

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO NEUROPROTETOR DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO
EXTRATO AQUOSO DA *Tradescantia spathacea* SOBRE A LESÃO
MEDULAR EM ROEDORES**

ANA MARIA GOMES DOS SANTOS

Aracaju
Junho - 2021

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO NEUROPROTETOR DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO
EXTRATO AQUOSO DA *Tradescantia spathacea* SOBRE A LESÃO
MEDULAR EM ROEDORES**

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

ANA MARIA GOMES DOS SANTOS

Professora Dra. Margarete Zanardo Gomes
Orientadora

Aracaju
Junho – 2021

-
- S237e Santos, Ana Maria Gomes dos
Efeito neuroprotetor da administração oral do extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* sobre a lesão medular em roedores / Ana Maria Gomes dos Santos ; orientação [de] Profa. Dra. Margarete Zanardo Gomes. – Aracaju : UNIT, 2021.
- 72 f. ; il.
- Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente na área de concentração em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes.
- Inclui bibliografia.
1. Commelinaceae. 2. Traumatismo da medula espinhal. 3. Astrócitos. I. Gomes, Margarete Zanardo (orient.). II. Universidade Tiradentes. III. Título.

**EFEITO NEUROPROTETOR DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO
AQUOSO DA *Tradescantia spathacea* SOBRE A LESÃO MEDULAR EM
ROEDORES**

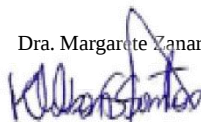
Ana Maria Gomes dos Santos

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

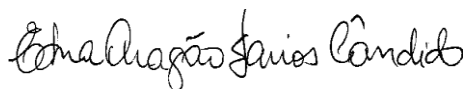
Aprovada por:



Dra. Margarete Zanardo Gomes (Orientadora)



Dr. Klebson Silva Santos (Examinador Externo)



Dra. Edna Aragão Farias Cândido (Examinadora Interna)

Dedico a todos que se dispõem a desafiar-se na pesquisa e perseveram nesse mundo magnífico de conhecimento.

“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência.”

Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

À Deus, que é constantemente a minha força, alegria, proteção, meu ânimo e sustento. Grata por me permitir estar em lugares inimagináveis;

À Nossa Senhora Aparecida, minha mãezinha do céu, aquela que intercede a Deus por minha saúde e minha vida;

Aos meus pais, Alvinete e Gomes, meu alicerce, meu porto seguro;

Às minhas irmãs, Ir. Ruth e Vida, incentivadoras em momentos mais difíceis;

Aos meus tios e tias, em especial a tia Nete sempre tão presente e incrível.

À Ronisson, a quem tenho muito carinho e admiração. Grata pela torcida mesmo de longe;

À Sheilla, que desde a iniciação científica plantou a sementinha da pesquisa em minha vida e esteve sempre por perto partilhando também a sua família;

Aos meus amigos, em especial a Lore e Rei. Juntos formamos um trio inseparável, um trio topa tudo, um trio que deu certo na pesquisa e na vida. Minha eterna gratidão pelo conhecimento e vida compartilhada. Somos 3 peças completamente diferentes, mas que se encaixam perfeitamente. Desde já, SAUDADE!!!

Aos ICs, Carol, Dani, Rafa e Aryel, que foram peças fundamentais para construção deste e de outros trabalhos e àqueles que mostraram que trabalho em grupo é sempre mais divertido;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Margarete Zanardo, por toda possibilidade de aprender, construir e reconstruir desde a iniciação científica;

Ao LMPE, local que foi minha casa por muitos anos e onde tive grandes experiências. Grata à todos que fazem parte dele e que de modo direto ou indireto também deram suporte para construção deste trabalho;

À Júlio que deu todo suporte no biotério, assim como Carlos e Marcos;

As agências de fomento pelo financiamento, em especial, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	x
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
3.1 Estrutura medular	22
3.2 Fisiopatologia da lesão medular espinal (LME)	23
3.3 Indução da lesão medular por hemissecção	26
3.4 Tratamentos para lesão medular	27
3.5 Produtos Naturais e Lesão medular	27
3.6 <i>Tradescantia spathacea</i>	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Local da pesquisa	33
4.2 Material vegetal	33
4.3 Extração	34
4.4 Caracterização dos extratos	34
4.4.1 Determinação do rendimento do EATS	34
4.5 Ensaio <i>in vivo</i>	35
4.5.1 Animais	35
4.5.2 Desenho experimental	35
4.5.3 Procedimento cirúrgico	35
4.5.4 Avaliação comportamental	36
4.5.4.1 Escala de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)	36
4.7 Avaliação histológica (Hematoxilina-Eosina)	37
4.8 Análise imunohistoquímica	38
4.9 Análise de imagens	39
4.10 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	40

5.1 Umidade relativa à amostra da <i>Tradescantia spathacea</i> coletada	40
5.2 Determinação do Rendimento do EATS	40
5.3 Cromatografia líquida de ultra performance acoplado a espectrômetro de massa (UPLC-QTOF- MS^E)	40
5.4 Avaliação comportamental	42
5.5 Análise histológica	42
5.6 Análise para reatividade de astrócitos	46
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	56
8 REFERÊNCIAS	57
CRONOGRAMA	70
ANEXO 1- EXSICATA DA <i>Tradescantia spathacea</i>	71
ANEXO 2- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

5-LO	Lipoxigenase
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
AA	cido Asiático
AQP4	Aquaporina-4
ATP	Adenosina Trifosfato
BBB	Basso Bettie Bresnahan
CAMs	Moléculas de Adesão Celular
CAPE	ster Fenetil do cido Cafeico
CAT	Catalase
CDD	Corno Dorsal Direito
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
CM	Canal Medular
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentao Animal
cPLA ₂	Fosfolipase A ₂
CVD	Corno Ventral Direito
CVD	Corno Ventral Direito
CVE	Corno Ventral Esquerdo
EATS	Extrato Aquoso da <i>Tradescantia spathacea</i>
EGCG	Epigallocatequina-3- galato
GFAP	Proteína Glial Fibrilar cida
HE	Hematoxilina- Eosina
i.p.	Intraperitoneal
IFN γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Oxido Nítrico Sintase Induzida
iROS	Espécies Reativas Intracelulares de Oxignio
ITP	Instituto de Tecnologia e Pesquisa
LAM	Laminectomia
LM	Lesão Medular
LME	Lesão da Medula Espinal

LMPE Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental
LSP Lipossacarídeo
MDA Malondialdeído
miR-21 microRNA 21
NASCIS II National Acute Spinal Cord Injury
NF-KB Fator de Necrose Kappa B
NF-KB Fator Nuclear Kappa B
NO Óxido Nítrico
NUESC Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais
PBS Phosphate Buffered Saline
RA Ácido Rosmarínico
RNS Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS Espécies Reativas de Oxigênio
SB Substância Branca
SC Substância Cinzenta
SNC Sistema Nervoso Central
SOD Superóxido Dismutase
TBS Tris-buffered Saline
TGF- β Fator de Transformação de Crescimento
TH Tirosina Hidroxilase
TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa
UNIT Universidade Tiradentes

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Organização dos grupos experimentais e tratamento proposto	35
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Buscas para investigação do efeito neuroprotetor de produtos naturais em modelos pré-clínicos para estudo da LME.....	29
Tabela 2: Compostos fenólicos encontrados na <i>Tradescantia spathacea</i>	32
Tabela 3: Identificação de compostos fenólicos do extrato etanólico de <i>Tradescantia spathacea</i>	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Corte sagital proporcionando vista das vertebrae e medula espinhal. (B) Corte transversal vista da medula espinhal e descrição das meninges- Pia-máter, Aracnoide-máter e Dura-máter. Arquivo pessoal.....	22
Figura 2: Corte transversal da medula espinhal proporcionando vista da estrutura interna da medula: (1) Corno anterior (2) Corno posterior (3) Comissura cinzenta (4) Funículo anterior (5) Funículo lateral (6) Funículo posterior (7) Comissura anterior (8) Fissura mediana anterior (9) Sulco mediano posterior (10) Canal central. Arquivo pessoal.....	23
Figura 3: Alteração fenotípica dos astrócitos pós lesão medular. Foto adaptada de OKADA <i>et al.</i> , 2018.....	25
Figura 4: Vista da medula espinhal sem a lâmina, com medula espinhal exposta e ilustração da hemisseccção parcial a direita. Arquivo pessoal.....	26
Figura 5: Fotografia da <i>Tradescantia spathacea</i> . Fonte: Arquivo pessoal, 2019.....	31
Figura 6: Fotografias do processo de preparo da amostra: (A) Planta <i>Tradescantia spathacea</i> ; (B) Folhas após higienização; (C) Folhas frescas cortadas num recipiente para secagem; (D) Folhas secas para granulometria; (E) Balança termogravimétrica para avaliação do teor de água (umidade); (F) Peneirador mecânico com peneiras da série Tyler 18-32 mesh; (G) Amostra com 18-32 mesh; (H) Recipiente para armazenamento da amostra.....	33
Figura 7: Protocolo da coloração por hematoxilina-eosina.....	38
Figura 8. Cromatograma UPLC-QTOF-MS ^E do extrato de <i>Tradescantia spathacea</i>	40
Figura 9: Resultados da avaliação funcional (D0= dia 1; D2= dia 2; D3=dia 3, D7= dia 7). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da <i>Tradescantia spathacea</i> na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da <i>Tradescantia spathacea</i> na dose de 100 mg/kg. * indica diferença significativa entre os grupos lesionados e o LAM no primeiro dia após lesão ($p<0,0001$); # indica diferença significativa entre os grupos lesionados e o LAM no terceiro dia pós lesão ($p<0,0001$); & indica diferença significativa entre os grupos lesionados e o LAM no sétimo dia após lesão ($p<0,0001$) (MANOVA com pós-teste de Tukey).....	42
Figura 10: Quantificação de neurônios no corno ventral direito e dorsal direito da medula espinhal. A contagem foi realizada na substância cinzenta em campos referentes ao corno ventral direito e dorsal direito da medula espinhal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência ($\times 400$). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da <i>Tradescantia spathacea</i> na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da <i>Tradescantia spathacea</i> na dose de 100 mg/kg. **** $p<0,0001$ e indica diferença significativa entre o grupo LAM e os grupos lesionados LESÃO, EATS10 e EATS100; ##### $p<0,0001$ indica diferença estatística significativa em relação com grupo Lesão; &&&& $p<0,0001$ indica diferença estatística entre os grupos tratados com EATS (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	43

Figura 11: Quantificação de neurônios no corno dorsal direito da medula espinhal, substância cinzenta, por meio de campo de alta potência ($\times 400$) em microscópio óptico. CDD: corno dorsal direito; LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** indica valor de $p < 0,0001$ e ** indica $p < 0,005$ em relação ao grupo LAM; #### $p < 0,0005$ em relação ao grupo Lesão (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....43

Figura 12: Quantificação de neurônios no corno ventral direito da medula espinal. A contagem foi realizada na substância cinzenta em campos referentes ao corno ventral direito da medula espinal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência ($\times 400$). CVD: corno ventral direito; LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** $p < 0,0001$ e indica diferença significativa entre o grupo LAM e os grupos lesionados: LESÃO, EATS10 e EATS100; #### $p < 0,0001$ e ## $p < 0,05$ indicam diferenças estatísticas significativas em relação com grupo LESÃO; &p $p < 0,0005$ indica diferença estatística entre os grupos tratados com EATS (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....44

Figura 13: Fotomicrografia de secções histológicas coradas em HE de tecido medular mostrando as principais alterações morfológicas observadas sete dias após lesão medular (grupo LESÃO). **(A)** Visão panorâmica indicando as áreas anatômicas do tecido medular denominadas corno dorsal direito e esquerdo (CDD e CDE) e corno ventral direito e esquerdo (CVD e CVE) ($40\times$). **(B)** Detalhe do corno ventral direito, correspondente a área lesada, destacando a substância branca (SB) e cinzenta (SC), assim como o canal medular (CM) ($100\times$). **(C)** Maior magnificação da figura anterior mostrando a presença de grande quantidade de astrócitos (seta espessa negra), oligodendrócitos (seta espessa branca) e células da micróglia (seta delgada) ($400\times$). **(D)** Presença de intensa reação neovascular (círculos) em meio ao tecido medular ($400\times$).....45

Figura 14: Fotomicrografia de secções histológicas coradas em HE de tecido medular mostrando as principais alterações morfológicas observadas sete dias após lesão medular (grupo LESÃO). **(A)** Neurônios do corno ventral direito exibindo alterações vacuolares citoplasmáticas degenerativas e sinais morfológicos de morte ($100\times$). **(B)** Maior detalhe da fotomicrografia anterior mostrando vacuolização moderada (seta espessa negra) ($400\times$) e **(C)** intensa (seta espessa branca) do citoplasma neuronal compatíveis com degeneração hidrópica ($400\times$). **(D)** Neurônios exibindo sinais morfológicos de alteração *post-mortem* como aumento da eosinofilia citoplasmática e contração da cromatina nuclear (círculos) ($400\times$).....45

Figura 15: Fotomicrografia de secções histológicas coradas em HE de tecido medular mostrando as principais alterações morfológicas não degenerativas nucleares consistentes com morte celular em neurônios do corno ventral direito. **(A)** Intensa condensação cromatínica compatível com picnose ($400\times$). **(B)** Dissolução parcial da cromatina (cariólise parcial), com formação de “cromatina residual em colar” ($400\times$). **(C)** Cariólise total, com perda da imagem do núcleo celular por dissolução completa da cromatina ($400\times$). **(D)** Neurônio piramidal viável e saudável exibindo citoplasma dendrítico e núcleo volumoso com cromatina clara e nucléolo proeminentes ($400\times$)...46

Figura 16: Quantificação de astrócitos no CDD e CVD, substância cinzenta, da medula espinal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência (× 400). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; grupo controle; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** $p < 0,0001$ indicam diferença significativa entre os grupos EATS 10 e EATS 100 e o grupo LAM; ##### $p < 0,0001$ indicam diferença estatística entre os grupos tratados (EATS 10 e EATS 100) e o grupo LESÃO (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....47

Figura 17: Quantificação de astrócitos no CDD, substância cinzenta, da medula espinal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência (× 400). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** $p < 0,0001$ indicam diferença significativa entre os grupos EATS 10 e EATS 100 e o grupo LAM; ##### $p < 0,0001$ e ## $p < 0,0019$ indicam diferença estatística entre os grupos tratados (EATS 10 e EATS 100) e o grupo LESÃO (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....47

Figura 18: Quantificação de neurônios no corno ventral direito (CVD) da medula espinal. A contagem foi realizada na substância cinzenta em campos referentes ao corno ventral direito da medula espinal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência (× 400). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** $p < 0,0001$ indicam diferença significativa entre os grupos EATS 10 e EATS 100 e o grupo LAM; ##### $p < 0,0001$ indicam diferença estatística entre os grupos tratados (EATS 10 e EATS 100) e o grupo LESÃO (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....48

Figura 19: Fotomicrografia de secções da imunohistoquímica para GFAP de tecido medular mostrando a reação astrocitária no CDD **(A)** LAM (grupo laminectomia) (400 ×). **(B)** LES (grupo lesão veículo) (400×). **(C)** EATS10 (grupo tratado com extrato a 10 mg/kg) (400×). **(D)** EATS100 (Grupo tratado com extrato a 100 mg/kg) (400 ×).....49

Figura 20: Fotomicrografia de secções da imunohistoquímica para GFAP de tecido medular mostrando a reação astrocitária no CVD. **(A)** LAM (grupo laminectomia) (400 ×). **(B)** LES (grupo lesão veículo) (400×). **(C)** EATS10 (grupo tratado com extrato a 10 mg/kg) (400×). **(D)** EATS100 (Grupo tratado com extrato a 100 mg/kg) (400 ×).....49

RESUMO

A extensão da lesão da medula espinal após injúria está associada a eventos como o estresse oxidativo e ativação da neuroglia. Dessa forma, compostos de origem natural com atividade antioxidante têm sido estudados como potenciais agentes neuroprotetores. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração oral do extrato aquoso das folhas de *Tradescantia spathacea* (EATS) em ratos submetidos a lesão medular por hemiseção. A extração foi realizada pelo método de infusão e o extrato aquoso foi analisado quanto ao seu rendimento e presença de compostos fenólicos pela cromatografia líquida de ultra performance acoplada a um espectrometro de massa (UPLC-QTOF). O ensaio biológico foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da UNIT (030919). Ratas *Wistar* (180-250 g) foram submetidas à cirurgia para realização de laminectomia e/ou hemiseção medular do lado direito. Os animais foram divididos em 4 grupos (n= 7), tratados diariamente por via oral com água destilada (grupos laminectomia e lesão), EATS 10 mg/kg e EATS 100 mg/kg por 7 dias. Foi realizada a avaliação funcional por meio da escala de Basso, Beattie, Bresnahan, nos dias 0 (pré-teste), 1, 3 e 7. A eutanásia foi realizada no 8º dia e as medulas espinais processadas para avaliação das alterações histológicas no tecido e contagem de neurônios remanescentes (cornos dorsais e ventrais da medula espinal separadamente e quantificação total do lado lesionado), utilizando-se a coloração hematoxilina-eosina e avaliação imunohistoquímica da expressão astrocitária, com marcação para proteína fibrilar ácida presente em astrócitos reativos e quantificação dessas células marcadas. Para a análise estatística, todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição gaussiana foram avaliados por análise de variância múltiplas com medidas repetidas (Two-way Anova repeated measures) e os dados não-paramétricos por Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. O rendimento do extrato por infusão foi de 22 %. Quanto à composição química foram identificados ácidos fenólicos, cumarina, flavonoides, iridoide, glicosídeo fenilpropanoide e derivados de ácidos graxos. Na avaliação da função motora não houve diferença significativa entre os grupos até o 7º dia. A análise histológica mostrou que todos os animais lesionados apresentaram diminuição significativa de neurônios do lado lesionado em relação ao grupo laminectomia. Nos grupos lesionados observou-se ainda neurônios com sinais histopatológicos de alterações degenerativas e características morfológicas compatíveis com o estado celular *post-mortem*. O tratamento com EATS 10 e 100 mg/kg promoveu aumento significativo no número médio de neurônios íntegros (corno ventral e total do lado lesionado) em relação ao grupo lesão, sendo o efeito do EATS 10 mg/kg significativamente maior que o do grupo EATS 100 mg/kg. No corno dorsal observou-se maior número de neurônios no grupo tratado com EATS 10 mg/kg em relação ao grupo lesão e também aumento da expressão astrocitária nos grupos EATS 10 mg/kg e 100 mg/kg em relação aos grupos laminectomia e lesão, compatível com o papel reparador de astrócitos nas fases iniciais da lesão medular. Portanto, os resultados mostraram efeito neuroprotetor do EATS.

Palavras-chave: Commelinaceae; Traumatismos da medula espinal; Astrócitos

ABSTRACT

The extent of lesion spinal cord injury after injury is associated with events such as oxidative stress and neuroglia activation. Thus, compounds of natural origin with antioxidant activity have been studied as potential neuroprotective agents the aim of this work was to evaluate the effect of orally administration of aqueous extract of *Tradescantia spathacea* leaves (AETS) in rats submitted to spinal cord injury by hemisection. and the aqueous extract was analyzed for its yield and presence of phenolic compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometer (UPLC-QTOF the biological assay was approved by the UNIT Ethics Committee on Animal Use (protocol number 030919). Adult female Wistar rats (180-250 g) underwent surgery for perform laminectomy and / or right medullary hemisection the animals were divided into 4 groups (n = 7), treated daily orally (gavage) with distilled water (laminectomy and injury groups), AETS 10 mg / kg and EATS 100 mg / kg for 7 days. Functional assessment was performed using the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale, on days 0 (pre-test), 1, 3 and 7. Euthanasia was performed on the 8th day and the spinal cords were processed to evaluate the histological changes in the tissue and count of remaining neurons (dorsal and ventral horns of the spinal cord separately and total quantification of the injured side), using hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical evaluation of astrocyte expression, with labeling for acid fibrillar protein (GFAP), present in reactive astrocytes and quantification of labeled cells. For statistical analysis, it used the Shapiro-Wilk to test the normality of data. The data with Gaussian distribution were evaluated by multiple repeated measures analysis variance (Two-way Anova) and Kruskal-Wallis test non-parametric data with Dunn's post-test. The differences were considered significant P values < 0.05. Regarding the chemical composition, five phenolic acids, one coumarin, two flavonoids, an iridoid, a phenylpropanoid glycoside, and six fatty acid derivatives were identified. In the assessment of motor function, there was no significant difference between groups until 7th day. Histological analysis showed all injured animals showed significant decrease in neurons on the injured side in relation to the laminectomy group (LAM). In the injured groups, neurons with histopathological signs of degenerative changes (cytoplasmic vacuolization) and morphological characteristics compatible with post-mortem cell status (cytoplasmic eosinophilia and chromatin contraction and condensation). Treatment AETS 10 and 100 mg / kg promoted a significant increase in the average number of healthy neurons (ventral and total horn of injured side) n relation to the lesion group, the effect of AETS 10 mg / kg being significantly greater that of AETS 100 mg/kg group. In the dorsal horn, higher density of neurons was observed in the group treated with AETS 10 mg / kg compared to the lesion group. Increase in astrocyte expression was observed in the AETS 10 mg / kg and 100 mg / kg groups in relation to the laminectomy and lesion groups, compatible with repairing role of astrocytes in the early stages of spinal cord injury. Therefore, the results showed a neuroprotective effect of AETS.

Keywords: Commelinaceae; Spinal cord trauma; Astrocytes

1 INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinal (LME), por contusão ou transecção, está associada a traumas por quedas e acidentes de trânsito e pode comprometer completa ou incompletamente as funções motoras, sensoriais e autonômicas de indivíduos em idade produtiva, gerando impacto econômico para sociedade (AHMED *et al.*, 2018; ALBAYAR *et al.*, 2019).

Os eventos subjacentes à fisiopatologia da LME são divididos em duas fases (HILTON *et al.*, 2017). A fase primária é caracterizada pelo dano mecânico inicial com lesão compressiva (VÁZQUEZ *et al.*, 2017) e contusão da medula espinal, e compreende eventos como hemorragia e morte celular (RATH; BALAIN, 2017). O dano secundário refere-se à progressão da lesão inicial e seus mecanismos incluem processos de excitotoxicidade mediada por glutamato, estresse oxidativo, inflamação e degeneração axonal, os quais levam à morte de neurônios e também das células de suporte, astrócitos e oligodendrócitos (VÁZQUEZ *et al.*, 2017; ALIZADEH *et al.*, 2019).

A inflamação é mediada inicialmente pela ativação da micróglia, que libera citocinas pró-inflamatórias (FAN *et al.*, 2020). Em consequência da alteração da homeostase, há o excesso da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (SIMPSON; OLIVER, 2020). Alguns fatores estão associados ao aumento de ROS após o dano medular, como a disfunção mitocondrial, ação de neutrófilos e macrófagos (JIA *et al.*, 2012).

Com o rompimento da barreira hemato-espinal (CHIO *et al.*, 2019) pós trauma medular, os astrócitos são ativados, proliferam (SHULTZ *et al.*, 2017; PICOLI *et al.*, 2019) e rapidamente circundam o local lesionado. Na fase aguda e subaguda, podem ser capazes de liberar citocinas anti-inflamatórias e limitar a expansão da área lesionada (PEKKNY *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2019). Os astrócitos reativos produzem quantidades elevadas de moléculas na matriz extracelular (OKADA *et al.*, 2018), são identificados pela hipertrofia, alta expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e compõem a cicatriz glial promovendo o bloqueio para o crescimento axonal, na fase crônica da lesão (AHMED *et al.*, 2018).

Estudos têm sido realizados para identificar intervenções protetoras nas reações secundárias após LM, a fim de proteger a célula neuronal e orientar a regeneração axonal (MCDONOUGH *et al.*, 2015; AYDIM *et al.*, 2016; OLAKOWSKA *et al.*, 2017). O tratamento atual conta com a cirurgia para descompressão medular, programas de reabilitação funcional multidisciplinar e o uso do medicamento anti-inflamatório metilprednisolona frequentemente utilizado para o tratamento da LM na fase aguda. Porém o uso deste fármaco é controverso devido à eficácia relativa para dirimir o dano

neurológico e aos efeitos colaterais associados, como hemorragias gastrointestinais e propensão à infecção por diminuição da resposta imune (MBORI *et al.*, 2016; PINCHI *et al.*, 2019).

Diante dessa necessidade, plantas medicinais têm sido amplamente estudadas devido ações antioxidante e anti-inflamatória (GEORGE *et al.*, 2017) que se associam à riqueza de compostos bioativos presentes em seus extratos (DUQUE *et al.*, 2017) e que poderiam atuar na redução de eventos secundários à LME (VÁZQUEZ *et al.*, 2017).

A *Tradescantia spathacea* T. *spathacea* Sw. (Commelinaceae) ou *Rhoeo discolor*, conhecida como Abacaxi-roxo, Moisés-no-berço ou Espada de Iansã, é popularmente utilizada como produto medicinal em forma de chá e apresenta potente ação antioxidante (TAN *et al.*, 2015). Estudo anterior evidenciou o efeito neuroprotetor do extrato aquoso obtido das folhas de *T.spathacea* com tratamento de 30 dias em modelo pré-clínico da doença de Parkinson que resultou na modulação na expressão de GFAP e proteção neuronal (LOPES, 2019). Além disso, compostos como a quercetina, rutina, kampferol, epigallocatequina, ácidos vanílico, p-cumarico e ferulico e antocianinas foram constatados em análises cromatográficas após a decocção das folhas de da *T. spathacea* (TAN *et al.*, 2014, 2015; García-Varela *et al.*, 2016; Sánchez-Roque *et al.*, 2017) e tais compostos mostraram efeito neuroprotetor (FAN *et al.*, 2019; GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016; SAKAMULA; THONG-ASA, 2018; SÁNCHEZ-ROQUE *et al.*, 2017; ZHANG, 2017; LI *et al.*, 2017).

Considerando ainda que as folhas da *T.spathacea* são facilmente encontradas na América do Sul (TAN *et al.*, 2015) e que o EATS apresenta em sua composição química alto teor de compostos fenólicos e flavonoides com ação antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora, hipotetiza-se que este produto possa ser uma nova abordagem em modelo pré-clínico de lesão medular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração oral do extrato aquoso das folhas de *Tradescantia spathacea* em ratos submetidos a lesão medular por hemissecção.

2.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar o extrato aquoso da *Tradescantia spathacea*;
- Avaliar as modificações *in vivo*, em função dos tratamentos (EATS, água) após lesão medular ou laminectomia, sobre:
 - A recuperação funcional sensoriomotora;
 - Aspectos histomorfológicos no tecido medular dos animais estudados;
 - A extensão da perda neuronal;
 - A reatividade de astrócitos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Estrutura medular

A medula espinal juntamente com o encéfalo formam o Sistema Nervoso Central (SNC) que controla todas as funções do corpo (GRIJALVO *et al.*, 2019). Tem como função a condução de impulsos nervosos para os centros superiores no encéfalo e o processamento de informações sensoriais (reflexos espinais) sem ação do encéfalo. Está localizada no interior do canal medular da coluna vertebral e é revestida por três membranas do tecido conjuntivo chamadas de meninges com o objetivo de proteger a medula espinal: dura-máter, formada por tecido conjuntivo fibroso é a membrana mais externa, espessa e resistente; aracnoide, meninge média localizada abaixo da dura-máter onde está intimamente aderida, tem a forma de trabéculas irregulares ou “teia de aranha”; e a pia-máter, altamente vascularizada e aderida a medula (Figura 1 B) (JUNQUEIRA, 2005; LAROSA, 2018).

Entre as meninges existem espaços ocupados por líquido cerebrospinal. Entre a dura-máter e aracnoide-máter situa-se o espaço subdural ocupado por líquido de pequeno volume e entre a aracnoide e pia-máter, no espaço subaracnoide, o líquido cerebrospinal. A medula espinal se estende desde o forame magno até a primeira ou segunda vértebra lombar e em sua extensão caudal se encontra a cauda equina (SPENCER, 1991)(Figura 1 A).

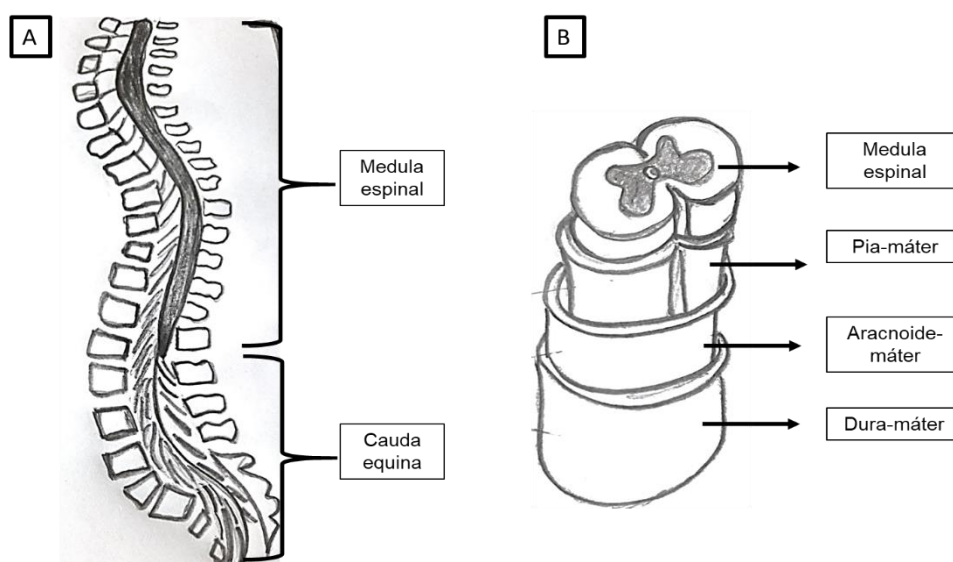


Figura 1: (A) Corte sagital proporcionando vista das vertebrae e medula espinal. (B) Corte transversal vista da medula espinal e descrição das meninges- Pia-máter, Aracnoide-máter e Dura-máter. Arquivo pessoal.

Num corte transversal, observa-se que a medula é formada, internamente, por duas regiões distintas, a substância branca e substância cinzenta (Figura 2). A primeira, localizada externamente, estrutura que é dividida em comissura anterior, fissura mediana anterior, sulco mediano posterior, funículos ventral onde há troca de informação motora, funículo lateral de informação autossômica e funículo dorsal de informação sensorial, formada por fibras mielinizadas e não-mielinizadas, transmitem impulsos nervosos tanto internamente quanto da medula para o cérebro; a segunda, na parte interna, uma estrutura em forma de H, possui comissura cinzenta local onde encontra-se o canal central ou canal epidemário, com células em forma cilíndrica de uma única camada de células endoteliais; corno anterior (ventral) e posterior (dorsal) estruturas formadas por corpos de neurônios motor (processa informação motora) e de neurônios sensitivos (processa informação sensorial), respectivamente, além de, células da glia e vasos sanguíneos (LAROSA, 2018; SPENCER, 1991).

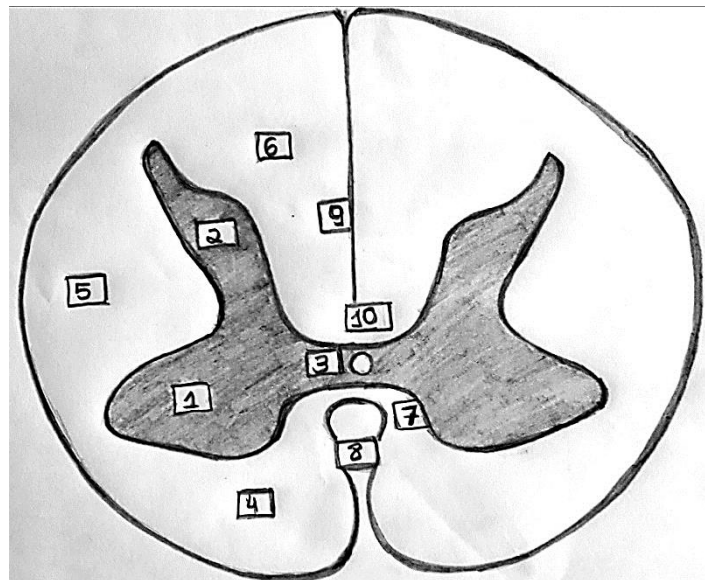


Figura 2: Corte transversal da medula espinhal proporcionando vista da estrutura interna da medula: (1) Corno anterior (2) Corno posterior (3) Comissura cinzenta (4) Funículo anterior (5) Funículo lateral (6) Funículo posterior (7) Comissura anterior (8) Fissura mediana anterior (9) Sulco mediano posterior (10) Canal central. Arquivo pessoal.

3.2 Fisiopatologia da lesão medular espinal (LME)

A LME está associada a uma variedade de eventos traumáticos que podem resultar em fratura dos corpos das vértebras com consequente compressão da medula espinhal, capaz de ocasionar diferentes graus de disfunção neurológica com grande potencial de comprometimento dos sistemas motor, sensorial e autonômico (HUTSON; DI GIOVANNI, 2019).

Como consequência e com a progressão do dano mecânico inicial, ocorrem alterações secundárias: ruptura de axônios e morte celular, isquemia, edema acompanhado de infiltração de neutrófilos e de macrófagos tipo I no sítio da lesão, além da ativação e proliferação de astrócitos e microglia (FISCHER *et al.*, 2020).

A micróglia, célula imune do SNC, está diretamente ligada a resposta inflamatória imediata após lesão medular. Nessa circunstância a micróglia dá o suporte na mediação da neuroinflamação com liberação das citocinas pró-inflamatória, como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), essas citocinas podem estimular a expressão uma das outras, fator que promove o aumento dos seus níveis, condição que pode ocasionar a morte neuronal (FAN *et al.*, 2020). Ainda, durante a neuroinflamação o receptor P2X7 é estimulado e regula a expressão de citocinas e mediadores de inflamação, como NF-KB (fator de necrose tumoral KB) que participam da mediação da neuroinflamação e resulta também na morte de células neuronais (WAN *et al.*, 2020).

No dano secundário: a degeneração Walleriana acontece quando o axônio e bainha de mielina se desconectam do corpo celular (FISCHER *et al.*, 2020) com consequente acometimento da circulação de impulsos nervosos; em condições fisiopatológicas o estresse oxidativo ocorre devido o excesso de radicais livres e insuficiência da defesa antioxidante (MOHD SAIRAZI, SIRAJUDEEN, 2020). As espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) reagem com ácidos graxos, nucleicos e proteínas e ocasionam danos oxidativos (VISAVADIYA *et al.*, 2013). Outros fatores como a disfunção mitocondrial, ação de neutrófilos e macrófagos podem acarretar em aumento de ROS e resultar em morte neuronal (JIA *et al.*, 2012); e a excitotoxicidade corresponde ao estímulo exagerado de glutamato, o neurotransmissor excitatório importante do SNC, os quais levam à morte de neurônios (ALIZADEH *et al.*, 2019; VÁZQUEZ *et al.*, 2017).

Os astrócitos são células gliais com importante função no SNC. Em condições normais atuam como sustentação, contribuem na composição iônica e molecular extracelular dos neurônios com a manutenção da estabilidade do SNC, da barreira hematoencefálica e barreira espinal; regula o metabolismo do neurotransmissor glutamato e da gliose (PEKNY; NILSSON, 2005); contribuem para desintoxicação de radicais livres e para prevenção da excitotoxicidade com a regulação da liberação do glutamato (CHEN *et al.*, 2019). E em atividade da célula neuronal capturam e redistribui potássio, produzem lactato e liberam Adenosina Trifosfato (ATP), além da capacidade de armazenar o glicogênio que pode substituir o ATP e estão envolvidos na regulação das sinapses excitatórias e inibitórias (SUTHERLAND *et al.*, 2020).

Na lesão medular (LM), uma situação de desregulação da fisiologia com início de um processo inflamatório, os astrócitos são ativados e sofrem alteração fenotípica como a hipertrofia celular necessária para conter a lesão aguda, ajudar no processo de cicatrização e remodelar o tecido (ADAMS; GALLO, 2018; PICOLI *et al.*, 2019).

Rapidamente, os astrócitos “recém-nascidos” depois de sofrerem alteração da sua característica inicial e apresentarem aumento na expressão de filamentos intermediários, caracterizados pela proteína fibrilar ácida da glia (GFAP), passam a ser astrócitos reativos e expressam a N-Cadeirina, moléculas de adesão, em torno da área lesionada (BRADBURY; BURNSIDE, 2019), e se transformam em astrócitos formadores de cicatriz (na fase crônica da lesão) os quais aderem uns aos outros e formam a cicatriz glial densa, meio celular complexo que impede a regeneração axonal (Figura 3) (CHEN *et al.*, 2016; OKADA *et al.*, 2018).

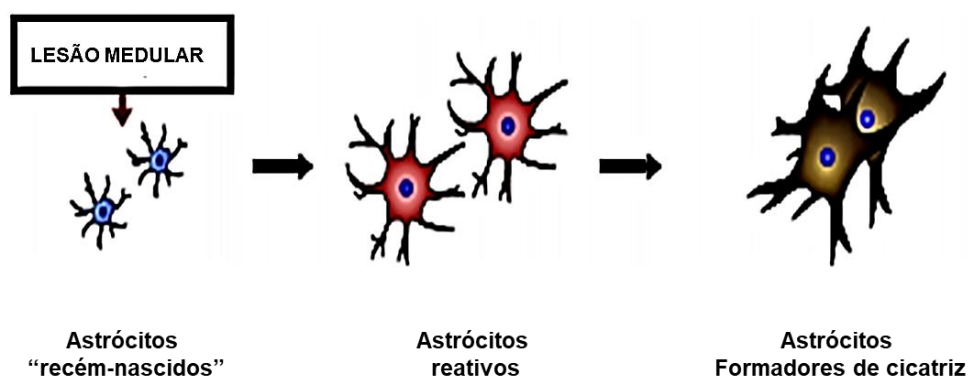


Figura 3: Alteração fenotípica dos astrócitos pós lesão medular. Foto adaptada de OKADA *et al.*, 2018.

Os astrócitos podem apresentar-se de forma prejudicial ou benéfica e a sua reatividade é o que determinará essa condição. Existem pelo menos dois estágios de ativação diferente de astrócitos reativos, A1 e A2, com base no fenótipo. O tipo reativo A1 está associado a processos neuroinflamatórios e pode interferir na função sináptica e diminuir a capacidade de sobrevivência neuronal pelo aumento da neurotoxicidade. O tipo A2, considerado neuroprotetor, relaciona-se ao reparo das sinapses, capacidade de fagocitose e sobrevivência dos neurônios (LIDDELOW, BARRES, 2017; SU *et al.*, 2019).

Os astrócitos A1, são encontrados em lesões agudas e são ativados pela micróglia, na neuroinflamação, por meio da liberação de TNF- α e IL-1 α que facilita a transformação para o fenótipo ora descrito. A transformação de Astrócitos A1 em astrócitos A2, ainda na fase aguda, pode criar um ambiente favorável para proteção dos neurônios e remodelação das sinapses. Contudo, ainda não se conhece o mecanismo de

transformação dos astrocitos em tipo A2, porém sua presença está ligada ao gene miR-21 (microRNA 21) em lesão medular isquêmica aguda (SU *et al.*, 2019).

3.3 Indução da lesão medular por hemissecção

O modelo animal de indução para lesão da medula espinal está diretamente ligado aos objetivos a serem alcançados no estudo. O modelo de lesão por hemissecção é observado, eventualmente, após lesão por lâmina e apresenta vantagem para o estudo *in vivo*. Em geral, este procedimento é simples, realizado a partir de cirurgia e pode envolver a região lateral de qualquer nível medular a depender da finalidade do estudo (WILSON *et al.*, 2020), em exemplo, a lesão no nível torácico corresponde a perda da função motora e sensorial dos membros posteriores em ratos, e pode ser feita com instrumentos tesoura e/ou bisturi.

A hemissecção parcial (Figura 4) refere-se ao rompimento do tecido medular de um dos lados, uma desconexão entre neurônios aferentes (neurônios sensitivos) e eferentes (neurônios motores) (ANDERSON *et al.*, 2005). A lesão parcial facilita a comparação no mesmo animal entre áreas lesionadas e não lesionadas e por isso é indicada quando se necessita investigar degeneração, regeneração axonal (WILSON *et al.*, 2020) e a ação de um tratamento frente a neuroplasticidade (LIN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

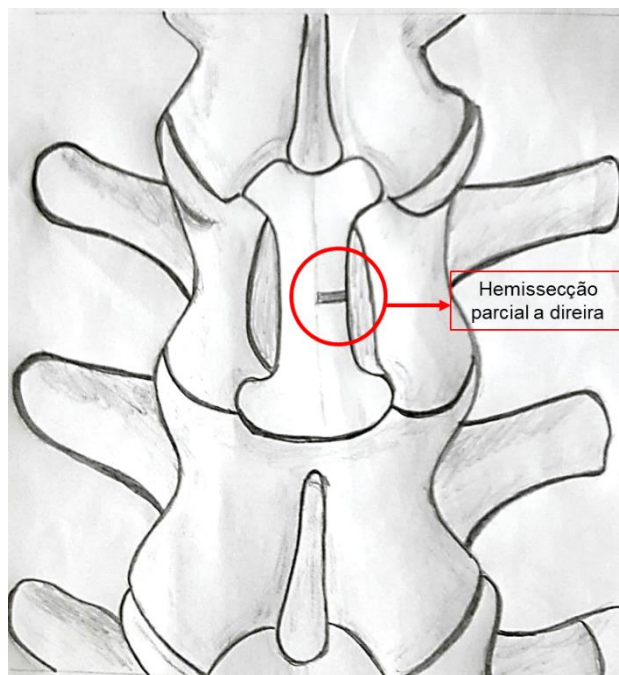


Figura 4: Vista da medula espinal sem a lâmina, com medula espinal exposta e ilustração da hemissecção parcial a direita. Arquivo pessoal.

3.4 Tratamentos para lesão medular

No tratamento clínico, o uso do suscinato de sódio de metilprednisolona (MP), medida farmacológica atualmente utilizada, tem sido discutido e apresenta resultados controversos quanto a sua eficácia. Nos anos 80, observou potencial neuroprotetor do MP quando administrado dentro de 8h após trauma medular (Lesão aguda), e teve evidência moderada de melhoras na função motora (FEHLINGS *et al.*, 2017; PINCHI *et al.*, 2019), porém o mecanismo que explica como o medicamento afeta a neuroproteção ainda permanece incompreendido, assim como, sua utilidade clínica.

No protocolo sugerido pela *National Acute Spinal Cord Injury* (NASCIS II), o MP é um corticosteroide indicado para o tratamento pós lesão medular por estar associada a diminuição da cascata inflamatória que favorece o aumento da lesão secundária (EVANIEW *et al.*, 2016). No entanto, altas doses desse medicamento, em busca da neuroproteção, aumenta a incidência de infecções respiratórias, do trato urinário, hemorragias gastrintestinais e sepse (HUANG *et al.*, 2020).

A cirurgia para descompressão da medula espinal numa lesão completa ou parcial, para restauração do fluxo sanguíneo, objetiva diminuir os danos bioquímicos que iniciam a partir da interrupção do fluxo sanguíneo. A intervenção cirúrgica precoce para remoção da compressão medular potencializa melhoras neurológicas e diminui a incidência de eventos adversos (WILSON *et al.*, 2020).

Como continuidade do procedimento cirúrgico são realizados programas de reabilitação multidisciplinar com início precoce, uma vez que a lesão medular acarreta em consequência físicas, sociais e psicológicas. Intervenções fisioterapêuticas com atividades focadas na função neuromuscular e respiratória auxiliarão na diminuição das limitações ocasionadas pela lesão medular e prevenirão a evolução tanto da lesão medular quanto de outras complicações associadas a ela. Além do apoio psicológico que visa acompanhar o indivíduo na adaptação e consciência frente a deficiência (MARIBO *et al.*, 2020).

3.5 Produtos Naturais e Lesão medular

O uso de plantas medicinais é milenar e fundamentado, com informações passadas por gerações. Ao longo dos anos, produtos de origem vegetal foram base para combater doenças (HU *et al.*, 2020) devido a eficiência no tratamento, baixo custo e facilidade de obtenção. Porém, mesmo com o uso constante do produto natural o seu consumo deve

ser consciente e cauteloso devido ao potencial risco de danos à saúde e, para segurança, necessita de evidências científicas que comprovem a sua qualidade, eficácia e eficiência (EKAR; KREFT, 2019).

O produto de origem natural têm efeitos terapêuticos que se associam à riqueza de compostos bioativos encontrados em seus extratos (DUQUE; BRAVO; OSORIO, 2017; TALEB *et al.*, 2018) ligados as ações antioxidante e anti-inflamatória (GEORGE *et al.*, 2017) que poderiam atuar na redução de eventos secundários à LME (VÁZQUEZ *et al.*, 2017). No grupo de antioxidantes têm os compostos fenólicos que incluem ácidos fenólicos, polifenóis e flavonoides que protegem plantas, frutas e vegetais de danos oxidativos (BENTO-SILVA *et al.*, 2020). Por essa razão são relevantes na elaboração de antioxidantes naturais (DO *et al.*, 2014).

Atualmente, a comunidade científica busca meios naturais que possam diminuir a cascata de alterações secundárias determinante para morte celular neuronal pós lesão medular visto que não existe tratamento curativo para essa condição. Tem sido mais presente o estudo com produtos naturais com foco em seus compostos químicos que atuam como elemento terapêutico pós LM. Devido as características antioxidante e anti-inflamatória, muitos compostos atuam na redução das espécies reativas de oxigênio e inflamação que são desenvolvidos pós trauma na medula espinal (COYOY-SALGADO *et al.*, 2019). Na tabela 1 estão descritos alguns produtos naturais, principais constituintes e efeito (neuroprotetor) pós LME.

Tabela 1: Buscas para investigação do efeito neuroprotetor de produtos naturais em modelos pré-clínicos para estudo da LME.

Produto Natural	Principais constituintes	Efeitos em modelos SCI	Referências
<i>Centella asiática</i>	Ácido asiático (AA)	Elevação do escore de BBB, diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias; redução do estresse oxidativo	(JIANG <i>et al.</i> , 2016)
<i>Angelicae sinensis</i>	Lingustilide	Inibição da ativação microglial, elevação do escore de BBB, reduz nível de iROS.	(ZHU <i>et al.</i> , 2014); (XIAO <i>et al.</i> , 2015)
<i>Camellia sinensis</i> (chá verde)	Epigallocatequina-3-galato (EGCG)	Redução da peroxidação lipídica, apoptose; atenuação da produção de citocinas pró-inflamatórias; promoção da recuperação motora	(KHALATBARY; AHMADVAND, 2011); (BOADAS-VAELLO; VERDÚ, 2015)
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolide B	Inibição da expressão de iNOS, da morte por apoptose, da degeneração secundária pela ativação de fosfolipase A ₂ (cPLA ₂); Redução da resposta inflamatória; proteção de neurônios e oligodendrócitos.	(AO <i>et al.</i> , 2006); (ZHAO <i>et al.</i> , 2011); (GUO <i>et al.</i> , 2020)
<i>Curcuma longa</i> (cúrcuma)	Curcumina	Aumento do escore BBB; apoptose reduzida; diminuição da expressão GFAP.	(LIN <i>et al.</i> , 2011)
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenosídeos	Aumento da função motora e de neurônio sobreviventes; atenuação do estresse oxidativo e da ativação microglial.	(CONG; CHEN, 2016); (KIM <i>et al.</i> , 2017); (WANG <i>et al.</i> , 2020)
Família <i>Lamiaceae</i> (alecrim, sálvia, erva-cidreira e tomilho)	Ácido rosmarínico (RA)	Melhora na função motora; Redução do estresse oxidativo; atenuação de citocinas pro-inflamatórias	(SHANG <i>et al.</i> , 2017)

BBB = Basso, Bettie, Bresnahan; iROS = espécies reativas intracelulares de oxigênio iNOS = óxido nítrico-sintase induzida cPLA₂ = fosfolipase A₂ GFAP = Proteína fibrilar ácida glial.

A planta medicinal é fonte abundante de substâncias ativas que pode ser base para a produção de medicamentos ou matriz para síntese de fármacos novos (KAZIEV *et al.*, 2021). A mistura dessas substâncias com efeito semelhante pode aumentar a biodisponibilidade de substâncias ativas, produzindo efeitos adicionais, quando usados simultaneamente. A palavra sinergia (do grego “*synergos*”) significa trabalhar em conjunto (FLEMING; LUO, 2021).

O composto curcumina, proveniente da *Curcuma longa*, conhecido como anti-inflamatório, tem sido estudado em modelo experimental de LM com objetivo de diminuir a ativação microglial e apoptose da célula neuronal. Epigallocatequina galato (EGCG), também em estudo de LM, apresenta efeito neuroprotetor atuando na inflamação mediante a diminuição nos níveis de TNF- α e IL-1. No tratamento de LM por compressão, as respostas pós lesão medular no tratamento associado desses dois compostos foram semelhante ao grupo tratado com apenas com um composto, curcumina (RUZICKA *et al.*, 2018). No entanto, mais estudos necessitam ser realizados para comprovação do efeito sinérgico dos compostos ativos em LM.

Em modelo experimental de câncer, a junção desses compostos potencializou o efeito do EGCG (inibidor da proliferação de células PC3), cujo efeito foi a regulação positiva sinérgica com a interrupção do crescimento de células cancerígenas prostáticas (EOM *et al.*, 2015). Em ensaio *in vitro* com células MGC-803 (célula câncer gástrico humano), o tratamento combinado com curcumina e quercetina foi mais forte do que o do tratamento individual desses compostos (ZHANG *et al.*, 2015).

3.6 *Tradescantia spathacea*

A planta herbácea *Tradescantia spathacea* ou *Rhoeo spathacea* (sw), pertencente à família Commelinaceae é conhecida popularmente como Manguey morado, Abacaxi-roxo, Moisés-no-berço ou Espada de Iansã (figura 5), foi reconhecida para consumo na forma de chá no continente americano para tratamentos diversos: afecções das vias aéreas, cicatrização de feridas e como anti-inflamatório (ROSALES-REYES *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2015).



Figura 5: Fotografia da Tradescantia spathacea. Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Na América do Sul, é utilizada também como bebida em função das suas atividades antibacteriana (MYRIAM *et al.*, 2011; ROSALES-REYES *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2015) e antioxidante, essa última evidenciada através de análises da quantificação de fenólicos totais, teor de flavonoides totais e avaliação de radicais livres (DPPH) (GONZÁLEZ-AVILA *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2015).

Estudos mostraram que o extrato aquoso obtido das folhas da *T. spathacea*, extrato polar, evidenciaram algumas propriedades terapêuticas como ação antioxidante e anti-inflamatória, além de atividade antibacteriana, antimutagênica (MYRIAM *et al.*, 2011), antineoplásica (ROSALES-REYES *et al.*, 2007), antigenotóxica (GONZÁLEZ-AVILA *et al.*, 2003) e inibidora de receptores associados ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (VO *et al.*, 2015) e neuroprotetora em modelo experimental de Doença de Parkinson (LOPES, 2019).

Em análise cromatográfica, alguns compostos como a rutina, epigallocatequina, antocianinas, taninos, alcaloides, terpenoides, esteróis, saponinas e glicosídeos foram identificados na amostra que passou pelo processo de decocção das folhas de *Rhoeo discolor* (TAN *et al.*, 2014). A rutina está associada a ação antioxidante e neuroprotetora (MACHAWAL; KUMAR, 2014; NA *et al.*, 2014; QU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015) contra isquemia (QU *et al.*, 2014) e apoptose (NA *et al.*, 2014). A epigallocatequina, por sua vez, teve ação neuroprotetora em lesão medular ao promover a recuperação funcional, a proteção contra excitotoxicidade e edema e o aumento da síntese de fatores de crescimento (RENNO *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2013). A roeonina é uma antocianina, classe das substâncias que tem ação protetora frente à lesão medular por diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (KIM *et al.*, 2011). Na tabela 2 estão descritos

flavonoides como kaempferol, quercetina, epigallocatequina, rutina, rheonina e antocianina pigmento nº 2 e compostos fenólicos (ácido gálico, ácido ferúlico, ácido vanílico e ácido clorogênico) e suas atividades biológicas.

Tabela 2: Compostos fenólicos encontrados na *Tradescantia spathacea*

Compostos	Classe fenólica	Ação biológica	Referência
Kaempferol	Flavonóide	Atividade antioxidante	(DEVI <i>et al.</i> , 2015; SÁNCHEZ-ROQUE <i>et al.</i> , 2017)
Quercetina	Flavonoide	Anti-inflamatório e antioxidante; Melhora na recuperação motora; diminuição da atividade antioxidante pela diminuição da mieloperoxidase	(FAN <i>et al.</i> , 2019; SÁNCHEZ-ROQUE <i>et al.</i> , 2017; CHÜLTKE; GRIEBEL; JUURLINK, 2010)
Epigallocatequina	Flavonoide	Efeito neuroprotetor; melhora na função motora; maior preservação de neurônios; diminuição de astrócitos imunorreativos GFAP	(RENNO <i>et al.</i> , 2014; SÁNCHEZ-ROQUE <i>et al.</i> , 2017)
Rutina	Flavonoide	Efeito antiinflamatório Redução significativa nos níveis de espécies reativas de oxigênio; melhora da recuperação motora	(SÁNCHEZ-ROQUE <i>et al.</i> , 2017; TAN <i>et al.</i> , 2015) (WU <i>et al.</i> , 2016)
Rheonina	Flavonoide	Antioxidante; reduz da concentração de superóxido e do volume da lesão	(GARCÍA-VARELA <i>et al.</i> , 2016; TAN <i>et al.</i> , 2015); (KIM <i>et al.</i> , 2011)
Antocianina	Flavonoide	Diminuição da concentração de superóxido e do volume da lesão; melhoras dos níveis de BBB;	(GARCÍA-VARELA <i>et al.</i> , 2016; KIM <i>et al.</i> , 2011)
Ácido gálico	Ácido fenólico	antioxidante e anti-inflamatório; Diminuição do estresse oxidativo; diminuição da lesão	(SÁNCHEZ-ROQUE <i>et al.</i> , 2017)
Ácido ferulico	Ácido fenólico	Diminuição da morte por apoptose	(GARCÍA-VARELA <i>et al.</i> , 2016; ZHANG, 2017)
Ácido Vanílico	Ácido fenólico	Aumento do escore de BBB Aumento da expressão de fator de crescimento endotelial vascular	(GARCÍA-VARELA <i>et al.</i> , 2016; LI <i>et al.</i> , 2017)
Ácido clorogênico	Ácido fenólico	Mellhora do escore BBB; Redução dos níveis de TNF- α , IL-1B, IL-6; Diminuição da lesão por meio da atividade anti-inflamatória.	(CHEN <i>et al.</i> , 2018; GARCÍA-VARELA <i>et al.</i> , 2016)
Ácido p-cumárico	Ácido fenólico	Antioxidante, anti-apoptótico e neuroprotetor (aumento da SOD e catalase)	(GUVEN <i>et al.</i> , 2015; SAKAMULA; THONG-ASA, 2018)

GFAP = Proteína fibrilar ácida glial; BBB = Basso, Bettie, Bresnahan; TNF- α = Fator de necrose tumoral; IL-1B= Interleucina-1B; IL-6=Interleucina-6.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental (LMPE) e no Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais (NUESC), ambos no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), e no biotério da Universidade Tiradentes (UNIT).

4.2 Material vegetal

As folhas da *Tradescantia spathacea* foram coletadas na Universidade Tiradentes (UNIT), localização geográfica 10°58'00.5"S 37°03'40.1"W, na cidade de Aracaju, estado de Sergipe. O espécime vegetal foi identificado no “Herbário Tiradentes – AJU” e a exsicata depositada sob o protocolo AJU Nº 0845 (ANEXO1). As folhas frescas foram pesadas, lavadas com água destilada e cortadas em tamanhos menores, acomodadas em recipientes e levadas à estufa para secagem a 45°C. Após a secagem, o material foi triturado e avaliado o teor de água (umidade) a partir da análise termogravimétrica, onde uma pequena amostra foi colocada no leitor (balança termogravimétrica). As folhas foram armazenadas em temperatura ambiente e protegidas de luz para posterior extração (Figura 6).

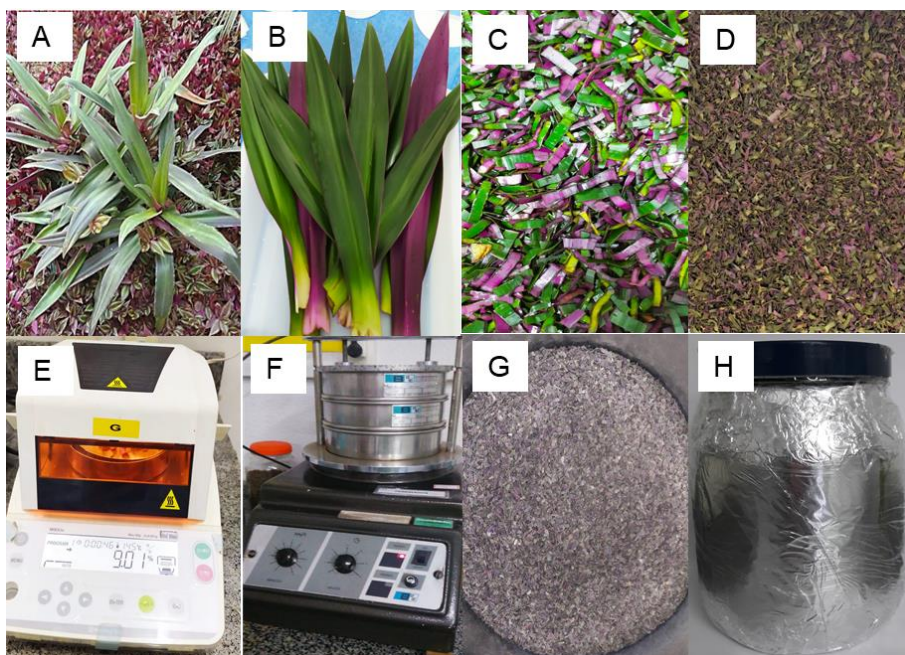


Figura 6: Fotografias do processo de preparo da amostra: (A) Planta *Tradescantia spathacea*; (B) Folhas após higienização; (C) Folhas frescas cortadas num recipiente para secagem; (D) Folhas secas para granulometria; (E) Balança termogravimétrica para avaliação do teor de água

(umidade); (F) Peneirador mecânico com peneiras da série Tyler 18-32 mesh; (G) Amostra com 18-32 mesh; (H) Recipiente para armazenamento da amostra.

4.3 Extração

O extrato aquoso da *T. spathacea* (EATS) foi obtido por infusão, conforme protocolo definido por García-varela *et al.*, (2016) e Tan *et al.*, (2015). Para o procedimento de infusão utilizou a proporção 1:50, 1 g de folha seca para 50 mL de água. A água fervente (100°C) foi adicionada à amostra e, em seguida, a preparação foi mantida em repouso e sob incubação durante 15 min, isenta de aquecimento constante. Posteriormente, utilizou-se um filtro de papel microporoso para obtenção do filtrado, o qual foi mantido em estufa a 45°C em placas de petri para obtenção do extrato seco.

4.4 Caracterização dos extratos

4.4.1 Determinação do rendimento do EATS

O rendimento da extração foi obtido em percentual (%) por meio da equação (1), conforme Machado *et al.*, (2017).

(1)

$$\%R = \left(\frac{Mes}{Mag} \right) \times 100$$

Onde %R = Porcentagem de rendimento; Mes = Massa de extrato seco (g); Mag = Massa da amostra granulada (g).

4.4.2 Cromatografia líquida de ultra performance acoplado a um espectrômetro de massa (UPLC-QTOF)

As análises foram realizadas em um sistema Acquity UPLC (Water, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa Xevo QTOF (Q-TOF, Water). As separações foram realizadas em uma coluna C18 (Waters Acquity® UPLC C18; 150 mm × 2,1 mm, 1,7 µm). Para a impressão digital metabólica, uma alíquota de 2 µL do extrato foi submetida à análise UPLC usando um gradiente exploratório com uma fase móvel compreendendo água deionizada (A) e acetonitrila (B), ambos contendo ácido fórmico (0,1% v/v). O extrato foi submetido ao gradiente exploratório da seguinte maneira: 2% –95% por 15 min, a uma taxa de fluxo de 500 µL min⁻¹. A ionização foi realizada com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) no modo de íons negativos, na faixa de 110–1200 Da. Os parâmetros instrumentais otimizados foram os seguintes: tensão capilar de –2800 V,

tensão do cone de -40 V, temperatura da fonte de 120 °C, temperatura de dessolvatação de 330 °C, fluxo do gás do cone de 20 L h⁻¹, fluxo do gás de dessolvatação em 600 L h⁻¹ e voltagem do detector de placa de microcanais (MCP) de -1900 V. modo de aquisição foi MS^E, e o sistema foi controlado usando o software MassLynx 4.1 (Waters Corporation).

4.5 Ensaio *in vivo*

4.5.1 Animais

O projeto foi realizado de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi autorizado pela Comissão de ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes (CEUA-UNIT) sob parecer número 030919 (Anexo 2).

Foram utilizados 28 animais da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), adultos, com pesos entre 180-250 g, idade de 2-3 meses, acomodados em trios nas gaiolas de polipropileno com cama de maravalha. Ambiente com controle de temperatura, ciclo claro-escuro 12h e acesso livre a comida e água.

4.5.2 Desenho experimental

Os animais (28) foram divididos em 4 grupos (n=7). Os grupos experimentais foram submetidos à laminectomia (LAM) e hemissecção da medula espinal (Lesão) em nível torácico e foram tratados com veículo (água destilada) ou extrato aquoso da *T. spathacea* (EATS) nas dosagens de 10 e 100 mg/kg por gavagem (via oral) diariamente durante 7 dias. A organização dos grupos pode ser observada no quadro 1 e as doses foram escolhidas com base no estudo de LOPES, 2019 (Quadro 1).

GRUPO (n=7)	CIRURGIA	TRATAMENTO VIA ORAL (7 dias)
LAM	Laminectomia (T10)	Água destilada
LESÃO	Hemissecção (T10)	Água destilada
EATS-10	Hemissecção (T10)	EATS 10 mg/kg
EATS-100	Hemissecção (T10)	EATS 100 mg/kg

Quadro 1: Organização dos grupos experimentais e tratamento proposto.

4.5.3 Procedimento cirúrgico

Os ratos foram pesados e posteriormente anestesiados com uma mistura de 0,05 mL de cloridrato cetamina 10% (na dose de 80 mg/kg) + 0,05 mL de cloridrato xilazina 2% (na dose de 10 mg/kg) para cada 100 g de massa corporal, administradas por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, foi realizada a tricotomia e assepsia da região dorsal torácica e uma incisão nesta mesma região para expor as vértebras torácicas e assim realizar os procedimentos de laminectomia onde é retirada da apófise espinhosa e a lâmina da décima vértebra torácica - T10 - para expor o tecido medular, e/ou hemisseção que corresponde a retirada da apófise espinhosa e lâmina da vértebra T10 para expor o tecido medular e posteriormente seccionada do lado direito a partir do sulco mediano dorsal (KIM *et al.*, 2011; HE; NAN, 2016; WANG *et al.*, 2017).

Após realização da sutura, foi aplicado o pentabiótico (0,2 mL/kg) intramuscular para animais de pequeno porte. O animal foi exposto à luz 60 W, na gaiola, para evitar a hipotermia, durante a recuperação pós-anestésica. Os ratos foram recolocados em suas respectivas gaiolas e tiveram livre acesso a água e comida e foi feito o monitoramento das condições intestinais e urinárias. Os roedores receberam massagens abdominais 3 vezes ao dia até a restauração das condições autonômicas de micção e defecação (ZHANG *et al.* 2015, WANG *et al.*, 2017, LIU *et al.*, 2019).

4.5.4 Avaliação comportamental

4.5.4.1 Escala de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)

A avaliação da função motora, na locomoção, foi realizada a partir da escala de classificação padronizada por Basso, Beattie e Bresnahan, para verificar a recuperação motora e a eficácia do tratamento pós lesão da medula espinal (NARDONE *et al.*, 2017). A escala BBB, varia de 0 a 21 escores, onde 0 significa que não é identificado nenhum movimento observável e 21 recuperação total dos movimentos. Na realização do teste os animais se locomoveram livremente durante um período de 4 min. As categorias de movimentos observadas foram as seguintes: movimento de articulação, coordenação dos membros (posteriores), abertura dos dedos, suporte do peso, estabilidade do tronco, posicionamento da pata e cauda (BASSO *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2018).

Os escores tiveram as seguintes categorias e parâmetros: inicial (escore de 0-7) = ausência de movimento, movimento discreto ou amplo de uma, duas ou três articulações; intermediária (escore de 8-13) = Colocação da pata, passada, coordenação entre os membros anteriores e posteriores organizados na escala conforme o ganho da função motora; tardia (escore de 14-21) = Afastamento dos dedos,

posição predominante da pata, estabilidade do tronco e posição da cauda (BASSO *et al.*, 1996).

Os roedores se locomoveram livremente durante um tempo já estabelecido numa caixa de tamanho padronizado cujas paredes foram transparentes para melhor visualização. Foram avaliados, a partir de imagem de vídeos, no dia 0 (pré-teste) para verificar a ausência de alteração motora, bem como nos dias 1, 3 e 7 após os procedimentos cirúrgicos

4.6 Eutanásia e preparo histológico

Os animais foram eutanasiados no 8º dia com a sobredosagem de anestésico (300 mg/kg de cloridato de cetamina e 30 mg/kg de cloridato de xilazina, por via intraperitoneal), conforme a Resolução normativa nº 37 do CONCEA (2018). Em seguida, a área lesionada na medula foi cuidadosamente identificada e cortada em um comprimento de 2 cm (1 cm rostral e 1 cm caudal ao local da lesão) (FAN *et al.*, 2016), ficou submersa na formalina a 10% durante 7 dias. No processamento histológico, o material passou por uma série crescente de álcoois afim de desidratar o material, em xilóis para diafanizar e, por último, parafinas que foram mantidas a uma temperatura acima de 55°C e abaixo de 60°C seguido de formação dos blocos.

Posteriormente, os blocos foram cortados no micrótomo MR2014 (O patologista, Brasil) a uma espessura de 5 µm e obtidas cinco séries de sete lâminas contendo o epicentro da lesão e as porções rostral e caudal da medula espinal totalizando 35 lâminas por bloco, e cada lâmina com 5 cortes teciduais organizados do lado esquerdo e direito. Os cortes foram depositados em banho histológico que depois de um tempo foram pescados em lâminas gelatinizadas e postas para secar a uma temperatura de 37°C.

4.7 Avaliação histológica (Hematoxilina-Eosina)

A avaliação das alterações histológicas foi feita a partir da coloração hematoxilina-Eosina (HE) seguindo metodologia de coloração de PUEBLA-OSORIO *et al.*, 2017 (Figura 7). Os cortes histológicos foram desparafinizados em uma série de xilóis, desidratados em uma série decrescente alcoólica, reidratados em água para posterior fixação da hematoxilina, submersos em eosina; imersos em série alcóolica crescente para remoção do excesso de corante e submetidos a uma série de xilóis e , por fim, as lâminas foram montadas com bálsamo e lamínula para proteção do tecido.

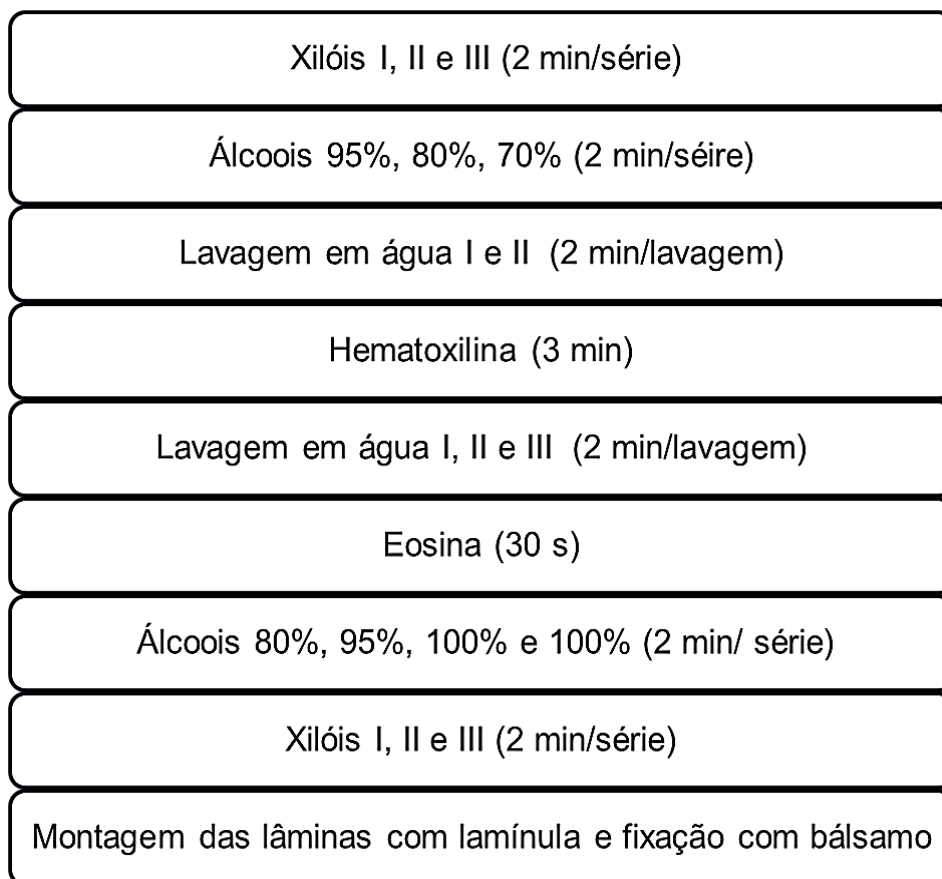


Figura 7: Protocolo da coloração por hematoxilina-eosina.

4.8 Análise imunohistoquímica

Foi avaliada a expressão de astrócitos reativos, por meio da marcação para proteína fibrilar ácida presente em astrócitos (GFAP).

As lâminas com cortes de medula passaram pela desparafinização em xilóis, desidratação em álcoois e lavadas com tampão fosfato (phosphate buffered saline (PBS) 0,1 M, pH 7,4). No forno micro-ondas a um tempo e temperatura pré-determinado deu início a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0). Posteriormente foi feito o bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂- 1% em PBS) e incubação com soro albumina-bovina 5% (Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Co., St Louis, USA), seguida da incubação com anticorpo primário GFAP (produzido em camundongos, clone S206A-8, 1:100, lote SAB5201104; Sigma Aldrich Chemical Company, St Louis MO, USA) (overnight). Subsequentemente, foi posto o anticorpo secundário (DAKO LSAB2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA), conjugado com complexo streptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA), conforme instruções do fabricante. Para revelação, as secções foram incubadas com o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (kit DAB, Vector Laboratories) diluído em tampão tris salino (Tris-buffered saline) (TBS) pH 7,4) com H₂O₂ (0,3%) e lavadas em PBS. Novamente foi feita a desidratação do material,

diafinização para na sequência montar as lâminas com lamínulas e bálsamo (SIBA *et al.*, 2017).

4.9 Análise de imagens

A análise quantitativa para lâminas de HE foi feita a partir da contagem dos neurônios (lâminas das seções V) usando o programa image J, do National Institute Of Health Image (W. Rasband, domínio público National Institute of Mental Health), com dados armazenados em planilhas no excel. As imagens foram obtidas através do microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera de vídeo Olympus. As áreas avaliadas foram cornos ventrais e cornos dorsais direito (área lesionada) da medula espinhal em campo de 400 ×, para quantificação das células neuronais íntegras, com nucléolo evidente e sem sinais de degeneração (KIM *et al.*, 2011). A análise qualitativa, por sua vez, foi baseada na evidência e frequência de neurônios com alterações histopatológicas degenerativas (vacuolização citoplasmática) e características morfológicas compatíveis com estado celular *post-mortem* (eosinofilia citoplasmática; picnose e cariólise nucleares); hiperemia do tecido; integridade e características das células da glia e das células neuronais. Para GFAP, foi utilizado a contagem de células do *software* image J para contabilizar os astrócitos nas mesmas áreas pré-determinadas. Os valores obtidos dos cornos direito e esquerdo também foram somados para verificação do total obtido no lado lesionado.

4.10 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição gaussiana foram avaliados por análise de variâncias múltiplas com medidas repetidas (*Two-way ANOVA repeated measures*: comportamento), com pós teste de Tukey. Os dados não paramétricos (histologia) foram analisados por Kruskal-Wallis com pós - teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Foi utilizado o software Graph Pad Prism versão 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 Umidade relativa à amostra da *Tradescantia spathacea* coletada

O teor de umidade do espécime vegetal em estudo (folhas secas de *T.spathacea*) foi de $11 \pm 0,4\%$.

5.2 Determinação do Rendimento do EATS

Após a análise em triplicata, foi obtido uma média de rendimento global equivalente a $21,98 \pm 0,25\%$ da extração aquosa das folhas secas de *T. spathacea*.

5.3 Cromatografia liquida de ultra performace acoplado a espectrômetro de massa (UPLC-QTOF- MS^E)

A figura 8 mostra o cromatograma típico dos padrões internos, compostos detectados no EATS e os tempos de retenção obtidos e a tabela descreve os compostos fenólicos encontrados no EATS.

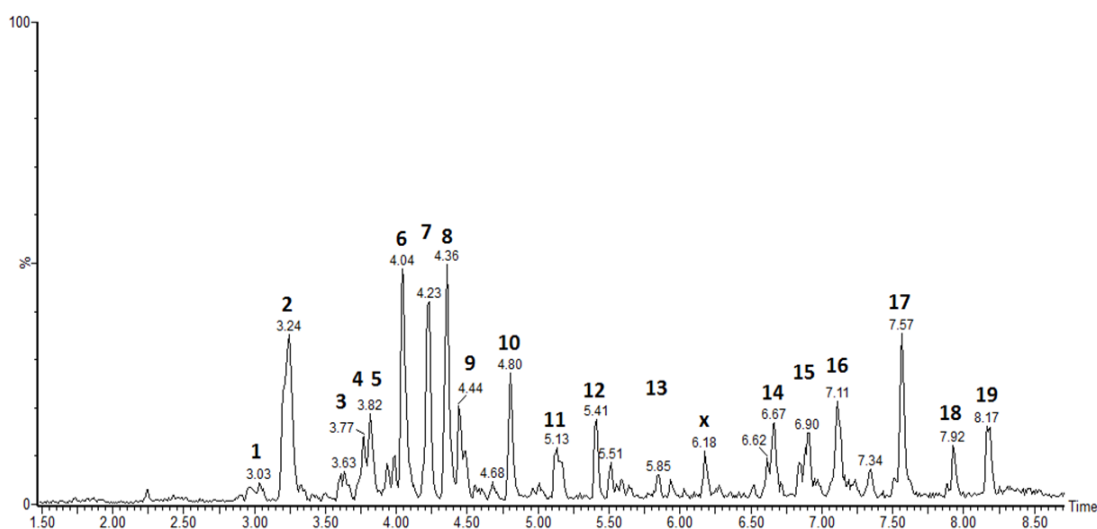


Figura 8. Cromatograma UPLC-QTOF-MS^E do extrato de *Tradescantia spathacea*

Tabela 3: Identificação de compostos fenólicos do extrato etanólico de Tradescantia spathacea.

Pico no.	Rt min	[M-H] ⁻ Observado	[M-H] ⁻ Calculado	Íons de produto (MS/MS)	Empírico Fórmula	Ppm (erro)	Compostos	Referências
1	2.98	181.0495	181.0501	161.0390, 135.0489	C ₉ H ₉ O ₄	-3.3	Ácido Verátrico ¹	Jia <i>et al.</i> , 2020
2	3.24	207.0295	207.0295	179.0376, 163.0399	C ₁₀ H ₇ O ₅	1.0	Fraxetina	Saleem <i>et al.</i> , 2019
3	3.63	593.1505	593.1506	473.1264, 353.0658	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-0.2	Vicenina 2 ¹	Dehkordl <i>et al.</i> , 2020
4	3.77	311.0769	311.0767	193.0460, 178.0218, 149.0456, 134.0351	C ₁₄ H ₁₅ O ₈	0.6	Ácido Ferúlico ¹	Wang <i>et al.</i> , 2017
5	3.82	179.0345	179.0344	135.0477	C ₉ H ₇ O ₄	0.6	Ácido Cafeico ^{1*}	Campos <i>et al.</i> , 2020
6	4.04	351.1291	351.1291	249.0609	C ₁₄ H ₂₃ O ₁₀	0.0	Desconhecido	-
7	4.23	371.0977	371.0978	249.0576, 121.0303, 113.0255	C ₁₆ H ₁₉ O ₁₀	-0.3	desacetil asperuloside ¹	Ouchemoukh <i>et al.</i> , 2014
8	4.35	163.0391	163.0395	119.0493	C ₉ H ₇ O ₃	-2.5	Ácido <i>p</i> -coumárico ^{*1}	Amaya-Cruz <i>et al.</i> , 2018
9	4.44	385.1144	385.1135	207.1059, 113.0237	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀	2.3	Ácido sinápico-O-hexosídeo	Lorenzo <i>et al.</i> , 2018
10	4.80	693.2028	693.2031	271.0932	C ₃₂ H ₃₇ O ₁₇	-0.4	Heloniosídeo A	Zou <i>et al.</i> , 2017
11	5.13	691.2618	691.2602	335.1241	C ₃₄ H ₄₃ O ₁₅	2.3	Desconhecido	-
12	5.41	271.0964	271.0970	-	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	-2.2	Vestitol	Yerlikaya <i>et al.</i> , 2019
13	5.84	675.2654	675.2653	-	C ₃₄ H ₄₃ O ₁₄	0.1	Desconhecido	-
14	6.67	375.2758	375.2747	-	C ₂₀ H ₃₉ O ₆	-2.4	Derivado de ácido graxo	-
15	6.90	373.2583	373.2590	-	C ₂₀ H ₃₇ O ₆	-1.9	Fatty acid derivative ¹	-
16	7.11	327.2161	327.2171	229.1406, 211.1334	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	-3.1	Pinellic acid isomer ¹	Barragán-Zaratea <i>et al.</i> , 2020
17	7.34	371.2420	371.2434	-	C ₂₀ H ₃₅ O ₆	-3.8	Fatty acid derivative ¹	-
18	7.56	329.2317	329.2328	229.1441, 211.1323	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	-3.3	Pinellic acid isomer ¹	Barragán-Zaratea <i>et al.</i> , 2020
19	7.94	359.2785	359.2797	-	C ₂₀ H ₃₉ O ₅	-3.3	Fatty acid derivative ¹	-

5.4 Avaliação comportamental

Na avaliação da função motora a partir da escala BBB, os grupos lesionados apresentaram diminuição significativa dessa função motora em relação ao grupo LAM ($p<0,0001$). Em contrapartida, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos lesionados, (Figura 9).

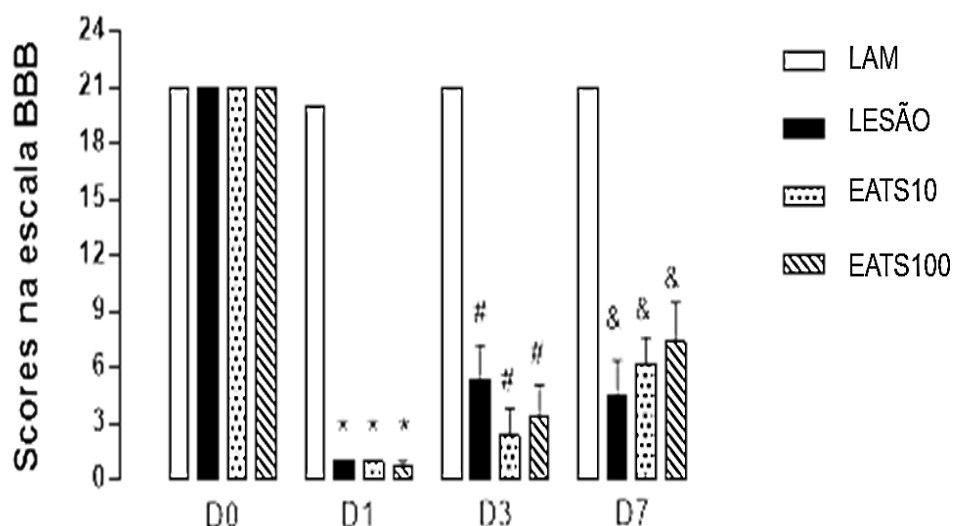


Figura 9: Resultados da avaliação funcional (D0= dia 1; D2= dia 2; D3= dia 3, D7= dia 7). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. * indica diferença significativa entre os grupos lesionados e o LAM no primeiro dia após lesão ($p<0,0001$); # indica diferença significativa entre os grupos lesionados e o LAM no terceiro dia pós lesão ($p<0,0001$); & indica diferença significativa entre os grupos lesionados e o LAM no sétimo dia após lesão ($p<0,0001$) (MANOVA com pós-teste de Tukey).

5.5 Análise histológica

Na quantificação de células neuronais totais (Figura 10), observou-se diferença estatística significativa no número total de neurônios do lado homolateral à lesão entre os grupos LESÃO, EATS10 e EATS100 em relação ao grupo controle (LAM) ($p<0,0001$); além disso, foi observado maior número de neurônios totais nos animais tratados com EATS em relação àqueles tratados com LESÃO ($p<0,0001$), sendo maior a média de neurônios íntegros dos animais no grupo EATS10 em relação ao grupo EATS100 ($p<0,0001$).

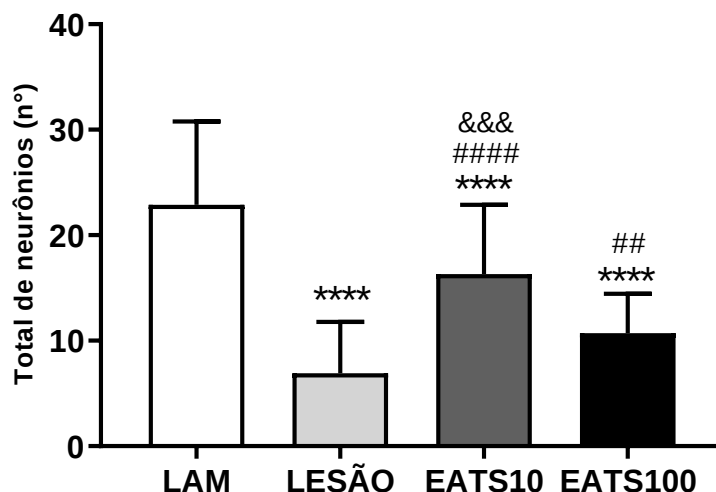


Figura 10: Quantificação de neurônios no corno ventral direito e dorsal direito da medula espinal. A contagem foi realizada na substância cinzenta em campos referentes ao corno ventral direito e dorsal direito da medula espinal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência ($\times 400$). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** $p < 0,0001$ e indica diferença significativa entre o grupo LAM e os grupos lesionados LESÃO, EATS10 e EATS100; ##### $p < 0,0001$ indica diferença estatística significativa em relação com grupo Lesão; &&& $p < 0,0001$ indica diferença estatística entre os grupos tratados com EATS (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Na avaliação histológica do corno dorsal direito (CDD), foi observada uma diminuição significativa de células neuronais dos animais submetidos a hemissecção do lado direito da medula espinal nos grupos Lesão ($p < 0,0001$), EATS10 ($p < 0,005$) e EATS100 ($p < 0,0001$) em relação ao grupo LAM. O CDD dos animais tratados com EATS10 mostrou maior número de neurônios comparado com o grupo Lesão ($P < 0,0001$) (Figura 11).

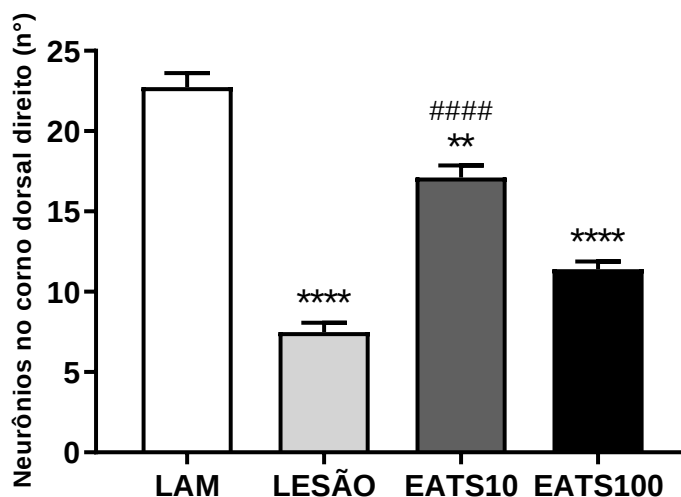


Figura 11: Quantificação de neurônios no corno dorsal direito da medula espinhal, substância cinzenta, por meio de campo de alta potência ($\times 400$) em microscópio óptico. CDD: corno dorsal direito; LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** indica valor de $p < 0,0001$ e ** indica $p < 0,005$ em relação ao grupo LAM; #### $p < 0,0005$ em relação ao grupo Lesão (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Referente a área do corno ventral direito, foi observada diminuição significativa no número de neurônios no corno ventral direito entre os grupos lesionados e o grupo controle (LAM) ($p < 0,0001$). Houve diferença significativa entre o grupo Lesão e os grupos tratados com EATS nas doses de 10 mg/ Kg ($p < 0,0001$) e 100 mg/ Kg ($p < 0,05$). Entre os grupos tratados com EATS, o grupo EATS10 apresentou maior número de neurônios no corno ventral direito ($p < 0,0005$) (Figura 12).

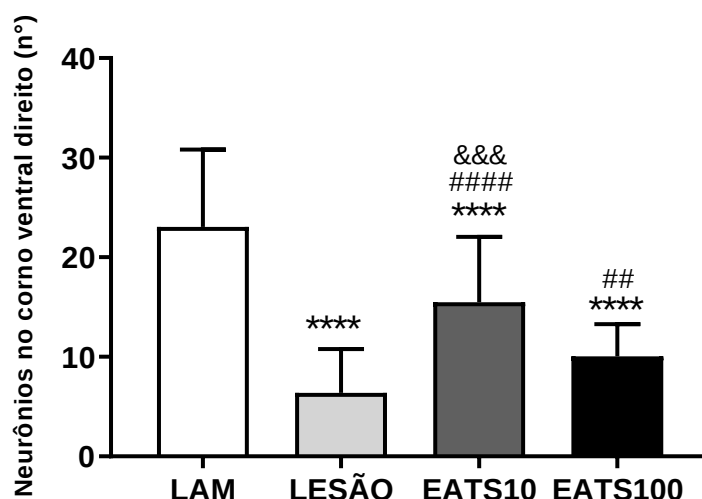


Figura 12: Quantificação de neurônios no corno ventral direito da medula espinhal. A contagem foi realizada na substância cinzenta em campos referentes ao corno ventral direito da medula espinhal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência ($\times 400$). CVD: corno ventral direito; LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** $p < 0,0001$ e indica diferença significativa entre o grupo LAM e os grupos lesionados: LESÃO, EATS10 e EATS100; #### $p < 0,0001$ e ## $p < 0,05$ indicam diferenças estatísticas significativas em relação com grupo LESÃO; && $p < 0,0005$ indica diferença estatística entre os grupos tratados com EATS (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

No presente estudo foi utilizada a coloração HE para avaliação das alterações histológicas da lesão de medula espinhal no sétimo dia. Nas alterações morfológicas promovidas pela hemissecção medular foram observadas células mononucleares da

micróglia, moderada quantidade de vasos capilares neoformados exibindo dilatação e congestão (hiperemia) (Figura 13).

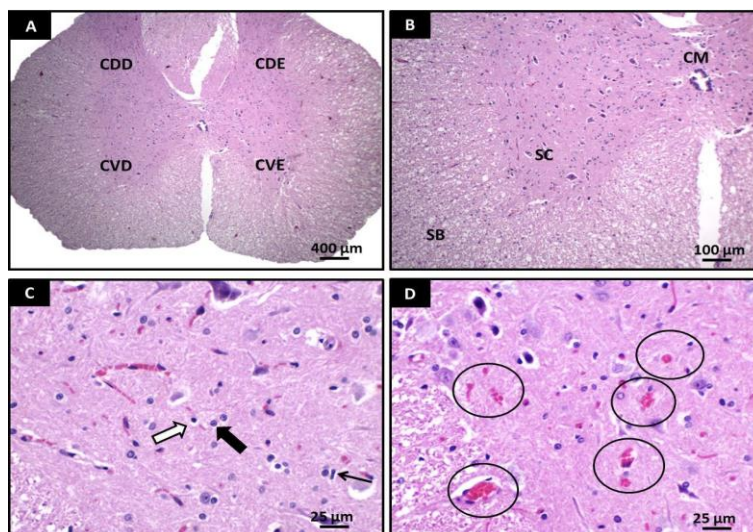


Figura 13: Fotomicrografia de secções histológicas coradas em HE de tecido medular mostrando as principais alterações morfológicas observadas sete dias após lesão medular (grupo LESÃO). **(A)** Visão panorâmica indicando as áreas anatômicas do tecido medular denominadas corno dorsal direito e esquerdo (CDD e CDE) e corno ventral direito e esquerdo (CVD e CVE) (40 ×). **(B)** Detalhe do corno ventral direito, correspondente a área lesada, destacando a substância branca (SB) e cinzenta (SC), assim como o canal medular (CM) (100 ×). **(C)** Maior magnificação da figura anterior mostrando a presença de grande quantidade de astrócitos (seta espessa negra), oligodendrócitos (seta espessa branca) e células da micróglia (seta delgada) (400 ×). **(D)** Presença de intensa reação neovascular (círculos) em meio ao tecido medular (400 ×).

Foram notados, também, neurônios com sinais histopatológicos de alterações degenerativas (vacuolização citoplasmática, de provável natureza hidrópica, em diferentes graus de intensidade) (Figura 14).

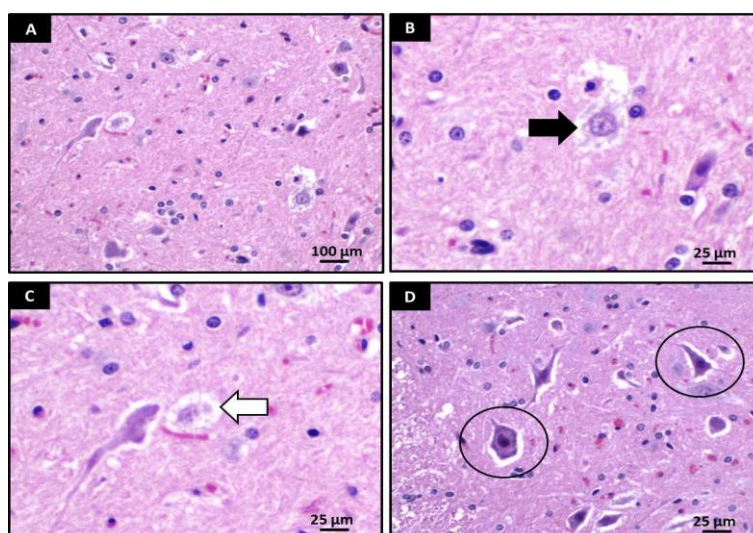


Figura 14: Fotomicrografia de secções histológicas coradas em HE de tecido medular mostrando as principais alterações morfológicas observadas sete dias após lesão medular (grupo LESÃO). **(A)** Neurônios do corno ventral direito exibindo alterações vacuolares citoplasmáticas degenerativas e sinais morfológicos de morte (100 ×). **(B)** Maior detalhe da fotomicrografia anterior mostrando vacuolização moderada (seta espessa negra) (400 ×) e **(C)** intensa (seta

espessa branca) do citoplasma neuronal compatíveis com degeneração hidrópica (400 ×). **(D)** Neurônios exibindo sinais morfológicos de alteração *post-mortem* como aumento da eosinofilia citoplasmática e contração da cromatina nuclear (círculos) (400 ×)

Também foram observadas características morfológicas compatíveis com o estado celular post-mortem, tais quais aumento expressivo da eosinofilia citoplasmática e alterações nucleares, como contração e condensação cromatínica (picnose) e dissolução total ou parcial da cromatina (cariólise), eventualmente com formação de um “colar” de cromatina residual (Figura 15).

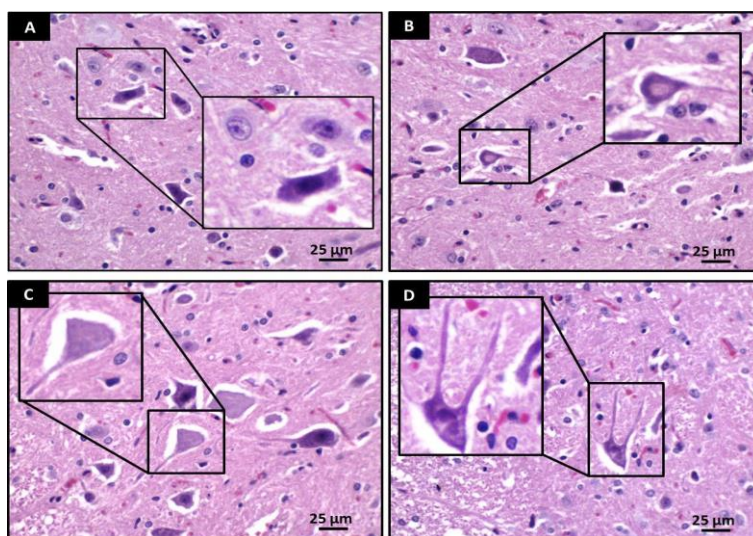


Figura 15: Fotomicrografia de secções histológicas coradas em HE de tecido medular mostrando as principais alterações morfológicas não degenerativas nucleares consistentes com morte celular em neurônios do corno ventral direito. **(A)** Intensa condensação cromatínica compatível com picnose (400 ×). **(B)** Dissolução parcial da cromatina (cariólise parcial), com formação de “cromatina residual em colar” (400×). **(C)** Cariólise total, com perda da imagem do núcleo celular por dissolução completa da cromatina (400×). **(D)** Neurônio piramidal viável e saudável exibindo citoplasma dendrítico e núcleo volumoso com cromatina clara e nucléolo proeminentes (400 ×).

5.6 Análise para reatividade de astrócitos

A quantidade de astrócitos na substância cinzenta, especificamente, no CDD e CVD da medula espinal foi maior nos grupos de tratamento, EATS 10 e EATS 100 $p < 0,0001$, quando comparados ao grupo LAM e LESÃO (figuras 16,19 e 20, fotos C e D).

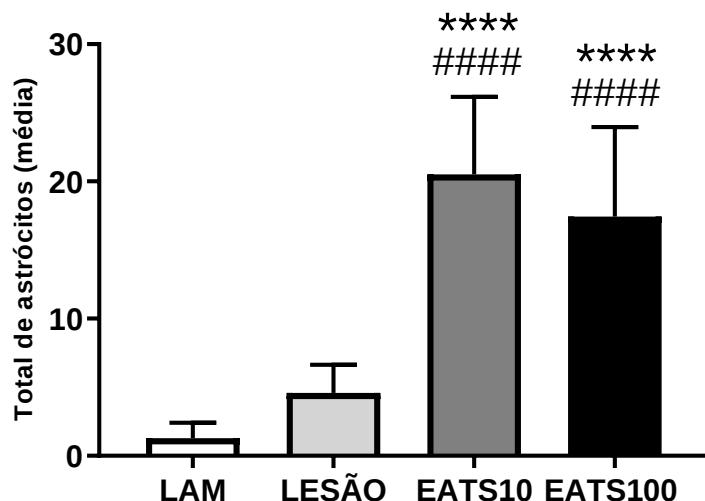


Figura 16: Quantificação de astrócitos no CDD e CVD, substância cinzenta, da medula espinal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência ($\times 400$). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; grupo controle; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** $p < 0,0001$ indicam diferença significativa entre os grupos EATS 10 e EATS 100 e o grupo LAM; #### $p < 0,0001$ indicam diferença estatística entre os grupos tratados (EATS 10 e EATS 100) e o grupo LESÃO (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Na quantificação de astrócitos no CDD da medula espinal (figuras 17 e 19, fotos C e D), o número dessas células foi significativamente maior nos grupos EATS 10 e EATS 100 $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle (LAM) e lesão/veículo (LESÃO).

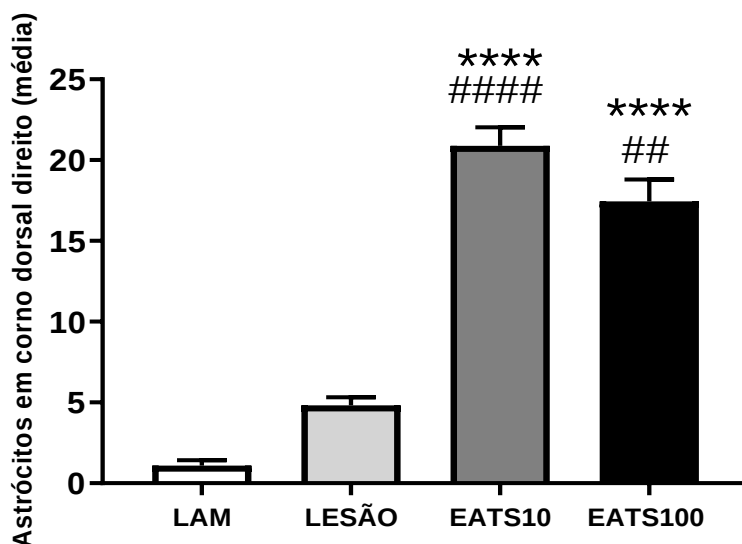


Figura 17: Quantificação de astrócitos no CDD, substância cinzenta, da medula espinal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência ($\times 400$). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** $p < 0,0001$ indicam diferença significativa entre os grupos

EATS 10 e EATS 100 e o grupo LAM; ##### $p < 0,0001$ e ## $p < 0,0019$ indicam diferença estatística entre os grupos tratados (EATS 10 e EATS 100) e o grupo LESÃO (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

No CVD em substância cinzenta da medula espinal o número de astrócitos foi estatisticamente superior nos grupos tratados com *Tradescantia spathacea*, EATS10 e EATS100 com $p < 0,0001$ em comparação aos grupos LAM e LESÃO (figura 18 e 20, foto C e D).

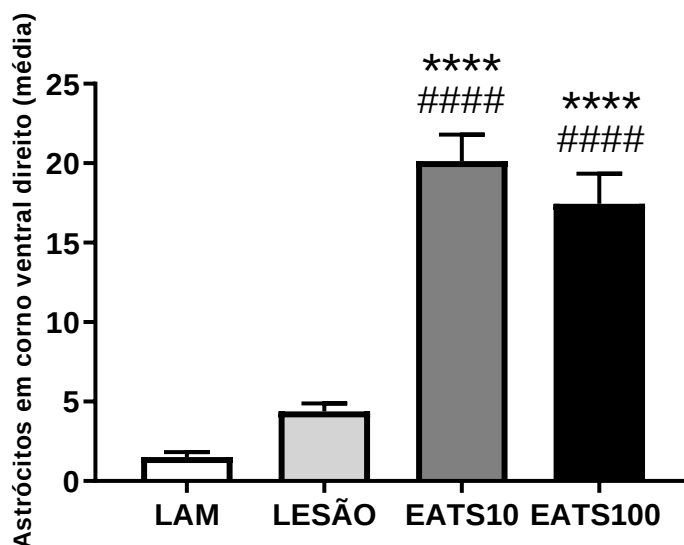


Figura 18: Quantificação de neurônios no corno ventral direito (CVD) da medula espinal. A contagem foi realizada na substância cinzenta em campos referentes ao corno ventral direito da medula espinal, por meio de microscópio óptico em campo de alta potência ($\times 400$). LAM: grupo controle; LESÃO: grupo lesão/veículo; EATS10: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 10 mg/kg; EATS100: grupo lesionado tratado com extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* na dose de 100 mg/kg. **** $p < 0,0001$ indicam diferença significativa entre os grupos EATS 10 e EATS 100 e o grupo LAM; ##### $p < 0,0001$ indicam diferença estatística entre os grupos tratados (EATS 10 e EATS 100) e o grupo LESÃO (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

A figura 19 ilustra, micrografia em 400 x do corno dorsal direito da medula espinal dos grupos estudados. Os grupos EATS 10 e EATS 100 apresentaram aumento da resposta astrocitária em comparação aos grupos LAM e LESÃO.

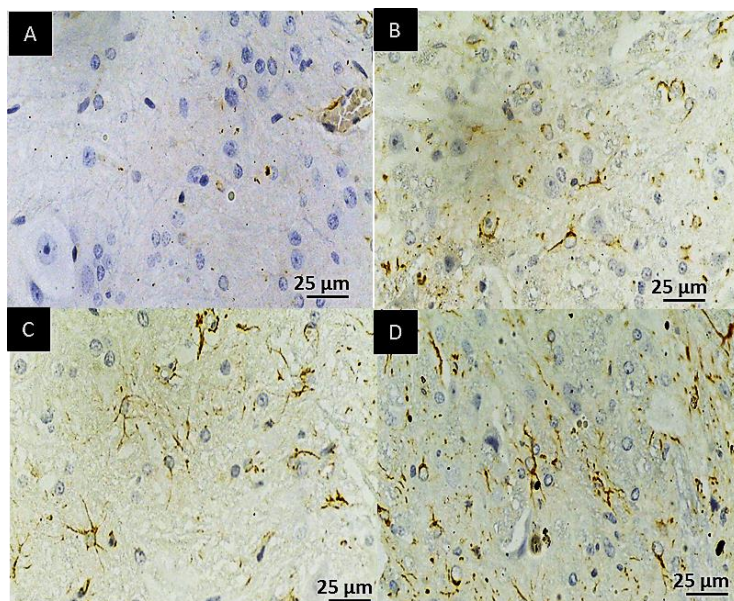


Figura 19: Fotomicrografia de secções da imunohistoquímica para GFAP de tecido medular mostrando a reação astrocitária no CDD **(A)** LAM (grupo laminectomia) (400 ×). **(B)** LES (grupo lesão veículo) (400×). **(C)** EATS10 (grupo tratado com extrato a 10 mg/kg) (400×). **(D)** EATS100 (Grupo tratado com extrato a 100 mg/kg) (400 ×).

Na figura 20, micrografia em 400x, do corno ventral direito da medula espinal dos grupos estudados. Observa-se aumento da resposta astrócitaria nos grupos EATS 10 e EATS 100 em comparação aos grupos LAM e LESÃO.

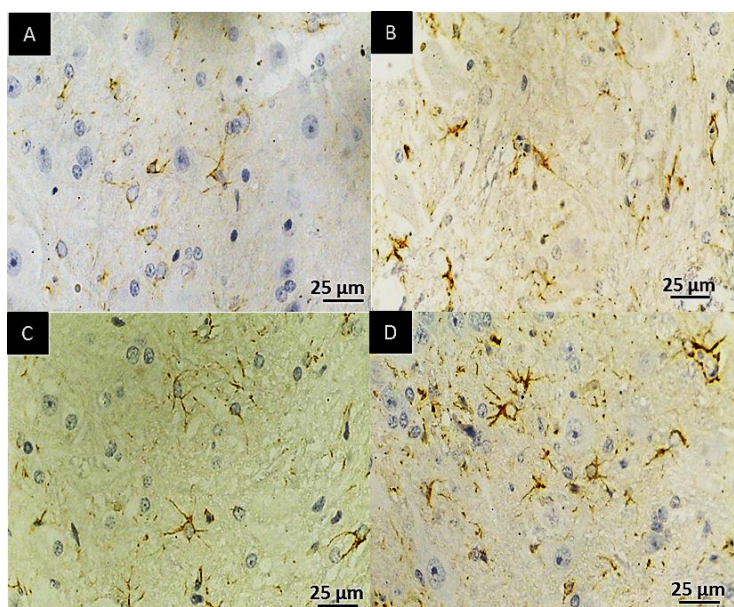


Figura 20: Fotomicrografia de secções da imunohistoquímica para GFAP de tecido medular mostrando a reação astrocitária no CVD. **(A)** LAM (grupo laminectomia) (400 ×). **(B)** LES (grupo lesão veículo) (400×). **(C)** EATS10 (grupo tratado com extrato a 10 mg/kg) (400×). **(D)** EATS100 (Grupo tratado com extrato a 100 mg/kg) (400 ×).

6 DISCUSSÃO

Para obtenção do extrato da *T.spathacea*, o método de preparo foi infusão uma técnica de fácil execução semelhante ao tradicional preparo de chás, de baixo custo, baixo índice de toxicidade e que possibilitou a extração de compostos fenólicos associados a atividade antioxidante (SANTOS; MAGAHÃES, 2020; ALARA *et al.*, 2021). Neste estudo o rendimento da extração (22%) foi superior ao rendimento encontrado nos estudos de Mena-Rejor *et al.* (2009), que utilizou o aparelho soxhlet para extração da mesma planta deste estudo com o caule e folhas, e apresentou rendimento de 4,3 % e 17,9 %, repectivamente. Em Rosales- Reyes (2008), o método de extração também foi por infusão (30 min) com rendimento de 8,37%.

Os ácidos fenólicos encontrados no extrato da *T. spathacea*, o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico foram testados no tratamento de lesão medular. O ácido ferúlico inibiu a apoptose (via mitocondrial), promoveu um aumento de proteínas antiapoptose, Survinina, NAIP e Bcl-2 e inibiu a autofagia celular (quando as células englobam e degradam seu citoplasma) via mTOR, P13K, AKT (reguladores do crescimento celular) (Zang *et al.*, 2017). Fatores que interferem bloqueando a morte por apoptose que consequentemente possibilita a sobrevivência de neurônios

Guven *et al.* (2015), mostraram que o ácido p-cumárico tem efeito neuroprotetor contra isquemia no SNC pois reduz a apoptose com ativação das vias de sinalização ERK e AKT que inibem a proteína pró-apoptótica ligada à mitocôndria. Sakamula *et al.* (2018), realizaram tratamento preventivo com do ácido p-cumárico contra a isquemia no SNC. O pré uso desse composto além de reduzir o estresse oxidativo ao melhorar os níveis de MDA (malondialdeído, biomarcador que avalia o estresse oxidativo), aumentou as atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

Com relação ao composto ácido verátrico, também encontrado na composição química do EATS neste trabalho, Choi *et al.* (2012) observaram que esse composto diminuiu a produção de óxido nítrico (NO) com a regulação de sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) e interleucina 1 beta (IL- 1b), atenuou a expressão de interferon γ (IFN γ , secretado pelos macrófagos após estimulação de citocinas) e Interleucina 6 (IL-6) a partir da inativação dos genes STAT1 e STAT 3 em células RAW264.7 (macrófago) que resultou em diminuição de NO. O tratamento com ácido verátrico inibiu a fosforilação de fator nuclear kappa B (NF-KB) com consequente regulação da expressão iNOS, reduziu a fosforilação de proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs), pois a produção

de NO e as reações inflamatórias são moduladas por essa proteína. Em resumo, o ácido verátrico pode ser um tratamento eficaz na modulação do NO pós LME.

Referente aos flavonoides encontrados destacam-se Vicenina 2 e Vestitol e a cumarina, fraxetina, Martin-aragon *et al.* (1997) mostraram que o tratamento com a fraxetina pode promover uma resistência ou proteção contra eventos mediados por radicais livres que contribui para doenças neurodegenerativas. Molina-Jimenes *et al.* (2003), constataram que a fraxetina tem ação neuroprotetora contra a apoptose induzida por rotenona na doença de *Parkinson*, diminui o estresse oxidativo e a ativação da caspase 3 cujo aumento da atividade da caspase 3 é indicativo para apoptose neural. Molina-Jimenes *et al.* (2005), ainda atestaram que o pré tratamento com a fraxetina protege a célula contra a apoptose quando a indução é pelo estresse oxidativo. Nesse sentido, a compreensão da cascata apoptótica, mecanismo de “autodestruição” celular, que ocorre posterior a LME, pode ser um importante meio para promover sobrevivência de células neuronais, ao contrário da morte neuronal irreversível por necrose (KUMAR *et al.*, 2018)

Sobre o mecanismo de ação do composto fenólico vestitol na modulação e migração dos neutrófilos em processo inflamatório, Franchin *et al.* (2016), reportaram que em situação de processo inflamatório ocorre um alto influxo de neutrófilos e o tratamento com vestitol reduz a liberação das quimiocinas CXCL1/KC e CXCL2/MIP2 estas que participam da migração de neutrófilos. Fisiologicamente, os neutrófilos são células que tem função bactericida e é a primeira defesa contra invasores. No entanto, pós trauma medular os subprodutos que são gerados a partir da fagocitose mediada por essas células, entre eles as EROs, podem ser tóxicos o que contribui para morte celular e aumento da lesão (RIGBY *et al.*, 2020) e, possivelmente, está associada a lesão progressiva da barreira hemato-espinal. Com isso, a redução do influxo de neutrófilos pode atenuar essa condição com consequente proteção de neurônios e promoção da recuperação funcional (KUMAR *et al.*, 2018).

Referente a ação do vestitol em macrófagos ativados por lipossacarídeo (LPS), Bueno-Silva *et al.* (2020), enfatizaram que houve redução da produção de óxido nítrico (NO), dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), Interleucina 6 (IL-6), fator de transformação de crescimento (TGF- β) e fator de necrose tumoral (TNF- α), visto que a superprodução dessas citocinas pode causar respostas inflamatórias e acarretar em danos a célula neuronal e posterior morte por apoptose (KUMAR *et al.*, 2018). As células inflamatórias que liberam essas citocinas, macrófagos com fenótipo M1, são ativadas e proliferam frente a lesão, (CHEN *et al.*, 2017), essas citocinas também são capazes de liberar

EROS, danificar o DNA da célula neuronal e exacerbar a lesão do tecido medular (AHUJA *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2020) e essa polarização para o fenótipo M1, mediada pelas condições do microambiente, apresenta capacidade reduzida para fagocitose sua principal função (ALIZADEH *et al.*, 2019). Bueno-Silva *et al.* (2020) ainda mostraram que os macrófagos objetivam padrões moleculares que se associam a patógeno, como o LPS, para iniciar a transcrição dos genes inflamatórios a partir do fator nuclear Kappa B (NF-KB). Por isso a inibição de NF-KB, baseado no tratamento com vestitol, pode ser um mecanismo anti-inflamatório desse composto. Também evidenciaram aumento da interleucina 10 (IL-10) e promoveu a indução de macrófagos que se assemelham ao fenótipo 2, esse tipo de célula é fonte de fatores tróficos e anti-inflamatórios que são importantes para promover a reparação do tecido (ZHOU *et al.*, 2020).

No que se refere a indução das respostas inflamatórias vasculares mediadas por lipossacarídeo (LSP), Kang *et al.* (2015) mostraram que o tratamento com o flavonoide vicenina-2 associada a escolimosida inibiu a ruptura endotelial vascular, a expressão de moléculas de adesão celular (CAMs), a adesão/migração de neutrófilos para as células endoteliais, a hipermeabilidade (característica do processo inflamatório) e migração de leucócitos. Dessa forma, é importante manter a integridade vascular com manutenção das respostas anti-inflamatórias contra estímulos inflamatórios que podem exacerbar a lesão. Lee e Bae (2016) reproduziram o estudo com lesão a partir do polifosfato (mediador pró-inflamatório) e confirmaram a ação anti-inflamatória da vicentina-2 associada a escolimosida.

O ácido verátrico, fraxetina, vicentina 2, ácido caféico e vestitol encontrados não estão associados ao uso na condição de lesão da medula espinal, mas apresentam ação neuroprotetora em estudos relacionados ao sistema nervoso central. No tratamento com ácido caféico frente a neurodegeneração da via nigroestriatal induzida por rotenona em modelo de doença de Parkinson, Zaitone *et al.* (2019) evidenciaram diminuição da expressão microglial e mediadores inflamatórios e aumento do número de neurônios dopaminérgicos que influenciaram na melhora da coordenação e dos movimentos motores. Yegin *et al.* (2020), mostraram que a intervenção preventiva com ácido cafeico em lesão cerebral por isquemia-reperfusão foi eficaz na proteção do tecido. Ainda, em modelo de isquemia-reperfusão, o ácido cafeico teve ação neuroprotetora e o mecanismo desse efeito pode estar associado a inibição da 5-lipoxigenase (5-LO, enzima que produz leucotriênio que está aumentado em cérebro isquêmico) que refletiu no reestabelecimento da memória e aprendizagem (LIANG *et al.*, 2015).

Wei *et al.* (2008) apresentaram a capacidade protetiva do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) contra a neurotoxicidade induzida por glutamato pela inibição da proteína transportadora de elétrons citocromo C (induzida por cálcio) na membrana mitocondrial de neurônios cerebelares. Son e Ma (2020), confirmaram a ação neuroprotetora do CAPE por via antioxidante com diminuição das espécies reativas de oxigênio em células lesionadas por ação do glutamato. Wang *et al.* (2016), observaram que o efeito neuroprotetora do CAPE foi por meio da diminuição da morte celular por apoptose e da atenuação da caspase na presença de degeneração de neurônios induzida por anestésico sevoflurano no hipocampo. O edema cerebral é mediado pela aquaporina-4 (AQP4) e citocinas. Nasution *et al.* (2020) evidenciaram que o tratamento com CAPE diminuiu os níveis da AQP4 induzida por astrócitos e como resultado houve redução do edema cerebral. Turan *et al.* (2020), comprovaram que a intervenção com ácido cafeico reduziu a morte neuronal por apoptose induzida pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), limitou o aumento das espécies reativas de oxigênio, preveniu disfunção mitocondrial, aumentou os níveis de Bcl-2 e AKT (quinase responsáveis por bloquear proteínas pró-apoptóticas) assim como os níveis da enzima tirosina hidroxilase (TH).

Na avaliação da função motora, nesse modelo de LME por hemissecção (7 dias), não houve aumento dos escores da escala BBB dos animais tratados com EATS. Porém, em estudo semelhante, Lin *et al.* (2011) utilizaram modelo de hemissecção para verificar o efeito da curcumina. Houve um pré-tratamento no dia anterior ao da cirurgia e seguiu até o sexto dia pós lesão medular. Na escala BBB, os animais tiveram ganho motor no 7º dia pós lesão e esse resultado foi atribuído a maior preservação de danos neuronais e ao efeito antiapoptótico. Nos resultados encontrados por Chen *et al.* (2018), que utilizaram um tipo de ácido fenólico (ácido clorogênico) como tratamento para LM, observaram que no início da fase subaguda houve aumento dos escores de BBB imposto à diminuição da reação inflamatória e inibição da apoptose. Li *et al.* (2017), trataram os animais com ácido ferúlico numa lesão por contusão e a pontuação do BBB aumentou após o 7º dia de LM, com justificativa semelhante pautado na diminuição da apoptose. Na maioria dos estudos encontrados a intervenção nos eventos que levam ao processo apoptótico foi crucial para o reestabelecimento da função motora em modelo animal. Porém é primordial considerar que outros fatores também influenciam na recuperação motora.

A preservação de neurônios nos grupos de tratamento, sobretudo no grupo EATS10, não refletiu na avaliação da função motora. A recuperação funcional é com processo complexo e dependente de fatores importantes e necessários: regeneração do axônio, microambiente permissivo e a capacidade intrínseca do neurônio lesado (PALMISIANO,

DI DIOVANNI, 2018). No estágio secundário da LM, resíduos de mielina estão acumulados esse é um fator que pode inibir o crescimento de neuritos (novos ramos de axônio), assim chamados de inibidores de NOGO-A, uma proteína que está associada a morte de neurônio por apoptose, colapso axonal e retração de neurite (ASHAMMAKAI *et al.*, 2019; RIGBY *et al.*, 2020), além de outros inibidores como glicoproteínas de oligodendrócitos e glicoproteína associada a mielina. Nesse ambiente, os axônios não são capazes de construir cones de crescimento, por isso há formação de terminais dismorfos e subsequentes axônios retraídos, incapazes de regeneração em direção ao músculo (SHIN, CHO, 2017). Sugere-se que outras análises sejam realizadas afim de investigar as condições do microambiente pós tratamento com EATS frente a lesão medular por hemissecção que podem ter impedido o ganho motor.

Na coloração hematoxilina-eosina (HE) foi possível identificar que o grupo tratado com EATS, com ênfase na dose de 10 mg/kg, apresentou maior número de neurônios sobreviventes em região de corno dorsal e ventral do lado direito na substância cinzenta o que traduz em maior proteção de neurônios pós lesão medular. Esse benefício pode ser atribuído ao efeito dos compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) encontrados na composição química da *T. spathacea* que tem ação antioxidante, anti-inflamatória (TAN *et al.*, 2015) e neuroprotetora (LOPES, 2019), porém o mecanismo de ação que envolve a preservação de neurônios motores com o tratamento da planta em estudo precisa ser investigado.

Nesse sentido, o efeito dose-resposta do EATS pós lesão medular na dose de 10 mg/kg pode ter sido mais potente por isso permitiu que o tratamento com baixa dose pudesse ter ação neuroprotetora; eficiente, devido a proteção de neurônios e maior eficácia quando comparada a dose de 100 mg/kg, que apesar de ter sido eficiente pode não ter sido tão eficaz pois teve diminuição do número de neurônios protegidos o que, segundo CRIPPA, ORSINI (2016), amplia a probabilidade de toxicidade ou ineficácia do tratamento.

As alterações histológicas analisadas a partir da coloração HE, permitiu a identificação de neurônios baseada na sua morfologia (HILTON *et al.*, 2016). Alizadeh *et al.* (2019), mostraram que na condição de isquemia, as células neuronais apresentaram sinais de núcleos encolhido, picnótico e condensado com membrana plasmática com danificação irreversível. Miguel *et al.* (2012), apontam que na microscopia essas características são evidências de necrose neural e apoptose.

A LME atinge os astrócitos de maneira diferente das células neuronais e oligodendrócitos. Na LME os astrócitos passam a ser reativos. Os astrócitos reativos

envolvem as margens da lesão com intuito de separar o núcleo da lesão do tecido medular normal (FAN *et al.*, 2016). A ativação dessa célula é importante para minimização da extensão da lesão em estágios iniciais (KARIMI-ABDOLREZAEI; BILLAKANTI, 2012).

Neste estudo em modelo de lesão medular por hemissecção com tratamento em 7 dias a base do extrato do *T. spathacea*, os grupos de tratamento, EATS 10 e EATS 100, apresentaram aumento da reação astrocitária na fase subaguda da lesão. Lukovic *et al.* (2015), mostraram que pós lesão medular os astrócitos passam por alteração morfológica e molecular como hipertrofia, aumento da proliferação e expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), vimentina e nestina, características do astrócito reativo. Hara *et al.* (2017) evidenciaram que na fase subaguda os astrócitos reativos são capazes de migrar para o epicentro da lesão, ajudam na proteção da área lesionada com o isolamento das células inflamatórias e são capazes de reparar o tecido.

Os astrócitos reativos liberam diversas substâncias que são bioativas, como fator de crescimento nervoso, fator neurotrófico derivado da linha de células gliais e fator de crescimento transformador β , exercem um efeito neuroprotetor aos neurônios. Portanto, preservar a proliferação dos astrócitos reativos contribui para proteção neuronal e regeneração do tecido medular (GU *et al.*, 2019). Este estudo apresentou aumento da reatividade de astrócitos nos tratamentos com EATS vista por imunohistoquímica para GFAP. Esse fator pode explicar a maior preservação de neurônios exibida na coloração HE, onde a dose de 10 mg/kg apresentou melhor tratamento pós lesão medular com a proteção de um número maior de neurônios.

Wang *et al.* (2018), ressaltam que durante as primeiras semanas os astrócitos reativos protegem o tecido e podem ter efeito benéfico sobre a restauração da medula espinal. A lesão permitiu aumento da quantidade de células astrocitária que são positivas para GFAP, e o composto quercetina, um flavonoide, aumentou ainda mais essas células, assim como a expressão GFAP e S100 β que são marcadores bases para destinação de astrócitos.

Dessa forma, o tratamento com EATS parece ter favorecido respostas gliais neuroprotetoras que contribuem para a diminuição da perda de neurônios pós LME por hemissecção.

7 CONCLUSÃO

O tratamento subagudo com EATS teve efeito protetor sobre a perda de neurônios após LME e promoveu aumento da resposta astrocitária. No entanto, não foi observada melhora significativa da função motora.

8 REFERÊNCIAS

- _____. Ministério da Saúde. Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília, 2006. Diário Oficial [da] União. http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/7/er/censi_med_norm/BRA-Portaria%20971-2006.pdf
- ALARA, O.R.; ABDURAHMAN, N.H.; UKAEGBU, C.I. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science* 2021.
- ALBAYAR, A.A.; ROCHE, A.; SWIATKOWSKI, P.; ANTAR, S.; OUDA, N.; EMARA, E.; AWAD, B.I. Biomarkers in Spinal Cord Injury: Prognostic Insights and Future Potentials. *Frontiers in neurology* 2019; 10: 27.
- ADAMS, K.L.; GALLO, V. The diversity and disparity of the glial scar. *Nature neuroscience* 2018 21(1): 9-15.
- AHMED, A.; PATIL, A.A.; AGRAWAL, D.K. Immunobiology of spinal cord injuries and potential therapeutic approaches. *Molecular and cellular biochemistry* 2018; 441(1-2): 181-189.
- AHUJA, C.S.; NORI, S.; TETREAULT, L.; WILSON, J.; KWON, B.; HARROP, J.; FEHLINGS, M.G. Traumatic spinal cord injury—repair and regeneration. *Neurosurgery* 2017; 80(3S): S9-S22.
- ALIZADEH, A.; DYCK, S.M.; KARIMI-ABDOLREZAEI, S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology* 2019; 10: 282.
- AMAYA-CRUZ, D.M.A.; RAMÍREZ, I.F.P.; GARCÍA, J.D.; JACOBO, C.M.; ESPINOZA, A.D., CAMACHO, R.R. An integral profile of bioactive compounds and functional properties of prickly pear (*Opuntia ficus indica* L.) peel with different tonalities. *Food Chemistry* 2018; 278: 568-578.
- ANDERSON, K.D.; GUNAWAN, A.; STEWARD, O. Quantitative assessment of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in rats: relationship to the corticospinal tract. *Experimental neurology* 2005; 194(1): 161-174.
- AO, Q.; SUN, X.H.; WANG, A.J.; FU, P.F.; GONG, K.; ZUO, H.Z.; ZHANG, X.F. Protective effects of extract of Ginkgo biloba (EGb 761) on nerve cells after spinal cord injury in rats. *Spinal Cord* 2006; 44(11): 662-667.
- ASHAMMAKHI, N.; KIM, H.J.; EHSANIPOUR, A.; BIERMAN, R.D.; KAARELA, O.; XUE, C.; SEIDLITS, S.K. Regenerative therapies for spinal cord injury. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2019; 25(6): 471-491.
- AYDIN, H.E.; OZKARA, E.; OZBEK, Z.; VURAL, M.; BURUKOGLU, D.; ARSLANTAS, A.; ATASOY, M.A. Histopathological Evaluation of the Effects of CAPE in Experimental Spinal Cord Injury. *Turk Neurosurg* 2016; 26: 437-444.
- BARRAGÁN-ZARATE, G.S.; LAGUNEZ-RIVERA, L.; SOLANO, R., PINEDA-PEÑA, E.A.; LANDA-JUÁREZ, A.Y.; CHÁVEZ-PIÑA, A.E.; HERNÁNDEZ-BENAVIDES, D.M.

Prosthechea karwinskii, an orchid used as traditional medicine, exerts anti-inflammatory activity and inhibits ROS. *Journal of Ethnopharmacology* 2020; 253: 112632.

BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Experimental Neurology* 1996; 139(2), 244–256.

BENTO-SILVA, A.; KOISTINEN, V.M.; MENA, P.; BRONZE, M.R.; HANHINEVA, K.; SAHLSTRØM, S.; AURA, A.M. Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: do we understand individual variability? *European journal of nutrition* 2020; 59(4): 1275-1293.

BOADAS-VAELLO, P.; VERDÚ, E. Epigallocatechin-3-gallate treatment to promote neuroprotection and functional recovery after nervous system injury. *Neural regeneration research* 2015; 10(9): 1390.

BUENO-SILVA, B.; FRANCHIN, M.; ALVES, C.F.; DENNY, C.; COLÓN, D.F.; CUNHA T.M.; ALENCAR, S.M.; NAPIMOGA, M.H.; ROSALEN, P.L. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. *Phytomedicine* 2016; 23(13):1583-1590.

CAMPOS, D.A.; RIBEIRO, T.B.; TEIXEIRA, J.A.; PASTRANA, L.; PINTADO, M.M. Integral Valorization of Pineapple (Ananas comosus L.) By-Products through a Green Chemistry Approach towards Added Value Ingredients. *FOODS* 2020; 9 (60): 2-21.

CEREZETTI, C.R.N.; NUNES, G.R.; CORDEIRO, D.R.C.L.; TEDESCO, S. (2012). Lesão medular traumática e estratégias de enfrentamento: revisão crítica. *O mundo da saúde* 2012; 36(2): 318-326.

CHEN, C.H.; SUNG, C.S.; HUANG, S.Y.; FENG, C.W.; HUNG, H.C.; YANG, S.N; CHEN, W.F. The role of the PI3K/Akt/mTOR pathway in glial scar formation following spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2016; 278: 27-41.

CHEN, J.; WANG, Z.; ZHENG, Z.; CHEN, Y.; KHOR, S.; SHI, K.; XIAO, J. Neuron and microglia/macrophage-derived FGF10 activate neuronal FGFR2/PI3K/Akt signaling and inhibit microglia/macrophages TLR4/NF- κ B-dependent neuroinflammation to improve functional recovery after spinal cord injury. *Cell death & disease* 2017; 8(10): e3090-e3090.

CHEN, D.; PAN, D.; TANG, S.; TAN, Z.; ZHANG, Y.; FU, Y.; HUANG, Q. Administration of chlorogenic acid alleviates spinal cord injury via TLR4/NF- κ B and p38 signaling pathway anti-inflammatory activity. *Molecular Medicine Reports* 2018; 17(1): 1340-1346.

CHEN, W.; HE, B.; TONG, W.; ZENG, J.; ZHENG, P. Astrocytic insulin-like growth factor-1 protects neurons against excitotoxicity. *Frontiers in cellular neuroscience* 2019; 13: 298.

CHIO, J.C.T.; WANG, J.; BADNER, A.; HONG, J.; SURENDRAN, V.; FEHLINGS, M.G. The effects of human immunoglobulin G on enhancing tissue protection and neurobehavioral recovery after traumatic cervical spinal cord injury are mediated through the neurovascular unit. *Journal of neuroinflammation* 2019; 16(1): 1-18.

CHOI, W.S; SHIN, P.G.; LEE, J.H.; KIM, G.D. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cells. *Cellular immunology* 2012; 280(2): 164-170.

CHÜLTKE, E.; GRIEBEL, R. W.; JUURLINK, B. H. J. Quercetin attenuates inflammatory processes after spinal cord injury in an animal model. *Spinal Cord* 2010; 48(12): 857-861.

CONG, L.; CHEN, W. Neuroprotective Effect of Ginsenoside Rd in Spinal Cord Injury Rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2016; 119 (2): 193-201.

COYOY-SALGADO, A.; SEGURA-URIBE, J.J.; GUERRA-ARAIZA, C.; OROZCO-SUÁREZ, S.; SALGADO-CEBALLOS, H.; FERIA-ROMERO, I.A.; OROZCO-BARRIOS, C.E. The Importance of Natural Antioxidants in the Treatment of Spinal Cord Injury in Animal Models: An Overview. *Oxidative medicine and Cellular Longevity* 2019; 2019.

CRIPPA, A.; ORSINI, N. Dose-response meta-analysis of differences in means. *BMC medical research methodology* 2016; 16(1): 1-10.

DEHKORDI, F.J.; KHARAZIAN, N.; LORIGOOINI, Z. Characterization of flavonoid components in *Scutellaria* L. species (Lamiaceae) using finger-printing analysis. *Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica* 2020; 79-96.

DE MELO SANTIAGO, L. M., DOS SANTOS BARBOSA, L. C., GUERRA, R. O., & DE MELO, F.R.L.V. Aspectos sociodemográficos e clínicos de homens com lesão medular traumática em um centro urbano do nordeste brasileiro. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, 2012; 37:3.

DEVI, K.P.; MALAR, D.S.; NABAVI, S.F.; SUREDA, A.; XIAO, J.; NABAVI, S.M.; DAGLIA, M. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research* 2015; 99: 1-10.

DO, Q.D.; ANGKAWIJAYA, A.E.; TRAN-NGUYEN, P.L.; HUYNH, L.H.; SOETAREDJO, F.E.; ISMADJI, S.; JU, Y.H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 2014; 22(3): 296-302.

DUQUE, L.; BRAVO, K.; OSORIO, E. A holistic anti-aging approach applied in selected cultivated medicinal plants: A view of photoprotection of the skin by different mechanisms. *Industrial Crops and Products* 2017; 97: 431-439.

EKAR, T.; KREFT, S. Common risks of adulterated and mislabeled herbal preparations. *Food and Chemical Toxicology* 2019; 123: 288-297.

EOM, D.W.; LEE, J.H.; KIM, Y.J.; HWANG, G.S.; KIM, S.N.; KWAK, J.H.; YAMABE, N. Synergistic effect of curcumin on epigallocatechin gallate-induced anticancer action in PC3 prostate cancer cells. *BMB reports* 2015; 48(8): 461.

ESCARTIN, C.; GALEA, E.; LAKATOS, A.; O'CALLAGHAN, J.P.; PETZOLD, G.C.; SERRANO-POZO, A.; VERKHRATSKY, A. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience* 2021; 24(3): 312-325.

EVANIEW, N.; BELLEY-CÔTÉ, E.P.; FALLAH, N.; NOONAN, V.K.; RIVERS, C.S.; DVORAK, M.F. Methylprednisolone for the treatment of patients with acute spinal cord injuries: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurotrauma* 2016; 33(5): 468-481.

FAN, H.; CHEN, K.; DUAN, L.; WANG, Y.Z.; JU, G. Beneficial effects of early hemostasis on spinal cord injury in the rat. *Spinal cord* 2016; 54(11): 924.

FAN, H.; TANG, H.B.; SHAN, L.Q.; LIU, S.C.; HUANG, D.G.; CHEN, X.; HAO, D.J. Quercetin prevents necroptosis of oligodendrocytes by inhibiting macrophages/microglia polarization to M1 phenotype after spinal cord injury in rats. *Journal of Neuroinflammation* 2019; 16(1):1–15.

FAN, X.; MA, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, L. P2X7 Receptor (P2X7R) of Microglia Mediates Neuroinflammation by Regulating (NOD)-Like Receptor Protein 3 (NLRP3) Inflammasome-Dependent Inflammation After Spinal Cord Injury. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2020; 26: e925491-1.

FAN, H.; ZHANG, K.; SHAN, L.; KUANG, F.; CHEN, K.; ZHU, K.E.; WANG, Y.Z. Astrócitos reativos sofrem necroptose induzida por microglia / macrophages M1 em lesão da medula espinhal. *Neurodegeneração molecular* 2016; 11 (1): 1-16.

FEHLINGS, M.G.; WILSON, J.R.; HARROP, J.S.; KWON, B.K.; TETREAULT, L.A.; ARNOLD, P.M.; DETTORI, J.R. Efficacy and Safety of Methylprednisolone Sodium Succinate in Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *Global Spine Journal* 2017; 7(3): 116-137.

FISCHER, T.; STERN, C.; FREUND, P.; SCHUBERT, M.; SUTTER, R. Wallerian degeneration in cervical spinal cord tracts is commonly seen in routine T2-weighted MRI after traumatic spinal cord injury and is associated with impairment in a retrospective study. *European Radiology* 2020; 1-10.

FLEMING, E.; LUO, Y. Co-delivery of synergistic antioxidants from food sources for the prevention of oxidative stress. *Journal of Agriculture and Food Research* 2021; 3: 100107.

FRANCHIN, M.; COLON, D.F.; CASTANHEIRA, F.V.; DA CUNHA, M.G.; BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Vestitol isolated from Brazilian red propolis inhibits neutrophils migration in the inflammatory process: elucidation of the mechanism of action. *Journal of natural products* 2016; 79(4): 954-960.

GARCÍA-VARELA, R.; RAMÍREZ, O.R.F.; SERNA-SALDIVAR, S.O.; ALTAMIRANO, J.; CARDINEAU, G.A. Cancer cell specific cytotoxic effect of Rheo discolor extracts and solvent fractions. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 190: 46–58.

GEORGE, V.C.; DELLAIRE, G.; RUPASINGHE, H.P.V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2017; 45: 1-14.

GHOSH, S.; BASAK, P.; DUTTA, S.; CHOWDHURY, S.; SIL, P.C. New insights into the ameliorative effects of ferulic acid in pathophysiological conditions. *Food and Chemical Toxicology* 2017; 103: 41-55

GONZALEZ-AVILA, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; DE LA GARZA, M.; DEL CARMEN HERNÁNDEZPRETELÍN, M.; DOMINGUEZ-ORTIZ, M. A.; FATTEL-FAZENDA, S.; VILLA-TREVINO, S. Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract. *Toxicology in vitro* 2003; 17(1): 77-83.

GRIJALVO, S.; NIETO-DÍAZ, M.; MAZA, R.M.; ERITJA, R.; DÍAZ, D.D. Alginate Hydrogels as Scaffolds and Delivery Systems to Repair the Damaged Spinal Cord. *Biotechnology Journal* 2019; 14(12): 1900275.

GUO, X.; WANG, X.; DONG, J.; LV, W.; ZHAO, S.; JIN, L.; ZHOU, Y. Effects of Ginkgo biloba on Early Decompression after Spinal Cord Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020; 2020.

GUVEN, M.; ARAS, A.B.; AKMAN, T.; SEN, H.M.; OZKAN, A.; SALIS, O.; COSAR, M. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. *Iranian journal of basic medical sciences* 2015; 18(4): 356.

HARA, M.; KOBAYAKAWA, K.; OHKAWA, Y.; KUMAMARU, H.; YOKOTA, K.; SAITO, T.; OKADA, S. The interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces the formation of an astrocytic scar through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nature medicine* 2017; 23 (7): 818-828.

HE, B.; NAN, G. Neuronal regeneration after acute spinal cord injury in adult rats. *The Spine Journal. The Spine Journal* 2016; 16 (12): 1459-1467.

HILTON, B. J.; MOULSON, A. J.; TETZLAFF, W. Neuroprotection and secondary damage following spinal cord injury: concepts and methods: concepts and methods. *Neuroscience Letters* 2017; 23; 652:3-10.

HIRAKAWA, A.; SHIMIZU, K.; FUKUMITSU, H.; SOUMIYA, H.; IINUMA, M.; FURUKAWA, S. 2-Decenoic acid ethyl ester, a derivative of unsaturated medium-chain fatty acids, facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Neuroscience* 2010; 171(4): 1377-1385.

HUANG, H.; YOUNG, W.; SKAPER, S.; CHEN, L.; MOVIGLIA, G.; SABERI, H.; EL MASRY, W. Clinical neurorestorative therapeutic guidelines for spinal cord injury (IANR/CANR version 2019). *Journal of Orthopaedic Translation* 2020; 20: 14-24.

HUSSEIN, R.M.; MOHAMED, W.R.; OMAR H.A. A neuroprotective role of kaempferol against chlorpyrifos-induced oxidative stress and memory deficits in rats via GSK3 β -Nrf2 signaling pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2018;152: 29-37.

HUTSON, T.H.; DI GIOVANNI, S. The translational landscape in spinal cord injury: focus on neuroplasticity and regeneration. *Nature Reviews Neurology* 2019: 1-14.

JIA, Q.; ZHANG, S.; ZHANG, H.; YANG, X.; CUI, X. A Comparative Study on Polyphenolic Composition of Berries from the Tibetan Plateau by UPLC-Q-Orbitrap MS System. *Chemistry & Biodiversity* 2020; 17(4), e2000033.

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.

JIANG, W.; LI, M.; HE, F.; BIAN, Z.; HE, Q.; WANG, X.; ZHU, L. Neuroprotective effect of asiatic acid against spinal cord injury in rats. *Life Sciences* 2016; 157: 45–51.

JUNQUEIRA, L.C.U. (2005). Biologia estrutural dos tecidos: histologia. In Guanabara-Koogan. 1nd ed; 2005.

KARIMI-ABDOLREZAEE, S.; BILLAKANTI, R. Astrogliose reativa após lesão da medula espinhal - efeitos benéficos e prejudiciais. *Neurobiologia molecular* 2012; 46(2): 251-264.

KANG, H.; KU, S.K.; JUNG, B.; BAE, J.S. Anti-inflammatory effects of vicienin-2 and scolymoside in vitro and in vivo. *Inflammation research* 2015; 64(12): 1005-1021.

KAZIEV, G.Z.; KOROTEEV, M.P.; KOKOEV, T.I.; KOROTEEV, A.M.; STEPNOVA, A.F.; DZHIOEVA, C.G. Research in the field of processing plant materials, and obtaining new materials, biologically active substances and medicines. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2021; 624(1): 012117.

KHALATBARY, A.R.; AHMADVAND, H. Anti-inflammatory effect of the epigallocatechin gallate following spinal cord trauma in rat. *Iranian Biomedical Journal* 2011; 15(1-2): 31.

KIM, K.T.; NAM, T.K.; PARK, Y.S.; KIM, Y.B.; PARK, S.W. Neuroprotective effect of anthocyanin on experimental traumatic spinal cord injury. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 2011; 49(4): 205.

KUMAR, R.; LIM, J.; MEKARY, R.A.; RATTANI, A.; DEWAN, M.C.; SHARIF, S.Y.; PARK, K.B. Traumatic spinal injury: global epidemiology and worldwide volume. *World neurosurgery* 2018; 113: e345-e363.

KUMAR, H.; JO, M.J.; CHOI, H.; MUTTIGI, M.S.; SHON, S.; KIM, B.J.; HAN, I.B. Matrix metalloproteinase-8 inhibition prevents disruption of blood–spinal cord barrier and attenuates inflammation in rat model of spinal cord injury. *Molecular neurobiology* 2018; 55(3): 2577-2590.

LAROSA PRR. Anatomia humana: texto e atlas. 1 ed.- Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2018.

LEE, I.C.; BAE, J.S. Anti-inflammatory effects of vicienin-2 and scolymoside on polyphosphate-mediated vascular inflammatory responses. *Inflammation Research* 2016; 65(3): 203-212.

LI, R.; BAO, L.; HU, W.; LIANG, H.; DANG, X. Expression of miR-210 mediated by adeno-associated virus performed neuroprotective effects on a rat model of acute spinal cord injury. *Tissue and Cell* 2019; 57: 22-33.

LI, Z.; WANG, S.; LI, W.; YUAN, H. Ferulic acid improves functional recovery after acute spinal cord injury in rats by inducing hypoxia to inhibit microRNA-590 and elevate vascular endothelial growth factor expressions. *Frontiers in molecular neuroscience* 2017; 10: 183.

LIANG, G.; SHI, B.; LUO, W.; YANG, J. The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Behavioral and Brain Functions* 2015; 11(1): 18.

LIN, C.Y.; ANDROJNA, C.; ROZIC, R.; NGUYEN, B.; PARSONS, B.; MIDURA, R.J.; LEE, Y.S. Differential adaptations of the musculoskeletal system after spinal cord contusion and transection in rats. *Journal of Neurotrauma* 2018; 35(15): 1737-1744.

LIN, M.S.; LEE, Y.H.; CHIU, W.T.; HUNG, K.S. Curcumin provides neuroprotection after spinal cord injury. *Journal of Surgical Research* 2011; 166(2): 280-289.

LIU, X.; BOTCHWAY, B.O.; TAN, X.; ZHANG, Y.; FANG, M. Resveratrol treatment of spinal cord injury in rat model. *Microscopy research and technique* 2019; 82(3): 296-303.

LOPES, L.E.S. Efeito neuroprotetor do extrato aquoso de Tradescantia spathacea sobre a lesão da via nigroestriatal em ratos, Sergipe - Brasil [Dissertação]. Aracaju: Universidade Tiradentes; 2019.

LORENZO, J.M.; KHANEGHAH, A.M.; GAVAHIAN, M.; MARSZALEK, K.. EŞ, I. Understanding the potential benefits of thyme and its derived products for food industry and consumer health: From extraction of value-added compounds to the evaluation of bioaccessibility, bioavailability, anti-inflammatory, and antimicrobial activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2018: 1-18.

LUKOVIC, D.; STOJKOVIC, M.; MORENO-MANZANO, V.; JENDELOVA, P.; SYKOVA, E.; BHATTACHARYA, S.S.; ERCEG, S. Concise review: reactive astrocytes and stem cells in spinal cord injury: good guys or bad guys?. *Stem Cells* 2015; 33(4): 1036-1041.

MACHADO, A.P.D.F.; PEREIRA, A.L.D.; BARBERO, G.F.; MARTÍNEZ, J. Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chemistry* 2017; 231: 1-10.

MACHAWAL, L.; KUMAR, A. Possible involvement of nitric oxide mechanism in the neuroprotective effect of rutin against immobilization stress induced anxiety like behaviour, oxidative damage in mice. *Pharmacological Reports* 2014; 66(1): 15-21.

MARIBO, T.; JENSEN, C.M.; MADSEN, L.S.; HANDBERG, C. Experiences with and perspectives on goal setting in spinal cord injury rehabilitation: a systematic review of qualitative studies. *Spinal Cord* 2020; 1-10.

MARTÍN-ARAGÓN, S.A.G.R.A.R.I.O.; BENEDÍ, J.M.; VILLAR, A.M. (1997). Modifications on antioxidant capacity and lipid peroxidation in mice under fraxetin treatment. *Journal of pharmacy and pharmacology* 1997; 49(1): 49-52.

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: 334-340.

MCDONOUGH, A.; MONTERRUBIO, J.; ARIZA, V.; MARTINEZ-CERDENO, V. Calibrated forceps model of spinal cord compression injury. *Journal of Visualized Experiments* 2015; 24: 98.

MENA-REJON, G.; CAAMAL-FUENTES, E.; CANTILLO-CIAU, Z.; CEDILLO-RIVERA, R.; FLORES-GUIDO, J.; MOO-PUC, R. In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 121(3): 462-265.

MIGUEL, M.P.; MENEZES, L.B.D.; ARAÚJO, E.G.D. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do pequi (Caryocar brasiliense) 2012.

MOHD SAIRAZI, N.S.; SIRAJUDEEN, K.N.S. Natural products and their bioactive compounds: neuroprotective potentials against neurodegenerative diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020.

MOLINA-JIMENEZ, M.F.; SANCHEZ-REUS, M.I.; BENEDI, J. Effect of fraxetin and myricetin on rotenone-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells: comparison with N-acetylcysteine. *European journal of pharmacology* 2003; 472(1-2): 81-87.

MOLINA-JIMÉNEZ, M.F.; SÁNCHEZ-REUS, M.I.; CASCALES, M.; ANDRÉS, D.; BENEDÍ, J. Effect of fraxetin on antioxidant defense and stress proteins in human neuroblastoma cell model of rotenone neurotoxicity. Comparative study with myricetin and N-acetylcysteine. *Toxicology and applied pharmacology* 2005; 209(3): 214-225.

MYRIAM, A.A.; LUIS, B.J.; JANNETE, R.P.N.; JAIME, S.N.; ROBERTO, R.S.; MARISELA, G.A. Antimutagenicity mechanisms of the Rhoecus discolor ethanolic extract. *Experimental and toxicologic pathology* 2011; 63(3): 243-248.

NA, J.Y.; KIM, S.; SONG, K.; KWON, J. Rutin alleviates prion peptide-induced cell death through inhibiting apoptotic pathway activation in dopaminergic neuronal cells. *Cellular and molecular neurobiology* 2014; 34(7): 1071-1079.

NASUTION, R.A.; ISLAM, A.A.; HATTA, M.; LUDONG, D.H.; WANGI, H.; MASSI, M.N.; NASUTION, K.I. Effects of caffeic acid phenethyl ester in reducing cerebral edema in rat subjects experiencing brain injury: an in vivo study. *Annals of medicine and Surgery* 2020; 57: 328-333.

NARDONE, R.; FLOREA, C.; HÖLLER, Y.; BRIGO, F.; VERSACE, V.; LOCHNER, P.; TRINKA, E. Rodent, large animal and non-human primate models of spinal cord injury. *Zoology* 2017; 123: 101-114.

OKADA, S.; HARA, M.; KOBAYAKAWA, K.; MATSUMOTO, Y.; NAKASHIMA, Y. Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury. *Neuroscience research* 2018; 126: 39-43.

OLAKOWSKA, E.; MARCOL, W.; WŁASZCZUK, A. The neuroprotective effect of N-acetylcysteine in spinal cord-injured rats. *Adv Clin Exp Med* 2017; 26(9): 1329–1334.

OUCHEMOUKH, N.A.; REIDAH, A.I.B.; PINÉ, R.Q.; PÉREZ, C.R.; MADANI, K. Tentative Characterisation of Iridoids, Phenylethanoid Glycosides and Flavonoid Derivatives from Globularia alypum L. (Globulariaceae) Leaves by LC-ESI-QTOF-MS. *Phytochemical Analysis* 2015; 25 (5): 389-398.

PALMISANO, I.; DI GIOVANNI, S. Advances and limitations of current epigenetic studies investigating mammalian axonal regeneration. *Neurotherapeutics* 2018; 15(3): 529-540.

PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005; 50(4): 427-434.

PICOLI, C.C.; COIMBRA-CAMPOS, L.M.; GUERRA, D.A.; SILVA, W.N.; PRAZERES, P.H.; COSTA, A. C.; BIRBRAIR, A. Pericytes Act as key players in spinal cord injury. *The American Journal of Pathology* 2019; 189(7): 1327-1337.

PINCHI, E.; FRATI, A.; CANTATORE, S.; D'ERRICO, S.; LA RUSSA, R.; MAIESE, A.; FINESCHI, V. Acute spinal cord injury: a systematic review investigating miRNA families involved. *International journal of molecular sciences* 2019; 20(8): 1841.

PUEBLA-OSORIO, N.; SARCHIO, S.N.; ULLRICH, S.E.; BYRNE, S.N. Detection of infiltrating mast cells using a modified toluidine blue staining. *Methods Mol Biol* 2017; 1627: 213-222.

QU, J.; ZHOU, Q.; DU, Y.; ZHANG, W.; BAI, M.; ZHANG, Z.; MIAO, J. Retracted: rutin protects against cognitive deficits and brain damage in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *British journal of pharmacology* 2014; 171(15): 3702-3715.

RATH, N.; BALAIN, B. Spinal cord injury-The role of surgical treatment for neurological improvement. *J Clin Orthop Trauma* 2017; 8(2): 99-102.

RENNO, W.M.; AL-KHALEDI, G.; MOUSA, A.; KARAM, S.M.; ABUL, H. ASFAR, S. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates neurological function when intravenously infused in acute AND, CHRONICALLY INJURED SPINAL CORD OF ADULT RATS. *Neuropharmacology* 2014; 77: 100-119.

RIGBY, M.J.; GOMEZ, T.M.; PUGLIELLI, L. Glial cell-axonal growth cone interactions in neurodevelopment and regeneration. *Frontiers in neuroscience* 2020; 14: 203.

ROSALES-REYES, T.; DE LA GARZA, M.; ARIAS-CASTRO, C.; RODRÍGUEZ-MENDIOLA, M.; FATTEL-FAZENDA, S.; ARCE-POPOCA, E.; VILLA-TREVIÑO, S. (Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *Journal of ethnopharmacology* 2008; 115(3): 381-386.

RUZICKA, J.; URDZIKOVA, L.M.; SVOBODOVA, B.; AMIN, A.G.; KAROVA, K.; DUBISOVA, J.; JENDELOVA, P. (2018). Does combined therapy of curcumin and epigallocatechin gallate have a synergistic neuroprotective effect against spinal cord injury?. *Neural regeneration research*, 2018; 13(1): 119.

SAKAMULA, R.; THONG-ASA, W. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in mice with cerebral ischemia reperfusion injuries. *Metabolic Brain Disease* 2018; 33(3): 765-773.

SALEEM, H., ZENGINC, G.; LOCATELLID, M.; MOLLICAD, A.; AHMAD, I. In vitro biological propensities and chemical profiling of *Euphorbia milii* Des Moul (Euphorbiaceae): A novel source for bioactive agents. *Industrial Crops & Products* 2019; 130: 9-15.

SÁNCHEZ-ROQUE, Y.; AYORA-TALAVERA, G.; RINCÓN-ROSALES, R.; GUTIÉRREZ-MICELI, F.A.; MEZA-GORDILLO, R.; WINKLER, R.; RUIZ-VALDIVIEZO, V.M. The flavonoid fraction from *rhoeo discolor* leaves acting as antiviral against influenza a virus. *Records Natural Products* 2017;11: 532-546.

SANTOS, W. N. D.; MAGALHÃES, B. E. D. Phenolic content and antioxidant capacity of infusions herbs: Optimization of phenolic extraction and HPLC-DAD method.

In ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 92., 2020, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: 2020.

SHANG, A.J.; YANG, Y.; WANG, H.Y.; TAO, B.Z.; WANG, J.; WANG, Z.F.; ZHOU, D.B. Spinal cord injury effectively ameliorated by neuroprotective effects of rosmarinic acid. *Nutritional neuroscience* 2017; 20(3): 172-179.

SHULTZ, R.B.; ZHONG, Y. Minocycline targets multiple secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury. *Neural regeneration research* 2017; 12(5): 702-713.

SIBA, I.P.; BORTOLANZA, M.; FRAZÃO VITAL, M.A.B.; ANDREATINI, R.; DA CUNHA, J.M.; DEL BEL, E.A.; ZANOVELI, J.M. Fish oil prevents rodent anxious states comorbid with diabetes: A putative involvement of nitric oxide modulation. *Behavioural Brain Research* 2017; 326: 173-186.

SHIN, J.E.; CHO, Y. Epigenetic regulation of axon regeneration after neural injury. *Molecules and cells* 2017; 40(1): 10.

SILVER, J.; MILLER, J.H. Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews neuroscience* 2004; 5(2) 146–156.

SIMPSON, D.S.; OLIVER, P.L. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants* 2020; 9(8): 743.

SINGH, N.A.; MANDAL, A.K.A.; KHAN, Z. A. Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Nutrition Journal* 2016; 15: 60.

SON, Y.; MA, C.J. Neuroprotective Activity of Caffeic Acid Isolated from *Lonicera japonica*. *Korean journal of pharmacognosy* 2020; 51(1): 30-35.

SONG, S.; NIE, Q.; LI, Z.; DU, G. Curcumin improves neurofunctions of 6-OHDA induced parkinsonian rats. *Pathology, Research and Practice* 2016; 212(4): 247-251.

SPENCER, A.P. Anatomia humana básica. In *Anatomia humana básica* 2n ed. Rio de Janeiro; 1991.p. 713-713.

SU, Y.; CHEN, Z.; DU, H.; LIU, R.; WANG, W.; LI, H.; NING, B. Silencing miR-21 induces polarization of astrocytes to the A2 phenotype and improves the formation of synapses by targeting glypican 6 via the signal transducer and activator of transcription-3 pathway after acute ischemic spinal cord injury. *The FASEB Journal* 2019; 33(10): 10859-10871.

SUTHERLAND, T.C.; GEOFFROY, C.G. The influence of neuron-extrinsic factors and aging on injury progression and axonal repair in the central nervous system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8.

TALEB, A.; AHMAD, K.A.; IHSAN, A.U.; QU, J.; LIN, N.; HEZAM, K.; QILONG, D. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 102: 689-698.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y.; LEE, S. M. Rhoeo spathacea (Swartz) Stearn leaves, a potential natural food colorant. *Journal of Functional Foods* 2014; 7: 443-451.

TAN, J.B.L.; LIM, Y.Y.; LEE, S.M. Antioxidant and antibacterial activity of Rhoes spathacea (Swartz) Stearn leaves. *Journal of food science and technology* 2015; 52(4): 2394-2400.

TIAN, W.; HAN, X.G.; LIU, Y.J.; TANG, G.Q.; LIU, B.; WANG, Y.Q.; XU, Y.F. Intrathecal epigallocatechin gallate treatment improves functional recovery after spinal cord injury by upregulating the expression of BDNF and GDNF. *Neurochemical research* 2013; 38(4): 772-779.

TURAN, D.; ABDIK, H.; SAHIN, F.; ABDIK, E.A. Evaluation of the neuroprotective potential of caffeic acid phenethyl ester in a cellular model of parkinson's disease. *European journal of pharmacology* 2020; 883: 173342.

VÁZQUEZ, R.G.; VELASCO, M.F.; FARIÑA, M.M.; MARQUÉS, A.M.; DE LA BARRERA, S.S. Update on traumatic acute spinal cord injury. Part 1. *Medicina Intensiva (English Edition)* 2017; 41(4): 237-247.

VENKATESH, K.; GHOSH, S.K.; MULLICK, M.; MANIVASAGAM, G.; SEN, D. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. *Cell and tissue research* 2019; 1-27.

VISAVADIYA, N.P.; MCEWEN, M.L.; PANDYA, J.D.; SULLIVAN, P.G.; GWAG, B.J.; SPRINGER, J.E. Antioxidant properties of Neu2000 on mitochondrial free radicals and oxidative damage. *Toxicology in Vitro* 2013; 27(2): 788-797.

VO, Q.H.; NGUYEN, P.H.; ZHAO, B.T.; ALI, M.Y.; CHOI, J.S.; MIN, B.S.; WOO, M.H. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory constituents from the aerial parts of Tradescantia spathacea Sw. *Fitoterapia* 2015; 103: 113-121.

WAN, G.; AN, Y.; TAO, J.; WANG, Y.; ZHOU, Q.; YANG, R.; LIANG, Q. MicroRNA-129-5p alleviates spinal cord injury in mice via suppressing the apoptosis and inflammatory response through HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway. *Bioscience reports* 2020; 40(3).

WANG, C.; WANG, Q.; LOU, Y.; XU, J.; FENG, Z.; CHEN, Y.; TIAN, N. Salidroside attenuates neuroinflammation and improves functional recovery after spinal cord injury through microglia polarization regulation. *Journal of cellular and molecular medicine* 2018; 22(2): 1148-1166.

WANG, D.; ZHAO, S.; PAN, J.; WANG, Z.; LI, Y.; XU, X.; LIU, M. Ginsenoside Rb1 attenuates microglia activation to improve spinal cord injury via microRNA-130b-5p/TLR4/NF- κ B axis. *Journal of Cellular Physiology* 2020.

WANG, L.Y.; TANG, Z.J.; HAN, Y.Z. Neuroprotective effects of caffeic acid phenethyl ester against sevoflurane-induced neuronal degeneration in the hippocampus of neonatal rats involve MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Molecular medicine reports* 2016; 14(4): 3403-3412.

WANG, R.; SUN, Y.; HUANG, H.; WANG, L.; CHEN, J.; SHEN, W. Rutin, a natural flavonoid protects PC12 cells against sodium nitroprusside-induced neurotoxicity through activating PI3K/Akt/mTOR and ERK1/2 pathway. *Neurochemical research* 2015; 40(9):1945-1953.

WANG, T.M.; FU, Y.; YU, W.; CHEN, C.; DI, X. Identification of Polar Constituents in the Decoction of *Juglans mandshurica* and in the Medicated Egg Prepared with the Decoction by HPLC-Q-TOF MS2. *Molecules* 2017; 22: 2-16.

WANG, Y.; LI, W.; WANG, M.; LIN, C.; LI, G.; ZHOU, X.; JIN, D. Quercetin reduces neural tissue damage and promotes astrocyte activation after spinal cord injury in rats. *Journal of cellular biochemistry* 2018; 119(2): 2298-2306.

WEI, X.; MA, Z.; FONTANILLA, C.V.; ZHAO, L.; XU, Z.C.; TAGGLIABRACI, V.; DU, Y. Caffeic acid phenethyl ester prevents cerebellar granule neurons (CGNs) against glutamate-induced neurotoxicity. *Neuroscience* 2008; 155(4): 1098-1105.

WILSON, J.R.; TETREAULT, L.A.; KIM, J.; SHAMJI, M.F.; HARROP, J.S.; MROZ, T.; FEHLINGS, M.G. State of the art in degenerative cervical myelopathy: an update on current clinical evidence. *Neurosurgery*, 2017; 80(3S): S33-S45.

WILSON, J.R.; WITIW, C.D.; BADHIWALA, J.; KWON, B.K.; FEHLINGS, M.G.; HARROP, J.S. Early surgery for traumatic spinal cord injury: where are we now?. *Global Spine Journal* 2020; 10(11): 84S-91S.

WILSON, S.; NAGEL, S.J.; FRIZON, L.A.; FREDERICKS, D.C.; DEVRIES-WATSON, N.A.; GILLIES, G.T.; HOWARD III, M. A. The hemisection approach in large animal models of spinal cord injury: Overview of methods and applications. *Journal of Investigative Surgery* 2020; 33(3): 240-251.

WU, J.; MAOQIANG, L.; FAN, H.; ZHENYU, B.; QIFANG, H.; XUEPENG, W.; LIULONG, Z. Rutin attenuates neuroinflammation in spinal cord injury rats. *Journal of Surgical Research* 2016; 203(2): 331-337.

YEĞİN, M.E.; BILKAY, U.; TİFTİKÇİOĞLU, Y.Ö.; UYANIKGİL, Y.; ÇAVUŞOĞLU, T.; ERCAN, G.; GÜRDAL, M. Altering effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and ischemia/reperfusion injury: an experimental study in a rat TRAM flap model. *European Journal of Plastic Surgery* 2020; 43: 527-534.

YERLIKAYA, S.; BALOGLU, M.C.; DIUZHEVA, A.; JEKO, J.; CZIÁKY, Z., ZENGİN, G. Investigation of Chemical Profile, Biological Properties of *Lotus corniculatus* L. Extracts and Their Apoptotic-Autophagic Effects On Breast Cancer Cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical* 2019,174: 286-299.

ZAITONE, S.A.; AHMED, E.; ELSHERBINY, N.M.; MEHANNA, E.T.; EL-KHERBETAWY, M. K.; ELSAYED, M.H.; MOUSTAFA, Y.M. Caffeic acid improves locomotor activity and lessens inflammatory burden in a mouse model of rotenone-induced nigral neurodegeneration: Relevance to Parkinson's disease therapy. *Pharmacological Reports* 2019; 71(1); 32-41.

ZHANG, C.; YAN, Z.; MAKNOJIA, A.; RIQUELME, M.A.; GU, S.; BOOHER, G.; JIANG, J.X. Inhibition of astrocyte hemichannel improves recovery from spinal cord injury. *JCI insight* 2021; 6(5).

ZHANG, L.; ZHUANG, X.; CHEN, Y.; XIA, H. Intravenous transplantation of olfactory bulb ensheathing cells for a spinal cord hemisection injury rat model. *Cell transplantation* 2019; 28(12): 1585-1602.

ZHANG, L.C. The apoptosis and autophagy in rats with spinal cord injury and the intervention effect of ferulic acid. *Journal of Hainan Medical University* 2017; 23(10): 5-8.

ZHANG, J.Y.; LIN, M.T.; ZHOU, M.J.; YI, T.; TANG, Y.N.; TANG, S.L.; CHEN, H.B. Combinational treatment of curcumin and quercetin against gastric cancer MGC-803 cells in vitro. *Molecules* 2015; 20(6): 11524-11534.

ZHAO, Z.; LIU, N.; HUANG, J.; LU, P.H.; XU, X.M. Inhibition of cPLA2 activation by Ginkgo biloba extract protects spinal cord neurons from glutamate excitotoxicity and oxidative stress-induced cell death. *Journal of neurochemistry* 2011; 116(6):1057-1065.

ZHOU, X.; WAHANE, S.; FRIEDL, M.S.; KLUGE, M.; FRIEDEL, C.C.; AVRAMPPOU, K.; ZOU, H. (2020). Microglia and macrophages promote corraling, wound compaction and recovery after spinal cord injury via Plexin-B2. *Nature neuroscience* 2020; 23(3): 337-350.

ZHU, M.D.; ZHAO, L.X.; WANG, X.T.; GAO, Y.J.; ZHANG, Z.J. Ligustilide inhibits microglia-mediated proinflammatory cytokines production and inflammatory pain. *Brain research bulletin* 2014; 109: 54-60.

ZOU, W.; ZHOU, H.; HU, J.; ZHANG, L.; TANG, Q.; WEN, X.; WANG, W. Rhizoma Smilacis Glabrae inhibits pathogeninduced upper genital tract inflammation in rats through suppression of NF- κ B pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017; 202: 103–113.

CRONOGRAMA

	2019 (Semestre)		2020 (Semestre)		2021 (Semestre)
Atividades Desenvolvidas	1º	2º	1º	2º	1º
Revisão de literatura	X	X	X	X	
Disciplinas obrigatórias	X				
Disciplinas eletivas		X		X	
Treinamento para histologia e avaliação comportamental	X				
Participação em eventos científicos projetos de pesquisa	X	X	X	X	
Extração e caracterização química do EATS	X				
Entrega do material e apresentação do seminário		X			
Submissão do CEUA	X				
Caracterização química	X				
Treinamento para cirurgia					
Cirurgia		X			
Análise do teste comportamental		X			
Retirada do material biológico		X			
Análise histológica		X		X	X
Redação da dissertação e artigo				X	X
Qualificação				X	
Defesa					X

ANEXO 1- EXSICATA DA *Tradescantia spathacea*



ANEXO 2- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada " Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato aquosos da *Tradescantia spathacea* sobre a lesão medular em roedores.", registrada com o nº030919, sob a responsabilidade de Margarete Zanardo Gomes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, 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 Aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 09/10/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Vigência da autorização	01/12/2019 a 31/12/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de Animais	60
Peso/idade	Peso: 180 a 250g / Idade: 2 a 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Tiradentes

Aracaju, 09 de outubro de 2019

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

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

UNIVERSIDADE TIRADENTES
AV. MURILO DANTAS Nº 300 B FAROLÂNDIA
CEP. 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

TELEFONE: (79)3218 2204
F AX: (79) 3218 21 00