

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ANA CLÁUDIA MOREIRA DOS SANTOS

Efeito do tratamento com extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* sobre a  
regeneração nervosa periférica

UBERLÂNDIA

2019

ANA CLÁUDIA MOREIRA DOS SANTOS

Efeito do tratamento com extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* sobre a  
regeneração nervosa periférica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e Estrutural  
Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia  
como requisito parcial à obtenção do título de  
mestre em Biologia Celular

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Graciele Zanon

UBERLÂNDIA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S237e Santos, Ana Cláudia Moreira dos, 1992  
2019 Efeito do tratamento com extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* sobre a regeneração nervosa periférica [recurso eletrônico] / Ana Cláudia Moreira dos Santos. - 2019.

Orientadora: Renata Graciele Zanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1300>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. 2. Sistema nervoso central. 3. *Aristolochia cymbifera*. 4. Células de Schwann. I. Zanon, Renata Graciele, 1981, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 576.3

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural  
Aplicadas

Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



**ATA**

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número: 002/2019 do PPGBC

Data: **22 de Fevereiro de 2019**

Discente: **Ana Cláudia Moreira dos Santos**

Matrícula nº 11712BCE001

Título do Trabalho: **“Aumento do número de fibras nervosas mielínicas após neurotmesa e tratamento com *Aristolochia cymbifera*”**

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual

Projeto de Pesquisa vinculado: Efeito do extrato de *Aristolochia cymbifera* no SNP

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Às quatorze horas do dia 22 de fevereiro do ano de 2019 no Anfiteatro do Bloco 4G/Biblioteca – Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: **Professoras Doutoras: Lucélia Gonçalves Vieira – UFG; Celina Monteiro da Cruz Lotufo – UFU e Renata Graciele Zanon, orientadora** da candidata. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Renata Graciele Zanon, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata **Ana Cláudia Moreira dos Santos**, agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Ana Cláudia Moreira dos Santos** aprovada. Sugerindo, (se couber) o novo título para o trabalho: **Efeito do tratamento com extrato etanólico da *Aristolochia cymbifera* sobre a regeneração nervosa periférica**

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as

normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida, conferida e assinada pela **Banca Examinadora:**

**Profa. Dra. Renata Graciele Zanon UFU/orientadora; Lucélia Gonçalves Vieira – UFG; Celina Monteiro da Cruz Lotufo – UFU.**



Documento assinado eletronicamente por **Renata Graciele Zanon, Presidente**, em 22/02/2019, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celina Monteiro da Cruz Lotufo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/02/2019, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucélia Gonçalves Vieira, Usuário Externo**, em 22/02/2019, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0989848** e o código CRC **42F61292**.

Em memória da minha querida mãe, Stella,

meu exemplo de amor incondicional.

Ao meu pai Vanderlúcio e à minha irmã Letícia,

que estão sempre comigo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida, oportunidades e conquistas.

Aos meus pais, Stella e Vanderlúcio, pelo incentivo, apoio e dedicação durante minha formação e, sobretudo, pelo amor com o qual me criaram. À minha irmã favorita, Letícia, pelo companheirismo e pelo incentivo em todas as fases da minha vida. Amo vocês!

À Gislane pela compreensão e apoio que muito me ajudaram nessa conquista.

À professora e orientadora, Dra Renata Zanon. Agradeço pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos e de continuar nossos estudos. Principalmente, pela confiança em me aceitar em sua equipe, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação à pesquisa e à minha formação.

Às professoras, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM-UFU), professora Dra Karen Hiraki, Celina Lotufu e Tatiana Tomiosso, agradeço pela disponibilidade e PELA contribuição durante esse estudo.

Aos professores da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), professor Dr. Alexandre de Oliveira e Gustavo Simões pela parceria e colaboração em parte experimental.

Aos técnicos Igor, Lorena, Daniele e Thaís, por todo auxílio e paciência na execução desse trabalho.

À Táríka, uma grande amiga que conheci durante o Mestrado. Obrigada auxílio na parte experimental e, em especial, pelo companheirismo, pelas boas risadas e pela amizade. Tmj!

A todos do laboratório de Morfologia e Cultura Celular (LAMOC). Aos ex alunos, Pedro e Alex, pelos ensinamentos e pela parceria. Aos alunos de iniciação científica, Larissa, Raphael e Mariana bem como aos demais alunos, Fernanda e Natália por todo suporte durante esses anos.

Aos alunos do Departamento de Fisiologia, pela colaboração e pelas conversas que ajudaram a tornar o ambiente de pesquisa divertido e descontraído.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas e às agências de fomento CAPES e CNPq.

Por fim, a todos que embora não citados contribuíram de alguma forma para execução desse trabalho. Muito obrigada!

## RESUMO

De acordo com dados de um estudo realizado no Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, o extrato etanólico da planta *Aristolochia cymbifera* apresentou ação neuroprotetora no Sistema Nervoso Central, protegendo neurônios da morte induzida por peçonha, e, ainda atuando positivamente sobre a crise epilética em moscas doentes. Esses dados despertaram o interesse de testarmos a planta sobre a regeneração do nervo periférico, que é o tema de estudo de nosso laboratório. Para tanto, após secção total do nervo ciático esquerdo de ratos Wistar utilizamos a técnica de tubulização, em que se colocam os cotos nervosos dentro de uma prótese tubular de silicone. Durante o período de dois meses os animais foram avaliados quanto à função sensitiva e motora do nervo, sendo o grupo tratado com a *A. cymbifera* comparado com um grupo controle que recebeu tratamento placebo. Após esses dois meses, os nervos foram extraídos para análises do comportamento das células de Schwann (imunofluorescência anti-S100beta e anti-NGFRp75; morfometria em microscopia de luz relativa à mielinização) e do crescimento axonal (imunofluorescência anti-neurofilamento; contagem de fibras em microscopia de luz). Os resultados funcionais motor ou sensitivo não apontaram diferença entre grupos, bem como, as imunomarcações, que não demonstraram diferenças significativas para a expressão das proteínas estudadas. A análise morfométrica também não apontou diferença entre os grupos tratado e controle. Houve aumento significativo de fibras mielínicas para os nervos extraídos de animais tratados com o extrato da planta. Nossos dados mostram que o tratamento com a *A. cymbifera* possivelmente pouco afeta o comportamento das células de Schwann, no entanto, o maior número de fibras mielínicas pode indicar uma proteção central, no microambiente da medula espinhal em que se encontram os corpos dos neurônios que tiveram seus axônios lesionados. Essa ideia está em acordo com resultados anteriores que já demonstravam uma neuroproteção central da planta.

**Palavras chaves:** Cipó mil homens, Nervo periférico, Células de Schwann



## ABSTRACT

According to data from a study carried out at the Biotechnology Institute of the Uberlândia Federal University, the ethanolic extract of the *Aristolochia cymbifera* plant presented neuroprotective action in the Central Nervous System, protecting neurons from venom-induced death, and, acting positively on the epileptic crisis in sick flies. These data aroused the interest of testing the plant on the peripheral nerve regeneration, which is the subject of study in our laboratory. To do so, after the total left sciatic nerve of Wistar rats we used the tubulization technique, in which the nerve stumps are placed inside a silicone tubular prosthesis. During the two-month period the animals were evaluated for sensory and motor function of the nerve, the group treated with *A. cymbifera* was compared to a control group receiving placebo treatment. After these two months, the nerves were extracted for analysis of the behavior of Schwann cells (anti-S100beta and anti-NGFRp75 immunofluorescence, morphometry by light microscopy relative to myelination) and axonal growth (anti-neurofilament immunofluorescence; counting fiber by light microscopy). The functional or sensory results showed no difference between groups, as well as the immunoblotting, which did not show significant differences for the expression of the proteins studied. The morphometric analysis also showed no difference between the treated and control groups. There was a significant increase in myelin fibers for the nerves extracted from animals treated with the plant extract. Our data show that treatment with *A. cymbifera* may have little effect on the behavior of Schwann cells, however, the increase in number of myelin fibers may indicate a central protection in the microenvironment of the spinal cord in which the bodies of the neurons that had their axons injured. This idea is in accordance with previous results that already demonstrated a central neuroprotection of the plant.

**Keywords:** Cipó mil homens, Peripheral nerve, Schwann cells

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Organização geral do nervo periférico .....	13
<b>Figura 2-</b> Mecanismo de regeneração após lesão nervosa periférica .....	15
<b>Figura 3-</b> <i>Aristolochia cymbifera</i> .....	19
<b>Figura 4-</b> Procedimento de Tubulização .....	24
<b>Figura 5-</b> Aparato utilizado no SFI e impressão plantar demonstrado as medidas utilizadas .....	24
<b>Figura 6-</b> Aparato utilizado no teste Randall e Selitto .....	26
<b>Tabela 1-</b> Descrição dos anticorpos primários utilizados .....	27
<b>Tabela 2-</b> Consumo de água e tratamento .....	30
<b>Figura 7-</b> Resultados dos testes funcionais .....	32
<b>Figura 8-</b> Imunomarcações anti anti-NGFRp75 e anti S-100 $\beta$ .....	33
<b>Figura 9-</b> Imunomarcação anti- neurofilamento .....	34
<b>Figura 10-</b> Avaliação morfométrica .....	35
<b>Tabela 3-</b> Dados morfométricos .....	36
<b>Anexo A-</b> Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais .....	50
<b>Anexo B-</b> Laudo histopatológico (Dra Karen Renata Nakamura Hiraki).....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>SN</b>	Sistema Nervoso
<b><i>A.cymbifera</i></b>	<i>Aristolochia cymbifera</i>
<b>ARFIS</b>	Depositário de Animais da Área de Ciências Fisiológicas
<b>Cdt</b>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética em Utilização Animal
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DFM</b>	Diâmetro da fibra mielínica
<b>DW</b>	Degeneração Walleriana
<b>EBE</b>	Extrato Bruto Etanólico
<b>EBM</b>	Espessura da bainha de mielina
<b>EP</b>	Erro padrão
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>P</b>	Perímetro
<b>PL</b>	<i>Print length</i> , comprimento da pegada
<b>PNPMF</b>	Programa Nacional de Plantas Medicinais
<b>RZG</b>	Razão G
<b>CS</b>	Células de Schwann
<b>IFC</b>	Índice Funcional do Ciático
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervoso Periférico
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TS</b>	<i>Intermediate toes spread</i> , abertura total dos dedos
<b>UFU</b>	Universidade Federal de Uberlândia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>122</b>
2.1 Composição do nervo periférico .....	12
2.2 Lesão nervosa periférica.....	133
2.3 Tubulização do nervo periférico.....	155
2.4 Plantas medicinais .....	166
2.5 Plantas medicinais e tecido neural.....	17
2.5 <i>Aristolochia cymbifera</i> ( <i>A. cymbifera</i> ) .....	18
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>211</b>
3.1 Objetivo geral .....	211
3.2 Objetivos específicos.....	211
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 Aspectos éticos .....	222
4.2 Animais e grupos.....	222
4.3 Preparação e administração do extrato bruto etanólico .....	222
4.4 Lesão do nervo ciático e tubulização.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 3
4.5 Avaliação funcional motora do ciático – SFI.....	244
4.6 Avaliação funcional sensitiva do ciático – Randall & Selitto .....	255
4.7 Eutanásia e processamento dos tecidos.....	26
4.8 Imunofluorescência .....	27
4.9 Contagem de fibras e Morfometria.....	28
4.10 Estatística.....	29
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
5.1 Ingestão e toxicidade de <i>A. cymbifera</i> .....	30
5.2 Avaliação funcional.....	30
5.3 Imunofluorescência .....	32
5.4 Contagem de fibras e Morfometria.....	34

<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A neurotmesa é caracterizada pela transecção completa do nervo. Esse tipo de lesão acarreta alterações estruturais e funcionais no corpo do neurônio, e, a regeneração envolve intensa atividade das células de Schwann e o desenvolvimento do processo de degeneração Walleriana (SIQUEIRA, 2007). Por interromper o crescimento axonal, a neurotmesa apresenta o pior prognóstico, sendo a recuperação dependente de intervenção cirúrgica (GRIFFIN et al., 2014). Quando não há a possibilidade de neurorrafia (sutura do epineuro dos segmentos nervosos), o tratamento padrão consiste no transplante autólogo. Todavia, essa técnica apresenta como limitação a restrição de sítios doadores, o que torna a tubulização uma alternativa que pode ainda, ser associada a substâncias a fim de acelerar o processo regenerativo (PENAIITE & BARAKAT-WALTER, 2010).

Todas as técnicas de restauração do nervo apresentam em comum a limitação do retorno funcional, que é alcançado quando ocorre a reinervação do órgão alvo. Desse modo, diversas estratégias experimentais que permitam a regeneração axonal e reinervação do alvo têm sido descritas (FARONI et al., 2015). Nesse sentido, plantas medicinais constituem um recurso potencial para descoberta de princípios ativos promissores para a terapêutica (OLIVEIRA & ROPKE, 2016). Adicionalmente, há atualmente um crescente interesse por medicamentos fitoterápicos, ou mesmo, o próprio recurso natural, as plantas medicinais. Entre 2013 e 2015, o Sistema Único de Saúde revelou o crescimento de 161% na procura de tratamentos a base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no país (PORTAL BRASIL, 2016).

Nesse contexto, estudos recentes demonstraram que o extrato de *Aristolochia cymbifera* foi capaz de proteger fatias de hipocampo tratadas com veneno neurotóxico de *Crotalus durissus terrificus*, revelando sua atividade neuroprotetora no Sistema Nervoso Central (ANDRADE, 2015; MELO, 2016). Visando o potencial neuroprotetor também no Sistema Nervoso Periférico, a *A. cymbifera* poderia ser aplicada na prática clínica como coadjuvante de técnicas já protocoladas para tratamento de neuropatias e lesões periféricas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do Extrato Etanólico (EBE) de *A. cymbifera* na regeneração de nervo periférico após neurotmesa e procedimento de tubulização.

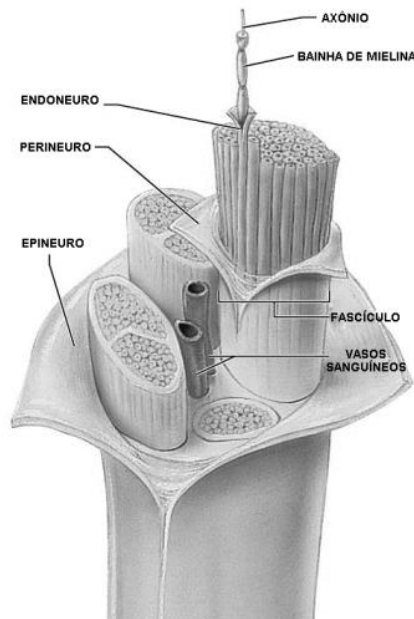
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Composição do nervo periférico

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) é constituído por fibras que ligam o Sistema Nervoso Central (SNC) aos receptores periféricos ou aos órgãos efetores, permutando informações sensitivas e motoras. Os nervos pertencentes a esse sistema são denominados nervos periféricos.

O nervo periférico é constituído por feixes de axônios, células de Schwann (CS) e tecido conjuntivo (GRANT et al., 1999). Além das CS, apresenta outros componentes celulares como as células perineurais, fibroblastos, macrófagos (GARBY et al., 2000; SCHIMDT & LEACH, 2003). As CS são células especializadas capazes de produzir mielina, que envolvem os axônios dos neurônios (denominados axônios mielínicos), isolando-os eletricamente e permitindo a propagação rápida de potenciais de ação (GUYTON & HALL, 2011). No entanto, também existem axônios amielínicos. Neste caso, uma única SC, através de projeções citoplasmáticas, envolve totalmente ou parcialmente cerca de 5 a 25 axônios, não havendo a formação da bainha de mielina (PETERS et al., 1976).

Anatomicamente o axônio juntamente com a bainha de mielina, denomina-se fibra nervosa. As fibras periféricas são envolvidas por três camadas de tecido conjuntivo. A camada mais externa é chamada de epineuro, formada por tecido conjuntivo frouxo, possui fibras de colágenas tipo I, fibroblastos e vasos sanguíneos em sua constituição. Já a camada média é denominada de perineuro, encontram-se as células pavimentosas (isto é, fibroblastos e células perineurais) unidas fortemente por “*tight junctions*” e colágeno I e III, os quais se dispõem concêntricamente em relação aos grupos de axônios originando os fascículos. Esta camada é importante na manutenção da homeostase do nervo, pois, atua como barreira seletiva ao trânsito de substâncias com alto peso molecular (GUTH, 1956; CAJAL, 1959; LUNDBROG, 1993). A camada mais interna de tecido conjuntivo é denominada endoneuro. Contém axônios e fibras de colágeno III orientadas longitudinalmente em relação ao axônio (GUTH, 1956; CAJAL, 1959; LUNDBORG, 1993; SCHIMDT & LEACH, 2003) (Figura 1).



**Figura 1:** Organização geral do nervo periférico e seus compartimentos (Fonte: MARIEB & HOEHN, 2006).

## 2.2 Lesão nervosa periférica

As lesões de nervo periférico são classificadas em *neurotmesis*, que caracteriza o nervo completamente seccionado; a *axonotmesis*, lesão por esmagamento ou estiramento na qual ocorre degeneração periférica do segmento distal à lesão, e na qual a bainha e as estruturas de apoio mais íntimas do nervo não são perdidas; e a *neuropraxia*, descrita como um período de curta perda das funções motoras e sensitivas no nervo, sem alterações estruturais significativas (SEDDON, 1942).

Após uma lesão, há a interrupção da integridade dos axônios e formação de um coto proximal e distal e o desenvolvimento de um processo chamado degeneração Walleriana (DW), com duração de 24 a 48 horas (Figura 2). Os axônios do coto proximal se degeneram de modo retrógrado, e passam a produzir brotos colaterais que crescem em direção a substâncias tróficas produzidas pelo órgão denervado. No coto distal há a formação de um cone de crescimento e ocorre a DW. A DW é um processo caracterizado por uma sequência de eventos que envolvem degeneração, degradação da mielina e suporte à proliferação de células gliais (KOEPPEN, 2004; SIQUEIRA, 2007).

Durante DW as SC organizam-se em colunas celulares semelhantes a tubos, as Bandas de Büngner, que induzem e orientam o crescimento axonal em direção ao órgão alvo (SALONEM et al., 1987; YOSHII et al., 1987; ABERNITHY et al., 1994; FRISEN, 1997).



Há evidências de que o crescimento axonal ocorra com uma velocidade de 2,0 a 3,5 mm/dia em lesões do tipo neurotmesa (SIQUEIRA, 2007). O crescimento do cone é garantido por fatores de crescimento que permitem o alongamento, maturação e sobrevivência dos axônios. Esse suporte é fornecido pelas CS que servem como interface entre os axônios e a matriz extracelular do endoneuro (IDE, 1996). A membrana basal das CS é caracterizada por uma forma especializada de matriz extracelular, onde podem ser encontradas várias moléculas, como a laminina, a fibronectina, o colágeno tipo IV, o proteoglicano de sulfato de condroitina, e o proteoglicano de heparan sulfato, macromoléculas que são ativamente produzidas pelas CS (IDE et al., 1983; TIMPL & BROWN, 1996; ZUO et al., 1998; CHERNOUSOV & CAREY, 2000; THYBOLL et al. 2002).

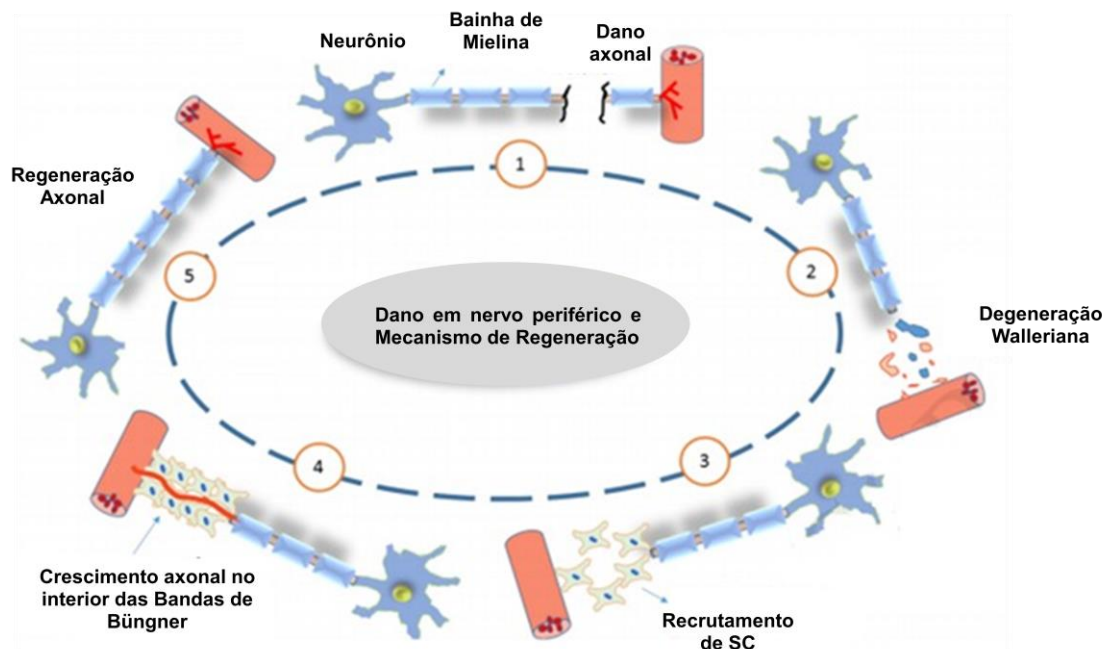
Além de proverem um substrato rico para o crescimento axonal através da síntese de fatores de crescimento para os axônios em regeneração, as SC realizam a mielinização dos axônios em brotamento promovendo a restauração da funcionalidade do nervo (LE BEAU et al., 1988; TANIUCHI et al., 1988; GARBAY et al., 2000; SCHIMDT & LEACH, 2003). Em casos em que há a regeneração do nervo, ocorre a mielinização dos axônios em um período médio de oito dias, no entanto, a regeneração funcional após a reparação nervosa é um processo complexo, envolvendo diversos fatores, como, a natureza e o nível da lesão, o tempo de denervação, o tipo e diâmetro das fibras nervosas afetadas, a idade do indivíduo e outras variáveis individuais (SIQUEIRA, 2007).

Portanto, durante o reparo periférico as CS são induzidas a se desdiferenciar num processo que envolve regulação negativa dos genes de mielina combinados a um conjunto de fenótipos pró-regenerativos que incluem o aumento da regulação de fatores tróficos e citocinas, eliminação da mielina e recrutamento de macrófagos (JESSEN & MIRSKY, 2016).

Ainda não há um conhecimento profundo dos mecanismos básicos de mielinização, crescimento e orientação das fibras regeneradas. Uma dificuldade encontrada nas pesquisas está em estabelecer um método experimental para avaliar a regeneração de nervo periférico. Nesse sentido, nem sempre se pode constatar uma boa correlação entre os diversos métodos existentes ou, até mesmo, entre o mesmo método aplicado por autores diferentes (MONTE-RASO, et al., 2006). Para proporcionar uma regeneração mais rápida e eficaz, são empregados, dependendo do caso, procedimentos cirúrgicos simples, como a sutura, ou para lesões mais extensas o tratamento padrão consiste em procedimentos cirúrgicos de aloenxertos e autoenxertos (LEE & WOLFE, 2000). O autoenxerto apesar de ser o tratamento padrão, apresenta como limitações a necessidade de realização de um procedimento cirúrgico

para retirada do nervo doador, gerando déficit sensitivo no local, além de haver restrição de sítios doadores.

Também estão sendo testados outros procedimentos como o ultrassom (MONTE-RASO et al., 2006), a laserterapia (ENDO, 2008) e técnicas de tubulização, sendo que neste último, para a confecção dos tubos, são usados diversos tipos de materiais e, dentro deles, podem ser introduzidos vários elementos para teste da tentativa de uma melhora na regeneração, como células tronco por exemplo (COLOMÉ et al., 2008), fibroblastos e fatores de crescimento (IKEDA et al., 2013), hormônios (PENAIITE & BARAKAT-WALTER, 2010).



**Figura 2:** Mecanismo de regeneração após lesão nervosa periférica (Fonte: SHAKER et al., 2018).

### 2.3 Tubulização do nervo periférico

A tubulização é uma técnica alternativa ao tratamento padrão e demonstra-se eficiente quando a distância que separa os dois cotos não excede 5mm (DAHLIN & LUNDBORG, 2001). O processo da tubulização consta de uma prótese tubular em que o coto distal e proximal são introduzidos e fixados através de pontos cirúrgicos em suas extremidades, permitindo um realinhamento dos cotos, deixando-se um espaço de poucos milímetros entre os mesmos, geralmente 10mm de extensão (LUNDBORG et al., 1994; LABRADOR et al., 1995; LUNDBORG et al., 1997; LUNDBORG et al., 2004; PIERUCCI et al., 2004). Os

objetivos desta técnica são criar um ambiente favorável à regeneração, orientar o crescimento das fibras em direção ao coto distal, proteger as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitar a formação de neuromas.

É importante ressaltar que a técnica da tubulização apresenta algumas desvantagens. Uma delas é a elevação gradativa da pressão no interior da prótese, à medida que o nervo regenerado aumenta em espessura. Como resultado, dificulta-se a vascularização, o que resulta em degeneração axonal secundária (FIELDS et al., 1989; TERRIS et al., 1999). E, outro fator limitante consiste na distância máxima entre os cotos, que não pode ser superior a alguns milímetros (LUNDBORG, 1982; DAHLIN & LUNDBORG, 2001; SCHIMDT & LEACH, 2003; PIERUCCI et al., 2004).

Atualmente, vários materiais sintéticos não degradáveis têm sido usados no reparo do nervo periférico, sendo o silicone o mais comum. Este se mostrou eficiente em vários ensaios quando a distância entre os cotos não excedia os 10 mm (LABRADOR et al., 1998; LUNDBORG et al., 2004). Apresenta a vantagem de ser um material inerte e impermeável, isolando o nervo do tecido cicatricial, porém, há a necessidade de uma intervenção cirúrgica posterior para a retirada do tubo.

## **2.4 Plantas medicinais**

Plantas medicinais constituem a base dos sistemas de saúde em muitas sociedades. A validação da eficiência da fitoterapia ou de plantas medicinais como tratamento complementar permite o resgate e valorização dos conhecimentos tradicionais (MACHADO et al., 2014). Além disso, o baixo custo e o fácil acesso do conhecimento popular estimulam o uso desses recursos, podendo compensar a falta crônica de medicamentos para muitas populações carentes (LEITE, 2010).

O Brasil representa a maior diversidade vegetal do planeta e detém ampla sociodiversidade. Portanto, constitui uma importante fonte de recursos para o desenvolvimento da fitoterapia (SALES et al., 2015). Além do Brasil, Cuba, Índia, Jordânia e México são exemplos de países que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição no uso de plantas medicinais (AHMAD & BEG, 2001; MAHASNEH et al., 1999 ; MART'INEZ et al., 1996; NAVARRO et al., 1996). Estudos estimam que aproximadamente 20% da totalidade da espécies de plantas existentes no planeta apresentam algum tipo de propriedade terapêutica (RODRIGUES, 2016).

Apesar da ampla difusão dos conhecimentos populares sobre plantas medicinais é importante salientar que são passados ao longo das gerações, o que torna frequente, a divergência de informações com relação ao uso, efeito e preparo. A segurança da informação é importante uma vez que o manuseio equivocado pode acarretar a perda do princípio ativo e consequente ineficiência do consumo, além de possíveis efeitos nocivos devido à toxicidade de algumas plantas.

Em razão do crescente interesse, em 2006, o Ministério da Saúde (MS) criou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) através do Decreto nº 5.813, que consiste num mecanismo que permite a população brasileira o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006). Todavia, dez anos após a criação do PNPMF, estudos ainda indicam o desestímulo para o desenvolvimento de fitoterápicos a partir da biodiversidade brasileira (OLIVEIRA & ROPKE, 2016). Fatores como falta de preparo dos profissionais da saúde, crença na natureza inócua das plantas medicinais e fitoterápicos está relacionada a esse mau desempenho (LEAL & TELLIS, 2015). Apesar disso, muitos estudos têm sido realizados contribuindo para o resgate do conhecimento tradicional e a descoberta de medicamentos e compostos promissores para tratamento de diversas enfermidades (MACIEL et al., 2017; NASCIMENTO et., 2017; MELO et al., 2018).

Muitos estudos revelam que biomas brasileiros, como o Cerrado, a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica, têm sido usados como fonte medicamentos naturais por populações locais no tratamento de doenças tropicais, incluindo leishmaniose, malária, esquistossomose e as infecções fúngicas e bacterianas (ALVES et al., 2000; LEITE, 2010).

## **2.5 Plantas medicinais e tecido neural**

Muitos extratos e óleos essenciais isolados a partir de plantas demonstraram exercer atividade biológica *in vitro* e *in vivo*. No que tange o efeito neuroprotetor e a ação positiva de plantas na regeneração ou proteção do tecido neural, diferentes neuroestimuladores tem sido utilizados tanto no SNP quanto SNC.

Nesse contexto, estudos identificaram a atenuação da neurotoxicidade do peptídeo beta-amilóide (A $\beta$  25-35) e a recuperação de neurônios com a utilização de Wen-Dan- Tang (LIU et al., 2009). Princípios ativos presentes no extrato da folha fresca de *Centella asiática*

foram eficazes para estimulação do crescimento de dendritos (MOHANDAS RAO et al., 2006).

Com relação à neuroproteção, estudos comprovaram que o extrato de folhas de *Ginkgo biloba*, o bilobalido, apresentou atividade neuroprotetora e foi capaz de auxiliar na regeneração do nervo ciático de ratos (CHEN et al., 2004; DEFEUDIS, 2002) e na prevenção do Mal de Alzheimer (ENGELHARDT et al., 2005). A atividade anti-inflamatória foi notada na espécie *Physalis angulata*, a qual sugere-se estar relacionada a ação neurogênica aumentando as chances de regeneração do tecido neural (BASTO, 2008; SANTANA et al., 2018).

Estudos demonstraram a influência de plantas sob a síntese de fatores de crescimento. Foi evidenciado que o ginsenosídeo Rb1, componente do *Ginseng radix*, foi capaz de influenciar a expressão de fatores neurotróficos durante o processo regenerativo periférico (CHEN et al., 2002). E o extrato com de *Paeoniae alba radix* também pode ser um fator de promoção do crescimento de nervo (KUN-SHAN et al., 2011). O ácido carnósico, um dos componentes da espécie *Rosmarinus officinalis* também conhecida como alecrim, está envolvido na síntese do fator de crescimento neuronal, necessário ao crescimento e manutenção do tecido nervoso (ESSA et al., 2016).

## **2.6 *Aristolochia cymbifera* (*A. cymbifera*)**

A família Aristolochiaceae compreende mais de sete gêneros de plantas, dos quais os mais importantes são *Aristolochia* e *Asarum* (TREASE & EVANS, 1980). Do gênero *Aristolochia*, provém em torno de 300 espécies de plantas, dentre as quais se destacam *Aristolochia triangularis* e *Aristolochia cymbifera* (SIMÕES et al., 1986).

A *A. cymbifera* popularmente conhecida como "cassáú", "cipó-mil-homens", "jarrinha" ou "papo de peru" é uma planta trepadeira perene, sem gavinhas, de ramos finos e flexuosos, com folhas simples de consistência membranácea, flores solitárias verde-amareladas, com nervuras castanho-avermelhadas de até sete centímetros de comprimento (Figura 3). Apresenta odor desagradável, próprio para atrair insetos. É nativa do Brasil, das Guianas até Minas Gerais e São Paulo, sendo mais adaptada aos ambientes quentes (TABACH et al., 2013).



**Figura 3:** *Aristolochia cymbifera* (Fonte: LORENZI E MATOS, 2008).

Alguns estudos constataram que a infusão de raiz e do caule da *A. cymbifera* são muito usados no Brasil e em outros países da América do Sul por sua ação diurética, sedativa, estomática e no alívio de sintomas do reumatismo (TABACH et al., 2013). Adicionalmente, no Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia foi desenvolvido um estudo sobre a ação dessa planta em modelos de epilepsia que mostrou efeitos benéficos (ANDRADE et al., 2015).

Estudos fitoquímicos com a planta evidenciaram a presença de estruturas químicas bem diversificadas, destacando-se terpenoides (mono e sesquiterpenos, nas folhas, e, diterpenos, estes no caule), lignoides, flavonoides, ácidos graxos e constituintes nitrogenados (alcaloides e nitrofenantrenos), além de ácidos aristolóquicos (TABACH et al., 2013). Os ácidos aristolóquicos são correlacionados à toxicidade da planta, sendo nefrotóxicos e carcinogênicos (TABACH et al., 2013). Contudo, a *A. cymbifera* tem sido utilizada em medicamentos à base de plantas por longo tempo, e, carcinomas resultantes da sua utilização só apareceram muitos anos mais tarde, dificultando uma correlação com o uso desta planta (TABACH et al., 2013). Devido essas informações, a Agência Européia de Medicamento vem proibindo a comercialização de produtos à base de plantas que sabidamente contém estes ácidos aristolóquicos (RAUBER, 2006). Além disso, a agência Americana *Food and Drug Administration* (FDA) vem advertindo consumidores em relação a continuidade do uso de produtos que contenham ácidos aristolóquicos (TABACH et al., 2013; ROZAINI ABDULLAH et al., 2017).

Um trabalho realizado no Instituto de Genética da Universidade Federal de Uberlândia mostrou função neuroprotetora do extrato alcoólico da *A. Cymbifera* em modelo de moscas para epilepsia intratável (*Drosiphila melanogaster*) e no hipocampo de camundongos tratados com peçonha neurotóxica (ANDRADE et al., 2015). Nesse estudo, o extrato da planta reduziu

significativamente o tempo de crise epilética em todos os tempos analisados (24, 48 e 72 horas após a administração da solução). Os mesmos autores procederam, ainda, com o tratamento do extrato alcoólico de *A. cymbifera* sobre fatias de hipocampo de camundongos tratados com peçonha de cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) que tem efeito convulsionante e induz excitotoxicidade no SNC. A planta não apresentou efeito tóxico e, quando administrada juntamente com a peçonha, foi capaz de proteger células neurais nas culturas de hipocampo, (ANDRADE et al., 2015).

Diante do efeito sobre o SNC visto nesse trabalho, nosso estudo teve como objetivo avaliar o potencial de ação neuroprotetora periférica da *A. cymbifera* em lesões nervosas periféricas. Não há na literatura estudos que demonstram tal ação da *A. cymbifera* e esse atributo pode ser usado na prática clínica como monoterapia ou adjuvante das técnicas protocoladas existentes para neuropatias de nervos periféricos como neuropatia diabética ou síndrome de Guillain-Barré e lesões traumáticas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar os efeitos do tratamento com extrato etanólico de *A. cymbifera* sobre a regeneração nervosa periférica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar após a tubulização e o tratamento com o extrato de *A. cymbifera*:

- A toxicidade renal e hepática;
- A reação das células de Schwann e o crescimento axonal;
- A recuperação funcional do nervo ciático;
- A mielinização.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), com o número de protocolo 132/16 (ANEXO A). Os procedimentos pelos quais os animais foram submetidos respeitaram a ética em pesquisa animal.

### 4.2 Animais e grupos

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos com idade de oito semanas com peso aproximado de 300g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU (CEBEA/UFU). Todos os animais foram submetidos à lesão e à tubulização do nervo ciático esquerdo. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram divididos e alocados de modo aleatório em dois grupos com 10 indivíduos cada: grupo controle e grupo tratado. Nesse último, foi realizada a administração por via oral do extrato bruto etanólico da *A. cymbifera*, enquanto que para o grupo controle foi administrada a solução placebo, contendo água filtrada e diluente, Tween 20. Durante o período do experimento, os animais foram mantidos no Depositário de Animais da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS), em gabinetes com controle de temperatura, de umidade e de ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à ração.

### 4.3 Preparação e administração do extrato bruto etanólico

Fragmentos de caules secos de *A. cymbifera* foram coletados na área rural da cidade de Uberlândia, Brasil. O *voucher* do espécime de *Aristolochia cymbifera* está depositado no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (76869).

O material botânico foi devidamente seco e, posteriormente, submetido a processos de trituração, mantido em etanol em repouso ao abrigo da luz por sete dias e em seguida, filtrado. Após a filtração foi obtido o extrato concentrado. Objetivando a obtenção do extrato bruto etanólico (EBE), os solventes foram removidos sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 45°C, o extrato seco foi acondicionado em frasco vedado a -20°C.

O tratamento constituiu na administração de uma solução de EBE para o grupo tratado e uma solução placebo para o grupo controle. Para tanto, a solução destinada ao grupo tratado

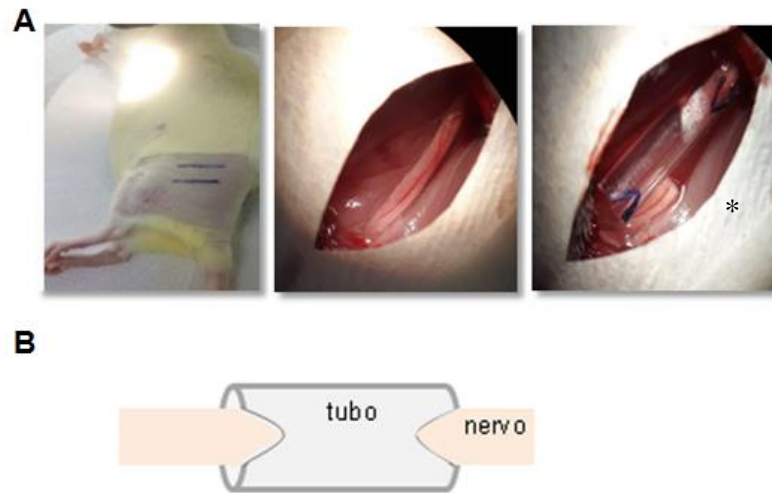
foi preparada com 25mg/L de água filtrada diluído em 0,1% de Tween 20. Já a solução placebo do grupo controle foi constituída somente de água filtrada e mesma quantidade de Tween 20 utilizada na solução do grupo tratado. As soluções foram administradas por via oral e disponibilizadas em bebedouros.

Os animais dos dois grupos utilizados no estudo foram agrupados em caixas. Desse modo, cada caixa recebia uma garrafa contendo 300 ml do tratamento (extrato alcoólico ou placebo) e uma garrafa contendo 400 ml de água filtrada. A disponibilização dos volumes de água e tratamento foi realizada respeitando o intervalo de 48 horas. Passado esse período, eram feitas as trocas das garrafas e os volumes residuais eram anotados. O tratamento durou 60 dias.

#### **4.4 Lesão do nervo ciático e tubulização**

Para o procedimento de tubulização foi utilizado um tubo de silicone com 0,8mm de diâmetro e 10mm de comprimento. Com auxílio de uma lupa cirúrgica e bisturi foram padronizadas as medidas de comprimento e de aberturas triangulares nas extremidades do tubo. Tais aberturas foram feitas de modo que o vértice de cada triângulo atingisse 2mm no interior do tubo (Figura 4).

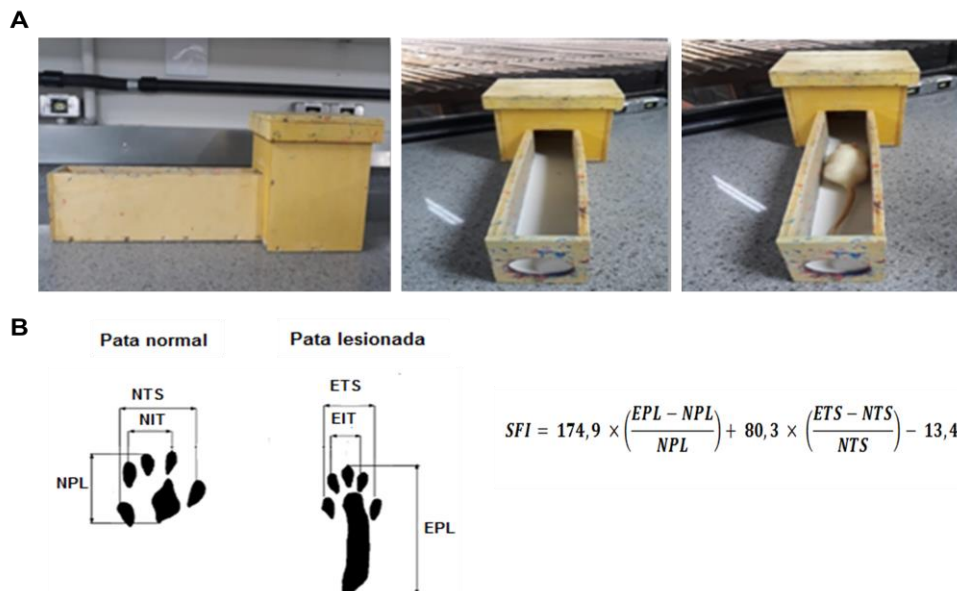
Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina/cetamina (15mg/kg e 100mg/kg, intraperitoneal). Posteriormente, foram submetidos à tricotomia e à assepsia da coxa esquerda com álcool 70% v/v. Em seguida, foram colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico. Foi realizada a incisão da pele e o afastamento da musculatura, o nervo ciático foi exposto e transecionado. Após a retração, cada coto foi introduzido 3mm no interior do tubo de silicone ultrapassando o vértice da abertura triangular presente no tubo e deixando um espaço de 4 mm de separação entre eles (Figura 4). Os cotos foram fixados com cianoacrilato (LIANG et al., 2014). Encerrado o procedimento de tubulização, foi realizada a união do plano muscular e a sutura da pele com ponto cirúrgico simples descontínuo utilizando fio mononylon 4-0, Ethicon.



**Figura 4:** A- Etapas do procedimento de tubulização demonstrando local da incisão, exposição do nervo ciático, transecção e colocação do coto proximal no túbulo (\*), respectivamente. B- Esquema do tubo com os vértices e os cotos nervosos inclusos.

#### 4.5 Avaliação funcional motora do ciático – SFI

Para avaliação funcional do ciático foi utilizado o protocolo de Bain et al.,(1989). Na semana anterior ao procedimento cirúrgico, os animais foram expostos ao aparato de dimensões 23x21x68cm a fim de permitir a ambientalização ao dispositivo, bem como o treinamento para a execução do teste funcional (Figura 5A).



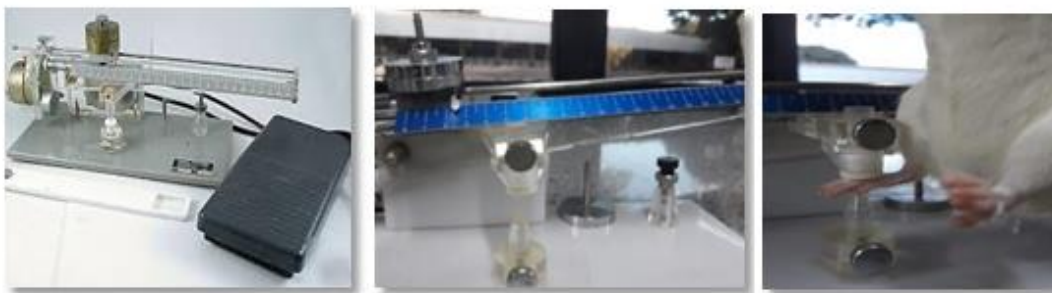
**Figura 5:** A- Aparato utilizado na execução da avaliação funcional do ciático (SFI). B- Impressão plantar da pata sem lesão e com lesão respectivamente apresentando as medidas adquiridas e a fórmula utilizada para o cálculo do SFI.

Para realização do teste, uma folha de papel com dimensões 7,0x29,5cm foi colada dentro do corredor do aparato e as patas traseiras dos animais pintadas com tinta atóxica. O animal era então, induzido a entrar no dispositivo deixando ao caminhar, suas impressões plantares no papel. Ao final da semana de treinamento, foi registrado o primeiro teste correspondente ao controle. Na semana seguinte, os animais foram submetidos à lesão nervosa e, portanto, não houve aplicação do teste, sendo reiniciado sete dias após a cirurgia e mantido uma vez por semana durante os 60 dias após lesão.

As tiras de papel contendo as impressões foram digitalizadas em *scanner* e analisadas com o programa UTHSCSA ImageTool. Os parâmetros comprimento da pegada (PL, *print length*) e abertura total dos dedos (TS, *intermediate toes spread*) foram considerados nas impressões coletadas e inseridos na fórmula SFI (Figura 5B). A pontuação obtida no teste anterior à lesão foi considerada como 100% da função, ou seja, correspondente à integridade do nervo, sendo as demais pontuações consideradas porcentagens negativas relativas às perdas funcionais em relação à pontuação inicial.

#### **4.6 Avaliação funcional sensitiva do ciático – Randall & Selitto**

Para avaliação sensitiva do nervo ciático foi utilizado o teste comportamental de Randall & Selitto (1957). O teste avalia a hipernocicepção por meio de um analgesímetro. O pé do animal é colocado sob uma ponteira que gera um aumento linear da força em gramas sobre a superfície plantar do pé do animal (Figura 6). O aumento linear é mantido até que o mesmo gere uma resposta de retirada da pata caracterizando a força necessária para indução de uma resposta aversiva a um estímulo mecânico. Os dois pés foram avaliados, e assim como no teste motor, os animais também foram treinados e ambientalizados ao equipamento na semana anterior à realização da lesão, e no final da mesma, realizado o teste controle. O teste sensitivo foi realizado individualmente em todos os animais uma vez por semana durante todo experimento. Foi garantido que o teste sensitivo e motor acontecessem em dias distintos.



**Figura 6:** Aparato utilizado na execução do teste Randall e Selitto.

#### 4.7 Eutanásia dos animais e processamento dos tecidos

Findo os 60 dias após a tubulização, os animais foram anestesiados com a mesma mistura anestésica utilizada no procedimento cirúrgico e submetidos à eutanásia com aprofundamento da anestesia. Em seguida, foi realizada a torotomia e perfusão transcardíaca com solução salina tamponada (50 mL de tampão fosfato com 0,9% de NaCl, 0,1M, pH 7,4; PBS) e solução fixadora (50 mL de formaldeído 3,7% ou Karnovsky). Com auxílio de material cirúrgico adequado e lupa, foram extraídos os nervos ciáticos de ambos os lados, contra e ipsilateral à lesão, rins e fígado. Todo o material extraído foi mantido em solução fixadora por 24 horas em temperatura de 4°C.

Após o período de fixação, os nervos destinados à imunofluorescência foram desidratados em sacarose 20%, incluídos em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congelados em -40°C em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. A partir dos blocos congelados com o material, em criostato (-25°C, Microm, Heidelberg, Germany), foram obtidos cortes histológicos longitudinais com espessura de 10µm. As secções do material foram transferidas para lâminas gelatinizadas, sendo estas armazenadas em -20°C até o início do procedimento de imunofluorescência.

Após a fixação, os nervos destinados à microscopia de luz foram pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio 1%, diluído em PBS 0,2M, pH 7,4. Passado esse período, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescente de álcool e acetona e incluídos em resina epóxi (EMbed 812 EMS). Os blocos foram desbastados e as secções transversais semifinas (0,5µm) obtidas foram coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação ao microscópio de luz sob o qual foi realizada a contagem de fibras e a análise morfométrica dos nervos. Escolheu-se um nervo representativo de cada grupo para documentação em microscópio eletrônico de transmissão (MET). Para tanto, foram realizados cortes ultrafinos (500Å serão; Ultramicrotomo LKB, Bromma 8800) os quais foram coletados em telas de cobre (200 Mesh). Após contraste em acetato de uranila

e citrato de chumbo, os espécimes foram observados ao microscópio eletrônico Zeiss Leo 906, operando a 60kv. Cinco áreas de cada nervo foram documentadas para cada animal.

Rim e fígado, após a fixação, foram submetidos ao protocolo de desidratação, diafinização e inclusão em parafina. Em seguida, foi realizado o corte em micrótomo com espessura de 5µm e as lâminas contendo as secções dos tecidos foram armazenadas em temperatura ambiente até sua utilização.

Dos 10 animais de cada grupo, cinco nervos foram reservados para imunofluorescência e cinco nervos a microscopia de luz. Todos os rins e fígados coletados seguiram para análise histopatológica.

#### 4.8 Imunofluorescência

As lâminas com os cortes de nervo foram colocadas em temperatura ambiente para a climatização, imersas e lavadas por três vezes em PBS 0,1M. Para o bloqueio das ligações inespecíficas do anticorpo, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com 150µl de solução albumina bovina 5% PBS 0,1M, pH 7,4 por 1 hora e 30 minutos. Após esse período, os anticorpos primários foram aplicados e incubados *overnight* a 4°C em câmara úmida.

Terminado o período de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01M, pH 7,4 e incubadas protegidas da luz com os anticorpos secundários conjugados à partícula fluorescente (Alexa Fluor 488 ou 594, Jackson Laboratories, USA) por 1 hora e 30 minutos. Os espécimes foram lavados em PBS 0,1M, pH 7,4 e montados com lamínula em glicerol/PBS (1:1). As lâminas prontas foram observadas em microscópio de fluorescência (TS-100, Nikon) acoplado à câmara fotográfica digital e o material foi documentado utilizando-se os filtros para fluoresceína (488nm) e rodamina (594nm). Na tabela abaixo estão listados os anticorpos primários utilizados para nervo.

**Tabela 1:** Descrição dos anticorpos primários utilizados.

<b>Anticorpo</b>	<b>Descrição</b>
Camundongo anti-neurofilamento (1:200, Sigma)	Proteína do citoesqueleto de axônios
Coelho anti-S100 beta (1:200, Santa Cruz)	Proteína de receptor cálcio dependente presente em células de Schwann
Coelho anti-NGFR-p75(1:200, Santa Cruz)	Receptor de fator de crescimento de nervo (NGF) produzido pela célula de Schwann

Três melhores resultados de cada grupo foram analisados para anti-S100 $\beta$  e anti-NGFRp75, sendo capturada uma imagem de cada nervo, direito e esquerdo, com a objetiva de 20x. Para neurofilamento, as imagens dos nervos foram capturadas utilizando a objetiva de 10x. As análises das imagens com marcação anti-neurofilamento foram realizadas de modo qualitativo, ao passo que as imagens referentes às marcações anti-S100 $\beta$  e anti-NGFRp75 foram usadas para quantificação da densidade de pixel através do software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). Considerando os nervos de ambos os lados, direito e esquerdo, foi calculada a média e a partir dela a razão lado esquerdo (lesionado)/lado direito (íntegro). Para a comparação, foi admitida também, a média aritmética por grupo (controle e tratado). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP).

#### 4.9 Contagem das fibras e morfometria

A contagem de fibras foi realizada de forma a se identificar fibras com mielina íntegra (fibras regeneradas) e fibras com a mielina deformada (fibras em degeneração). Ao final foi calculada a média aritmética para cada animal e por grupo.

A análise morfométrica considerou os parâmetros: diâmetro das fibras mielínicas [DFM], diâmetro dos axônios mielínicos [DAM], espessura da bainha de mielina [EBM] e razão "g" [RZG] ( $RZG = DAM/DFM$ ). O comportamento das SC foi avaliado a partir dos valores da EBM e da RZG, e a resposta regenerativa axonal pelos resultados DFM e DAM.

A EBM é um parâmetro que ilustra diretamente o nível de atividade fisiológica das SC durante a regeneração, estando também relacionado à recuperação funcional do nervo, tendo sido utilizado na avaliação da evolução do processo regenerativo axonal por diversos autores (LUNDBORG *et al.*, 1982; OLIVEIRA & LANGONE, 2000). A RZG corresponde ao quociente entre DAM e DFM, é um parâmetro morfométrico que expressa a relação que se estabelece entre a SC e o axônio durante a regeneração funcional do nervo (SMITH & KOLES, 1970; WAXMAN, 1980). Cinco campos representativos de cada nervo foram digitalizados com o auxílio de uma vídeo câmera digital (Olympus UCmad- 2) conectada a um microscópio olympus BX60 (Obj. 100x). A partir deles foi realizada a obtenção das medidas do diâmetro das fibras e dos axônios mielínicos. Estas foram obtidas a partir dos valores dos respectivos perímetros (P), aplicando-se a fórmula  $D=P/\pi$ . A diferença entre o DFM e o DAM fornece a EBM (MAYHEW & SHARMA, 1984). A morfometria foi realizada empregando-se um sistema computadorizado, utilizando-se o programa Image Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics).

#### **4.10 Estatística**

Foi realizada a análise descritiva e avaliada a distribuição dos dados. Diante dos resultados descritivos foi escolhido o teste mais adequado, considerando o nível de significância  $p < 0,05$  (\*). Os dados foram apresentados como Média  $\pm$  Desvio Padrão. Para análise e construção dos gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 4.0.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ingestão e toxicidade de *A. cymbifera*

O consumo de *A. cymbifera* ou da solução placebo foi realizado por meio da ingestão das soluções preparadas e colocadas nos bebedouros. Ao final do tratamento, os valores residuais permitiram o cálculo da ingestão média por animal das soluções e de água filtrada em 48 horas. Durante as trocas foi verificada a redução do volume de ambas as garrafas (água e tratamento) disponibilizadas confirmando a aceitação e o consumo. Os valores médios são apresentados na Tabela 2. A partir dos resultados, verificou-se que não houve diferença significativa entre os volumes médios consumidos entre os grupos.

**Tabela 2:** Ingestão média do diluente Tween, EBE de *A. cymbifera* e água por animal no intervalo de 48 horas.

Consumo/animal/48horas	Tween	EBE <i>A. cymbifera</i>	Água filtrada
<b>Tratado</b>	63µl	1,6mg	63ml
<b>Controle</b>	67µl	-	64ml

A ausência indícios de lesão tecidual após o tratamento de *A. cymbifera* administrada aos animais foi confirmada por avaliador “cego” que realizou a análise histopatológica de rim e fígado. A avaliação, conforme laudo anexado (Anexo B) revelou que as estruturas de rim e fígado estavam bem preservadas nas áreas analisadas.

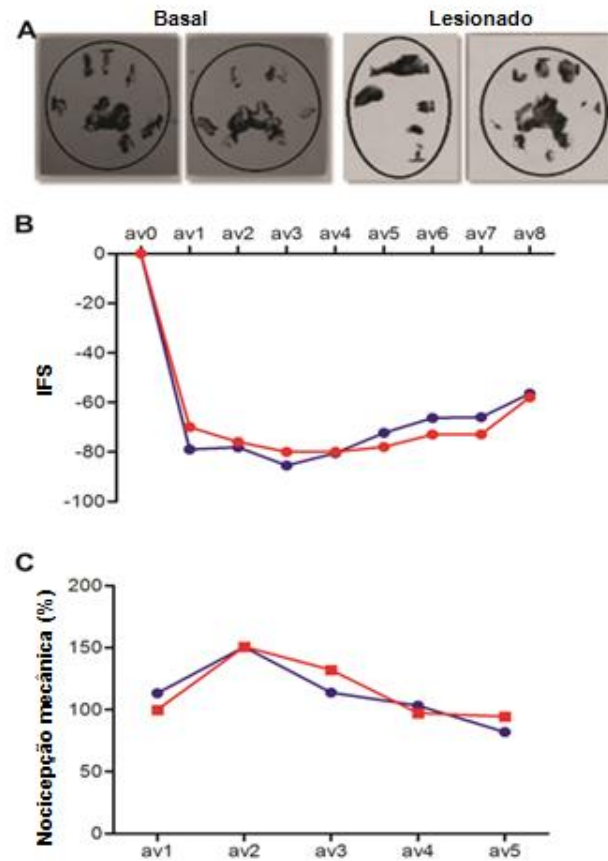
### 5.2 Avaliação funcional

A avaliação funcional do nervo ciático foi realizada por meio da análise da função motora dada pelo teste SFI e sensitiva pelo teste Randall e Selitto. Num primeiro momento foi planejada a execução semanal de ambos os testes. Todavia, durante o experimento foi observado eventos de automutilação da pata lesionada em ambos os grupos. Esse comportamento também foi descrito por outros autores que atribuem esse estado a uma possível geração espontânea de impulsos nos brotos axonais em regeneração. (SARIKCIOGLU et al., 2008). Uma vez iniciado tal comportamento, tornava-se progressivo. Nesses casos, os animais que apresentaram automutilação, foram eutanasiados, evitando o

sofrimento. Por esse motivo, na tentativa de mantermos a continuidade dos testes, optamos por preservar nossos animais suspendendo algumas avaliações sensitivas, por ser considerada mais estressante do que o SFI, vista a necessidade de imobilização do animal durante o teste.

Com relação à função motora, após a lesão nervosa foi observado que os animais apoiavam-se menos sobre a pata esquerda, resultando em uma alteração do padrão normal de passadas obtidas no teste controle. Além disso, os dedos da pata lesionada apresentavam-se em completa adução, resultado este, representado no teste motor pela diminuição da medida de TS (Figura 7A). A análise do teste motor durante o experimento está representada na Figura 7B. A primeira pontuação (av0) representa a integridade ou teste controle. As demais pontuações (av1-av8) correspondem às avaliações ocorridas após lesão nervosa. Após a lesão, os resultados indicam que ambos os grupos apresentaram redução similar da pontuação no teste, sem diferença estatística entre os pontos (teste t;  $p > 0,05$ ).

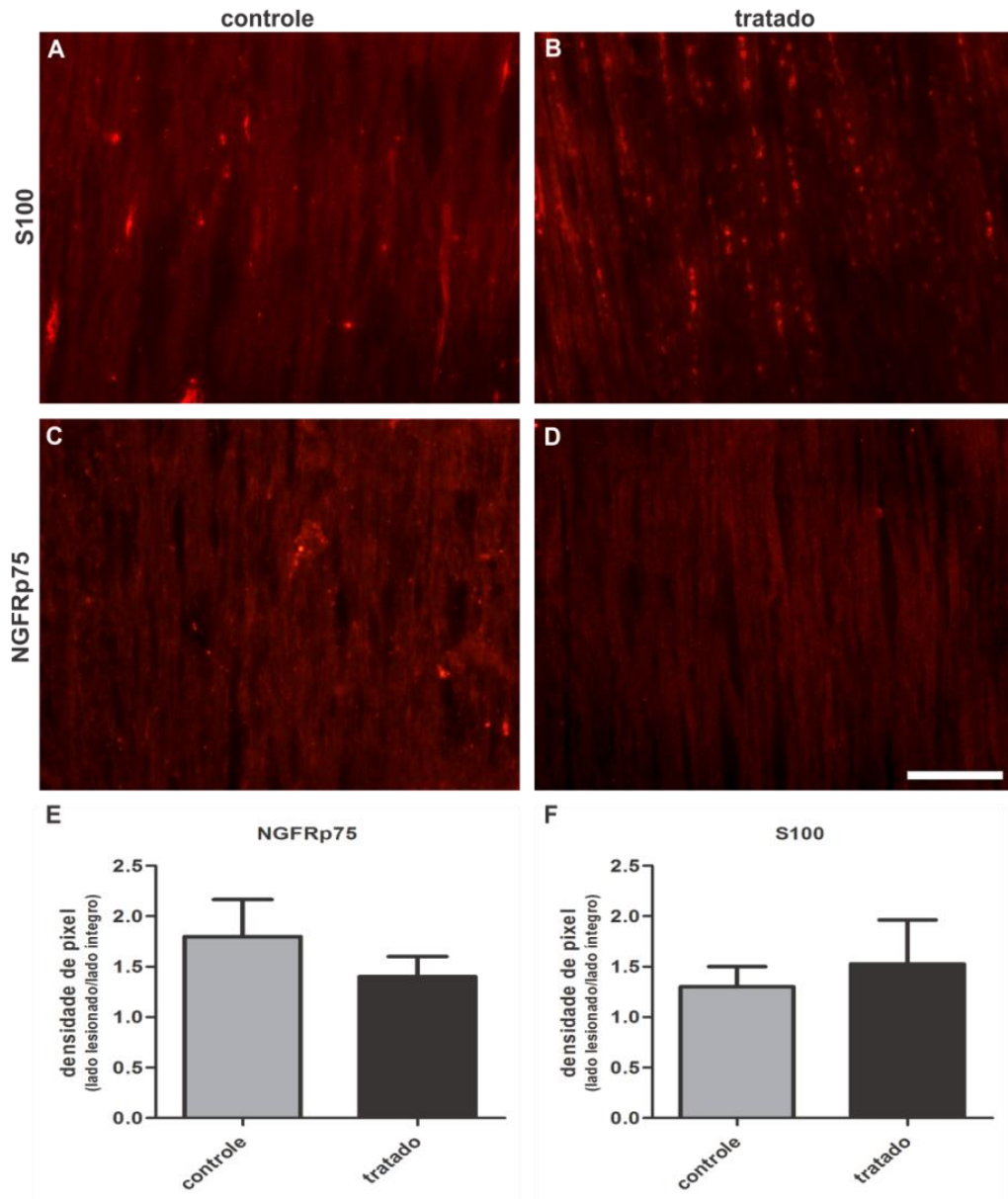
Relativo à função sensitiva, o teste Randall e Selitto avaliou o limiar nociceptivo dos animais. Os resultados são apresentados na Figura 7C. O teste controle indica que a força necessária para uma resposta contra um estímulo mecânico entre os grupos foi similar. Após a tubulização (av2), quando submetidos à carga superior ao suportado no teste controle e mantidos com aumento progressivo do mesmo, os animais não demonstraram nenhum esboço de reação, caracterizando a ausência de função sensitiva do nervo lesionado. Devido a esse motivo, durante a realização do teste, foi padronizada a pontuação 12 como ausência de sensibilidade. Nas avaliações seguintes, observou-se apenas um retorno da sensibilidade, sem variação significativa entre os grupos (teste t;  $p > 0,05$ ).



**Figura 7:** Testes funcionais após lesão do nervo ciático e tratamento com *A. cymbifera*. **A-** impressões plantares da esquerda para a direita: pata direita, pata esquerda do animal controle, pata esquerda do animal tratado. **B-** Gráfico que mostra a evolução do SFI em relação ao tempo. Foram oito avaliações (av) no decorrer de dois meses pós lesão. Linha azul = grupo controle e Linha vermelha = grupo tratado. O ponto zero (0) corresponde ao SFI do nervo íntegro. **C-** Gráfico que mostra a evolução temporal da porcentagem do limiar de dor em relação ao limiar inicial. Linha azul = grupo controle e Linha vermelha = grupo tratado.

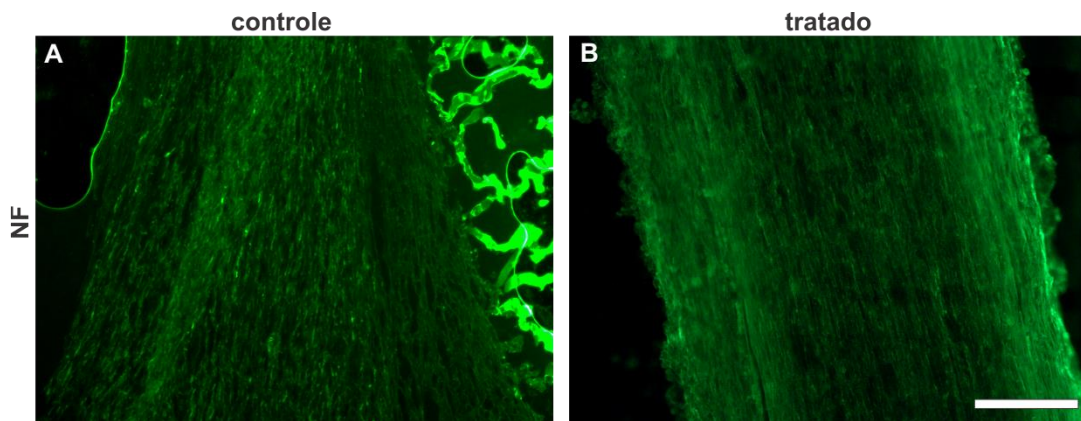
### 5.3 Imunofluorescência

A isoforma  $\beta$  da proteína S100 é encontrada no SNP principalmente após uma lesão nervosa. Enquanto, a presença de células de Schwann com fenótipo pró-regenerativo pode ser confirmada pela marcação anti-NGFRp75. Os resultados para esses dois marcadores são mostradas na Figura 8. A análise estatística não apontou diferenças entre os grupos. No entanto, existe uma tendência de menor expressão de NGFRp75 no grupo tratado com *A. cymbifera* (Figura 8F).



**Figura 8:** Imunomarcações em cortes longitudinais do nervo ciático. **A-B:** imunomarcação anti-S100 $\beta$ , nervo do grupo controle e tratado respectivamente. **C-D:** imunomarcação anti-NGFRp75, nervo do grupo controle e tratado respectivamente. Gráficos da relação da densidade de pixel da imunomarcação anti-S100 $\beta$  (**E**) e anti-NGFRp75 (**F**) entre os lados lesionado e íntegro. Teste U de Mann Whitney,  $p < 0,05$ . Barra cinza – grupo Controle, barra preta – grupo Tratamento. Escala= 100  $\mu$  m.

A manutenção da forma e estabilidade dos axônios são garantidas por um tipo de filamento intermediário denominado neurofilamento. A análise da integridade do citoesqueleto axonal foi verificada por meio da marcação dessa proteína (Figura 9). A imunomarcação obtida para neurofilamento foi similar em ambos os grupos, demonstrando semelhança com relação à disposição dos axônios, estando estes, de modo paralelo e linear. Outro ponto em comum consistiu na presença de lacunas no citoesqueleto (setas). Sendo que essas características apontam um fenótipo de nervo em recuperação.

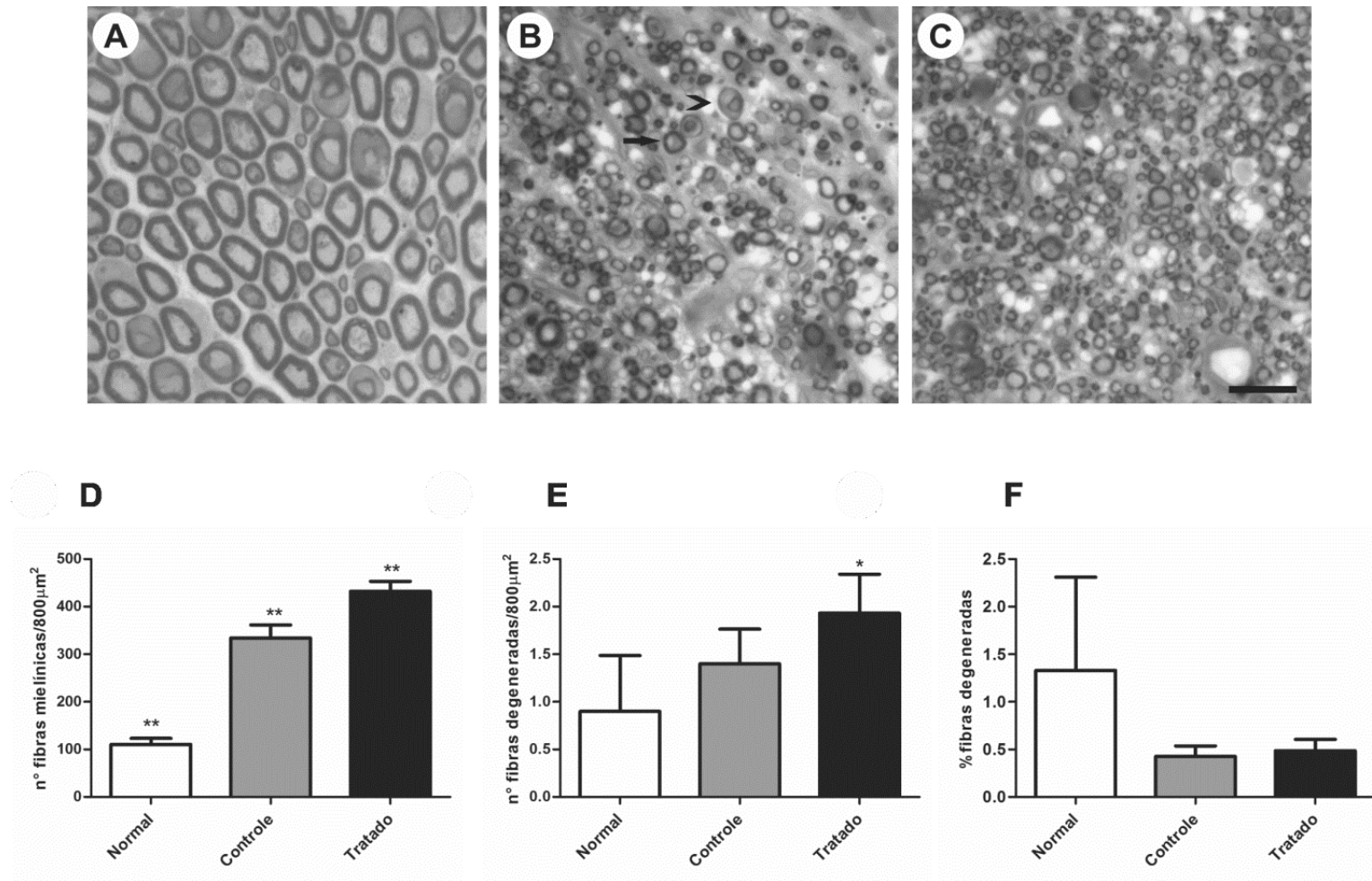


**Figura 9:** Imunomarcação anti-neurofilamento em cortes longitudinais do nervo ciático. **A:** nervo do grupo Controle e **B:** nervo do grupo Tratado. Setas brancas indicam lacunas no citoesqueleto. Escala= 100µm.

#### 5.4 Contagem das fibras e morfometria

Foi realizada a quantificação de fibras mielínicas regeneradas e em degeneração no nervo íntegro e nos nervos esquerdos dos animais dos grupos controle e tratado. A ocorrência de fibra mielínica foi maior nos nervos pós lesão nervosa quando comparados a quantidade de fibras presentes no nervo íntegro, sendo ainda, estatisticamente superior no grupo tratado com *A. cymbifera* (Figura 10D).

Com relação ao número de fibras degeneradas, foi observada a presença de um número maior desse tipo de fibras no grupo tratado quando comparado aos demais grupos, enquanto no nervo íntegro e controle não houve diferença significativa (Figura 10E). Adicionalmente, foi considerada a análise da porcentagem de fibras degeneradas em relação às íntegras mielínicas. Esses dados apontam uma maior presença relativa de fibras degeneradas no grupo normal. Todavia, estatisticamente não houve diferença significativa.



**Figura 10:** Contagem de fibras no nervo regenerado. **A-C:** fotomicrografias de nervo íntegro, nervo do grupo Controle e do grupo Tratado, respectivamente. **D-F:** gráficos referentes à **(D)** número de fibras mielínicas, **(E)** número de fibras degeneradas e **(F)** porcentagem de fibras degeneradas. (Teste Anova one way com pós- teste de Bonferroni). Barra branca- nervo normal (sem lesão), barra cinza – grupo Controle, barra preta – grupo Tratamento. A seta indica fibra mielínica e a cabeça de seta indica fibra em degeneração. Escala= 20μm.

Os resultados de média e erro padrão obtidos na análise morfométrica: diâmetro das fibras mielínicas (DFM), diâmetro dos axônios mielínicos (DAM), espessura da bainha de mielina (EBM) e razão “g” (RZG) são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Dados morfométricos

<b>Grupos:</b> <b>(MÉDIA±EP)</b>	<b>DFM</b>	<b>DAM</b>	<b>EBM</b>	<b>RAZÃO g</b>
Normal (N)	10.19±0.35	6.70±0.26	1.74±0.05	0.65±0.01
Controle (C)	4.69±0.10	3.10±0.06	0.78±0.03	0.66±0.01
Tratado (T)	4.28±0.08	3.02±0.12	0.70±0.02	0.67±0.01
Teste estatístico Anova <i>one way</i> com pós teste de Tukey:				
N x C	*	*	*	ns
N x T	*	*	*	ns
C x T	ns	ns	ns	ns

*Análise dos dados morfométricos dada por diâmetro da fibra mielínica (DFM), diâmetro do axônio mielínico (DAM), espessura da bainha de mielina (EBM) e Razão g, de nervo sem lesão ou Normal (N), nervo do grupo Controle (C) e nervo do grupo Tratado (T). Os resultados são apresentados como média±erro padrão. Teste Anova one way com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$  (\*).*

De modo geral, as diferenças observadas tanto quando olhamos para os axônios (DFM e DAM) como quando observamos o comportamento das SC (EBM e Razão g) foram detectadas apenas entre o grupo normal e os dois que sofreram lesão. Dessa forma, nenhuma diferença foi notada para o grupo tratado com *A. cymbifera*.

## 6 DISCUSSÃO

Devido à ampla distribuição do SNP, as lesões nervosas periféricas possuem elevada incidência. Esse sistema apresenta relativa plasticidade para regeneração (CHEN et al., 2007), o que fundamenta o desenvolvimento de pesquisas que investigam diferentes tratamentos alternativos, como por exemplo os recursos naturais (ANDRADE, 2015; REBAÏ, 2017; LOPRESTI, 2017). Nesse sentido, esse estudo buscou contribuir para o entendimento dos efeitos do tratamento com *A. cymbifera* sobre a regeneração periférica. A escolha da via oral de administração objetivou aproximar o tratamento oferecido aos hábitos de consumo popular, visto que *A. cymbifera* é uma planta principalmente ingerida sob forma de infusão (OLIVEIRA et al., 2015; MANGGINI et al., 2018).

A ausência de alterações na avaliação histopatológica de rim e de fígado dos animais (laudo no Anexo B) indicou que o volume da solução de EBE e a frequência de consumo foi bem tolerada, durante o período de 60 dias de sobrevivência. No entanto, muitos estudos comprovaram a existência de ácidos aristolóquicos no gênero *Aristolochia* associados a efeitos nefrotóxicos e carcinogênicos (CHEN et al., 2010). Por isso, embora a administração de *A. cymbifera* não tenha apresentado efeitos nocivos nesse estudo, a segurança da ingestão desse extrato ainda requer investigações à longo prazo.

Nesse estudo, foi avaliado o efeito da *A. cymbifera* durante a regeneração nervosa periférica. Para tanto, foi induzida a lesão do tipo neurotmesa seguida do procedimento de tubulização. Durante o experimento o comportamento de automutilação exigiu que a execução de testes funcionais fosse evitada em casos em que o animal apresentasse inchaço ou vermelhidão na pata, o que reduziu a quantidade de avaliações sensitivas, mas permitiu que a maior parte dos animais permanecesse até o fim do experimento e cumprisse, pelo menos, o teste motor.

O processo de regeneração foi evidenciado dentro do tubo após transecção completa do nervo ciático foi observada após 60 dias, corroborando com os resultados de experimentos anteriores, que demonstraram a eficácia da técnica de tubulização (COSTA et al., 2006; PENAITE & WALTER- BARAKAT, 2010). Apesar do crescimento do nervo após lesão, em termos práticos, a preocupação consiste no retorno funcional do nervo acometido. Assim, a funcionalidade do nervo regenerado foi avaliada pelos testes SFI e Randall e Selitto. Os resultados dos grupos controle e tratado indicaram prejuízo da função dos músculos inervados pelo ciático, o que foi observado pela alteração do padrão normal de marcha após lesão. Entretanto, estatisticamente o grupo tratado não se diferenciou do grupo controle. Portanto,



podemos concluir que o tratamento com *A. cymbifera* não melhorou o desempenho da regeneração sob o aspecto funcional. Porém, deve-se considerar que dentre os tipos de lesão periférica, esta é a que apresenta o pior prognóstico (GRIFFIN et al., 2014). Dessa forma, ainda que tenha sido identificada a regeneração após tubulização nesse estudo, o tempo de experimento pode ter sido insuficiente para que os axônios crescidos alcançassem o órgão-alvo e a recuperação funcional fosse estabelecida.

Além do crescimento visual do nervo, os indícios de regeneração foram constatados pelos ensaios de imunofluorescência, que revelaram a disposição de modo alinhado dos axônios, indicando que a regeneração estava em processo de desenvolvimento, condizente, portanto, com os resultados motores insatisfatórios discutidos anteriormente.

As marcações para os ensaios de imunofluorescência para neurofilamento foram similares, não havendo diferenças com relação ao citoesqueleto axonal de ambos os grupos. Da mesma forma, as imunomarcações para S100 $\beta$  e para NGFRp75 não obtiveram diferença significativa entre os grupos analisados. Ainda assim, foi possível observar que no grupo tratado houve uma tendência de menor marcação de NGFRp75. O aumento da expressão de NGFRp75 está associado a um conjunto de fenótipos pró-regenerativos adquiridos pelas células de Schwann durante o reparo periférico (MARTINS et al., 2005). Portanto, possivelmente menos CSs produtoras de fatores de crescimento estavam presentes nos nervos de animais tratados com a *A. cymbifera*. Sabe-se que as CS e células inflamatórias, destacando-se os macrófagos, interagem ativamente para orquestrarem a dinâmica dos processos que sucedem a lesão nervosa periférica (GOMEZ-SANCHES et al., 2015; FRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015). Tendo, a *A. cymbifera* efeito anti-inflamatório (MORENO, 1993; ESTEVES, 2017), possivelmente, essa planta poderia influenciar indiretamente as SC, induzindo alterações em expressões proteicas como o NGFRp75.

Na análise morfológica foi identificado um número menor de fibras mielínicas e degeneradas no nervo íntegro em relação aos grupos lesionados (controle e tratado). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que após uma lesão, ocorre o crescimento de diversos axônios a fim de que seja restabelecida a conexão com o órgão-alvo, sendo degenerados posteriormente aqueles que não atingirem esse objetivo (GÓRIO et al., 1983). Adicionalmente, constatou-se que nervos de animais tratados com *A. cymbifera* mostraram um aumento no número de fibras mielínicas regeneradas, sugerindo a capacidade do EBE de *A. cymbifera* em interferir no processo de regeneração do axônio periférico.

Essa constatação é considerada promissora, já que se pode inferir uma correlação entre o maior número de fibras mielínicas e a viabilidade da regeneração. Estudos sobre a relação

entre envelhecimento e regeneração periférica, demonstraram que a falha na regeneração pode ser explicada pela redução do número de axônios em decorrência do envelhecimento. Como consequência dessa limitação, há um menor número de axônios regenerados viáveis para restabelecer a conexão com o órgão alvo e, portanto, alcançar a recuperação funcional (VERDÚ et al., 2000). Nesse sentido, é possível considerar que a maior quantidade de fibras mielínicas regeneradas observadas após a administração de EBE de *A. cymbifera*, está relacionada a uma maior probabilidade restabelecimento da inervação com órgão alvo e, conseqüentemente, recuperação funcional futura.

A morfologia do nervo regenerado foi avaliada quanto ao diâmetro dos axônios e fibras (DAM e DFM) e à espessura da mielina (EBM). Entre os grupos com lesão não houve diferença significativa, porém ambos apresentaram redução do diâmetro do axônio e da espessura da mielina em relação ao nervo íntegro, sem lesão. O que era esperado, uma vez que, após a lesão, há diminuição do diâmetro axonal e a mielina está sendo reconstruída (FRAHER & DOCKERY, 1998). Sabe-se que a maturação completa da fibra nervosa é dificilmente obtida, pois o aumento do seu diâmetro médio não atinge a integridade do nervo normal, mesmo em casos em que a recuperação funcional seja restabelecida (ANSSELIN et al., 1997). Portanto, a redução aqui observada não representa um fator limitante ao retorno funcional. Em nosso trabalho, a recuperação da função motora não foi alcançada provavelmente pelo pouco tempo de observação experimental que, de um lado, atende observar-se alterações morfológicas entre grupos, mas, por outro lado, não garante um período suficiente para que os axônios recém-formados alcancem o órgão denervado.

Não há consenso na literatura sobre o tempo ideal para que a regeneração nervosa seja identificada experimentalmente após neurotome. No tratamento com triiodotironina (T3), por exemplo, foi demonstrado a reinervação somente 14 semanas após lesão nervosa. (PENAIITE & BARAKAT- WALTER, 2010). Já o trabalho de Pierucci et al. (2008) em que se pretendia analisar a morfologia do nervo regenerado dentro de conduítes confeccionados com diferentes biomateriais, o tempo experimental foi de 30 e 60 dias.

A razão *g*, calculada pela razão entre DAM e DFM, relaciona-se ao padrão de mielinização. Os valores normais variam entre 0,6 e 0,7, considera-se que valores inferiores ou superiores a esse intervalo, indicam alteração na mielinização. Valores superiores indicam uma mielina mais delgada, enquanto que, ao contrário, valores inferiores, indicam aumento da espessura da mielina. Em ambos os casos, a consequência é um distúrbio na velocidade de condução do impulso nervoso (ANSSELIN et al., 1997). A ausência de diferença entre os

grupos analisados confirma que a normalidade da velocidade de condução nervosa foi alcançada nesse estudo.

Os resultados obtidos nesse experimento revelaram que a administração de EBE de *A. cymbifera* não foi capaz de melhorar a eficiência da regeneração periférica. Entretanto, aumento no número de fibras mielínicas regeneradas é condizente com trabalhos que indicam efeitos neuroprotetores da planta no SNC (Andrade et al.,2015). Nesse sentido, um próximo passo a ser investigado pode ter foco nos neurônios medulares, cujos axônios foram lesionados pela lesão e cresceram dentro do tubo posteriormente. Se encontrado maior número de neurônios ou maior cobertura sináptica para essas células, poderia explicar o maior número de fibras encontrado no grupo tratado no presente trabalho.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, concluiu-se que após 60 dias de consumo de da *A. cymbifera*, não houve indícios de lesões teciduais ou alterações histopatológicas de rim e fígado.

O tratamento utilizado não foi eficiente para induzir melhora funcional dos órgãos denervados mesmo após o crescimento do nervo seccionado.

Foi observada uma tendência de menor quantidade de CSs pró-regenativas. Porém, o tratamento com a planta influenciou positivamente a quantidade de fibras mielínicas no nervo após lesão.

## REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, D.A.; THOMAS, P.K.; RUD, A; KING, R.H. Mutual attraction between emigrant cells from transected denervated nerve. **Journal Anatomy**. v. 184, p. 239-249, 1994.
- ANDRADE, L. A. **Efeitos do extrato de *Aristolochia cymbifera* no controle de epilepsia e neuroproteção**. 2015. 53f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Genética e Bioquímica. Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. v.74, p.113–123, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00335-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00335-4)
- ALVES, T. M. A., et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.95, p.367–373, 2000.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000300012>
- ANSSELIN, A.D.; FINK, T.; DAVEY, D.F. Peripheral nerve regeneration through nerveguides seeded with Schwann cells. **Neurophatol Appl Neurobiology**. v.23, p. 387-98, 1997.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1997.tb01313.x>
- BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, R.T. A Functional evaluation of complete sciatic peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v.83, p. 129-38, 1989.  
<https://doi.org/10.1097/00006534-198901000-00024>
- BASTOS, G.N.T.; SILVEIRA, C. G.; SALGADO, D. L. W.; PINCANÇO-DINIZ, D.L.W.; NASCIMENTO, J.L.M. Physalisangulata extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 118, p. 246–251, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.04.005>
- BRASIL. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 23 jun. 2006. Seção 1.
- CAJAL, S. R. **Degeneration and regeneration of the nervous system**. New York: Hafner, 1959.
- CHEN, Y.S. et al. Effect of bilobalide on peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**. v.25, p. 509–514, 2004.  
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00548-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00548-9)
- CHEN, Y. Y.; CHUNG, J. G.; WU, H. C.; BAU, D. T.; WU, K.Y.; KAO, S.T.; HSIANG, C. Y.; HO, T.Y.; CHIANG, S. Y. Aristolochic acid suppresses DNA repair and triggers oxidative DNA damage in human kidney proximal tubular cells. **Oncology Reports**. v.24, p. 141-153, 2010.

CHEN, Z.L.; YU, W.M.; STRICKLAND, S. Peripheral regeneration. **Annual Review of Neuroscience**. v.30, p.209–233, 2007.

<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094337>

CHERNOUSOV, M.A. & CAREY, DJ. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. **Histology. Histopathology**. v. 15, n.2, p. 593-601, 2000.

COLOMÉ, L. M. et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**. v.38, n.9, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000900018>

COSTA, M. P.; CUNHA, A. S.; SILVA, T. E. P B. F.; FERREIRA, M.C. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortopédica Brasileira**. v.14, n. 1, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S1413-78522006000100005>

DAHLIN, L.B. & LUNDBORG, G. Use of tubes in peripheral nerve repair. **Neurosurgery Clinics of North America**. v. 12, p. 341-52, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S1042-3680\(18\)30059-7](https://doi.org/10.1016/S1042-3680(18)30059-7)

DEFEUDIS, F. V. Bilobalide and neuroprotection. **Pharmacological Research**. v. 46, n.6, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(02\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00233-5)

ENDO, C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N.; FAZAN V. P. S. A Laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortop Bras**. v.16, n.5, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S1413-78522008000500011>

ENGELHARDT, E. E.; BRUCKI, S. M.T.; CAVALCANTI, J. L. X.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C; membros do Departamento de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. Recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v. 63, n.4, p.1104-1112, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0004-282X2005000600035>

ESSA, M.M.; VIJAVAN, R. K.; CASTELLANO- GOONZALES, G.; MEMON, M.A.; BRAIDAY, N.; GUILLEMIN, G. J.Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease. **Neurochemical Research**. v. 37, n.9, 2012.

<https://doi.org/10.1007/s11064-012-0799-9>

ESTEVEES, B. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e antitumoral dos extratos de *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera* e *Piper umbellatum***. 2017. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

FARONI, A; MOBASSERI, S; KINGHAM, P. J.; REID, A.Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.82-83, p. 160-167, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.010>

FRISEN J. Determinants of axonal regeneration. **Histology Histopathology**. v.12, n.3, p. 857-68, 1997.

FIELDS, R.D.; LE BEAU J.M. ; LONGO, FM; ELLISMAN, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progress in Neurobiology**. v.33, n.2, p. 87-134, 1989.  
[https://doi.org/10.1016/0301-0082\(89\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90036-1)

FRANCESCO-LISOWITZ, A.; LINDBORG, J.A.; NIEMI, J.P.; ZIGMOND, R.E. The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. **Neuroscience**. v.302, p. 174–203, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.027>

FRAHER, J. & DOCKERY, P. A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. **Journal of Anatomy**. v.193, n.2, p. 195-201, 1998.  
<https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1998.19320195.x>

GARBAY, B.; HEAPE, A.M.; SARGUEIL, F.; CASSAGNE, C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**. v. 61, n.3, p.267-304, 2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00049-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00049-0)

GÓMEZ-SÁNCHEZ, G. A.; CARTY, L.; IRUARRIZAGA-LEJARRETA, M.; PALOMO-IRIGOYEN, M.; VARELA-REY, M.; GRIFFITH, M.; HANTKE, J.; MACIAS-CAMARA, N.; AZKARGORTA, M.; IGOR AURREKOETXEA, I.; DE JUAN, V. G.; JEFFERIES, H. B. J.; ASPICHUETA, P.; ELORTZA, F.; ARANSAY, A. M.; MARTINEZ-CHANTAR, M. L.; BAAS, F.; MATO, J.M.; MIRSKY, R.; WOODHOO, A.; JESSEN, K.R. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. **Journal of Cell Biology**. v.210, n.1, p. 153-198, 2015.

GORIO, A.; CARMIGNOTO, G.; FINESSO, M.; POLATO, P.; NUNZI, M.G. Muscle reinnervation- II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience**. v.8, n.3, p.403-4016, 1983.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90188-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90188-4)

GRANT, G. A.; GOODKIN, R.; KILIOT, M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. **Neurosurgery**. v.44, n.4, p. 825-840, 1999.  
<https://doi.org/10.1097/00006123-199904000-00077>

GRIFFIN, M. F.; MALAHIAS, M.; KINGHAM, P. J.; REID, A. Peripheral Nerve Injury: Principles for Repair and Regeneration. **The Open Orthopaedics Journal**. v.8, p. 199-203, 2014.  
<https://doi.org/10.2174/1874325001408010199>

GUTH, L. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. **Peripheral. Nervous System Regeneration**. v.36, p.441-478, 1956.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.1956.36.4.441>

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Guyton & Hall - Tratado de fisiología médica**. 12. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1176 p., il., 27 cm. Inclui bibliografía e índice. ISBN 9788535262858.

- IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**. v. 25, n.2, p.101-121, 1996.  
[https://doi.org/10.1016/0168-0102\(96\)01042-5](https://doi.org/10.1016/0168-0102(96)01042-5)
- IDE, C.; TOHYAMA, K.; YOKOTA, R; NITATORI, T; ONODERA, S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. **Brain Research**. v. 288, p. 61-75, 1983.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90081-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90081-1)
- IKEDA, M.; UEMURA, T.; TAKAMATSU, K.; OKADA, M.; KAZUKI, K.; TABATA, Y.; IKADA, Y.; NAKAMURA, K. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. **Wiley Online Library**, 2013.
- JESSEN, K. R. & MIRSKY, R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. **The Journal of Physiology**. v.594, n.13, p.3521-3531, 2016.  
<https://doi.org/10.1113/JP270874>
- KOEPPEN, A.H. Wallerian degeneration: history and clinical significance. **The Journal of the Neurological Sciences**. v.220, n.1-2, p 115-117, 2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.03.008>
- LABRADOR, RO; BUTI, M; NAVARRO, X. Peripheral nerve repair: role of agarose matrix density on functional recovery. **Neuroreport**. v.6, n.15, p. 2022-2026, 1995.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-199510010-00017>
- LEAL, L. R. & TELLIS, C. J.M. Farmacovigilância de plantas Medicinais e Fitoterápicas no Brasil: uma breve revisão. **Revista Fitos**. v.9, n. 4, p. 253-303, 2015.  
<https://doi.org/10.5935/2446-4775.20150020>
- LE BEAU, JM; LA CORBIERE, M; POWELL, HC; ELLISMAN, MH; SCHUBERT, D. Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration and proliferation. **Brain Research**. v.459, n.1, p. 93-104, 1988.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90289-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90289-2)
- LEE, S.K. & WOLFE, S.W. Peripheral nerve injury and repair. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**. v.8, p. 243-252, 2000.  
<https://doi.org/10.5435/00124635-200007000-00005>
- LEITE, F. S. **Perfil fenotípico e de expressão de proteínas de Cryptococcus neoformas após tratamento com substâncias obtidas da planta Pterogyne nitens**. 2010. 113f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara, 2010.
- LIANG, X.; CAI, H.; HAO, Y.; SUN, G. SONG, Y.; CHEN, W. Sciatic nerve repair using adhesive bonding and a modified conduit. **Neural Regeneration Research**. v.9, n.6, p.591-601, 2014.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.130099>
- LIU, P. et al. Modified Wendan Decoction can Attenuate Neurotoxic Action Associated with Alzheimer’s Disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.6, p. 325-330, 2009.  
<https://doi.org/10.1093/ecam/nem103>



LOPRESTI, A. L. Salvia (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. **Drugs in R & D**. v.17, p. 53-64, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s40268-016-0157-5>

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; VARON, S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. **Experimental Neurology**. v.76, n.2, p. 361-375, 1982.

[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(82\)90215-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(82)90215-1)

LUNDBORG, G. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. **Journal of Hand Therapy**. v.6, n.3, p. 179-188, 1993.

[https://doi.org/10.1016/S0894-1130\(12\)80130-X](https://doi.org/10.1016/S0894-1130(12)80130-X)

LUNDBORG, G.; ROSEN, B.; ABRAHAMSON, S.O.; DAHLIN, L.; DANIELSEN, N. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. **Journal of Hand Therapy**. v.19, n.3, p. 273-276, 1994.

LUNDBORG, G; ROSEN, B; DAHLIN, L; DANIELSEN, N; HOLMBERG, J. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early results from a prospective, randomized, clinical study. **Journal Hand Surgery**. v.22, p. 99-106, 1997.

[https://doi.org/10.1016/S0363-5023\(05\)80188-1](https://doi.org/10.1016/S0363-5023(05)80188-1)

LUNDBORG, G.; ROSEN, L.; DAHLIN, L.; HOLMBERG, J.; ROSEN, I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. **Journal of Hand Surgery**. v.29, n.2, p. 100-107, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.jhsb.2003.09.018>

MACIEL, M. J. M.; SILVA, M. A.; ETHUR, E.; AVANCIN, C. A. M. Indicadores fotoquímicos e atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides* (“ macela”) frente *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos isoladas em produtos de origem animal (suíno e aves. ). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.11, n.3, 2017.

MACHADO, H.L.; MOURA, V.L.; GOUVEIA, N.M.; COSTA, G.A.; ESPINDOLA F S.; BOTELHO, F.V. 1, Pesquisa e atividades de extensão em fitoterapia desenvolvidas pela Rede FitoCerrado: uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos por idosos em Uberlândia-MG. **Revista Brasileira de Fitoterápicos**. v.16, n. 3, p. 527-533, 2014.

MAHASNEH, A.M.A.; ADEL, M.A.; EL-OQLAH, A.A.B. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**. v.64, p.271–276, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00132-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00132-9)

MAGGINI, V. MENNETI-IPPOLITO, F. FIRENZUOLI, F. Aristolochia, a nephrotoxic herb, still surfs on the Web, 15 years later. **Internal and Emergency Medicine**. v.13, p.811–813, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s11739-018-1813-2>

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. Human anatomy and physiology . 7.ed. NEW YORK: Pearson Education, Inc., 2006

MART'INEZ, M. J. et al. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.52, p. 171–174. 1996.  
[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01405-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01405-5)

MARTINS, R. S. et al. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**. v. 24, n. 1, p. 20-25, 2005.  
<https://doi.org/10.1055/s-0038-1625458>

MAYHEW, T. M.; SHARMA, A. K. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. I. Methods for nerve trunks of mixed fascicularity. **Journal of Anatomy**. v.139, 1984.

MELO, H. B. **Atividade neuroprotetora do extrato etanólico de *Aristolochia cymbifera* sobre o sistema nervoso central e periférico de vertebrados**. 2016. 42f Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2016.

MELO, M. C. S.; CAVALCANTE, L. C.; OLIVEIRA, L. V.; CARVALHO, C. M. R. S.Avaliação da dissociação iônica do hidróxido de cálcio associado ao Aloe vera como veículo. **Revista de Odontologia da UNESP**. v.47, n. 2, 2018.  
<https://doi.org/10.1590/1807-2577.02018>

MOHANDAS RAO, K. G.; MUDDANNA RAO, S.; GURUMADHVA RAO, S. Centella asiatica (L.) Leaf Extract Treatment During the Growth Spurt Period Enhances Hippocampal CA3 Neuronal Dendritic Arborization in Rats, Evidence-Based. **Complementary and Alternative Medicine**. v. 3, n. 3, p. 349-357, 2006.  
<https://doi.org/10.1093/ecam/nel024>

MONTE-RASO, V. V., BARBIERI, C. H., MAZZER, N., FAZAN V. P. S. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v. 10, n. 1, 2006.  
<https://doi.org/10.1590/S1413-35552006000100015>

MORENO, J.J. Effect of aristolochic acid on arachidonic acid cascade and in vivo models of inflammation. **Immunopharmacology**. v.26, n.1, p.1-9, 1993.  
[https://doi.org/10.1016/0162-3109\(93\)90061-T](https://doi.org/10.1016/0162-3109(93)90061-T)

NASCIMENTO, F. E. C; REATGUI, W. S.; ARAÚJO, L.S.; RIBEIRO, M. A. E. S.; MAIA, D; C; S.; GIAGOMIN, L. L.; KITAGAWA, R. R.; BARATTO, L. C.Avaliação do potencial antioxidante e anti-Helicobacter pylori in vitro de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. **Revista Fitos**. v.11, n. 2, 2017.

NAVARRO, V. et al. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 53, p.143–147, 1996.  
[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01429-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01429-8)

OLIVEIRA, A. L. R. & LANGONE, F. Non-neuronal cells are not the main limiting factor for the low axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.33, n.12, p.1467-1475, 2000.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000001200011>

OLIVEIRA, A. C. D. & ROPKE, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos.** v.10, n.2, 2016.

OLIVEIRA, F. A.; CONDE, B. E.; GOMES, F. T.; FONSECA, A. S.; CAMPOS, B.C. Potencial de cura e segurança do uso de plantas medicinais na utilização do método da biodigital como tratamento alternativo no grupo de medicina alternativa em juiz de fora, MG. **Revista Científica Perspectivas Online.** v.17, n.5, p.47-63, 2015.

PANAITE, P. A.& BARAKAT-WALTER, I. Thyroid hormone enhances transected axonal regeneration and muscle reinnervation following rat sciatic nerve injury. **Journal of Neuroscience Research.** v.88, p.1751–1763, 2010.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.22344>

PETERS, A.; PALAY, S. L.; WEBSTER, H. DE F. The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells. Phylafelphia, Saunders, p.406, 1976.

PIERUCCI, A.; DE DUEK, E.A.; OLIVEIRA, A.L.R. Peripheral nere regeneration through biodegradable conduits prepared using solvent evaporation. **Tissue Engineering. Part A.** v.14, n.5, p. 595-606, 2008.

PIERUCCI, A; FARIA, AM; PIMENTEL, ER; SANTOS, AR JR.; OLIVEIRA, ALR. Effects of agrecan on Schwann cell migration in vitro and nerve regeneration vivo. **Brazilian Journal of Morphological Sciences.** v.21, n.3, p. 125-130, 2004.  
<https://doi.org/10.1089/tea.2007.0271>

PORTAL BRASIL Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%. [2016]. Disponível em:<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-efitoterapicos-sobe-161/>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** v.111, p. 409–419, 1957.

RAUBER, C. Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrcarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto) em ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 34, n.1, p. 15-21, 2006.

REBAÏ, M. Bioinformatic tools status in the characterization of functional SNP of candidate genes. **Journal of Genetics and Molecular Biology.** v.1, n.1, 2017.

RODRIGUES, W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **Interações.** v. 17, n. 2, p. 267–277, 2016.  
<https://doi.org/10.20435/1984042X2016210>

ROZAINI ABDULLAH, LEOLEAN NYLE DIAZ, SEBASTIAAN WESSELING & IVONNE M. C. M. RIETJENS. Risk assessment of plant food supplements and other herbal products containing aristolochic acids using the margin of exposure (MOE) approach. **Food Additives & Contaminants.** v.34, n. 1, p. 135-144, 2017.

SALES, M.D.C.; SARTOR, E.B.; GENTILLI, R.M.L. Etnobotânica e Etnofarmacologia: medicina tradicional e bioprospecção de fitoterápicos. **Revista Salus**. v.1, n. 1, p. 17-26, 2015.

SALONEN, V; PELTONEN, J; ROYTTA, M; VIRTANEN, I. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. **Journal Neurocytology**. v.16, n.5, p.713-720, 1987.  
<https://doi.org/10.1007/BF01637662>

SANTANA, J.D.; DOURADO, S. H. A.; BIESKI, I. G. C. Potencial das plantas medicinais no tratamento de doença de alzheimer com ênfase em curcuma longa. **Revista Saúde Viva**. v.1,n.1, 2018.

SARIKCIOGLU, L.; DEMIREL, B. M.; UTUK, A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. **Folia Morphologica**. v.68, n. 1, pp 1-7, 2008. SEDDON, H.J.D., F. R. C. S., A classification of nerve injuries. **British Medical Journal**. v.2, p. 327-239, 1942.

SIMÕES, C.M.O. et al. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. 4 ed. Porto Alegre: Universidade, 1995. 173 p.

SMITH, R.S. & KOLES, Z.J. Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *Am J Physiol*. v.219, n.5, p.1256-1258, 1970.  
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1970.219.5.1256>

SCHMIDT, C.E. & LEACH, J.B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. **Annual Review Biomedical Engineering**. v.5, p.293-347, 2003.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.5.011303.120731>

SARKER, M.; SAMAN, N.; MCLNNES, A. D.; SCHREYER, D. J.; XIONGBIAO, C. Regeneration of peripheral nerves conduits by nerve guidance conduits: influence of design, biopolymers, cells, growth factors and physical stimuli. **Progress in Neurobiology**. v. 171, p. 125-150, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.07.002>

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Revista Neurociências**. v.15, n. 3, p. 226-233, 2007.

TABACH, R.; CARVALHO, A. C.; PEREIRA, B. A.; NETO, A. R. S.; MAIAM L. M.; PEREIRA, S. A. et al. Editorial: Farmacovigilância de medicamentos dinamizados. **Boletim Planfavi: Sistema de farmacovigilância em plantas medicinais**, São Paulo, , n. 27, p. 1-4, Jul./Set. 2013.

TANIUCHI, M.; CLARK, H.B.; SCHWEITZER, J.B.; JOHNSON, E.M. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. **The Journal of Neuroscience**. v. 8, n. 2, p. 664-681, 1988.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-02-00664.1988>

TERRIS, D.J.; CHENG E.T.; UTLEY, D.S.; TARN, HO, PR; VERITY, A.N. Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of

laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution. **Auris Nasus Larynx**. v. 26, n. 2, p. 117-122, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0385-8146\(98\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0385-8146(98)00067-4)

THYBOLL, J.; KORTESMAA, J.; CAO, R.; SOININEN, R.; WANG, L.; IIVANAINEN, A.; SOROKIN, L.; RISLING, M.; CAO, Y.; TRYGGVASON, K. Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. **Molecular and Cellular Biology**. v.22, n.4, p. 1194-1202, 2002.

<https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1194-1202.2002>

TIMPL, R. & BROWN, J.C. 1996. Supramolecular assembly of basement membranes. **Bioessays**. v.18, n. 2, p. 123-132, 1996.

<https://doi.org/10.1002/bies.950180208>

TREASE G.E.; EVANS W.C.; **Pharmacognosy**. 11.ed. London: Baillière Tindall, 1980.

VAREJÃO, A. S. P.; MELO-PINTO, P.; MEEK, M. F.; FILIPE, V. M.; BULAS-CRUZ, J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. **Neurological Research**. v. 26, n. 2, p. 186-194, 2004.

<https://doi.org/10.1179/016164104225013833>

VERDÚ, E.; CEBALLOS, D.; VILCHES, J.J.; NAVARRO, X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. **Journal of the Peripheral Nervous System: JPNS**. v.5, n.4, p.191, 2000.

<https://doi.org/10.1179/016164104225013833>

YOSHII, S.; YAMAMURO, T.; ITO, S.; HAYASHI, M. In vivo guidance of regenerating nerve by laminin-coated filaments. **Experimental Neurology**. v.95, p.469-473, 1987.

[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(87\)90064-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90064-1)

WAXMAN, S. G. Determinants of conduction velocity in myelinated nerve fibers. **Muscle & Nerve**. v.3, p.141-150, 1980

<https://doi.org/10.1002/mus.880030207>

## ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)



Universidade Federal de Uberlândia  
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito do Extrato da *Aristolochia cymbifera* na Regeneração Axonal, Plasticidade Sináptica e Gliose após Lesão Nervosa Periférica”, protocolo nº 132/16, sob a responsabilidade de **Renata Graciele Zanon** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **09 de dezembro de 2016**.

(We certify that the project entitled "Efeito do Extrato da *Aristolochia cymbifera* na Regeneração Axonal, Plasticidade Sináptica e Gliose após Lesão Nervosa Periférica", protocol 132/16, under the responsibility of Renata Graciele Zanon - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of December 09th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/03/2017 Término: 30/09/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	69
Peso / Idade	200 g – 5-10g / 8 semanas – 1-3 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	CEBEA – UFU / ARFIS
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 14 de fevereiro de 2017.

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**  
Coordenador da CEUA/UFU

**ANEXO B – Laudo histopatológico (Dra Karen Renata Nakamura Hiraki)**

Os cortes histológicos corados em H.E. de fragmentos de rim revelaram que a arquitetura do órgão estava preservada, sendo possível visualizar as porções cortical e medular. O parênquima renal apresentava aspectos usuais de normalidade sem sinais de infiltrado inflamatório, necrose, degeneração, fibrose e depósitos hialinos. Os corpúsculos renais estavam preservados com espaço capsular de dimensão normal sem sinais de alterações aparentes no glomérulo renal. Os túbulos renais apresentavam-se com aspecto de normalidade e luz preservada sem aumento de interstício renal. Em alguns cortes foi possível observar a presença do hilo renal que encontrava-se sem sinais de infiltrado inflamatório, necrose ou fibrose.

Os cortes histológicos corados em H.E. de fragmento de fígado revelaram parênquima hepático preservado apresentando lóbulos pouco delimitados com veia centrolobular sem sinais de alterações. Não foram observadas áreas de infiltrado inflamatório, necrose, fibrose, degeneração e depósitos de qualquer natureza. Os espaços porta estavam normais apresentando vasos sanguíneos e ductos biliares com aspectos usuais. Os espaços sinusóides sem sinais de dilatação ou obstrução estavam permeando os hepatócitos que não apresentavam sinais aparentes de alterações. Não foi observado aumento do número de células de Kupffer.