



UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Neurodegeneração e déficits cognitivos após lesão medular:
efeitos do tratamento com extrato aquoso da casca do fruto de
*Punica granatum***

JULIANA ANDRADE PASSOS PRADO

Aracaju

Março – 2018



UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Neurodegeneração e déficits cognitivos após lesão medular:
efeitos do tratamento com extrato aquoso da casca do fruto de
*Punica granatum***

Dissertação de Mestrado/Exame de defesa
submetido à banca examinadora para a
obtenção do título de Mestre em Saúde e
Ambiente, na área de concentração Saúde e
Ambiente.

JULIANA ANDRADE PASSOS PRADO

Orientadores

Prof^a. Margarete Zanardo Gomes, Dr.

Prof. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Dr.

Aracaju

Março – 2018

Neurodegeneração e déficits cognitivos após lesão medular: efeitos do tratamento com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum*

Juliana Andrade Passos Prado

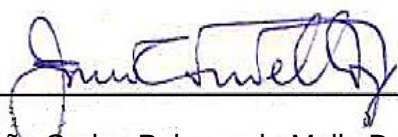
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE

Margarete Zanardo Gomes Dra.
Orientadora

Ricardo Luiz Albuquerque Cavalcanti Júnior Dr.
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso Dra.
Universidade Tiradentes

Andressa Sales Coelho Dra.
Universidade Tiradentes (Suplente)



João Carlos Palazzo de Mello Dr.
Universidade Estadual de Maringá

FICHA CATALOGRÁFICA

P912n Prado, Juliana Andrade Passos
Neurodegeneração e déficits cognitivo após lesão medular: efeitos do tratamento com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* / Juliana Andrade Passos Prado ; orientação [de] Prof.^a Dr.^a Margarete Zanardo Gomes, Prof.^o Dr. ^o Ricardo Luiz C. De Albuquerque Júnior– Aracaju: UNIT, 2018.

72 f. il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2018
Inclui bibliografia.

1. Lesão medular. 2. Hipocampo 3. Cromatografia líquida. 4. *Punica granatum*. 5. Cognição. 6. Neuroinflamação. I. Prado, Juliana Andrade Passos. II. Albuquerque Junior, Ricardo Luiz C. De. (orient.). III. Gomes, Margarete Zanarde (orient.). IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 616.8-009.11.003.8

EPÍGRAFE

Tudo tem o seu tempo determinado, e há
tempo para todo o propósito debaixo do céu.

(Eclesiastes 3:1)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Hélio e Ednalva, e meu esposo Marcio que compartilharam comigo os sabores e dissabores da jornada que compõe a prática de pesquisa. E ao meu amado e querido filho Heitor, príncipe do sorriso, que com tamanho amor expresso em gestos, palavras e troca de olhares me fortalece.

AGRADECIMENTOS

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore e nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”. (Josué 1:9).

Primeiramente agradeço a DEUS por permitir a concretização deste sonho e me fazer forte para superar os desafios que se apresentaram durante o caminhar.

Ao meu pai Hélio e minha mãe Edinalva, fontes de amor incondicional, e maiores incentivadores deste projeto. Amo vocês.

Ao meu irmão Pedro e minha irmã Carla, meus sobrinhos Julia e Gustavo, ao meu cunhado Alexandre e minha cunhada Rafaela, pessoas responsáveis por momentos maravilhosos e inesquecíveis.

Ao meu esposo Marcio, meu filho Heitor e minha querida e amada Maria Clara, por compreenderem a importância do tempo dedicado à produção deste trabalho. Amo vocês.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a. Margarete Zanardo Gomes, pela acolhida no LMPE, e pelas orientações fundamentais para a produção científica.

Ao Prof^o Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, pelo tempo dedicado à construção deste trabalho, bem como pelas palavras de incentivo.

À prof^a Dr^a Silvana Floresta, pela brilhante contribuição. Obrigada por compartilhar comigo seus conhecimentos. Te admiro.

À Prof^a Dr^a Maria Nogueira, Isabela e Nayara pela parceria.

Aos membros da família LMPE, Rose Nely, Lorena, Eliane, Gabriele, Felipe, que estiveram ao meu lado nesta jornada.

À Sheilla Barroso e Mayana Machado, pelo tempo dedicado à evolução da minha escrita.

À Marcelle Feitosa, pela parceria do Mestrado pra Vida.

À Fanildes Moraes, Ângela Valéria e Iza Fontes por dividirem comigo o conhecimento adquirido na prática científica.

À Bruno Felipe de Santana, Carlos Roberto Xavier e Reinaldo Melo, meu muito obrigada pela amizade e pelo incentivo em momentos cruciais deste caminhar.

Aos alunos de iniciação científica, Joanne, Amanda, Stefani, Ana, Rafael, em especial a Luis Eduardo, Andrea, e Lennon, que contribuíram na produção deste trabalho.

À FAPITEC e a CAPES pelo incentivo financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3. OBJETIVOS	13
3.1 Geral:	13
3.2 Objetivos Específicos:	13
4. REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1 Lesão medular (LM)	14
4.2 Aspectos cognitivos relacionados à LM	18
4.3 Tratamento farmacológico para LM	20
4.4 A <i>Punica granatum</i> (romã)	21
4.5 Compostos Fenólicos	24
4.6 Taninos.....	24
5.1 Coleta da casca de <i>Punica granatum</i> Linn	26
5.2 Obtenção do extrato aquoso das cascas de <i>P. granatum</i> Linn	26
5.5 Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico	27
5.5.1. Equipamento	27
5.6 Ensaio biológico <i>in vivo</i>	32
5.6.1 Aspectos éticos	32
5.6.3 Distribuição da amostra.....	32
5.6.4 Procedimentos cirúrgicos de Laminectomia e Lesão Medular	33
5.7 Testes de comportamento	34
5.7.1 Teste do Campo Aberto	34
5.7.2 Teste do Labirinto em Y	35
5.8 Obtenção das amostras de tecido	35
5.10 Análise estatística	36
6. RESULTADOS	37
6.1 Otimização das condições cromatográficas	37
6.2 Identificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico por CLAE-DAD-ESI/MS.....	40

6.4. Quantificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico	46
6.5 Testes comportamentais	47
6.5.1 Campo aberto	47
6.5.2 Labirinto em Y	47
6.6 Análise Histológica	48
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO – REGISTRO DO PARECER DO CEUA (COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL)	72

RESUMO

A lesão medular (LM) decorrente da interrupção parcial ou total dos sinais neurológicos através da medula resulta em alterações locomotoras e/ou sensitivas. Danos à medula espinhal podem ocasionar comprometimento motor e déficits cognitivos e distúrbios emocionais, fruto de modificações fisiopatológicas consequentes do processo neuroinflamatório e destruição neuronal, repercutindo significativamente sobre a qualidade de vida dos pacientes afetados. Dentro desse contexto, a *Punica granatum* tem se destacado por apresentar uma série de atividades biológicas, como ação antiinflamatória, antioxidante e neuroprotetora. Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o possível efeito neuroprotetor da administração oral do extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* (EACPG) sobre a progressão da LM em roedores. Para tanto os ácidos fenólicos foram quantificados no EACPG através do método de padronização externa, utilizando-se as curvas analíticas construídas para os padrões. Foi avaliada a atividade motora em teste de campo aberto e desempenho cognitivo em teste de labirinto em Y (memória de trabalho). Para tanto os animais foram divididos em 5 grupos: falso-operado (LAM), hemissecção tratados com água destilada (LESÃO), e os lesionados tratados com EACPG nas doses de 100 e 300 mg/kg e com Metilprednisolona (METIL) 30 mg/kg. Os tratamentos foram realizados através de gavagem (via oral) diariamente durante 28 dias. Ao término do tratamento os testes comportamentais foram realizados e, em seguida, os animais foram eutanasiados em câmara de gás carbônico e os cérebros removidos para análise *pós-mortem*. Os espécimes foram devidamente processados e submetidos à análise histológica para avaliação das alterações morfológicas e densidade média de neurônios do hipocampo. Os dados foram avaliados por meio de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, dados não paramétricos por meio de teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Na análise química do EACPG foi possível quantificar e identificar a presença do ácido gálico e do ácido elágico. No teste de labirinto em Y, o grupo lesionado tratado com EACPG 300 mg/kg mostrou aumento significativo da porcentagem média de alterações corretas em relação aos grupos LAM ($p < 0,0001$), LESÃO ($p < 0,05$) e EACPG100 ($p < 0,001$) ao final de 28 dias. Com relação à avaliação motora, observou-se que todos os grupos lesionados mostraram valores significativamente menores que o grupo LAM ($p < 0,0001$). A análise histopatológica dos animais evidenciou um número médio de neurônios/campo histológico no hipocampo significativamente menor no grupo LESÃO ($2,93 \pm 0,23$) do que no grupo LAM ($4,13 \pm 0,27$) ($p < 0,01$) no lado homolateral à lesão. O tratamento com o EACPG com a dose de 300 mg/kg levou as contagens médias de neurônios a valores estatisticamente semelhantes ao grupo LAM ($p > 0,05$), o que também foi visto no grupo tratado com metilprednisolona (METIL) ($p > 0,05$). Concluiu-se que a lesão medular promoveu diminuição da atividade motora e a administração do extrato aquoso da casca da *P. granatum* foi capaz de melhorar o desempenho no teste de memória (labirinto em Y), além de promover ação neuroprotetora sobre a neurodegeneração de neurônios hipocámpais após lesão medular espinhal.

Palavras-Chave: Lesão medular; Hipocampo; Cromatografia Líquida; *Punica granatum*; cognição; neuroinflamação.

ABSTRACT

The spinal cord Injury (SCI) caused partial or total interruption of the neurological connections through the spinal cord results in locomotor and/or sensory alterations. Damage to the spinal cord can lead to motor impairment and cognitive deficits and also to emotional disturbances, resulting from the pathophysiological changes (neuroinflammatory process and neuronal destruction), with a significant repercussion on the quality of life of the affected patients. Within this context, *Punica granatum* has been outstanding for presenting a series of biological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective actions. Thus, the objective of this work was to evaluate the possible neuroprotective effects orally administrated aqueous extract of the bark of the fruit of *Punica granatum* (AEBPG) on the progression of SCI in rodents. The phenolic acids were quantified in the EACPG through the external standardization method, using the analytical curves constructed from the standards. Motor activity in open field test and cognitive performance in Y maze test (working memory) were evaluated. The animals were divided into 5 groups: sham (LAM), lesioned (hemisection) and treated with distilled water (LESION), and lesioned treated with AEBPG at doses of 100 and 300 mg/kg and with Methylprednisolone (METIL) 30 mg/kg. The treatments were performed through gavage (orally) daily for 28 days. At the end of the treatment, the behavioral tests were performed and then the animals were euthanized and the brains were removed for postmortem analysis. The specimens were routinely processed and submitted to histological analysis to evaluate the morphological alterations of the hippocampus and the mean number of neurons. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test, while non-parametric data using Kruskal-Wallis test and Dunn post-test. The substances identified in the aqueous extract of *P. granatum* were gallic acid, ellagic acid and punicalagin α and β . Gallic acid (3.83 ± 0.00 mg/g) and ellagic acid (11.80 ± 0.08 mg/g) were quantified. In the Y maze test, the injured group treated with AEBPG 300 mg/kg showed a significant increase in mean of correct alternations, in relation to LAM ($p < 0.0001$), LESION ($p < 0.05$) and AEBPG100 ($p < 0.001$) at the end of 28 days. Regarding motor assessment, it was observed that all injured groups showed significantly lower values than the LAM group ($p < 0.0001$). Histopathological analysis showed a significant reduction in the mean number of neurons/histological field in the hippocampus significantly in the LESION group (2.93 ± 0.23) compared to the LAM group (4.13 ± 0.27) ($p < 0.01$) homolateral to the lesion. Treatment with AEBPG at 300 mg/kg increased the mean neuron counts at values statistically similar to the LAM group ($p > 0.05$), which was also seen for the methylprednisolone (METIL) group ($p > 0.05$). It was concluded that the SCI promoted a decrease in the motor activity and that the administration of the aqueous extract of the *P. granatum* bark improved the performance in the memory test (Y maze test), besides promoting neuroprotective action on neurodegeneration of hippocampal neurons after spinal cord injury.

Keywords: Spinal cord injury; Hippocampus; Liquid Chromatography; *Punica granatum*; cognition: neuroinflammation.

1. INTRODUÇÃO

A lesão medular (LM) é um quadro que acomete o indivíduo por meio de alterações na medula espinal (BRASIL, 2013), classificada em traumática, ocasionada por fatores externos, e não traumática quando as alterações se desenvolvem por meio de doenças (NSCISC, 2016).

As sequelas relacionadas à LM são tema de estudo, com ênfase em déficits motores e sintomas como disfunção sexual, comprometimento da bexiga e do intestino (LAZARIDIS; ANDREWS, 2014), dor neuropática (FINNERUP *et al.*, 2014) e sintomas de ordem emocional (KHAZAEIPOUR *et al.*, 2015). Estudos recentes mostram que as modificações fisiopatológicas causadas pela LM provocam alterações na cognição, consequência do processo neuroinflamatório na região cerebral, que ocorre ao longo de semanas, com importante perda neuronal e aumento nos níveis de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (WU *et al.*, 2014b; PHILLIPS *et al.*, 2016).

Estudos clínicos mostraram, por meio de avaliações psicológicas, que há comprometimento cognitivo relacionado ao déficit de atenção, concentração e memória associados a fatores sociais (DAVIDOFF *et al.*, 1992, STRUBREITHER *et al.*, 1997, MURRAY *et al.*, 2007, MAXON *et al.*, 2014, LIM *et al.*, 2017). Em estudos pré-clínicos foi observado que, após a LM, as vias aferentes e eferentes são alteradas e ocorre o surgimento de reações neuroinflamatórias tanto no local lesionado como em regiões do cérebro em decorrência da neurodegeneração e do processo inflamatório com perda neuronal no córtex, tálamo e hipocampo que promovem alterações cognitivas e emocionais observadas por meio de testes comportamentais como o labirinto em Y e campo aberto (ZHAO *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2014 a,b).

O tratamento da LM requer desenvolvimento de estratégias com o intuito de impedir o avanço dos danos secundários que se seguem ao trauma inicial (JIA *et al.*, 2012), como a resposta inflamatória e formação de espécies reativas de oxigênio que levam à neurodegeneração e posterior acometimento/neuroinflamação de áreas encefálicas e progressão do quadro neurológico (MCDONOUGH *et al.*, 2015). A metilprednisolona é um dos fármacos mais citados para o tratamento da fase aguda da LM (SANTOS, 2013), porém, por não possuir uma relevante eficácia mediante a complexidade do trauma e apresentar efeitos colaterais como a embolia pulmonar, que se sobrepõem aos benefícios clínicos, seu uso é questionado (VIALLE *et al.*, 2007; RASLAN; NEMECEK, 2012; ARDESTANI *et al.*, 2017). Dessa forma, faz-se necessária a busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da LM.

Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, pomadas, tinturas e cápsulas) desenvolvidas a partir de produtos naturais, considerados uma opção para tratamento de diversas doenças por apresentarem compostos com diferentes atividades biológicas (HENDRICH, 2006).

A *Punica granatum* L. (*P. granatum*) da Família Lythraceae, popularmente conhecida como romã, e seus componentes bioativos possuem importantes efeitos biológicos descritos como a atividade anti-inflamatória (LEE *et al.*, 2010; BENSAAD *et al.*, 2017), antioxidante (CELIK *et al.*, 2013, PRAKASH; PRAKASH, 2011; ZHUANG; DU; WANG, 2011; WANG *et al.*, 2013, FAWOLE; OPARA; THERON, 2011), bactericida (GULLON *et al.*, 2016) e neuroprotetora em modelos experimentais para estudo da doença de Alzheimer (HARTMAN *et al.*, 2006, AHMED *et al.*, 2014 a), acidente vascular encefálico (AHMED *et al.*, 2014 b) e frente ao estresse oxidativo neuronal induzido *in vitro* e *in vivo* (FOROUZANFAR *et al.*, 2013).

As ações terapêuticas da *P. granatum* tem sido atribuídas aos compostos fenólicos como as antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos (elágico, gálico) e taninos (punicalagina), presentes no fruto (LI *et al.*, 2006), consideradas substâncias com ação neuroprotetora (LIU *et al.*, 2017) e que retardam a progressão das deficiências cognitivas e comportamentais (SUBASH *et al.*, 2015) por meio da atividade antioxidante, anti-inflamatória (HOUSTON *et al.*, 2017) e aumento da expressão de neurotrofinas (OLAJIDE *et al.*, 2014), em especial o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que atua na manutenção, sobrevivência, crescimento e diferenciação de neurônios, promovendo proteção frente a atrofia neuronal e, conseqüentemente, reduzindo déficits comportamentais (GOMEZ-PINILLA; NGUYEN, 2012).

Farbood *et al.*, (2015), estudaram os possíveis efeitos do ácido elágico sobre distúrbios motores e biomarcadores neuroinflamatórios induzido por 6-hidroxidopamina em modelo animal de doença de Parkinson e constataram que o ácido elágico pode restaurar as deficiências e diminuir os biomarcadores inflamatórios, TNF- α e interleucina (IL)-1 β , no tratamento e na prevenção de radicais livres.

Desta forma, dada a importância da neuroinflamação na progressão dos efeitos secundários à LM em especial a neurodegeneração e comprometimento de áreas encefálicas, e considerando que o extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* (EACPG) apresenta ações que podem contribuir para a diminuição dos efeitos secundários, este estudo se propõe a avaliar o potencial terapêutico do EACPG para melhora no desempenho cognitivo e redução da neuroinflamação e neurodegeneração encefálica após hemissecção medular em ratos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar os efeitos neuroprotetores do tratamento com extrato aquoso da Casca do fruto de *Punica granatum* (EACPG) sobre a progressão da lesão medular para áreas encefálicas, em roedores.

3.2 Objetivos Específicos:

- Desenvolver e validar um método por CLAE para identificação e quantificação de marcadores químicos no EACPG;
- Avaliar os efeitos dos tratamentos sobre:
 - ✓ Avaliação motora em teste de campo aberto;
 - ✓ O desempenho cognitivo em testes de memória;
 - ✓ A neurodegeneração cerebral.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Lesão medular (LM)

A coluna vertebral é constituída por 24 vértebras além do sacro e do cóccix e protege a medula espinal. Impulsos nervosos sensitivos e motores entre o cérebro e as demais regiões do corpo, são conduzidos através da medula espinhal contida no canal vertebral (DEFINO, 1999).

Segundo os dados apresentados pelo *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (NSCISC, 2016) a incidência anual de LM, nos Estados Unidos da America (EUA) é de aproximadamente 17.000 novos casos por milhão de habitantes a cada ano, e estima-se que a prevalência é de 243.000 a 347.000 pessoas com idade média de 42 anos, sendo 80% dos casos de LM do sexo masculino. Acidentes automobilísticos são as principais causas, seguido de queda, violência (ferimento com arma de fogo) e atividades esportivas.

No Brasil, a rede Sarah de Hospitais de Reabilitação realizou uma pesquisa no primeiro semestre de 2015 e constataram que os acidentes de trânsito se destacam como causa primária, externa, totalizando 48% dos casos, as agressões (arma de fogo, arma branca e agressão física) aparecem como segunda causa, com 24,8%, seguido de quedas (15,2%), acidentes em mergulhos, (4,7%) impactos por objetos pesado (1,7%) e outras causas 4,8% (SARAH, 2016).

Devido aos índices de ocorrência da LM, estudos buscam entender a fisiopatologia desta moléstia e salientam a relevância das pesquisas experimentais em animais por conta da necessidade de compreender o processo da LM para propor um tratamento efetivo (HULSEBOSH, 2002, YILMAZ; TURAN; KELES, 2014). A caracterização da fisiopatologia da LM é determinada por uma sequência de fatores que ocorrem ao redor da lesão como a destruição tecidual, reparação e cicatrização (POPA *et al.*, 2010).

Os processos decorrentes do trauma raquimedular são estudados em duas etapas (**quadro 1**). A primeira etapa é denominada lesão primária, que ocorre no ato da injúria medular, em que há o rompimento dos axônios, danificação das células nervosas e o extravasamento sanguíneo, provocando necrose, edema, hemorragia e vaso espasmo, ocasionando em poucas horas efeitos irreversíveis na substância cinzenta (SC) e na substância branca. (DEL BEL, 2009, MARQUES *et al.*, 2010).

No local da lesão, surgem células inflamatórias acompanhadas de células da glia como os astrócitos, oligodendrócitos e células endimárias, bem como células microgliais. Os macrófagos residentes do sistema nervoso central (SNC) estão relacionados com a resposta primária diante de quadros infecciosos e são

responsáveis por iniciar o processo inflamatório, auxiliando na defesa e promovendo a formação de tecido cicatricial dentro da medula espinhal (COSTA *et al.*, 2013).

A lesão secundária é caracterizada por uma série de alterações celulares que provocam dano no tecido neuronal e culminam em déficit funcional afetando a estrutura da medula espinhal (IMPELLIZZERI *et al.*, 2012). Desta forma, os processos degenerativos e regenerativos axonais são medidos por meio da cascata inflamatória decorrente da LM (JANG *et al.*, 2014). O trauma provoca o aumento da produção de citocinas, secretadas pelo sistema imunológico como as IL-1 β , IL-6 e o TNF- α , as quais são importantes mediadores inflamatórios (BOCHE *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o processo inflamatório é caracterizado pelo aumento das células sanguíneas no local da lesão, tais como macrófagos e neutrófilos, que são células do sistema imune inato, e os linfócitos, células do sistema imune específico, considerada a primeira linha de defesa do organismo (JULIUS, 2001; OYINBO, 2011). Elevam-se as quantidades de neurotransmissores excitatórios, principalmente o glutamato, um aminoácido mediador de sinais excitatórios no SNC dos mamíferos que participa de funções cerebrais normais da cognição, como a memória e aprendizagem, e também da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo ocasionar a morte de neurônios e de oligodendrócitos, (BARBOSA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2006, CHENG *et al.*, 2016). Os oligodendrócitos participam da produção da bainha de mielina para os neurônios e a perda destas células acarreta na desmielinização, bloqueio axonal e morte celular (MATUTE, 2010; ALMAD, 2011).

A morte neuronal na medula e o rompimento da ligação entre os axônios de origem cerebral e suas conexões provocam neurodegeneração retrógrada do motoneurônio superior, culminando em alterações na condução dos impulsos nervosos sensitivos e motores, o que ocasiona danos e déficits cognitivos relacionados à memória, evidenciados em estudos experimentais em animais, por meio de testes comportamentais, com o campo aberto que avalia estado emocional e atividade motora do animal e o labirinto em Y que avalia a memória de trabalho (WU *et al.*, 2014a, FADEN *et al.*, 2016).

Quadro 1. Alterações, fases da lesão e características e consequências da LME.

Alteração	Fase da lesão	Características/Consequências
Alterações vasculares	Primária/Secundária	Hemorragia, vaso espasmo, trombose, rompimento da barreira hematoencefálica, infiltrado de células inflamatórias, edema, necrose, isquemia e diminuição do fluxo sanguíneo (TATOR; FEHLINGS, 1991, KWON, 2004).
Formação de radicais livres e Peroxidação lipídica	Primária	Diminuição do fluxo sanguíneo para a medula espinal, isquemia, edema, resposta inflamatória e perda de função neuronal (SCHWAB <i>et al.</i> , 1996).
Quebra do equilíbrio iônico de K⁺, Na⁺ e Ca²⁺	Primária/Secundária	Morte celular (LI <i>et al.</i> , 1996)
Excitotoxicidade	Primária/Secundária	Morte celular pelo aumento da estimulação de receptores excitatórios (glutamato) (LIU <i>et al.</i> , 1999; MACHADO <i>et al.</i> , 2005)
Apoptose	Secundária	Morte celular programada de neurônios, oligodendrócitos, micróglia e, talvez, astrócitos. Leva a desmielinização e danos aos tratos medulares (LEE <i>et al.</i> , 2004; SILVA, <i>et al.</i> , 2014)
Resposta Inflamatória	Primária/Secundária	Aumento de citocinas e espécies reativas de oxigênio em decorrência elevado número de leucócitos, aumentando a inflamação e lesionando o sistema nervoso (LU <i>et al.</i> , 2000)
Fase Crônica	Secundária	Aumento de gene relacionado ao ciclo celular (ciclina A1, A2, D1, D2, E2F1 e PCNA) e proteínas (ciclina D1, e CDK4) no hipocampo e no córtex cerebral (WU <i>et al.</i> ; 2014a).

4.2 Aspectos cognitivos relacionados à LM

As sequelas relacionadas a lesão medular são temas de inúmeros estudos, com ênfase em déficits motores e sintomas secundários como disfunção sexual, comprometimento na bexiga, intestino, dor neuropática e sintomas de ordem emocional (BRUNOZI, 2011).

As alterações cognitivas decorrentes da LM vem ganhando destaque na última década. Felix *et al.* (2012), em estudo experimental, investigaram alterações na dinâmica celular em áreas neurogênicas do prosencéfalo de ratos adultos após LM por meio de quantificação da incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU) e determinando os fenótipos das células recém-geradas (neurônios, astrócitos ou micróglia) durante as fases subcrônicas e crônicas da lesão. Os autores constataram que a LM induz a remodelação cortical e subcortical no cérebro, e mostraram que a neurogênese do prosencéfalo é vulnerável à LM ocasionando impacto negativo distal e sugeriram novos estudos para descoberta de mecanismos subjacentes com a finalidade de promover estratégias de proteção ao cérebro após LM.

Em adição Craig *et al.* (2015) realizaram um estudo prospectivo para analisar a ocorrência de distúrbios e comorbidades após a lesão medular, no qual avaliaram 88 pacientes com LM, admitidos em uma unidade de saúde, por meio de Mini Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional, entrevista psiquiátrica diagnóstica estruturada, utilizadas para avaliar presença de transtornos psicológicos, incluindo episódios de ansiedade, humor depressivo, resiliência e capacidade cognitiva. Os autores observaram que 17% a 25% apresentaram maiores índices quando comparados com dados populacionais sem LM, e aumento de comorbidades de transtornos psicológicos incluindo distúrbios depressivos, do uso de substâncias psicoativas e ansiedade, e propuseram que melhorias no processo de reabilitação para pessoas com LM são necessárias, de modo a oferecer melhores estratégias de enfrentamento dessa condição.

Com a finalidade de identificar os mecanismos responsáveis por causar comprometimento cognitivo e depressão após LM, WU *et al.* (2014 a,b; 2016) realizaram estudo experimental em camundongos submetidos a LM e avaliaram o desempenho cognitivo por meio de testes neurocomportamentais como o labirinto em Y, reconhecimento de novos objetos, para avaliar o comportamento depressivo utilizaram o teste de preferência de sacarose, suspensão de cauda e de nado forçado, e observaram que as vias aferentes e eferentes são alteradas devido ao surgimento de reações neuroinflamatórias, tanto no local lesionado, como em outras regiões do cérebro após 12 semanas da LM. Avaliaram por meio de ensaio imunohistoquímico que a LM provoca uma redução a longo prazo do número de

neurônios imaturos recém-gerados no giro dentado do hipocampo e constataram que a LM moderada/grave reduziu a sobrevivência neuronal e aumentou o número de células microgliais ativadas cronicamente no cortex cerebral e no hipocampo com elevação do ativador microglial cisteína-cisteína quimiocina (CCL21) e concluem que os resultados encontrados indicam que a LM causam neuroinflamação crônica que contribui para a perda neuronal, deterioração da neurogênese do hipocampo e aumento do estresse do retículo endoplasmático (ER) neuronal, sugerindo declínio cognitivo, como perda de memória e depressão.

Danos no hipocampo, estrutura responsável por consolidar memórias, foram estudados à partir do caso clínico de HM (Henry Molaison) (SCOVILLE; MILNER, 1957) que sofria de epilepsia do Lobo Temporal Medial e foi submetida à retirada bilateral do hipocampo, causando melhora da epilepsia, no entanto provocou perda de memória episódicas passadas (amnésia retrógrada) e dificuldade em produzir novas memórias (amnésia anterógrada) (SQUIRE; WIXTED, 2011).

Desta forma para melhor compreender os mecanismos envolvidos na formação de memórias, Mishkin, (1978) realizou estudo em modelo animal de amnésia humana no primata não humano, e deixou claro a importância do hipocampo e dos córtices adjacentes, peririnal e para-hipocampal, que compõem grande parte do giro hipocampal, que são estruturas responsáveis por consolidar memória. Posteriormente o hipocampo foi estudado em subdivisões, conforme a citoarquitetura, e atribuídas a cada uma delas denominações específicas, sendo elas: CA1, CA2, CA3 e Giro Denteado (GD), sendo que cada setor exercem diferentes funções (KEALY; COMMINS, 2011; MORRISEY; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2014).

Adicionalmente, estudos realizados em cérebro humanos *pos-mortem* com comprometimento da memória após episódio isquêmico, apresentando amnésia anterógrada e pequena amnésia retrógrada e foi possível observar, por meio de exame histológico, lesões bilaterais circunscritas envolvendo o setor CA1 (memória similar à episódica) e constataram o que o lobo temporal e o hipocampo estão envolvidos com a memória de longo prazo (ZOLA-MORGAN; SQUIRE; AMARAL, 1986; REMPEL-CLOWER *et al.*, 1996).

Estudos recentes utilizando camundongos transgênicos com conexões sinápticas de CA2 inativadas por meio de manipulação genética, foi possível observar que as funções referentes à memória espacial e contextual, encontravam-se preservadas, no entanto, os animais apresentaram prejuízo significativo no processamento de memória social cognitiva (HITTI; SIEGELBAUM, 2014; SMITH *et al.*, 2016).

A sub-região CA3 é responsável pela evocação de memórias na presença de estímulos que facilitem a lembrança de eventos que foram previamente vivenciados, mesmo quando não são idênticos a ele (LEUTGEB; LEUTGEB, 2007; LEUTGEB *et al.*, 2007;

ROLLS, 2013). Li e Chao (2008) e de Barbosa *et al.* (2012) sugeriram que as áreas CA3 e o Giro Denteado são fundamentais para aquisição/consolidação do componente espacial da memória episódica, mas não tem influência sobre a memória associativa.

Tomados em conjunto, esses dados demonstram que danos à medula espinhal podem ocasionar alterações morfológicas e funcionais ao hipocampo, diminuindo significativamente a qualidade de vida dos pacientes afetados. E, embora a maioria dos trabalhos foquem no déficit locomotor, por vezes incapacitante, danos cognitivos e emocionais severos, frequentemente estão associados. Assim, as estratégias no manejo da LM devem proporcionar melhorias tanto da função motora quanto minimizar alterações cognitivas, como a memória de trabalho, por exemplo, e depressão.

4.3 Tratamento farmacológico para LM

O tratamento da LM requer desenvolvimento de estratégias com o intuito de frear o avanço em virtude dos danos primários e secundários provocados pelo trauma (NASIRINEZHAD *et al.*, 2015). Na década de 1970, os glucocorticoides esteroides, uma classe de hormônios esteroides, com atividade imunossupressora, antialérgica e anti-inflamatória, por serem absorvidos de forma rápida, com picos de concentração e tempo de meia vida entre 1 e 3 horas após o uso, com um percentual de aproveitamento de 80%, começaram a ser utilizados no tratamento clínico da LM, em destaque a metilprednisolona, (ALBAYRAK *et al.*, 2015).

A metilprednisolona auxilia na diminuição significativa dos agravos neurológicos, sendo o fármaco mais utilizado no tratamento da LM, por possuir propriedades neuroprotetoras (RABCHEVSKY *et al.*, 2002) dirimindo eventos neurodegenerativos durante a primeira e segunda fase da lesão. Suas ações incluem a inibição da isquemia pós-traumática, diminuição da resposta inflamatória e ação antioxidante (MBORI *et al.*, 2016), bem como redução da autofagia e a apoptose na fase secundária após LM (GAO *et al.*, 2016).

Outras opções de fármacos têm sido citadas para o tratamento da LM, como a dexametazona, que tem efeito similar ao da metilprednisolona (ARDESTANI *et al.*, 2017) e o mesilato de tirilazade, um anti-hemorrágico indicado para o tratamento de aneurisma que atua inibindo a peroxidação lipídica com efeito citoprotetor contra espécies reativas de oxigênio (HALL, 2011).

No entanto o uso contínuo desses medicamentos tem sido questionado por promoverem danos (MAZZOCCA *et al.*, 2013; FEHLINGS *et al.*, 2014) como o aumento de complicações infecciosas e metabólicas como a hiperglicemia e infecções no trato

respiratório, relatadas em estudo de pacientes com LM na fase aguda internados em UTI (SUBERVIOLA *et al.*, 2008), o que justifica a necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas.

4.4 A *Punica granatum* (romã)

A *P. granatum* Linn (*Punica granatum* Linn) tem a origem botânica na Pérsia (atual Irã), estendendo o cultivo na Ásia Central, Armênia, Geórgia, região Mediterrânea, no Azerbaijão, no sul da China e no Sudeste Asiático (SHAYGANNIA *et al.*, 2015). Com o passar dos anos, houve uma expansão no cultivo da romã principalmente em países, cujas condições climáticas são áridas e semiáridas (VANOYE-ELIGIO *et al.*, 2017).

No Brasil, a *P. granatum* Linn é popularmente conhecida como romanzeira, um arbusto que mede de 6 a 12 cm de diâmetro e de 2 a 8 m de altura (BARATHIKANNAN *et al.*, 2016). O clima brasileiro favorece o cultivo de plantios da romã, sendo a região Nordeste a que mais produz, e o aumento de sua produção deve-se à indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica (MOREIRA *et al.*, 2015).

A romanzeira possui folhas verde-brilhantes, flores solitárias, cálices esverdeados, duros (figura 1: A), fruto esférico com casca coriácea que atinge aproximadamente o tamanho de uma laranja. A porção interna do fruto é dividida em compartimentos membranosos de cor branco-amarelada denominada de endocarpo, as sementes apresentam, no exterior, aspecto carnudo de cor vermelho vivo, que revestem um caroço pouco rígido e esbranquiçado, sabor doce, levemente acidulado (figura 1: B). O período de floração da romanzeira se dá de abril a junho, com maturação em setembro (JAISWAL, DERMARDEROSIAN e PORTER, 2010).

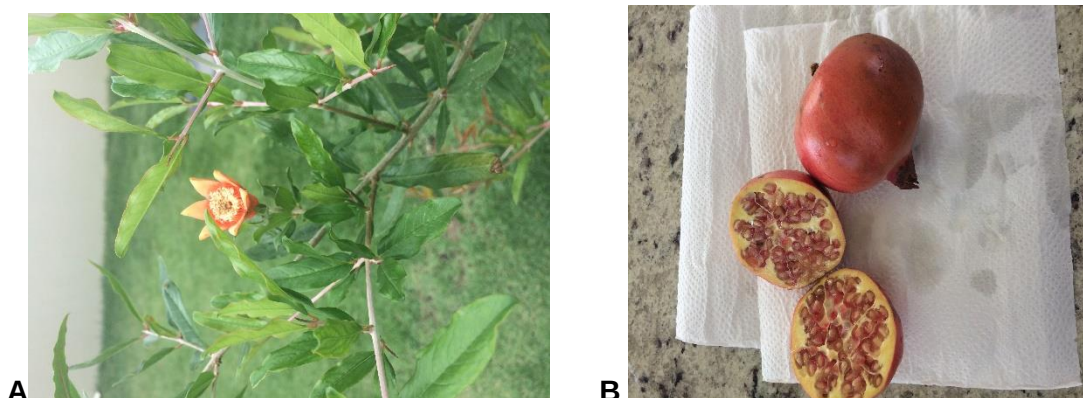


Figura 1: A) Folhas e flor da romanzeira; B) Fruto da romã (acervo pessoal).

Os frutos da romanzeira são ricos em água, apresentam pouca quantidade de gordura e baixo valor calórico, dispõem de minerais, sendo potássio, fósforo, ferro e cálcio, encontrados em maior quantidade, vitamina A, B e do complexo B, como a B6. Além disso, estes frutos possuem compostos fenólicos como as antocianinas, taninos hidrolisáveis (punicalagina, ácido gálico, ácido elágico) (ZOHIN; AQIL; AHMAD, 2010) que têm ação antioxidante evidenciada (ZEKAVAT, 2016). Estes compostos também estão presentes na casca do fruto, sendo considerados os principais constituintes da romã (JARDINI *et al.*, 2010).

A *P. granatum* possui efeitos biológicos descritos na literatura como a atividade anti-inflamatória. Em estudo utilizando peles de suínos, apresentou efeito anti-inflamatório significativo, diminuindo a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), atribuídos aos compostos fenólicos principalmente a punicalagina (HOUSTON *et al.*, 2017).

Estudo mostrou efeito contra o estresse oxidativo e inflamações induzidos por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células do tecido adiposo associados à obesidade, resistência à insulina e diabetes, em modelo *in vitro* (RAMLAGAN *et al.*, 2017). Singh *et al.*, (2002) utilizaram o extrato da casca e sementes da romã, diluído em acetato de etila, metanol e água, com intuito de investigar o potencial antioxidante, por meio de modelos *in vitro*, tais como o I-caroteno-linoleato e 1,1 difenil-2-picril hidrazila (DPPH). Foi observado que o extrato metanólico da casca de romã apresentou 83 e 81% de atividade antioxidante, o extrato metanólico de sementes apresentou 22,6 e 23,2% de atividade antioxidante

A *P. granatum* também tem apresentado efeito neuroprotetor em modelos para estudo da doença de Alzheimer com camundongos transgênicos. Utilizando-se suplemento dietético do extrato de romã a 4% como dieta padrão, observou-se efeito na neuroinflamação e na plasticidade sináptica. O tratamento foi feito durante 15 meses sendo observada uma diminuição na perda de proteínas de estrutura sináptica e inibição da atividade neuroinflamatória. Dois fatores neurotróficos foram analisados, o BDNF e o IGF-1 que se apresentaram significativamente aumentados no final do tratamento, evidenciando efeito neuroprotetor (BRAIDY *et al.*, 2016).

Em outro estudo experimental em ratos transgênicos como modelo da doença de Alzheimer, os ratos com idade de 24-30 meses foram tratados com o extrato de *P. granatum* nas concentrações de 100 e 200 mg/kg, ou com solução veículo diariamente, por um período de três semanas. Para mensurar melhorias nas funções de memória espacial de longo prazo e de trabalho, foi utilizado o labirinto aquático de Morris e o labirinto em Y e, por meio de análise imunohistoquímica, foi mensurado os níveis de proteína precursora Amiloide β -cortical (APP) e β - Amiloide (β A). Foi constatado que o extrato de *P. granatum* não melhorou o desempenho cognitivo dos ratos, porém observaram-se alterações nos

níveis dos peptídeos β 42 e β 40, o que ocasionaria uma diminuição da patogênese da doença de Alzheimer (AHMED *et al.*, 2014a).

Em adição, Ahmed *et al.* (2014b) utilizaram extrato padronizado de ácido elágico, para investigar os efeitos protetores contra a isquemia cerebral (lesão cerebral induzida por interrupção da perfusão sanguínea) em ratos, que receberam doses de 250 e 500 mg/kg durante 15 dias antes da indução isquemia. Os encéfalos passaram por análise bioquímica subsequente e foi constatado que houve uma redução significativa do conteúdo cerebral de malondialdeído (MDA) e de óxido nítrico (ON), além do aumento das atividades de superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione redutase, bem como a diminuição dos níveis de mediadores inflamatórios fator nuclear KBp65 (NF-kB p65), TNF- α , aumento dos níveis cerebrais IL-10 e na produção de adenosina trifosfato (ATP) cerebral. Os níveis de caspase -3 foram diminuídos houve menos danos no DNA (ácido desoxirribonucleico) cerebral.

A casca da romã possui 20% dos compostos fenólicos bioativos (taninos, ácido gálico, ácido elágico, punicalagina), principais responsáveis pela ação antioxidante da planta (AFAQ *et al.*, 2010, GULLON *et al.*, 2016). Adicionalmente, o extrato metanólico da casca da romã tem demonstrado atividade anti-diabético, hipolipidêmica e antioxidante, em estudo experimental com ratos Wistar induzidos a diabetes por estreptozotocinas. (SALWE *et al.*, 2015).

O aumento na procura pela *P. granatum* (YANG *et al.*, 2016) pode estar associado à quantidade de compostos bioativos e às evidências científicas dos benefícios à saúde (AKHTAR *et al.*, 2015).

Em estudo utilizando extratos e o suco da romã (casca, mesocarpo e arilos polposos), com o objetivo de caracterizar por meio de HPLC-DAD-ESI/MS, e elucidar o potencial de promoção à saúde causado por compostos fenólicos presentes no fruto, foram detectados 48 compostos, entre os quais 9 antocianinas, 2 galotaninos, 22 elagitaninos, 2 ésteres de gálico, 4 ácidos hidroxibenzóicos, 7 ácidos hidroxicinâmicos e 1 di-hidroflavonol, com base em seus espectros UV, e compostos que foram identificados pela primeira vez na romã, a cianidina-pentosideo-hexosideo, ácido bilônico de ácido valonoico, ácido brevifolina carboxílico, 4-glucósidos de ácido vanílico e dihidrocanferol-hexosideo, além da punicalagina α e β e pendunculagina. Os elagitaninos se apresentaram predominantes em todas as amostras analisadas entre eles a punicalagina (FISCHER *et al.*, 2011).

4.5 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos de origem natural são produzidos por meio do metabolismo de vegetais, servem de proteção contra condições adversas, são responsáveis por características como a cor, a adstringência o aroma e auxiliam na a estabilidade oxidativa da planta. Apresentam em suas estruturas pelo menos um anel aromático unido a uma ou mais hidroxilas e classificados em fenóis simples, como os ácidos fenólicos e polifenóis que apresentam moléculas altamente polimerizadas tais como os taninos (JARDINI *et al.*; 2007).

Os taninos são substâncias químicas pertencentes ao grupo de fenóis vegetais de alto peso molecular (500-300 Dalton). São divididos em dois tipos: os taninos hidrolisáveis, formados por ésteres de ácido gálico e ácido elágico glicosilados, e os taninos condensados, formados por estrutura flavonóica, que por meio de condensação formam proantocianidinas, que produzem pigmentos avermelhados, após degradação com ácido (ROMEO *et al.*, 2015).

A quantidade de taninos presentes nas plantas depende das condições climáticas e geográficas, podendo apresentar variadas composições químicas (YSSAAD; HAMMADI, 2017). Na forma oxidada, reagem com proteínas por meio de ligações de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas. Quando não oxidados, os taninos se transformam em quinonas através de ligações covalentes com grupos específicos de proteínas (TYAGI *et al.*, 2012).

4.6 Taninos

Os ácidos fenólicos como o ácido gálico e o ácido elágico são encontrados em produtos naturais como os chás verdes principalmente nas frutas, como as uvas, castanha e romã (suco, folhas e sementes) (SIASOS *et al.*, 2013), obtidos por meio de hidrólise ácida de taninos. Desta forma, estudos demonstram que tanto o ácido gálico quanto o ácido elágico apresentam forte ação antioxidante (FAWOLE *et al.*, 2016), anti-inflamatória (OUACHRIF *et al.*, 2012) e antitumoral, confirmando atividade citotóxica seletiva (PANTH *et al.*, 2017). Também foi observada ação neuroprotetora, demonstrada em estudo *in vitro* utilizando o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), toxina ambiental que induz danos oxidativos em neurônios dopaminérgicos de forma similar à doença de Parkinson e foi sugerido que o mecanismo de proteção se deve a atividade antioxidante e a presença de ácidos fenólicos, como o ácido gálico e ácido elágico e punicalagina α e β presentes no suco da romã (BRAIDY *et al.*, 2013).

Os taninos, em especial a punicalagina, constituem uma classe de compostos bioativos da *P. granatum*, com maior concentração na casca, é pertencente à classe dos

elagitaninos, solúvel em água, e apresenta em forma de macromolécula. (FISCHER *et al.*, 2011). Em virtude das funções biológicas atribuídas aos compostos fenólicos (flavonoides e não flavonoides) no organismo animal, Essa *et al.* (2015) realizaram estudo utilizando suplementos dietéticos feitos à base de frutos da romã, figos e tâmaras, visando a prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo em modelo experimental *in vivo* e constataram que as ações dos flavonóides apresentaram potencial terapêutico contra doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, exercendo efeitos benéficos sobre o cérebro, reduzindo de forma significativa os níveis de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 β (IL-1 β), IL- 2, IL-3, IL 4, IL-9 e TNF- α , durante o envelhecimento dos animais, por meio da atividade antioxidante dos constituintes fenólicos.

Estudo *in vitro* constatou o efeito neuroprotetor em células pré-tratadas com punicalagina e expostas a danos induzidos por H₂O₂, e concluiu que houve modulação da cascata apoptótica, dando indícios da ação preventiva em doenças neurodegenerativas (CLEMENTI *et al.*, 2017; SHEN *et al.*, 2017).

Em pesquisa experimental *in vitro* e *in vivo*, foi analisado o efeito do ácido gálico em modelo de isquêmica cerebral, constatando a inibição da disfunção mitocondrial, ocasionando proteção das mitocôndrias por meio da inibição da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e a apoptose, promovendo neuroproteção. (SUN *et al.*, 2017).

O efeito antiinflamatório de compostos isolados do fruto de *P. granatum*, como o ácido gálico, ácido elágico e punicalagina α e β , foi sugerido em estudo ao observarem efeitos inibitórios sobre lipopolissacarídeos, óxido nítrico, prostaglandina E2, interleucina-6 e na liberação de cicloxigenase-2 a partir de macrófagos RAW267 (BENSAAD *et al.*, 2017).

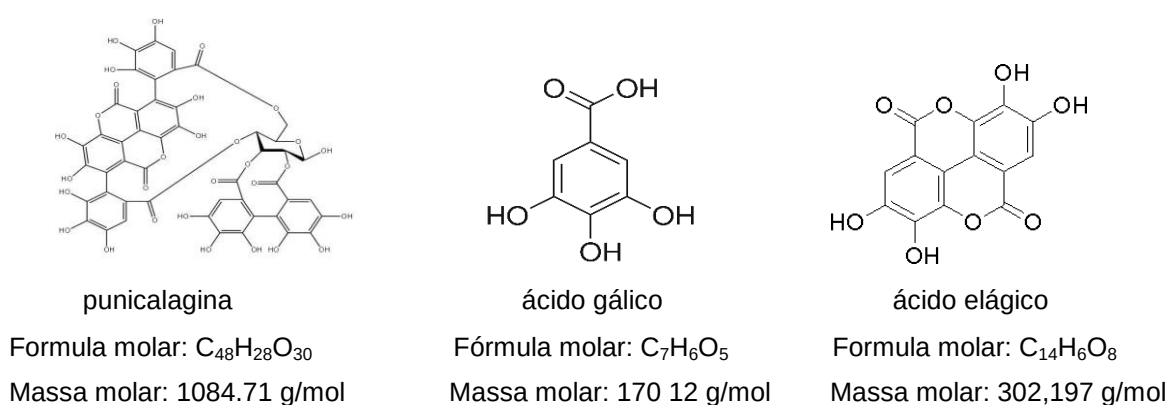


Figura 2. Estruturas químicas da punicalagina, ácido gálico e ácido elágico

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta da casca de *Punica granatum* Linn

Os frutos da *P. granatum* foram coletados no mês de setembro de 2016, no município de Petrolina, na mesorregião do São Francisco, no semiárido de Pernambuco, extremo oeste do estado, cujo plantio faz parte do Projeto Irrigado Senador Nilo Coelho: N9, com localização geográfica: 9° 23'34``S 40° 30'28``O. A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo herbário da Universidade Tiradentes (UNIT), local destinado à realização do voucher e depósito da exsicata nº 20881.



Figura 3. Registro Científico (Exsicata nº 20.881), da amostra de *Punica granatum*
Fonte: Nascimento (2013)

5.2 Obtenção do extrato aquoso das cascas de *P. granatum*

Os frutos da *P. granatum* foram lavados em água corrente para retirada das impurezas existentes na casca da romã e em seguida submetidos à secagem completa em ambiente arejado e ventilado. Após secagem, a casca da romã foi separada dos arilos polposos e as amostras foram acondicionadas em bolsas plásticas transparentes e mantidas sob refrigeração a -20°C (BASTOS, 2014) (**figura 4.A**). As cascas da romã anteriormente congeladas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar, com temperatura de $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por um período de 48 a 72 h, até a secagem completa (**figura 4.B**). Posteriormente, as cascas foram quebradas em pedaços menores por ação mecânica (**figura 4.C**) e submetidas ao moinho de facas (**figura 4.D**). O pó resultante foi submetido à granulometria de 32 mesh (**figura 4.E**) e conservado em frasco de vidro âmbar até o preparo do extrato aquoso (BASTOS, 2014).

O material vegetal foi submetido à extração aquosa sob agitação mecânica, na proporção de 1 g/100 mL (m/v), durante 2 h, em temperatura ambiente (25°C) (**figura 4.F**). Ao final deste processo, procedeu-se à filtração (**figura 4.G**) e o sobrenadante colocado em placas de petri previamente pesadas (**figura 4.H**) e após eliminação do solvente em estufa

de circulação de ar com temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$ durante sete dias. Após a evaporação completa do solvente as placas foram novamente pesadas (**figura 4.I**) e o material resultante (extrato seco) foi raspado (**figura 4.J**), calculado o rendimento (**equação 1**) e posteriormente armazenado sob refrigeração a $\pm 8^\circ\text{C}$, em frasco âmbar devidamente identificado (**figura 4.K**) (BASTOS, 2014).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato sólido}}{\text{Massa do pó da casca do fruto}} \times 100 \text{ (equação 1)}$$



Figura 4. (A) Cascas congeladas; (B) cascas em estufa de circulação de ar à $50 \pm 5^\circ\text{C}$; (C) cascas desidratadas; (D) Cascas em moinho de facas; (E) Pó da casca em peneiras de granulometria; (F) Pó da casca suspenso em água destilada; (G) Suspensão filtrada em papel filtro; (H) peso da placa vazia; (I) peso da placa com o extrato seco; (J) Extrato sólido; (K) Extrato líquido.

5.5 Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico

5.5.1. Equipamento

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu (Kyoto, Japão) acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e a um espectrômetro de massas com fonte de ionização *eletrospray* (ESI) no modo positivo e analisador tipo tempo de voo

MicrOTOF II (Bruker Daltonics, Alemanha). O equipamento é composto por uma bomba binária LC-20ADx, auto-injetor SIL-20AHT, loop de injeção de 100 µL, degaseificador DGU-20A3R, forno CTO-20A e interligados por uma interface CBM 20A. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa m/z 50-1100. O nitrogênio foi usado como gás de secagem com taxa de fluxo de 9,0 L/min, e gás nebulizador à pressão de 2 Bar. A temperatura do nebulizador foi de 247 °C. O hélio foi utilizado como gás de colisão na pressão de 4×10^{-6} . Os cromatogramas e espectros de massas foram registrados pelo *software* DataAnalysis.

5.5.2. Condições analíticas para o perfil cromatográfico do EACPG e do método quantitativo

As amostras foram analisadas utilizando-se uma coluna analítica C₁₈ Shimpack XR-ODS (100 x 2,0 mm d.i., 5 µm). Utilizou-se uma vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção de 10 µL, temperatura do forno fixada em 30 °C e fase móvel constituída de solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) e acetonitrila (ACN) com solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (B). As análises foram feitas utilizando-se o gradiente otimizado no modo reverso de 2-28% de B por 40 min ($\Delta\%B/min = 0,65$), permanecendo isocrático em 28% (B) por 5 min. O retorno do gradiente foi feito em 5 min (28-2% de B). A coluna foi condicionada em 2% de B por 10 min entre cada análise.

Os cromatogramas foram registrados com detector de arranjo de diodos em varredura de 190-800 nm e todos os perfis cromatográficos por CLAE foram obtidos na absorção de 280 nm. Os picos referentes ao ácido gálico e ácido elágico foram determinadas pelo tempo de retenção obtido com a análise da solução do padrão e a pureza do pico foi assegurada pela análise de amostras de extratos.

5.5.3. Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas de separação foram otimizadas avaliando-se os seguintes fatores: parâmetros de eluição gradiente, composição da fase móvel, vazão e volume de injeção (Quadro 2).

Quadro 2: Fatores avaliados na otimização das condições cromatográficas.

Parâmetros de eluição gradiente	- $\Delta\%$ B/min - tempo de gradiente (min)
Composição da fase móvel	- ACN:água - solução de ácido fórmico 0,1%:ACN com ácido fórmico 0,1%.
Vazão	- 1 mL/min - 0,5 mL/min
Volume de injeção	- 10 μ L - 20 μ L

5.4. Identificação e quantificação dos marcadores químicos no EACPG

O ácido gálico e o ácido elágico foram identificados no EACPG com base em seus tempos de retenção (t_R), coinjeção das amostras com padrões, comparação dos seus espectros de UV ($\lambda = 280$ nm), obtidos pelo detector de arranjo de diodos, e dos seus espectros de massas, com dados publicados na literatura. Para a quantificação, utilizou-se a curva analítica por padrão externo (item 5.5.1.2.) dos ácidos fenólicos, após validação do método cromatográfico.

5.5. Validação do método

A validação do método quantitativo seguiu as normas estabelecidas pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), mediante a Resolução RE nº 166, 24 de julho em 2017 (BRASIL, 2017). Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, seletividade, efeito da matriz, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão.

5.5.1. Linearidade

5.5.1.1. Preparo das soluções

As soluções estoque do ácido gálico (Sigma, $\geq 95\%$) e do ácido elágico (Sigma, $\geq 95\%$) foram preparadas em uma concentração de 0,5 mg/mL, em balão volumétrico de 50 mL. O ácido gálico foi dissolvido em metanol grau CLAE e o ácido elágico foi submetido por 1 h em ultrassom em água ultrapura.

O EACPG foi preparado em metanol grau CLAE, em uma concentração de 0,5 mg/mL, em balão volumétrico de 5 mL, em triplicata.

As amostras foram filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm antes das análises no CLAE.

5.5.1.2. Curva de calibração por padrão externo

As soluções-padrão do ácido gálico e do ácido elágico foram preparadas em triplicata, a partir das soluções estoque, nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 6 µg/mL para o ácido gálico e 1, 4, 8, 12 e 16 µg/mL para o ácido elágico. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, a partir da relação entre as áreas dos picos e as concentrações das amostras. Como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, foi considerado um coeficiente de correlação maior que 0,9900.

5.5.2. Seletividade e efeito da matriz

A seletividade e o efeito da matriz foram avaliadas através do método de adição de padrão. O EACPG (0,0025 g) foi fortificado com as soluções-padrão do ácido gálico, nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 6 µg/mL, e com as soluções-padrão do ácido elágico, nas concentrações de 1, 4, 8, 12 e 16 µg/mL, preparados em triplicata, de forma a reproduzir os pontos da curva de calibração por padrão externo. Após 24 h, cada amostra da curva de calibração do ácido gálico foi solubilizada em metanol e as amostras do ácido elágico em água ultrapura, em balão volumétrico de 5 mL. As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear, a partir da relação entre as áreas dos picos e as concentrações das amostras.

5.5.3. Exatidão

A exatidão foi determinada por meio de ensaios de recuperação utilizando o EACPG. O extrato foi fortificado por 24 h com as soluções-padrão do ácido gálico, nas concentrações de 0,5, 2 e 6 µg/mL, e com as soluções-padrão do ácido elágico, nas concentrações de 1, 8 e 16 µg/mL, correspondentes a três níveis diferentes de concentração (baixa, média e alta), respectivamente, em triplicata. A recuperação foi determinada considerando os resultados obtidos para cada analito estudado, utilizando a seguinte equação matemática:

$$\% \text{ Recuperação} = [(\text{concentração medida}) / (\text{concentração esperada})] \times 100$$

5.5.4. Precisão

5.5.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada através da análise, em triplicata, das soluções-padrão do ácido gálico nas concentrações de 0,5, 2 e 6 µg/mL e das soluções-padrão do ácido elágico nas concentrações de 1, 8 e 16 µg/mL. Todas as soluções-padrão foram submetidas a três diferentes preparações, no mesmo dia e pelo mesmo analista, sendo, então, estimado o coeficiente de variação (CV) correspondente a cada nível de concentração.

5.5.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada realizando-se análises em triplicata, em dois dias não consecutivos, por analistas diferentes, das soluções-padrão do ácido gálico nas concentrações de 0,5, 2 e 6 µg/mL e das soluções-padrão do ácido elágico nas concentrações de 1, 8 e 16 µg/mL, correspondentes a três níveis diferentes de concentração (baixa, média e alta), respectivamente. O coeficiente de variação (CV) foi estimado ao final das sucessivas repetições.

5.5.5. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) foi determinado através dos parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte equação:

$LD = 3,3 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica.

5.5.6. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) foi determinado através dos parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte equação:

$LD = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica.

5.6 Ensaio biológico *in vivo*

5.6.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa obedeceu às normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes (CEUA-UNIT), processo nº 010816.

5.6.2 Animais

A amostra foi composta por 48 ratos *Wistar* fêmeas com peso corporal ~200-300 g, e idade entre 2 e 3 meses, originados do Biotério de Universidade Tiradentes. Os animais foram alojados em gaiolas com cama de maravalha trocadas diariamente, à temperatura controlada de (± 22 °C), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 h, recebendo água *ad libitum* e dieta padrão (Nuvital CR1; Nuvilab®, Colombo/PR-Brasil).

5.6.3 Distribuição da amostra

Para o modelo experimental de LM, os ratos foram distribuídos de forma randomizada em 2 grupos: grupo Laminectomia (cirurgia sem lesão, com remoção da apófise espinhosa e lâmina da décima vértebra torácica (T10), expondo a medula espinal) e o grupo Lesão (cirurgia com hemissecção do lado direito da medula espinal, após laminectomia), classificados de acordo com a etapa de execução descrita abaixo.

Os ratos foram divididos em grupos de acordo com os testes e procedimentos cirúrgicos. Cada grupo foi composto por 08 ratos (com tempo de eutanásia em 28 dias): Grupo tratado com água destilada por via oral (1 mL) e submetido à laminectomia (grupo LAM), grupo submetido à hemissecção medular em nível torácico (T10) e tratado com água destilada (grupo LESÃO VEÍCULO), grupo submetido à hemissecção em nível torácico tratado com EACPG a 100 mg/kg (grupo LESÃO/EACPG100) (AHMED *et al.*, 2014a; ADIGA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010), grupo submetido à hemissecção em nível torácico tratado com EACPG a 300 mg/kg (grupo LESÃO/EACPG300) (RATHOD *et al.*, 2012), grupo submetido à hemissecção em nível torácico tratado com metilprednisolona (fármaco padrão, grupo lesão/ metilprednisolona 30 mg/kg) (LI *et al.*, 2016). Todos os animais foram submetidos a testes comportamentais - campo aberto e labirinto em Y na quarta semana, sendo realizados em dias distintos (WU *et al.*, 2014) (**Quadro 3**).

Quadro 3 - Grupos experimentais para o desenvolvimento do trabalho.

Grupos (n=8)	Procedimento experimental	Tratamento Oral (Gavagem)	Eutanásia (Dias)
GRUPO LAM	Laminectomia	Água destilada (1 mL/dia)	28
GRUPO LESÃO VEÍCULO	Hemiseccção	Água destilada (1 mL/dia)	28
GRUPO LESÃO/EACPG 100 mg/kg	Hemiseccção EACPG	EACPG 100 mg/kg	28
GRUPO LESÃO/EACPG 300 mg/kg)	Hemiseccção EACPG	EACPG 300 mg/kg	28
GRUPO METIL	Hemiseccção metilprednisolona	Metilprednisolona 30 mg/kg 2 doses 24/24 h	28

5.6.4 Procedimentos cirúrgicos de Laminectomia e Lesão Medular

Os animais foram pesados e anestesiados com Cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (75 mg/kg), na proporção de 14 mg/kg, para cada 100 g de massa corporal, administradas por via intraperitoneal (i.p.). Na sequência, foi realizada a tricotomia e assepsia da região dorsal torácica e uma incisão na região correspondente à coluna torácica. Adicionalmente, os ratos foram submetidos aos seguintes procedimentos:

Laminectomia: A musculatura foi separada do tecido sem seccionar, expondo as vértebras T8 – T11, que foram identificadas pela palpação das apófises espinhosas. Após a identificação das vértebras, a apófise espinhosa e a lâmina da vértebra T10 foram cuidadosamente retiradas, fazendo uso de uma lupa cirúrgica, com aumento de 10X (GRUNER, 1992).

Lesão medular: Foram realizados os mesmos procedimentos descritos para a laminectomia, no entanto, os ratos do grupo lesão tiveram a hemi-medula do lado direito seccionada com auxílio de microtesoura e bisturi. Ao final do procedimento, a musculatura dos ratos foi suturada com 2 pontos (laçada dupla). Na sequência o tecido adiposo foi colocado sobre a musculatura recobrando-a e posteriormente, foi realizada a sutura da pele. Para finalizar, o local passou por antissepsia com álcool 70% e iodopovidina. Logo após a finalização do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose de 0,5 mL de

pentabiótico. Em uma sala climatizada os ratos foram alocados para a recuperação pós cirurgia, na qual foram diariamente observadas as necessidades fisiológicas de excreção de fezes e urina, de alimentação e hidratação. Com a finalidade de retomar as condições normais de micção e defecação, foram realizadas massagens abdominais 3 vezes ao dia e sinais de autotomia e infecções foram monitorados frequentemente (KUSHCHAYEV, 2016).

5.7 Testes de comportamento

5.7.1 Teste do Campo Aberto

O equipamento tem forma de um quadrilátero, feito de madeira, com 4830,25 cm² de área e paredes com 34,5 cm de altura, sendo a base subdividida em dezesseis quadrantes. Na 4^o semana, cada animal foi avaliado individualmente durante cinco minutos (figura 5). No teste foram analisados os seguintes parâmetros: (1) a frequência dos comportamentos de exploração horizontal (número de quadrantes percorridos pelo animal com as quatro patas - *crossings*), (2) exploração vertical (manutenção do animal apenas sobre as patas anteriores - *rearing*), (3) o número de bolos fecais expelidos e (4) comportamentos de autolimpeza - *grooming*) executados. Entre o teste de um animal e outro, o equipamento foi limpo com álcool 20% para evitar a influência do cheiro de outros animais sobre o resultado da avaliação (WALSH; CUMINS, 1975, KANDRATAVICIUS *et al.*, 2015).



Figura 5. Equipamento para realização do teste de Campo Aberto. Fonte: Juliana Andrade Passos Prado (2017).

5.7.2 Teste do Labirinto em Y

O equipamento constitui um labirinto em forma de Y com os três braços iguais, de madeira, medindo 35 cm de altura, 12 cm de largura e 40 cm de comprimento. Os braços do labirinto em Y foram numerados e durante 8 min foi mensurado o número de vezes que o animal entrou no braço, só foi aplicado um valor quando o animal entrou em cada braço sem repetir entre as sessões (figura 6). O labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel (YAMADA *et al.*, 1996, DALL'IGNA *et al.*, 2007). A porcentagem das alterações foi calculada por meio da fórmula matemática descrita (alterações espontâneas % = $\frac{\text{nº de acertos}}{\text{total} - 2} \times 100$) (**equação 2**):

$$\text{Alterações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Total de alterações corretas}}{\text{Total de entradas} - 2} \times 100$$

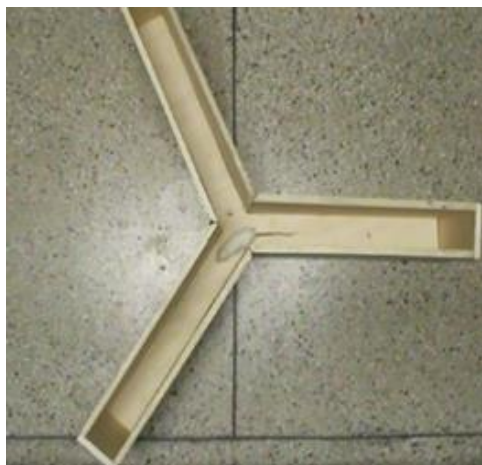


Figura 6. Equipamento para a realização do teste de labirinto em y. Fonte: Juliana Andrade Passos Prado (2017).

5.8 Obtenção das amostras de tecido

Os animais foram eutanasiados em 28 dias, em câmara de dióxido de carbono (modelo CGSCO@G – Beiramar), e expostos durante 10 min a um fluxo de ar contendo 100% de gás carbônico (CO₂) (LEARY *et al.*, 2013). As amostras teciduais dos encéfalos foram coletadas e armazenadas em formol tamponado a 10 % e conservadas durante sete dias nesta solução. Após sete dias, as amostras foram então desidratadas em série alcoólica crescente, diafinizadas em séries de xilóis e incluídas em parafina sob a forma de blocos.

5.9 Análise Histológica

As modificações histológicas decorrentes da lesão e da sua associação com os tratamentos foram analisadas por meio da coloração de hematoxilina-eosina seguindo a rotina das técnicas laboratoriais, após a obtenção de cortes de 5 µm de espessura com um micrótomo. As secções foram colhidas de forma serial, sendo que cada lâmina continha 4 cortes da amostra de cérebro. A técnica da coloração consistiu em manter as secções de tecido em contato com três séries de xilol (I, II e III; 2 min cada), cinco séries de concentração decrescente de alcoóis (100%, 95%, 80%; 2 min cada) e duas lavagens em água (2 min cada). Em seguida as amostras são imersas em hematoxilina (3 min) foram lavadas em duas séries de água (2 min cada) imersas em eosina (30 s) e passam por séries crescentes de alcoóis (80%, 95% e 100%; 2 min cada), finalizando em três séries de xilol (I, II, III; 2 min cada). A seguir foram montadas as lâminas com lamínulas.

Para que a análise histológica fosse analisada às cegas, os códigos de identificação de cada lâmina foram cobertos por outro pesquisador antes do início da análise e revelados após o termino. Foi realizada a análise das imagens utilizando microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera fotográfica Olympus. Para a realização da análise quantitativa das imagens, foram capturadas áreas de interesse CA1, CA2 e CA3, regiões do hipocampo. As regiões foram identificadas utilizando os limites do atlas Paxinos; Watson (1986) e foi realizada a quantificação de neurônios com morfologia compatível com normalidade em uma área de 1000 µm² (figuras 16 e 17). Em cada área de interesse, foi quantificado bilateralmente o número de neurônios. As secções histológicas foram analisadas em HE com magnificação de 100 X.

5.10 Análise estatística

A fim de verificar a distribuição Gaussiana dos dados, foi realizado teste de Shapiro-Wilk. Se paramétricos, os dados foram avaliados por meio de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. Constatando-se que eram não paramétricos, procedeu-se à comparação de médias entre os grupos por meio de teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas significantes. Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 para análise dos dados.

6. RESULTADOS

6.1 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas por CLAE-DAD foram otimizadas para se obter um perfil cromatográfico representativo dos múltiplos compostos presentes na amostra vegetal. A otimização consiste numa complexa avaliação de diferentes fatores que interferem simultaneamente na eficiência da separação, e podem interagir entre si.

Neste trabalho, foi avaliada a influência dos seguintes fatores sobre as condições cromatográficas de separação: parâmetros de eluição gradiente, composição da fase móvel, vazão e volume de injeção. As otimizações estão apresentadas na Tabela 1.

O primeiro passo para a otimização cromatográfica no modo reverso foi a utilização de um gradiente exploratório, em condições de ampla faixa de força de fase móvel, para visualizar a complexidade da amostra e identificar a fase móvel mais eficiente para separação dos componentes (SNYDER; DOLAN, 1996).

Para isso, foi utilizado como solventes uma mistura de ACN (B) e água (A), com intervalo de 5-100% (B) por 60 min, em uma coluna C₁₈ ShimPack XR-ODS (100 x 2,0 mm, 5 µm), com vazão de 1 mL/min, acompanhado pelo detector de arranjo de diodos com seleção da faixa de comprimento de onda entre 190-800 nm na região do UV para se fazer a determinação das absorvâncias das substâncias presentes na amostra (Figura 7). A ACN na fase móvel geralmente é menos viscosa e permite a utilização de valores baixos de comprimento de onda no UV para a detecção das substâncias.

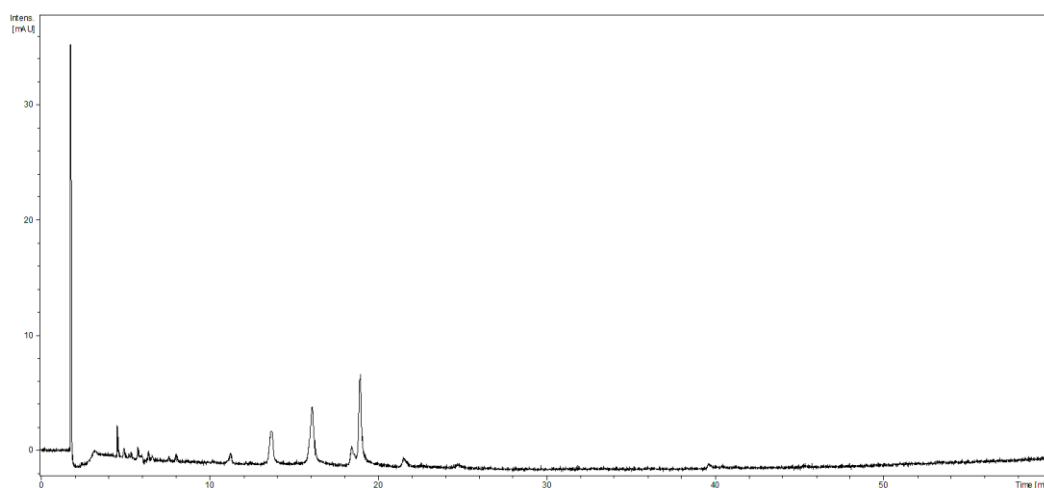


Figura 7. Cromatograma da condição cromatográfica 1: gradiente linear de 5-100% de ACN (B) em 60 min, vazão 1mL/min, $\lambda=280$ nm, $V_{inj.} = 10\mu\text{L}$.

Tabela 1. Condições cromatográficas avaliadas para análise do EACPG.

Fase estacionária	Análise	Condições cromatográficas
C₁₈ Shim-Pack XR-ODS (100 x 2,0 mm, 5 µm)	1	5-100% ACN: água por 60 min ($\Delta\%B/min = 1,58$); vol. Inj. 10 µL; vazão = 1,0 mL/min; T= 30 °C.
	2	2-32% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 20 min ($\Delta\%B/min = 1,5$); 32-80% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 30 min ($\Delta\%B/min = 1,6$); vol. inj. 20 µL; vazão = 1,0 mL/min; T= 30 °C.
	3	2-23% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 15 min ($\Delta\%B/min = 1,4$); 23-32% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 6 min ($\Delta\%B/min = 1,5$); 32-80% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 25 min ($\Delta\%B/min = 1,9$); vol. inj. 20 µL; vazão = 1,0 mL/min; T= 30 °C.
	4	2-32% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 30 min ($\Delta\%B/min = 1$); 32-80% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% ($\Delta\%B/min = 1,6$) por 30 min; vol. inj. 20 µL; vazão = 1,0 mL/min; T= 30 °C.
	5	2-28% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 35 min; ($\Delta\%B/min = 0,74$); vol. inj. 20 µL; vazão = 1,0 mL/min; T= 30 °C.
	6	5-26% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 35 min; ($\Delta\%B/min = 0,6$); vol. inj. 20 µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30 °C.
	7	8-30% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 30 min; ($\Delta\%B/min = 0,73$); vol. inj. 20 µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30 °C.
	8	2-28% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 40 min; ($\Delta\%B/min = 0,65$); vol. inj. 10 µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30 °C.
	9	2-28% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 40 min; ($\Delta\%B/min = 0,65$); 28% por 5 min; vol. inj. 10 µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30 °C.
	10	8-28% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 40 min; ($\Delta\%B/min = 0,5$); vol. inj. 10 µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30 °C.

A análise cromatográfica da condição 1 permitiu verificar que as substâncias presentes na amostra apresentaram baixa interação com a fase estacionária, além disso não foi possível obter uma adequada separação dos picos.

A partir dessa primeira análise foi possível determinar as próximas condições experimentais de separação, utilizando a relação entre o intervalo de variação da concentração do modificador orgânico ($\Delta\%B$) e o tempo de análise (tg) obtendo-se o valor da inclinação do gradiente ($\Delta\%B/min$). Esta medida é usada para descrever mudanças na

separação decorrentes do aumento ou diminuição na inclinação do gradiente (CASS; DEGANI, 2001).

Como no EACPG é comum a presença de compostos fenólicos diversos, a fase estacionária quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (C_{18}) e a solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) na composição da fase móvel foram escolhidas nas análises cromatográficas. Na fase estacionária C_{18} devido a sua baixa polaridade ocorrem interações hidrofóbicas entre a parte não polar das substâncias a serem separadas e as cadeias hidrocarbônicas da fase estacionária. A solução ácida na composição da fase móvel teve como intuito melhorar a retenção e resolução das substâncias presentes no extrato através da supressão da ionização, pois as tornam mais hidrofóbicas, aumentando a sua retenção.

Dentre as condições analíticas avaliadas, o cromatograma que mostrou melhor faixa de retenção e melhor separação foi obtido com a condição cromatográfica 9 da tabela 1: coluna analítica de fase estacionária C_{18} Shimpack XR-ODS (100 x 2,0 mm d.i., 5 μ m), utilizando vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e eluição gradiente no modo reverso, com fase móvel constituída por solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) e acetonitrila com solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (B), com seguinte inclinação: 2-28% de B em 40 min ($\Delta\%B/min = 0,65$), permanecendo isocrático em 28% (B) por 5 min; o retorno do gradiente de 28-2% (B) por 5 min, apresentado na Figura 8. Esta condição foi definida como a condição analítica para a validação do método e posterior quantificação das substâncias de interesse.

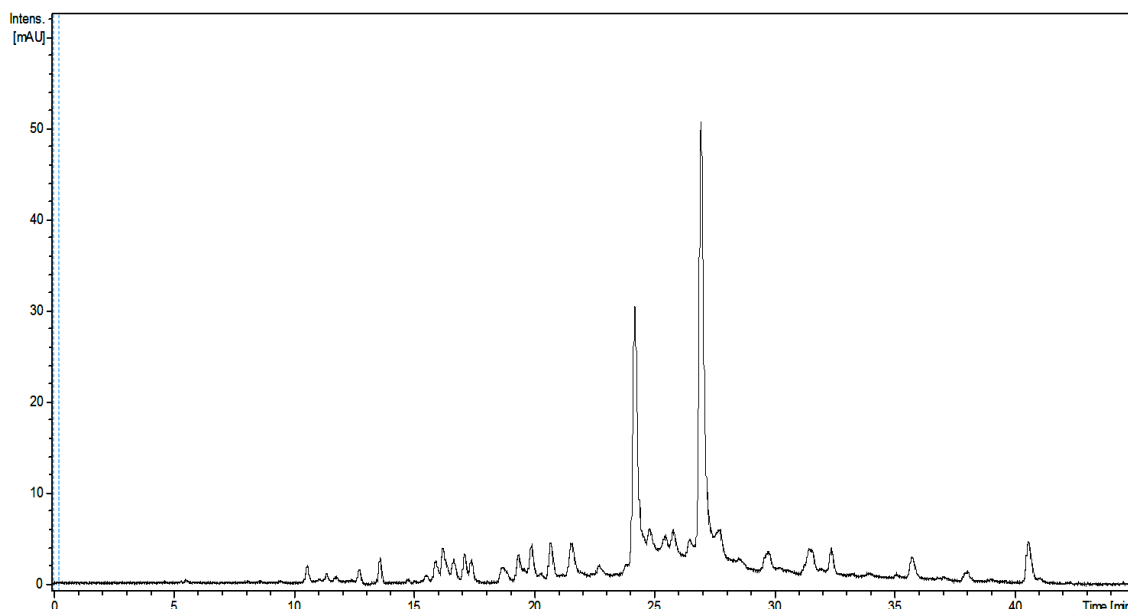


Figura 8. Cromatograma ($\lambda = 280$ nm) de eluição gradiente do EACPG, referente à condição 9 da Tabela 1.

6.2 Identificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico por CLAE-DAD-ESI/MS

No extrato de *P. granatum* foram identificados os marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico por CLAE-DAD-ESI/MS. A Figura 9 apresenta o perfil cromatográfico do extrato de *P. granatum*, onde estão assinalados os picos referentes a cada substância. Os picos com tempo de retenção (t_r) de 15,9 e 40,5 min, correspondem ao ácido gálico e ácido elágico, respectivamente.

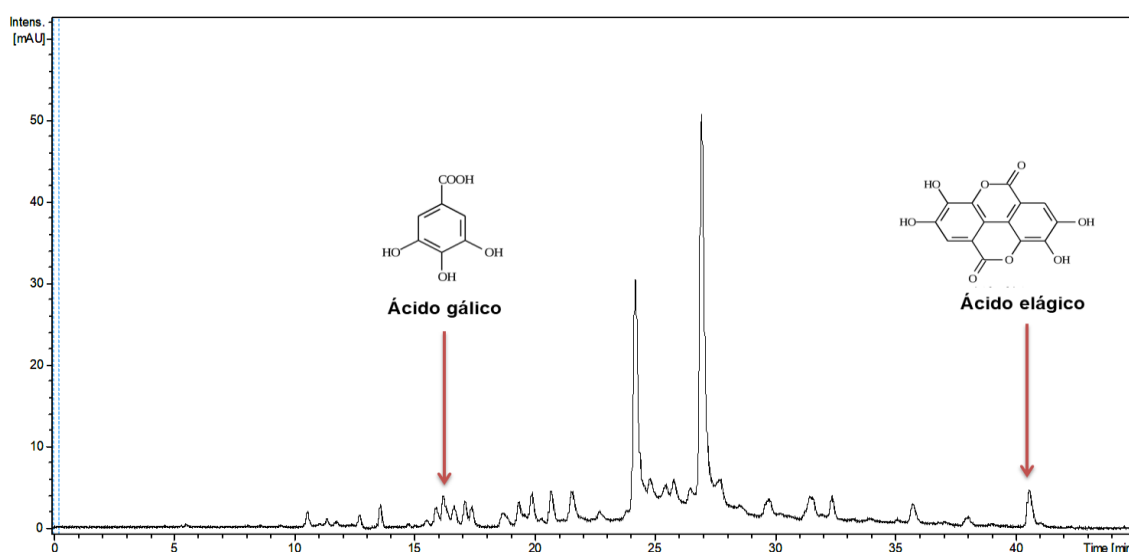
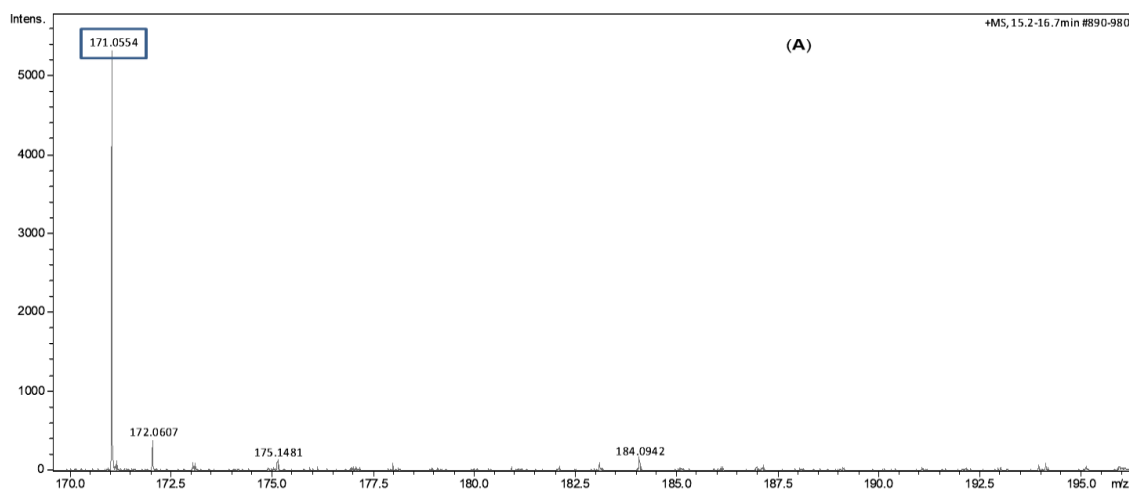


Figura 9. Perfil cromatográfico do EACPG. Ácido gálico ($t_r = 15,9$ min) e ácido elágico ($t_r = 40,5$ min).

O espectro de massas do ácido gálico ($t_r = 15,9$ min) exibiu o íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 171, indicando a fórmula molecular $C_7H_6O_5$ (Figura 10.A). O ácido elágico com t_r de 40,5 min apresentou íon molecular protonado $[M-H]^+$ em m/z 303, de fórmula molecular $C_{14}H_6O_8$ (Figura 10.B).



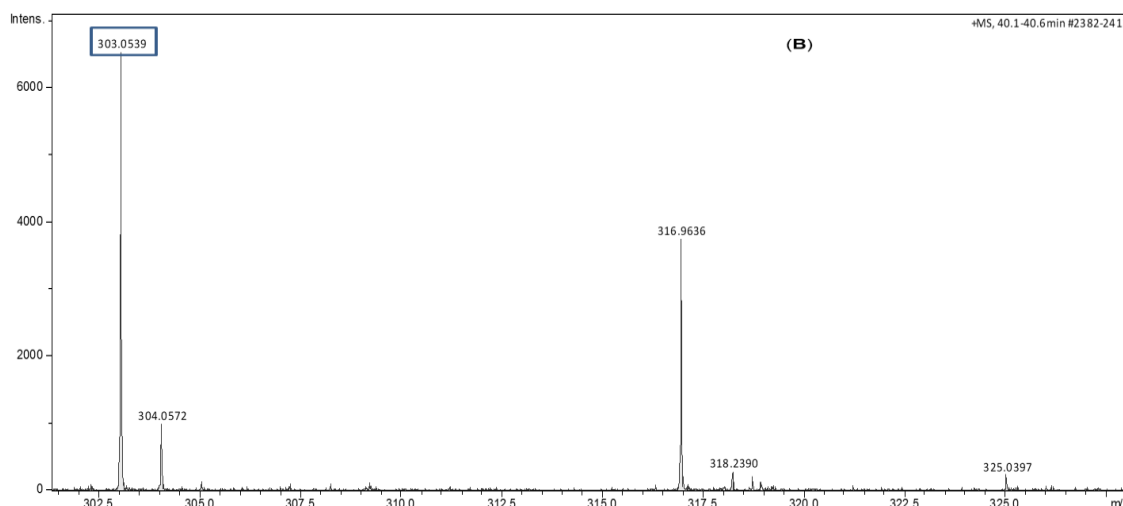


Figura 10. ESI(+)-MS ampliado do EACPG. $[M+H]^+$ em m/z 171 – ácido gálico (A) e $[M+H]^+$ em m/z 303 – ácido elágico.

6.3 Validação do método analítico

Para assegurar que um novo método analítico seja capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma série de estudos experimentais denominados validação. A identificação e quantificação de uma substância por um método analítico só se torna confiável quando advinda de uma metodologia validada, o que garante comparabilidade e rastreabilidade (RIBANI *et al.*, 2014). Sendo assim, o método analítico desenvolvido por CLAE-DAD para identificação e quantificação dos marcadores químicos no EACPG foi validado para garantir a confiabilidade do método e de seus resultados.

As figuras de mérito avaliadas na validação do método proposto foram linearidade, seletividade, efeito da matriz, limite de detecção, limite de quantificação precisão e exatidão.

6.3.1. Linearidade

A linearidade é a resposta obtida em função da capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância a ser analisada, dentro de uma faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

Por meio da construção das curvas analíticas, é possível avaliar a linearidade do método pela estimativa dos coeficientes de correlação referentes às equações das curvas, obtidas por regressão linear. O gráfico da curva de calibração deve ser construído com no mínimo cinco valores de concentração, representado por uma reta, que relaciona a resposta do equipamento com as várias concentrações das substâncias em estudo (RIBANI *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

As curvas de calibração do ácido gálico e do ácido elágico foram construídas pelo método de padronização externa a partir do preparo e análise de cinco concentrações, em triplicata, e a regressão foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, a partir da relação entre as áreas dos picos e as concentrações das amostras.

As curvas de calibração obtidas estão apresentadas na Figura 11. Os coeficientes de correlação obtidos na padronização externa foram respectivamente 0,9983 e 0,9962, para ácido gálico e ácido elágico, mostrando a forte correlação linear entre a concentração das substâncias analisadas e as áreas dos picos, com valores acima de 0,99, conforme preconizado pela Anvisa (BRASIL, 2017). Desta forma, o método cromatográfico é linear para a quantificação dos analitos na faixa de concentração avaliada.

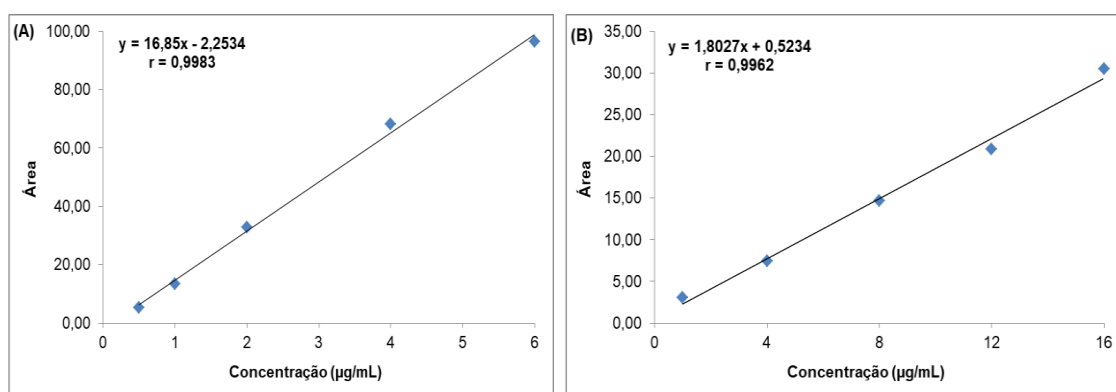


Figura 11. Curvas de calibração por padronização externa para o método de quantificação de ácido gálico (A) e ácido elágico (B).

6.3.2 Seletividade e efeito da matriz

Seletividade é a capacidade de avaliar, de maneira inequívoca, as substâncias em exame na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente da substância de interesse (BRASIL, 2017). A seletividade pode ser avaliada pelo método de adição de padrão. Este método é usado quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse, como em matrizes complexas (RIBANI *et al.*, 2014). Neste caso, é feita duas curvas analíticas, uma com adição da substância de interesse na amostra e a outra sem a presença da matriz. Comparando-se então as duas curvas analíticas, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que o método tem seletividade e que a matriz não interfere na quantificação do analito de interesse.

As curvas de calibração obtidas estão apresentadas nas Figuras 12 e 13. Ao se observar as figuras, verifica-se que o método foi seletivo para a quantificação do ácido gálico e do ácido elágico, uma vez que as duas curvas são paralelas e os coeficientes

angulares são bastante próximos entre si, o que demonstra a seletividade do método e a não-interferência da matriz na resposta analítica.

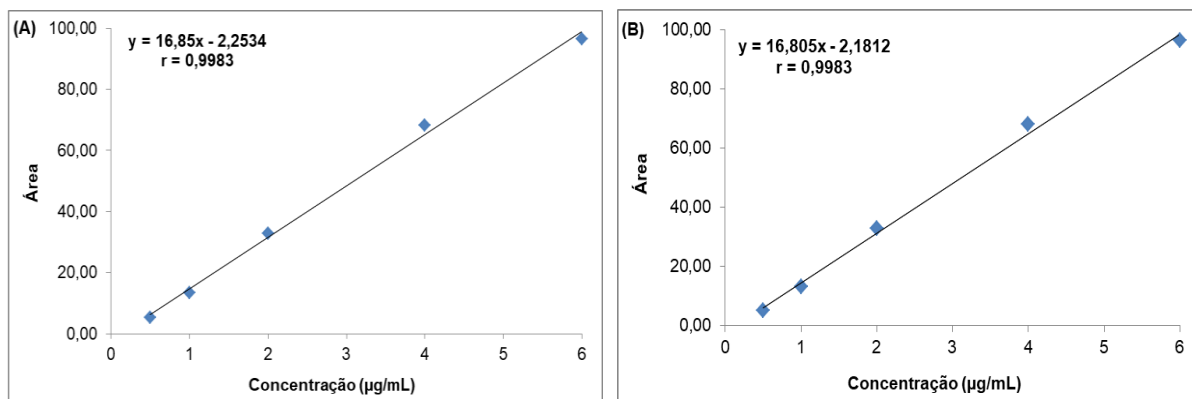


Figura 12. Curvas de calibração por padronização externa (A) e por adição de padrão (B) para o método de quantificação de ácido gálico no extrato de *P. granatum*.

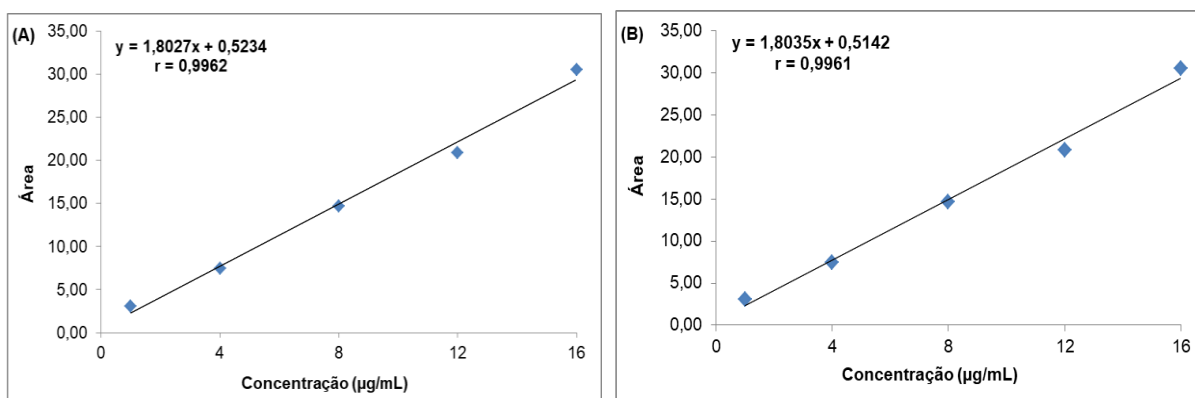


Figura 13. Curvas de calibração por padronização externa (A) e por adição de padrão (B) para o método de quantificação de ácido elágico no extrato de *P. granatum*.

6.3.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito (RIBANI *et al.*, 2014; BRASIL, 2017). O LQ e o LD podem ser calculados pelo método visual, método da relação sinal-ruído e pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica construída. Neste estudo, a determinação dos limites de detecção e quantificação foi baseada em parâmetros da curva analítica do ácido gálico e ácido elágico, utilizando as seguintes equações: $LD = 3,3 \times (s/S)$ e $LQ = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica.

Os LD foram de 0,50 µg/mL e 2,01 µg/mL para o ácido gálico e ácido elágico, respectivamente. O LQ obtido para o ácido gálico foi de 1,51 µg/mL e 6,10 µg/mL para o ácido elágico.

6.3.4. Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

A precisão foi avaliada de duas maneiras: repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados obtidos foram expressos como desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) entre as áreas obtidas para as replicatas analisadas. O valor máximo aceitável de coeficiente de variação (CV) vai depender do método empregado, da concentração do analito na amostra, do tipo de matriz e da finalidade do método, porém, não deve ultrapassar 5%.

6.3.4.1. Repetibilidade

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio ou intracorrida (BRASIL, 2017).

Para a avaliação da repetitividade do método, foi realizada a análise de soluções-padrão, correspondentes a três níveis de concentração (baixa, média e alta), submetidas a três diferentes preparações, sendo, então, estimado o CV correspondente para cada nível de concentração.

A tabela 2 apresenta os valores obtidos de CV para a precisão do método quantitativo proposto. Constatou-se neste trabalho, em todos os testes realizados, que o método apresentou todos os valores dentro dos limites aceitáveis, indicando uma boa repetibilidade.

Tabela 2 - Média das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada substância na avaliação da repetibilidade do método.

Substância	Concentração (µg/mL)	Área (n=3)	CV (%)
Ácido gálico	0,5	5,24	2,65
	2,0	41,13	3,47
	6,0	96,59	4,47
Ácido elágico	1,0	1,41	4,49
	8,0	14,92	2,45
	16,0	30,02	3,14

6.3.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito das variações da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por diferentes analistas (BRASIL, 2017). O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. Para isso, foi realizada a análise, em 2 dias diferentes, por analistas diferentes, utilizando o mesmo equipamento, de soluções-padrão referentes a três níveis de concentração, sendo estimado o CV ao final das sucessivas repetições.

Como observado na Tabela 3, os valores de coeficiente de variação (CV) para a precisão intermediária do método de quantificação de ácido gálico e ácido elágico estão abaixo do limite de 5%, conforme é recomendado.

Tabela 3 - Média das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para o ácido gálico e ácido elágico na avaliação da precisão intermediária do método.

Substância	Concentração (µg/mL)	1º dia CV (%)	2º dia CV (%)	Média CV(%)
Ácido gálico	0,5	1,36	2,16	1,76
	2,0	1,10	3,87	2,49
	6,0	4,70	1,68	3,19
Ácido elágico	1,0	0,84	1,44	1,14
	8,0	0,01	1,42	0,71
	16,0	2,36	0,19	1,28

6.3.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível (BRASIL, 2017).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência certificada, comparação de método proposto com método de referência, ensaios de recuperação com matriz fortificada e adição de padrão.

Nesse estudo, a exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando o EACPG, sendo o extrato fortificado com padrões dos analitos em 3 níveis de concentrações diferentes (baixo, média e alto).

Os valores aceitáveis de recuperação para alguns tipos de análise estão geralmente entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$; porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2014).

Na tabela 4, constam os resultados do ensaio de recuperação do método quantitativo proposto, expressos em termos de porcentagem de recuperação. Observou-se neste estudo, que o método apresentou boa recuperação para o ácido gálico e o ácido elágico nos três níveis de concentração e com valores de coeficiente de variação (CV) menores que 5%, ficando todos os valores dentro dos limites aceitáveis (entre 70 e 120%).

Tabela 4 – Recuperação dos padrões em EACPG.

Composto	Concentração (µg/mL)			Recuperação (%)	Média	CV (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado			
Ácido gálico	0,93	0,5	1,35	94,49	91,78	2,64
	0,93	0,5	1,28	89,82		
	0,93	0,5	1,30	91,02		
	0,93	2,0	2,59	88,61	91,46	4,78
	0,93	2,0	2,61	89,29		
	0,93	2,0	2,82	96,49		
	0,93	6,0	7,20	103,89	103,19	1,71
	0,93	6,0	7,01	101,18		
	0,93	6,0	7,24	104,49		
Ácido elágico	26,95	1,0	29,52	105,61	106,72	1,17
	26,95	1,0	30,21	108,07		
	26,95	1,0	29,76	106,47		
	26,95	8,0	38,07	108,94	109,53	1,06
	26,95	8,0	38,02	108,79		
	26,95	8,0	38,75	110,87		
	26,95	16,0	50,91	118,54	119,27	0,34
	26,95	16,0	51,35	119,56		
	26,95	16,0	51,10	118,98		

6.4. Quantificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico

O método cromatográfico validado foi aplicado na quantificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico no EACPG.

Para a quantificação dos ácidos fenólicos, a pureza dos picos de interesse foram avaliadas. Para isso, o EACPG (0,5 mg/ mL) foi analisado, utilizando detector de arranjo de diodos com varredura entre 190-800 nm. Os picos referentes ao ácido gálico ($t_r = 15,9$ min, $k = 1,61$) e ao ácido elágico ($t_r = 40,5$ min, $k = 5,64$) foram determinadas pela comparação com a análise da solução-padrão. O cromatograma apresentou boa seletividade ($\alpha = 1,08$) para o ácido gálico em relação ao pico em $t_r = 16,7$ min ($k = 1,74$) e excelente resolução ($R_s = 1,78$); e boa seletividade ($\alpha = 1,08$) para o ácido elágico em relação ao pico em $t_r = 38,0$ min ($k = 5,23$) com excelente resolução ($R_s = 5,85$), não sendo detectado nenhum interferente na eluição de ambos ácidos fenólicos. Na quantificação, o comprimento de onda selecionado foi 280 nm.

Os ácidos fenólicos foram quantificados no EACPG através do método de padronização externa, utilizando-se as curvas analíticas construídas para os padrões. Na

análise do EACPG a concentração média do ácido gálico foi de $4,36 \pm 0,01$ mg/g de extrato e $94,33 \pm 0,57$ mg/g de extrato para o ácido elágico.

6.5 Testes comportamentais

6.5.1 Campo aberto

Com relação às explorações horizontais, observou-se que todos os grupos lesionados mostraram valores significativamente menores que o grupo LAM ($p < 0,0001$, figura 14).

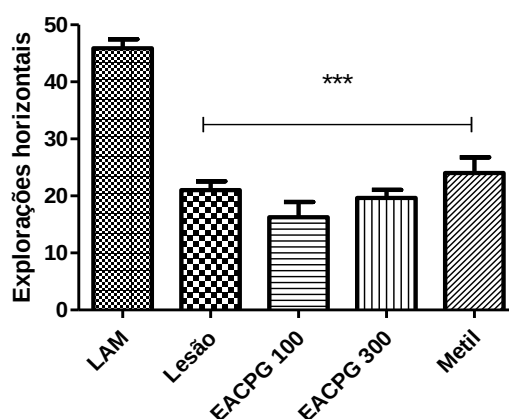


Figura 14. Resultados do teste de campo aberto quanto ao número médio de explorações horizontais, representado pelas colunas. As barras representam o erro padrão da média. Os testes foram realizados aos 28 dias após as cirurgias. LAM: grupo laminectomia; LESÃO: grupo lesão/veículo; LESÃO/EACPG100: grupo lesionado e tratado com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* a 100 mg/kg; LESÃO/EACPG300: grupo lesionado e tratado com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* a 300 mg/kg; METIL: grupo lesionado e tratado com metilprednisolona a 30 mg/kg ($n = 8$ a 16 por grupo). *** indica valor de $p < 0,0001$ em relação ao grupo LAM (teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

6.5.2 Labirinto em Y

O grupo lesionado tratado com EACPG 300 mg/kg mostrou aumento significativo da performance no labirinto em Y, em relação aos grupos LAM ($p < 0,0001$), Lesão ($p < 0,05$) e EACPG100 ($p < 0,001$) em 28 dias (figura 15).

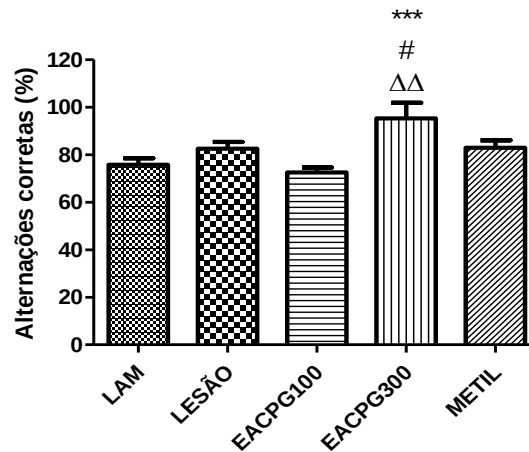


Figura 15. Resultados do teste de labirinto em Y. As colunas representam a porcentagem média de alterações corretas e as barras representam o erro padrão da média. Os testes foram realizados aos 28 dias após as cirurgias. LAM: grupo laminectomia; LESÃO: grupo lesão/veículo; LESÃO/EACPG100: grupo lesionado e tratado com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* a 100 mg/kg; LESÃO/EACPG300: grupo lesionado e tratado com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* a 300 mg/kg; METIL: grupo lesionado e tratado com metilprednisolona a 30 mg/kg (n = 8 a 16 por grupo). *** indica valor de $p < 0,0001$ em relação ao grupo LAM; # indica valor de $p < 0,05$ em relação ao grupo LESÃO; ΔΔ indica valor de $p < 0,001$ em relação ao grupo EACPG100 ((teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn)).

6.6 Análise Histológica

Como pode ser observado na Figura 16.A, o número médio de neurônios/campo histológico no hipocampo foi significativamente menor no grupo LESÃO ($2,93 \pm 0,23$) do que no grupo LAM ($4,13 \pm 0,27$) ($p < 0,01$). O mesmo comportamento foi observado no grupo EACPG100 ($2,67 \pm 0,13$), que também se mostrou significativamente menor que LAM ($p < 0,001$), mas estatisticamente semelhante ao grupo LESÃO ($p > 0,05$). Apesar de não ter sido evidenciada diferença significativa entre o grupo EACPG300 ($3,55 \pm 0,19$) e LESÃO ($p > 0,05$), o tratamento com a dose de 300 mg/kg levou as contagens médias de neurônios a valores estatisticamente semelhantes ao grupo LAM ($p > 0,05$), o que também foi visto no grupo tratado com metilprednisolona (METIL) ($p > 0,05$).

Para determinar em qual região anatomomorfológica do hipocampo houve maior ou menor perda de neurônios, foi realizada a análise quantitativa desta população celular nos diferentes setores, denominados CA1, CA2 e CA3. De maneira similar àquela observada anteriormente na análise de neurônios totais, o número médio de neurônios no setor CA1 (Figura 16.B) observado no grupo LESÃO ($2,35 \pm 0,42$) e EACPG100 ($3,36 \pm 0,24$) também foi significativamente menor que em LAM ($5,31 \pm 0,43$) ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Por outro lado, os grupos EACPG300 ($4,61 \pm 0,35$) e METIL ($4,71 \pm 0,57$) apresentaram contagens médias de neurônios significativamente maiores que o grupo LESÃO ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) e estatisticamente semelhantes ao grupo LAM ($p > 0,05$). No

entanto, não foi observada diferença significativa na contagem média de neurônios nos setores CA2 e CA3 entre os grupos analisados ($p>0,05$).

No lado contralateral ao lesionado (lado esquerdo, Figura 17.A), apesar do número médio de neurônios totais observado em EACPG100 ($3,13 \pm 0,15$) ter sido significativamente menor que no grupo LESÃO ($4,58 \pm 0,23$) ($p<0,001$) e METIL ($4,35 \pm 0,30$) ($p<0,05$), todos os grupos que sofreram lesão medular, incluindo o EACPG300 ($3,71 \pm 0,18$), exibiram números médios de neurônios totais estatisticamente semelhantes àquele observado no grupo LAM ($3,78 \pm 0,24$) não lesionado ($p>0,05$). Além disso, não houve qualquer diferença na contagem média de neurônios entre os grupos estudados, independente do tratamento, quando foram analisados, separadamente, os setores CA1, CA2 e CA3 ($p>0,05$) (Figura 17.B).

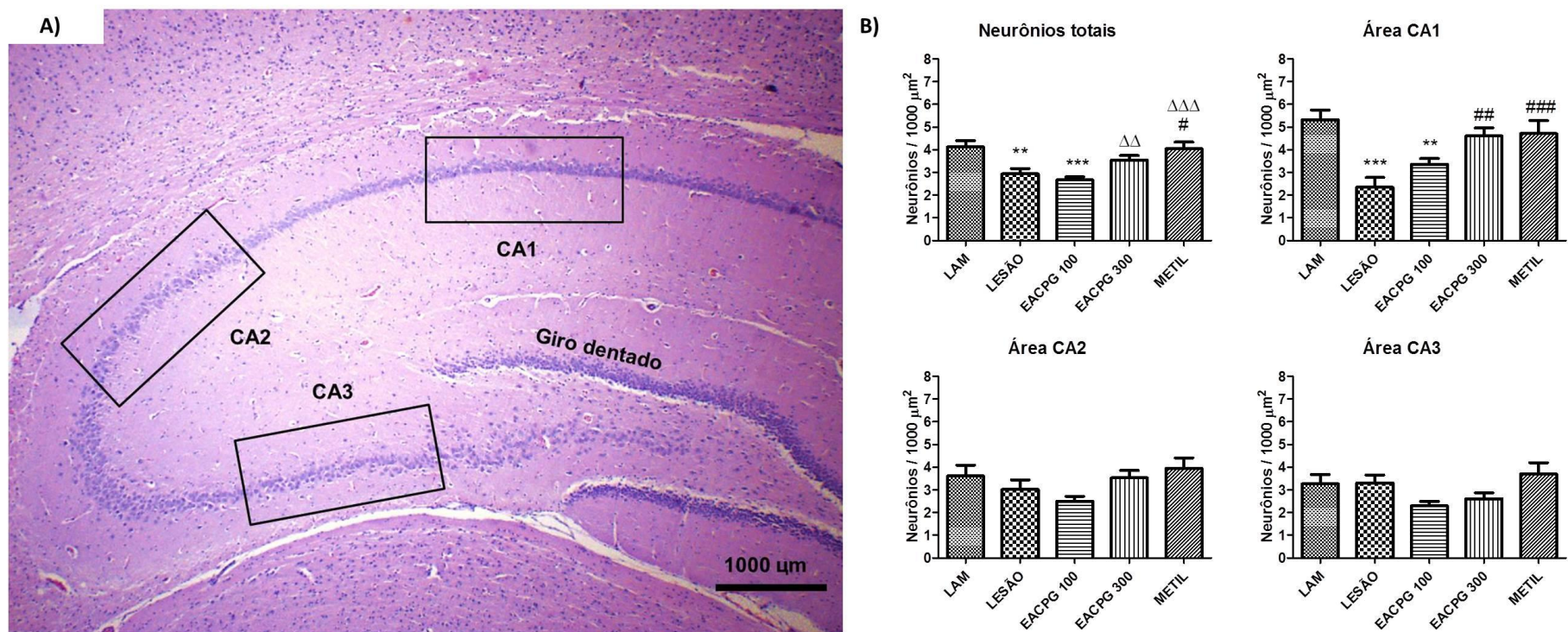


Figura 16. A) Secção histológica corada em HE de região do hipocampo ilustrativa das áreas anatomomorfológicas CA1 (memória similar à episódica), CA2 (memória social) e CA3 (memórias parciais) nas quais foi realizada a análise quantitativa de neurônios no lado direito (100 ×). B) Número médio de neurônios/1000 μm^2 nas áreas anatomorfológicas analisadas. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas em relação ao grupo LAM estão expressas como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; diferenças significativas em relação ao grupo LESÃO estão expressas como: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$; diferenças significativas em relação ao grupo EACPG100 estão expressas como: $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ e $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ (teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey).

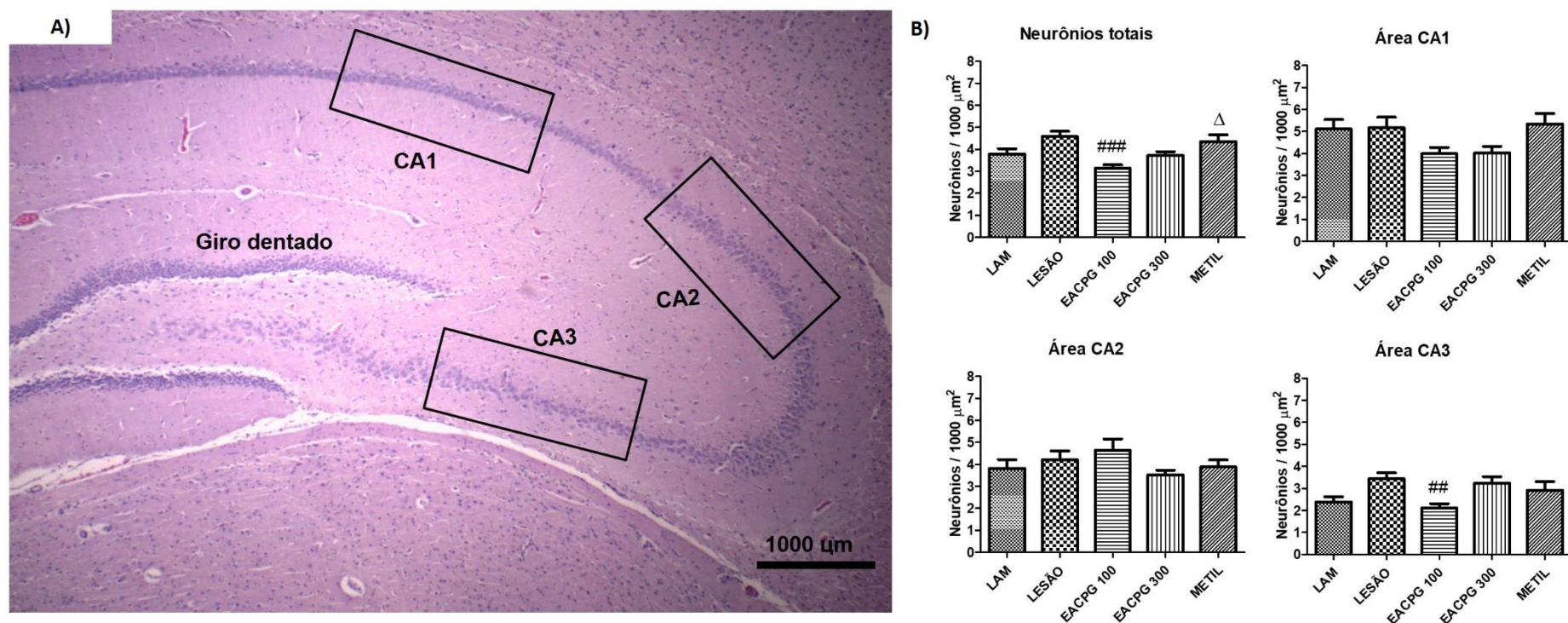


Figura 17. A) Secção histológica corada em HE de região do hipocampo ilustrativa das áreas anatomomorfológicas CA1 (memória similar à episódica), CA2 (memória social) e CA3 (memórias parciais) nas quais foi realizada a análise quantitativa de neurônios no lado esquerdo (100 ×). B) Número médio de neurônios/1000 μm² nas áreas anatomomorfológicas analisadas. Dados expressos como média ± erro padrão da média. Diferenças significativas em relação ao grupo LESÃO estão expressas como: #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001; diferenças significativas em relação ao grupo EACPG100 estão expressas como: Δp<0,05, ΔΔp<0,01 e ΔΔΔp<0,001 (teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey).

7. DISCUSSÃO

Nesse estudo um novo método cromatográfico por CLAE-DAD-ESI/MS foi desenvolvido para identificação e quantificação dos compostos químicos, ácido gálico e ácido elágico, presentes no EACPG, desta forma foi possível observar a presença destas substâncias na amostra utilizada nesse trabalho. Alguns estudos referem o ácido gálico e o ácido elágico estão presentes na casca de *P. granatum* (ZAHIN; AQIL; AHMAD, 2010; NASCIMENTO, 2013, KAZEMI *et al.*, 2016; ROSAS-BURGOS *et al.*, 2017). O EACPG, no presente trabalho, apresenta substâncias, o que se assemelha aos achados de Fischer *et al.* (2011) e de Brighenti *et al.* (2017), que analisaram o extrato da casca do fruto de *P. granatum* e confirmaram por meio de CLAE-DAD/MS a presença desses compostos fenólicos, dentre ele o ácido gálico e o ácido elágico. A importância destes compostos para a presente proposta relaciona-se às suas ações já descritas para o sistema nervoso (ZAHIN; AQIL; AHMAD, 2010; KAZEMI *et al.*, 2016).

Para avaliar a atividade locomotora dos animais, o teste de campo aberto foi realizado e observou-se diferença entre o número médio de explorações horizontais entre o grupo LAM e todos os grupos lesão, com diminuição da atividade motora. Este achado pode estar relacionado à intensidade da lesão produzida e é indicativo da efetividade da lesão. Em estudo Wu *et al.*, (2014a) ao analisarem a memória de trabalho, em lesão crônicas, utilizando método *Infinite Horizon Spinal Cord Impactor*, em camundongos, e dividindo os grupos conforme gravidade da lesão (leve, moderada ou grave) observaram que os animais cuja lesão foi moderada ou grave, apresentaram uma redução significativa da atividade motora espontânea, após 11 semanas, em comparação com os animais do grupo laminectomia.

O tratamento com EACPG, nas doses utilizadas, não modificou o efeito da lesão sobre a atividade motora no campo aberto. Isoladamente, este dado sugere que não houve efeito neuroprotetor pela administração do EACPG ou METIL sobre a lesão medular. Embora não existam trabalhos mostrando os efeitos do EACPG sobre a lesão medular, este dado é distinto em relação aos dados da literatura que mostram ação neuroprotetora da romã sobre diferentes doenças (LIU *et al.*, 2017; AHMED *et al.*, 2014a). Especula-se que a medida de explorações horizontais isoladamente possa não ter refletido a melhora funcional após os tratamentos com EACPG e Metil que pode ter sido mais bem observada, por exemplo, através da escala de avaliação motora de Basso, Beattie e Bresnahan (1995).

No presente estudo observou-se redução significativa de neurônios hipocâmpais no lado homolateral à lesão medular. Estes dados sugerem que a lesão medular pode afetar o hipocampo e, por consequência, pode ter reflexos indesejáveis na memória, conforme

previamente relatado por Wu *et al.*, (2014 a,b; 2016). Além disso, a análise quantitativa nos setores do hipocampo indicou que esta redução ocorreu basicamente em CA1, sugerindo maior impacto na região que reflete a memória similar à episódica (CHANG *et al.*, 2009). Do mesmo modo, estudos observaram por meio de reação imunohistoquímica, que após LM, houve uma redução no nível da expressão de BDNF no hipocampo (FUMAGALLI *et al.*, 2009) com ênfase no setor CA1 (JING *et al.*, 2017). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), é conhecido por regular a neurogênese adulta e poderia estar envolvido em alterações cerebrais após a LM (LEE *et al.*, 2002; SCHARFMAN *et al.*, 2005; FUMAGALLI *et al.*, 2009). Estudos tem demonstrado que a redução da neurogênese do hipocampo está correlacionada com a diminuição dos níveis dessa proteína (FELIX *et al.*, 2012).

Atualmente, há evidências convincentes que sugerem que a lesão medular crônica resulta em uma neuroinflamação em nível central (FELIX *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2014 a, b; MALDONADO-BOUCHARD *et al.*, 2016; JURE *et al.*, 2017), especialmente no tálamo, mais especificamente em nível das projeções hipotalâmicas, e no hipocampo (HULSEBOSCH *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2007). Um estudo recente forneceu evidências de uma relação entre a elevação dos níveis de citocinas periféricas e do hipocampo e o aumento da depressão ou sinais semelhantes a ansiedade após a contusão da medula espinhal de roedores (MALDONADO-BOUCHARD *et al.*, 2016). Adicionalmente, Faden *et al.* (2016) demonstraram que células microgliais são ativadas no córtex cerebral, no tálamo e no hipocampo de ratos submetidos a lesão medular experimental. Os autores descreveram que há uma diminuição significativa no número de células microgliais em repouso, que apresentam morfologia celular ramificada, e um aumento no número de células microgliais ativadas, que se apresentam morfologicamente hipertróficas. As últimas mudanças na morfologia da microglia estão associadas à expressão de citocinas pró-inflamatórias (M1) e são observadas tanto nas fases aguda como crônica pós-trauma (WU *et al.*, 2014 a, b). Os níveis de TNF- α , IL-6 e genes do ciclo celular (ciclina A1, A2, D1, PCNA) também são cronicamente aumentados no hipocampo após lesão medular grave (WU *et al.*, 2014 a, b).

A reatividade das células da glia está relacionada à intensidade da lesão medular. Células microgliais e astrócitos em condições patológicas (estresse crônico, lesão, doenças neurodegenerativas, diabetes, envelhecimento, infecção) tornam-se reativos e desenvolvem uma resposta neuroinflamatória que leva a déficits cognitivos e emocionais (SIERRA *et al.*, 2014). Embora o mecanismo preciso de lesão do hipocampo após injúrias traumáticas na medula espinhal não esteja totalmente elucidado, acredita-se que além da reatividade das células gliais, monócitos são recrutados e responsáveis por criar um meio tóxico dentro do hipocampo, uma vez que essas células são fonte de espécies reativas de oxigênio, metaloproteinases, elastases e catepsinas, além de citocinas pró-inflamatórias e

quimiocinas (HOWE *et al.*, 2012) e poderiam, dessa forma, induzir lesão oxidativa e apoptose, contribuindo para destruição das células neuronais, especialmente dos neurônios piramidais do hipocampo CA1, causando, por consequência, comprometimento do desempenho cognitivo e emocional. Corroborando com os nossos achados, Wu *et al.* (2014 a,b) demonstraram que a lesão medular moderada e grave - mas não leve - aumentou o estresse do retículo endoplasmático das células nervosas, reduzindo consequentemente a sobrevivência neuronal e gerando destruição significativa de neurônios no hipocampo, no córtex e no tálamo, regiões cerebrais importantes associadas com o declínio cognitivo e à depressão (WU *et al.*, 2014 a, b; 2016).

O tratamento com a metilprednisolona, no presente estudo, levou as contagens médias de neurônios hipocampais a valores estatisticamente semelhantes ao grupo LAM ($p>0,05$). Esses achados são compatíveis com o de estudos anteriores que avaliaram os efeitos desse fármaco no trauma medular em modelo roedor (BOWERS *et al.*, 2014). Está bem documentado que o hipocampo e o córtex cerebral são vulneráveis às ações de glicocorticoides e que a corticosterona liberada na fase aguda após a LM tem o poder de promover modulação do cérebro produzindo alterações de longo prazo (LUCASSEN *et al.*, 2015). Resultado semelhante também foi visto no grupo tratado com o EACPG na dose de 300 mg/Kg ($p>0,05$), sugerindo um possível efeito neuromodulador. De fato, estudos prévios *in vitro* demonstraram que o pré-tratamento de neurônios com a punicalagina promoveu diminuição significativa dos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), proporcionou modulação da cascata apoptótica (ODUBANJO *et al.*, 2018) e apresentou efeito neuroprotetor o dano oxidativo induzido pela isquemia cerebral por perfusão em ratos (YAIDIKAR; BAYNA; THAKUR, 2014). Adicionalmente, extratos ricos em ácido gálico proporcionaram melhora da função cognitiva (memória de trabalho) em roedores através da modulação de enzimas colinérgicas e antioxidantes (ODUBANJO *et al.*, 2018). Curiosamente, estudos recentes também demonstraram que o ácido elágico, um dos compostos presentes no EACPG, teve efeito terapêutico sobre os déficits de memória, alteração na condução de impulsos nervosos e aumento no teor de interleucinas pró-inflamatórias após trauma encefálico em roedores (MASHHADIZADEH *et al.*, 2017). Este resultado corrobora com os achados do teste de labirinto em Y, que evidenciou que os animais tratados com o EACPG na dose de 300 mg/ Kg, apresentaram um aumento na porcentagem de alterações corretas em relação a todos os grupos 28 dias após lesão medular, o que indica uma possível ação neuroprotetora do EACPG em nível central.

Resultados similares foram reportados por Hartman *et al.*, (2006) que mostraram efeito protetor dos compostos fenólicos presentes no suco de romã sobre os parâmetros comportamentais e neuropatológicos em modelo animal para estudo da doença de Alzheimer, bem como os resultados reportados por Morzelle *et al.*, (2016) que sugerem ação

positiva do extrato da casca de romã sobre a memória, evidenciada por meio do teste no Labirinto de Barnes. Adicionalmente, Riaz; Ra; Rá, (2014), observaram que o suco de romã melhorou o desempenho de ratos em teste de esquiva passiva, indicando ação sobre a memória de curto prazo. Conforme observado por estes mesmos autores, os mecanismos de ação da romã frente às desordens neurodegenerativas envolvem a diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio (BRAIDY *et al.*, 2013) e a da resposta inflamatória (OWACHRIF *et al.*, 2012), presentes também no quadro de LM (LIU *et al.*, 1999). Fatima *et al.* (2017) observaram que o suco da romã em modelo experimental de amnésia induzida por escopolamina também promoveu efeito neuroprotetor notável sobre a memória, aprendizagem, cognição e parâmetros comportamentais. Além disso, existem evidências da ação de extratos e suco de romã sobre o sistema nervoso central íntegro, incluindo atividades ansiolítica e antidepressiva (KUMAR; MAHESHWARI; SINGH, 2008; RIAZ; KHAN, 2017), o que poderia explicar, ao menos em parte, a diferença observada entre o grupo ECAPG 300 e o grupo LAM, no teste de labirinto em Y.

Em nosso estudo, a avaliação da memória de trabalho analisada por meio do teste de labirinto em Y não demonstrou diferenças significativas entre o grupo LAM e LESÃO. No entanto, a avaliação histológica do número percentual médio de neurônios/campo histológico no hipocampo demonstrou diferença significativa entre o grupo LESÃO e LAM. Esse aparente paradoxo pode ser fruto da plasticidade neuronal e tentativa de reorganização funcional do hipocampo como estratégia de minimizar os danos à essa estrutura (GRIGOREAN *et al.*, 2009; JING *et al.*, 2017). No entanto, a longo prazo, a interrupção do circuito ou à perda da regulação homeostática de neurotransmissores e íons desencadeados pelas alterações inflamatórias locais podem promover prejuízos cognitivos (JURE *et al.*, 2017).

Em síntese, a lesão medular resulta em neuroinflamação crônica do cérebro produzindo uma neurodegeneração progressiva e déficits funcionais como comprometimento cognitivo e comportamento depressivo (FADEN *et al.*, 2016). Essas anormalidades cerebrais a longo prazo e a neuroinflamação difusa associada podem explicar deficiências comportamentais exibidas em pacientes com trauma da medula espinhal (DAVIDOFF *et al.*, 1992; DOWLER *et al.*, 1997; LAZZARO *et al.*, 2013). No entanto, estudos ainda são necessários para compreender os mecanismos e eventos bioquímicos responsáveis pelas alterações hipocampais após lesões medulares traumáticas. Futuras estratégias de reabilitação devem ser desenvolvidas para melhorar não apenas as habilidades sensoriais, mas também a função cognitiva, visto que a lesão medular promove mudanças cerebrais crônicas, trazendo consequências drásticas para a qualidade de vida dos pacientes afetados. Portanto, as terapias futuras devem incluir a inibição da resposta inflamatória cerebral pós-traumática para evitar déficits cognitivos e

emocionais. Neste sentido, o tratamento com EACPG a 300 mg/kg parece constituir uma abordagem terapêutica promissora.

8. CONCLUSÃO

Conclui-se que o método cromatográfico desenvolvido foi útil para a obtenção do perfil cromatográfico do EACPG e, ainda, para a identificação e quantificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico presentes no extrato. Além disso, os parâmetros de validação apresentaram-se conforme o recomendado pela legislação vigente, garantindo a eficiência e reprodutibilidade do método.

Adicionalmente, a lesão medular promoveu diminuição da atividade motora e o referido extrato foi capaz de melhorar o desempenho no teste de memória, além de proteger neurônios hipocâmpais da neurodegeneração cerebral decorrente de lesão medular espinal.

REFERÊNCIAS

- ABID, M.; CHEIKHROUHO, S.; RENARD, C. M.; BUREAU, S.; CUVELIER, G.; ATTIA, H.; AYADI, M. A. Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. *Food chemistry*, 2017; 1 (215), 318-325.
- ADIGA, S.; TRIVEDI, P.; V, R.; DEB, D.; MEHTA, F. Effect of Punica granatum peel extract on learning and memory in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2010, 687-690.
- AFAQ, F.; KHAN, N.; SYED, D. N.; MUKHTAR, H. Oral Feeding of Pomegranate Fruit Extract Inhibits Early Biomarkers of UVB Radiation-induced Carcinogenesis in SKH-1 Hairless Mouse Epidermis. *Photochemistry and photobiology*. 2010; 86(6), 1318-1326.
- AHMED, A.H.; SUBAIEA, G.M; EID, A.; LI, L.; SEERAM, N.P.; ZAWIA, N.H. Pomegranate extract modulates processing of amyloid- β precursor protein in an aged Alzheimer's disease animal model. *Current Alzheimer Research*. 2014 a; 11(9):834-43.
- AHMED, M.A.; EL MORSY, E.M.; AHMED, A.A. Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats. *Life Sciences*. 2014 b; 110(2):61-9.
- AKHTAR, S.; ISMAIL, T.; FRATERNALE, D.; SESTILI, P. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food chemistry*. 2015; 174, 417-425.
- ALBAYRAK, S.; ATCI, I.B.; KALAYCI, M.; YILMAZ, M.; KULOGLU, T.; AYDIN, S.; et al. Effect of carnosine, methylprednisolone and tjeir combined application on irisin levels in the plasma and brain of rats with acute spinal Cord injury. *Neuropeptides*, 2015, v. 52, n. p.47-54.
- ALMAD, A.; SAHINKAYA, F.R.; MCTIGUE, D.M.. Oligodendrocyte fate after Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*. 2011, V.8: p. 262-273.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.* 1967,,21(2): 205-235.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour*.1973, 21(2), p.205-235.
- ARDESTANI, M. E.; KALANTARY, E.; SAMAIY, V.; TAHERIAN, K. Methyl prednisolone vs Dexamethasone in Management of COPD Exacerbation; a Randomized Clinical Trial. *Emergency*, 2017. 5(1): 35.
- BARATHIKANNAN, K.; VENKATADRI, B.; KHUSRO,A.; AL-DHABI, N.A.; AGASTIAN, P.; ARASU, M.V.; et al. Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties, 2016, v. 16, n. p. 264.
- BARBOSA, F.F, Pontes IM, Ribeiro S, Ribeiro AM, Silva RH. Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. *Behav Brain Res*. 2012 15;232(1):269-77.
- BARBOSA, L.F.; DE MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Química Nova*. 2006; 29 (6), 1352-1360.

BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1–21.

BASTOS, T. S. Efeito antitumoral induzido por apoptose e avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos do extrato aquoso de punica granatum linn em modelo murino. [Dissertação]. Sergipe: *Universidade Tiradentes*; 2014.

BENSAAD, L. A.; KIM, K. H.; QUAH, C. C.; KIM, W. R.; SHAHIMI, M. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017;17(1), 47.

BENSAAD, L. A.; KIM, K. H.; QUAH, C. C.; KIM, W. R.; SHAHIMI, M. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 17: 47.

BOCHE, D.; PERRY, V.H.; NICOLL, J.A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2013, v. 39,n.1,p.3-18.

BOWERS, J. M.; PEREZ-POUCHOULEN, M.; ROBY, C. R.; RYAN, T. E.; MCCARTHY, M. M. Androgen Modulation of Foxp1 and Foxp2 in the Developing Rat Brain: Impact on Sex Specific Vocalization. *Endocrinology*, 2014; 155(12):4881-4894.

BRAIDY, N., SELVARAJU, S., ESSA, M. M., VAISHNAV, R., AL-ADAWI, S., AL-ASMI, AL-SENAWI, H.; ALOBAIDY, A.A.A.; LAKHTAKIA, GUILLEMIN, G.J. Neuroprotective effects of a variety of pomegranate juice extracts against MPTP-induced cytotoxicity and oxidative stress in human primary neurons. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.

BRAIDY, N.; ESSA, M.M.; POLJAK, A.; SELVARAJU, S., AL-ADAWI, S.; MANIVASAGM, T.; *et al.* Consumption of pomegranates improves synaptic function in a transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Oncotarget*, 2016, v. 7, n.40, p. 64589–64604.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 julho 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas e Departamento de Atenção Especializada. – Brasília, 2013.

BRIGHENTI, M.; GROOTHUIS, S.F.; PRENCIPE, F.P.; AMIR, R.; BENVETUNI, S.; PELLATI, F. Metabolite fingerprinting of *Punica granatum* L. (pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection Author links open overlay panel. *Journal of Chromatography A*, 2017; 1480; 20–31.

BRUNOZI, A.E, SILVA, A.C.; GONÇALVES, L.F.; VERONEZI, R.J.B. Qualidade de Vida na Lesão Medular Traumática. *Revista Neurociências*. 2011;19(1):139-44.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos: Edufscar, 2001.

CELIK, F.; GOCMEZ, C.; BOZKURT, M.; KAPLAN, I.; KAMASAK, K.; AKIL, E.; DOGAN, E.; GUZEL, A.; UZAR, E. Neuroprotective effects of carvacrol and pomegranate against methotrexate-induced toxicity in rats. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2013; 17(22): 2988-2993.

CEREZETTI, C.R.N.; NUNES, G.R.; CORDEIRO, D.C.L.; TEDESCO, S. Lesão Medular Traumática e estratégias de enfrentamento: revisão crítica. *O Mundo da Saúde*, São Paulo - 2012; 36(2):318-326.

CHANG, C.M.; LEE, M.H.; WANG, T.C.; WENG, H.H.; CHUNG, C.Y.; YANG, J.T. Brain protection by methylprednisolone in rats with spinal cord injury. *NeuroReport*. 2009, 20:968–972.

CHENG, P.; KUANG, F.; JU, G. Aescin reduces oxidative stress and provides neuroprotection in experimental traumatic spinal cord injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016; 99, 405-417.

CLEMENTI, M.E.; PANI, G.; SAMPAOLESE, B.; TRINGALI, G. *Punicalagin* reduces H₂O₂-induced cytotoxicity and apoptosis in PC12 cells by modulating the levels of reactive oxygen species. 2017, v.0, p.1-8.

COSTA, L.M.; PEREIRA, J.E.; FILIPE, V.M.; MAGALHÃES, L.G.; COUTO, P.A.; GONZALO-ORDEN JM, *et al.* Rolipram promotes functional recovery after contusive thoracic spinal cord injury in rats. *Behav Brain Res*. 2013; 243 : 66-73.

CRAIG, A.; NICHOLSON, P.K.; GUEST, R.; TRAN, Y.; DEZARNAULDS, A.; HALES, A.; EPHRAUMS, C.; MIDDLETON, J. Prospective study of the occurrence of psychological disorders and comorbidities after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2015;96:1426–1434.

DALL'IGNA, O.P.; FETT, P.; GOMES, M.W.; SOUZA, D.O.; CUNHA, R.A.; LARA, D.R. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol* 2007; 203: 241–245.

DAVIDOFF, G. N.; ROTH, E. J.; RICHARDS, J. S. Cognitive deficits in spinal cord injury: epidemiology and outcome. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 1992; 73(3): 275-284.

DEFINO, H. L. A. *Trauma raquimedular*. Medicina. Ribeirão Preto. 1999; v. 32, p.388-400.
DEL BEL, E.A.; da SILVA, C.A.; MLADINIC, M.O.; O trauma raquimedular. *Coluna/Columna*, 2009, v.8, n.4, p.441-449.

DEV, S. Ancient-modern concordance in Ayurvedic plants: some examples. In *Development of Plant-Based Medicines: Conservation, Efficacy and Safety*. 1999, 47-67.

DOWLER, R.N.; HARRINGTON, D.L.; HAALAND, K.Y.; SWANDA, R.M.; FEE, F.; FIEDLER, K. Profiles of cognitive functioning in chronic spinal cord injury and the role of moderating variables. *J Int Neuropsychol Soc*. 1997;3:464-472.

ESSA, M. M.; SUBASH, S.; AKBAR, M.; AL-ADAWI, S.; GUILLEMIN, G. J. Long-term dietary supplementation of pomegranates, figs and dates alleviate neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one*, 2015,10(3): 1-17.

FADAVI, A.; BARZEGAR, M.; AZIZI, M.H.; BAYAT, M. Note: physicochemical composition of ten Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Sci Technol Int.* 2005;11(2):113–9.

FADEN, A. I.; WU, J.; STOICA, B. A.; LOANE, D. J. Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. *British Journal of Pharmacology*, 2016,173(4), 681–691.

FARBOOD, Y.; SARKAKI, A.; DOLATSHAHI, M.; MANSOURI, S. M. T.; KHODADADI, A. Ellagic Acid Protects the Brain Against 6-Hydroxydopamine Induced Neuroinflammation in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Basic and Clinical Neuroscience*, 2015; v. 6, n.2, p.83.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, R. O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Org.* 1985; v.63, n. p. 965-981.

FATIMA, F.; RIZVI, D.A.; ABIDI, A.; AHMAD, A.; SHUKLA, P.; QADEER, F.; SRIVASTAVA, K. A study of the neuroprotective role of *Punica granatum* and rosuvastatin in scopolamine induced cognitive deficit in rats. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2017, 6(7) p. 1773-1777.

FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L. Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to in vitro digestion. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, v.16, n.1, p. 358.

FAWOLE, O.A.; OPARA, U.L.; THERON, K.I.;. Chemical and phytochemical properties and antioxidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa. *Food Bioprocess Tech.* 2012, v. 5, n. p.:2934–40.

FEHLINGS, M.G; WILSON, J.R; CHO, N. Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: counterpoint. *Neurosurgery* 61 *Suppl.* 2014;1:36–42.

FELIX, M.S.; POPA, N.; DJELLOUL, M.; BOUCRAUT, J.; GAUTHIER, P., BAUER, S.; *et al.* Alteration of Forebrain Neurogenesis after Cervical Spinal Cord Injury in the Adult Rat. *Frontiers in Neuroscience*, 2012, v. 6, p. 45.

FERNÁNDEZ, V.; BENADERO, C.L.; BORRELL, V. Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned?. *The EMBO journal.* 2016; 35(10): 1021-1044.

FINNERUP, N. B., NORRBRINK, C.; TROK, K.; PIEHL, F.; JOHANNESSEN, I. L.; SORENSEN, J. C.; JENSEN, T. S.; WERHAGEN, L. Phenotypes and predictors of pain following traumatic spinal cord injury: a prospective study. *The Journal of Pain*, 2014;15(1), 40-48.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MS n. *Food chemistry*, 2011, v. 127, n. 2, p. 807-821.

FISCHER, U.A.; CARLE, R.; KAMMEMMERER, D.R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSⁿ. 2011; 127 (2); p. 807-821.

FOROUZANFAR, F.; AFKHAMI GOLI, A.; ASADPOUR, E.; GHORBANI, A.; SADEGHNIA, H.R. Protective effect of *Punica granatum* L. against serum/glucose deprivation-induced PC12 cells injury. *Evid Based Complement Alternat med*. 2013;1:1-9.

Fumagalli F, Madaschi L, Caffino L, Marfia G, Di Giulio AM, Racagni G, Gorio A. Acute spinal cord injury reduces brain derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. *Neuroscience*. 2009;159:936–939.

GAO, W.; CHEN, S.; WU, M.; GAO, K.; LI, Y.; WANG, H.; LI, H. Methylprednisolone exerts neuroprotective effects by regulating autophagy and apoptosis. *neural regeneration research*, 2016, v. 11, n. 5, p. 823–828.

GOMEZ-PINILLA, F.; NGUYEN, T. T. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional neuroscience*, 2012, v.15, n. 3, p. 127-133.

GONZÁLEZ – MOLINA, E.; MORENO, D.A.; GARCIA-VIGUERA, C. A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry*, Barking, 2009. v.115. p.1364-1372.

GRIGOREAN, V.T.; SANDU, A.M.; POPESCU, M.; IACOBINI, M.A.; STOIAN, R.; NEASCU, C.; et al. Cardiac dysfunctions following spinal cord injury. *J Med Life* 2009; 2:133–145. GRUNER, JA. Amonitored contusion modelo f spinal cord injury in the rat. *Journal Neurotrauma* 1992; 9(0), p.123-126.

GULLON, B.; PINTADO, M. E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. 2016; *Food Control*; 59, 94-98.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *J Comp Psychol*, v.18, n.3, p.385-403. 1934. HALL, E. D. Antioxidant therapies for acute spinal cord injury. *Neurotherapeutics*, 2011, v.8, n. 2, p. 152-167.

HARTMAN, R. E.; SHAH, A.; FAGAN, A. M.; SCHWETYE, K. E.; PARSADANIAN, M.; SCHULMAN, R. N.; FINN, M.B.; HOLTZMAN, D.M. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*. 2006, 24(3), 506-515.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta. Pharmacol. Sin*. 2006; 27 (1), p. 27-40. HITTI, F.L.; SIEGELBAUM, S.A. The hippocampal CA2 region is essential for social emory. *Nature*, 2014. 508 (7494)88-92.

HOUSTON, D. M.; BUGERT, J.; DENYER, S. P.; HEARD, C. M. Anti-inflammatory activity of *Punica granatum* L.(Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*,. 2017; 112(1), 30-37.

HOWE, C.L.; LAFRANCE-COREY, R.G.; SUNDSBAK, R.S.; LAFRANCE, S.J. Inflammatory monocytes damage the hippocampus during acute picornavirus infection of the brain. *J Neuroinflammation*. 2012; 9:9:50.

HULSEBOSCH, C. E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances Physiology Education*. 2002; 26 (4):238-255.

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*. 2012; 343(1): 21-33. in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2008. 89(2):192-8.

JAISWAL, V.; DERMARDEROSIAN, A.; PORTER, J. R. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chemistry* 2010; 11(118): 11–16.

JANG, C.H.; CHO, Y.B.; CHOI, C.H.; JANG Y.S.; JUNG, W.K. Efeito da dexametasona tópica na redução da disfunção após lesão por esmagamento do nervo facial no rato. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014; 78 (6): 960-963.

JARDINI, F. A.; FILHO, J.M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica Granatum*, L.). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2007; 43(1): 137-147.

JARDINI, F.A.; *et al.* Compostos fenólicos da polpa e sementes de Romã (*Punica Granatum*, L.): Atividade antioxidante e protetora em células MDCK. *Alimentação e Nutrição Araraquara* 2010; 21(4): 509-517.

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

JING, Y.; BAI, F.; CHEN, H.; DONG, H. Acute spinal cord injury diminishes silent synapses in the rat hippocampus. *NeuroReport*. 2017, 28:1139–1143.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001, v. 413.n. p.6852: 203-210.

JURE, I.; PIETRANERA, L.; DE NICOLA, A.F.; LABOMBARDA, F. Spinal cord injury impairs neurogenesis and induces glial reactivity in the hippocampus. *Neurochem Res*. 2017; 42(8):2178-2190.

KANDRATAVICIUS, L.; BALISTA, P.A.; WOLF, D.C.; ABRAO, J.; EVORA, P.R.; RODRIGUES, A.J. *et al.* Effects of nitric oxide-related compounds in the acute ketamine animal model of schizophrenia. *BMC Neuroscience* 2015; 16: 9-18.

KAZEMI, M.; KARIM, R.; MIRHOSSEINI, H.; ABDUL HAMID, A. Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food Chem*. 2016, 1;206:156-66

KEALY, J.; COMMINS, S. The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, Plasticity, and function. *Prog Neurobiol*. 2011, 93(4):522-48.

KUMAR, S.; MAHESHWARI, K.K.; SINGH, V. Central nervous system activity of acute administration of ethanol extract of Punica granatum L. seeds in mice. *Indian J Exp Biol*. 2008; 46(12):811-6.

KUSHCHAYEV, SV.; GIERS, MB.; HOM ENG, D.; MARTIROSYAN, NL.; ESCHBACHER, JM.; MORTAZAVI, MM.; *et al.* Hyaluronic acid scaffold has a neuroprotective effect in hemisection spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine* 2016; 0(0): 1-11.

KWON, B.K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J.N.; BEINER, J.; VACCARO, A.R. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal Cord injury. *Spine Journal*. 2004, V. 4, p. 451- 464.

LABSI, M.; KHELIFI, L.; MEZIOUG, D.; SOUFLI, I.,TOUIL-BOUKOFFA, C. Antihydatic and immunomodulatory effects of Punica granatum peel aqueous extract in a murine model of echinococcosis. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 2016; 9(3): 211-220.

LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 109, 177–206.

LAZARIDIS, C.; ANDREWS, C. M. Traumatic Spinal Cord Injury: Learn From the Brain!. *Critical care medicine*, 2014;42(3), 749-750.

LAZZARO, I.; TRAN, Y.; WIJESURIYA, N.; CRAIG, A. Central correlates of impaired information processing in people with spinal cord injury. *J Clin Neurophysiol*. 2013;30:59-65.

LEARY, S.; UNDERWOOD, W.; ANTHONY, R.; CARTNER, S.; COREY, D.; GRANDIN, T.; *et al.* [Internet]. 2013. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>.

LEE, J.; DUAN, W.; MATTSON, M.P. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*. 2002;82:1367–1375.

LEE, B.H.; LEE, K.H.; KIM, U.J.; YOON, D.H.; SOHN, J.H.; CHOI, S.S.; *et al.* Injury in the spinal Cord may produce cell death in the brain. *Brain Res*, 2004, v. 1020, n. 1-2, p. 37-44.

LEE, C-CHEN.; LIANG, L.G.; WANG, C.C. Anti-inflammatory effects of Punica granatum Linn in vitro and in vivo. *Food Chemistry*. 2010; 118(2):315-322.

LEUTGEB, J.K.; LEUTGEB, S.; MOSER, M.B.; MOSER, E.I. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*. 2007.16;315(5814):961-6.

LEUTGEB, S.; LEUTGEB, J.K. Pattern separation, pattern completion, and new neuronal codes within a continuous CA3 map. *Learn Mem*. 2007.14(11):745-57

LI, G.L.; BRODIN, G.; FAROOQUE, M.; FUNA, K.; HOLTZ, A.; WANG, W.L.; *et al.* Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 1996, v.55, p.280-289.

LI, J.S.; CHAO, Y.S. Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory LI, X.G.; LIN, X.J.; DU, J.H.; XU, S.Z.; LOU, X.F.; Chen, Z. Combination of methylprednisolone and rosiglitazone promotes recovery of neurological function after spinal Cord injury. *Neural Regen Res*. 2016,11(10):1678-1684.

LI, Y., GOU, C., YANG, J.; WEI, J.; XU, J.; CHENG, S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem*. 2006 v. 96, p. 254-260.

- LIM, S. W.; SHIUE, Y. L.; HO, C. H.; YU, S. C.; KAO, P. H.; WANG, J. J.; KUO, J. R. Anxiety and Depression in Patients with Traumatic Spinal Cord Injury: A Nationwide Population-Based Cohort Study. 2017; *PLOS ONE*, 12(1).
- LIU, Q. S.; DENG, R.; LI, S.; LI, X.; LI, K.; GULIBANUMU, K.; LI, X.; LIU, R. Ellagic acid protects against neuron damage in ischemic stroke through regulating the ratio of Bcl-2/Bax expression. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2017;(ja).
- LIU, Q.S.; DENG, R.; LI, S.; LI, X.; LI, K.; KEBAITULI, G.; *et al.* Ellagic acid protects against neuron damage in ischemic stroke through regulating the ratio of Bcl-2/Bax expression. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2017, Vol. 42, No. 8 : pp. 855-860.
- LIU, Y.; KIM,.; HIMES, B.T.; CHOW, S.Y.; SCHALLERT, T.; MURRAY, M.; *et al.* Transplants of fibroblasts genetically modified to Express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J Neurosci*, 1999, 19(11):4370-4387.
- LU, J.; ASHWELL, K.W.S.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury: Role of apoptosis. *Spine*, 2000, 25(14):1859-1866.
- LUCASSEN, P.J.; OOMEN, C.A.; NANINCK, E.F.; FITZSIMONS, C.P.; VAN DAM, A.M.; CZECH, B.; KOROSI, A. Regulation of Adult Neurogenesis and Plasticity by (Early) Stress, Glucocorticoids, and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7:a021303.
- MACHADO. Neuroanatomia funcional. 2ª Ed., São Paulo: Atheneu, 2005.
- MALDONADO-BOUCHARD S, PETERS K, WOLLER SA, MADAHIAN B, FAGHIHI U, PATEL S, BAKE S, HOOK MA. Inflammation is increased with anxiety- and depression-like signs in a rat model of spinal cord injury. *Brain Behav Immun*. 2016;51:176 –195.
- MARQUES, S.A.; ALMEIDA, F.M.; FERNANDES, A.M.; DOS SANTOS SOUZA, C.; CADILHE, D.V.; REHEN, S.K.; *et al.* As células-tronco embrionárias pré-diferenciadas promovem recuperação funcional após lesão compressiva da medula espinhal. *Brain Res*. 2010; 1349 : 115-128.
- MASHHADIZADEH, S.; FARBOOD, Y.; DIANAT, M.; KHODADADI, A.; SARKAKI, A. Therapeutic effects of ellagic acid on memory, hippocampus electrophysiology deficits, and elevated TNF- α level in brain due to experimental traumatic brain injury. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;20(4):399-407.
- MATUTE, C. Calcium dyshomeostasis in White matter pathology. *Cell Calcium*, 2010, 47(2):150-157.
- MAZZOCCA, A.D.; MCCARTHY, M.B.; INTRAVIA, J.; BEITZEL, K.; APOSTOLAKOS, J.; COTE, M.P.; BRADLEY, J.; ARCIERO, R.A. An *in vitro* evaluation of the anti-inflammatory effects of platelet-rich plasma, ketorolac, and, methylprednisolone. *Arthroscopy* 2013; 1(29): 675–683.
- MBORI, N. J. R.; CHUAN, X. Y.; FENG, Q. X.; ALIZADA, M.; ZHAN, J. Evaluation of the Combination of Methylprednisolone and Tranilast after Spinal Cord Injury in Rat Models. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 2016; 59(4), 334-340.

MCDONOUGH, A.; MONTEERRUBIO, J.; ARIZA, V.; MARTINEZ-CERDENO. Calibrated forceps model of spinal cord compression injury. *Journal of Visualized Experiments*. 2015, (98), e52318.

MIDDHA, S.K.; USHA, T.; PANDE, V. A review on antihyperglycemic and antihepatoprotective activity of eco-friendly *punica granatum* peel waste. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013:1-10.

MISHKIN, M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature*. 1978. 273:297–98.

MOREIRA, G.M.B.; MATSUMOTO, L. S.; SILVA, R.M.G.; DOMINGUES, P.F.; MELLO-PEIXOTO, E.C.T.; Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2014; 34(7): 626-632.

MOREIRA, I.S.; ROCHA, R.H.C.; PAIVA, E.P.; SILVA.; SOUSA, F.A. Biometria e componentes físico-químicos de romã armazenada sob refrigerações. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, 2015, 45(2): 209-215.

MORRISSEY, M.D.; TAKEHARA-NISHIUCHI, K. Diversity of mnemonic function within the entorhinal cortex: a meta-analysis of rodent behavioral studies. *Neurobiol Learn Mem*. 2014.115:95-107.

MORZELLE, M.C.; SALGADO, J.M.; TELLES, M.; MOURELLE, D.; BACHIEGA, P.; BUCK, H.S.; VIEL, T.A. Neuroprotective Effects of Pomegranate Peel Extract after Chronic Infusion with Amyloid- β Peptide in Mice. *PLoS One*. 2016, 9(11):e0166123.

MOXON, K. A.; OLIVIERO, A.; AGUILAR, J.; FOFFANI, G. Cortical reorganization after spinal cord injury: always for good? *Neuroscience*. 2014, 283, 78-94.

MURRAY, R. F., ASGHARI, A., EGOROV, D. D., RUTKOWSKI, S. B., SIDDALL, P. J., SODEN, R. J., & RUFF, R. Impact of spinal cord injury on self-perceived pre-and postmorbidity cognitive, emotional and physical functioning. *Spinal Cord* 2007, 45(6), 429-436.

NASCIMENTO, M.F. Desenvolvimento, caracterização e avaliação do potencial cicatrizante de membranas de gelatina contendo extrato aquoso de *Punica granatum* Linn. [Dissertação]. Sergipe: *Universidade Tiradentes*; 2013.

NASIRINEZHAD, F.; GAJAVELLI, S.; PRIDDY, B.; JERGOVA, S.; ZADINA, J.; SAGEN, J. Viral vectors encoding endomorphins and serine histogranin attenuate neuropathic pain symptoms after spinal cord injury in rats. *Molecular pain*, 2015,11(1), 2.

NSCISC. National Spinal Cord Injury Statistical Center, Facts and Figures at a Glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham, 2016.

NSCISC. National Spinal Cord Injury Statistical Center. Spinal Cord Injury (SCI) Facts and Figures at a Glance. *Annual Report Complete Public Version*, 2015.

ODUBANJO, V.O.; IBUKUN, E.O.; OBOH, G.; ADEFEGHA, S.A. Aqueous extracts of two tropical ethnobotanicals (*Tetrapleura tetraptera* and *Quassia undulata*) improved spatial and non-spatial working memories in scopolamine-induced amnesic rats: Influence of neuronal cholinergic and antioxidant systems. *Biomed Pharmacother*. 2018 11;99:198-204.

OGINO, A. *et al.* Pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. *Journal of Neurophatology and Experimental Neurology*. 2005, 64(5): 398-403.

OLAJIDE, O. A.; KUMAR, A.; VELAGAPUDI, R.; OKORJI, U. P.; FIEBICH, B. L. Punicalagin inhibits neuroinflammation in LPS-activated rat primary microglia. *Molecular nutrition & food research*, 2014; 58(9):1843-1851.

OWACHRIF, A., KHALKI, H., CHAIB, S., MOUNTASSIR, M., ABOUFATIMA, R., FAROUK, L.; BENHARRAF, A.; Chait, A. Comparative study of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of two varieties of *Punica granatum*. *Pharmaceutical biology* 2012; 50(4), 429-438.

OYINBO, C. A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011; 71(2): 281–299.

PANTH, N.; MANANDHAR, B.; PAUDEL, K.R. Anticancer activity of *Punica granatum* (pomegranate) A review. *Phytotherapy Research*, 2017, v.31, n.4, p.568-578.

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*. 2011; 8(1):31: 2-14.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic atlas. *London: Academic*, 1986.

PHILLIPS, A. A.; SQUAIR, J. W.; CURRIE, K. D.; TZENG, S.; AINSLIE, P.; KRASSIOUKOV, A. V. 2015 ParaPan American Games: Autonomic function, but not physical activity, is associated with vascular-cognitive impairment in spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 2016; 34(6), 1283-1288.

POPA, C.; POPA, F.; GRIGOREAN, V. T. *et al.* Vascular dysfunctions following spinal cord injury. *Journal of Medicine and Life*. 2010; 3(3): 275-285.

PRAKASHC, V.S.; PRAKASH, I. Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate (*Punica granatum*) Juice, Seed and Peel-A Review. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*. 2011;1(1):1-18.

QNAIS, E. Y.; ELOKDA, A. S.; ABU GHALYUN, Y. Y.; ABDULLA, F. A. (2007). Antidiarrheal Activity of the Aqueous Extract of *Punica granatum*.(Pomegranate) Peels. *Pharmaceutical Biology*. 2007; 45(9), 715-720.

RABCHEVSKY, A. G.; FUGACCIA, I.; SULLIVAN, P. G.; BLADES, D. A.; SCHEFF, S. W.. Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. *Journal of neuroscience research*, 2002;68(1): 7-18.

RAMLAGAN, P.; RONDEAU, P.; PLANESSE, C.; NEERGHEEN-BHUJUN, V. S.; FAWDAR, S.; BOURDON, E.; BAHORUN, T. *Punica granatum* L. mesocarp suppresses advanced glycation end products (AGEs)-and H₂O₂-induced oxidative stress and pro-inflammatory biomarkers. *Journal of Functional Foods*, 2017;29, 115-126.

RASLAN , A.M.; NEMECEK, A.N. Controversies in the Surgical Management of Spinal Cord Injuries. *Neurology Research International*. 2012, 1-6.

RATHOD, N.R.; BISWAS, D.; CHITME, H.R.; RATNA, S.; MUCHANDI, I.S.; CHANDRA, R. Anti-urolithiatic effects of *Punica granatum* in male rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012, 140, p.234-238.

REMPEL-CLOWER, N.; ZOLA-MORGAN, S.M, SQUIRE, L.R; AMARAL, D.G. Three Cases of Enduring Memory Impairment after Bilateral Damage Limited to the Hippocampal Formation. *J Neurosci*. 1996. 16:5233-55.

RIAZ, A.; KHAN, RA. Behavioral effects of Citrus limon and Punica granatum combinations in rats. *Metab Brain Dis*. 2017; 32(1):123-131.

RIAZ, A; KHAN, R.A; ALGAHTANI, H.A. Memory boosting effect of Citrus limon, Pomegranate and their combinations. *Pak J Pharm Sci*. 2014, 27(6):1837-1840.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 2004; 27(5);771-780, 2004.

RODRIGUES, A. M. G.; DOS SANTOS MARCILIO, F.; MUZITANO, M. F.; GIRALDI-GUIMARÃES, A Therapeutic potential of treatment with the flavonoid rutin after cortical focal ischemia in rats. *Brain research* 2013, 1503: 53–61.

ROLLS, E. T. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 2013. 7, 74.

ROMEO, F. V., BALLISTRERI, G., FABRONI, S., PANGALLO, S., NICOSIA, M. G. L. D., SCHENA, L.; RAPISARDA, P. Chemical characterization of different sumac and pomegranate extracts effective against Botrytis cinerea rots. *Molecules* 2015; 20(7): 11941-11958.

ROSAS-BURGOS, E.C.; BURGOS-HERNÁNDEZ, A.; NOGUERA-ARTIAGA L.; KAČÁNIOVÁ, M.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, F.; CÁRDENAS-LÓPEZ, J.L.; CARBONELL-BARRACHINA, Á.A. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. *J Sci Food Agric*. 2017, 97(3):802-810.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. 2010; 121(4): 996-1002.

SALWE, K. J.; SACHDEV, D. O.; BAHURUPI, Y.; KUMARAPPAN, M. Evaluation of antidiabetic, hypolipemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punica granatum* in male Wistar albino rats. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2015;6(1), 56.

SANTOS, F.S.M. DOS. Efeitos do tratamento oral com própolis vermelha e exercício de natação sobre a lesão medular em ratos. [Dissertação]. Sergipe. Universidade Tiradentes. 2013.

SCHARFMAN H, GOODMAN J, MACLEOD A, PHANI S, ANTONELLI C, CROLL S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol*. 2005;192:348–356.

SCHWAB, M.E.; BARTHOLDI, D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal Cord. *Physiol Rev*, 1996, 76,(2): 319-370.

SCOVILLE, W.B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957. 20(1):11-21.

SENDROWSKI, K.; SOBANIEC, W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacological Reports* 2013, 65(3):555-65.

SHABAN, Y. A.; EL SAYED, M. A.; EL MARADNY, A. A.; AL FARAWATI, R. K.; AL ZOBIDI, M. I. Photocatalytic degradation of phenol in natural seawater using visible light active carbon modified (CM)-n-TiO₂ nanoparticles under UV light and natural sunlight illuminations. *Chemosphere* 2013; 91(3): 307-313.

SHAYGANNIA, E.; BAHMANI, M.; ZAMANZAD, B.; RAFIEIAN-KOPAEI. A Review Study on *Punica granatum* L. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 21(3), p. 221-227, 2015.

SHEN, Y.C.; JUAN; C.W.; LIN, C.S.; CHEN, C.C.; CHANG, C.L. Neuroprotective effect of *terminalia chebula* extracts and ellagic acid in pc12 cells. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 2017; 14(4), 22-30.

SHWARTZ, E.; GLAZER, I.; BAR-YAAKOV, I. MATITYAHU, I.; BAR-LLAN, I.; HOLLAND, D.; AMIR, R. Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. *Food Chemistry*. 2009;115(3):965–973.

SIASOS, G.; TOUSOULIS, D.; TSIGKOU, V.; KOKKOU, E.; OIKONOMOU, E., VAVURANAKIS, M.; STEFANADIS, C. Flavonoids in atherosclerosis: an overview of their mechanisms of action. *Current medicinal chemistry*, 2013, 20(21), 2641-2660.

SIERRA, A.; BECCARI, S.; DIAZ-APARICIO, I.; ENCINAS, J.M.; COMEAU, S.; TREMBLAY, M.E. Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural Plast*. 2014; 610343.

SILVA, N.A.; SOUSA, N.; REIS, R.L.; SALGADO, A.J. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal Cord injury. *Prog Neurobiol*, 2014, v. 114, n. p.25-57.

SINGH, R.P.; MURTHY, K.N.C.; JAYAPRAKASHA, G.K. Studies on the antioxidant activity of Pomegranate (*Punica Granatum*, L.) Peel and Seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50(1): 81-86.

SMITH, A.S.; WILLIAMS AVRAM, S.K.; CYMERBLIT-SABBA, A.; SONG, J.; YPUNG, W.S. Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Molecular Psychiatry*. 2016 21(8). 1137-1144.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run. *Journal of Chromatography A*, v. 721, p. 3-14, 1996.

SONAGLIO, D. CNS activities of liquid and spray-dried extracts DEV, S. Ancient-modern concordance in Ayurvedic plants: some examples. In *Development of Plant-Based Medicines: Conservation, Efficacy and Safety*. 1999, 47-67.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T. The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. *Annual Review of Neuroscience*, 2011. 34, 259–288.

- STRUBREITHER, W.; HACKBUSCH, B.; HERMANN-GRUBER, M.; STAHR, G., & JONAS, H. P. Neuropsychological aspects of the rehabilitation of patients with paralysis from a spinal injury who also have a brain injury. *Spinal cord*, 1997; 35(8); 487 - 492.
- SUBASH, S.; BRAIDY, N.; ESSA, M. M.; ZAYANA, A. B.; RAGINI, V.; AL-ADAWI, S.; ALASMI, A.; GUILLEMIN, G. J. Long-term (15 mo) dietary supplementation with pomegranates from Oman attenuates cognitive and behavioral deficits in a transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Nutrition*, 2015; 31(1), 223-229.
- SUBERVIOLA, B.; GONZÁLEZ-CASTRO, A.; LLORCA, J.; ORTIZ-MELÓN, F.; MIÑAMBRES, E. Early complications of high-dose methylprednisolone in acute spinal cord injury patients. *Injury*, 2008; 39(7), 748-752.
- SUN, J.; REN, D.D.; WAN, J.Y.; CHEN, C.; CHEN, D.; YANG, H.; FENG, C.L.; GAO, J. Desensitizing Mitochondrial Permeability Transition by ERK-Cyclophilin D Axis Contributes to the Neuroprotective Effect of Gallic Acid against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in Pharmacology*. 2017; 8; 184.
- TAPIAS, V.; CANNON, J. R.; GREENAMYRE, J. T. Pomegranate juice exacerbates oxidative stress and nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*. 2014; 35(5), 1162-1176.
- 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*. 1991, v. 112, n. 2, p. 15-26.
- TYAGI, S.; SINGH, A.; BHARADWAJ, P.; SAHU, S.; YADAV, A. P; KORI, M. L. Punicalagins- a large polyphenol compounds found in pomegranates: a therapeutic review. *Academic Journal of Plant Sciences*. 2012; 5(2), 45-49.
- VANOYE-ELIGIO, V.; MORA-OLIVO, A.; GAONA-GARCÍA, G.; REYES-ZEPEDA, F.; ROCANDIO-RODRÍGUEZ, M. Mexican fruit fly populations in the semi-arid highlands of the Sierra Madre Oriental in northeastern Mexico. *Neotropical Entomology*, 2017, v. 46, n. p. 1-8.
- VASCONCELOS, A.S.; DE FRANÇA, I.S.X.; COURA, A.S.; ENDERES, B.C.; CARTAXO, H.G.O.; DE SOUSA, F.S. Self care in neurogenic intestine in subjects with spinal cord injury: an integrative review. *Online Brazilian Journal of Nursing*. 2013; 12(4): 998-1010.
- VELAGAPUDI, R.; BACO, G.; KHELA, S.; OKORJI, U.; OLAJIDE, O. Pomegranate inhibits neuroinflammation and amyloidogenesis in IL-1 β -stimulated SK-N-SH cells. *European journal of nutrition* 2016; 55(4): 1653-1660.
- VERMEULEM, K.; BERNEMAN, B.Z.; BOCKSTAELE, D.R. Cell cycle and apoptosis. *Cell proliferation* 2003; 36(3): 165-175.
- VIUDA-MARTOS, M.; FERNANDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2010;9(6):635–54.
- VIVALLE, E.N.; VIVALLE, L.R.; BLEGGI-TORRES, L.F, SAKAMOTO, K.S. Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos. *Revista Brasileira Ortopedia*. 2007;42(4):101-113.

WALSH, R.N.; CUMINS, R.A. Mechanisms mediating the production of environmentally induced brain changes. *Psychological Bulletin* 1975; 82(6): 986-1000.

WANG, Y.; ZHANG, H.; LIANG, H.; YUAN, Q.; Purification antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk. *Food Chem* 2013;1;138(1):437-43.

WHIMBE, A.E.; DENENBERG, V.;H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J Comp Physiol Psychol.* 1967, 63(3):500-4.

WHIMBEY, A.E.; DENEMBERG, V.H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J Comp Physiol Psychol.* 1967,63(3):500-4.

WU, J.; ZHAO, Z.; KUMAR, A.; LIPINSKI, M.M.; LOANE, D.J.; STOICA, B.A.; *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress and Disrupted Neurogenesis in the Brain Are Associated with Cognitive Impairment and Depressive-Like Behavior after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 2016, v. 33 n. (21), p.1919–1935.

WU, J.; STOICA, B.A.; LOU,T.; SABIRZHANOV, B.; ZHAO, Z.; GUANCIALE, K. Isolated spinal cord contusion in rats induces chronic brain neuroinflammation, neurodegeneration, and cognitive impairment. *Cell Cycle.* 2014 a; 13(15): 2446-2458.

WU, J.; ZHAO, Z.; SABIRZHANOV, B.; STOICA, B.A.; KUMAR, A.; LOU, T. *et al.* Spinal Cord Injury Causes Brain Inflammation Associated with Cognitive and Affective Changes: Role of Cell Cycle Pathways. *The Journal of Neuroscience.* 2014 b; 34(33).

XI, J.; HE, L.; YAN, L. G. Continuous extraction of phenolic compounds from pomegranate peel using high voltage electrical discharge. *Food Chemistry*, 2017;230, 354-361.

YAIKAR, L.; BYNA, B.; THAKUR, S.R. Neuroprotective effect of punicalagin against cerebral ischemia reperfusion-induced oxidative brain injury in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2014; 23(10):2869-78.

YAMADA, K.; NODA, Y.; HASEGAWA, T.; KOMORI, Y.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. *et al.* The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276: 460–466.

YANG, J.; LEE, R.; HENNING, S.M.; THAMES, G.; HSU, M.; MANLAM, H.; *et al.* Soy protein isolate does not affect ellagitannin bioavailability and urolithin formation when mixed with pomegranate juice in humans. *Food Chemistry*, Braking, 2016, v. 194, p.1300-303.

YANG, Z.; ZHANG, A.; DUAN, H.; ZHANG, S.; HAO, P.; YE, K.; *et al.* NT3-chitosan elicits robust endogenous neurogenesis to enable functional recovery after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112 (43): 13.354-13.359.

YILMAZ, T.; TURAN, Y.; KELES, A. Pathophysiology of the spinal cord injury. *Journal of Clinical and Experimental Investigations.* 2014; 5(1): 131-136.

YSSAAD; R.: HAMMADI, K. Enhancement of the bark of *Punica granatum* fruit through the phytochemical and antimicrobial activity studies 2017; 6(1): 1-8.

ZAHIN, M.; AQIL, F.; AHMAD, I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of punica granatum L. peelextracts. *Mutat Res.* 2010, 703(2):99-107.

ZEKAVAT, O.; AMANAT, A.; KARAMI, K.; PAYDAR, S.; GRAMIZADEH, B.; ZAREIAN-JAHROMI, M. Wound Healing Studies Using Punica granatum Peel: An Animal Experimental Study. *Advances in skin & wound care*. 2016; 29(5):217-225.

ZHAO, P.; WAXMAN, S.G.; HAINS, B.C. Modulation of thalamic nociceptive processing after spinal cord injury through remote activation of thalamic microglia by cysteine cysteine chemokine ligand 21. *J Neurosci*. 2007;27:8893-8902.

ZHAO, Z.; LOANE, D. J.; MURRAY, M. G.; STOICA, B. A.; FADEN, A. I. Comparing the predictive value of multiple cognitive, affective, and motor tasks after rodent traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 2012; 29(15), 2475-2489.

ZHUANG, H.; DU, J.; WANG, Y. Antioxidant Capacity Changes of 3 Cultivar Chinese Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juices and Corresponding Wines. *Journal of Food Science*. 2011;76(4):C606-11, 2011.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R.; AMARAL, D.G. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci*. 1986. 6:2950–67.

Anexo – Registro do Parecer do CEUA (Comissão de Ética no Uso Animal)



UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do tratamento com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* sobre a neuroinflamação e alterações cognitivas decorrentes de lesão medular em ratos", registrada com o nº 010816, sob a responsabilidade de Margarete Zanardo Gomes, que envolve a utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 28/10/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Vigência da autorização	15/ 11 /2016 a 15/11 /2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de Animais	60
Peso/idade	250 a 300 g / 2 a 3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério da UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT

Maria Júlia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

Aracaju, 28 de outubro de 2016

Maria Júlia Nardelli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA
Universidade Tiradentes - UNIT