

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DO EXTRATO DA *Aristolochia cymbifera* NA REGENERAÇÃO AXONAL
APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

LARISSA CAROLINE DA SILVA

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DO EXTRATO DA *Aristolochia cymbifera* NA REGENERAÇÃO AXONAL
APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

LARISSA CAROLINE DA SILVA

Prof^ª. Dr^a. Renata Graciele Zanon

MSc. Alex Dias Assis

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DO EXTRATO DA *Aristolochia cymbifera* NA REGENERAÇÃO AXONAL
APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

LARISSA CAROLINE DA SILVA

Prof^ª. Dr^ª. Renata Graciele Zanon
Instituto de Ciências Biomédicas/ICBIM

MSc. Alex Dias Assis
Instituto de Ciências Biomédicas/ICBIM

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em ____/____/____

Prof^º Dr^º Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DO EXTRATO DA *Aristolochia cymbifera* NA REGENERAÇÃO AXONAL
APÓS LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

LARISSA CAROLINE DA SILVA

Aprovado pela Banca Examinadora em ____/____/____ Nota: ____

Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de .

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma contribuíram para a sua realização, em especial meus pais e meu namorado, que tanto me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por iluminar meu caminho e me permitir concluir mais essa etapa da minha vida.

Agradeço a minha família, em especial meus pais Carmo e Claudeli, por se preocuparem com a minha formação, meu futuro, e não medirem esforços para que eu conquistasse meus sonhos. Também aos meus avós, pois ao ouvir as histórias das vidas deles, percebo o quanto lutaram para criar meus pais e para que estes tivessem uma vida melhor que a deles e pudessem dar aos seus filhos uma vida melhor ainda. Minhas irmãs, que entre discussões e brincadeiras, estavam ao meu lado todo o tempo. E aos demais familiares que mesmo com a distância torceram por mim. Amo todos vocês!

Ao meu namorado Wellington Talles, que foi meu companheiro, meu amigo, durante toda essa etapa. Me apoiou, me ouviu, me incentivou, me motivou e me ajudou a realizar todos meus objetivos. Esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, sempre que precisei e foi meu equilíbrio sempre quando eu estava me perdendo, cansada e desanimada. Muito obrigada Meu Amor, te amo. E também a sua família, que me acolheu de forma muito carinhosa.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Renata Garciele Zanon, pelos ensinamentos, paciência, dedicação e compromisso em fazer sempre um bom trabalho.

Aos professores que me deram aula durante a graduação e meus colegas de curso, em especial, Sávio Borges, Ruth Gabriela, Pollyanne Moraes, Luana Félix e Marcos Paulo, pois todos vocês têm participação na profissional que eu me tornei e também na pessoa que serei daqui pra frente.

Aos colegas do laboratório de Morfologia e Cultura Celular, pela disponibilidade e paciência em me ajudar, em vários momentos.

Aos membros da banca, prof^o Dr^o Alberto da Silva Moraes e MSc. Pedro Augusto Silva Nogueira, por disponibilizarem seu tempo e atenção ao meu trabalho.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Uberlândia, que mantêm essa universidade funcionando, possibilitando meus estudos nela.

Aos animais de laboratório, instrumentos de meu trabalho, todo o meu agradecimento e respeito.

De maneira geral, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, a ajuda de vocês foi fundamental.

Muito obrigada!

RESUMO

Após lesão nervosa periférica ocorrem alterações morfológicas e funcionais no nervo. Alguns processos são iniciados após a lesão, como, a degeneração Walleriana, e o crescimento de brotos colaterais no coto proximal. As células de Schwann são componentes importantes neste processo desempenhando diferentes funções. Alguns procedimentos cirúrgicos estão em estudo, como a tubulização, que pode ser associada a outras substâncias, para acelerar o processo regenerativo. De acordo com dados de um estudo, que utilizou modelos de moscas epiléticas e hipocampo de camundongos, o extrato etanólico da planta *Aristolochia cymbifera* apresentou ação neuroprotetora no Sistema Nervoso Central. Diante disso, o presente trabalho avaliou o efeito do extrato bruto da *A. cymbifera* após neurotmesa do nervo ciático em roedores. Para isso, fez-se a lesão e a tubulização do nervo ciático e durante dois meses foram feitos testes funcionais semanais. Findo os 60 dias, avaliou-se a regeneração axonal e a atividade das células de Schwann através de imunofluorescência para neurofilamento, S100 β e NGFRp75. A partir dos resultados obtidos conclui-se que o tratamento com *A. cymbifera*, não apresentou efeito neuroprotetor sobre a regeneração nervosa periférica.

Palavras – chave: *Aristolochia cymbifera*, Lesão nervosa periférica, Nervo ciático.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Composição do nervo periférico.....	1
1.2 Lesão nervosa periférica	2
1.3 Tubulização do nervo periférico	4
1.4 <i>Aristolochia cymbifera</i>	4
2 JUSTIFICATIVA.....	6
3 OBJETIVOS.....	6
3.1 Geral	6
3.2 Específicos.....	7
4 MATERIAIS E MÉTODOS	7
4.1 Preparação do extrato bruto alcoólico	7
4.2 Animais, tubulinização e tratamento	7
4.3 Avaliação funcional do ciático – IFC	8
4.4 Eutanásia dos animais e extração dos tecidos	10
4.5 Imunofluorescência	10
4.6 Análise estatística	12
5 RESULTADOS	12
5.1 Análise funcional	12
5.2 Imunofluorescência	14
6 DISCUSSÃO.....	18
7 CONCLUSÃO	20
8 REFERÊNCIAS	21
ANEXO 1	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 Composição do nervo periférico

A composição dos nervos periféricos é feita por feixes de axônios de neurônios envoltos em camadas de tecido conjuntivo. De acordo com sua origem, o nervo pode ser craniano, com origem em estruturas do encéfalo, ou, espinhal, quando originado na medula espinhal. Os principais componentes celulares do nervo periférico são as células perineurais, os fibroblastos, os macrófagos e as células de Schwann, estas últimas capazes de produzir a bainha de mielina que envolve os axônios, isolando-os eletricamente o que permite a rápida propagação dos potenciais de ação.

A unidade formada pela bainha de mielina junto com o axônio é denominada de fibra nervosa (Guyton; Hall, 2011). Estas fibras periféricas são envolvidas por três camadas de tecido conjuntivo as quais juntamente com os componentes da matriz extracelular (MEC) entram na composição do nervo periférico. A camada mais interna é chamada endoneuro, que possui fibras de colágeno tipo III orientadas longitudinalmente em relação ao axônio (Cajal, 1959; Guth, 1956; Lundborg, 1993; Schmidt; Leach, 2003). A camada média é chamada de perineuro, que origina os fascículos devido à disposição concêntrica das fibras de colágeno tipo I e III em relação aos grupos de axônios. Essa camada atua na manutenção da homeostase do nervo, como barreira seletiva ao trânsito de substâncias com alto peso molecular. A camada mais externa é denominada epineuro, que é formada por tecido conjuntivo frouxo e possui fibras de colágeno tipo I em sua constituição (Cajal, 1959; Guth, 1956; Lundborg, 1993) (Figura 1).

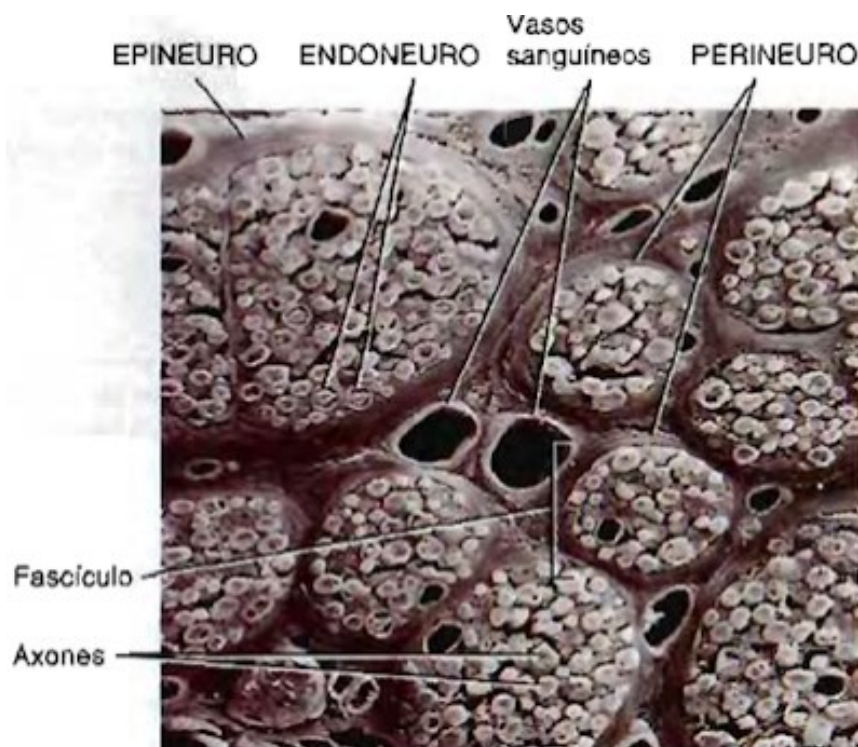


Figura 1: Microscopia Eletrônica de Varredura de corte transversal de nervo periférico, mostrando sua composição. Fonte: Abrams, 2015.

1.2 Lesão nervosa periférica

Há três classificações, segundo Seddon (1942), para as lesões nervosas periféricas: a *Neurotme*, que designa a secção completa do nervo; a *Axonotme*, lesão que causa degeneração periférica distal por esmagamento ou estiramento, com preservação parcial da bainha e de estruturas de apoio mais íntimos do nervo; e a *Neuropraxia*, que se caracteriza pela temporária perda das funções motoras e sensitivas no nervo, sem alterações estruturais significativas.

Ao ocorrer uma lesão, alguns processos são iniciados como a degeneração Walleriana, em que macrófagos e células de Schwann fagocitam as fibras do coto distal (Figura 2A). Também, o coto proximal produzirá brotos colaterais (Figura 2B) que irão crescer e seguir substâncias tróficas produzidas pelo órgão denervado (Figura 2C) (Pistarini, 2015).

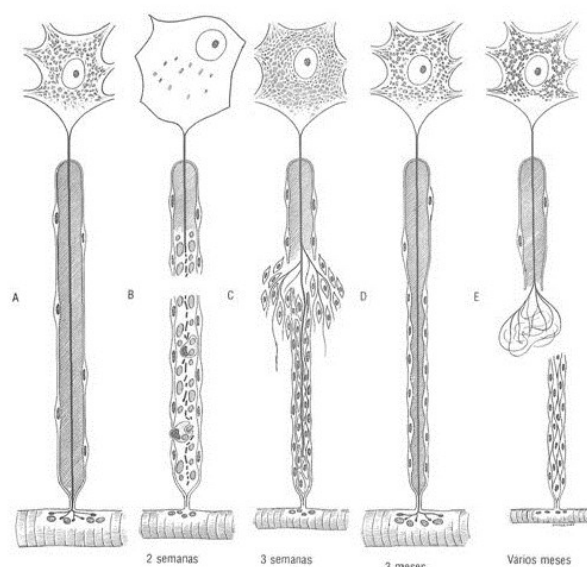


Figura 2: Processo de regeneração axonal após neurotme (A-D). **A:** Nervo íntegro. **B:** Neurotme e início do processo de degeneração Walleriana. **C:** Origem dos brotos colaterais a partir do coto proximal e formação das Bandas de Bungner pelas células de Schwann. **D:** Reinervação do órgão-alvo. **E:** Formação de neuroma, processo regenerativo insatisfatório. Fonte: Isabel, 2010.

As células de Schwann são importantes para a regeneração axonal, pois dão suporte ao crescimento axonal, expressam várias integrinas receptoras de membrana, proveem um substrato rico para o crescimento axonal e, realizam a mielinização dos axônios em brotamento, além de formarem as Bandas de Bungner, através das novas células de Schwann que são formadas, que vão aderindo à lâmina basal e formam um tubo, que irá induzir e orientar o crescimento axonal em direção ao órgão alvo através da síntese de moléculas neurotróficas (Schmidt; Leach, 2003; Viott, 2006).

Caso ocorra a regeneração do nervo, a mielinização dos axônios se dá em um período médio de oito dias, por outro lado, a regeneração funcional após a reparação nervosa é mais complexa, dependendo de diferentes 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).

Com o objetivo de auxiliar o processo de regeneração, alguns procedimentos cirúrgicos já são empregados como a sutura, podendo haver a utilização de aloenxertos, autoenxertos ou xenoenxertos (Lee; Wolfe, 2000). E alguns estão em estudo, como exemplo, as técnicas de tubulização, que podem utilizar diferentes materiais na confecção dos tubos, podendo se inserir dentro deles elementos para testes na tentativa de uma melhora na regeneração (Colomé et al., 2008), sendo o silicone o material mais usado para esta confecção devido suas características favoráveis ao processo como, não ser carcinogênico, não provocar reações alérgicas, ser quimicamente inerte, entre outras (Delistoianov et al., 2008), porém, apresenta a necessidade de posterior intervenção cirúrgica para sua retirada.

1.3 Tubulização do nervo periférico

O processo de tubulização é feito através da introdução dos cotos distal e proximal em uma prótese tubular, mantendo-se um espaço entre eles, fixados com pontos cirúrgicos em suas extremidades, na intenção de se reparar uma lesão e realinhar os cotos, criando assim, um ambiente favorável à regeneração axonal orientada ao coto distal (Lundborg et al., 2004; Pierucci et al., 2004). Uma limitação dessa técnica é a possível necessidade de nova cirurgia para a retirada da prótese por conta do aumento na pressão dentro do tubo à medida que o nervo aumenta sua espessura, dificultando a vascularização no local e, conseqüentemente, causando nova degeneração (Terris et al., 1999).

1.4 *Aristolochia cymbifera*

Uma importante estratégia associada à conservação da biodiversidade é a recuperação dos conhecimentos e das práticas associadas às plantas medicinais, que leva a descoberta de novos medicamentos e a melhora da qualidade de vida das comunidades pobres (Leite, 2010).

Ao longo do tempo, inúmeros pesquisadores vêm demonstrando que extratos e óleos essenciais extraídos de algumas plantas possuem atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, atividades estas como efeito neuroprotetor e ação positiva na regeneração do tecido neural, seja sobre os nervos periféricos bem como no Sistema Nervoso Central (SNC) (Peixoto, 2015; Pereira, 2008; Rebouças, 2017).

A *Aristolochia cymbifera* pertence à família Aristolochiaceae e é popularmente conhecida como "cassaú", "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). Nativa do Brasil, das Guianas até Minas Gerais e São Paulo, apresenta odor desagradável, próprio para atrair insetos (Tabach et al., 2013).



Figura 3: *Aristolochia cymbifera*

Partes como o caule e a raiz da *A. cymbifera* são muito usadas no Brasil e em outros países da América do Sul por apresentarem ação diurética, sedativa, estomática, entre outras (Tabach et al., 2013), entretanto, não devem ser utilizadas durante a gestação pois, apresentam ação abortiva. Segundo a literatura consultada, de modo geral, as raízes da *A. cymbifera* são utilizadas sobre a forma de extrato (obtido por maceração ou percolação), infusão (utiliza-se imersão em água quente para o preparo) e xarope (preparado com água quente e açúcar) (Santos, 2009).

Diferentes compostos químicos foram observados a partir dos estudos fitoquímicos com a planta, destacando-se os ácidos aristolóquicos, que estão correlacionados à toxicidade da planta, pois são metabólitos nefrotóxicos e carcinogênicos (Tabach et al., 2013), com isso, estudos buscam analisar a possibilidade do uso prolongado de produtos à base de *A. cymbifera* estar relacionado ao surgimento de danos renais permanentes, assim como a possibilidade de desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Rauber, 2006).

Dados obtidos a partir de um trabalho realizado no Instituto de Genética da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando extrato etanólico da *A. cymbifera* em moscas epiléticas e no hipocampo de camundongos tratados com peçonha neurotóxica, demonstraram função neuroprotetora no Sistema Nervoso Central (dados não publicados, Andrade, 2015). Diante disso, o presente trabalho avaliou o efeito do extrato bruto alcoólico da *A. cymbifera* após neurotmesa e tubulização do nervo ciático em roedores.

2 JUSTIFICATIVA

Há ainda falta de dados científicos que demonstrem esta ação neuroprotetora no Sistema Nervoso Periférico da *A. cymbifera* e esse atributo se mostra importante pela sua possibilidade de ser usado na prática clínica como monoterapia ou adjuvante das técnicas protocoladas existentes para neuropatias de nervos periféricos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o possível efeito neuroprotetor do tratamento com extrato alcoólico de *A. cymbifera* sobre a regeneração nervosa periférica.

3.2 Específicos

Observar a reação das células de Schwann e o crescimento axonal a partir do tratamento com extrato da *A. cymbifera*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação do extrato bruto alcoólico

O material botânico foi coletado na região de Uberlândia, (voucher do espécime de *Aristolochia cymbifera* está depositado no herbarium da UFMG (BHCH 931)), após secagem em estufa foi triturado e submetido aos processos de extração por maceração com álcool absoluto (maceração 1:5 – 50mg:250ml). Para isto, o material foi triturado, na presença de 250ml de álcool absoluto, mantido em repouso ao abrigo da luz por 3 semanas antes de ser filtrado. Após filtração, o extrato obtido foi concentrado e os solventes removidos sob pressão reduzida em rotavaporizador a 45°C e acondicionado em frascos bem vedados a -20°C.

4.2 Animais, tubulinização e tratamento

Foram utilizados 21 ratos Wistar machos jovens (6 a 8 semanas, ~200g) disponibilizados pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo CEUA 132/16, anexo1). Após anestesia (0,2ml de cetamina e 0,2ml de xilazina, 0,2ml/100g peso corpóreo, IP), os animais foram submetidos à tricotomia da coxa esquerda. Em seguida, foram colocados em decúbito ventral sob lupa, a pele foi incisada e, afastando-se a musculatura, o nervo ciático foi exposto e transeccionado, utilizando-se tesoura cirúrgica. Após a retração dos cotos, estes foram introduzidos e fixados com cola adesiva (Figura 4) (Liang et al., 2014), no interior de um tubo de silicone deixando-se um espaço de 6-7mm entre os cotos. Encerrados os procedimentos de tubulinização, o plano muscular foi recolocado

e a pele fechada com 3 pontos cirúrgicos (fio mononylon 6-0, Ethicon). Os animais foram mantidos em biotério por um período de 60 dias, recebendo ração e água *ad libitum*.

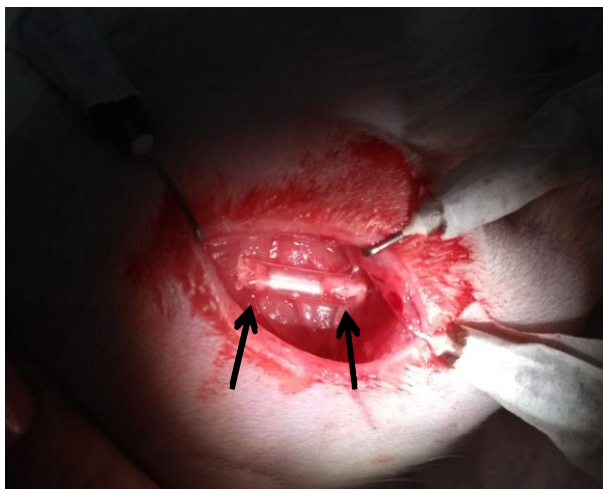


Figura 4: Tubulização do nervo ciático. As setas indicam os cotos inseridos no tubo de silicone.

Os animais foram separados em dois grupos: Controle n=9 (tratado com o diluente do extrato - Tween 20) e Tratamento n=12 (tratado com o tratamento contendo o extrato). O tratamento utilizado contendo o extrato foi: extrato bruto alcoólico da *A. cymbifera* diluído em 0,1% de Tween 20 e água filtrada (300 ml, concentração do extrato = 25mg/kg), administrado por via oral à vontade. Cada caixa de animais (grupo Controle – 3 animais por caixa, grupo Tratamento – 4 animais por caixa) recebia a cada 48 horas uma garrafa contendo 400ml de água filtrada e uma garrafa contendo 300 ml do tratamento adequado. Passadas 48 horas eram feitas as trocas das garrafas e os volumes residuais eram anotados. A média da ingestão do tratamento foi de 76,83ml/animal. O tratamento foi contínuo durante os 60 dias de sobrevivência dos animais.

4.3 Avaliação funcional do ciático – IFC

O protocolo seguido foi o de Bain, Mackinnon e Hunter (1989). Os ratos foram treinados uma semana antes da cirurgia a caminhar no aparato construído para a análise funcional com

dimensões de 23x21x68cm (AxLxP). Foi realizada a coleta da impressão plantar pintando com tinta atóxica as patas posteriores do animal e posicionando o mesmo para caminhar em uma tira de papel 7,0 x 29,5 cm colocada no corredor da caixa de avaliação projetada para esse experimento. As análises foram realizadas uma semana antes da cirurgia e uma vez por semana após a semana da cirurgia, até o final dos 60 dias de tratamento.

As tiras contendo as impressões foram digitalizadas em *scanner* e analisadas utilizando o programa UTHSCSA ImageTool. Os dados referentes a cada animal foram identificados individualmente de modo a permitir o seguimento ao longo do tempo. Os parâmetros medidos nas impressões, tanto das patas normais como das patas afetadas, foram o comprimento da pegada (PL, *print length*) e a abertura total dos dedos (TS, *toe spread*). Essas medidas (Figura 5) foram colocadas na fórmula do cálculo do IFC (abaixo) e a pontuação obtida anteriormente à lesão foi considerada 100% da função, correspondendo, portanto à integridade do nervo, e as demais pontuações obtidas no pós-cirúrgico porcentagens relativas à pontuação inicial.

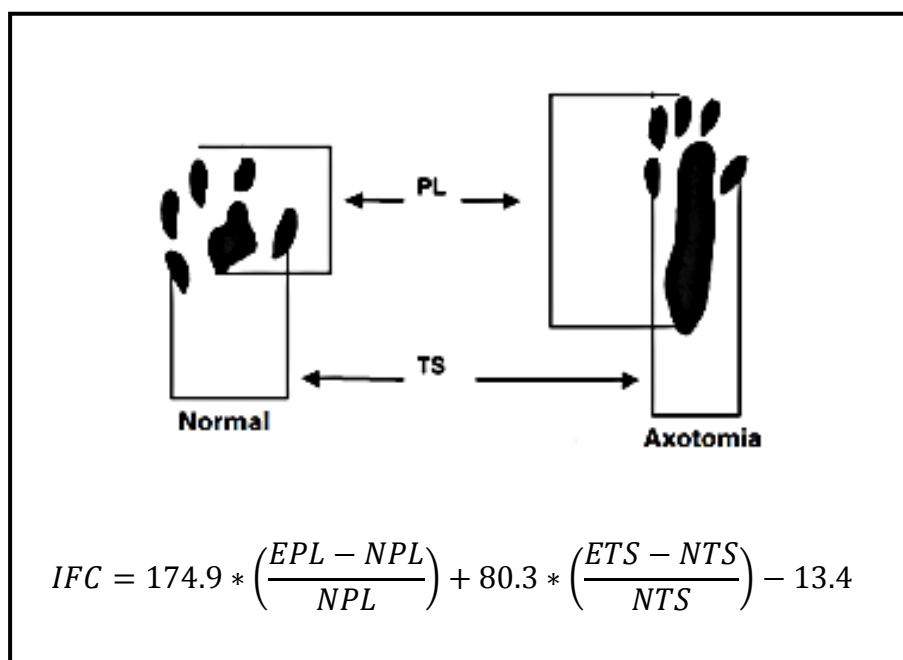


Figura 5: Medidas utilizadas no cálculo do índice funcional do ciático (Fonte: Insera, Bloch e Terris, 1998). **IFC** índice funcional do ciático, **ETS** abertura total dos dedos (TS, *toe spread*) lado experimental, **NTS** abertura total dos dedos (TS, *toe spread*) lado normal, **EPL** comprimento da pegada (PL, *print length*) do lado experimental e **NPL** comprimento da pegada (PL, *print length*) do lado normal.

4.4 Eutanásia dos animais e extração dos tecidos

Findo os 60 dias de experimento, os animais foram anestesiados com a mesma mistura anestésica utilizada no procedimento cirúrgico e submetidos à eutanásia com aprofundamento da anestesia para realização de torotomia e perfusão transcardíaca, respectivamente, com solução salina tamponada (50mL tampão fosfato com 0,9% de NaCl, 0,1M, pH 7,4; PBS) e solução fixadora (50mL de paraformaldeído 4%). Com auxílio de material cirúrgico adequado e lupa, foram extraídos os nervos ciáticos de ambos os lados (nervo esquerdo retirado com o tubo). Todo o material extraído foi mantido em solução fixadora por 12h em temperatura de 4°C.

4.5 Imunofluorescência

Passado o período de fixação, o material foi desidratado em sacarose 20% e incluído em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congelado a -40°C em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. Dos blocos congelados com o material, foram obtidos cortes histológicos longitudinais dos nervos em criostato (-25°C, Microm, Heidelberg, Germany) com espessura de 10 µm. As secções foram então transferidas para lâminas gelatinizadas previamente climatizadas. As lâminas prontas, contendo os cortes histológicos de nervo, foram estocadas a -20°C até a realização da técnica.

As lâminas foram colocadas em temperatura ambiente para a climatização, sendo então, imersas e lavadas por três vezes em PBS 0,01M. Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com 150µl de solução de albumina sérica bovina 5% em PBS 0,01M, pH 7,4

por 1h. Após este período, os anticorpos primários foram aplicados, com período de incubação de 18 a 24h sob temperatura de 4°C em câmara úmida. Os anticorpos primários empregados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos primários que foram utilizados e suas descrições

ANTICORPOS	DESCRIÇÃO
Camundongo anti-neurofilamento (1:200, Sigma)	Proteína do citoesqueleto de axônios
Coelho anti-S100β (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

Em sequência à primeira incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01M, pH 7,4 e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com partícula fluorescente (Alexa Fluor 488 ou 594, Jackson Laboratories, USA) por 1h protegidos da luz. Os espécimes foram lavados em PBS 0,01M, pH 7,4 e montados com lamínula em glicerol/PBS (1:1) contendo DAPI (4'-6'-diamino-2-fenil-indol) marcador citoquímico de núcleo que marca DNA. O material foi então observado e documentado utilizando-se um microscópio de fluorescência (TS-100, Nikon) acoplado à câmera fotográfica digital utilizando-se os filtros para fluoresceína (488nm) e rodamina (594nm). Foi capturada uma imagem de cada nervo, esquerdo e direito, de três animais de cada grupo (um de cada caixa), com objetiva de 20x para anti-S100β e anti-NGFRp75 e uma imagem do nervo esquerdo de um animal de cada grupo, com objetiva de 10x para anti-neurofilamento. As imagens dos nervos com marcação anti-neurofilamento foram analisadas qualitativamente. As imagens anti-S100β e anti-NGFRp75 foram usadas para quantificação da densidade de pixel através do software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). Foram feitas cinco medidas de forma aleatória nas imagens obtidas, para que a quantificação representasse da melhor forma a marcação apresentada.

A partir da média dos animais para cada lado (lesionado e íntegro), calculou-se a razão lado esquerdo (lesionado)/lado direito (íntegro) para cada animal. Por fim, foi calculada a média aritmética de cada grupo e feita comparação entre esses valores. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP).

4.6 Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva primeiramente para a análise da distribuição dos dados numéricos. A partir dos resultados descritivos, foi escolhido o teste ANOVA para a análise da distribuição dos resultados do teste funcional. E o teste *U* de Mann Whitney (não paramétrico) para os dados obtidos a partir das imunomarcações. Assumiu-se para todos os testes comparativos nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise funcional

Logo após a cirurgia, os animais operados não se apoiavam na pata lesionada, apresentando a pata caída e os dedos em completa adução, consequência da disfunção do nervo ciático. Durante o tempo de experimento os animais recuperam gradualmente a capacidade de apoio sobre a pata lesionada com abdução dos dedos. Foram avaliadas 212 impressões de pegadas (Figura 6) (106 da pata lesionada e 106 da pata normal).

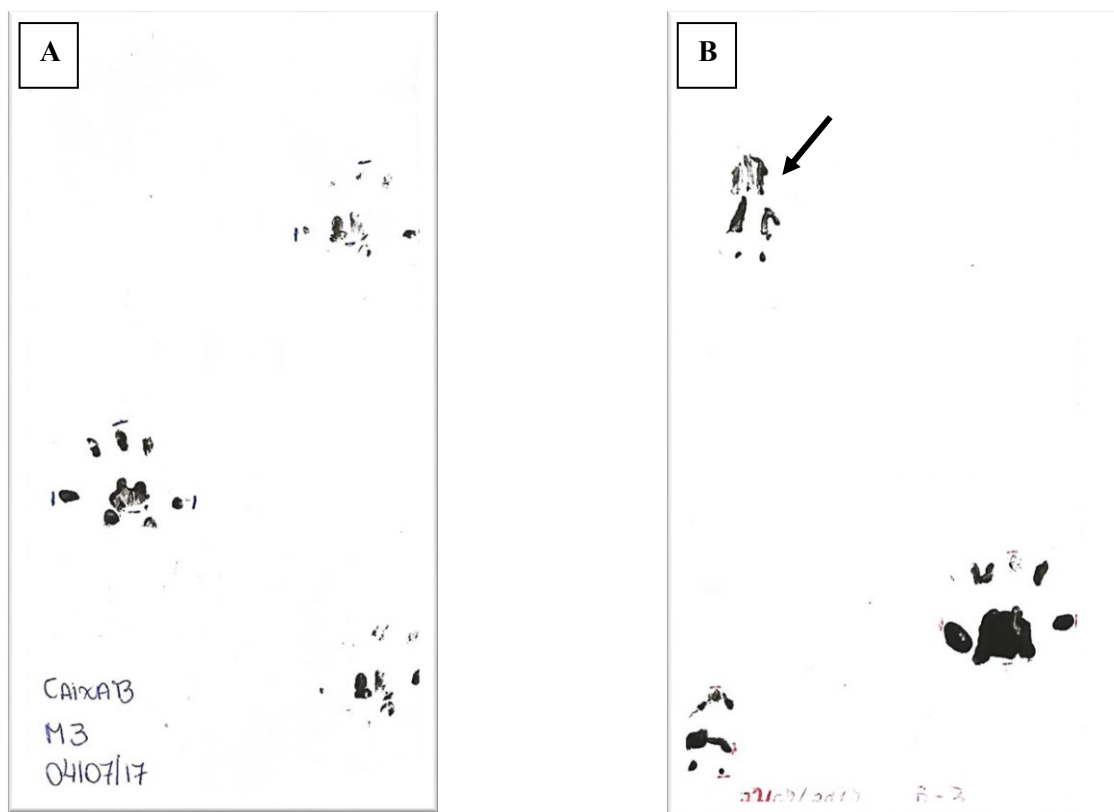


Figura 6: Exemplos das impressões das pegadas obtidas no teste funcional. **A:** Impressões obtidas antes da cirurgia. **B:** Impressões obtidas após a cirurgia, seta indica a pegada da pata com nervo lesionado.

Na Figura 7 estão os resultados dos valores de IFC obtidos, observa-se que todos os animais, antes do procedimento cirúrgico possuem a pontuação de 100% de função preservada, caracterizando uma avaliação funcional do nervo ciático normal ou íntegra. Após três semanas da cirurgia os animais de ambos os grupos apresentavam a mesma redução na pontuação. No ponto 4 (4ª semana após a lesão) o grupo Controle apresenta leve melhora na pontuação que gradualmente aumenta até o ponto 7 (7ª semana após a lesão), tendo uma pequena queda no ponto 8 (8ª semana após a lesão). Já o grupo Tratamento, no ponto 4 ainda apresenta queda na pontuação, que aumenta no ponto 5 (5ª semana após a lesão), diminui novamente no ponto 6 (6ª semana após a lesão) e aumenta até o ponto 8 se aproximando do grupo Controle, mas sempre abaixo deste. Contudo, os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa, segundo o teste estatístico realizado.

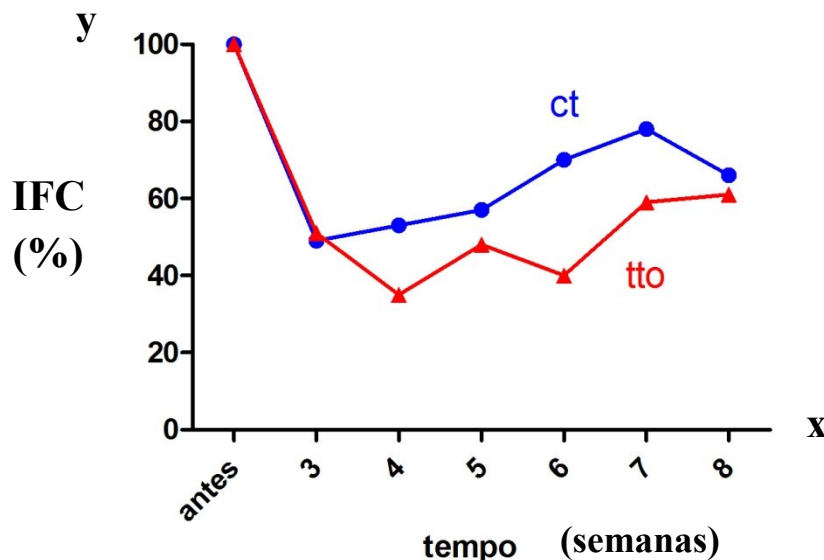


Figura 7: Teste do índice funcional do ciático (IFC) que analisa a recuperação funcional após lesão do nervo.

A **linha azul - ct** corresponde ao grupo Controle e a **linha vermelha - tto** ao grupo Tratamento.

5.2 Imunofluorescência

As Figuras 8, 9 e 10 mostram imunomarcações em cortes longitudinais dos nervos ciáticos coletados, com os anticorpos anti-S100 β , anti-NGFRp75 e anti-neurofilamento, respectivamente.

A proteína S100 β , pertence à família das proteínas S100 e possui um sítio de ligação ao cálcio. A análise da expressão dessa proteína indica a reação das células de Schwann, já que a isoforma β é a única encontrada nos nervos periféricos, nas células de Schwann e é altamente expressa após uma lesão nervosa, estando relacionada à ativação mais intensa destas células no coto proximal do nervo lesionado, principalmente após a primeira semana de lesão, após esse período seus níveis de expressão diminuem se aproximando do nível basal (Assis, 2015; Spreca et al., 1989).

A imunomarcação anti-S100 β (Figura 8A-F) mostra uma maior expressão da proteína nos nervos lesionados dos animais do grupo Tratamento após 60 dias de experimento,

correspondente a uma maior atividade das células de Schwann. Já os animais do grupo Controle, apresentam uma expressão menor da proteína pelas células de Schwann, o que é o esperado para o tempo pós-lesão analisado (Spreca et al., 1989). O gráfico (Figura 8G) apresenta a quantificação da intensidade de marcação e o resultado do teste estatístico realizado a partir da imunomarcação de anti-S100 β . Este demonstra não haver diferença estatística entre os grupos Controle e Tratamento, indicando, entretanto, uma tendência de maior reatividade para o grupo Tratamento.

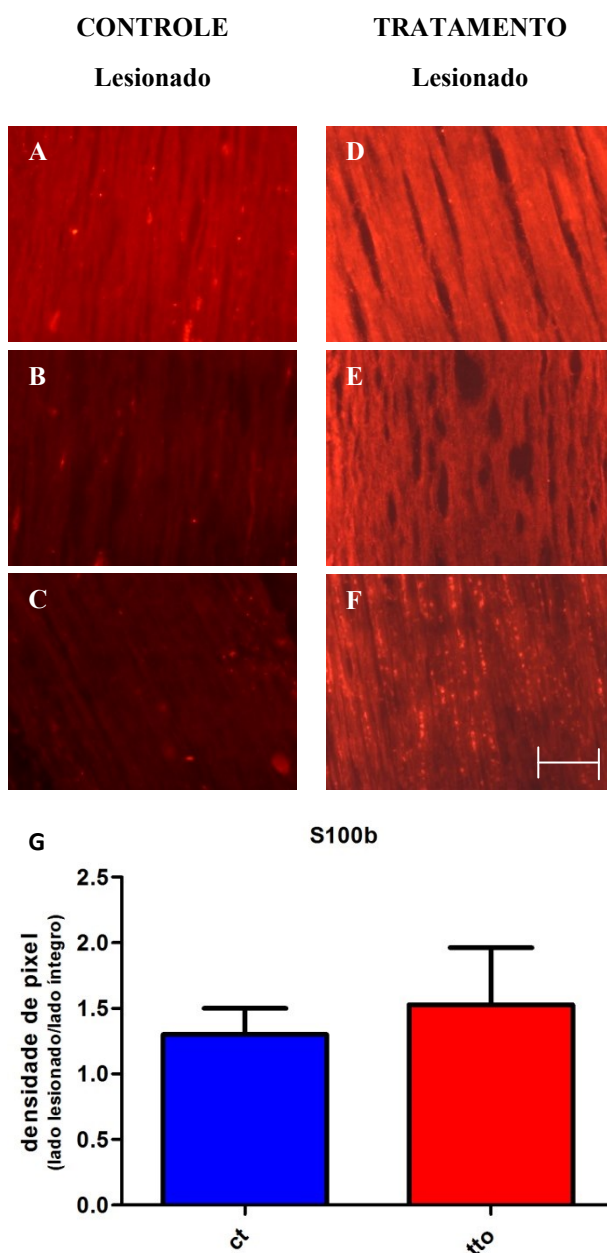


Figura 8: Imunomarcção anti-S100 β em cortes longitudinais do nervo ciático. **A-C:** grupo Controle nervo lesionado, **A:** animal 1 da caixa A, **B:** animal 1 da caixa B, **C:** animal 1 da caixa C. **D-F:** grupo Tratamento nervo lesionado, **D:** animal 1 da caixa D, **E:** animal 1 da caixa E, **F:** animal 1 da caixa F. Observa-se uma maior imunomarcção nos nervos lesionados do grupo Tratamento (**D-F**). **G:** Gráfico da relação da densidade de pixel da imunomarcção anti-S100 β entre os lados esquerdo (lesionado) e o direito (íntegro) de cada grupo no nervo ciático. Teste *U* de Mann Whitney, $p < 0,05$. **Barra azul** – grupo Controle, **barra vermelha** – grupo Tratamento. Escala= 100 μ m.

O fator de crescimento neural (NGF) é uma neurotrofina importante para o crescimento e sobrevivência de diversos neurônios e que possui papel fundamental na regeneração de nervos periféricos. Os efeitos do NGF são mediados por um receptor de superfície celular de alta afinidade e um receptor neurotrófico de baixa afinidade, o NGFRp75 (Receptor Neurotrófico p75) (Sofroniew; Howe; Mobley, 2001). Durante o processo de regeneração do nervo, após a fase inicial, ocorre o aumento da expressão deste receptor pelas células de Schwann, que passam a expressar um fenótipo molecular pró-regenerativo, que se assemelha ao das células de Schwann imaturas e não mielinizadas (Martins et al., 2005). Desta forma, a análise destes receptores indica a presença destas células de Schwann reparadoras.

A Figura 9 apresenta a imunomarcção anti-NGFRp75 e mostra expressão maior da proteína no grupo Controle, o que indica a presença de células de Schwann de fenótipo pró-regenerativo. Enquanto, no grupo Tratamento, esta expressão se mostra menor, consequentemente indicando menor presença de células de Schwann reparadoras. O gráfico (Figura 9G) apresenta a quantificação da intensidade de marcação e o resultado do teste estatístico realizado a partir das imunomarcção de anti-NGFRp75. Este demonstra não haver diferença estatística entre os grupos Controle e Tratamento, indicando, entretanto, tendência de menor marcação para o grupo Tratamento.

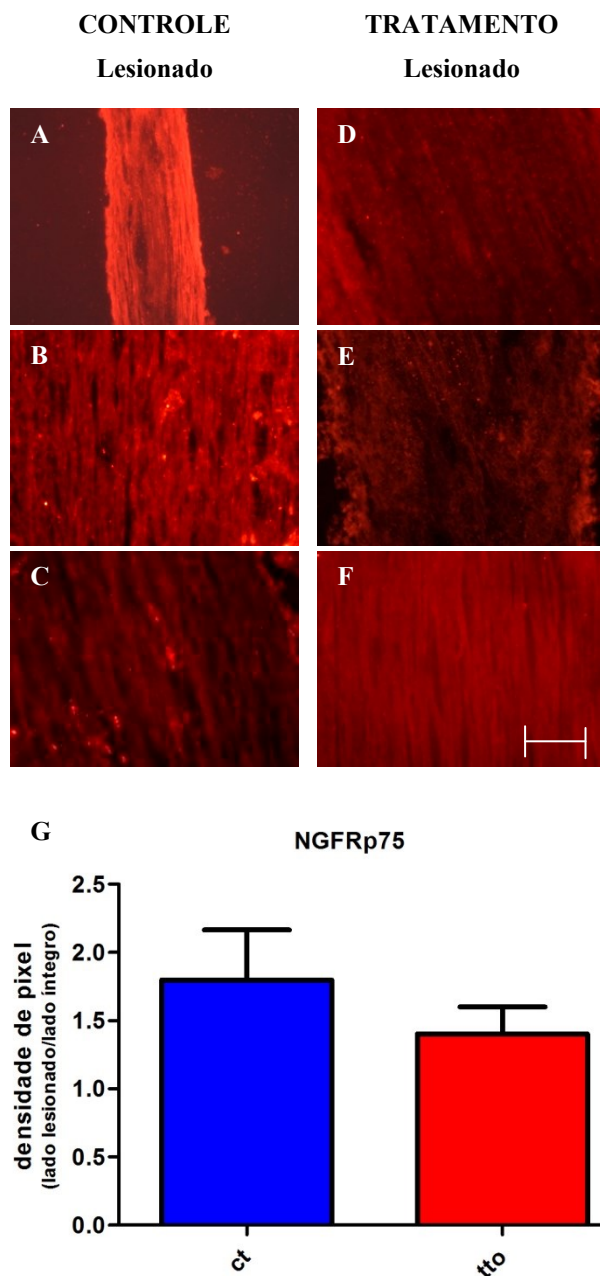


Figura 9: Imunomarcção anti-NGFRp75 em cortes longitudinais do nervo ciático. **A-C:** grupo Controle nervo lesionado, **A:** animal 1 da caixa A, **B:** animal 1 da caixa B, **C:** animal 1 da caixa C. **D-F:** grupo Tratamento nervo lesionado, **D:** animal 1 da caixa D, **E:** animal 1 da caixa E, **F:** animal 1 da caixa F. Observa-se uma menor imunomarcção nos nervos lesionados do grupo Tratamento (**D-F**). **G:** Gráfico da relação da densidade de pixel da imunomarcção anti-NGFRp75 entre os lados esquerdo (lesionado) e o direito (íntegro) de cada grupo no nervo ciático. Teste *U* de Mann Whitney, $p < 0,05$. **Barra azul** – grupo Controle, **barra vermelha** – grupo Tratamento. Escala= 100 μ m.

Neurofilamento, uma das classes de filamentos intermediários, é encontrado nos corpos celulares, dentritos e, principalmente, no axoplasma de neurônios, tendo como função a manutenção da forma dos axônios e a estabilização destes.

Na imunomarcagem anti-neurofilamento (Figura 10) é possível ver que a disposição dos axônios nos cortes longitudinais dos nervos lesionados de ambos os grupos é semelhante. Os axônios estão organizados de forma linear e paralela e apresentam lacunas, evidenciando o acontecimento de um processo de regeneração.

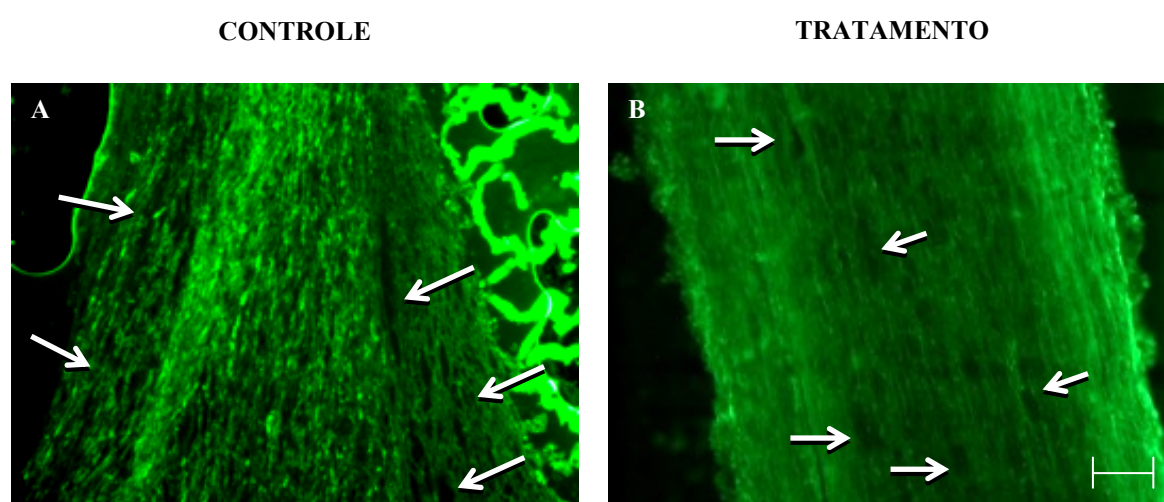


Figura 10: Imunomarcagem anti-neurofilamento em cortes longitudinais do nervo ciático. **A:** grupo Controle e **B:** grupo Tratamento. Observa-se a organização dos axônios e as lacunas (indicadas pelas setas) semelhantes em ambos os grupos. Escala= 100µm.

6 DISCUSSÃO

Após uma lesão nervosa periférica ocorrem alterações morfológicas e funcionais, com modificações no corpo celular, nos segmentos distal e proximal à lesão, no local da lesão e nos órgãos denervados (Silva; Camargo, 2010). Então, tem-se início o processo de regeneração axonal, tendo como componente importante às células de Schwann, assim, algo que possa influenciar neste processo pode-se favorecer ou não o reparo tecidual e funcional

do nervo lesionado. Tendo essa perspectiva, o presente trabalho avaliou o efeito da planta *Aristolochia cymbifera* após lesão do nervo ciático.

Diante dos resultados pode-se observar que, após a lesão houve prejuízo da função dos músculos inervados pelo nervo, o que levou os animais apresentarem a marcha prejudicada. Os animais tratados com o extrato da *A. cymbifera* tiveram sua recuperação funcional sempre inferior ao grupo Controle especialmente nas primeiras semanas após a lesão, mas essa diferença não foi significativa estatisticamente, e os níveis de recuperação foram aproximados na 8ª semana após a cirurgia. Os ensaios de imunofluorescência realizados indicam axônios ainda em processo de regeneração (alinhados) após dois meses da lesão, o que condiz com os resultados obtidos no teste funcional que indicam que a integridade funcional ainda não foi atingida, além disso, a imunomarcção anti-neurofilamento mostra resultados semelhantes do processo regenerativo após o período de experimento, então faz sentido, que os níveis de recuperação funcional após o mesmo período de tempo também sejam semelhantes, como mostrado na Figura 7.

Nos resultados das imunofluorescências, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. No entanto, foi possível observar que os animais do grupo Tratamento apresentaram uma tendência de maior expressão de S100 e menor de NGFRp75 após 60 dias da lesão. Isso nos informa sobre a situação das células de Schwann no nervo. A imunomarcção anti-S100 β , nesse tempo de lesão, já se encontraria próxima ao seu nível basal, já que essas células estão mais ativas especialmente nas primeiras semanas após axotomia. Nesse momento, a expressão de NGFRp75 poderia estar mais elevada indicando o fenótipo pró-regenerativo com grande atividade de síntese de fatores de crescimento, já que o processo regenerativo ainda estava em andamento.

Em vista da importância do processo inflamatório para o sucesso da regeneração axonal, uma possível explicação para essa discrepância nas respostas das células de Schwann no grupo Tratamento, é a ação anti-inflamatória apresentada pela *A. cymbifera* (Melo, 2016). Esta ação poderia influenciar, por exemplo, na infiltração dos macrófagos no tecido, que além de realizarem a fagocitose dos resíduos de mielina produzem neurotrofinas, como o IGF (Fator de crescimento semelhante à insulina), que tem ação sobre a atividade das células de Schwann, sendo assim, com a ação anti-inflamatória o processo inflamatório seria prejudicado, dificultando assim, a produção de neurotrofinas que iriam induzir as respostas adequadas das células de Schwann (Martins et al., 2005), de qualquer forma, teriam que ser feitos experimentos para confirmar essa hipótese.

Desta forma, mesmo que não estatisticamente, qualitativamente os resultados das imunomarcações anti-S100 β e anti-NGFRp75 indicam que o tratamento com o extrato total alcoólico de *A. cymbifera* tem a possibilidade de influenciar as respostas das células de Schwann. Talvez outros métodos de administração do extrato ou mesmo frações deste possam ser usados numa tentativa de potencialização dos efeitos da planta sobre as células de Schwann.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos a partir deste trabalho conclui-se que o tratamento com o extrato bruto da *A. cymbifera* após neurotome do nervo ciático, não possui efeito neuroprotetor no processo de regeneração nervosa periférica.

8 REFERÊNCIAS

ABRAMS, D. Clase – Respuesta de la trivia histológica #1. **HistoScientifics**, 2015. Disponível em: <<http://histoscientifics.blogspot.com.br/2015/09/respuesta-de-la-trivia-histologica.html>>. Acesso em: 21 mar. 2018. il.

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.

ASSIS, A. D. **Efeitos da Angiotensina-(1-7) na regeneração axonal e na plasticidade medular após lesão nervosa periférica**. 2015. 72f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

BAIN J. R.; MACKINNON S. E.; HUNTER D. A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast. Reconstr. Surg.**, Toronto, v. 83, n. 1, p. 129-36, Jan. 1989.

CAJAL, S. R. **Degeneration and regeneration of the nervous system**. New York: Hafner, 1959. 469 p.

COLOMÉ, L. M. et al. Applying of autologous stem cells from bone marrow in the regeneration of tibial nerve of rabbits using the tubulization technique with silicone tube. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2529-34, Dez. 2008.

DELISTOIANOV, N. et al. Implante de tubo de silicone com e sem colágeno na regeneração de nervos em equinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1667-74, Sep. 2008.

GUTH, L. Regeneration in mammalian peripheral nervous system. **Peripheral Nervous System Regeneration**, v. 36, n. 4, p. 441-78, Oct. 1956.

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

INSERRA, M. M.; BLOCH, D. A.; TERRIS, D. J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, [Palo Alto], v. 18, n. 2, p. 119-24, Dec. 1998. il.

ISABEL, M. Neurônio. **SlideShare**, 2010. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/institutoconscienciago/neurnio>>. Acesso em: 08 feb. 2018. il.

LEE, S. K., WOLFE, S. W. Peripheral nerve injury and repair. **J. Am. Acad. Orthop. Surg.**, v. 8, n. 4, p. 243 – 52, Aug. 2000.

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. et al. Sciatic nerve repair using adhesive bonding and modified conduit. **Neural Regen. Res.**, Pequim, v. 9, n. 6, p. 594-601, Mar. 2014.

LUNDBORG, G. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. **J. Hand Ther.**, v. 6, n. 3, p. 179-88, Sep. 1993.

LUNDBORG, G. et al. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. **Journal of Hand Surgery**, Malmo, v. 29, n. 2, p. 100-7, Apr. 2004.

MARTINS, R. S. et al. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. **Arq. Bras. Neurocir.**, v. 24, n. 1, p. 20-25, 2005.

MELO, H. **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). Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2016.

PEIXOTO, L. F. **Avaliação do efeito protetor do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. sobre a neurotoxicidade induzida pelo alumínio**. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biologia. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

PEREIRA, R. N. **Efeito da Catuama e do bilobalide na regeneração nervosa periférica de ratos submetidos à secção do nervo isquático.** 2008. 48f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Programa de Pós Graduação em Cirurgia Veterinária. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

PIERUCCI, A. et al. Effects of aggrecan on Schwann cell migration *in vitro* and nerve regeneration *in vivo*. **Braz. J. Morphol. Sci.**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 125-30, 2004.

PISTARINI, L. C. Y. **Avaliação *in vivo* do potencial regenerativo na degeneração Walleriana de nervos periféricos – com a utilização de laser de baixa potência e composto polivitamínico 3-NERVE®.** 2015. 82f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Programa de Pós Graduação em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

RAUBER, C. **Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú composto) em ratos wistar.** 2006. 75f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

REBOUÇAS, T. C. S. **Composição química e atividade biológica do extrato bruto etanólico do pólen de *Corymbia Torelliana* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson. (Myrtaceae).** 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Biológicas.

Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2017

SANTOS, F. S. **As plantas brasileiras, os jesuítas e os indígenas do Brasil: história e ciência na triaga brasílica (séc. XVII-XVIII)**. São Paulo: Casa do Novo Autor, 2009. 240 p. ISBN 978-85-7712-1182

SEDDON, H. J. A classification of nerve injuries. **British Medical Journal**, Londres, v. 2, n. 4260, p. 237-9 Aug. 1942.

SCHMIDT, C. E.; LEACH, J. B. Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, Austin, v. 5, p. 293-347, 2003.

SILVA, C. K.; CAMARGO, E. A. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas. **Rev. Saúde e Pesquisa**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 93-98, 2010.

SIQUEIRA, R. Peripheral Nerve Injury: A Review. **Rev. Neurocienc.**, v. 15, n. 3, p. 226-233, 2007.

SOFRONIEW, M. V.; HOWE, C. L.; MOBLEY, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 1217-81, 2001.

SPRECA, A. et al. Immunocytochemical localization of S-100b protein degenerating and regenerating rat sciatic nerves. **J. Histochem Cytochem**, v. 37, p. 441-6, 1989.

TABACH, R. et al. Editorial: Farmacovigilância de medicamentos dinamizados. **Boletim Planfavi: Sistema de farmacovigilância em plantas medicinais**, São Paulo, ano 7, n. 27, p. 1-4, Jul./Set. 2013.

TERRIS, D. J. et al. 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**, [Palo Alto], v. 26, n. 2, p. 117-22, Apr. 1999.

VIOTT, A. M. **Os nervos periféricos e suas alterações**. 2006. 132f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006.

ANEXO 1



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