinhais extraídas. Após sua remoção, elas permaneceram imersas em PFA 4% por 24 h (pós-fixação). Em seguida, o material foi transferido para soluções de crioproteção com concentrações crescentes de sacarose em 25%, 50% e 100% diluídos em uma mistura de glicerina com tampão fosfato (PB 0,05M, pH 7,2- 7,4). O material permaneceu em cada solução de crioproteção até que afundassem. Em seguida, os tecidos foram incluídos em Tissue-Tek[®] (Sakura) e congelados a -35 °C para a obtenção de secções de 40 µm em criostato (Leica CM1850). Os cortes foram montados em lâminas silanizadas previamente gelatinizadas as quais foram armazenadas em freezer a -20 °C para serem utilizadas em protocolos de histologia e imunohistoquímica.

2.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para avaliação da ação neuroprotetora e anti-inflamatória do extrato de cipó-pucá. A análise de macrófagos e microglia

ativados na área da lesão e nas regiões circunvizinhas foi feita usando o anticorpo policlonal feito em coelho anti - CD68 (abcam, 1:100), células neurais foram marcadas usando o anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-NeuN (LSBio, 1:50), células apoptóticas foram marcadas através de anticorpo policlonal feito em coelho anti-caspase-3 (abcam, 1:100) e neutrófilos foram marcados usando anticorpo policlonal MBS-1 fabricado e doado pelo Dr. Victor Perry da Universidade de Southampton, UK (CNS Inflammation Group, 1:500) (GOMES-LEAL *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2012). O quadro 2 abaixo resume os anticorpos usados no presente estudo.

Anticorpo	Objetivo	Fabricante
MBS-1 (1:500)	Marcar neutrófilos	CNS Inflammation Group, Southampton University, UK
NeuN (1:50)	Marcar os pericários neuronais	LSBio
Caspase-3 (1:100)	Identificar as células apoptóticas	abcam
CD68 (1:100)	Analisar macrófagos e microglia ativados	abcam

Quadro 2 – Anticorpos primários usados na análise imunohistoquímica.

A técnica de imunohistoquímica foi realizada utilizando-se o seguinte protocolo:

Primeiramente, os cortes foram escolhidos e colocados para secar por 30 minutos na estufa em temperatura de 37°C. Logo depois foram lavados 1 vez durante 5 minutos em PBS, em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂ a 3%) por 20 minutos no escuro, após o bloqueio lavou-se 2 vezes durante 5 minutos em PBS para remoção da solução de bloqueio. As secções foram submersas em solução de ácido cítrico em banho maria a 90° durante 20 minutos para recuperação antigênica e novamente lavadas 2 vezes em PBS por 5 minutos para remoção da solução de recuperação antigênica. Depois, nos cortes, foram colocados em solução de saponina por 10 minutos, sendo lavados 2 vezes durante 5 minutos em PBS para retirada do excesso de saponina. Terminada esta etapa, os cortes foram imersos em BSA 10% durante 30 minutos para bloqueio das proteínas inespecíficas e, em seguida, para finalizar as etapas do primeiro dia, foram incubados nos anticorpos primários (overnight).

No dia seguinte, dando continuidade ao protocolo, as secções foram lavadas 2 vezes por 5 minutos com PBS e incubadas em solução de biotina durante 30 minutos em

temperatura de 37°C. Em seguida, procedeu-se 2 lavagens em PBS por 5 minutos cada para remoção do excesso de biotina. As secções foram incubadas em solução de Streptavidina-HRP por 30 minutos em temperatura de 37°C, lavadas 2 vezes com PBS e submetidas a revelação com solução diaminobenzidina (DAB) durante 2 minutos. Logo depois, procedeu-se 2 lavagens por 5 minutos em tampão fosfato para inativação do DAB, desidratação em gradientes de álcool/xileno e montagem com Etellan.

2.6 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Todas as secções foram examinadas em microscópio óptico binocular (Zeiss, Imager. 21). A análise histopatológica da área de lesão foi feita usando coloração de HE. Avaliou-se também a presença de corpos celulares marcados para os anticorpos utilizados. As imagens dos campos mais ilustrativos foram obtidas por meio de um sistema de captura de imagens acoplado ao microscópio (câmara digital AxioCam HRc - Zeiss) usando as objetivas de 50, 100, 200 e 400.

A contagem do número de células marcadas para cada imunohistoquímica foi feita usando um microscópio binocular (Olympus, BX41) provido de uma gradícula de contagem de 245 μm^2 e utilizando a objetiva 40x/Plan. As contagens foram realizadas em três campos: um campo próximo ao centro da lesão, um campo cranial e um campo caudal (Figura 1). A média das contagens e os erros padrão obtidos foram apresentados na forma de gráficos, em coordenadas cartesianas.

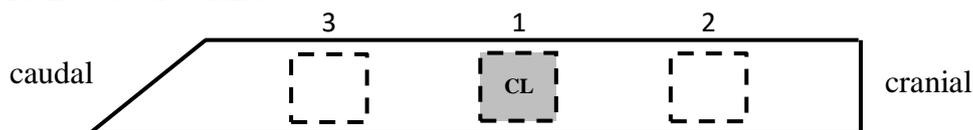


Figura 5. Desenho esquemático do método de contagem usado no trabalho (CL = centro da lesão).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar as diferenças entre os grupos, utilizou-se análise de variância de um critério e teste t de Student. O nível de significância adotado foi de $p < 0.001$ = significativo. As análises estatísticas foram feitas no programa Biostat 5.0 e os gráficos construídos no programa Excel (AIRES *et al.*, 2006).

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DA ÁREA DE LESÃO

A demarcação da área de lesão foi realizada utilizando-se coloração HE (figura 6), onde observou-se hemorragia, necrose, edema e a presença de corpos neurais rodeados por células microgliais.

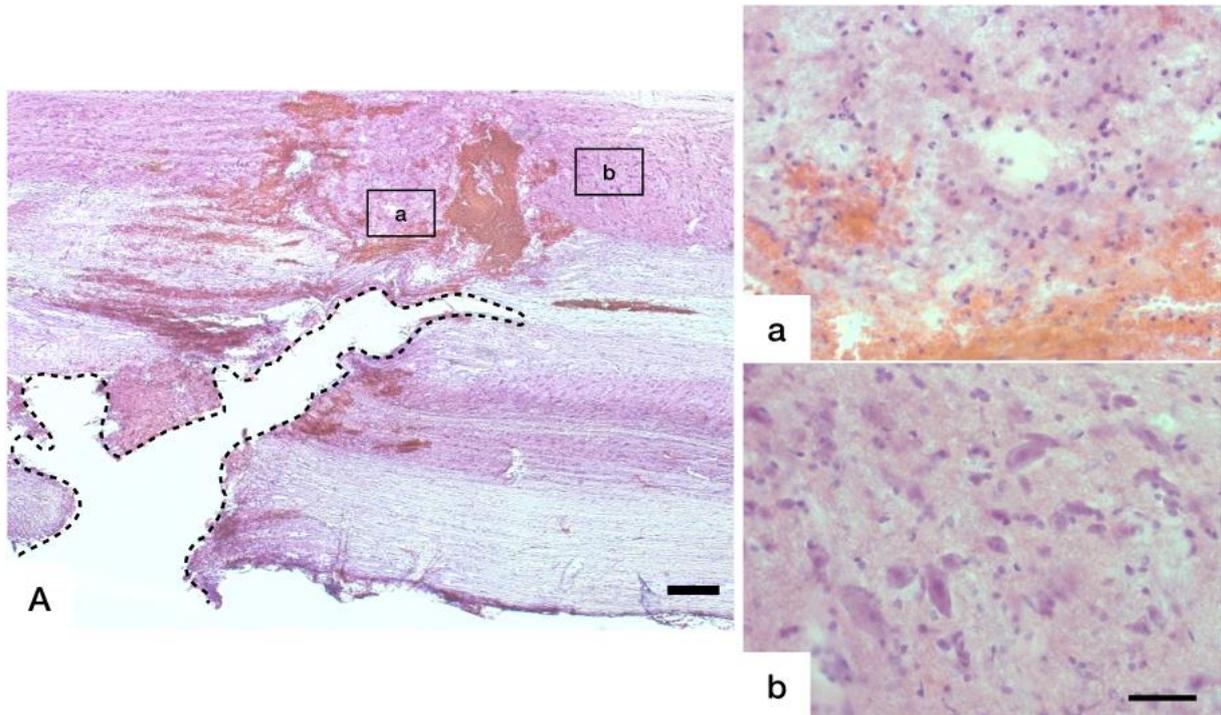


Figura 6. Aspecto geral de lâmina de LAME coradas com HE (A). Nota-se a presença de hemorragia perivascular, necrose tecidual e edema caracterizado pelas áreas esbranquiçadas (a). Próximo à área de lesão observou-se a presença de corpos neurais rodeados por células microgliais (b). Escala = 100 μ m.

3.2 ANÁLISE DA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS NEURONAIS

Para avaliar se o tratamento proposto no presente estudo contribui para a preservação neuronal, realizou-se imunohistoquímica para o anticorpo anti-NeuN, um marcador específico de neurônios diferenciados (Figura 7). O número de células NeuN+ foi de $29,86 \pm 0,781$ e $18,0 \pm 1,072$, respectivamente, nos grupos tratado e controle (Figura 8). Observou-se que o tratamento com o extrato supercrítico de cipó-pucá foi capaz de promover neuroproteção significativa dos neurônios quando comparado ao grupo controle o que foi comprovado pelo teste estatístico utilizado ($p < 0.001$).

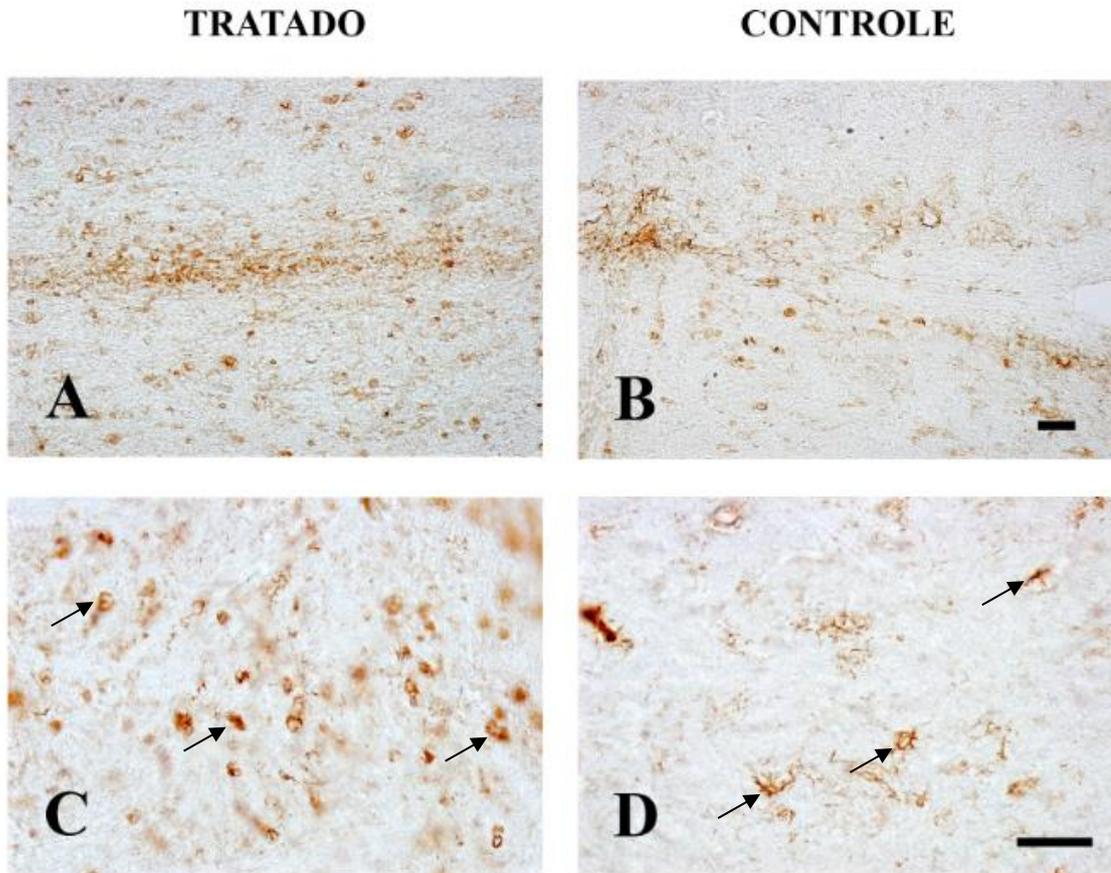


Figura 7. O tratamento com extrato de cipó-pucá promoveu a preservação neuronal. Imunoistoquímica para anti-NeuN em animais tratados (A e C) e controle (B e D). Fotomicrografias ilustrativas de campos localizados na região apical à lesão. Escalas = 50 μ m.

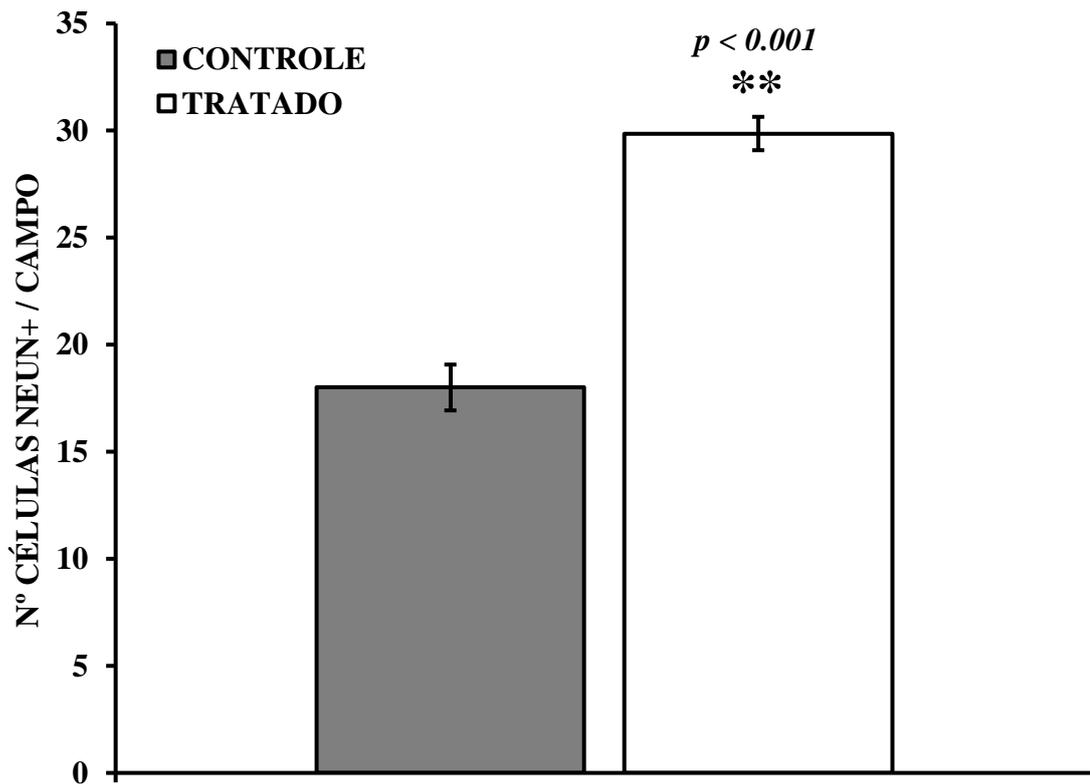


Figura 8. Análise do número de células NeuN positivas por campo de contagem. O número de neurônios foi significativamente maior nos animais tratados em comparação aos animais controle (** $p < 0.001$ – teste t de Student).

3.2 ANÁLISE DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

Para estudar os efeitos do extrato de cipó-pucá sobre o padrão de morte celular programada após lesão da medula espinhal de ratos, realizou-se imunohistoquímica para caspase-3-ativa, um marcador específico de apoptose (Figura 9). O número de células caspase-3-ativa por campo de contagem foi de $31,43 \pm 1,945$ nos grupos tratado e $51,60 \pm 2,802$, nos grupos controle (Figura 10) demonstrando que o tratamento foi eficaz em reduzir a morte celular por apoptose quando comparado ao grupo controle ($p < 0.001$).

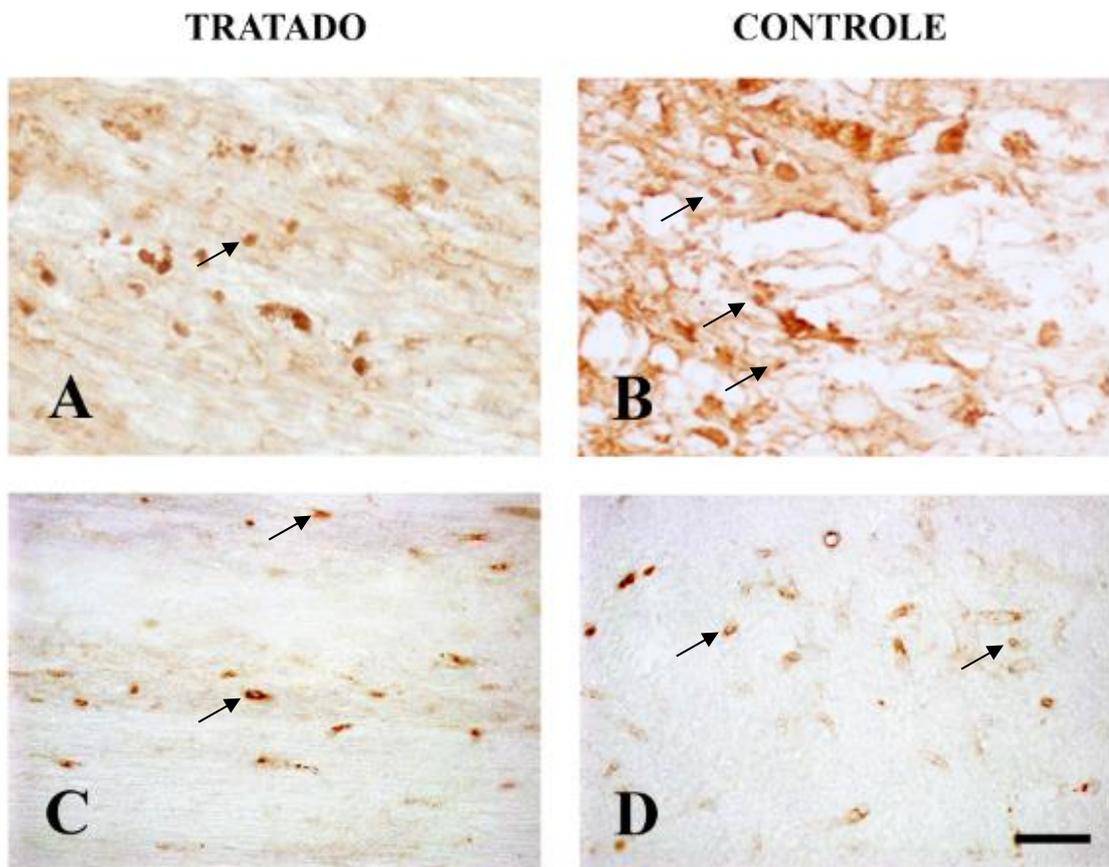


Figura 9. Efeito do tratamento com extrato de cipó-pucá na diminuição do número de células apoptóticas após lesão medular. Imunohistoquímica para caspase-3-ativa em animais tratado e controle. Fotomicrografias capturas em regiões próximo ao centro da lesão (A e B) e em regiões mais periféricas (C e D). As setas apontam para as células marcadas. Escala = 50 μ m.

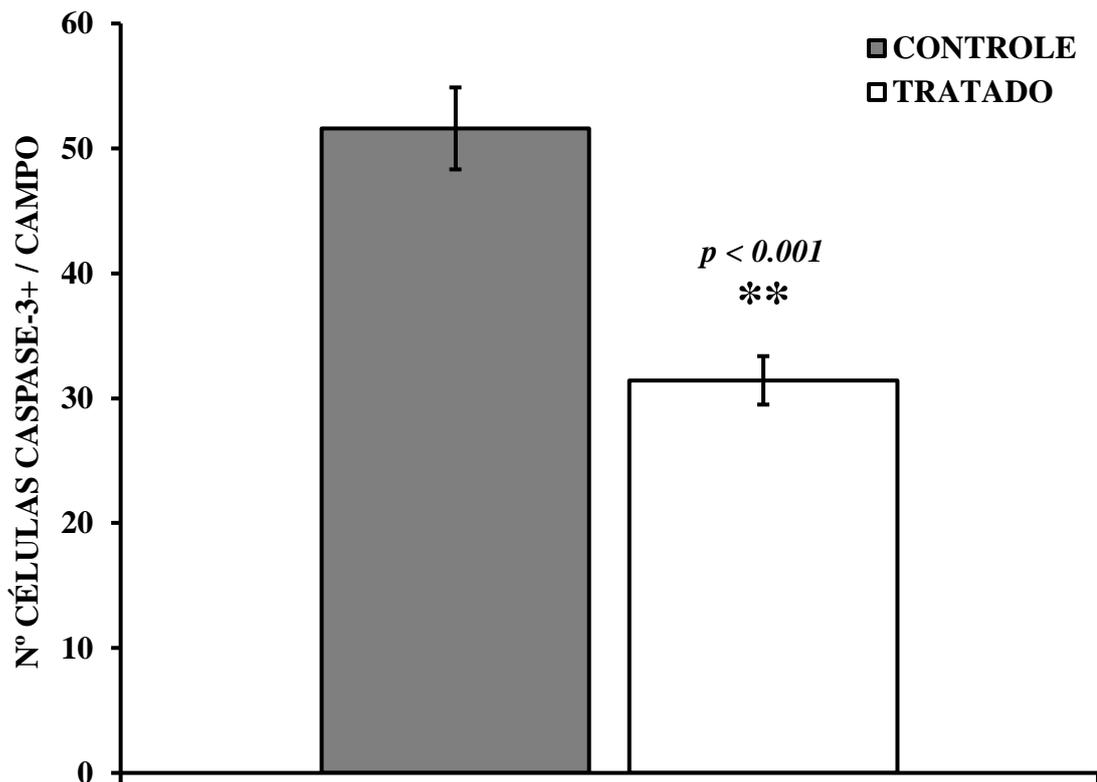


Figura 10. Redução do número de células caspase-3-positivas em animais tratados com extrato de cipó-pucá. O número de células apoptóticas foi significativamente menor nos animais tratados em comparação aos animais controle (** $p < 0.001$ – teste t de Student).

3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO DE CIPÓ-PUCÁ

3.3.1 Análise Do Recrutamento De Neutrófilos

A presença de neutrófilos na lesão medular foi avaliada realizando ensaio de imunohistoquímica para MBS-1, um anticorpo que marca a população geral de neutrófilos. O tratamento com extrato de cipó-pucá promoveu a diminuição do infiltrado inflamatório nos animais tratados quando comparado ao grupo controle (Figura 11). O número de células MBS1 foi $26,94 \pm 1,52$ nos grupos tratado e $64,80 \pm 4,83$, nos grupos controle (Figura 12). O tratamento com 50 mg/kg de extrato de cipó-pucá (i.p.) induziu uma diminuição significativa do recrutamento destes neutrófilos na área de lesão.

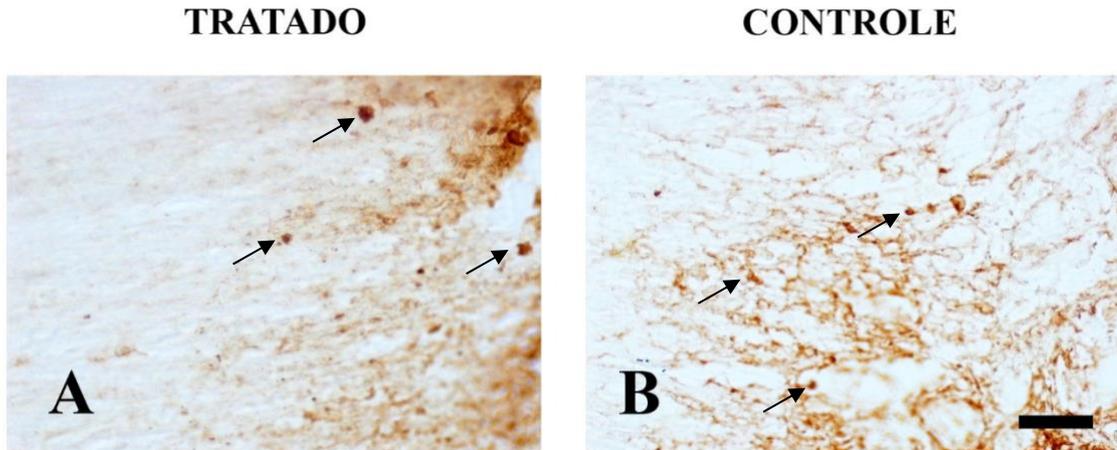


Figura 11. O tratamento com extrato de cipó-pucá promoveu a diminuição do infiltrado inflamatório nos animais tratados quando comparado ao grupo controle. Imunohistoquímica para MBS-1 em animais tratado (A) e controle (B). As setas apontam para as células marcadas. Escalas = 50 μ m.

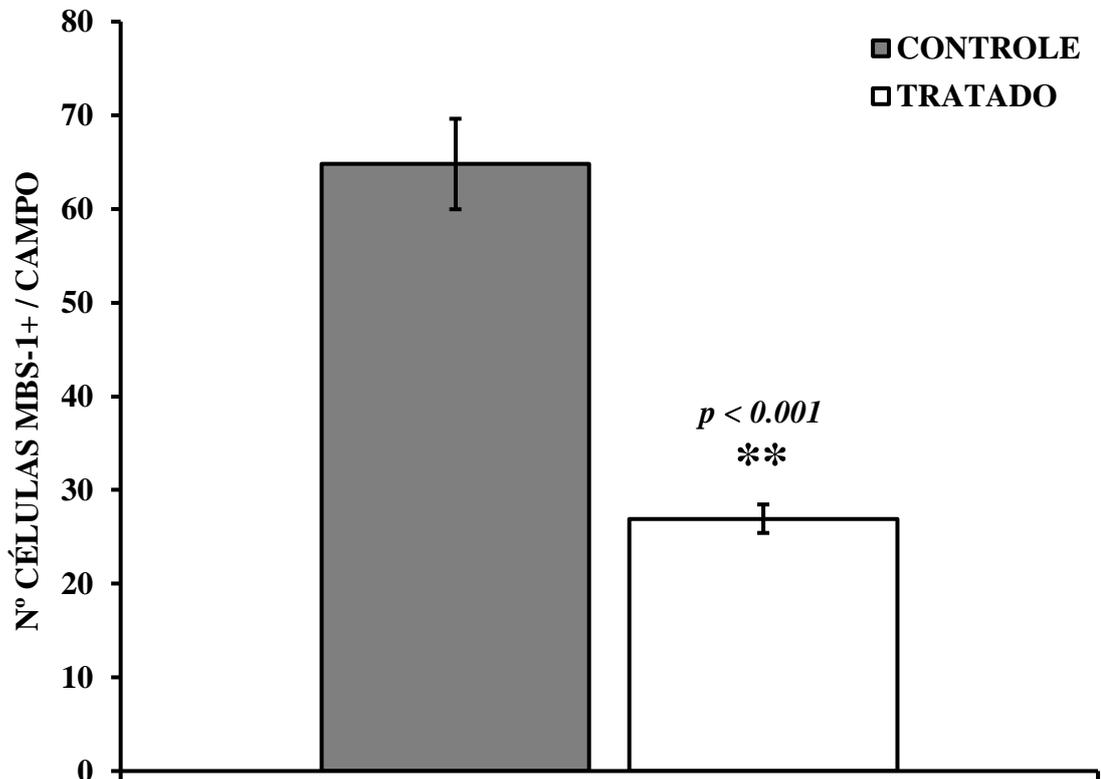


Figura 12. Redução do número de neutrófilos em animais tratados com extrato de cipó-pucá. O número de neutrófilos foi significativamente menor nos animais tratados em comparação aos animais controle (** $p < 0.001$ – teste t de Student).

3.3.2 Análise De Células Microgliais Ativadas

A análise qualitativa demonstrou uma redução de células microgliais ativadas em animais tratados quando comparado aos animais controle (Figura 13). No grupo controle o número de células por campo de contagem foi de $60,07 \pm 3,38$. No grupo tratado houve redução

deste quantitativo para $31,07 \pm 0,91$ (Figura 14). Essa redução no número de células CD68+/campo de contagem sugere uma possível atividade anti-inflamatória do extrato de cipó-pucá após LAME. Tal redução no número de macrófagos/micróglia pode ter atenuado os mecanismos secundários deletérios provocados pela inflamação que promovem uma série de eventos prejudiciais.

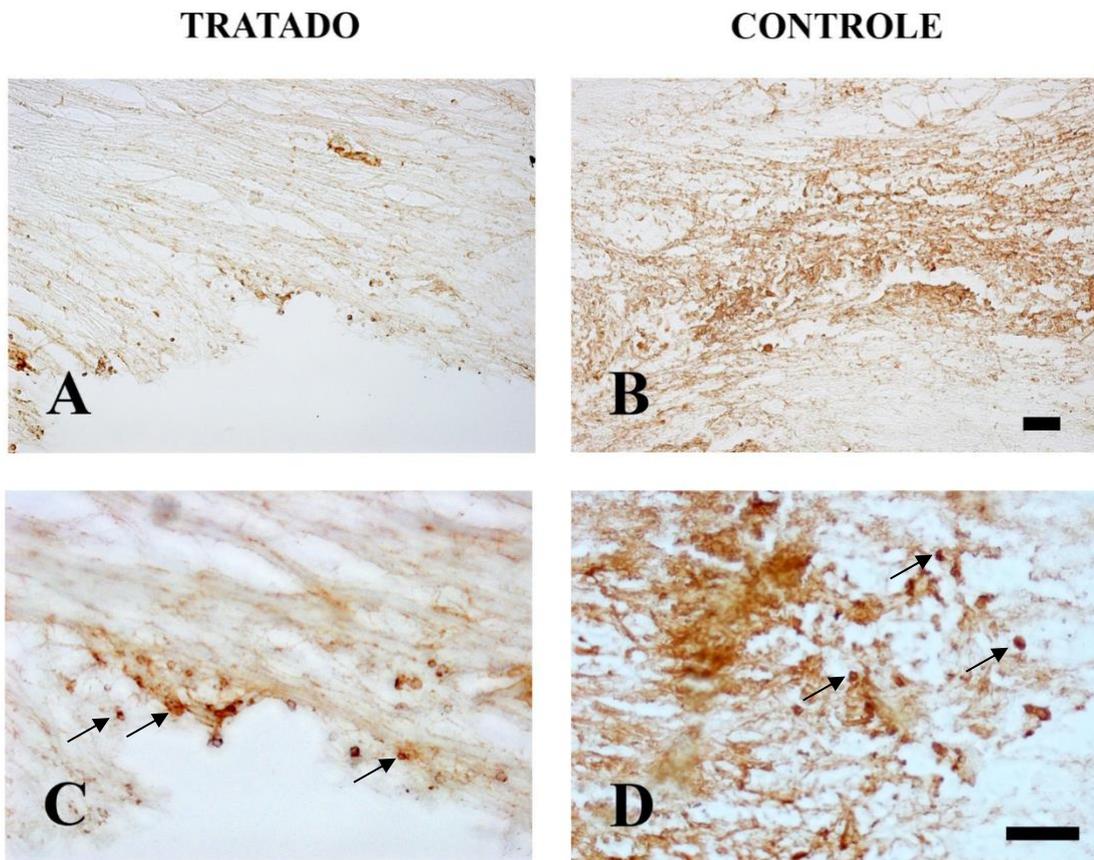


Figura 13. Análise qualitativa de células microgliais ativadas na área da lesão demonstrando uma diminuição do número dessas células. As setas apontam para as células marcadas. Escala = 50 μ m

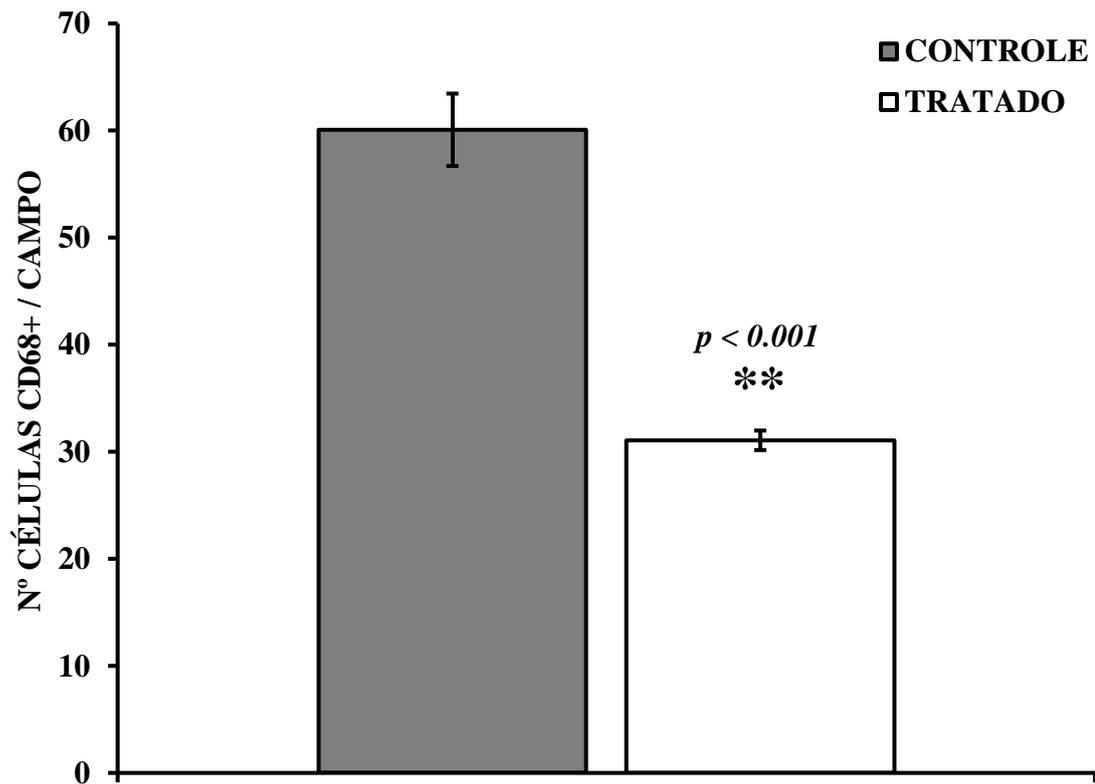


Figura 14. Análise quantitativa de células CD68 por campo de contagem em ratos tratados com extrato de cipó-pucá foi significativamente menor se comparado ao grupo controle. (** $p < 0.001$ – teste t de Student).

4 DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO DE LESÃO MEDULAR

A fim de aprofundar o estudo da fisiopatologia e testar novas estratégias terapêuticas para LAME, a maioria das pesquisas aplicam modelos experimentais por contusão ou compressão, haja vista, que estas são as principais causas desse tipo de lesão em humanos. Nestes casos, roedores são os animais de experimentação mais utilizados e as secções podem ser completas ou parciais (NOUT, *et al.*, 2012; ANWAR; AL SHEBABI; EID, 2016).

Com o objetivo de investigar os efeitos do extrato supercrítico de cipó-pucá (*C. verticillata*), o modelo experimental utilizado no presente estudo foi a hemissecção da medula no segmento torácico, nível da vértebra T8, da medula espinhal de ratos adultos. Este modelo tem sido utilizado devido não necessitar de aparatos rebuscados e por ser relativamente simples de ser implementado (MILLS *et al* 2001; FONSECA, 2013; SOUZA, 2017). A técnica realizada para LAME foi efetiva ao promover formação de cavitação, intenso infiltrado inflamatório e ativação microglial no local onde a lesão foi induzida, portanto, é um modelo útil para o propósito desta investigação (Figura x).

As lesões na medula espinhal induzem intensa resposta inflamatória local (HALL & SPRINGER, 2004; GOMES-LEAL *et al.*, 2004; GOMES-LEAL *et al.*, 2005; FLEMING *et al.*, 2006; SOUZA, 2017), o que resulta na ativação de macrófagos e microglia. Estudos demonstram que, nesse contexto, a apoptose é um fator que contribui para a perda celular após a LAME (EMERY *et al.*, 1998; YONG *et al.*, 1998; BEATTIE; FAROOQUI; BRESNAHAN, 2000; HALL; SPRINGER, 2004). Este estudo demonstrou que no grupo tratado com extrato supercrítico de cipó-pucá o número de células apoptóticas foi menor quando comparado ao controle.

Após este tratamento, também observou-se diminuição da ativação microglial e, conseqüentemente, preservação neuronal. Resultados semelhantes foram observados em ratos submetidos à hemissecção utilizando terapia celular – um tratamento promissor, porém, com custos elevados devido a necessidade de cultivo destas células em laboratório (FONSECA *et al.*, 2013; SOUZA, 2017). No presente trabalho, o tratamento com uma dose de extrato supercrítico de cipó-pucá na concentração de 50 mg/kg foi eficaz em reduzir de maneira significativa ($p > 0.001$) a ativação de macrófagos/microglia, células apoptóticas, infiltração de neutrófilos e, conseqüentemente, preservação neuronal. Embora resultados promissores tenham sido encontrados, o tempo de sobrevida analisado no presente estudo foi 24h.

Em lesões medulares, as células microgлияis têm papel dual e estão diretamente envolvidas na fisiopatologia da lesão secundária (ZHOU, HE, & REN, 2014). Pesquisas anteriores demonstraram que a redução da infiltração de macrófagos diminui o dano tecidual secundário (POPOVICH, WEI, & STOKES, 1997). Neste contexto, os macrófagos derivados do sangue migram para o centro da lesão, enquanto que as células microgлияis ativadas ficam nas bordas e tem a função de isolar a lesão e bloquear o alastramento do dano. As células ativadas que migram para o centro da lesão fazem a fagocitose de células apoptóticas e necróticas, além dos debris do tecido, tais como debris da bainha de mielina e outros elementos (DAVID & KRONER, 2011).

As células microgлияis apresentam forma ramificada quando encontram-se em repouso e assumem característica amebóide e migratória ao serem ativadas. Elas podem desempenhar uma ação negativa ou positiva no tecido medular lesionado ao liberarem radicais livres, fatores de crescimento e citocinas pró e anti-inflamatórias minutos após a LAME ter ocorrido (GOMES-LEAL *et al.*, 2004; OYINBO, 2011). Além disso, a microgлия também contribui para a perda de tecido não afetado e, consequentemente, ocasionando o aumento da área lesionada já que a ativação e proliferação dessas células pode implicar em indução de apoptose e necrose em células do tecido adjacente à lesão, liberação de fatores neurotóxicos e intensificação da resposta inflamatória (ANWAR; AL SHEBABI; EID, 2016).

De acordo com a expressão de alguns marcadores de membrana celular, enzimas intracelulares e moléculas secretadas, as células microgлияis podem ser classificadas em dois fenótipos distintos M1 e M2 (ZHOU, HE, & REN, 2014; SHECHTER & SCHWARTZ, 2013). M1 e M2 são os dois primeiros subgrupos celulares a chegar à área de lesão e, dependendo do fenótipo e do estado de ativação dos macrófagos/microgлия, eles podem exacerbar o dano secundário ou iniciar a reparação tecidual (GOMES-LEAL, 2012). Tem-se demonstrado que os fenótipos e funções dos macrófagos na lesão medular podem mudar de acordo com o microambiente da lesão (STOUT & SUTTLES, 2004; MENZIES, HENRIQUEZ, ALEXANDER, & ROBERTS, 2009). As células microgлияis M1 (CD-86+) e M2 (arginase-1+) permanecem no centro da lesão durante a primeira semana após o evento traumático, porém, em camundongos, apenas o fenótipo M1 permanece até 28 dias após a lesão. Outros dados também sugerem que a fagocitose de restos teciduais feita pelos macrófagos pode ser detectada até 1 a 2 semanas após lesão (ZHOU, HE, & REN, 2014; ULNDREAJ *et al.*, 2016).

Pelo fato do processo inflamatório ter um papel crítico na fisiopatologia da LAME, no presente estudo realizou-se a análise imunohistoquímica de micrógлияs ativadas através da marcação da proteína CD-68. Embora tenha-se observado redução no número destas

células no sítio e nas regiões adjacentes a lesão no grupo tratado com extrato supercrítico de cipó-pucá, o que caracteriza um possível efeito antiinflamatório desse extrato, não é possível descrever com detalhes os seus mecanismos de ação, sendo necessários estudos posteriores para elucidar os mecanismos de ação envolvidos.

4.2 UTILIZAÇÃO DE FITOTERÁPICOS NO TRATAMENTO DE LESÕES AGUDAS DO SNC

Em virtude da ausência de um tratamento eficaz para LAME, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de investigar os efeitos terapêuticos de plantas medicinais com potencial fitoterapêutico em lesões agudas do SNC.

Penha (2016), investigou os possíveis efeitos neuroprotetores e/ou anti-inflamatórios do extrato supercrítico de gergelim (*Sesamun indicum L.*) em tempos agudos (1, 3 e 7 dias) após lesão experimental da medula espinhal (ME) de ratos adultos. Neste estudo observou-se que o tratamento com extrato de gergelim foi capaz de induzir preservação tecidual, diminuição considerável de recrutamento de neutrófilos e diminuição da ativação microglial/macrofágica. No presente trabalho, resultados semelhantes a este também foram encontrados (Figura 12 e 14).

Guimarães *et al* (2012) analisaram o efeito anti-inflamatório e neuroprotetor do óleo resina de copaíba (ORC) em um modelo de lesão isquêmica excitotóxica com NMDA em animais experimentais. Eles demonstraram que o tratamento com ORC promoveu a diminuição do infiltrado inflamatório, da cavitação tecidual, de microglia/macrófagos ativados, infiltrado de neutrófilos, células polimorfonucleares e perda tecidual. Botelho *et al.* (2015) testaram o efeito do extrato supercrítico de copaíba em modelo de AVC experimental induzido por microinjeções de endotelina-1 (ET-1) no cérebro de ratos. Os resultados de análises histológicas e imunohistoquímicas sugerem que o extrato obtido a 60 °C e 20 MPa tem efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores – metodologia semelhante a esta foi utilizada para a obtenção do extrato supercrítico de cipó-pucá usado no presente estudo.

Os possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato supercrítico de *Cissus veticillata* foi investigado por Costa *et al* (2018) em ratos adultos submetidos a lesão aguda induzida por endotelina-1 (ET-1) no córtex motor. Neste trabalho foi observado uma redução exacerbada da resposta inflamatória e os autores propuseram que o extrato supercrítico de cipó-pucá poderia induzir neuroproteção. Os resultados apresentados no presente estudo corroboram com os achados descritos na literatura, demonstrando os possíveis efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato supercrítico de cipó-puca.

4.3 POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO EXTRATO DE CIPÓ-PUCÁ

Na medicina popular o cipó-pucá é utilizado na forma de chá das folhas para o tratamento da diabetes, como anti-inflamatório, antiepilético, anti-hipertensivo, anti-térmico, anti-ireumático, anti-gripal e contra infecções respiratórias (BRAGA *et al.*, 2007).

Silva *et al* (1996), realizaram estudo toxicológico e farmacológico dos extratos fluídos de *Cissus sicyoides* L. e não encontraram atividade tóxica. Barbosa *et al* (2002), determinaram o perfil cromatográfico da fração acetato de etila obtida após hidrólise de extrato aquoso (EAq) de cipó-pucá e descrevem a presença de três flavonoides (canferol, luteolina e luteolina-3'-sulfato).

A literatura apresenta uma ampla descrição sobre a atividade anti-inflamatória dos flavonoides, os quais atuam modulando células envolvidas com a inflamação, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico (iNOS) (MACHADO *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2009).

Com base nestes dados, pode-se sugerir que o tratamento com extrato supercrítico de cipó-pucá promove redução do infiltrado de neutrófilos e ativação de macrófagos/micróglia o que pode atenuar os mecanismos secundários deletérios provocados pelo processo inflamatório. Como consequência, tem-se diminuição do número de células apoptóticas e maior sobrevivência de células neuronais caracterizando o seu efeito neuroprotetor (Figura 16). Contudo, investigações futuras são necessárias para elucidar os mecanismos de ação do extrato supercrítico de cipó-pucá e comprovar esta hipótese.

5 CONCLUSÃO

O objetivo da presente pesquisa foi investigar o efeito neuroprotetor do extrato supercrítico de cipó-pucá (*C. verticillata*) em animais submetidos a lesão aguda da medula espinhal a nível T8 com tempo de sobrevivência de 24 horas. Os resultados demonstram que o tratamento foi capaz de reduzir a resposta inflamatória, demonstrada pela redução de neutrófilos e número de células inflamatórias (microglia) ativadas no grupo tratado comparado ao controle. Houve também diminuição significativa do número de células apoptóticas e maior preservação neuronal. Tais resultados sugerem que o extrato de cipó-pucá apresenta atividade anti-inflamatória e neuroprotetora observados logo após a lesão aguda da medula espinhal.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, C. S. Traumatic spinal cord Injury. **Nature Reviews Disease Primers**. v.3. 2017.
- AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. A. S. Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.
- ANDRADE, Maria João; GONÇALVES, Sofia. Traumatic spinal cord injury: neurologic and functional recovery. **Acta medica portuguesa**.
- ANWAR, M. Akhtar; AL SHEHABI, Tuqa S.; EID, Ali H. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury. **Frontiers in cellular neuroscience**,
- BAINS, M., HALL E.D. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochim Biophys Acta*. p. 10, 2011.
- BARBOSA, Wagner LR *et al.* Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.
- BARBOSA, Wagner LR *et al.* Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.
- BAREYRE, Florence M.; SCHWAB, Martin E. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. **Trends in neurosciences**.
- BEATTIE MS, FAROOQUI AA, BRESNAHAN JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. **J Neurotrauma**. 2000.
- BOTELHO, José Rafael S. *et al.* Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. **The Journal of Supercritical Fluids**.
- BRACKEN, M. B.; HOLFORD, T. R. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *Journal of Neurosurgery*. 1993.
- BRAGA, Tatiane Vieira *et al.* Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & CE Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. 2007.
- BRAGA, Tatiane Vieira. Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & CE Jarvis subsp. *verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante. 2008.
- BRUNI, Denise Stela *et al.* Physiopathological aspects and nursing care on rehabilitation of patient with spinal cord Injury. 2004.
- BRUNI, J. E. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. **Microsc Res Tech**, v. 41, n. 1, p. 2-13, 1998.

BURDA, J. E.; BERNSTEIN, A. M. e SOFRONIEW, M. V. Astrocyte roles in traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 275 Pt 3, n. p. 305-315, 2016.

BYDON, Mohamad *et al.* The current role of steroids in acute spinal cord injury. **World neurosurgery**, v. 82, n. 5, p. 848-854, 2014.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A. e O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **J Neuroinflammation**, v. 11, n. p. 98, 2014.

CHVATAL, Stacie A. *et al.* Spatial distribution and acute anti-inflammatory effects of methylprednisolone after sustained local delivery to the contused spinal cord. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1967-1975, 2008.

COELHO-FERREIRA, Márlia. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159-175, 2009.

COSTA, Jonabeto Vasconcelos *et al.* Efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato (scco2) de cipó-pucá (*Cissus verticillata*) após isquemia focal induzida por microinjeções de endotelina-1 (et-1) no córtex motor de ratos adultos. 2018.

COUTINHO, Marcela AS; MUZITANO, Michele F.; COSTA, Sônia S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L. e GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 752-758, 2005.

DAVID, S., & KRONER, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2011.

DEFINO, H. Trauma raquimedular. **Medicina** (Ribeirão Preto. Online), v. 32, n. 4, p. 388-400, 30 dez. 1999.

DOBKIN & HAVTON, Basic Advances and New Avenues in Therapy of Spinal Cord Injury 2004.

DOULAMES, Vanessa M.; PLANT, Giles W. Induced Pluripotent Stem Cell Therapies for Cervical Spinal Cord Injury. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 4, p. 530, 2016.

DO VALE RAMOS, Renato Carlos; ALEGRETE, Nuno. The role of pharmacotherapy in modifying the neurological status of patients with spinal and spinal cord injuries. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 50, n. 6, p. 617-624, 2015.

EMERY, E. *et al.* Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, 89(6):911-920. 1998.

FAROOQUI, A. A., ONG, W.-Y., & HORROCKS, L. A. Neurochemical Aspects of Excitotoxicity. Ohio State University Publication. 2008.

FALAVIGMA, Asdrubal. Epidemiology and Management of Spinal Trauma in Children and Adolescents <18 Years Old. **World Neurosurgery**. v.110, n. p.479-483, 2018.

FERNANDEZ-CASTANEDA, A. e GAULTIER, A. Adult oligodendrocyte progenitor cells - multifaceted regulators of the CNS in health and disease. **Brain Behav Immun**, v. n. p. 2016.

FÓRUM DA COMUNIDADE DE LESÃO DA MEDULA ESPINHAL. **Escala De Impairment Da American Spinal Injury Association (ASIA)**. New Brunswick, NJ, EUA, 2011.

FRANCO, ECS. Resposta inflamatória e neuroproteção após transplante endovenoso de células tronco da medula óssea em ratos submetidos à isquemia focal do córtex motor. In: **Instituto de Ciências Biológicas, ICB, p 109. Belém: Universidade Federal do Pará**. 2009.

GARCIA, E. *et al.* Cytokine and growth factor activation in vivo and in vitro after spinal cord injury. **Mediators of inflammation**, v. 2016.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C. e GAGE, F. H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918-934, 2010.

GOODKIN E CAMPBELL, Sequential pathologic changes in spinal cord injury: a preliminary report, 1969.

GOMES-LEAL, Wallace. *et al.* Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Experimental neurology**, v. 190, n. 2, p. 456-467, 2004.

GOMES-LEAL W, CORKILL, D.J., PICANÇO-DINIZ, C.W., PERRY, V.H. Systematic analysis of axonal damage and its possible correlation with inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Res**. 2005.

GEISLER, F.H.; DORSEY, F.C.; COLEMAN, W.P. Past and current clinical studies with gm-1 ganglioside in acute spinal cord injury. *Ann. Emerg. Med.*, v.22, n.6, p.1041-1047, 1993.

GREVE, JMDA. Reabilitação da lesão da medula espinal. In: Nitrini R. A neurologia que todo médico deve saber. São Paulo: Maltese/Santos; 1991.

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain Behav**, v. 2, n. 3, p. 345-56, May 2012.

GUIMARAES-SANTOS, A. *et al.* Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 918174, 2012.

HALL, E. D. *et al.* Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 9 Suppl 2, n. p. S425-442, 1992.

HALL ED, BRAUGHLER JM (1981). Acute effects of intravenous glucocorticoid pretreatment on the in vitro peroxidation of cat spinal cord tissue. **Exp Neurol**, 73:321-324.

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

HAINS, Bryan C.; WAXMAN, Stephen G. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 16, p. 4308-4317, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0003-06.2006>>

HANKIN, M.H.; MORSE, D.E.; BENNETT-CLARKE, C.A. Anatomia clínica. Uma abordagem por estudos de casos. Artmed AMGH Editora Ltda: Porto Alegre: 2015.

HAUWEL, M.; FURON, E.; CANOVA, C.; GRIFFITHS, M.; NEAL, J. e GASQUE, P. Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 48, n. 2, p. 220-233, 2005.

HOU, X., HE, X., & REN, Y. (15 de October de 2014). Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**, pp. 1787-1795.

HULSEBOSCH, C. E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. **Advances in physiology education**, pp. 238-255, 2002.

KABU, Shushi *et al.* Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 141-154, 2015.

KANDEL, Eric. *at al.*; Tradução: Ana Lúcia Severo Rodrigues *et al.* Princípios de Neurociências. 5 ed.-Porto Alegre: AMGH, 2014

KWON, B. K. *et al.* Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. **The Spine Journal**: 451-464 p. 2004.

LI, S., & STYS, P. K. (2000, February 1). Mechanisms of Ionotropic Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxicity in Isolated Spinal Cord White Matter.

LIMA, Rafael Rodrigues *et al.* Degeneração neuronal secundária e excitotoxicidade. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 1, p. 27-31, 2007.

LIZAMA, R. S.; MARTINEZ, M. M. & PEREZ, O. C. 2000. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (Bejuco-ubí). **Revista Cubana Farma**. v. 34, n. 2, p.120-140.

LUNDY-EKMAN, Laurie. Neurociência fundamentos para reabilitação. **Elsevier**. Brasil, 2008.

MACHADO, Hussein *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v.27, n.1/2, p.33-39, 2008.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomy**: text and atlas. 3 ed., New York: Mc Graw-Hill Companies 2003.

MASINI, Marcos. Estimativa de incidência e prevalência de lesão medular no Brasil. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 12, n. 2, p. 97-100, 2001.

MATUTE, C. Calcium dyshomeostasis in white matter pathology. **Cell Calcium**, v. 47, n. 2, p. 150-157, 2010.

MARTINO, G.; FURLAN, R.; COMI, G. e ADORINI, L. The ependymal route to the CNS: an emerging gene-therapy approach for MS. **Trends Immunol**, v. 22, n. 9, p. 483-490, 2001.

MCDONALD JW, SADOWSKY C (2002). Spinal-cord injury. **Lancet**; 359(9304):417-25.

MILLS, Charles D. *et al.* Strain and model differences in behavioral outcomes after spinal cord injury in rat. **Journal of neurotrauma**, v. 18, n. 8, p. 743-756, 2001.

MENZIES, F., HENRIQUEZ, F., ALEXANDER, J., & ROBERTS, C. (2009). Sequential expression of macrophage anti-microbial/inflammatory and wound healing markers following innate, alternative and classical activation. **Clinical and Experimental Immunology**, pp. 369–379.

MOTHE, A. J., & C. H. (2012, November). Advances in stem cell therapy. **The Journal of Clinical Investigation**, pp. 3824–3834.

MOTHE, A. J., & TATOR, C. H. Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury. **International Journal of Developmental Neuroscience**, pp. 701–713., 2013

NAHAR, Lutfun; SARKER, Satyajit D. Supercritical fluid extraction. **Natural Products Isolation**, p. 47-76, 2005.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F. e HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, 2005.

NOGUEIRA, P.C. Perfil de pacientes com lesão traumática da medula espinhal e ocorrência de úlcera de pressão em um hospital universitário. **Rev. Latino-Am. Enfermagem** vol.14 no.3 Ribeirão Preto maio/junho. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Spinal Cord Injury**, 2013.

OYINBO, Charles Aidemise. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. **Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars)**, v. 71, n. 2, p. 281-99, 2011.

PADILLA-ZAMBRANO, Huber. Pathophysiology of spinal trauma. **Rev. Mexicana de Neurociência**. v. 18, n. 5, p.46-52, 2017.

PASSIAS, Peter. Traumatic Fractures of the Cervical Spine: Analysis of Changes in Incidence, Cause, Concurrent Injuries, and Complications Among 488, 262 Patients from 2005 to 2013. **World Neurosurgery**, V.110, P.427-437, 2018.

PEDRAM, H., REZA, Z. M., REZA, R. M., VACCARO, A. R., & VAFA, R.-M. Spinal fractures resulting from traumatic injuries. **Chinese Journal of Traumatology**, pp. 39. 2010.

PELZER, E. L. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**. v. 53, p. 421-424, 1998.

PENHA, Nelson Elias Abrahão da *et al.* Efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do extrato de gergelim (*Sesamum indicum* L.) em um modelo experimental de lesão aguda da medula espinhal de ratos. 2016.

PEREIRA, Edmundo Luis Rodrigues; GOMES, Alzira Leite; RODRIGUES, Daniella Brito. Epidemiologia do traumatismo raquimedular por projéteis de armas de fogo em um hospital de referência no estado do Pará. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery**, v. 34, n. 01, p. 013-019, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1547384>>.

PIERRI, F.A. et al. Copaiba oil (*Copaifera* sp.): history, extraction, industrial applications and medicinal properties. **Rev. bras. plantas med.** vol.11 no.4 Botucatu. 2009.

PIROUZMAND, F. (2010, February). Epidemiological trends of spine and spinal cord injuries in the largest Canadian adult trauma center from 1986 to 2006. **Journal of Neurosurgery: Spine**, pp. 131–140.

POPOVICH, P., WEI, P., & STOKES, B. (1997). Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. **The Journal of Comparative Neurology**, pp. 443-464.

RANSOM, B.; BEHAR, T. e NEDERGAARD, M. New roles for astrocytes (stars at last). **Trends Neurosci**, v. 26, n. 10, p. 520-522, 2003.

ROSS BM, MOSZCZYNSKA A, ERLICH J, KISH SJ. Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimers disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A2 activity. **J Neurochem**. 1998.

SALAZAR, M. A. R. *et al.* Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, p. 36-45, 2018.

SANIVARAPU, Raghavendra; VALLABHANENI, Vijayalakshmi; VERMA, Vivek. The Potential of Curcumin in Treatment of Spinal Cord Injury. **Neurology Research International**, v. 2016, 2016.

SANTOS, Ravelly Lucena *et al.* Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

- SASTRY & RAO, Apoptosis and the nervous system. **Journal of Neurochemistry**. 2000.
- STOUT, R., & SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **Journal of Leukocyte Biology**, pp. 509-513. 2004.
- SILVA, Geraldo Alves da *et al.* Padronização dos extratos de *Cissus sicyoides* L.(Insulina vegetal) e identificação de carotenos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 1, p. 96-112, 1996.
- SILVA, Nuno A. *et al.* From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. **Progress in neurobiology**, v. 114, p. 25-57, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.002>>.
- STANFORD, SC (2007) The Open Field Test: reinventing the wheel. **Journal of psychopharmacology** (Oxford, England) 21:134-135.
- SOUZA, C.C. Comparative Therapeutic Effects of Minocycline Treatment and Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation following Striatal Stroke. **Journal Oxid Med Cell Longev**. 2017.
- SHECHTER & SCHWARTZ, Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. **Journal Immunity**. v.38. 2013
- TOSOLINI, Andrew P. *et al.* Viral-mediated gene therapy for spinal cord injury (SCI) from a translational neuroanatomical perspective. **Neural Regeneration Research**, v. 11, n. 5, p. 743, 2016.
- TATOR, C.H. Acute spinal cord injury: analysis of epidemiologic factors. **Journal Can J Surg**. v. 22. 1979.
- TATOR CH, FEHLINGS MG (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **J Neurosurg** 75:15-26.
- TATOR CH, KOYANAGI I (1997) Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. **J Neurosurg**, 86: 483-492.
- ULNDREAJ, Antigona *et al.* Modulating the immune response in spinal cord injury. **Expert views in Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 1-3, 2016.
- VEIGA, J. O gênero *copaifera* L. **Journal Química Nova**, v. 25. 2002
- VERONEZ, Djanira Aparecida da Luz; REGATTIERI, Neysa Aparecida Tinoco. Abordagem morfofuncional do sistema nervoso central. 2012.
- VIANA, GS; Medeiros, AC; Lacerda, AM; Leal, LK; Vale, TG; Matos, FJ (2004) Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC pharmacology** 4:9.
- VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 365-75, May 2003.

WALSH RN, Cummins RA (1976) The Open-Field Test: a critical review. **Psychological bulletin** 83:482-504.

WALKER & HARRIS, GM-1 ganglioside administration combined with physical therapy restores ambulation in humans with chronic spinal cord injury. **Journal Neuroscience Letters**, v. 161. 1993.

XU, Jun *et al.* Angelica Sinensis attenuates inflammatory reaction in experimental rat models having spinal cord injury. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 6, p. 6779, 2015.

YONG ET AL, Boron neutron capture therapy of brain tumors: functional and neuropathologic effects of blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of sodium borocaptate and boronophenylalanine. **J Neurooncol**, v. 48. 2000.

ZENG, Y. Snx27 Deletion Promotes Recovery From Spinal Cord Injury by Neuroprotection and Reduces Macrophage/Microglia Proliferation. **Journal Front Neurol**, v. 9. 2018.

ZHOU, Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. **Journal. Neural Regen Res**, v.9. 2014.