

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DO TRATAMENTO ORAL COM PRÓPOLIS
VERMELHA E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO SOBRE A
LESÃO MEDULAR EM RATOS.**

FANILDES SILVA MORAES DOS SANTOS

ARACAJU
ABRIL - 2013

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DO TRATAMENTO ORAL COM PRÓPOLIS
VERMELHA E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO SOBRE A
LESÃO MEDULAR EM RATOS.**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

FANILDES SILVA MORAES DOS SANTOS

Orientador (es)

**Margarete Zanardo Gomes, Profa. Dra.
Juliana Cordeiro Cardoso, Profa. Dra.**

ARACAJU
ABRIL – 2013

**OS AUTORES PERMITEM A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES
DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS
ACADÊMICOS OU CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA**

S231e Santos, Fanildes Silva Moraes dos

**Efeitos do tratamento oral com própolis vermelha e exercício de
natação sobre**

**a lesão medular em ratos. / Fanildes Silva Moraes dos Santos;
orientadores:**

**Margarete Zanardo Gomes, Juliana Cordeiro Cardoso. – Aracaju,
2013.**

EFEITOS DO TRATAMENTO ORAL COM PRÓPOLIS VERMELHA E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO SOBRE A LESÃO MEDULAR EM RATOS.

FANILDES SILVA MORAES DOS SANTOS

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE**

Aprovada por:

**Margarete Gomes Zanardo, D. Sc.
Orientadora**

**Juliana Cordeiro Cardoso, D. Sc.
Orientadora**

**Ricardo Luiz C. de Albuquerque Júnior, D. Sc.
Examinador**

**Waldecy de Lucca Junior, D. Sc.
Examinador**

**Edna Aragão Farias Cândido, D. Sc.
1º Suplente**

**Leonardo Rigoldi Bonjardim, D. Sc.
2º Suplente**

ARACAJU
ABRIL-2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que mais amo nesta vida...

... a minha mãe Elisete, pela dedicação e seu amor incondicional. Por ser meu maior exemplo de vida e dos verdadeiros valores para a vida. Minha guerreira predileta.

... ao meu pai Pedro, que apesar de não ser instruído e não possuir recursos para investir em meus estudos usou sabiamente os atributos que lhe eram acessíveis para me estimular e incentivar a busca pelo conhecimento.

... ao meu esposo Jailson, por sua paciência, compreensão e amor. Por ter mesmo do seu jeito torto, me direcionado cada vez mais nessa conquista. Por me encorajar sempre e conseguir enxergar em mim força e capacidade que nem eu mesma conheço.

... ao meu filho João Pedro, por seu amor e carinho que amplia meus horizontes, por me apoiar e incentivar sempre, além de estar sempre disposto a perdoar minha ausência.

... a um serzinho muito especial que eu nem conheço ainda, mas que já faz transformações gigantescas em minha vida, em meu corpo físico rsrs, meu modo de pensar e de agir. Que está dando um novo colorido a minha vida. Alice, você também já faz parte desta conquista minha pequena.

... aos meus irmãos, Angélica, Anderson, Marcelo e Hugo pelo carinho, amor e a coragem com que me estimulam a seguir os meus sonhos.

... a vocês família, que foram especiais e essenciais em minha vida...

Fé é acreditar no que você não vê.
A recompensa dessa fé é ver o que
você acredita.

Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata as alunas **Débora** e **Tâmara** por terem sido extremamente dedicadas, por facilitarem um trabalho árduo de dois anos e principalmente por estarem sempre dispostas às exigências que a pesquisa impôs. Vocês foram simplesmente brilhantes, perfeitas... Meu mais puro e sincero muito obrigado!!

A professora **Juliana Cordeiro Cardoso** minha profunda admiração pela maneira como se entrega ao conhecimento e a orientação de seus alunos, pela coragem de desbravar caminhos, pelo empenho em fazer o melhor na pesquisa. Sempre estive e sempre vou estar muito orgulhosa por estar incluída em sua coleção de alunos. Um dia, se tiver coragem, quero ser igual a você. Muito, muito obrigada de verdade.

Especialmente a professora **Margarete Zanardo Gomes** pela presteza, dedicação, competência, e principalmente pelo voto de confiança, pela paciência e responsabilidade a mim depositada. Pelas experiências e oportunidades com as quais muito aprendi. Por ter sido firme e sábia sempre, por ser pacificadora em momentos de angústias, pela orientação rica e concisa. Obrigada por todos os sins e todos os sábios nãoos. Por ser a precursora de tudo e acreditar que seria possível, por ter tornado esse sonho e sua dura e intensa realização apaixonante. Merece todo o meu carinho, respeito e admiração. Devo esse momento a você!!

Sou eternamente grata a Professora **Ana Paula Belizário** por ter me encorajado e exposto possibilidades, por mostrar que após a curva havia sim estrada. Aos professores do mestrado em Saúde e Ambiente da Unit que mostraram com muita perspicácia a difícil e incrível arte de ser mestre. Em especial a professora **Edna Aragão** por estar sempre disposta as correções deste trabalho.

Agradeço do fundo do meu coração aos amigos (as) **Sheilla Barroso, Ângela Valéria, Hatamy, Tássia Luisa, Rafaela, Lucas Emanuel, Daniele Albuquerque, Rafael, Genecy e Cleveilton** pela ajuda constante sempre que necessária, pela amizade sincera, por todas as experiências vivenciadas, por terem sido amigos de fé e meus parceiros durante estes dois anos. Cultivemos sempre essa amizade. A **Rose Nely**, pelos sábios conselhos e companheirismo, pela força que retira não se sabe de onde para ajudar a quem precisa. Pela dedicação e ajuda na histologia e confecção das lâminas.

A amiga **Camila Dantas** exemplo de dedicação, força, coragem, superação e amizade. Obrigada amiga por cada momento que passamos, por cada angústia que dividimos. Seu carinho tornou a batalha mais leve. Ainda faltam algumas batalhas, mas certamente, com a graça do pai venceremos. Te admiro muito, e torço muito pelo seu sucesso!!!

Meu muito obrigada a todos os colegas do laboratório LMBE que sempre foram muito simpáticos e gentis. Foi muito bom estar com vocês. Aos colegas de turma que de alguma forma deram um pouquinho de si para o meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal em especial **Weber, Reinaldo, Andréia Poschi, Catharina, Marismar e Isana**. Aos funcionários do biotério da Unit pela amizade, zelo, carinho e profissionalismo incontestável a mim direcionado. Ao professor **Waldecy de Luca Junior** pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar sempre que solicitado. A **caps** pelo apóio financeiro. Aos **ratos wistar**...

Um agradecimento sincero e especial ao professor **Ricardo Luiz Cavalcante de Albuquerque Junior**, que já me despertou medo, substituído por respeito agregado a muita admiração e carinho. Muito obrigado por tudo prof., principalmente por ter tido significado expressivo nesta formação, diante das atitudes que fundamentam o profundo amor com o qual se dedica aos papeis de professor e pesquisador. Por ter sido mestre quando deveria ser professor e amigo quando deveria ser mestre. Por ter sido totalmente disponível e acessível, e ser simplesmente a pessoa que é: professor extraordinário, ser humano impar, um colecionador de pessoas e de virtudes, além de estimulador de carreiras. Ter te conhecido fez toda a diferença em minha formação. Para mim, você é a forma humana e a tradução do verdadeiro significado da palavra Mestre. Parabéns e mais uma vez muito obrigada!!!

Agradeço a **Deus** por ter me dado forças e me guiado. Por em sua infinita bondade ter colocado em meu caminho pessoas especiais e importantes para esta conquista. Pessoas que deixaram contribuições valiosas e direcionamentos exemplares para minhas atitudes futuras, além de ajudarem a transformar uma idealização na mais completa realização.

Obrigada meu Deus pela honra e pela glória de todo aprendizado concedido!!

*Porque,
“mestre não é só quem sempre
ensina,
mas também, quem derrepente
aprende.”*

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE SÍGLAS E ABREVIACÕES.....	XII
RESUMO.....	XIII
1.0 INTRODUÇÃO.....	15
1.1Objetivos.....	17
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Medula espinal e lesão medular.....	19
2.2 Estratégias(s) Terapêuticas(s) para Lesão Medula.....	26
2.3 Produtos Naturais.....	29
2.4 Própolis.....	31
2.5 PrópolisVermelha.....	35
2.6 Exercício Físico.....	38
3.0 Materiais e Métodos.....	42
3.1 Obtenção da Própolis e Caracterização do extrato.....	42
3.2 Ensáio Biológico.....	44
3.2.1 Animais.....	44
3.2.2 Laminectomia e Lesão Medular.....	45
3.2.3 Tratamentos.....	45
3.2.4 Avaliação histológica.....	47
3.2.5 Análise Estatística.....	48
4.0 Resultados e discussão.....	49
5.0 Conclusão.....	61
6.0 Referências.....	63
Anéxo ou Apêndices.....	77

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	Pg.
Quadro 1: Incapacidades causadas pela lesão medular em função a localização do trauma.	20
Quadro 2: Classificação do Comprometimento neurológico de acordo com a ASIA	21
Tabela 1: Determinação do rendimento da amostra de própolis vermelha.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do mecanismo fisiológico da lesão medular traumática	23
Figura 2: Representação do resultado da atividade antioxidante obtido através do método de sequestro de radicais livres.	52
Figura 3: Resultados do teste de avaliação locomotora pela escala BBB nos tempo 24 horas (A) e 7 (B); 14 (C) e 21 (D) dias após o procedimento cirúrgico de Laminectomia (em cinza) ou hemissecção (em preto). As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. EHPV10 e EHPV50: extrato hidroetanólico de própolis vermelha a 10 e 50 mg/kg, respectivamente; EXE: exercício de natação. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via para o fator tratamento, seguida do pós-teste de Tukey).	54
Figura 4: Secções histológicas do tecido da medula espinal. (A) Secção da medula espinal em menor aumento, mostrando ausência de alterações histológicas no grupo Laminectomia. (A1) Ausência de infiltrado inflamatório na substância cinzenta no mesmo grupo. (A2) Detalhe da substância cinzenta ao redor do canal central da medula, com corpos celulares de neurônios motores. (A3) Detalhe da substância branca, contendo axônios mielinizados algumas células gliais dispersas. (B) Secção da medula espinal, em menor aumento, do grupo LME. (B1) Infiltrado inflamatório pode ser observado na substância cinzenta. (B2) Detalhe da substância cinzenta ao redor do canal medular atrófico, mostrando menor quantidade de corpos celulares de neurônios, infiltrado inflamatório crônico e profuso (rico em linfócitos) e hiperemia de capilares sanguíneos. (B3) Detalhe da substância branca mostrando leve infiltrado inflamatório e algumas alterações edematosas. (C) Menor aumento ilustrando secção do grupo LME/EXE. (C1) Ausência de alterações histológicas visíveis na substância cinzenta. (C2) Detalhe da substância cinzenta ao redor do canal central medular, mostrando apenas leve inflamação e hiperemia. (C3) A substância branca mostra características histológicas habituais. (D) Ilustração de secção do grupo LME/EHPV em menor aumento. (D1) Não são observadas alterações histológicas significantes na substância cinzenta. (D2) Detalhe da substância cinzenta mostrando infiltrado inflamatório moderado e corpos celulares em degeneração ao redor do canal central da medula. (D3) Infiltrado inflamatório leve e alterações	57

edematosas moderadas podem ser observadas na substância branca (HE, aumentos de 40, 100 e 400x).

Figura 5: Número médio de neurônios motores íntegros (A) e em degeneração (B) aos 21 (D) dias após o procedimento cirúrgico de laminectomia ou hemissecção (LME). As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. EHPV10: tratamento com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 10 mg/kg, durante duas semanas; EXE: exercício de natação durante três semanas. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via para o fator tratamento, seguida do pós-teste de Tukey).

59

Figura 6: Número médio de neurônios sensoriais íntegros (A) e em degeneração (B) aos 21 (D) dias após o procedimento cirúrgico de laminectomia ou hemissecção (LME). As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. EHPV10: tratamento com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 10 mg/kg, durante duas semanas; EXE: exercício de natação durante três semanas. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via para o fator tratamento, seguida do pós-teste de Tukey).

61

Figura 7: Resposta inflamatória na medula espinal, onde 1 corresponde a grau leve, 2 corresponde a grau modorrado e 3 grau severo. As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média, encontrados em cada grupo. EHPV10: tratamento com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 10 mg/kg, durante duas semanas; EXE: exercício de natação durante três semanas. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn).

63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ASIA - American Spinal Injury Association
ATP- Adenosina Trisofato
BDNF- Brain Derived Neurotrophic Factor (Fator de Necrose Tumoral Derivado do Cérebro)
CAPE- Ácido fenil éster cafeíco
COBEA- Colégio brasileiro de experimentação animal
COX - Ciclooxygenase
COX 2- Ciclooxygenase induzível
DNA- Ácido desoxirribonucleico
DPPH - 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EHPV - Extrato hidroetanólico de própolis vermelha
ERO's - Espécies reativas de Oxigênio
ISNCSCI - Normas Internacionais para Classificação Neurológica e Funcional da Lesão Medular
ITP - Instituto de Tecnologia e Pesquisa
LME - lesão da medula espinhal
LMET - lesão medular espinhal traumática
NO - óxido nítrico
NOS - Síntese de óxido nítrico
NOSn - Síntese de óxido nítrico neuronal
NSCISC - National Spinal Cord Injury Statistical Center
SNC - Sistema nervoso central
UNIT - Universidade Tiradentes
URSS - União Soviética

EFEITOS DO TRATAMENTO ORAL COM PRÓPOLIS VERMELHA E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO SOBRE A LESÃO MEDULAR EM RATOS.

Fanildes Silva Moraes dos Santos

A lesão da medula espinal (LME) é um problema clínico debilitante de alta incidência, ainda sem tratamentos efetivos. Estratégias terapêuticas têm sido utilizadas no sentido de conter os eventos secundários ao trauma, como inflamação e geração de espécies reativas de oxigênio, e ao mesmo tempo promover o crescimento axonal. Neste sentido, a própolis vermelha apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, enquanto a atividade física pode promover a síntese de fatores de crescimento neurais. Este trabalho propôs-se testar os efeitos do tratamento com o extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV), associado ou não ao exercício de natação, sobre a LME. Os efeitos foram caracterizados após hemissecção unilateral torácica ou laminectomia, seguidas de avaliação da recuperação funcional motora, no 01º, 07º, 14º e 21º dias após a cirurgia. Diariamente, grupos de animais realizaram exercício de natação durante três semanas consecutivas à lesão e/ou receberam EHPV via oral por duas semanas, nas doses de 10 e 50mg/kg. Finalizados os testes de comportamento, procedeu-se à análise histológica do tecido medular espinal para avaliação da morte neuronal e intensidade da inflamação. O extrato foi caracterizado com relação ao rendimento da extração e atividade antioxidante pelo método DPPH. O EHPV, com rendimento de 42%, atingiu o IC50 em 58 µg/ml. Nos resultados comportamentais, um dia após a lesão todos os grupos LME apresentaram déficit motor significativo comparado a laminectomia. Após 07 e 14 dias, os grupos LME tratados com EHPV na dose de 10mg/kg e natação separadamente tiveram efeito significativamente favorável à recuperação da lesão. A partir da terceira semana, todos os tratamentos mostraram-se favoráveis à recuperação funcional de forma significativa. Contudo, o tratamento com EHPV 10mg/kg mostrou ser mais efetivo em acelerar a recuperação funcional motora ($p < 0,05$). A natação reduziu a morte neuronal ($p < 0,05$) e a intensidade da reação inflamatória ($p < 0,05$). Estes efeitos foram mais evidentes associados ao EHPV 10 mg/kg (reação inflamatória leve). Os resultados indicam que a natação e a própolis vermelha 10 e 50 mg/kg favorecem a recuperação funcional, reduzindo morte neuronal e inflamação após LME em ratos.

Palavras-chave: Lesão medular, própolis, exercício físico.

SWIMMING TRAINING AND ORAL ADMINISTRATION OF RED PRÓPOLIS IMPROVE FUNCTIONAL RECOVERY AND REDUCE INFLAMMATORY RESPONSE AFTER RAT SPINAL CORD INJURY

Fanildes Silva Moraes dos Santos

Therapeutic strategies for spinal cord injury have sought to promote axonal growth and reduce the toxic secondary events such as inflammation and oxidative stress. While the physical activity can promote the synthesis of neural growth factors, red propolis presents anti-inflammatory and antioxidant properties. Thus, this study aimed to evaluate the effects of swimming exercise and the oral administration of hydroethanolic extract of red propolis (HERP), administered alone or in association, after spinal cord injury in rats. Animals were subjected to hemisection (SCI) at the thoracic level (T10), or laminectomy. Swimming exercise was performed from 03 days to three consecutive weeks after surgery. HERP (10 and 50 mg/kg) was given orally daily during the first two weeks. The motor recovery was evaluated at 01, 07, 14 and 21 days by using a BBB scale. After tests were completed, the histological analysis was performed in order to measure the neuronal cell death and inflammatory response. Also, it was used the dpph method for the evaluation of the HERP antioxidant activity. The yield of the EHPV was 42% and it was able to sequester 50% of free radicals in a concentration of 58 µg/ml. The behavioral results showed significant motor deficit in all SCI groups at day 01. After 07 days, the groups treated with EHPV (10mg/kg) or exercise alone had significantly motor recovery from injury, as well as 14 days. From the third week, all treatments improved the functional recovery significantly; however, HERP (10mg/kg) alone was the most effective. Concerning the histological analysis, swimming exercise reduced neuronal cell death and the inflammatory response, this effect being more pronounced when associated with EHPV (10 mg/kg). The results indicate that swimming training and HERP improve functional recovery, decrease neuronal cell death and reduce the inflammatory response after SCI in rats.

Key-words: Spinal cord injury, red propolis, Physical exercise.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinal é um problema clínico sério e complexo que resulta na interrupção da comunicação sensorial e motora entre estruturas do sistema nervoso central (SNC) e periférico. Como consequência, observa-se ausência parcial ou total de movimentos voluntários e sensibilidade abaixo do nível da lesão, comprometendo a qualidade de vida dos indivíduos. Dados epidemiológicos estimam que a lesão da medula espinal acometa mundialmente 10.000 pessoas por ano, principalmente homens, adultos jovens em fase produtiva. Em contra partida, em adultos, a reparação das fibras e células que constituem o SNC após lesão da medula espinal é restrita.

Após o trauma inicial, a medula espinal está sujeita a uma série de eventos secundários neurotóxicos como influxo de íons, alterações no fluxo sanguíneo local, processos inflamatórios e geração de espécies reativas de oxigênio. Estes eventos secundários contribuem para a expansão da lesão e ainda dificultam processos de regeneração, contribuindo para a evolução do quadro neurológico.

Diante da complexidade que envolve os eventos fisiológicos após lesão medular, estratégias terapêuticas que possam conter os eventos secundários da lesão e ao mesmo tempo promover o crescimento axonal e recuperar as conexões com as estruturas alvo tem sido objetivo de muitos estudos. Neste sentido, embora não existam tratamentos capazes de reverter completamente os danos neuronais ocasionados pela lesão medular, tem sido demonstrado que a utilização de moléculas bioativas e terapias de reabilitação motora podem gerar condições favoráveis ao crescimento axonal.

Neste contexto, a própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias descritas na literatura. Alguns flavonóides encontrados em amostras de própolis agem em diferentes processos fisiológicos, incluindo aqueles que ocorrem no SNC. Por exemplo, estudos pré-clínicos recentes reportaram a ação neuroprotetora da pinocembrina e da formononetina *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, foi demonstrado que a administração oral do extrato hidroetanólico da própolis chinesa promoveu recuperação funcional e redução da resposta inflamatória em ratos submetidos à lesão medular.

A própolis encontrada na região Nordeste do Brasil apresenta coloração vermelha e propriedades farmacológicas peculiares, como maior ação antioxidante

quando comparada a amostras de outras regiões, que apresentam diferente composição química. A própolis vermelha tem sido alvo de diversos estudos, mas ainda não existem relatos na literatura da utilização deste material como adjuvante no tratamento para minimizar os efeitos da lesão medular.

A atividade física tem sido utilizada como estratégia para a reabilitação de pacientes com trauma da medula espinal. Estudos experimentais demonstraram que ocorre um aumento na síntese de fatores de crescimento neurais e modificações sinápticas, associadas à recuperação funcional motora e sensorial, em roedores submetidos à lesão medular que realizaram treinamento físico aeróbico e de força. Estudos conduzidos em seres humanos mostraram que a atividade física pode favorecer a ativação de sistemas neurotransmissores promovendo melhoria no quadro sensório-motor e função cardiovascular apontando o exercício como importante desencadeador de alterações positivas na vida de uma pessoa com lesão medular. Embora estudos indiquem que a natação promova a recuperação funcional após lesão, os mecanismos neurais subjacentes à esta prática são pouco conhecidos.

Dessa forma, a proposta desta pesquisa foi avaliar o efeito do tratamento com extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) e do exercício físico de natação sobre a lesão de vias sensório-motoras em ratos submetidos à hemiseção torácica da medula espinal.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos do tratamento com EHPV e exercício de natação, associados ou não, sobre a lesão medular em ratos produzida por hemissecção em nível torácico.

1.1.2 Objetivos específicos:

- Analisar as modificações funcionais após os tratamentos por meio de escala de avaliação locomotora, no decurso temporal da lesão;
- Avaliar as modificações estruturais no SNC, em função dos tratamentos;
- Analisar modificações na resposta inflamatória após lesão medular espinal (LME) com a utilização de diferentes estratégias terapêuticas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Medula espinal e lesão medular

A medula espinal é uma massa alongada e cilíndrica de tecido nervoso, situada dentro do canal vertebral, sem ocupá-lo completamente, ligeiramente achatada no sentido ântero-posterior (MACHADO, 2000). É composta por células e fibras nervosas, denominadas neurônios e axônios, respectivamente, que fazem a comunicação sensorial e motora, por meio das fibras, entre o SNC e os demais órgãos e sistemas do organismo (DEFINOS, 1999). Segundo Fernandes (2004), é a “estrada por onde as informações motoras e sensitivas viajam entre o cérebro e o corpo”.

Nos adultos a medula espinal mede aproximadamente 45 cm e situa-se entre o atlas (primeira vértebra Cervical) e a primeira ou segunda vértebra lombar onde forma o cone medular. As raízes dos nervos espinais seguem até a parte caudal do canal vertebral formando a cauda equina. Esta última tem início na décima primeira vértebra torácica finalizando-se no terceiro segmento sacral, e ocupa todo o canal vertebral abaixo da segunda vértebra lombar (L2) (DEFINOS, 1999).

A principal função da medula espinal consiste em transmitir, receber e produzir estímulos em forma de informações motoras e sensoriais que são transmitidas do encéfalo para todas as áreas do corpo (GOULDING, 2009). Além disso, a medula espinal atua como um importante centro de integração que coordena comportamentos reflexos, de maneira topográfica em relação à região do corpo que é innervada por um determinado segmento medular (FREUD et al., 2011).

Dessa forma, danos à medula espinal geralmente interrompem a comunicação sensorial e motora entre estruturas do sistema nervoso central e entre o sistema nervoso central e periférico, resultando consequentemente na ausência parcial ou total de movimento voluntário e ou sensibilidade abaixo do nível da lesão (DEFINOS, 1999).

De acordo com as especificações do banco de dados da *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (NSCISC, 2011), o termo lesão da medula espinal (LME) destina-se a qualquer dano causado em qualquer ponto da medula espinal, cone medular ou cauda equina que comprime ou rompe seus tratos axonais impedindo o envio de informações para o restante do corpo. Definios (1999), conceitua lesão medular como sendo “a transferência da energia cinética para a medula espinhal, o rompimento dos axônios, a lesão das células nervosas e a ruptura dos vasos

sanguíneos”. Hagen et al., (2012) a descreve como lesão aguda e traumática da medula espinhal, que conduz a graus variados de déficits motores, sensoriais e paralisia.

Ainda de acordo com o NSCISC (2011), a LME pode ser caracterizada como traumática ou não traumática, a depender de sua causa; completa ou incompleta, dependendo do nível de gravidade. A lesão medular espinhal traumática (LMET) ocorre quando a medula sofre algum tipo de trauma, enquanto que lesão medular não traumática se refere à medula que apresenta má formação ou é ofendida por alguma patologia. Em relação à gravidade da lesão, as incapacidades funcionais e motoras causadas pela LME estão diretamente relacionadas ao nível anatômico em que o trauma acontece e estruturas corporais inervadas por segmentos neurais afetados pela lesão (quadro1).

ALTURA	LOCAL	NÍVEL MEDULAR	COMPROMETIMENTO MOTOR E SENSORIAL
LESÃO ALTA	CERVICAL	C1 a C5	Paralisia dos músculos utilizados na respiração e de todos os músculos dos membros superiores e inferiores. Geralmente fatal.
		C5 a C6	Pernas paralisadas. Discreta capacidade de flexão dos membros superiores.
		C6 a C7	Paralisação dos membros inferiores e parte dos punhos e das mãos. Os movimentos dos ombros e a flexão dos cotovelos estão relativamente preservados.
		C8 a T1	Paralisia dos membros inferiores e do tronco: ptose palpebral; ausência desudorese na fronte (Síndrome de Homer); traços relativamente normais; mãos paralisadas.
LESÃO BAIXA	TORÁCICA	T2 a T4	Ausência de sudorese na fronte (Síndrome de Homer); traços relativamente normais; mãos paralisadas. Paralisia dos membros inferiores e do tronco: perda da sensibilidade abaixo dos mamilos.
		T5 a T8	Paralisia dos membros inferiores e da parte inferior do tronco: perda da sensibilidade abaixo da caixa torácica.
		T9 a T11	Pernas paralisadas: perda da sensibilidade abaixo da cicatriz umbilical.
		T12 a L1	Paralisia e perda da sensibilidade abaixo da virilha.
	LOMBAR	L2 a L5	Diferentes padrões de fraqueza e entorpecimentos dos membros inferiores.
	SACRAL	S1 a S2	Diferentes padrões de fraqueza e entorpecimentos dos membros inferiores.
		S3 a S5	Perda do controle da bexiga e dos intestinos: entorpecimento no períneo.

Quadro 1: Incapacidades causadas pela lesão medular em função da localização do trauma.

Fonte: Hegen, (2012)

As denominações vinculadas aos graus e níveis da LME foram criadas pela *American Spinal Injury Associação* (ASIA) diante da necessidade de padronização das avaliações de diagnósticos neurológico, que favorecessem o acompanhamento e previsão de resultados funcionais por especialistas. Lesão alta é a LME que afeta o

nível anatômico cervical e a lesão baixa é a LME que atinge os níveis torácicos, lombares e sacrais (HEGEN, 2012). A LME traumática é classificada em cinco categorias na escala de comprometimento neurológico, sendo então denominada ASIA A, B, C, D e E (quadro 2). A LMET é considerada completa quando há ausência de movimento voluntário ou sensibilidade abaixo do nível da lesão, e incompleta quando existe movimento voluntário e ou sensibilidade abaixo do nível da lesão.

ASIA A	Lesão traumática completa. Perda total da função motora e sensorial abaixo do nível da lesão.	
ASIA B	Perda da função motora, sensorial preservada e sensibilidade do segmento sacral S4-S5.	
ASIA C	Função motora preservada, mais da metade dos músculos-chave possuem grau de força inferior a 3, porém não vencem a gravidade.	
ASIA D	Função motora preservada, mais da metade dos músculos-chave possuem grau de força inferior a 3, embora vencem a gravidade.	
ASIA E	Funções motora e sensorial são normais.	

Quadro 2: Classificação do Comprometimento neurológico de acordo com a ASIA

Fonte: (NSCISC 2009; HEGEN 2012, SARAH, 2011).

A capacidade de reparação das fibras e células que compõem SNC após a LME é limitada. Dessa forma, a LMET é uma injúria altamente debilitante. Ocorre com alta incidência, além de resultar em danos neurológicos severos e possui alta taxa de morbidade e taxa de mortalidade estimada em 5% dos acometidos (NSCISC, 2009). Afeta de 2,3 a 83 pessoas por milhão de habitantes anualmente em todo o mundo (HAGEN, 2012). Dados fornecidos pelo relatório anual do NSCISC (2011), estimam 40 casos de LMET por milhão de habitantes nos Estados Unidos e que aproximadamente 12.000 novos casos ocorram a cada ano. Entre as principais causas da LMET estão

os acidentes automobilísticos, seguido por quedas de alturas, ferimentos por arma de fogo e traumatismo esportivo. O documento indica ainda que a lesão ocorre mais frequentemente para o gênero masculino, representando 80% dos casos, e a faixa etária predominantemente atingida por esta enfermidade está entre 14 e 40 anos.

No Brasil um estudo realizado na Rede SARAH de hospitais durante o primeiro semestre de 2011, mostrou que a LMET ocorre em 70,9% das internações por traumas, havendo um maior predomínio para a paraplegia, atingindo 67,2% dos casos, sendo que 63% dos diagnósticos apresentados no momento da internação são de lesão medular completa. O estudo também indica que a faixa etária predominante está entre 14 e 39 anos, sendo 80,2% dos acometidos homens e que os acidentes de trânsito são as principais causas da LMET, correspondendo 65% dos casos (SARAH, 2011).

Anderle et al., (2010) encontraram no Hospital Estadual Professor Carlos da Silva Lacaz, na cidade de Francisco Morato em São Paulo, no período entre maio de 2005 e dezembro de 2008, 69 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de LMET. Os déficits neurológicos completos estavam presentes em 26,1% dos casos e 56,6% chegaram ao hospital apresentando índice E da escala ASIA. Em Sergipe, só o Hospital de Urgência de Sergipe (HUSE) no ano de 2010, recebeu 126 pacientes com LMET, dos quais 10% foram a óbito (PEREIRA; JESUS, 2011).

O quadro neurológico após LME depende do nível de gravidade da lesão, que é determinado pela complexidade de eventos que envolvem as fases de desenvolvimento da injúria. A fisiopatologia da LMET é caracterizada por uma lesão inicial primária, seguida de deterioração secundária (ZAO et al., 2011; JIA et al., 2012).

O trauma medular primário está geralmente associado ao deslocamento ou fratura do canal vertebral, que provoca secção, compressão e ou concussão da medula espinal. Como resultado, sucedem-se modificações substanciais nos aferentes primários, interneurônios e motoneurônios, repercutindo particularmente no bloqueio da transmissão do impulso nervoso e na interação sensório-motora (DEFINOS, 1999). Concomitante aos processos de apoptose e necrose ocorre rompimento dos vasos sanguíneos, com consequente hemorragia ocasionando isquemia, hipóxia e despolarização da membrana celular, que impede a propagação do impulso nervoso (GENSEL et al., 2011; ARIAS, SEVERO e TUDURY, 2007; OYINBO, 2011).

Na lesão primária (até 24h após o trauma), o organismo atua favorecendo a regulação de genes apoptóticos e pró - inflamatórios específicos que em grande

quantidade possuem efeitos nocivos sobre a sobrevivência da célula lesionada, ocasionando a morte de mais neurônios (um a três dias), levando ao desenvolvimento da lesão secundária, que pode persistir por meses ou anos após o trauma (CADOTTE;FEHLINGS, 2011; YU et al., 2012), causando a morte prolongada de neurônios (YIP; MALASPINA, 2012).

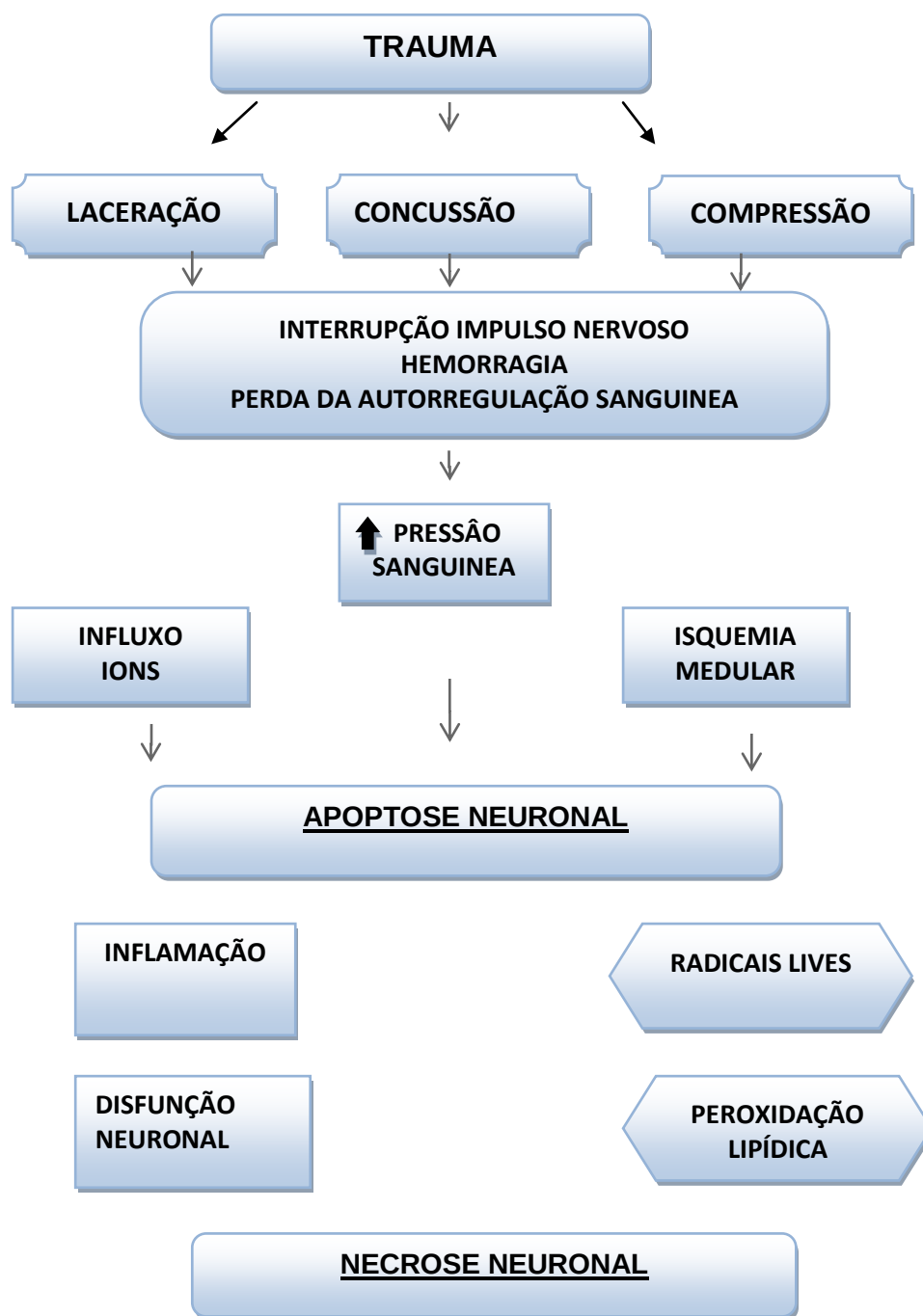


Figura 1: Representação do mecanismo fisiológico da lesão medular traumática

Enquanto a lesão primária é caracterizada pelo trauma mecânico causador de danos imediatos ao tecido neuronal com morte celular e sangramento, os danos expressos no primeiro momento da lesão dão origem a novos e importantes fatores que viabilizam a ampliação da lesão, levando à destruição progressiva dos tecidos em torno da área central. Agravidade da LME depende, em grande parte, da extensão do dano secundário causado por uma sequência de eventos celulares e moleculares, tais como a inflamação, produção desequilibrada de radicais livres e excitotoxicidade causada por glutamato, um neurotransmissor excitatório capaz de causar alterações químicas importantes que irão estabelecer íntima relação com o quadro clínico observado (ZAO et al., 2011).

A lesão secundária, portanto, concerne às respostas do organismo em função à lesão primária (CADOTTE;FEHLINGS, 2011). Os eventos envolvidos nesta fase incluem a formação de edema, isquemia e hipóxia decorrentes da hemorragia, alteração do fluxo sanguíneo (IMPELLIZZERI et al., 2012), além do influxo de íons que ocorre em função da ruptura de axônios e reação celular no microambiente medular, que por sua vez, sofre influência das alterações da barreira hematoencefálica na região medular (DEFINOS, 1999; CUSTÓDIO, 2008; PERALE et al., 2012).

A inflamação, ponto crítico na lesão medular, leva o sistema imunológico a secretar citocinas como interleucina (IL)-1 β , interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que, em desequilíbrio, podem danificar tecidos saudáveis e também agravar a lesão, aumentando a extensão da inflamação. O dano tecidual e endotelial causado pelo trauma desencadeia vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, ocorrendo a princípio extravasamento de células sanguíneas para o local da lesão como leucócitos seguidos de neutrófilos, monócitos e linfócitos ampliando o processo inflamatório (OYIMBO, 2011).

Com o rompimento de vasos sanguíneos que nutrem o tecido medular, há liberação de substâncias vasoativas capazes de causar alteração na perfusão da medula espinal. Como resultado disso, as células inflamatórias já liberadas induzem sequencialmente células responsáveis por fases subsequentes à liberação dos neutrófilos, como a microglia, responsável pela fagocitose, seguida dos astrócitos responsáveis pela liberação de substâncias no ambiente medular (SCHWAB et al., 2006; PERALE et al., 2012).

As alterações químicas no local da lesão favorecem o aumento das cavitações, traduzidas por contração do endotélio vascular induzido pela histamina liberada pelo processo inflamatório reforçando a resposta. As cavitações são preenchidas por fluídos e circundadas por tecido cicatricial no centro da lesão, exacerbando a disfunção neurológica, impedindo desta forma o crescimento neuronal (WRIGHT et al., 2011; PERALE et al., 2012).

A participação de neurotransmissores excitatórios é favorecida pelo influxo das citocinas que liberam especialmente o glutamato. Quando em excesso, o glutamato desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), como o óxido nítrico (NO), em função da despolarização neuronal e abertura de canais iônicos voltagem-dependentes (canais principalmente de cálcio e sódio) (SCHWAB et al., 2006; PROW et al., 2007; IRANI, 2008; GENSEL et al., 2012).

A liberação do glutamato é excessiva logo após o trauma medular em torno e no local da lesão e as mudanças metabólicas severas ocasionam a morte de neurônios e de oligodendrócitos (OYIMBO, 2011; ZHAO et al., 2011). (ARIAS; SEVERO; TUDURY, 2007). Neurônios e oligodendrócitos são particularmente vulneráveis a excitotoxicidade por glutamato porque expressam receptores de glutamato. A lesão excitotóxica por glutamato resulta na desmielinização de axônios (lesão dos oligodendrócitos) e morte de neurônios em torno do local da lesão, levando a uma redução drástica ou parada completa de transmissão axonal (OYIMBO, 2011). Isso acontece porque o glutamato liga-se a proteínas receptoras propiciando a abertura dos canais de íons, permitindo o aumento de sódio e principalmente o aumento do cálcio intracelular (HALL, 2011; ARIAS, SEVERO e TUDURY, 2007). Este último é responsável pela ativação de proteases que destroem o citoesqueleto e o DNA cromossomal iniciando a necrose, morte imediata e a apoptose, morte programada das células que compõem o tecido neuronal (ARIAS; SEVERO; TUDURY, 2007).

As espécies reativas de oxigênios (EROs) em excesso no tecido neuronal favorecem o estresse oxidativo e a apoptose de oligodendrócitos causando dano adicional ao tecido local e neurodegeneração de tecidos adjacentes ao sítio da lesão (WRIGHT et al., 2011). Estas espécies refletem as reações de lesão excitotóxica mediada por glutamato (GENSEL et al., 2012), insuficiência respiratória mitocondrial e dano microvascular (BAINS e HALL, 2012). O estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio entre a produção de EROs e o nível de substâncias antioxidantes no meio intracelular (GANDHI e ABRAMOV, 2012; KOPPULA et al., 2012).

A insuficiência respiratória mitocondrial diminui a produção de adenosina trifosfato (ATP), favorecendo a liberação de EROs (HALL e SPRINGER, 2004; SCHWAB et al., 2006), com consequente dano oxidativo e peroxidação lipídica de proteínas medulares, inflamação e apoptose neuronal.

A liberação de EROs é um evento precoce, que ocorre em poucos minutos após o impacto mecânico que causa a LMET (BAINS; HALL, 2012). As EROs agem como moléculas sinalizadoras que iniciam a progressão da inflamação pós-traumática e a apoptose (HALL; SPRINGER, 2004; SCHWAB et al., 2006). Um componente fundamental nesse evento é o peróxido nítrico, indutor da peroxidação lipídica. A formação de peróxido nítrico e peroxidação lipídica são irreversíveis, danificam lipídeos da membrana neuronal e funções específicas das proteínas, levando esse tecido a desequilíbrios constantes na liberação de íons (BAINS; HALL, 2012).

Além disso, a produção de radicais livres possui papel significativamente importante no desenvolvimento da dor neuropática após LMET. Pacientes que sofrem de síndrome de dor neuropática expressam os produtos da peroxidação e substâncias antioxidantes significativamente elevados no sangue e podem ter seus sintomas aliviados a partir de tratamentos que utilizem sequestradores de radicais livres (HAN et al., 2012). Essas evidências enfatizam a premissa de que medidas terapêuticas que minimizem a produção de EROs e, dessa forma, diminuam o estresse oxidativo, podem ser estratégias eficientes no que se diz respeito ao tratamento da LMET (JIA et al., 2012).

2.2 Estratégias(s) Terapêuticas(s) para Lesão Medular

Muitos dos fatores bioquímicos que estão presentes na lesão secundária tiveram seus mecanismos de desenvolvimento originados ainda no primeiro momento da lesão (PERALE et al., 2012), como os neuropeptídeos, monoaminas, células imunes, modificações em concentrações de cátions, aminoácidos e produtos da hidrólise de fosfolipídios, como ácidos graxos insaturados, eucosanóides e radicais livres, dentre eles, o óxido nítrico (NO) (YANG; KIM; LEE, 2007).

Ao mesmo tempo, alguns eventos de fase aguda continuam atuando na fase secundária (OYIMBO, 2011). Estes dados fundamentam a importância de inicialização de tratamentos imediatamente após o trauma, uma vez que eventos fisiológicos e bioquímicos atuam na primeira e segunda fase da lesão.

Portanto, estudos buscam o desenvolvimento de ações terapêuticas distintas, a partir de várias abordagens metodológicas, voltadas para fases específicas de recuperação da lesão, que possam estabelecer tratamento para as consequências agudas e crônicas ou terapias de reabilitação (Custódio, 2009). Oyinbo (2011), que classifica as fases da LMET como: aguda, secundária e crônica, salienta que na tentativa de melhor entender a fisiopatologia da lesão medular espinal, diversos métodos experimentais que reproduzem a lesão medular são utilizados em estudos pré-clínicos laboratoriais.

Métodos como Clips para aneurisma (POON et al., 2007), cateteres com balões (KHAN; GRIEBEL, 1983), contusão por queda de peso (TORRES et al., 2010), placas compressivas (SILVA, 2006) transecção (LIU et al., 2010) e hemissecção medular (YING et al., 2008), cabos circunferências (KHAN; GRIEBEL, 1983) e estreitamento do canal vertebral (CARLSON et al., 2003) são apenas algumas das formas utilizadas por pesquisadores para estudar o desenvolvimento das fases que envolve as injúrias medulares e através delas, encontrar estratégias terapêuticas eficazes para mimetizar a severidade dos danos sucessores ao trauma.

Estudos mostram que melhorias mais acentuadas são observadas com a utilização de abordagens que agregam combinações entre duas ou mais terapias, indicando que múltiplas terapias contribuem favoravelmente para uma melhor recuperação e regeneração axonal (MARSH et al., 2011). Dessa forma, compreende-se ser necessário o rastreamento das particularidades inerentes a cada fase do desenvolvimento da lesão e de toda reação fisiológica que a envolve (JAKEMAN; HOSCHOUER; BASSO, 2010).

Apesar das dificuldades em alcançar terapias que propiciem a completa recuperação desde o trauma inicial, algumas terapias experimentais têm demonstrado sucesso no tocante à regeneração medular espinal após lesão (MAIER et al., 2008; LIU et al., 2010). Tratamentos farmacológicos em estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido propostos como potenciais abordagens terapêuticas. As terapias farmacológicas mais promissoras incluem drogas que melhorem a condução axonal, equilibrem a regulação de genes e neurotransmissores relacionados ao crescimento celular, favoreçam a preservação do tecido neuronal e a manutenção das atividades funcionais (FURLAN, et al., 2011; PATERNIT et al., 2011).

Em humanos, além da intervenção cirúrgica indicada para a descompressão da medula espinal, realinhamento e estabilização da coluna vertebral, o único tratamento aprovado para uso na fase aguda é o tratamento com metilprednisolona.

Este medicamento tem utilização questionada atualmente, pois sua administração sistêmica possui resposta modesta diante da complexidade do quadro e sua ação está relacionada a graves efeitos colaterais, como infecção após lesão e embolia pulmonar (RASLAN; NEMECEK, 2012).

Enquanto a novas abordagens terapêuticas, pode-se citar o estudo de Paterniti et al., (2011) indicando que a aplicação de adenosina tem efeito protetor sobre a LME, agindo sobre receptores glutamatérgicos reduzindo a excitotoxicidade. Abrams et al., (2012) encontraram indícios de que o imatinibe, um inibidor da tirosina quinase, utilizado clinicamente para tratamento de câncer, possui efeito significativamente protetor sobre neurônios e outras células do tecido medular após LME em ratos. Yu et al., (2012) encontraram evidências de que o ácido valpróico influencia a restauração da hiperacetilação e redução da resposta inflamatória resultante da LME, sendo eficaz na recuperação da função motora em ratos. Gensel et al., (2012) na tentativa de preservar oligodendrócitos e neurônios motores utilizaram o topiramato, um inibidor da histona deacetilase empregado no tratamento clínico contra a epilepsia, para tratar lesão medular a nível cervical em ratos, os autores perceberam menor morte neuronal. (JAKEMAN; HOSCHOUER; BASSO, 2010; CADOTTE; FEHLINGS, 2011).

A inflamação e o estresse oxidativo são fatores importantes na fisiopatologia da LME, e por isso, a modulação da exacerbação destes fatores pode ser uma estratégia eficaz para a intervenção terapêutica (JIA et al., 2012). Diante disso, produtos que apresentam em sua composição substâncias com atividade antioxidante e anti-inflamatória representam importante ferramenta farmacológica na diminuição dos embates e agravantes causados no SNC pela lesão medular secundária, evitando a progressão das cascatas de eventos químicos que a envolve (TY et al., 2009; MANDALARI et al., 2010).

A terapia física é componente fundamental comumente associada à terceira fase conhecida como reabilitação. Sua ação no SNC pode levar a impactos significativos sobre a recuperação global nesta etapa, propiciando efeitos positivos sobre o controle do movimento denominado de controle motor e capacidade de manter as habilidades físicas e mentais também caracterizadas como capacidade funcional (KLOOSTERMAN; SNOEK; JANNINK, 2009). Estes efeitos podem estar relacionados ao aumento da produção de fator de necrose tumoral derivado do cérebro (BDNF) no músculo e medula espinhal, capazes de impedir a atrofia muscular e promover a reorganização dos circuitos da coluna vertebral (SANDROW-FEINBERG et al., 2008).

O BDNF é uma neurotrofina que desempenha um papel crucial no SNC, modulando a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica agindo nos processos de crescimento, diferenciação e sobrevivência das células do tecido nervoso (DAVIS, 2008). Sua ação é diminuída pela LME e sua função favorecida pelo exercício, resultando na recuperação do desempenho motor após LME. Estudos têm mostrado o potencial do treinamento motor no que se refere à promoção da recuperação funcional e plasticidade após uma lesão medular, muito embora os mecanismos e sistemas moleculares envolvidos ainda não estejam totalmente claros. Sabe-se que o exercício físico aumenta a expressão de neurotrofinas com ações específicas de reorganização dos circuitos no tecido nervoso, favorecendo o desempenho locomotor após lesão medular (SANDROW-FEINBERG et al., 2008; YING et al., 2008; GRAZIANO et al., 2013).

Neste sentido, Yng et al., (2008) constataram que o exercício físico foi capaz de mediar os níveis de BDNF e melhorar o desempenho motor em ratos com lesão na medula espinal. Beaumont et al., (2008) perceberam melhora no desempenho locomotor de ratos atribuída à plasticidade neuronal. Faherty et al., (2005) demonstraram em seu estudo que o exercício foi capaz de proteger a substância cinzenta contra morte neuronal induzida por lesão em camundongos. Morphy et al., (2013) encontraram melhoras na condição cardiovascular em gatos hemisseccionados a partir de sua regulação durante o exercício imediatamente após uma lesão.

Outros autores entanto, estudam a possibilidade de alcançar melhorias utilizando tratamentos após lesão medular a partir do emprego de produtos naturais. Em alguns desses produtos são encontradas substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias em altas concentrações podendo ser um interessante objeto de estudo para a LME. Zhu et al., (2012) investigaram os efeitos benéficos de uma substância extraída do alho a alicina na lesão da medula espinal em coelhos e demonstraram efeito neuroprotetor da droga associados à melhoria da função mitocondrial. Zao et al., (2011) observaram o efeito neuroprotetor do *Ginkgo biloba* L. sobre a LME modulando a excitotoxicidade por glutamato e a peroxidação lipídica por provável inibição da fosfolipase. Genovese et al., (2010) avaliaram os efeitos da verbascosídeo, uma substância extraída da verbena, na LME em ratos e encontraram uma atenuação na expressão de neurotransmissores capazes de potencializar a síntese do óxido nítrico no tecido medular.

2.3 Produtos Naturais

Diante da diversidade abundante de estruturas químicas complexas e pouco estudadas, presentes em produtos naturais, diversos trabalhos têm sido publicados, visando comprovar suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, bem como definir as substâncias químicas presentes responsáveis pela ação biológica desses produtos (PINTO et al., 2002; CARVALHO et al., 2008; BARREIRO; BOLZANI 2009; ARAYAT; KINDSCHER ; TIMMERMAN, 2012).

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas e estudos revelam que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO; BOLZANI 2009; WELLS, 2011).

A introdução de plantas de diferentes culturas no mercado mundial, a exemplo das utilizadas na medicina oriental (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005) tem contribuído para o tratamento de diversas doenças, indicando novas possibilidades de comercialização e maior diversificação de estudos do produto natural. De acordo com Schmitt et al., (2011) a globalização e o desenvolvimento tecnológico na área dos ensaios biológicos foram grandes aliados no fortalecimento o direcionamento dessas pesquisas.

Oliveira et al., (2012) relataram que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial utiliza plantas medicinais nos cuidados com a saúde, sendo que aproximadamente 10.000 plantas têm seu uso medicinal documentado. A partir da grande quantidade de substâncias ativas em sua composição, resultam milhões de combinações moleculares. Essas combinações tornam-se eficientes na produção de estruturas químicas complexas com um extenso grupo de moléculas funcionais aptas a interagirem com moléculas alvo.

Assim, aproximadamente 60% de compostos anticancerígenos e 75% dos medicamentos para doenças infecciosas, por exemplo, puderam ser extraídos de fontes naturais ou derivados de produtos naturais (MCCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007). Desde a descoberta do Taxol, um fármaco anticancerígeno extraído a partir de fungos endófitos, novas fontes de fitoquímicos e substâncias bioativas prometendo aplicação medicinal e agrícola têm atraído a atenção dos cientistas em todo o mundo (CHEN et al., 2013).

O Brasil é considerado um grande consumidor de produtos naturais. O crescente índice de utilização de plantas medicinais pela população favoreceu a implantação desses produtos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), através de políticas públicas na área da saúde, que já conta com 16 Estados em que o produto natural é disponibilizado. A indicação terapêutica de produtos naturais pelos profissionais da medicina deve estar associada à garantia de segurança, eficácia e qualidade no tratamento. Para tanto, o Brasil propôs a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no sistema de saúde pública. Essas práticas são regidas por normas que adéquam à utilização dos produtos naturais à prática medicinal regulamentada (OLIVEIRA et al., 2012).

Os Produtos naturais têm sido cada vez mais explorados pela população e pela área científica por apresentarem composição rica em substâncias importantes para a manutenção da saúde (SMITH et al., 2008), a exemplo dos flavonóides (ZAO et al., 2011). Os flavonóides oferecem potenciais terapêuticos antioxidante e anti-inflamatório significantes para o organismo e estão sendo utilizados na tentativa de cura de várias patologias, inclusive aquelas que envolve doenças neurológicas. Em estudos pré-clínicos a utilização desses produtos na busca por terapias que minimizem os danos causados pela LME trazem esperança para diversos pesquisadores (LEE et al., 2005; GENOVESE et al., 2010; ZAO et al., 2011).

2.4 Própolis

Dentre os produtos naturais utilizados pela população, os derivados apícolas têm-se destacado devido à sua composição química e potencialidades de uso na saúde humana (MELO, 2010; BLOCH et al., 2010). Entre eles, pode-se citar a própolis (BERRETTA et al., 2012), a geleia real (PARK et al., 2012), o pólen apícola (KADAFAR et al., 2012), o veneno (YUN; SUN, 2010) e o mel de abelhas (ABDULRHMAN, 2012), por apresentarem importantes propriedades terapêuticas já comprovadas (CHERNIACK, 2010; KADAFAR et al., 2012). Tais produtos são atualmente comercializados como alimentos, apesar da população conhecer suas indicações terapêuticas. A utilização destes recursos naturais apresenta um significativo retorno financeiro e de baixo impacto ao meio ambiente, podendo ser desenvolvida por pequenos produtores (SEBRAE, 2003; OLIVEIRA et al., 2010; REIS, 2011). Desta forma, a apicultura brasileira tem propiciado desenvolvimento econômico, envolvendo principalmente a agricultura familiar (OLIVEIRA et al., 2010; REIS, 2011).

A apicultura é uma prática antiga que remonta a mais de 3.000 anos, sendo considerada uma atividade importante e bem desenvolvida, com propósitos direcionados à criação e o manejo de abelhas, bem como de seus subprodutos, desde a idade do ferro (BLOCH et al., 2010). É uma atividade ecologicamente sustentável que gera renda para os produtores e está aliada a conservação do ambiente, tendo em vista a necessidade de manutenção do pasto apícola para a obtenção destes produtos. A atividade apícola tem como prerrogativa a conservação das espécies vegetais nativas permitindo a utilização permanente das mesmas pelas abelhas (OLIVEIRA et al., 2010).

Neste sentido, a própolis é um produto natural produzido biogeneticamente pelas abelhas do gênero *Apis* a partir de diversas partes das plantas, como brotos, ramos, botões florais e exsudatos resinosos (SILVA, 2008). Possui composição complexa e tem sido empregada na medicina popular há séculos por exibir diversas bioatividades. Sua utilização já era descrita pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios (PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO, 2002). No Egito era utilizada para embalsamar os mortos (“cera negra”), na África do Sul no período da guerra era empregada como cicatrizante (MARCUCCI, 1996). Segundo Pereira, Seixas e Aquino Neto (2002), a própolis foi utilizada na antiga União Soviética (URSS) no tratamento da tuberculose.

A própolis é uma mistura, formada por material resinoso e balsâmico de consistência viscosa. Os compostos que originam a própolis em estado bruto, segundo Marcucci (1995), são derivados dos exsudatos de plantas coletadas pelas abelhas, das substâncias secretadas do metabolismo de abelha e dos materiais adicionados durante a extração da própolis.

O termo própolis é de origem grega pro (em defesa de), polis (cidade), o que significa: “em defesa da cidade ou da colmeia” (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000). Na colônia as abelhas utilizam a própolis para esterilização, impermeabilização, isolamento térmico, vedação e tratamento antisséptico impedindo assim a contaminação e invasão de animais (MARCUCI, 1996; MARCUCCI, 2001; LONGHINI, 2007).

Em geral, a própolis bruta é composta de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de substâncias orgânicas. (MENEZES, 2005; TOIT; BUTHELEZI; BODENSTEIN, 2009), podendo as concentrações sofrer pequenas modificações dependentes do tipo da amostra (BERRETTA et al., 2012). A coloração da própolis pode variar do marrom escuro

passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado (LOTFLY, 2006; INOUE et al., 2007).

No Brasil, são descritas propriedades biológicas e composições químicas distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país. Mendonça (2011) apresenta em seu estudo os 13 tipos distintos da própolis já estudados no Brasil e os relaciona em grupos, a partir da caracterização dos perfis físicos, químicos e botânicos apresentados pela própolis brasileira. Ressalta ainda que sua origem botânica varia de acordo com o pasto apícola disponível.

Segundo Mendonça (2011), a própolis de cor castanho claro é encontrada nos grupos 2 e 4 do Rio Grande do Sul e Paraná, respectivamente. A que apresenta coloração castanho escuro pertence ao grupo 8 de Pernambuco e grupo 3 Paraná, tendo este último como origem botânica a resina do botão floral de *Populus Alba* e presença de éster do ácido dimetildialilcaféico, crisina e galangina em sua composição química. A própolis amarela e amarela escuro caracterizam os grupos 1 do Rio Grande do Sul, 9 de Pernambuco, 10 do Ceará e 11 do Piauí. Já a variedade marrom esverdeado é encontrada no Paraná (grupo 5) e na Bahia (grupo 7). A mais estudada e comercializada é a própolis verde ou marrom esverdeada representativa do grupo 12, encontrada principalmente em São Paulo e Minas Gerais. Esta variedade tem sua origem botânica à resina de folhas jovens de *Baccharisdracunculifolia* e apresenta em sua composição química flavonóides, ácidos fenólicos, cetonas, aldeídos aromáticos, alcoóis, terpenos, ácidos graxos, aminoácidos, oligoelementos, vitaminas B1, B2, B6, E, C e hidrocarbonetos. A cor marrom avermelhado (grupo 6) é encontrada na Bahia, possuindo origem botânica atribuída principalmente à resina de folhas jovens de *Hyptisdivaricata*. A própolis vermelha do grupo 13 é encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, e Pernambuco, sua fonte apícola é o exudato do caule da *Dalbergia ecastophyllum*, e os seus importantes constituintes químicos de maior destaque são flavonóides (pinocembrina, formononetina, rutina, quercetina, dalbergina entre outros) e ácidos fenólicos (ácido felúrico) (MENDONÇA, 2011).

A composição química da própolis sofre alterações de acordo com a sazonalidade e a região. As espécies encontradas no Brasil apresentam diferenças em sua composição química e atividade farmacológica, que podem ser explicadas pela biodiversidade de florestas encontradas no país (BANKOVA et al., 2000; SFORCIN et al., 2000; CASTRO et al., 2009).

Diversos compostos químicos já foram identificados e/ou caracterizados na própolis. Dentre eles as substâncias mais comuns encontradas nas variedades brasileiras são os ácidos fenólicos (ácido gálico) (MARCUCCI et al., 2001; BEECHER, 2003; BARBOSA, 2009), os flavonóides (como a quercetina, pinocembrina e kaempferol), os derivados do ácido cinâmico, ésteres, terpenos, aldeídos e cetonas (GECKIL et al., 2005), fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico) (LUSTOSA et al., 2008), óleos voláteis e ácidos aromáticos, ceras, resinas, bálsamo, pólen, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxo, aminoácidos, esteroides (MELO et al., 2010), charconas e di-hidrochalconas e proteínas. Também foram identificados elementos inorgânicos como o cobre, manganês, cálcio, alumínio, silício, zinco, cromo (MARCUCCI, 1996) e vitaminas (A, B1, B2, B6, C, E) (MENEZES, 2005). Estas substâncias são consideradas biologicamente ativas.

Dentre os compostos citados, o grupo dos flavonóides tem sido mais intensamente estudado (LUSTOSA et al., 2008). A ingestão de flavonóides e terpenóides, podem interferir em diversos processos fisiológicos, atuando nos processos responsáveis por promover a cicatrização de ferimentos, principalmente devido às suas características adstringente e antimicrobiana (NAYAK et al., 2006). Além disso, os flavonóides apresentam atividades inibidoras do ciclo-oxigenase (COX) e lipooxigenase, de redução de prostaglandina E2 (PGE2) e da expressão da isoforma induzível da COX (COX-2) (BARRETTA et al., 2012). Desta forma auxiliam na resolução do processo inflamatório. Os flavonóides apresentam também atividade antioxidante e moduladora do sistema imune (WILLIAMS et al., 2004; ADELMAN, 2005; ALENCAR et al., 2007).

A própolis sob a forma de extratos hidroetanólicos, ricos em flavonóides, tem sido estudada por apresentar atividade antimicrobiana (PARK et al., 1998), anti-inflamatória (LÉDON, 1997), cicatrizante, anestésica e antioxidante (GECKIL et al., 2005). O ácido fenil-éster-caféico (CAPE), um dos componentes bioativos da própolis, apresenta atividade anticancerígena (MARCUCI et al., 2001; MENEZES, 2005; ALENCAR et al., 2007). GONG et al., (2012) constataram que o CAPE atenuou o estresse oxidativo e restaurou o sistema de defesa e a função renal em ratos. De acordo com Koyu et al.,(2009) oCAPEpôde impedir alterações oxidativasno fígado, reduzindo as EROspor aumentar aatividade de enzimas antioxidantes.

Os efeitos da própolis em suas diferentes apresentações têm sido descritos no sistema nervoso central, em estudos utilizando modelos animais. Recentemente, Kasai et al., (2011) realizaram hemissecção da medula espinal de ratos a fim de

avaliar o efeito da administração de própolis chinesa (2010) e do CAPE (2011) sobre a recuperação funcional. De acordo com estes autores, houve um aumento significativo no desempenho e a aceleração da recuperação funcional, em função do tempo, nos animais que receberam extrato etanólico da própolis chinesa. O CAPE foi capaz ainda de prevenir a neurotoxicidade causada por glutamato (KWON et al., 2004; WEI et al., 2008). Ratos tratados com este mesmo composto antioxidante apresentaram melhora frente ao infarto cerebral produzido por isquemia focal (TSAI et al., 2006) e frente ao estresse oxidativo induzido por encefalomielite alérgica (ILHAN et al., 2004).

Alguns derivados do CAPE também demonstraram proteção mediada por efeito antioxidante, capaz de inibir a peroxidação lipídica no prosencéfalo de ratos, submetidos a dano de retina induzido pelo estresse oxidativo (NAKAJIMA et al., 2007). A pinocembrina, um dos flavonoides encontrados em alta concentração na própolis, pode proteger da oxidação e apoptose decorrentes da isquemia (GUANG; DU, 2006; LIU et al., 2008). O CAPE apresentou ainda habilidade em prevenir o estresse inflamatório em culturas de células hipocâmpais (MONTPIED et al., 2003). Além disso, um estudo realizado por Noelker et al. (2005), com cultura de neurônios cerebelares evidenciou que o CAPE apresentou efeito protetor ante a ação da toxina 6-hidroxidopamina.

2.5 Própolis Vermelha

A própolis vermelha foi recentemente classificada como a 13ª variedade brasileira e é encontrada em colmeias localizadas ao longo de florestas próximas às costas do mar e de rios no nordeste brasileiro (TRUSHEVA et al., 2006; SOUSA, 2007; DAUGSCH et al., 2008). Na última década, este produto tem sido objeto de numerosos estudos farmacológicos (TRUSHEVA et al., 2006; SILVA et al., 2007; DAUGSCH et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2009; LIO et al., 2010; PICCINELLI et al., 2011; FRANCHI et al., 2012). Sua origem botânica foi descrito como *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae) (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Na literatura a própolis vermelha é caracterizada como sendo típica de Cuba e da Venezuela, por apresentarem semelhanças em suas composições químicas. Nessas regiões, as origens botânicas foram identificadas como *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) e *Clusia scrobiculata*, respectivamente (TRUSHEVA et al., 2006; PICCINELLI et al., 2011).

O estudo de Mendonça (2011), voltado para a análise química e biológica da própolis vermelha brasileira durante o ano de 2010, demonstra alterações significativas nas concentrações de componentes fenólicos durante o ano, além de alteração na coloração da amostra, muito embora as mudanças de cor e composição química observada ao longo do ano não tenham demonstrado efeito diferenciado sobre a atividade biológica do extrato da própolis vermelha brasileira.

Segundo Alencar et al., (2007), a própolis vermelha brasileira possui novos compostos bioativos nunca encontrados nas variedades antes estudadas. De acordo com os resultados encontrados no estudo de Silva et al., (2007) apenas dois flavonóides (quercetina e crisina) e um ácido fenólico (ácido ferúlico) foram identificados como padrão nas amostras de própolis vermelha. Righi et al., (2011) encontraram novas substâncias exclusivamente encontradas na própolis proveniente de Alagoas, o 3,4,2',3'-tetraidroxicalcona e C-glicosídeo flavona, os quais possuem atividade antioxidante e antimicrobiana. Alencar et al., (2007) identificaram quatro tipos de isoflavonas em sua pesquisa: diidroxi-isoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavona. Trusheva et al., (2006) encontraram as benzofenonas preniladas, constituintes principais da própolis vermelha. Barroso (2011) quantificou quantidade significativa de formononetina em seu estudo com própolis vermelha do estado de Sergipe.

Piccinelli et al., (2011) em um estudo comparando a origem botânica da própolis brasileira e cubana, isolaram 43 compostos de uma amostra de própolis vermelha coletada no litoral sul da Paraíba. Dentre os compostos isolados foram encontrados os flavonóides, isoflavonóides, neoflavonóides, chalconas e lignanas.

A formononetina é uma das isoflavonas e um dos componentes majoritários da própolis vermelha brasileira, possuindo ação anti-inflamatória e antioxidante (DAUGSCH et al., 2008). A partir da diminuição na formação de radicais livres, impedindo assim a peroxidação lipídica, a formononetina pode diminuir a disseminação da inflamação no organismo (MU et al., 2009).

A formononetina é encontrado na própolis vermelha (DAUGSCH et al., 2008) e em outras fontes naturais, tais como leguminosas (WANG et al., 2008; ZHANG, MAO e XIA, 2012; DELGADO-ZAMARREÑO et al., 2012). Os mecanismos de ação farmacológica desta molécula têm sido demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Em estudo recente, Sum et al., (2012) encontraram evidências de que esta substância regulou a ação de mediadores proteicos citotóxicos em células neuronais após hipóxia, exercendo ação neuroprotetora. Huh et al., (2011) encontraram indícios de

sua ação na regulação de fatores de transcrição que favorecem o processo de cicatrização em ratos e em estudos *in vitro* (JEONG-EUN et al., 2011).

A formononetina demonstrou também possuir ação antitumoral auxiliando a inibição da proliferação de células prostáticas cancerígenas de origem humana (Ye et al., 2012) e células cancerígenas mamárias de ratos (CHEN et al., 2011). Quando administrada isoladamente, ou associada a outros flavonóides, diminuiu o estresse oxidativo em modelo para estudo da doença de Alzheimer (OCCHIUTO et al., 2009).

Em relação à atividade biológica da própolis, Franchi et al., (2012) realizaram uma comparação entre a citotoxicidade das variedades verde e vermelha de própolis brasileira em linhagens de células leucêmicas e os resultados mostraram que a própolis vermelha foi mais citotóxica. Os autores sugeriram a possibilidade da utilização de componentes da própolis vermelha no tratamento do câncer. Siqueira et al., (2009) também compararam a ação de extratos etanólicos de própolis verde e vermelha quanto à sua atividade antifúngica e observaram que o extrato de própolis vermelha foi mais efetivo. Albuquerque-Júnior et al., (2009) demonstraram que a incorporação da própolis vermelha em filmes de colágeno bovino tipo I foi capaz de melhorar a cicatrização de feridas realizadas no dorso de ratos, por modulação dinâmica da evolução do processo de inflamatório e da deposição de colágeno.

A própolis vermelha demonstrou atividade antioxidante e antimicrobiana em estudos *in vitro* (ALENCAR et al., 2007; IZUTA et al., 2009). Lio et al., (2012) mostraram que extrato etanólico de própolis vermelha brasileira interfere com a homeostase do colesterol podendo ser benéfico na terapia e prevenção da arteriosclerose. Este mesmo grupo (LIO et al., 2010) reportou que o extrato etanólico da própolis vermelha modificava a diferenciação de adipócitos e poderia ser utilizado no tratamento da obesidade. Daleprane et al., (2011e 2012) realizaram estudos *in vivo* e *in vitro*, e demonstraram que polifenóis da própolis vermelha reduzem lesões arterioscleróticas, por meio de ação antiangiogênica e anti-inflamatória.

Silva et al., (2006) sugerem que os flavonóides desempenham importante papel na atividade antioxidante de extratos de própolis brasileira, mas outros fatores poderiam estar envolvidos. Embora estudos com extratos etanólicos de própolis sejam mais comuns, é relatado que o extrato aquoso possui atividade antioxidante, associada ao alto teor de compostos fenólicos (MANI et al., 2006). Cabral et al., (2009) demonstraram que a própolis vermelha possui alta atividade antioxidante e antibacteriana e que as subfrações obtidas são mais ativas biologicamente que o extrato bruto.

No entanto, até o momento não existem relatos na literatura sobre a investigação do efeito do tratamento com extratos da própolis vermelha sobre a lesão medular.

2.5 Exercício Físico

Evidências na literatura demonstram que a atividade física promove melhoria no quadro sensório-motor e função cardiovascular após lesão da medula espinal em humanos (KLOOSTERMAN; SNOEK; JANNINK, 2009) e em modelos animais (EDGERTON et al., 2004). Contudo, os mecanismos subjacentes a esse processo não são completamente conhecidos.

Terapias envolvendo exercício físico muitas vezes são utilizadas para fornecer estabilidade ao ritmo de vida de pessoas com lesão medular, mas não há histórico de total regeneração axonal ou plasticidade das funções da medula espinal após lesão medular em adultos (EDGERTON et al., 2008; ICHIYAMA et al., 2008; DUNLOP, 2008; EDGERTON; ROY, 2009).

Em humanos o exercício tem demonstrado ser um importante aliado às terapias medicamentosas em pacientes com lesão medular, a fim de estimular uma melhor possibilidade de locomoção. A lesão medular pode causar paralisia muscular permanente levando os músculos à atrofia e a uma diminuição no tamanho e na força de contração. Isso acontece porque depois da lesão medular ocorre uma degradação de miofibrilas, que compreendem a maioria das proteínas do músculo (WILLOUGHBY et al., 2000). Percebe-se então que o exercício leva ao aumento da síntese proteica associada ao melhoramento da atrofia muscular uma vez que o tamanho do músculo está associado ao equilíbrio entre as taxas de síntese proteica e degradação (WILLOUGHBY et al., 2000).

O exercício físico ainda pode ser utilizado como terapia minimizando a dor. Norrbrink et al., (2012) afirmam que um programa intensivo de exercícios pode ser usado para o tratamento da dor músculo esquelética e neuropática após lesão da medula espinal. Neste aspecto, Kemp et al., (2011) sugeriram que a redução da dor pode estar relacionada a aumentos significativos na participação social e melhorias na qualidade de vida. Além disso, a prática frequente do exercício físico pode proporcionar inúmeros benefícios ao paciente, considerando o estágio de gravidade da lesão, como força muscular (MIRBAGHERI; PATEL; QUINEY, 2011), melhoria da

coordenação motora (TESTER et al., 2012), autoestima e autodependência (LANNEM et al., 2011), melhor concentração e equilíbrio corporal (BETKER et al., 2007).

Rossignol et al., (2007) sugerem que abordagens de reabilitação motora devem reforçar a promoção do treinamento locomotor utilizando técnicas de reforço estimulando o impulso nervoso e controlando níveis de toxicidade, bem como de mecanismos endógenos da coluna vertebral. Kloosterman, Snoek e Jannink (2008) realizaram um trabalho de revisão onde seis dos oito estudos incluídos na pesquisa sobre a influência do exercício físico na recuperação locomotora em pacientes com lesão medular relataram efeitos positivos do exercício sobre o controle motor, e quatro relataram efeitos positivos sobre a capacidade funcional.

A LMET causa grandes alterações nos níveis de produção de substâncias neuronais. O treinamento locomotor é capaz de regular as ações do BDNF sobre o nível de proteínas em tecidos neuronais. Em experimentos utilizando modelos animais, Macias et al., (2009) observaram melhora no desempenho motor após transecção da medula espinal de ratos submetidos ao treino com esteira, que foi correlacionada à expressão do BDNF. Beaumont et al., (2008) mostraram que o treinamento motor em ratos facilitou a recuperação funcional após lesão da medula espinal, pela restauração dos níveis de BDNF, de modificações nas propriedades eletrofisiológicas das células e aumento da conectividade entre neurônios com origem acima do local da lesão, uma forma de plasticidade neuronal. Kao et al., (2009) encontraram modificações plásticas no mapa somatotópico induzidas por exercício físico após lesão medular em animais neonatos.

Concomitante a melhora funcional ocorrem modificações quanto aos fatores de crescimento, moléculas guia e de adesão, além de componentes de formação de sinapses, induzidas pela atividade física em ratos com lesão medular (MAIER et al., 2008). Dados do estudo de Liu et al., (2010) sugerem que a recuperação da função muscular dos membros inferiores de animais acometidos por lesão medular quando tratados com exercício de ciclismo está relacionada com a redução da apoptose após a lesão. Sandrow-Feinberg et al., (2009) reportaram que o exercício forçado foi capaz de acelerar a recuperação funcional durante as primeiras semanas após a lesão. Gomez-Pinilla, Ying e Zhuang (2012), estudando as interações entre cérebro e medula espinal, perceberam que o nível de atividade prolongada antes de uma lesão da medula espinal pode determinar o nível de recuperação sensorio motor e cognitivos após a lesão e que a prática de exercício físico prévio poderia organizar uma reação protetora em todo eixo neurológico

Outros estudos mostram ainda que o exercício aumenta a eficácia de tratamentos para lesão medular a exemplo da utilização de células tronco (FORET et al., 2010), nanotecnologia para administração de beta-interferon (SANDROW-FEINBERG et al., 2010) e melatonina (PARK et al., 2010). Sandrow-Feinberg et al., (2010) investigaram se o tratamento agudo com beta-interferon apresentava melhora sozinho ou quando combinado com o exercício forçado e perceberam que as terapias não trabalharam em conjunto para amenizar os danos causados pela lesão, mas que cada uma atuou em uma fase diferente do problema.

Dentre os exercícios físicos utilizados para a recuperação motora após lesão medular, a natação pode ser uma excelente estratégia terapêutica na luta contra os embates que envolvem a injúria. O consumo de energia durante a prática da natação prolongada é um dos mais elevados entre todas as atividades esportivas e é um fator importante para combater a obesidade, considerada um adversário na conquista da autonomia de movimentos (ALMEIDA; TONELO, 2007).

A prática da natação possibilita diversos movimentos ininterruptos que aumentam as oportunidades para o desenvolvimento motor. Possibilita a execução de movimentos em vários planos diferentes como rotações e flexão do corpo, além de aumentar a resistência cardiovascular, flexibilidade e mobilidade das articulações, melhorando a força e a resistência dos músculos (ALMEIDA; TONELO, 2007), visando determinados grupos musculares que possibilitem movimentos específicos como alternância entre direita e esquerda, flexão e extensão de membros (SMITH et al., 2006) ou o condicionamento geral.

A natação pode desempenhar papel importante na regeneração de circuitos responsáveis pelo funcionamento das funções da medula espinal danificada. Para tanto, várias semanas de treino intensivo são necessárias para alcançar melhoras significativas (SMITH et al., 2006; MAGNUSON et al., 2009). Em relação ao tempo de aplicação do exercício, Carvalho et al, (2008) sugere que terapias de reabilitação com intuito de atenuar a atrofia muscular e perda de movimentos após LMT sejam aplicadas logo após a injúria, ainda na fase aguda da lesão na medula espinal.

Em estudos experimentais, o exercício de natação favoreceu a melhora funcional sensório-motora (HUTCHINSON et al., 2004; SMITH et al., 2006). A combinação de terapia com células tronco e o exercício de natação resultou em melhora funcional significativa após lesão aguda da medula espinal (Carvalho et al., 2008). Robert et al, (2010) também mostraram que a natação teve efeito significativo na melhora funcional, assim como o exercício de treino em esteira. No entanto, a

despeito dos diversos estudos mostrando a influência da atividade física na plasticidade neuronal após lesão da medula espinhal (MACIAS et al., 2009; BEAUMONT et al., 2008; MAIER et al., 2008; KAO et al., 2009) não há relatos dos mecanismos neurais subjacentes à recuperação funcional para o exercício de natação.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção da Própolis e Caracterização do Extrato

A própolis de coloração vermelha foi coletada das frestas das tampas de caixas produtoras de própolis do apiário localizado no Povoado Brejão dos Negros, Município de Brejo Grande no Estado de Sergipe, Brasil, em outubro de 2011 (S 10°28'25" e O 36°26'12"). O material coletado foi etiquetado e acondicionado em recipientes estéreis, encaminhados ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) da Universidade Tiradentes (UNIT), onde a amostra foi pesada e refrigerada para posterior extração.

Obtenção do EHPV- A extração foi realizada conforme método descrito por Maia-araújo (2009). A amostra de própolis foi extraída com 12,5 mL de etanol a 70% durante 1 h em banho de ultrassom. O extrato obtido ao final do processamento foi filtrado, e o solvente eliminado por evaporação em capela de exaustão em temperatura ambiente por 48h. O material resultante (extrato seco) foi armazenado em frasco âmbar previamente identificado e em seguida conservado sob refrigeração. A ressuspensão do extrato foi feita em concentrações de 20 mg/mL, as doses administradas foram de 10 mg/kg e 50 mg/kg.

O extrato foi caracterizado em função do rendimento da extração e atividade antioxidante. O rendimento do processo de extração foi estimado com base no percentual da massa seca obtida, a qual foi calculada tendo como referência a massa inicial da própolis antes da extração (BRASIL, 2001).

Atividade antioxidante – a avaliação da capacidade de inibição de radicais livres foi realizada conforme metodologia descrita por Cabral et al. (2009). Foram preparadas amostras de soluções em diferentes concentrações (400, 100, 60, 50, 55, 40 e 30 µg/ml) a partir do extrato seco de própolis vermelha. Foi adicionado 750 µL de solução alcoólica de radical 1,1-Difenil-2-picrilidrazil (DPPH), a 400 mM em 3 mL de cada amostra. O branco foi preparado utilizando 750 µL de solução de DPPH e 3 mL de etanol 70°. Para zerar o equipamento foi utilizado etanol 70°. Após 45 minutos de incubação foi realizada a leitura em espectrofotômetro Hitachi U2001, no comprimento de onda de 517 nm. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

A equação 1 foi utilizada para calcular a porcentagem de inibição do radical livre DPPH pela amostra. Posteriormente foi obtida a concentração capaz de inibir

50% das moléculas de DPPH em solução (IC50), utilizando regressão não linear (OLDONI et al., 2011).

Equação para cálculo do IC50

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{controle positivo} - \text{controle negativo})}{\text{Controle positivo}} \times 100$$

3.2. Ensaio biológico

3.2.1 Animais

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos provenientes do Biotério de Universidade Tiradentes, com idade entre 2 e 3 meses, pesando entre 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em número de cinco, por caixa retangular padronizada de tamanho médio, devidamente identificada de acordo com o grupo experimental e receberam ração padrão Labina® e água ad libitum.

Para o desenvolvimento deste projeto, seguiram-se os princípios éticos da experimentação animal de acordo com a COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), seguindo as normas para a prática didático-científica de acordo com a Lei nº 9.605/1998, §1º e o Projeto de Lei nº 1.691, de 2003, que dispõe sobre o uso de animais para fins científicos e didáticos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UNIT/ Aracaju/SE, cujo número do Parecer Consubstanciado foi 131110. O estudo foi realizado no Biotério e no Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural e no Laboratório de Biomateriais do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), na Universidade Tiradentes (UNIT/SE).

Após avaliação por meio de escala locomotora preliminar para descarte de ratos debilitados, os animais foram distribuídos de forma randomizada primeiramente em 2 grandes grupos: o grupo laminectomia (cirurgia sem lesão, com remoção da apófise espinhosa e lâmina da décima vértebra torácica, expondo a medula espinal) e o grupo lesão (cirurgia com hemissecção do lado direito da medula espinal, após laminectomia). Cada um desses grupos foi subdividido em grupos para administração dos tratamentos: grupo controle (veículo– solução aquosa contendo 10% de Tween 80); grupo própolis 10 mg/kg; grupo própolis 50 mg/kg; grupo veículo + exercício; grupo própolis 10 mg/kg+ exercício. Foram utilizados 4 - 8 animais para cada grupo.

3.2.2. Procedimentos cirúrgicos de Laminectomia e Lesão Medular

Os ratos foram pesados e anestesiados com uma mistura de 0,1mL de ketamina sob a concentração de 75 mg/kg + 0,1mL de xilazina com concentração de 14 mg/kg, para cada 100g de massa corporal, administradas por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida foi realizada a tricotomia e assepsia da região dorsal torácica e uma incisão na região correspondente à coluna torácica foi efetivada.

Os ratos foram então submetidos aos seguintes procedimentos:

Laminectomia: A musculatura foi divulsionada, expondo as vértebras T8 – T11, identificadas pela palpação das apófises espinhosas. Após a identificação das vértebras, a apófise espinhosa e a lâmina da vértebra T10 foram cuidadosamente retiradas, usando-se uma lupa cirúrgica, com aumento de 10X.

Lesão medular: Os mesmos procedimentos descritos para a laminectomia foram executados, porém os animais do grupo lesão tiveram a hemi-medula do lado direito seccionada com auxílio de uma microtesoura e bisturi.

Ao término destes procedimentos os animais tiveram a musculatura suturada com 2 pontos (laçada dupla). Em seguida foi colocado o tecido adiposo sobre a musculatura recobrimo-a, para depois ser realizada a sutura da pele. Finalmente foi realizada antissepsia com álcool e iodopovidina.

Os animais foram acomodados em sala climatizada para recuperação pós-cirúrgica, onde foram constantemente monitoradas as condições de alimentação, hidratação, excreção de fezes e urina, além de receberem massagens abdominais 3 vezes ao dia até a restauração das condições normais de micção e defecção. Imediatamente após a cirurgia todos os animais receberam uma dose de 0,5 mL de pentabiótico e foram inspecionados diariamente à procura de sinais de autotomia e infecções.

3.2.3. Tratamentos

3.2.3.1. Tratamento medicamentoso

A administração de EHPV na concentração de 4 e 20 mg/mL nas doses de 10mg/kg e 50mg/kg em 0,6mL respectivamente ou solução de Tween 80® a 10% (volume de 0,6 mL), ocorreu no dia da cirurgia e durante 15 dias subsequentes (tratamento sub-crônico), por via oral em forma de gavagem. As concentrações de própolis nos

extratos foram determinadas com base nos resultados de estudos pilotos realizados para caracterização de suas atividades farmacológicas e toxicológicas.

3.2.3.2. Protocolo de Treinamento Físico

O programa de treinamento físico foi iniciado 3 dias após a cirurgia e realizado durante três semanas consecutivas. Os animais foram submetidos à natação durante 1 hora, de segunda a sexta-feira (adaptado de CARVALHO et al., 2008), em tanques específicos com 100 cm de largura por 60 cm de profundidade e 80 cm de altura, com água em temperatura controlada entre $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ (GOBATTO, 2008).

3.2.4. Avaliação locomotora

A avaliação funcional da função motora foi realizada por meio de teste de comportamento, realizado em momentos fixados: pré – teste (um dia antes da cirurgia); 24 horas; 07; 14 e 21 dias após a cirurgia. O teste foi realizado às cegas quanto ao grupo experimental sempre pelo mesmo examinador. Durante o teste os animais foram estimulados a caminhar continuamente.

Para avaliação da recuperação da função motora dos animais, foi utilizada a escala de BASSO, BEATTIE e BRESNAHAN (1995; 1996; documento anexo). Para tanto, os animais foram colocados um a um em uma arena de testes e observados durante 4 minutos, enquanto se locomoveram livremente. A avaliação foi realizada através da observação de parâmetros comportamentais, a saber: o movimento do membro, a posição da pata, o tipo do passo, a coordenação da passada, a abertura dos dedos, a rotação predominante da pata, a estabilidade do tronco e a posição da cauda. Os parâmetros colhidos em cada teste foram anotados em tabelas individuais e posteriormente classificados por meio de uma escala com valores entre 0 e 21 pontos.

Os pontos refletem a condição motora dos animais, onde zero representa paralisia total do membro e 21 pontos representa função motora normal do membro (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995). Pontuações entre 0 e 7 indicam o retorno de movimentos isolados de até três articulações (quadril, joelho e tornozelo). Pontuações entre 8 e 13 indicam o retorno dos passos plantares e coordenação dos movimentos entre patas posteriores e anteriores. Por fim, pontuações entre 14 e 21 mostram o retorno da abertura dos dedos durante a passada, posição predominante da pata em paralelo ao tronco, estabilidade de tronco e levantamento da cauda. A avaliação funcional da função motora foi realizada por meio de teste de

comportamento, realizado em momentos fixados: pré – teste (um dia antes da cirurgia); 24 horas; 07; 14 e 21 dias após a cirurgia. O teste foi realizado às cegas quanto ao grupo experimental sempre pelo mesmo examinador. Durante o teste os animais foram estimulados a caminhar continuamente.

3.2.5. Avaliação histológica

Os animais foram sacrificados aos 21 dias para análise histológica. O tecido medular em torno da área cirúrgica (2 cm) foi retirado e conservado em formalina por um período de sete dias. O material foi então desidratado em série alcoólica crescente, diafanizado em série de xilóis e incluído em parafina sob a forma de blocos que foram levados ao micrótomo, para fornecer os cortes transversais de 20 µm.

As secções foram colhidas de forma serial. Foi colocada serie de sete secções em cada uma das cinco do conjunto. Em seguida, foi colocada outra série em cada lâmina, ao lado daquela já colhida. Após o preenchimento de um conjunto, um novo conjunto foi iniciado. Desse modo, o primeiro conjunto recebeu os cortes rostrais à lesão, o segundo, do centro da lesão e o terceiro da região caudal à lesão.

As modificações histológicas decorrentes da hemissecção e da sua associação com os tratamentos foram analisadas por meio da coloração de hematoxilina-eosina (HE). A técnica da coloração consistiu em manter as secções de tecido em contato com a hematoxilina de Harris por 90 segundos, lavar em água corrente por 5 minutos, submergir em solução de água amoniacal, por 15 segundos, lavar em água corrente por 5 minutos e corar com a solução de Eosina por 30 segundos. A seguir as lâminas foram desidratadas e passadas por uma bateria de alcoóis em concentração crescente, uma mistura de álcool e xilol e xilol puro (3 minutos cada) para então serem montadas com lamínulas. Por meio desta coloração foram avaliados a densidade de neurônios marcados e o perfil das alterações inflamatórias.

As quantificações neuronais foram realizadas por meio de análise de imagens utilizando microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera fotográfica Olympus. Para que a análise histológica fosse realizada às cegas quanto ao grupo experimental, os códigos de identificação de cada lâmina foram cobertos por outro experimentador antes do início da análise e revelados após o término.

A densidade de células coradas para HE foi medida na medula espinal, bilateralmente nos cornos dorsal (lâminas I, II e III) e ventral (lâminas VIII e IX) dos animais. As regiões foram identificadas de acordo com ilustrações apresentadas de Paxinos e Watson (1998). Para tanto, foram analisadas todas as secções colhidas para cada conjunto de lâminas correspondente às regiões rostral, central e caudal. A densidade de células em cada região analisada foi definida como o número de células coradas em uma área padronizada de 100.000 μm^2 (0,1mm²). Os resultados foram expressos como média da densidade celular (número de células /0,1mm² de estrutura) $\pm$ erro padrão da média (EPM), em cada segmento para os lados direito e esquerdo.

Para análise das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os critérios de intensidade do infiltrado inflamatório e hiperemia. Foram atribuídos escores de 1 a 3, de acordo com o seguinte padrão:

1 (grau agudo) – O infiltrado inflamatório/hiperemia pode ser observado em menos de 10% do tecido medular;

2 (grau moderado) – Presença de infiltrado/hiperemia em 10 a 50 % do tecido;

3 (grau severo) – O infiltrado inflamatório/hiperemia ocorre em mais de 50% do tecido medular

3.2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. Para avaliação dos dados de testes comportamentais foi utilizada a análise de variância de duas via com medidas repetidas (MANOVA), sendo considerados os fatores tratamento e tempo. Em caso de alterações significantes as mesmas foram seguidas de ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey. Para avaliação da densidade de neurônios, em função dos tratamentos, utilizou-se ANOVA de uma via com extensão de Tukey. Para análise da resposta inflamatória, as médias entre os grupos foram comparadas por meio do teste de Kruskal-Wallis com extensão de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$. Foi utilizado o programa SPSS versão 19.0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento do extrato e Atividade Antioxidante da Própolis Vermelha

Neste estudo o rendimento da extração hidroalcóolica da amostra de própolis vermelha foi de 42%. A amostra apresentou, portanto, rendimento de extração acima do valor mínimo especificado pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001) que é de 11% m/v.

Para testar a capacidade antioxidante da amostra da própolis foram utilizadas as concentrações entre 30 a 400 µg/mL. A amostra apresentou capacidade de sequestrar 50% de radicais livres na concentração de 58 µg/mL.

Outros trabalhos, utilizando a mesma metodologia, mostraram que a própolis vermelha exibiu atividade antioxidante nas concentrações de 294 µg/mL (PINHEIRO, 2009), 270 µg/mL (FROZZA et al., 2013), 47 µg/mL (BANDARI et al., 2010). Alencar et al. (2007), relataram que o extrato hidroetanólico de própolis vermelha na concentração de 90 µg/mL apresentou 57% de atividade de inibição, resultado semelhante ao encontrado por Cabral et al. (2009) que observaram que nesta mesma concentração o extrato foi capaz de inibir 50,5% dos radicais DPPH. Os autores também reportaram a presença de importantes componentes bioativos, tais como o ácido ferúlico, a daidizeína, a quercetina e a formononetina. Portanto, os resultados encontrados no presente estudo apontam para um alto potencial antioxidante do EHPV, uma vez que, em relação aos resultados descritos anteriormente, uma menor concentração do mesmo foi capaz de sequestrar 50% dos radicais em solução.

Trabalhos anteriores atribuíram a atividade antioxidante da própolis vermelha (ALENCAR et al., 2007; IZUTA et al., 2009) à ação de flavonóides como a formononetina, o componente bioativo encontrado em maior quantidade (RIGHI et al., 2011; SILVA et al., 2007). De acordo com Cabral et al., (2009) a própolis vermelha possui alta atividade antioxidante e antibacteriana e as sub-frações obtidas são mais ativas biologicamente que o extrato bruto.

A atividade antioxidante pode ser um importante fator para diminuir os eventos secundários que agravam o quadro da LME (GENSEL et al., 2011; OYIMBO, 2011). Por exemplo, compostos que promoveram melhora na recuperação funcional e redução da morte neuronal após lesão medular experimental foram associados a mecanismos antioxidantes: a administração do extrato de *Angelica dahuricae* diminui a produção de ânions superóxidos e nitratos (MOON et al., 2012); o tratamento com o polifenol

resveratrol foi capaz de reverter a diminuição na atividade superóxido dismutase e o aumento nos níveis de malondialdeído (LIU et al., 2011); o ácido alfa lipóico, um potente antioxidante, reverteu a diminuição das quantidades de glutatona e o aumento nas quantidades de malondialdeído, atividade mieloperoxidase e fragmentação do DNA celular (TOKLU et al., 2010).

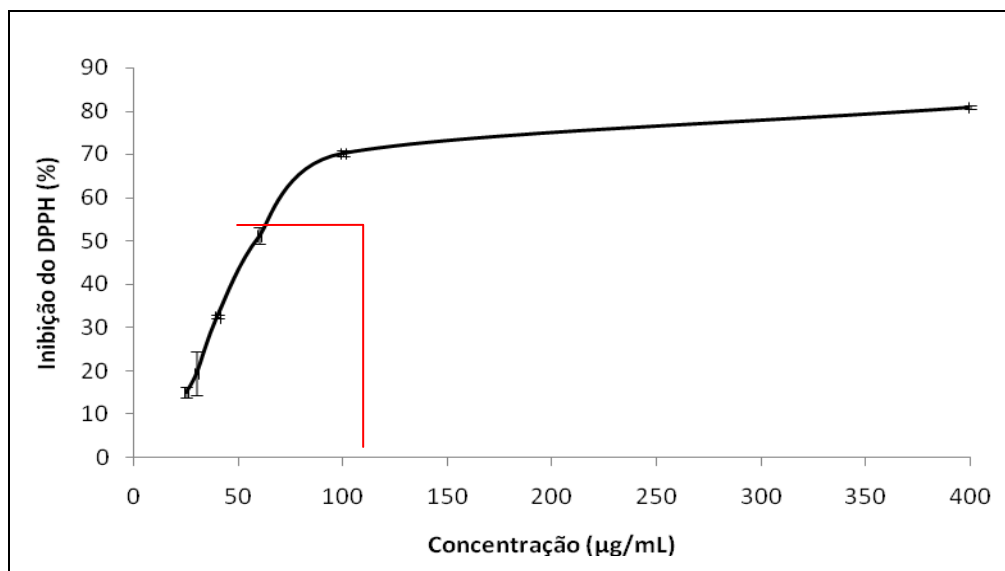


Figura 2: Representação do resultado da atividade antioxidante obtido através do método de sequestro de radicais livres.

4.2 Avaliação locomotora

A avaliação da escala locomotora BBB foi realizada 24 horas, bem como aos 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. A análise de variância com medidas repetitivas mostrou interação entre tratamento e tempo ($p = 0,04$) e diferenças significantes para o fator tratamento ($p = 0,001$). Em todos os tempos analisados, todos os grupos submetidos à Laminectomia mostraram valores significativamente iguais entre si ($p > 0,05$).

Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico (Figura 3A), os grupos submetidos à LME por hemissecção mostraram valores médios significativamente menores em relação aos grupos laminectomia, independente do tratamento associado ($F_{8-51} = 30,05$; $p < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

Resultados deste tipo são observados devido à limitação na capacidade de regeneração do SNC após uma lesão (YU et al., 2012). Lesões severas geralmente

levam a incapacidades permanentes, e as lesões moderadas são seguidas por certo grau de recuperação funcional espontânea (MAYER et al., 2008). Cho et al. (2011) e Johnson et al. (2012) encontraram resultados semelhantes para os escores locomotores da escala BBB em ratos lesionados do primeiro ao 28º dia.

Aos 07 dias (Fig. 3B), permaneceram as diferenças entre grupos LME e grupos Laminectomia ($p < 0,0001$). No entanto, o grupo LME tratado com EHPV a 10mg/kg e também o grupo LME submetido à natação exibiram escores médios significativamente maiores que os demais grupos LME, exceto o grupo LME tratado com EHPV 50 mg/kg ($F_{8-52} = 25,75$; $p < 0,0001$, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey).

Resultados semelhantes aos de 07 dias foram observados aos 14 dias, embora tenham sido observados valores estatísticos mais próximos entre os grupos LME ($F_{8-50} = 27,23$; $p < 0,0001$, ANOVA de uma via)(Figura 3C).

Os estudos de Arvanian et al., (2006; 2009) indicaram que, entre uma e duas semanas após a hemissecção em nível torácico, ocorre declínio significativo na função de transmissão da substância branca associada à desmielinização de axônios, concomitante ao declínio da função locomotora e do desempenho em testes comportamentais. Em adição, neurônios positivos para a NOS foram encontrados inicialmente 3 dias após a LME e aumentaram significativamente após 5 dias, atingindo um nível máximo em 10 a 20 dias depois (YICK et al., 1998). Ao mesmo tempo, uma semana após a LME por hemissecção foi observada redução da marcação serotoninérgica que, concomitante aos déficits funcionais, retornou gradualmente aos níveis normais ao longo de quatro semanas (SARUHASHI, YOUNG, PERKINS, 1996). Estes dados indicam que a atividade física e a própolis atuaram em períodos críticos do processo degenerativo, já que as alterações comportamentais refletem a recuperação ou piora na degeneração.

Aos 21 dias (Figura 3D), todos os tratamentos associados à LME promoveram aumento significativo em relação ao grupo LME que recebeu veículo. Especificamente, o grupo LME tratado com EHPV a 10 mg/kg mostrou valores estatisticamente iguais aos encontrados para os grupos laminectomia, e superiores aos demais grupos LME ($F_{8-51} = 16,39$; $p < 0,0001$, ANOVA de uma via).

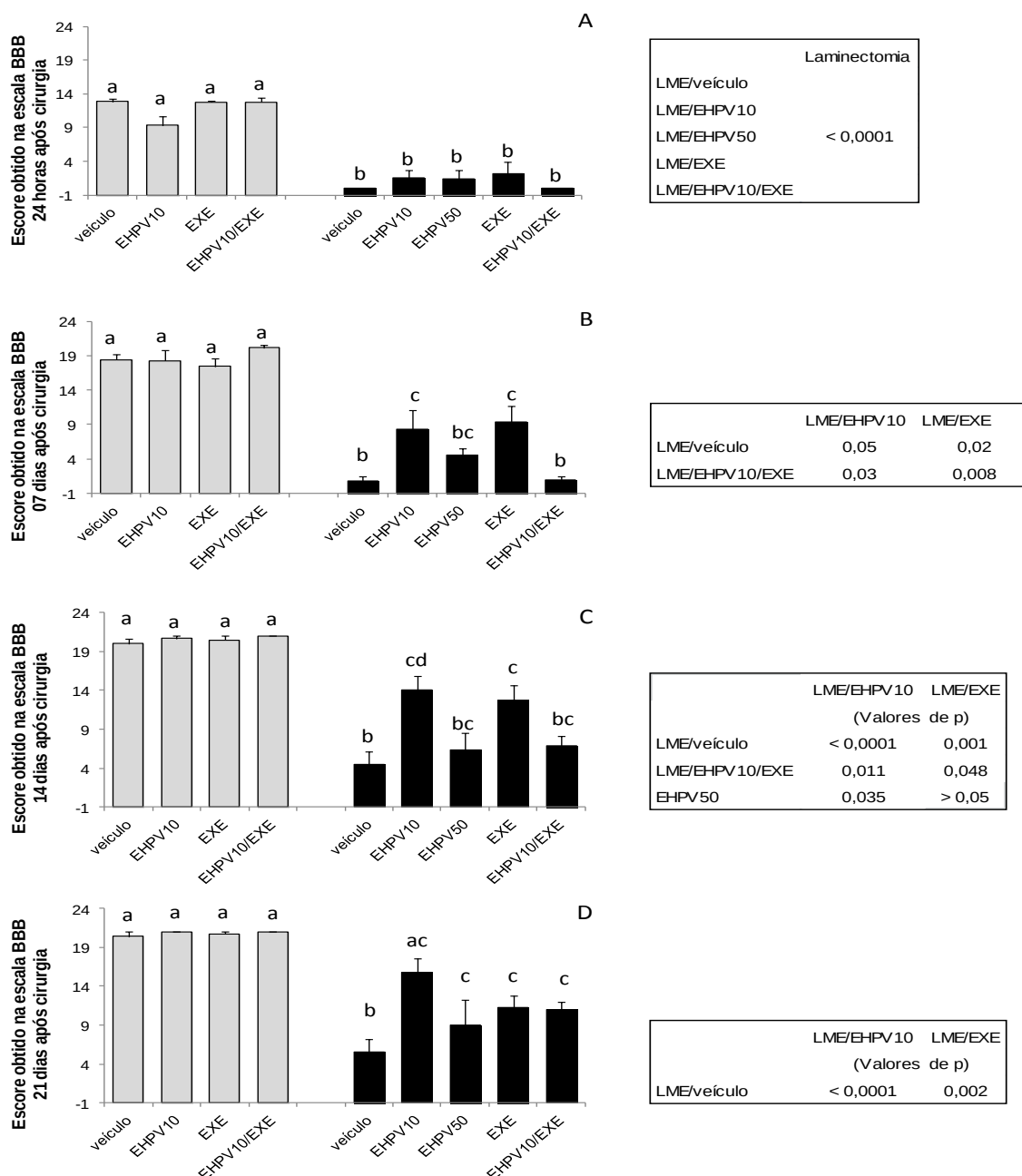


Figura 3: Resultados do teste de avaliação locomotora pela escala BBB nos tempo 24 horas (A) e 7 (B); 14 (C) e 21 (D) dias após o procedimento cirúrgico de Laminectomia (em cinza) ou hemisseção (em preto). As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. EHPV10 e EHPV50: extrato hidroetanólico de própolis vermelha a 10 e 50 mg/kg, respectivamente; EXE: exercício de natação. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via para o fator tratamento, seguida do pós-teste de Tukey).

Os resultados obtidos evidenciam um efeito neuroprotetor do EHPV sobre a recuperação funcional após hemisseção, e aceleração da recuperação em relação aos demais grupos. Corroborando estes achados, Kasai et al. (2011), realizaram o

mesmo tipo de procedimento a fim de avaliar o efeito do extrato etanólico da própolis chinesa sobre a recuperação funcional. De acordo com estes autores a função locomotora (BBB) foi recuperada dentro de três semanas após a lesão no grupo tratado com veículo enquanto as doses de 01 e 05 mg/kg de extrato etanólico de própolis chinesa, por via intraperitoneal, mostraram aumento significativo nos escores e a aceleração da recuperação em função do tempo.

Esta ação neuroprotetora pode ser atribuída aos efeitos dos flavonoides. Os efeitos de flavonóides presentes em diferentes amostras de própolis têm sido descritos no sistema nervoso central, em estudos experimentais: A pinocembrina, um dos flavonóides encontrados em alta concentração na própolis, inclusive na própolis vermelha, pode proteger da oxidação e apoptose decorrentes da isquemia (Guang; Du, 2006) e da toxicidade resultante da produção de proteína β -amilóide (Liu et al., 2012). Estudos mostraram que a formononetina possui efeito neuroprotetor (Lee et al., 2005). Estudos in vitro mostraram que este flavonóide teve ação protetora contra hipóxia neuronal induzida por citotoxicidade (SUN et al, 2012) e em neurônios dopaminérgicos submetidos à toxicidade induzida por glutamato (CHEN et al, 2008), isoladamente, ou associado a outros flavonóides, no estresse oxidativo em modelo para estudo da doença de Alzheimer (OCCHIUTO et al, 2009), em cultura de neurônios dopaminérgicos (CHEN et al, 2008) e na toxicidade causada por glutamato (YU et al, 2005).

Em concordância com os achados do presente trabalho, o exercício de natação também favoreceu a melhora funcional sensório-motora após lesão experimental em ratos (HUTCHINSON et al., 2004; SMITH et al., 2008; CARVALHO et al., 2008). Robert et al., 2010 mostraram que a natação possui efeito significativo na melhora funcional, assim como o exercício de treino em esteira. Alguns estudos mostram ainda, que o exercício aumenta a eficácia de tratamentos para lesão medular a exemplo da utilização de células tronco (FORET et al., 2010), associado ao treino em esteira e nanotecnologia para administração de beta-interferon (SANDROW-FEINBERG et al., 2010) e melatonina (PARK et al., 2010). No entanto nesse estudo, a associação de tratamentos (natação e EHPV) produziu melhora em relação ao grupo LME, mas não mostrou alteração significativa em relação aos tratamentos isolados no tocante à recuperação funcional motora.

4.3 Avaliação histológica

A análise qualitativa das secções coradas por HE, com base nas observações histológicas, não evidenciou dano tecidual nos animais do grupo laminectomia, na substância cinzenta ou branca. Por outro lado, no grupo LME, a maior parte da substância cinzenta apresentou-se destruída e substituída por cistos e gliose. O parênquima medular foi intensamente infiltrado por linfócitos e apresentou extensa hiperemia e edema, além de atrofia do canal central medular. Adicionalmente, a maioria dos corpos celulares exibiram citoplasma eosinofílico e marcante vacuolização pericelular, consistentes com alterações degenerativas. Além disso, o infiltrado inflamatório estendeu-se para a substância branca, que também apresentou edema leve a moderado. No grupo LME submetido à natação, observou-se leve infiltração de linfócitos e hiperemia, embora a substância cinzenta ainda tenha mostrado alguns neurônios em degeneração e leve gliose não houve alterações na substância branca. No grupo LME que recebeu os tratamentos associados (natação e EHPV) persistiram alterações edematosas e infiltrado inflamatório leve a moderado na substância cinzenta. Além disso, foi observado um número expressivo de neurônios em degeneração e leve gliose. Na substância branca foram observados alguns linfócitos e edema leve a moderado (Figura 4).

Quantificação de neurônios marcados por HE:

A quantificação de motoneurônios íntegros no corno ventral da substância cinzenta de secções medulares evidenciou uma redução significativa na densidade de células no grupo LME em relação ao grupo Laminectomia ($p < 0,0001$). Tal redução não foi observada quando animais lesionados foram submetidos à natação, sendo os valores encontrados grupo LME tratado com exercício diferentes do grupo LME tratado com veículo ($p = 0,003$). Ainda, a associação do exercício à administração de EHPV 10 mg/kg resultou em aumento na contagem de neurônios marcados em relação aos demais grupos (todos os valores de $p < 0,0001$) (figura 5A, $F_{3-251} = 41,66$, $p < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

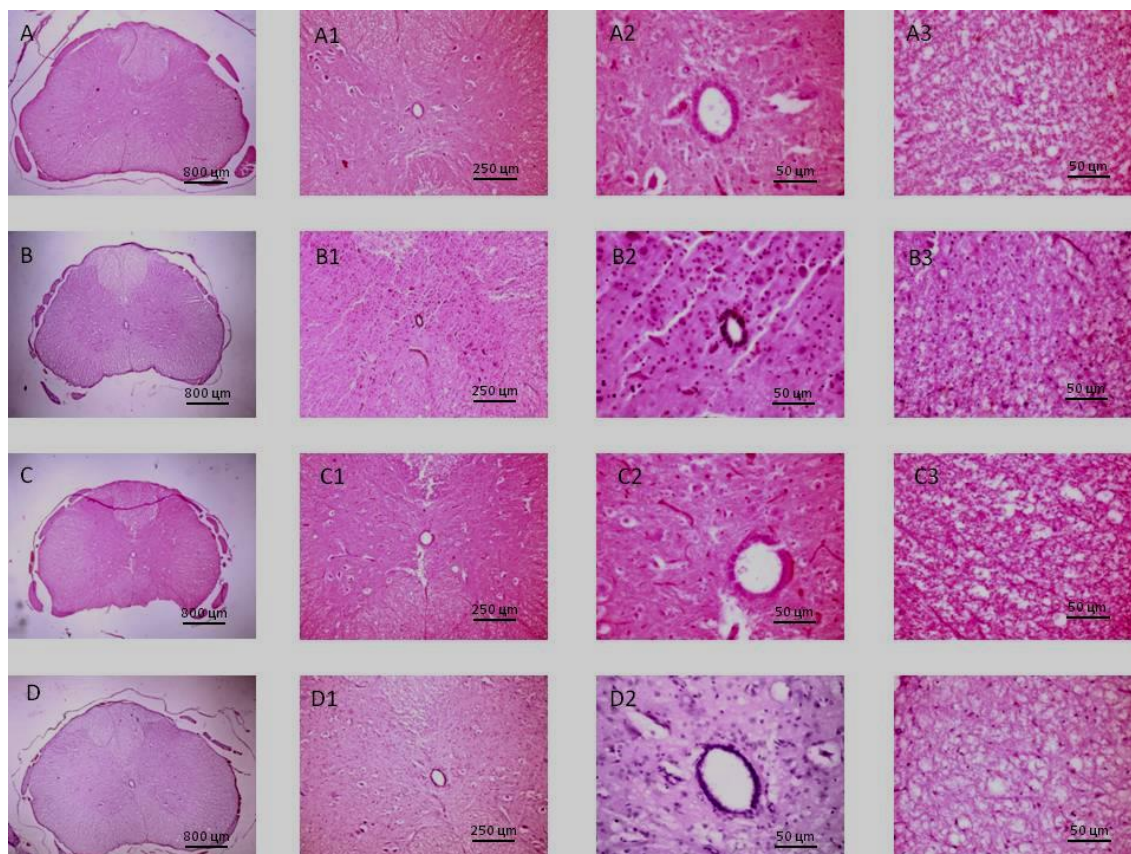


Figura 4. Secções histológicas do tecido da medula espinal. (A) Secção da medula espinal em menor aumento, mostrando ausência de alterações histológicas no grupo Laminectomia. (A1) Ausência de infiltrado inflamatório na substância cinzenta no mesmo grupo. (A2) Detalhe da substância cinzenta ao redor do canal central da medula, com corpos celulares de neurônios motores. (A3) Detalhe da substância branca, contendo axônios mielinizados algumas células gliais dispersas. (B) Secção da medula espinal, em menor aumento, do grupo LME. (B1) Infiltrado inflamatório pode ser observado na substância cinzenta. (B2) Detalhe da substância cinzenta ao redor do canal medular atrofico, mostrando menor quantidade de corpos celulares de neurônios, infiltrado inflamatório crônico e profuso (rico em linfócitos) e hiperemia de capilares sanguíneos. (B3) Detalhe da substância branca mostrando leve infiltrado inflamatório e algumas alterações edematosas. (C) Menor aumento ilustrando secção do grupo LME/EXE. (C1) Ausência de alterações histológicas visíveis na substância cinzenta. (C2) Detalhe da substância cinzenta ao redor do canal central medular, mostrando apenas leve inflamação e hiperemia. (C3) A substância branca mostra características histológicas habituais. (D) Ilustração de secção do grupo LME/EHPV em menor aumento. (D1) Não são observadas alterações histológicas significantes na substância cinzenta. (D2) Detalhe da substância cinzenta mostrando infiltrado inflamatório moderado e corpos celulares em degeneração ao redor do canal central da medula. (D3) Infiltrado inflamatório leve e alterações edematosas moderadas podem ser observadas na substância branca (HE, aumentos de 40, 100 e 400x).

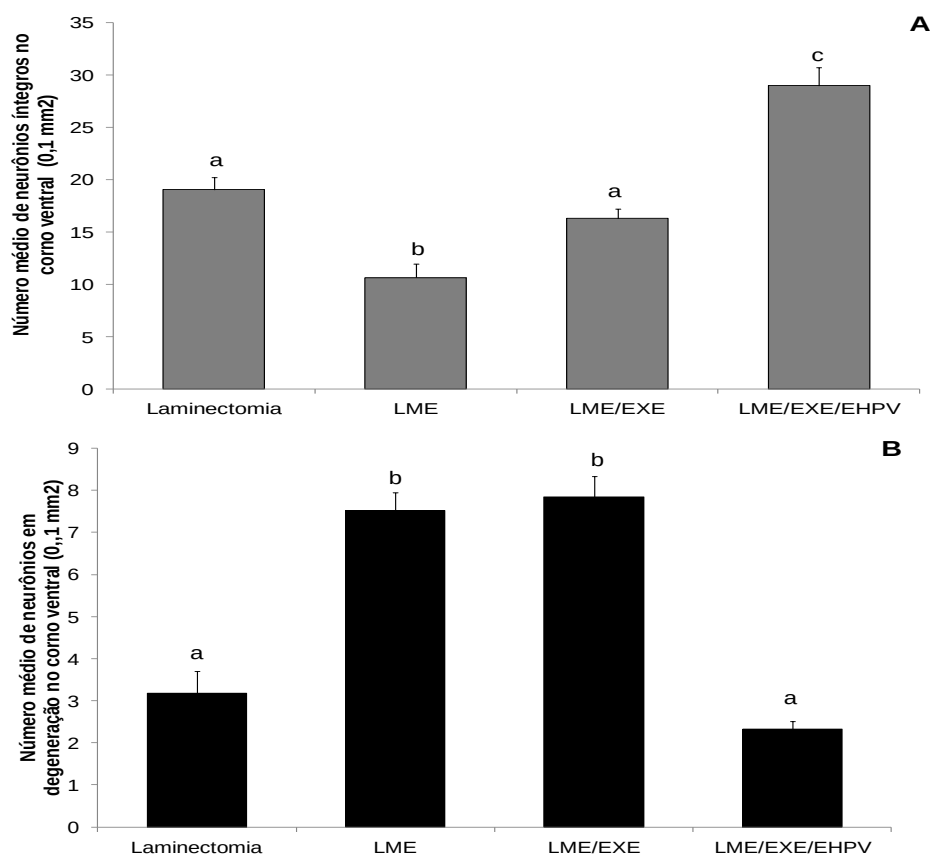


Figura 5: Número médio de neurônios motores íntegros (A) e em degeneração (B) aos 21 (D) dias após o procedimento cirúrgico de laminectomia ou hemissecção (LME). As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. EHPV10: tratamento com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 10 mg/kg, durante duas semanas; EXE: exercício de natação durante três semanas. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via para o fator tratamento, seguida do pós-teste de Tukey).

Foram quantificados os neurônios em degeneração na mesma região e observou-se aumento no grupo LME ($p < 0,0001$ em relação à Laminectomia). Este efeito não foi modificado pelo exercício ($p < 0,0001$ em relação à Laminectomia), mas sim pela associação dos tratamentos ($p < 0,0001$ em relação aos grupos LME). Os dados podem ser observados na figura 5B ($F_{3-251} = 46,85$, $p < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

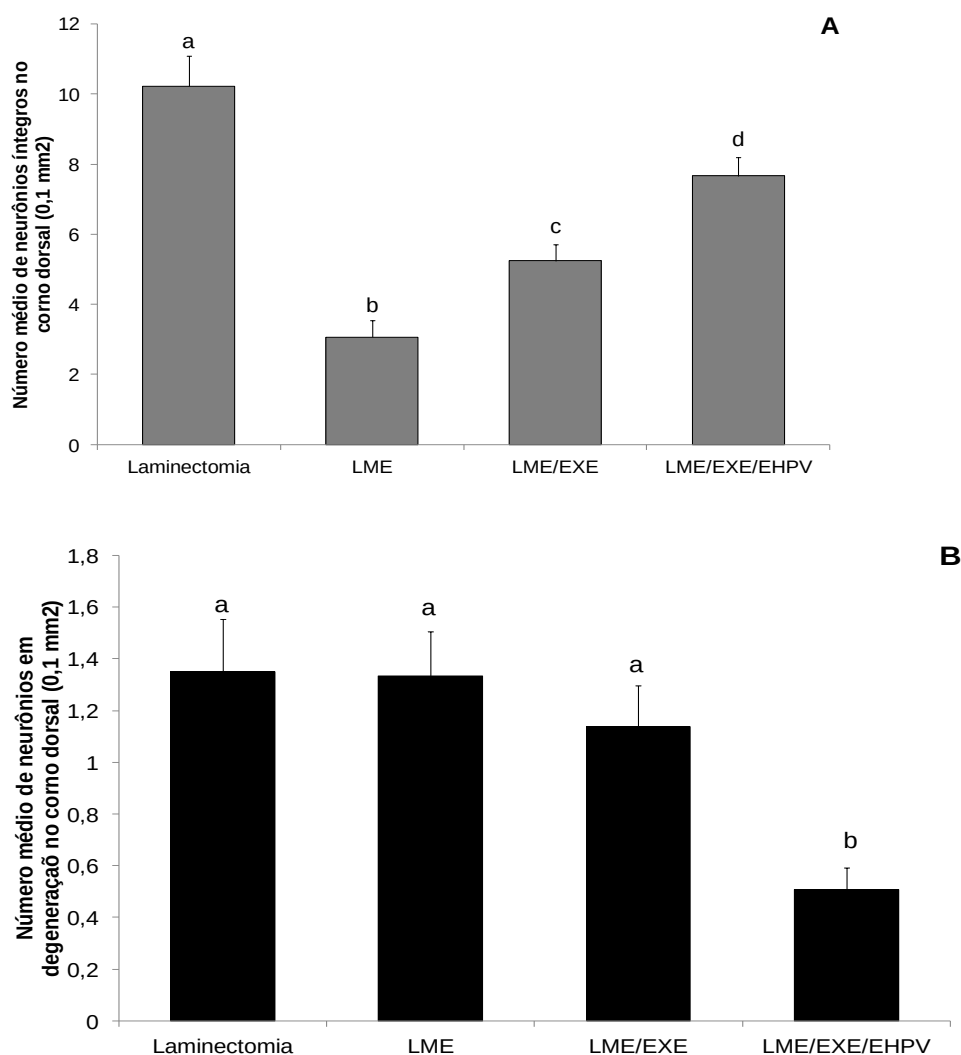


Figura 6: Número médio de neurônios sensoriais íntegros (A) e em degeneração (B) aos 21 (D) dias após o procedimento cirúrgico de laminectomia ou hemisseção (LME). As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. EHPV10: tratamento com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 10 mg/kg, durante duas semanas; EXE: exercício de natação durante três semanas. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via para o fator tratamento, seguida do pós-teste de Tukey).

No corno dorsal, observou-se redução significativa de neurônios sensoriais íntegros em função da lesão independente dos tratamentos utilizados ($p < 0,0001$). No entanto, o efeito da lesão foi menor no grupo tratado com exercício ($p = 0,049$, LME/EXE em relação a LME) e ainda menos evidente quando os tratamentos foram associados ($p = 0,013$ e $p < 0,0001$, LME/EXE/EHPV em relação a LME e LME/EXE, respectivamente), conforme observado na figura X (figura 6A, $F_{3-251} = 27,20$, $p < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

Foram encontrados em média apenas 1,5 neurônios em degeneração em todos os grupos, sem diferenças significativas entre os mesmos, à exceção do grupo LME que recebeu EHPV 10 mg/kg associada ao exercício de natação ($p = 0,002$, $p = 0,002$ e $p = 0,033$ em relação a Laminectomia, LME e LME/EXE). Os resultados podem ser visualizados na figura 6B ($F_{3-251} = 5,80$, $p = 0,001$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

Alguns autores reportaram modificações estruturais relacionadas à prática de atividade física após lesão medular experimental. Endo et al. 2009, observaram que as alterações sofridas pelos tratos axonais foram minimizadas com a introdução do exercício físico. Kao et al. (2009) encontraram modificações plásticas no mapa somatotópico induzidas por treino em esteira após lesão medular em animais neonatos.

Alguns mecanismos foram sugeridos para a melhora no desempenho motor após transecção da medula espinal de ratos submetidos ao treino com esteira, correlacionada à expressão do fator de crescimento neurotrófico derivado do cérebro (Macias et al., 2009). Maier et al. (2008) demonstraram que, concomitante à melhora funcional, ocorrem modificações quanto aos fatores de crescimento, moléculas guia e de adesão e componentes de formação de sinapses, induzidas pela atividade física em ratos com lesão medular. No entanto, ainda não foram reportados os mecanismos neurais subjacentes recuperação funcional promovidas especificamente pelo exercício de natação. No presente trabalho, este exercício diminuiu a morte neuronal e este efeito foi mais significativo quando a terapia foi associada à administração de EHPV.

Extratos de própolis têm mostrado efeitos protetores sobre a morte neuronal, em modelos de neurotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio (Cardoso et al., 2001), privação de oxigênio e glicose (Nakajima et al., 2009) e apoptose mitocondrial (Izuta et al., 2008), associados à sua atividade antioxidante (Nakajima et al., 2007). Tal atividade pode estar diretamente envolvida na redução dos efeitos secundários ao trauma por estresse oxidativo, inclusive reduzindo processo inflamatório decorrente da lesão. Neste sentido, vale ressaltar que a amostra utilizada no presente trabalho apresentou alto grau de atividade antioxidante, que pode ter resultado na diminuição da morte neuronal.

Análise semiquantitativa da intensidade da reação inflamatória

A figura 7 ilustra as médias de escores obtidos para a intensidade da reação inflamatória. Observou-se que o grupo com LME apresentou os maiores índices (reação inflamatória severa) e que este efeito foi significativamente reduzido no grupo LME submetido à natação (reação inflamatória moderada). A redução foi ainda mais evidente nos animais que receberam tratamentos associados (reação inflamatória leve – moderada), de forma semelhante ao grupo Laminectomia, que mostrou escassa reação inflamatória (todos os valores de $p < 0,01$; Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas).

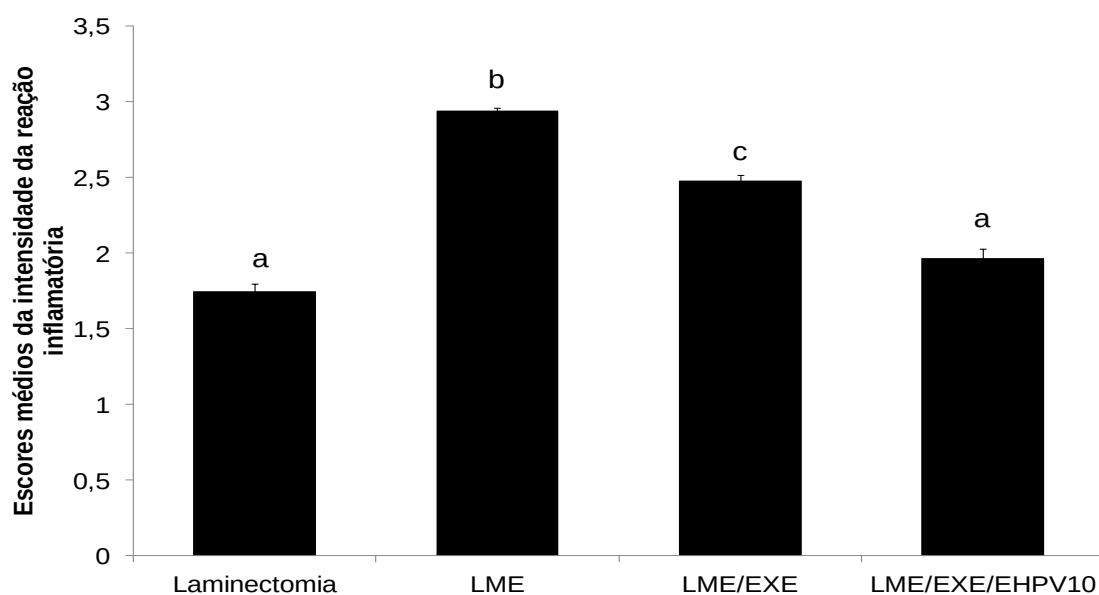


Figura 7:Resposta inflamatória na medula espinal, onde 1 corresponde a grau leve, 2 corresponde a grau modorrado e 3 grau severo. As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média, encontrados em cada grupo. EHPV10: tratamento com extrato hidroetanólico de própolis vermelha 10 mg/kg, durante duas semanas; EXE: exercício de natação durante três semanas. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn).

A atividade física pode ser um importante modulador neuro-imuno-endócrino: o exercício causa aumento na atividade simpática, levando a um aumento de catecolaminas no plasma e o subsequente aumento nos níveis sanguíneos de IL-6. Esta liberação de IL-6 na circulação é então seguida de um aumento de citocinas anti-inflamatórias IL-1ar e IL-10. O aumento da resposta simpática também leva ao aumento de lipólise e à ativação de células do sistema imune, efeitos que resultam na diminuição da gordura corporal e visceral, com decréscimo na produção de citocinas inflamatórias pelos linfócitos do sangue (Rosa-Neto et al., 2009; Penget al., 2004). De

acordo com revisão apresentada por Alves et al., (2013) o exercício pode representar uma terapia não farmacológica interessante por diminuir a inflamação crônica de grau leve- moderado.

O tratamento com EHPV aumentou o efeito benéfico do exercício na resposta inflamatória. Neste sentido, trabalhos mostraram que a própolis tem atividade anti-inflamatória (Khayyal et al., 1993; Moura et al., 2001), inclusive a própolis vermelha (Ledón et al., 1997). Este efeito parece ser mediado por compostos como o CAPE (Boreli et al., 2012) e a formononetina, respectivamente, esta última através da modulação da produção de interleucinas (Wang et al., 2012; Park et al., 2005).

Após LME, ocorre aumento na produção de NO pela isoforma induzida da NOS, que pode ser tóxico e causar insultos como cavitação tecidual (Matsuyama et al., 1998). Kasai et al. (2011), observaram aumento na expressão de NOS induzida após hemissecção que foi revertido pela administração do extrato etanólico da própolis chinesa. No entanto, este efeito ocorreu nos primeiros três dias após as cirurgias, enquanto a melhora comportamental foi observada depois de dez dias. Nossos resultados apontam para um quadro de inflamação crônica após a lesão, uma vez que o sacrifício foi realizado aos 28 dias. A própolis e o exercício de natação diminuíram este efeito. Os mecanismos subjacentes precisam ser elucidados, mas pode-se inferir que outros fatores, além da produção do NO podem estar envolvidos na lesão secundária e ação neuroprotetora da própolis vermelha.

Em suma, os dados comportamentais indicam que os tratamentos utilizados atuaram em períodos críticos da morte neuronal (7 a 14 dias), relacionados alterações morfológicas e estresse oxidativo. A análise celular corrobora esta hipótese e fornece evidências da diminuição dos efeitos secundários após lesão, inclusive sobre a resposta inflamatória, depois de 28 dias.

CONCLUSÃO

5.CONCLUSÃO

O exercício de natação e o tratamento com EHPV foram eficazes em acelerar a recuperação funcional motora após a lesão da medula espinal em ratos, sendo este efeito mais evidente para o EHPV na dose de 10 mg/kg. Embora a associação destas terapias não tenha mostrado efeito significativamente maior que os tratamentos isolados sobre o comportamentos dos animais, a análise histológica evidenciou que o EHPV, associado à atividade física, aumentou a ação anti-inflamatória no tecido lesionado e promoveu acentuada diminuição na morte neuronal. Os resultados sugerem, portanto, que ambas as terapias tiveram ação neuroprotetora frente à lesão medular por hemissecção torácica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, M. B.; NILSSON, I.; LEWANDOWSK, S. A.; KJELL, J; CODELUPPI, S.; L Olson, I.; Eriksson, U. Imatinib Enhances Functional Outcome after Spinal Cord Injury. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, June 2012.

ADELMAN, J. **Própolis variabilidade composicional correlação com a flora e a bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2005.

ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, S. A. L.; PIRES, A. J; REIS, P. F.; LIMA, O. S.; RIBEIRO, G. M. A.; CARDOSO, C. J. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal of Morphology**, v. 27, n.4, p.1105-1110, 2009.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal Ethnopharmacol**, V.113, n. 2, p.78-83. 2007.

ALMEIDA, P. A.; TONELLO, M. G. M. Benefícios da natação para alunos com lesão medular. **Efdportes**, v. 11, n. 106, 13, 2007.

ALVES, E. S.; LEMOS, V. A.; SILVA, F. R.; LIRA, F. S.; SANTOS, R. V. T.; ROSA, J. P. P.; CAPERUTO, E.; TUFIK, SERGIO.; MELLO, M. T. Low-Grade Inflammation and Spinal Cord Injury: Exercise as Therapy?. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p.7, 2013.

AMAR, A. P.; LEVY, M. Pathogenesis and Pharmacological Strategies for Mitigating Secondary Damage in Acute Spinal Cord Injury. **Neurosurgery**, v. 44, n. 5, p. 1027-1039, 1999.

AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION. Spinal cord injury statistics. Disponível em: <<http://www.asia-spinalinjury.org/>> Acessado em: 20 jun. 2012.

AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION. INTERNATIONAL STANDARDS FOR NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY. Reprint 2009. Atlanta, GA: American Spinal Injury Association; 2009.

ANDERLE, D. V.; JOAQUIM, A.F.; SOARES, M.S.; MIURA, F.K.; SILVA, F.L.; VEIGA, J. C. E.; MILAGRES, A.C.; DANIEL, J.W.; SOUZA, A.; HADDAD, L.; MUDO, M. L. Avaliação epidemiológica dos pacientes com traumatismo raquimedular operados no Hospital Estadual “Professor Carlos da Silva Lacaz”. **Coluna/columna**, v.9, n. 1, p. 58-61, 2010.

ARIAS, M. V. B.; SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 115-134, jan./mar. 2007.

ARVANIAN, V. L.; SCHNELL, L.; LOU, L.; GOLSHANI, R.; HUNANYAN, A.; GHOSH, A.; PEARSE, D. D.; ROBINSON, J. K.; SCHWAB, M. E.; FAWCETT, J. W.; MENDELL, L. M.

Chronic spinal hemisection in rats induces a progressive decline in transmission in uninjured fibers to motoneurons. **Experimental Neurology**, v. 216 n. 2, p. 471-80, 2009.

BHANDARI, P.; KUMAR, N.; SINGH, B.; AHUJA PS. Online HPLC-DPPH method for antioxidant activity of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. and characterization of kutkoside by ultra-performance LC-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Indian Journal Experimental Biology**. V. 48, n. 3, p. 323-8, Março, 2010.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.

BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B.; JORGE, L. L. R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n.3, p.18-22. 2009.

BERRETTA, A. A.; NASCIMENTO, A. P.; BUENO, P. C. P.; VAZ, M. M. DE O. L. L.; MARCHETTI, J. M. Propolis Standardized Extract (EPP-AF®), an Innovative Chemically and Biologically Reproducible Pharmaceutical Compound for Treating Wounds. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 512-521, 2012.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova Brasil**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa.** Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

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, n. 1, p. 1-21, 1995.

BEAUMONT, E.; KALOUSTIAN, S.; ROUSSEAU, G.; BRUNO CORMERY. Training improves the electrophysiological properties of lumbar neurons and locomotion after thoracic spinal cord injury in rats. **Neuroscience Research**, v. 62, p. 147–154, 2008.

BECKER, D.; GARY, D. S.; ROSENZWEIG, E. S.; GRILL, W. M.; MCDONALD. J.W. Functional electrical stimulation helps replenish progenitor cells in the injured spinal cord of adult rats. **Experimental Neurology**, v. 222, p. 211–218, 2010.

BETKER, A. L.; DESAI, A.; NETT, C.; KAPADIA, N.; SZTUM, T. Game-based exercises for dynamic short-sitting balance rehabilitation of people with chronic spinal cord and traumatic brain injuries. **Physical Therapy**, v.87, n.10, p. 1389-98, 2007.

BLOCH, G.; FRANCOYB, T. M.; WACHTELC, I.; PANITZ-COHENC, N.; FUCHSD, S.; MAZAR, A. Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 25, P.11240–11244, Jun, 2010.

BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v.73, n.1, p. 53-63, Nov, 2002.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. de.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CADOTTE, D. W.; FEHLINGS, M. G. Spinal Cord Injury: A Systematic Review of Current Treatment Options. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 3, p. 732–741, Março 2011.

CARDOSO, S. M.; RIBEIRO, M.; FERREIRA, I. L.; REGO, C. A. Northeast Portuguese propolis protects against staurosporine and hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons. **FoodChemToxicol**, v. 49, n. 11, p. 2862-8, Nov, 2011.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CASTRO, M. L.; NASCIMENTO, A. M.; IKEGAKI, M.; COSTA-NETO, C. M.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v.17, n.14, p. 5332-5335, 2009.

CHEN, J.; ZHANG, L. C.; XING, Y. M.; WANG, Y. Q.; XING, X. K. Diversity and Taxonomy of Endophytic Xylariaceous Fungi from Medicinal Plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

CRAIG, A.; TRAN, Y.; MIDDLETON, J. Psychological morbidity and spinal cord injury: a systematic review. **Spinal Cord**, v. 47, p. 108–114, 2009.

CUSTÓDIO, N. R. O.; CARNEIRO, M. R.; FERES, C.C.; LIMA, G. H. S.; JUBÉ, M. R. R.; WATANABE, L. E.; SALIBA, L. G. R. S. O.; DAHER, S.; GARCIA, A. C. F. Lesão medular no Centro de Reabilitação e Readaptação Dr. Henrique Santillo (CRER- GO). **Coluna/columna**, v.8, n. 3, p. 265-268, 2009.

DALEPRANE, J. B.; DA SILVA FREITAS, V.; PACHECO, A.; RUDNICKI, M.; FAINE, L. A.; DÖRR, F. A.; IKEGAKI, M.; SALAZAR, L. A.; ONG, T. P.; ABDALLA, D. S. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p.557-66, 2011.

DALEPRANE J. B.; SCHMID, T.; DEHNE, N.; RUDNICKI, M.; MENRAD, H.; GEIS, T.; IKEGAKI, M.; ONG, T. P.; BRÜNE, B.; ABDALLA, D. S. Suppression of hypoxia-inducible factor-1 α contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. **The Journal of Nutrition**, v.142, p. 441-7, 2012.

DAUGSH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. **ECAM**, p. 1-7, 2007.

DAVIS, M. I. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. **Pharmacology Therapy**, v. 118, p.36–57, 2008.

DEFINOS, H. L. A. Trauma raquimedular. **Medicina**. Ribeirão Preto. v. 32, p.388-400, out./dez. 1999.

DELGADO-ZAMARREÑO, M. M.; PÉREZ-MARTÍN, L.; BUSTAMANTE-RANGEL, M.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Pressurized liquid extraction as a sample preparation method for the analysis of isoflavones in pulses. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 2, p. 361-366, 2012.

EDGERTON, V. R.; TILLAKARATNE, N. J.; BIGBEE, A. J.; DE LEON, R. D.; ROY, R. R. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, p. 145-167, 2004.

EDGERTON, V. R.; Roy, R. R. Activity-Dependent Plasticity of Spinal Locomotion: Implications for Sensory Processing. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v.37, n. 4, p.171-178, 2009.

ENDO, T.; AJIKI, A.; INOUE, A.; KIKUCHI, M.; YASHIRO, B.; NAKAMA, S.; HOSHINO, Y.; MURAKAMI, T.; KOBAYASHI, E. Early exercise in spinal cord injured rats induces allodynia through TrkB signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 381, p. 339–344, 2009.

FAHERTY, C. J.; SHEPHERD, R. K.; HERASIMTSCHUK, A.; SMEYNE, R. J. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 134, p.170-9, 2005.

FORET, A.; QUERTAINMONT, R.; BOTMAN, O.; BOUHY, D.; AMABILI, P.; BROOK, G.; SCHOENEN, J.; FRANZEN, R. Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 3, p. 762-72, 2010.

FRANCHI, G. C. JR.; MORAES, C. S.; TORETI, V. C.; DAUGSCH, A.; NOWILL, A. E.; PARK, Y. K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evid Based Complement Alternat Med**. v. 2012, p. 1-6, 2012.

FREUD, P.; WEISKOPF, N.; WARD, N.; HUTTON, C.; GALL, A.; CICCARELLI, O.; CRAGGS, M.; FRISTON, K.; THOMPSON, A.J. Disability, atrophy and cortical reorganization following spinal cord injury. **Brain**, v.134, p. 1610–1622, 2011.

FUNARI, C. S.; FERRO, O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.1, p. 171-178, 2006.

FURLAN, J.C.; NOONAN, V.; CADOTTE, D.W.; FEHLINGS, M.G. Timing of Decompressive Surgery of Spinal Cord after Traumatic Spinal Cord Injury: An Evidence-Based Examination of Pre-Clinical and Clinical Studies. **Journal of neurotrauma**, v. 28, p. 1371–1399, August 2011.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2012, p. 11, 2012.

GENOVESE, T.; PATERNITI, I.; MAZZON, M.; ESPOSITO, E.; PAOLA, R.; GALUPPO, M.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. Efficacy of treatment with verbascoside,

biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in an experimental mice model of spinal cord trauma. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 382, p. 331–345, 2010.

GENSEL, J.C.; TOVAR, A.; BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M.S. Topiramate Treatment Is Neuroprotective and Reduces Oligodendrocyte Loss after Cervical Spinal Cord Injury. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. 1-6, 2012.

GOMEZ-PINILLA, F.; YING, Z.; ZHUANG, Y. Brain and spinal cord interaction: protective effects of exercise prior to spinal cord injury. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. 1-8, 2012.

GRAZIANO, A.; FOFFANI, G.; KNUDSEN, E. B.; SHUMSKY, J.; MOXON, K. A. Passive exercise of the hind limbs after complete thoracic transection of the spinalcord promotes cortical reorganization. **PLoS One**, v. 8, n. 1, 2013.

GONG, P.; CHEN, F.; LIU, X.; GONG, X.; WANG, J.; MA, Y. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester against cadmium-induced renal damage in mice. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 415-25, 2012.

GUANG, H. M.; DU, G.H. Protections of pinocembrin on brain mitochondria contribute to cognitive improvement in chronic cerebral hypoperfused rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 542, n. 1-3, p. 77-83, 2006.

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

HALL, E. D. Neurotherapeutics: Antioxidant Therapies for Acute Spinal Cord Injury. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**. v. 8, p. 152-167, 2011.

HAN, C. G.; HAN, J. K.; PARK, K. B.; KWAK, K. H.; PARK, S. S.; LIM, D. G. Effect of superoxide on the development and maintenance of mechanical allodynia in a rat model of chronic post-ischemia pain. **Korean Journal of Anesthesiology**, v.63, n. 2, p.149–156, Ago. 2012.

HAGEN, E. M.; REKAND, T.; GILHUS, N. E. Traumatic. spinal cord injuries–incidence, mechanisms and course. **Tidsskr Nor Lægeforen**, v. 132, n. 7, p. 831–7, 2012.

HUH, J.; NAM, D.; BAEK, Y.; KANG, J. W.; PARK, D.; CHOI, D.; LEE, J. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. **International Immunopharmacology**, v.11, p. 46–54, 2011.

ILHAN, A; AKYOL, O; GUREL, A. A.; ARMUTCU. F.; IRAZ, M.; OZTAS, E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 3, p. 386-394, 2004.

IMPELLIZZERI, D.; MAZZON, E.; PATERNITI, I.; ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Effect of Fasudil, a selective inhibitor of Rho Kinase activity, in the secondary injury associated with the experimental model of spinal cord trauma. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, n. 1, p. 21-33, 2012.

INOUE, H.T.; SOUSA, E.A.; ORSI, R. O.; FUNARI, S.R.C.; BARRETO, L.M.R.C.; DIB, A.P.S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v.15, n.2, p. 65-69,2007.

IZUTA, H.; SHIMAZAWA, M.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; HARA, H. Protective effects of Chinese propolis and its component, chrysin, against neuronal cell death via inhibition of mitochondrial apoptosis pathway in SH-SY5Y cells. **J Agric Food Chem**,v. 8, n. 56, p. 44-53, out, 2008.

IZUTA H.;NARAHARA Y.;SHIMAZAWA M.;MISHIMA S.;KONDO S.;HARA H. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.32 n.12, p.1947-51,dezembro 2009.

JAKEMAN, L. B.; HOSCHOUERA, E. L.; BASSO, M. Injured mice at the gym: Review, results and considerations for combining chondroitinase and locomotor exercise to enhance recovery after spinal cord injury. **Brain Research Bulletin**, v.84, p. 317–326, 2011.

JIA, Z.; ZHU, H.; LI, J.; WANG, X.; MISRA, H.; LI, Y. Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. **Spinal Cord**, v. 50, n. 4, p.264-274, 2012.

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

KAFADAR, I.H.; GÜNEY, A.; TÜRK, C.Y.; ÖNER, M.; SILICI, S. Royal jelly and bee pollen decrease bone loss due to osteoporosis in an oophorectomized rat model. **Klem Hastalik Cerrahisi**, v.23, n.2, p.100-105, 2012.

KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A.; EL-KHATIB. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **As Drugs ExpClin Res**, V.19, n. 5, p.197-203, 1993.

KAO, T.; SHUMSKY, J. S.; MURRAY, M.; MOXON, K. A. Exercise induces cortical plasticity after neonatal spinal cord injury in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 23, p.7549-7557, 2009.

KASAI, M.; FUKUMITSU, H.; SOUMIYA, H.; FURUKAWA S. Caffeic acid phenethyl ester reduces spinal cord injury-evoked locomotor dysfunction. **Biomedical Research**, v. 32, n. 1, p.1-7, 2011.

KEMP, B. J.; BATEHAM, A. L.; MULROY, S. J.; THOMPSON, L.; ADKINS, R. H.; KAHAN, J.S. Effects of reduction in shoulder pain on quality of life and community activities among people living long-term with SCI paraplegia: a randomized control trial. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 34, n. 3, p. 278-84, 2011.

KIGERL, K. A.; MCGAUGHY, V. M.; POPOVICH, P. G. Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 494, n. 4, p. 578-594, 2006.

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

KWON, Y. S.; PARK, D. H.; SHIN, E. J.; KWON, M. S.; KO, K. H.; KIM, W. K. JHOO, J. H.; JHOO, W. K.; WIE, M. B.; JUNG, B. D.; KIM, H. C. Antioxidant propolis attenuates kainate-induced neurotoxicity via adenosine A1 receptor modulation in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 355, p.231-235. 2004.

KLOOSTERMAN, M. G.; SNOEK, G. J.; JANNINK, M. J. Systematic review of the effects of exercise therapy on the upper extremity of patients with spinal-cord injury. **Spinal Cord**, v. 47, n. 3, p. 196-203, 2008.

LANNEM, A. M.; SORENSEN, M.; FROSLIE, K. F.; HJELTNES, N. Incomplete spinal cord injury, exercise and life satisfaction. **Spinal Cord**, v. 47, n. 4, p. 295-300, 2008.

LEDÓN, N.; CASACO, A.; GONZALEZ, R.; MERINO, N.; GONZALEZ, A.; TOLON, Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. **Acta Pharmacologia Sinica**, v.18, p. 274-276. 1997.

LIO, A.; OHGUCHI, K.; MARUYAMA, H.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; ICHIHARA, K.; NOZAWA, Y.; ITO, M. Ethanol extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. **Phytomedicine**, v. 15, p. 383-8, 2012.

LIU, G.; KEELER, M. E.; ZHUKAREVA, V.; HOULÉ, J. D. Cycling exercise affects the expression of apoptosis-associated microRNAs after spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**, v. 226, p. 200–206, 2010.

LIU, R.; GAO, M.; YANG, Z. H.; DU, G. H. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion both in vivo and in vitro. **Brain Research**, v. 1216, p.104-115, 2008.

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. 16, p. 1374:100-9, 2011.

LIU, R.; WU, C. X.; ZHOU, D.; YANG, F.; TIAN, S.; ZHANG, L.; ZHANG, T. T.; DU, G. H. Pinocembrin protects against β -amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. **BMC Med**, Set, 2012.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 17, p. 388-395, 2007.

LOTFY, M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 7, n. 1, p. 22-31, 2006.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.447-454, 2008.

MACEFIELD, V. G.; BURTON, A. R.; BROWN, R. Somatosympathetic vasoconstrictor reflexes in human spinal cord injury: responses to innocuous and noxious sensory stimulation below lesion. **Frontiers in Physiology**, v.3, p. 2-8, June 2012.

MACIAS, M.; NOWICKA, M. D.; CZUPRYN, A.; SULEJCZAK, D.; SKUP, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J.; CZARKOWSKA-BAUCH, J. Exercise-induced motor improvement after complete spinal cord transection and its relation to expression of brain-derived neurotrophic factor and presynaptic markers. **BMC Neuroscience**, v. 10, p. 144, 2009.

MAGNUSON, D. S. K.; SMITH, R. R.; BROWN, E. H.; ENZMANN, GABY.; ANGELI, CLAUDIA.; QUESADA, P. M.; BURKE, DARLENE. Swimming as a Model of Task-Specific Locomotor Retraining After Spinal Cord Injury in the Rat. **Neurorehabil Neural Repair**, v.23, n.6, p.535-545. Mar 2010.

MAIA-ARAUJO, Y. L. F. **Estudo Da Atividade Antimicrobiana De Variedades De Própolis da Região da Foz do Rio São Francisco – Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Tiradentes, UNIT, Aracaju/SE, 2009.

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

MANDALARI, G. B.; GENOVESE, T.; BISIGNANO, C.; MAZZON, E.; WICKHAM, M. S. J.; PAOLA, R. D.; BISIGNANO, G.; CUZZOCREA, S. Neuroprotective effects of almond skins in experimental spinal cord injury. **Clinical Nutrition**, v.30, p. 221e233, 2011.

MANI, F.; DAMASCENO, H. C.; NOVELLI, E. L.; MARTINS, E. A.; SFORCIN, J. M. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal Ethnopharmacologie**, v.105, p.95-98, 2006.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêutica dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, p.529-536, 1996.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal Ethnopharmacologie**, v.74, p.105-112, 2001.

MATSUYAMA, Y.; SATO, K.; KAMIYA, M.; YANO, J.; IWATA, H.; ISOBE, K-I. Nitric oxide: a possible etiologic factor in spinal cord cavitation. **Journal of Spinal Disorders**, v.11, n. 3, p. 248–252, 1998.

MCCCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015–2022, 2007.

MENDONÇA, L. S. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados a própolis vermelha**. Qualificação de Dissertação do Mestrado - Universidade Tiradentes/Sergipe. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. Aracaju, Brasil, 2010.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, P. 405-411, 2005.

MIRBAGHERI, M. M.; PATEL, C.; QUINEY, K. Robotic-assisted locomotor training impact on neuromuscular properties and muscle strength in Spinal Cord Injury. **Conference Proceeding: IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**, v.4, p.132-135, 2011.

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

MOON, Y. J.; LEE, J. Y.; OH, M. S.; PAK, Y. K.; PARK, K. S.; OH, T. H.; YUNE, T. Y. Inhibition of inflammation and oxidative stress by Angelica dahuricae radix extract decreases apoptotic cell death and improves functional recovery after spinal cord injury. **Journal Neuroscienci Reserch**, v. 90, n. 1, p. 243-56, 2012.

MONTPIED, P.; DE BOCK, F.; RONDOUIN, G.; NIEL, G.; BRIANT, L.; COURSEAU, A. S.; LERNER-NATOLI, M.; BOCKAERT, J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Brain Reserch Molecular Brain Research**, v.115, p.111-120, 2003.

MOURA, S. A. L.; FERREIRA, M. A. N. D.; ANDRADE, S. P.; REIS, M. L. C.; NOVIELLO, M. L.; CARA, D. C. Brazilian Green Propolis Inhibits Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, V. 2011 p. 7, 2011.

MURPHY, M. N.; ICHIYAMA, R. M.; IWAMOTO, G. A.; MITCHELL, J.; SMITH, S. A. Exercise pressorreflex function following acute hemi-section of the spinal cord in cats. **Frontiers Physiology**, v. 4, p.1, Fevereiro, 2013.

NAKAJIMA, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sciences**, v. 80, p.370-377, 2007.

NAKAJIMA, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Neuroprotective effects of Brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation stress, with a gene-expression analysis. **Phytother Reserch**, V. 23, n. 10, p.1431-8, out, 2009.

NEWARIRY, A. S.; SALAMA, A. F.; HUSSIN, H. M.; YOUSEF, M. I. Propolis alleviates aluminium-induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats. **Food ChemistryToxicology**, v. 47, p.1093-1098, 2009.

NOELKER, C. B. M.; GOCKE, P.; WEI, X.; KLOCKGETHER, T.; DU, Y.; DODEL, R. The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **NeurosciLett**, v. 43, p. 383-39, 2005.

OYIMBO, C. A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. **Acta Neurobiol Exp**, v. 71, P. 281–299, 2011.

OLIVEIRA, M. E.; PODEROSO, J. C. M.; FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, G. T.; ARAÚJO, E. D. Apicultores do Estado de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 1, 2010.

OLIVEIRA, S. G. D.; MOURA, F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. S.; PINO, F. A. B.; LUND, R. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, p. 428– 437, 2012.

PARK, Y. P., IKEGAKI, M., ABREU, J. A. D. S. E ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p. 313-318, 1998.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINE, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 2, p. 997-1003, 2002.

PARK, K.; LEE, Y.; PARK, S.; LEE, S.; HONG, Y.; KIL LEE, S.; HONG, Y. Synergistic effect of melatonin on exercise-induced neuronal reconstruction and functional recovery in a spinal cord injury animal model. **Journal of Pineal Research**, v. 48, n. 3, p. 270-81, 2010.

PARK, J.; KIM, S. H.; CHO, D.; KIM, T. S. Formononetin, a phyto-oestrogen, and its metabolites up-regulate interleukin-4 production in activated T cells via increased AP-1 DNA binding activity. **Immunology**, V. 116, n. 1, p.71-81, set, 2005.

PATERNITI, P.; MELANI, A.; CIPRIANI, S.; CORTI, F.; MELLO, T.; MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S.; PEDATA, F. Selective adenosine A2A receptor agonists and antagonists protect against spinal cord injury through peripheral and central effects. **Journal of Neuroinflammation**, v.8:31, p. 2-14, 2011.

PENG, Y.P.; QIU, Y. H.; JIANG, J. L.; WANG, J. J. Effect of catecholamines on IL-2 production and NK cytotoxicity of rats in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 10, p. 1354–1360, 2004.

PEREIRA, A. D. S., SEIXAS, F. R. M. S. E NETO, F. R. D. A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, C. U.; JESUS, R. M. Epidemiologia do Traumatismo Raquimedular Epidemiology of spinal injury in Aracaju. A prospective series. **Jornal Brasileiro Neurocirurgia**, v. 22, n. 2, p. 26-31, 2011.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray

ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484-6491, 2011.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, São Paulo, May. 2002.

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

RASLAN, A. M.; NEMECEK, A N. Controversies in the Surgical Management of Spinal Cord Injuries. **Neurology Research International**, v. p. 6, 2012.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal Scienci off Food and Agriculture**, v. 91, n. 2, p 363-70, 2011.

ROBERT, A. A.; AL JADID, M. S.; BIN AFIF, S.; AL SOWYED, A. A.; AL-MUBARAK, S. The effects of different rehabilitation strategies on the functional recovery of spinal cord injured rats: an experimental study. **Spine**, v. 35, n. 23, p. 1273-1277, 2010.

ROSSIGNOL, S.; SCHWAB, M.; SCHWARTZ, M.; FEHLINGS, M. G. Spinal cord injury: time to move? **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 44, p. 11782-11792, 2007.

ROSA NETO, J. C.; LIRA, F. S.; OYAMA, L. M.; ZANCHI, N. E.; YAMASHITA, A. S.; BATISTA, M. L. JR.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M.; SEELAENDER, M. L. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 106, no. 5, p. 697–704, 2009.

SANDROW-FEINBERG, H. R.; ZHUKAREVA, V.; SANTI, L.; MILLER, K.; SHUMSKY, J. S.; BAKER, D. P.; HOULE, J. D. PEGylated interferon-beta modulates the acute inflammatory response and recovery when combined with forced exercise following cervical spinal contusion injury. **Experimental Neurology**, v. 223, n. 2, p. 439-451, 2010.

SARUHASHI, Y.; YOUNG, W.; PERKINS, R. The recovery of 5-HT immunoreactivity in lumbosacral spinal cord and locomotor function after thoracic hemisection. **Experimental Neurology**, v. 139, n. 2 p. 203-13, jun, 1996.

SEBRAE. Histórias de Sucesso: experiências empreendedoras. (Org) Mara Regina Veit. Belo Horizonte: SEBRAE-MG. **2003**.

SCHMITT, E. K.; MOORE, C. M.; KRASTEL, P.; PETERSEN, F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 4, p. 497-504, 2011.

SMITH, R. R.; BROWN, E. H.; SHUM-SIU, A.; WHELAN, A.; BURKE, D. A.; BENTON, R. L.; MAGNUSON, D. S. K. Swim Training Initiated Acutely after Spinal Cord Injury Is Ineffective and Induces Extravasation In and Around the Epicenter. **Journal of neurotrauma**, v. 26, p. 1017–1027, julio, 2009.

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

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 253–260, 2011.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, JR. A.; LOPES, C. A.; BANKOVA, V.; FUNARI S. R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 243-249, 2000.

SILVA, B. B. **Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP, 2008.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M.; Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian Própolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 313-316, 2007.

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431–435, 2006.

SILVA, M. C. R.; OLIVEIRA, R.J.; CONCEIÇÃO, M. I. G. Efeitos da natação sobre a independência funcional de pacientes com lesão medular. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, v. 11, n. 4, Jul/Ago, 2005.

SIQUERA, A.B.S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I.; MAIA, R. S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; QUEIROZ, L. A.; PORTO, A. L. F. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Applied Microbiology**, v. 48, p. 90–96, 2009.

SONNTAG, V. K.; DOUGLAS, R. A. Management of cervical spinal cord trauma. **Journal of Neurotrauma**, v. 9, n. 1, p. 385-396, 1992.

SOUZA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), **Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 85-93, Jan./Mar., 2007.

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

TESTER, N. J.; BARBEAU, H.; HOWLAND, D. R.; CANTRELL, A.; BEHRMAN, A. L. Arm and leg coordination during treadmill walking in individuals with motor incomplete spinal cord injury: A preliminary study. **Gait & Posture**, v. 36, n. 1, p. 49-55, 2012.

TOIT, K. D.; NUTHELEZI, S.; BODENSTEIN, J. Anti-inflammatory and antibacterial profiles of selected compounds found in South African propolis. **South African Journal of Science**, v. 105, n. 11-12, p. 470-472, 2009.

TOKLU HZ, HAKAN T, CELIK H, BIBER N, ERZIK C, OGUNC AV, AKAKIN D, CIKLER E, CETINEL S, ERSAHIN M, SENER G. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury in rats. **J Spinal Cord Med**. v. 3, n. 4, p. 401-9.

TORRES, B.B.; SILVA, C.M.O.; ALMEIDA, Á.E.R.F.; CALDEIRA, F.M.C.; GOMES, M.G.; ALVES, E.G.L.; SILVA, S.J.; MELO, E.G.; MODELO experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotático modificado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, p.92-99, 2010.

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

TRUSHEVA, B; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **e-CAM**, v. 3, p. 249- 254, 2006.

TSAI, S. K.; LIN, M. J.; LIAO, P. H.; YANG, C. Y.; LIN, S. M.; LIU, S. M.; LIN, R. H.; CHIH, C. L.; HUANG, S. S. Caffeic acid phenethyl ester ameliorates cerebral infarction in rats subjected to focal cerebral ischemia. **Life Science**, v. 78 n. 2 p. 758-62, 2006.

KOYU, A.; OZGUNER, F.; YILMAZ, H.; UZ, E.; CESUR, G.; OZCELIK, N. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on oxidative stress in rat liver exposed to the 900 MHz electromagnetic field. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, P. 429-34, 2009.

TY, Y.; JY, L.; CM, C.; HC, K.; Oh, T. H. Neuroprotective effect of *Scutellaria baicalensis* on spinal cord injury in rats. **Journal Neurochemistry**, v. 110, p. 1276-87, 2009.

UENO, N.; OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; NISHIDA, M.; OHNO, H. Effects of swimming training on Brown-adipose-tissue activity in obese ob/ob mice: GDP binding and UCP m-RNA expression. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 95, n.1, p. 92-104, 1997.

ZHAO, Z.; LIU, N.; HUANG, J.; LU, P.; XU, X. Inhibition of cPLA2 activation by *Ginkgo biloba* extract protects spinal cord neurons from glutamate excitotoxicity and oxidative stress-induced cell death. **Journal Neurochemistry**, v. 116, n. 6, p. 1057-1065, Mar 2011.

ZHU, J. W.; CHEN, T.; GUAN, J.; LIU, W. B.; LIU, J. Neuroprotective effects of allicin on spinal cord ischemia-reperfusion injury via improvement of mitochondrial function in rabbits. **Neurochemistry International**, v. 61, p. 640-8, 2012.

WANG, W. C.; LIANG, S. L.; CHEN, Y. K.; LIN, L. M. The therapeutic effect of fractionated radiation on DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v. 44, p.1160-1166, 2008.

WANG, Y.; ZHU, Y.; GAO, L.; YIN, H.; XIE, Z.; WANG, D.; ZHU, Z.; HAN, X. Formononetin attenuates IL-1 β -induced apoptosis and NF- κ B activation in INS-1 cells. **Molecules**, v. 24, n.17, p.10052-64, Ago, 2012.

WEI, X.; MA, Z.; FONTANILLA, C. V.; ZHAO, L.; XU, C.; TAGGLIABRACI, V.; JOHNSTONE, B. H.; DODEL, R. C.; FARLOW, M. R.; DU, Y. Caffeic acid phenethyl ester prevents cerebellar granule neurons (CGNs) against glutamate-induced neurotoxicity. **Neuroscience**, v. 155, p.1098-105, 2008.

WELLS, T. N. C. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 2-12, 2011.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical. Biology and Medicine**, v.36, p. 838-849, 2004.

WILLOUGHBY, D. S.; PRIEST, J. W.; JENNINGS, R. A. Myosin Heavy Chain Isoform and Ubiquitin Protease mRNA Expression After Passive Leg Cycling in Persons With Spinal Cord Injury. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 81, n. 2, p. 157-163, 2000.

WRIGHT, C. T.; MASRI, W.; OSMAN, A.; HOWDHURY, J.; JOHNSON, W. E. B. Concise Review: Bone Marrow for the Treatment of Spinal Cord Injury: Mechanisms and Clinical Applications. **Stem cells**. v. 29, p. 169–178, 2011.

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

YE, Y.; HOU, R.; CHEN, J.; MO, L.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; MO, Z. Formononetin-induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 4, p. 263-7. 2012.

YICK, L. W.; WU, W.; SO, K. F.; WONG, S. Y. Time course of NOS expression and neuronal death in Clarke's nucleus following traumatic injury in adult rat spinal cord. **NeurosciLett**. V. 30, n. 241 (2-3) p.155-8, jan, 1998.

YING, Z.; ROY, R. R.; ZHONG, H.; ZDUNOWSKI, S.; EDGERTON, V. R.; GOMEZ-PINILLA, F. BDNF-Exercise Interactions in the Recovery of Symmetrical Stepping After a Cervical Hemisection In Rats. **Neuroscience**, v.155, n. 4, p. 1070–1078, Sept. 2008.

YIP, P. K.; MALASPINA, A. Spinal cord trauma and the molecular point of no return Molecular. **Neurodegeneration**, v. 7, n. 6, p. 2-10, 2012.

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

ZHANG, H.; CHANG, M.; HANSEN, C. N.; BASSO, D. M.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L. J. Role of Matrix Metalloproteinases and Therapeutic Benefits of Their Inhibition in Spinal Cord Injury. **Neurotherapeutics**, v. 8, n. 2, p. 206–220, April, 2011.

MARSH, B. C.; ASTILL, S. L.; UTLEY, A.; ICHIYAMA, R. M. Movement rehabilitation after spinal cord injuries: emerging concepts and future directions. **Brain Research Bulletin**, V. 84, p. 327–336, 10 March, 2011.

9. ANEXOS

Ficha de Classificação Neurológica da Lesão Medular Espinal

Patient Name _____

Examiner Name _____ Date/Time of Exam _____

ASIA AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION **ISCOS** INTERNATIONAL STANDARDS FOR NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY

MOTOR

KEY MUSCLES (scoring on reverse side)

	R	L	
C5			Elbow flexors
C6			Wrist extensors
C7			Elbow extensors
C8			Finger flexors (distal phalanx of middle finger)
T1			Finger abductors (little finger)

UPPER LIMB TOTAL (MAXIMUM) □ + □ = □
(25) (25) (50)

Comments:

	R	L	
L2			Hip flexors
L3			Knee extensors
L4			Ankle dorsiflexors
L5			Long toe extensors
S1			Ankle plantar flexors

(VAC) Voluntary anal contraction (Yes/No) □

LOWER LIMB TOTAL (MAXIMUM) □ + □ = □
(25) (25) (50)

LIGHT TOUCH PIN PRICK

	R	L	R	L
C2				
C3				
C4				
C5				
C6				
C7				
C8				
T1				
T2				
T3				
T4				
T5				
T6				
T7				
T8				
T9				
T10				
T11				
T12				
L1				
L2				
L3				
L4				
L5				
S1				
S2				
S3				
S4-5				

TOTALS { □ + □ = □ }
(MAXIMUM) (56) (56) (56) (56)

SENSORY

KEY SENSORY POINTS

0 = absent
1 = altered
2 = no mal
NT = not to stable

• Key Sensory Points

(DAP) Deep anal pressure (yes/no) □

PIN PRICK SCORE (max: 112) □ + □ = □

LIGHT TOUCH SCORE (max: 112) □ + □ = □

NEUROLOGICAL LEVEL R L

SENSORY MOTOR □ □

SINGLE NEUROLOGICAL LEVEL □

COMPLETE OR INCOMPLETE? □

Incomplete = Any sensory or motor function in S4-S5

ASIA IMPAIRMENT SCALE (AIS) □

(In complete injuries only)

ZONE OF PARTIAL PRESERVATION R L

Most caudal level with any innervation

SENSORY MOTOR □ □

This form may be copied freely but should not be altered without permission from the American Spinal Injury Association.

REV 04/11

Muscle Function Grading

0 = total paralysis

1 = palpable or visible contraction

2 = active movement, full range of motion (ROM) with gravity eliminated

3 = active movement, full ROM against gravity

4 = active movement, full ROM against gravity and moderate resistance in a muscle specific position.

5 = (normal) active movement, full ROM against gravity and full resistance in a muscle specific position expected from an otherwise unimpaired person.

5* = (normal) active movement, full ROM against gravity and sufficient resistance to be considered normal if identified inhibiting factors (i.e. pain, disuse) were not present.

NT = not testable (i.e. due to immobilization, severe pain such that the patient cannot be graded, amputation of limb, or contracture of >50% of the range of motion).

ASIA Impairment (AIS) Scale

☐ **A = Complete.** No sensory or motor function is preserved in the sacral segments S4-S5.

☐ **B = Sensory Incomplete.** Sensory but not motor function is preserved below the neurological level and includes the sacral segments S4-S5 (light touch, pin prick at S4-S5; or deep anal pressure (DAP)), AND no motor function is preserved more than three levels below the motor level on either side of the body.

☐ **C = Motor Incomplete.** Motor function is preserved below the neurological level**, and more than half of key muscle functions below the single neurological level of injury (NLI) have a muscle grade less than 3 (Grades 0-2).

☐ **D = Motor Incomplete.** Motor function is preserved below the neurological level**, and at least half (half or more) of key muscle functions below the NLI have a muscle grade ≥ 3 .

☐ **E = Normal.** If sensation and motor function as tested with the ISNCSCI are graded as normal in all segments, and the patient had prior deficits, then the AIS grade is E. Someone without an initial SCI does not receive an AIS grade.

**For an individual to receive a grade of C or D, i.e. motor incomplete status, they must have either (1) voluntary anal sphincter contraction or (2) sacral sensory sparing with sparing of motor function more than three levels below the motor level for that side of the body. The Standards at this time allows even non-key muscle function more than 3 levels below the motor level to be used in determining motor incomplete status (AIS B versus C).

NOTE: When assessing the extent of motor sparing below the level for distinguishing between AIS B and C, the motor level on each side is used; whereas to differentiate between AIS C and D (based on proportion of key muscle functions with strength grade 3 or greater) the single neurological level is used.

Steps in Classification

The following order is recommended in determining the classification of individuals with SCI.

1. Determine sensory levels for right and left sides.
2. Determine motor levels for right and left sides.
Note: in regions where there is no myotome to test, the motor level is presumed to be the same as the sensory level, if testable motor function above that level is also normal.
3. Determine the single neurological level.
This is the lowest segment where motor and sensory function is normal on both sides, and is the most cephalad of the sensory and motor levels determined in steps 1 and 2.
4. Determine whether the injury is Complete or Incomplete. (i.e. absence or presence of sacral sparing)
If voluntary anal contraction = No AND all S4-5 sensory scores = 0 AND deep anal pressure = No, then injury is COMPLETE. Otherwise, injury is incomplete.

5. Determine ASIA Impairment Scale (AIS) Grade:

Is injury Complete? If YES, AIS=A and can record ZPP (lowest dermatome or myotome on each side with some preservation)

NO

Is injury

motor Incomplete?

If NO, AIS=B
(Yes=voluntary anal contraction OR motor function more than three levels below the motor level on a given side, if the patient has sensory incomplete classification)

YES

Are at least half of the key muscles below the single neurological level graded 3 or better?

NO

AIS=C

YES

AIS=D

If sensation and motor function is normal in all segments, AIS=E

Note: AIS E is used in follow-up testing when an individual with a documented SCI has recovered normal function. If at initial testing no deficits are found, the individual is neurologically intact; the ASIA Impairment Scale does not apply.

Categorias de pontuação da Escala BBB de avaliação locomotora*.

- 00-** Sem movimento do membro posterior;
- 01-** Movimento discreto de uma ou duas articulações
- 02-** Movimento amplo de uma articulação, ou movimento amplo de uma articulação e discreto de outra articulação;
- 03-** Movimento amplo de duas articulações;
- 04-** Movimento discreto das três articulações do membro posterior;
- 05-** Movimento discreto de duas articulações e amplo da terceira;
- 06-** Movimento amplo de duas articulações e discreto da terceira;
- 07-** Movimento amplo das três articulações do membro posterior;
- 08 -** Movimento em “varredura” do membro posterior, ou posicionamento plantar da pata, ambos sem sustentação de peso;
- 09-** Posicionamento plantar da pata com sustentação do peso na posição estática, ou passos dorsais com sustentação de peso ocasional, freqüente ou constante e sem passos plantares;
- 10-** Passos plantares ocasionais, com sustentação de peso, mas sem coordenação;
- 11-** Passos plantares com sustentação de peso de freqüente a constante e sem coordenação;
- 12-** Passos plantares com sustentação de peso de freqüente a constante e coordenação ocasional;
- 13-** Passos plantares com sustentação de peso de freqüente a constante e coordenação freqüente;
- 14-** Passos plantares com sustentação de peso constante, c/ coordenação constante; posição da pata predominantemente rodada (externamente ou internamente) no contato inicial ou final da fase de apoio, ou passos plantares frequentes, coordenação constante e passos dorsais ocasionais;
- 15-** Passos plantares e coordenação constantes, sem abertura dos dedos, ou abertura ocasional dos dedos; posição da pata predominantemente paralela ao corpo no contato inicial;
- 16-** Passos plantares e coordenação constantes; abertura dos dedos freqüente; posição da pata predominantemente paralela ao contato inicial, e rodada ao final da fase de apoio;
- 17-** Passos plantares e coordenação constantes; abertura dos dedos freqüente; posição da pata predominantemente paralela ao contato inicial e ao final do apoio;
- 18-** Passos plantares e coordenação constantes; abertura dos dedos constante; posição da pata predominantemente paralela ao contato inicial e rodada ao final da fase de apoio;
- 19-** Passos plantares e coordenação constantes; abertura dos dedos constante; posição da pata predominantemente paralela ao contato inicial e ao final da fase de apoio, cauda abaixada durante a caminhada;
- 20 -** Passos plantares e coordenação constantes; constante abertura dos dedos; posição da pata predominantemente paralela ao contato inicial e ao final da fase de apoio; cauda constantemente erguida e tronco instável;
- 21 -** Passos plantares, coordenação e abertura dos dedos constantes; posição da pata predominantemente paralela em todas as posições; estabilidade do tronco e cauda erguida.

Obs.: O item coordenação refere-se à coordenação entre os membros anteriores e posteriores.

* BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1996.

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Efeitos do tratamento com própolis vermelha associado ao exercício físico sobre a lesão medular em ratos

Pesquisador Responsável Fanildes Silva Moraes dos Santos

Data da Versão 10/11/2010

Cadastro 131110

Data do Parecer 29/11/2010

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

Objetivos do Projeto

Evidências recentes indicam que a morte neuronal e degeneração dos axônios após trauma da medula espinal pode ser agravada por processos de inflamação local e formação de espécies reativas de oxigênio. Ao mesmo tempo, a atividade física tem sido apontada como estratégia para reabilitação após lesão medular, uma vez que promove processos de plasticidade neuronal como a regeneração axonal, possivelmente pela ativação de fatores de crescimento neuronal (Macias et al., 2009). Nossa hipótese é que a própolis, por apresentar atividade antiinflamatória e antioxidante, tenha efeito protetor sobre os eventos secundários à lesão medular e possa ser associada à atividade física, aumentando a eficácia da reabilitação, abrindo perspectiva para uma nova estratégia terapêutica.

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com extrato de própolis vermelha associada ou não ao exercício físico sobre a lesão de vias sensório-motoras em ratos submetidos à hemissecção da medula espinal.

Objetivos Específicos

Verificar os efeitos do tratamento com extratos da própolis vermelha associada ou não ao exercício aeróbio sobre:

- O desempenho locomotor físico após hemissecção da medula espinal ou laminectomia em ratos por meio da análise funcional
- As alterações plásticas no tecido neuronal após hemissecção da medula espinal ou laminectomia por meio da análise histoquímica e imunohistoquímica
- A glicemia, insulemia e colesterol dos animais
- As condições histológicas de fígado, pâncreas e músculos

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. Neste sentido, a própolis - substância resinosa obtida pelas abelhas - apresenta propriedades antioxidantes e antiinflamatórias descritas na literatura, inclusive no SNC. Adicionalmente, a atividade física é apontada como estratégia para reabilitação motora após lesão medular por promover a síntese de fatores que favoreceriam o crescimento axonal. Neste trabalho nos propomos a testar os efeitos do tratamento com o extrato etanólico da própolis vermelha, associado à atividade física, sobre a lesão medular em ratos. Os efeitos serão caracterizados após lesão medular por hemissecção 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

Página 1-2


Bárbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes

Universidade Tiradentes, junto ao laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural e Laboratório de Biomateriais, mediante aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Sim
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

FAPITEC/SE

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

Comentários sobre a Introdução

A

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

Comentários sobre os Objetivos

Objetivos claros e de acordo com a metodologia proposta

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 80 Local 01
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crêterios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Adequado
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Comentário
Data de início prevista	mês 1
Data de término prevista	mês 24
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Financiamento proveniente em sua maior parte da FAPITEC/SE.

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

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto é de relevância ao demonstrar a importância da utilização dos recursos naturais disponíveis para o desenvolvimento de tratamentos alternativos.


Bárbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes