

LARA CLEMES ASSIS

**EFEITO DA FRAÇÃO RICA EM PROANTOCIANIDINAS
DA PLANTA *CROTON CELTIDIFOLIUS* SOBRE A
NEUROTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA:
UM ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

**FLORIANÓPOLIS
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO DA FRAÇÃO RICA EM PROANTOCIANIDINAS
DA PLANTA *CROTON CELTIDIFOLIUS* SOBRE A
NEUROTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA:
UM ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

Co-Orientadora: Dra. Janice Koepf

LARA CLEMES ASSIS

Aquele que conhece os outros é sábio.

Aquele que conhece a si mesmo é iluminado.

Aquele que vence os outros é forte.

Aquele que vence a si mesmo é poderoso.

Aquele que conhece a alegria é rico.

Aquele que conserva seu caminho tem vontade.

Sejas humilde, e permanecerás íntegro.

Curva-te, e permanecerás ereto.

Esvazia-te, e permanecerás repleto.

Gasta-te, e permanecerás novo.

O sábio não se exhibe, e por isso brilha.

Ele não se faz notar, e por isso é notado.

Ele não se elogia, e por isso tem mérito.

*E porque não está competindo,
ninguém no mundo pode competir com ele.*

(Lao Tsu)

*Dedico este trabalho a minha mãe Rosita
e meu pai Tadeu.*

Ao meu companheiro e namorado

Maicon Pizzolotto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus, obrigada, por nunca ter me abandonado;

A Prof. Dr. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, por toda ajuda, conselhos e amizade, por ter sido minha mãe muitas vezes, obrigada pela oportunidade professora e pelo respeito, por sempre me tratar com carinho e humildade;

A Dra. Janice Koepp, minha co-orientadora, por toda ajuda, carinho e amizade. Agradeço a Janice, por ter me ensinado com muita paciência e amor, pela confiança e dedicação, por toda preocupação, sem palavras para agradecer;

A minha mãe Rosita, obrigada mãe, por tudo, você sempre será tudo que tenho de melhor, amo você minha “mãezinha querida”;

Ao meu pai Tadeu, “papis” obrigada por todo amor;

Ao meu companheiro e namorado Maicon, obrigada por estar sempre ao meu lado, pelos conselhos, por me fazer tão feliz, por me permitir sonhar, me ouvir, por me mostrar que o amor supera toda distância e as diferenças, você já faz parte de mim meu “Preto”;

A minha irmã Alana e meu cunhado Aury, obrigada pelo amor e carinho;

Ao meu sobrinho e afilhado Alan, você sempre será o bebê da “Madri”;

Ao meu primo Raulzinho por fazer meus dias mais felizes;

A minha prima Rafaela, por estar sempre comigo;

Aos meus primos Danon e Maykon, por todo carinho, conselhos e amizade;

As minhas colegas de trabalho e amigas Ale, Lenyta, e Stef, por toda ajuda, vocês fizeram meus dias melhores; obrigada por tudo meninas;

A minha amiga Mariana Apell, por toda ajuda e amizade;

A Gisele Volpato, Livia, Amandinha e Baiana pela amizade;

Aos meus amigos, Eduardo, Paulo, Thiago e Manuel por toda amizade;

A aluna de iniciação científica, Jeni e Mari, obrigada pela ajuda meninas;

Ao Prof. Dr. Giles e seus orientados, pelo carinho, receptividade e por me concederem a alegria de confraternizarmos bons momentos, por toda ajuda;

Ao Prof. Dr. Adair e seu aluno Daniel por toda ajuda;

Ao Murilo e Pedro, bioteristas, obrigada por tudo e pela amizade;

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Farmacologia;

A FAPESC e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Glutamato	14
1.1.1. Glutamato e excitotoxicidade.....	16
1.2. A lesão medular traumática	16
1.2.1. Patofisiologia da lesão medular traumática	17
1.3. A planta <i>Croton celtidifolius</i>	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Animais.....	24
3.2. Caracterização da FRP	24
3.3. Cultura primária de células do GRD.....	24
3.4. Avaliação imunocitoquímica dos da presença de células neuronais em GRD.....	25
3.5. Neurotoxicidade induzida por glutamato	26
3.6. Avaliação da viabilidade celular.....	26
3.7. Avaliação da liberação de LDH	27
3.8. Avaliação do efeito anti-apoptótico da FRP	27
3.9. Dosagem intracelular de EROs	28
3.10. Neurotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio	28
3.11. Indução da lesão medular	28
3.12. Avaliação da atividade locomotora dos animais	30
3.13. Avaliação da força de preensão	30
3.14. Análise Estatística	30
3.15. Drogas e reagentes	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Experimentos <i>in vitro</i>	31
4.1.1. Padronização da cultura de neurônios de GRD de ratos adultos.....	31
4.1.2. Padronização do modelo de neurotoxicidade induzida por glutamato em cultura de GRD adultos.....	34
4.1.3 Efeito da FRP sobre a morte celular induzida por glutamato...	35
4.1.4 Avaliação do perfil de liberação da enzima LDH induzido por glutamato	38
4.1.5 Quantificação da liberação de espécies reativas de oxigênio induzida por glutamato e o possível efeito antioxidante da FRP.....	41

4.1.6 Envolvimento de receptores glutamatérgicos no efeito neuroprotetor desencadeado pela FRP	43
4.2 Experimentos <i>in vivo</i>	47
4.2.1 Análise da atividade locomotora dos animais submetidos à lesão medular por compressão e o efeito do tratamento sistêmico com a FRP.....	47
4.2.2 Análise da força de preensão dos animais submetidos ao trauma da medula espinhal e o efeito da FRP.....	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS	57

LISTA DE ABREVIACÕES

μg	-	Micrograma
μL	-	Microlitro
μM	-	Micromolar
μM	-	Micrmetro
mM	-	Milimolar
ANOVA	-	Análise de Variância
AMPA	-	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazopropionato
ATP	-	Adenosina Trifosfato
CEUA	-	Comitê de tica em Pesquisa no Uso de Animais
DAPI	-	4,6-diamino-2-fenilindol-dihidroclorido intercalar
DCF	-	2,7-diclorodihidrofluoresceína
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle
EAF	-	Subfrao de <i>Croton celtidifolius</i>
E.P.M	-	Erro Padrão da Média
EROS	-	Espécies Reativas de Oxignio
FRP	-	Frao Rica em Proantocianidinas
GLAST	-	Transportador de Glutamato Aspartato
GFAP	-	Proteína Glial Fibrilar cida
GRD	-	Gânglio da Raiz Dorsal
HOE-140	-	Antagonista de Receptores B2 para Cininas
JNK	-	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
HOECHST	-	Técnica de Colorao do Núcleo Celular
LDH	-	Lactato-desidrogenase
MK-801	-	(+)-5methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo (a,d) cyclohepten-5-10-imine maleate
M-CPG	-	Antagonist alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine
MTT	-	3-(4,5-dimetil-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADH	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NEU-N	-	Neurofilamento-N
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
NIH	-	National Institutes of Health
NGF	-	Fator de Crescimento do Nervo
NMDA	-	N-metil-D-Aspartato
NSCISC	-	National Spinal Cord Injury Statistical Center
PKC	-	Proteína Quinase C
SNC	-	Sistema Nervoso Central
TRM	-	Traumatismo Raquimedular

- TRPA1 - Antagonista de Receptores de Potencial Transitório
com Domínios tipo Anquirina
- UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Lesão medular traumática.....	19
Figura 2:	Visão panorâmica da <i>Croton celtidifolius</i>	21
Figura 3:	Curva de padronização da cultura de GRD com e sem NGF.....	32
Figura 4:	Fotografias de células do gânglio da raiz dorsal mantidos em cultura durante 24 e 96 horas.....	33
Figura 5:	Imunocitoquímica da presença de células neuronais em cultura de gânglios da raiz dorsal de ratos adultos.....	34
Figura 6:	Padronização do modelo de neurotoxicidade induzida por glutamato em GRD de ratos adultos.....	35
Figura 7:	Efeito da FRP sobre a morte celular induzida por glutamato por 12 horas (co-tratamento) e 6 horas (Pós-tratamento).....	36
Figura 8:	Efeito <i>per se</i> da FRP sobre a viabilidade das células dos GRD de ratos adultos.....	38
Figura 9:	Perfil de liberação da enzima LDH induzida por Triton-X.....	39
Figura 10:	Efeito da FRP sobre a liberação da LDH induzida por glutamato em cultura de DRG.....	40
Figura 11:	Avaliação das células apoptóticas pela coloração de Hoechst.....	41
Figura 12:	Avaliação dos níveis de EROS em GRD pela formação de DCF.....	42
Figura 13:	Efeito da FRP sobre a morte celular induzidas por peróxido de hidrogênio.....	43
Figura 14:	Efeito dos antagonistas glutamatérgicos sobre a morte celular induzida por glutamato em cultura de DRG de ratos adultos.....	44
Figura 15:	Efeito da viabilidade celular de células de GRD de ratos adultos tratadas com agonistas e antagonistas glutamatérgicos e FRP.....	46
Figura 16:	Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos à lesão da medula espinhal pela escala BBB.....	48
Figura 17:	Efeito da FRP sobre o déficit locomotor de ratos submetidos à lesão medular.....	48

Figura 18: Avaliação da força de preensão 28 dias após a lesão da medula espinhal de ratos..... 49

Resumo

Glutamato, o principal neurotransmissor central excitatório, induz excitotoxicidade neuronal pela ativação de receptores NMDA e AMPA, promovendo o influxo de cálcio nos neurônios. Estudos recentes do nosso grupo demonstram que as frações e sub-frações isoladas da *Croton celtidifolius* possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antinociceptivas. Assim, utilizando um modelo *in vitro* de excitotoxicidade induzida por glutamato (Glu) e *in vivo* de neurotoxicidade decorrente da lesão da medula espinhal de ratos Wistar adultos, avaliou-se o possível efeito neuroprotetor da fração rica (FRP) em proantocianidinas isolada da *C. celtidifolius*. Glu induziu morte de células do gânglio da raiz dorsal (GRD), de forma dependente da concentração e do tempo de exposição. O pós-tratamento com a FRP (1 - 100 µg/ml) inibiu em até 37% a morte celular induzida por Glu (1 mM). Já o co-tratamento, foi capaz de reduzir a morte celular em 27%. A exposição das células ao Glu (0,01, 0,1 e 1 mM) aumentou os níveis da enzima lactato desidrogenase de 6,5 % (células controle) para 37, 49 e 63 % respectivamente, indicativo de alteração na permeabilidade da membrana celular. Esta alteração foi atenuada pelo tratamento das células com a FRP (100 µg/mL). Ademais, o insulto glutamatérgico induziu a geração de espécies reativas de oxigênio, a qual foi inibida pelo tratamento das células do GRD com FRP (100 µg/ml). Além disso, o efeito neuroprotetor desencadeado pela FRP parece ser mediado em parte pela inibição de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, mas não os metabotrópicos uma vez que a perda da viabilidade celular decorrentes da exposição das células ao agonista NMDA, mas não ao agonista metabotrópico, foi revertida pela FRP. Nos estudos *in vivo*, animais submetidos a lesão medular e tratados com a FRP na dose de 10 mg/kg por via intraperitoneal, durante 5 dias consecutivos, apresentaram um melhora significativa na performance locomotora e na força de preensão, quando comparado aos animais lesados tratados com veículo. Em conjunto, estes resultados fornecem a primeira evidência de que a FRP atenua a morte celular por necrose e por apoptose, bem como a produção de EROs induzida por Glu, inibe a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio e pelo agonista NMDA. A FRP também foi capaz de promover uma melhora na atividade locomotora e na força de preensão de animais submetidos à lesão traumática da medula espinhal, reforçando a hipótese de que polifenóis podem ser ferramentas terapêuticas promissoras como agentes neuroprotetores.

Palavras-chave: *Croton celtidifolius*, cultura de gânglios da raiz dorsal (DRG), glutamato, neuroproteção, Fração Rica em Proantocianidinas, lesão medular.

Abstract

Glutamate, the major central excitatory neurotransmitter, induces neuronal excitotoxicity by activation of NMDA and AMPA receptors and stimulating the influx of calcium into neurons. Recently, our group showed that fractions and subfractions isolated from *Croton celtidifolius* have antiinflammatory, antioxidant and antinociceptive properties. Thus, using an in vitro model of excitotoxicity induced by glutamate (Glu) and in vivo neurotoxicity caused by spinal cord injury (SCI) in adult Wistar Rats, we evaluated the possible neuroprotective effect of a proanthocyanidin-rich fraction (PRF) isolated from the bark of *Croton celtidifolius*. Glu induced cell death of dorsal root ganglion (DRG) in a manner concentration-dependent and the exposure time. The post-treatment with FRP (from 1 to 100 µg / mL) inhibited the cell death induced by Glu (1 mM) in 37%. Since co-treatment, was able to reduce cell death in 27%. The exposure of cells to glu (0.001, 0.1 and 1 mM) increased the levels of the enzyme lactate dehydrogenase from 6.5% (control cells) to 37, 49 and 63% respectively, indicating changes in cell membrane permeability. This change was attenuated by treatment of cells with the PRF (100 µg / mL). Moreover, the glutamatergic insult induced generation of reactive oxygen species, which was inhibited by treatment of cells with FRP (100 µg / mL). Moreover, the neuroprotective effect triggered by FRP seems to be mediated in part by inhibition of NMDA-type glutamate receptors, but not metabotropic receptors, since the loss of cell viability after exposure of cells to NMDA agonist, but not a metabotropic agonist was reversed by FRP. The in vivo studies, animals subjected to SCI and treated with PRF at a dose of 10 mg / kg by i.p. route for 5 consecutive days showed a significant improvement in locomotor performance and grip force when compared to injured animals treated with vehicle. Taken together, these results provide the first evidence that PRF attenuated the cell death by apoptosis and the production of ROS induced by Glu, also inhibits cell death induced by hydrogen peroxide and the NMDA agonist receptors. The FRP was able to promote an improvement in locomotor activity and grip strength of animals subjected to traumatic spinal cord injury (SCI), reinforcing the hypothesis that polyphenols are promising therapeutic tools such as neuroprotective agents.

Keywords: *Croton celtidifolius*, culture of dorsal root ganglia (DRG), glutamate receptors, neuroprotection, proanthocyanidin-rich fraction, spinal cord injury

APRESENTAÇÃO

A lesão medular traumática, uma síndrome neurológica altamente incapacitante, sofre globalmente com a falta de atenção tanto da comunidade científica quanto da sociedade, principalmente devido à dificuldade em reproduzir de modo fidedigno à síndrome humana. A lesão medular acomete 250.000 pacientes no Brasil as quais se somam cerca de 9.000 novos casos por ano (ROSSIGNOL, 2009). O tratamento é caro, contínuo e não apresenta resolutividade adequada. De acordo com a Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina, devido à inexistência de centros especializados, o Estado gasta R\$ 3 milhões por ano para enviar pacientes portadores de paralisia à centros especializados.

Neste contexto, buscando identificar novas estratégias terapêuticas para a recuperação funcional de pacientes portadores de lesão medular traumática, iniciou-se em 2008 um projeto multidisciplinar coordenado pelo Prof. Dr. Giles Alexander Rae e pela Dra Janice Koepp, financiado pela Fundação de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica de Santa Catarina – FAPESC intitulado “Desenvolvimento de novas estratégias para tratamento da lesão medular traumática”. O projeto tem como grandes metas (i) a avaliação das alterações fisiopatológicas e moleculares decorrentes da lesão medular traumática em roedores, (ii) a modelagem matemática da medula espinhal, (iii) a avaliação epidemiológica da população catarinense de portadores de lesão medular e (iv) a prototipagem de microchips orgânicos impressos suscetíveis de agir na lesão medular. No contexto fisiopatológico, os resultados do grupo demonstram um importante efeito de antagonistas de receptores de potencial transitório com domínio do tipo anquirina (TRPA1) (ANDRADE et al., 2011) e de antagonistas de receptores B₁ e B₂ para a bradicinina (FORNER et al., submetido) na modulação da hiperatividade da bexiga urinária decorrente da lesão medular traumática. Demonstram ainda que a administração intratecal do antagonista SP600125, um inibidor da ativação da proteína ativada por mitógeno JNK, foi capaz de promover uma melhora significativa no desempenho locomotor de animais submetidos a lesão medular traumática moderada. Esta melhora parece estar associada à capacidade deste antagonista em inibir a apoptose celular no sítio da lesão (MARTINI et al., em preparação).

O presente estudo, o qual é parte integrante do projeto multidisciplinar, teve por meta específica investigar o possível efeito neuroprotetor de subfrações ricas em proantocianidinas (FRP) isolados da planta *Croton*

Celtidifolius sobre a morte neuronal induzido por trauma da medula espinhal. Assim, visando minimizar o número de animais utilizados no estudo, bem como caracterizar os mecanismos envolvidos na possível ação neuroprotetora da FRP primeiramente uma série de experimentos *in vitro* foi realizada através do uso de um modelo de excitotoxicidade induzida por glutamato em neurônios periféricos. A partir dos dados obtidos *in vitro*, deu-se início ao tratamento sistêmico de animais submetidos a lesão da medula espinhal, nos quais avaliou-se alterações nos parâmetros locomotores e sensoriais. Neste contexto, visando um melhor entendimento da temática abordada no estudo, na introdução será apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre glutamato e excitotoxicidade. Em seguida, serão descritos dados epidemiológicos, fisiopatológicos e terapêuticos da lesão medular traumática, bem como sua correlação com a fração rica em proantocianidinas isoladas da planta *Croton celtidifolius*. Após a descrição dos objetivos geral e específicos, serão apresentados os resultados, seguido da discussão dos mesmos e por fim as conclusões e referências bibliográficas.

INTRODUÇÃO

1.1 GLUTAMATO

O glutamato, considerado o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, desempenha importante papel na manutenção de aspectos funcionais do cérebro, tais como: cognição, aprendizagem, memória e controle motor. Além disso, desempenha papel fundamental no desenvolvimento do SNC, inclusive na indução sináptica, migração, diferenciação e morte celular (MCDONALD e JOHNSTON, 1990).

O metabolismo celular do glutamato envolve tanto neurônios quanto astrócitos. Este é transportado para o interior de vesículas sinápticas por um transportador de baixa afinidade, através de um mecanismo dependente de gradiente próton-eletrólítico promovido por uma ATPase, de onde é subsequentemente liberado por exocitose. Quando o glutamato é liberado das terminações nervosas em resposta a um estímulo de despolarização promovido pela entrada de íons cálcio, ele interage com seus receptores específicos localizados principalmente na membrana dos terminais sinápticos e de astrócitos (NAITO e UEDA, 1985).

Como parece haver nenhuma enzima extracelular capaz de metabolizar o glutamato liberado pelos terminais pré-sinápticos, a única maneira rápida e eficaz de promover a sua retirada do fluido extracelular é através da captação feita por transportadores de alta afinidade para o glutamato. Estes carreadores estão localizados nos neurônios e principalmente nas células gliais e são dependentes de íons sódio. Nos astrócitos, o glutamato captado do fluido extracelular é convertido em glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase e liberado por intermédio de transportadores de glutamina para o meio extracelular, sendo então reconvertida a glutamato quando captado pelas células neuronais (ROBINSON e DOWND, 1997). O tráfego de glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos parece ser a maior rota de reciclagem do neurotransmissor no SNC.

O neurotransmissor glutamato interage com duas classes de receptores glutamatérgicos, os quais são denominados ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são uma família de canais iônicos caracterizados de acordo com seu agonista mais seletivo: N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidróximetilisoxazolepropionato (AMPA) e cainato (KA). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos acoplam-se a proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas-G), através das quais promovem

a modulação de efetores intracelulares e ativam e/ou inibem diversos eventos de transdução do sinal celular (OBRENOVITCH e URENJAK, 1997).

Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos estão difusamente localizados no SNC. O receptor do subtipo NMDA está particularmente concentrado no córtex cerebral, no hipocampo e nas células granulosas do cerebelo, além do estriado tálamo e medula espinhal. A distribuição dos receptores AMPA parece ser paralela à dos receptores NMDA. Os receptores cainato estão situados em poucas áreas cerebrais, no córtex cerebral e nas áreas hipocampais. De forma geral, os receptores glutamatérgicos ionotrópicos se localizam no nível pós-sináptico (GOODMAN e GILMAN 2010; SILVA, 2010).

O receptor NMDA apresenta três aspectos característicos: (i) sob condições de repouso permanece bloqueado por Mg^{2+} , de modo que correntes iônicas através deste receptor ocorrem somente quando a membrana neuronal é despolarizada; (ii) quantidades significativas de íons Ca^{2+} entram na célula durante a ativação deste receptor; e (iii) a neurotransmissão mediada pelo receptor NMDA ocorre lentamente e continua por um período prolongado. Os receptores NMDA são positivamente regulados por glicina, poliaminas e por fosforilação. A sua atividade pode ser diminuída pela oxidação de grupos sulfidrilas em seu sítio redox (STONE & ADDAE, 2002).

Os receptores metabotrópicos são receptores acoplados a proteínas G, ligados a sistemas de segundos mensageiros intracelulares e compreendem oito subtipos, distribuídos em três classes principais. Eles possuem uma cauda N-terminal extracelular muito grande que contém o local de ligação com o glutamato, em contraste com a maioria das aminas, nos quais o sítio de ligação do agonista está mergulhado entre as hélices transmembrana (RANG et al., 2007).

Efeitos neurotóxicos dos agonistas dos receptores glutamatérgicos e o bloqueio ou prevenção da indução de toxicidade na presença de antagonistas específicos têm sido avaliados. Entre os compostos mais frequentemente usados estão os antagonistas dos receptores NMDA, tais como: ácido [3-[(+)-carboxipiperazina-4-il]prop-1-il]-fosfônico (CPP), ácido D-2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP7) e (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d]ciclohepteno-5,10-imina (MK-801); e os antagonistas não NMDA, 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX), g-D glutamilamino-metilsulfonato (GAMS), e 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), são mais efetivos para os receptores de KA; e 2,3-dihidróxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo-(F)-quinoxalinal (NBQX) é o mais efetivo antagonista competitivo específico para os receptores AMPA (SHEARDOWN et al., 1990).

1.1.1 Glutamato e Excitotoxicidade

A potencialidade do neurotransmissor glutamato como mediador de eventos patológicos foi descoberta simultaneamente à caracterização do seu papel como o principal agente excitatório das sinapses no SNC. Estudos realizados que definiram seu papel fisiológico mostraram que a aplicação direta de altas concentrações de glutamato a neurônios de retina (LUCAS e NEWHOUSE, 1957) e a injeção de glutamato monossódico em camundongos neonatos, produziam lesões hipotalâmicas e retinianas (OLNEY, 1969). O termo excitotoxicidade foi criado para definir a morte neuronal causada pela administração de altas concentrações de glutamato exógena ou compostos com ação agonística nos receptores para glutamato (OLNEY, 1981). Este tipo de excitotoxicidade exógena tem sido amplamente demonstrado *in vitro* e *in vivo*, inclusive em humanos que acidentalmente consomem mexilhões contaminados com o análogo de KA, o ácido domóico (PENG et al., 1994).

O excesso de glutamato, além de causar toxicidade para neurônios, também pode estar envolvido na morte de células gliais, como astrócitos neocorticais e em oligodendrócitos. A microglia parece ser o tipo celular menos susceptível à excitotoxicidade, uma vez que estas células só expressam receptores para glutamato quando estão ativas (MATUTE, 2002).

A excitotoxicidade glutamatérgica está envolvida em alterações neurológicas agudas como hipóxia cerebral, traumatismo craniano, epilepsia (MELDRUM, 2000), doenças neurodegenerativas crônicas como as de Alzheimer, Parkinson, Huntington (LIPTON e ROSENBERG, 1994), e traumatismos da medula espinhal (HALL E BAINS, 2011). O mecanismo primário da morte celular induzida por glutamato envolve o desequilíbrio iônico promovido pela entrada excessiva de cálcio, inicialmente por atuar via seus receptores ionotrópicos e posteriormente atuando também via seus receptores metabotrópicos (MICHAELIS, 1998). O aumento de cálcio intracelular leva à ativação de enzimas como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintases e endonucleases que contribuem para a morte celular através de diversos mecanismos (MELDRUM, 2000). No contexto do presente trabalho a ênfase maior será dada à morte celular induzida por glutamato na lesão medular traumática.

1.2. A LESÃO MEDULAR TRAUMÁTICA

A lesão medular traumática ou traumatismo raquimedular - TRM (coluna vertebral e medula espinhal) é uma lesão frequente na vida moderna que acarreta uma síndrome neurológica altamente incapacitante. A taxa de

incidência mundial de lesões da medula espinhal é de 22 ocorrências por milhão de habitantes (ROSSIGNOL et al., 2007). No Brasil, há cerca de 250.000 pacientes com esta condição, somando-se aproximadamente 9 mil novos casos por ano (MEYER et al., 2003). O *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (NSCISC) dos Estados Unidos estima que a lesão medular ocorra em cerca de 20% das fraturas da coluna vertebral, e que 10 a 15% dos pacientes apresentem dano neurológico severo com grande morbidade, sendo de 5% a taxa de mortalidade (NSCISC, 2009).

Devido à elevada incidência e os custos envolvidos no diagnóstico, tratamento, reabilitação e suporte destes pacientes, esta patologia representa um grande problema socioeconômico. Dados fornecidos pelo relatório anual do NSCISC de 2009 demonstram que a lesão é mais frequente no sexo masculino, representando 80% dos casos, sendo os adultos jovens, na faixa etária de 14 a 40 anos, os mais atingidos. Os acidentes automobilísticos são a principal causa destas lesões, seguido por quedas de alturas, ferimentos por arma de fogo e traumatismos esportivos (NSCISC, 2009).

1.2.1 Patofisiologia da lesão medular traumática

Diversos estudos em modelos experimentais voltados ao entendimento da patofisiologia da lesão medular traumática sugerem que o imenso déficit neurológico é decorrente de dois eventos distintos: a lesão primária e a lesão endógena secundária subsequente à primeira. A lesão primária é produzida pelo trauma em si, com morte celular, liberação de eletrólitos, metabólitos e enzimas, sendo, portanto, um processo mecânico que independe de controle celular envolvendo hemorragia disseminada no sítio da lesão e necrose de componentes celulares do SNC.

A lesão endógena secundária, cujo início se dá imediatamente após o trauma, resulta da combinação de diversos eventos destrutivos progressivos tais como edema, isquemia, desequilíbrio iônico, acúmulo de neurotransmissores, neurotoxicidade, peroxidação lipídica, formação de radicais livres, apoptose glial e neuronal, além de uma complexa resposta neuroinflamatória que persiste por meses ou anos após o trauma inicial (TATOR & FEHLINGS, 1991; YAMAURA ET AL., 2002; HULSEBOSCH, 2002; PROFYRIS et al., 2004).

Resumidamente, a lesão tecidual primária induz a liberação de eletrólitos, radicais livres, fragmentos de membrana e aminoácidos excitatórios, os quais aumentam a concentração de cálcio intracelular a níveis tóxicos. Na microcirculação observa-se hemorragia e trombose. Os sistemas eletrolíticos não são capazes de regular o fluxo iônico. Como consequência, a liberação de aminoácidos excitatórios ativam receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e

AMPA, os quais induzem aumento de cálcio intracelular e aumento no consumo de energia.

Concomitantemente, ocorre um aumento do influxo intracelular de Na^+ , Ca^{++} e Cl^- e efluxo de K^+ , favorecendo a excitotoxicidade. Ademais, após a lesão da medula espinhal, o metabolismo de glutamato mediada pelos astrócitos é prejudicado e a depuração é inibida por citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, (CHAO et al., 1995), espécies reativas de oxigênio (PIANI et al., 1993; VOLTERRA, 1994) e ácido araquidônico (ZERANGUE et al., 1995), aumentando ainda mais os níveis de glutamato. A microglia ativada e os macrófagos também induzem um aumento de glutamato na fenda sináptica (PIANI e FONTANA, 1994).

Como resultado, as concentrações extracelulares de glutamato e outros aminoácidos excitatórios aumentam seis a oito vezes acima dos níveis normais. A liberação excessiva de glutamato leva ao estímulo exagerado dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, contribuindo para um ciclo vicioso no qual a morte de células no sítio da lesão favorece a morte de células neuronais e gliais vizinhas. Os oligodendrócitos são os mais prejudicados, uma vez que estes apresentam maior permeabilidade ao cálcio e sofrem sensibilização por ciclooxigenase-2, resultando em morte excitotóxica (PROFYRIS et al., 2004; CARLSON et al., 2010). Em adição, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF o qual modula a expressão sináptica de receptores AMPA e GABA, tornando os neurônios ainda mais susceptíveis à excitotoxicidade (BEATTIE et al., 2002; STELLWAGEM et al., 2005).

Além disso, ocorre peroxidação lipídica e produção de radicais livres, tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxinitrito, os quais favorecem a hipoperfusão da medula espinhal, o edema, a falha na condução axonal e a quebra do metabolismo energético (HULSEBOSCH, 2002).

Em decorrência da lesão secundária, a medula espinhal apresenta ainda gliose reativa extensa em estágios mais avançados do processo. Durante este processo, as ações dos astrócitos e de outros tipos celulares, incluindo as do sistema imune, criam um ambiente altamente desfavorável à regeneração neuronal do local afetado pela lesão (PROFYRIS et al., 2004). Por sua vez, o recrutamento de neutrófilos em estágios iniciais, e de macrófagos em estágios mais tardios da lesão medular leva à exacerbação da injúria neural. Mais adiante, o recrutamento de linfócitos T helper pode prover algum suporte trófico para reparos de componentes neuronais ou não-neuronais do tecido lesado. No entanto, fatores inibitórios expressos no sítio da perilesão inibem o processo de regeneração neuronal (HULSEBOSCH, 2002). Então inicia-se a degeneração Walleriana com morte de oligodendrócitos, formação de cistos e de uma cicatriz constituída principalmente de astrócitos e fibroblastos, representando o estágio final da evolução histopatológica (BAUCHET et al.,

2009; NORENBURG et al., 2004). Partes destes eventos fisiopatológicos encontram-se representados na figura 1 abaixo.

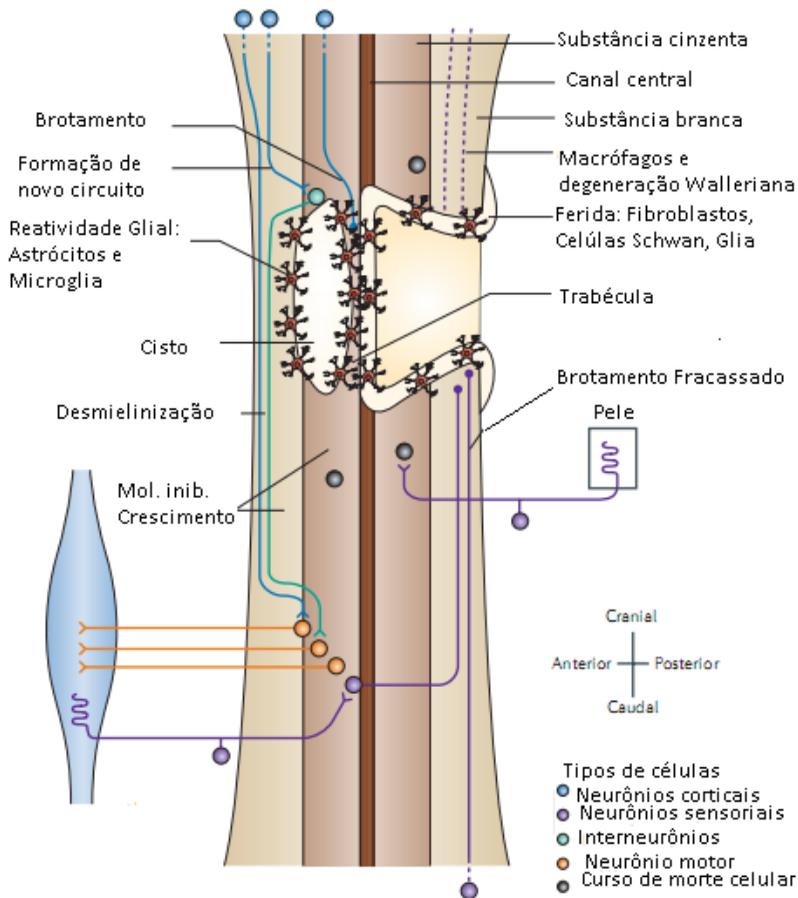


Figura 1: Figura esquemática de um corte sagital da medula espinal lesionada mostrando alguns aspectos fisiopatológicos decorrentes da lesão da medula espinal (Adaptado de Thuret, et al., 2006).

Diante da complexa cascata de eventos fisiopatológicos descrita acima, as pesquisas dedicadas à lesão medular traumática têm se voltado a estratégias

que visam à redução do edema e produção de radicais livres, o controle da excitotoxicidade, o controle da inflamação, a inibição de apoptose celular, o reparo da desmielinização, a regeneração axonal e restauração da sua condutibilidade e conectividade, a reposição celular, a minimização das disfunções autonômicas, a restauração da coordenação motora ou o alívio da dor neuropática crônica.

Dentre as estratégias mencionadas acima, algumas tiveram êxito e encontram-se em fase clínica nos quais se estuda a eficácia do tratamento com metilprednisolona, aminoesteróides, gangliosídeo GM1 (Sygen, um esfingolípídeo promotor do crescimento de neurito e da transmissão sináptica), hormônio liberador de tireotropina, gaciclidina (GK-11, um antagonista de receptores NMDA), naloxona (antagonista opióide) e nimodipina (bloqueador de canais de cálcio do tipo L) riluzole e minociclina, inativação de inibição de mielina e o transplante de vários substratos celulares na medula espinhal lesada (para revisão ver HAWRYLUK et al., 2008).

No entanto, a intervenção clínica atual se restringe, essencialmente, na estabilização da coluna vertebral, restauração do alinhamento, descompressão da medula espinhal e no uso de doses elevadas de glicocorticóides, tais como metilprednisolona, administrada até oito horas após o trauma (THURET et al., 2006; ABUL-KASIM et al., 2010). A metilprednisolona tem a capacidade de atenuar a resposta neuroinflamatória que se instala imediatamente após a lesão, reduzir a peroxidação lipídica e preservar a integridade das estruturas neuronais. Porém, alguns estudos clínicos questionam a eficácia do tratamento com o corticóide. Há, ainda, abordagens que buscam restituir ou substituir funções perdidas por meio de transplantes celulares variados (para revisão ver GISZTER, 2008).

Neste contexto, buscando identificar compostos com atividade sobre a excitotoxicidade glutamatérgica e produção de espécies reativas de oxigênio o presente estudo avaliou o efeito de subfrações ricas em proantocianidinas isolados da planta *Croton Celtidifolius* sobre estes parâmetros.

1.3. A planta *Croton celtidifolius*

A *Croton celtidifolius* é uma árvore nativa das regiões de Mata Atlântica, sendo frequentemente encontrada do estado do Rio de Janeiro, São Paulo e região Sul do Brasil. Ela recebe diversos nomes populares, dependendo da região em que é encontrada, como por exemplo, Pau-Sangue, Sangue de Dragão, Sangue de Adáve, entre outros (SMITH et al., 1988).

Os aspectos botânicos desta espécie foram estudados por Smith e cols (1988). Em resumo, é uma árvore de fácil reconhecimento no campo, comumente de 5 a 15 metros de altura e 10 a 25 cm de diâmetro; tronco quase

cilíndrico e reto, raízes subterrâneas, casca externa acinzentada; casca interna ocre-esverdeada, com exsudação abundante ao corte, vermelha lembrando a cor de sangue e copa transparente. Suas folhas têm de 10 a 18 cm de comprimento, palminervadas, miudamente serrilhadas, delgadas, a face superior verdes com pelos entrelados deprimidos mais ou menos dispersos, a face inferior coberta de indumento pálido (Figura 2).

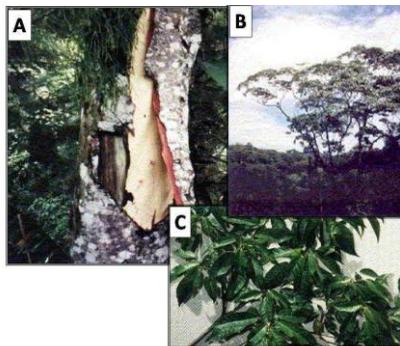


Figura 2. (A) Retirada da casca, matéria prima utilizada obtenção da FRP. (B) A *Croton celtidifolius* em seu habitat natural, visão panorâmica; (C) Folhas de 10 – 25 cm de comprimento.

A infusão da casca dessa planta é utilizada popularmente para o tratamento de úlcera, diabetes, reumatismo e outras doenças inflamatórias (SMITH et al., 1988). Dentre os diversos estudos biológicos realizados com espécies do gênero *Croton*, pode-se destacar as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, antitumoral, antimicrobiana, anti-diarreica, hipertensiva e vasorrelaxante, inibidora da produção de radicais livres e da proliferação celular (PERDUE et al., 1979; DE ALBUQUERQUE et al., 1974; CARVALHO et al., 1996; GURGEL et al., 2001; GUERRERO et al., 2001).

Estudos realizados pelo grupo demonstraram que frações e sub-frações isoladas da *Croton celtidifolius* possuem propriedades antiinflamatórias e antioxidantes, inibindo a peroxidação lipídica em um modelo de pleurisia induzido por carragenina em ratos (NARDI et al., 2003). Em outro estudo do grupo, Nardi e colaboradores (2007) sugerem que a propriedade antioxidante e anti-inflamatória das frações de *Croton celtidifolius*, principalmente da fração acetato de etila e 63SF parece decorrer de sua capacidade de (i) modular os parâmetros oxidativos, através da inibição da produção de ânion superóxido e

malondialdeído e do aumento da atividade da superóxido dismutase, (ii) inibir o extravasamento plasmático e migração celular, principalmente de leucócitos.

Ademais, a fração parece apresentar uma pronunciada ação antinociceptiva em modelos experimentais de dor induzida por estimulação química (formalina) e térmica, sendo que este efeito parece envolver a ativação direta de receptores dopaminérgicos D₂ e a participação de fibras C sensíveis a capsaicina (DALBÓ et al., 2005; 2006).

Em outro estudo, também realizado pelo grupo, os resultados demonstram que a administração sistêmica da fração rica em proantocianidinas induz um amplo espectro de alterações comportamentais em ratos, consistente com a existência de componentes hipnosedativos, anticonvulsivantes e ansiolíticos (MOREIRA et al., 2010).

Desta maneira, com base nas ações descritas acima para a fração rica em proantocianidinas obtida das cascas da *Croton celtidifolius*, o presente trabalho buscou avaliar, através de um estudo *in vitro* e *in vivo*, o efeito preventivo da fração rica em proantocianidinas isolada da *Croton celtidifolius* sobre a morte neuronal desencadeada em cultura de células do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos e sobre a neurotoxicidade decorrente da lesão medular traumática, respectivamente.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar as ações da fração rica em proantocianidinas (FRP), obtidas da casca da planta *Croton celtidifolius*, sobre a neurotoxicidade *in vitro* induzida por glutamato em cultura de células do gânglio da raiz dorsal e a neurotoxicidade *in vivo*, decorrente da lesão da medula espinhal de ratos.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo envolvem a:

- Padronização da cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal; indução de morte celular induzida por glutamato e avaliação da viabilidade celular através do método de redução do MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina;
- Análise do efeito da fração rica em proantocianidinas - FRP sobre a morte celular induzida por glutamato através do método de redução do MTT e da dosagem da enzima lactato-desidrogenase em células do gânglio da raiz dorsal;
- Avaliação do possível efeito anti-apoptótico da FRP através da técnica de Hoechst;
- Avaliação do efeito da FRP sobre alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio induzido por glutamato através da dosagem de DCF - 2'7'- diclorodihidrofluoresceína bem como sobre a indução de morte celular induzido por peróxido de hidrogênio;
- Determinação dos subtipos de receptores glutamatérgicos envolvidos na morte celular induzido por glutamato e a possível interação com a FRP;
- Estudo do tratamento sistêmico com FRP sobre a atividade locomotora e neuromuscular de animais submetidos à lesão da medula espinhal através da escala de atividade locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (Escala BBB) e do teste da força de preensão (*Grip Force*).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, de aproximadamente 10 semanas e peso entre 270-300g, criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Estes foram alojados em número de 5 por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em uma temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade entre 60-80% e ciclo claro-escuro de 12 horas, alimentados com água e ração *ad libitum*. Este estudo obedeceu às recomendações do Guia do Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos da America (Publication No. 85-23, revisado em 1996), e todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da UFSC (CEUA, processo nº 230080.030935/2010-53).

3.2. Caracterização da Fração Rica em Proantocianidinas - FRP

A FRP foi extraída das cascas da *Croton celtidifolius* Baill pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), utilizando a metodologia descrita abaixo.

Para a extração da FRP, as cascas da *Croton celtidifolius* foram secas sob ventilação, cortadas em pequenos pedaços e maceradas exaustivamente em etanol 80% a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado e o solvente evaporado sob vácuo formando um extrato bruto hidroalcoólico que foi solubilizado em acetona de maneira a obter uma solução saturada. Em seguida, foi adicionada uma grande quantidade de água que ocasionou a formação de um precipitado. Este precipitado foi removido por filtração e a solução transferida para um rota evaporador para eliminação da acetona. A solução aquosa resultante foi submetida a uma extração de acetato de etila e após a remoção do solvente orgânico, obteve-se a fração rica em proantocianidinas (DALBÓ et al., 2005; 2006).

3.3. Cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal

Os GRDs que inervam os segmentos torácicos e lombares de medula espinhal foram isolados de ratos Wistar machos pesando entre 280 e 300 g. Para tal, após indução de eutanásia dos animais em câmara de CO₂ e exposição da medula espinhal, 15 GRDs por animal foram removidos e submetidos à digestão enzimática com papaína 0,1% a 37°C por 20 minutos seguido de centrifugação (1 min, 200 x g). Ao precipitado foi adicionado colagenase do

tipo 1, mantido a 37°C por 20 minutos, seguido de uma nova centrifugação (1 min 200 x g). Após a digestão enzimática os gânglios foram lavados com solução rica em potássio - KRH e ressuspensos em 1,5 mL de DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), (Invitrogen Corporation, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativo por calor e 1% de penicilina e estreptomicina. Após uma nova centrifugação (1 min, 200 x g), o precipitado resultante foi novamente ressuspensionado em DMEM. A seguir os gânglios foram dissociados mecanicamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. As células foram então depositadas sobre uma placa de 96 poços, previamente tratada com poli-lisina e laminina (Sigma, Brasil) (ambas 20 µg/ml). Nesta etapa, as células neuronais foram incubadas na ausência ou na presença de NGF (10 µg/mL; Sigma, Brasil) e mantidas em cultura por um período de 12, 18, 24, 48 ou 96 horas, a 37°C, em atmosfera saturada de umidade com 5% de CO₂.

3.4. Avaliação imunocitoquímica da presença de neurônios em GRD

Para comprovar a presença de neurônios nas culturas de células do GRD de ratos, realizou-se uma caracterização imunocitoquímica. Para tal, as culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 1 hora, seguido de lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,6). As células, foram permeabilizadas, com solução de PBS-Triton X-100 0,25% por 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir a marcação de antígenos citoplasmáticos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de SFB em PBS durante 1 hora. As células foram então lavadas com PBS e incubadas, por 1 hora a 37°C, com os anticorpos primários específicos para neurônios, a anti β -tubulina III (1:500, Promega), o anti-neurofilamento 200 (1:150, Sigma) ou o Anti-Neu-N (1:50m Chemicon). As células foram então lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma) e subsequentemente incubadas, por 1 hora à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários, o Alexa flúor 488 (1:500, Invitrogen) e alexa flúor 594 (1:400, Invitrogen). As células foram novamente lavadas com PBS e então incubadas por 40 segundos com corante fluorescente nuclear 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloridrato (DAPI) (1 µg.mL⁻¹; Sigma) e observadas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX71).

3.5. Neurotoxicidade induzida por glutamato

Para avaliar a excitotoxicidade induzida por glutamato, células do GRD foram mantidas em cultura em meio DMEM suplementado com NGF (DMEM-NGF) por um período de 6, 12 ou 15 horas. Em seguida o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM-NGF contendo glutamato (0,001; 0,01; 0,1; 1 ou 10 mM) e um período adicional de 12, 6 ou 3 horas de cultivo, respectivamente, foi mantido, totalizando um tempo total de cultivo celular de 18 horas.

Em outro protocolo experimental, as células foram mantidas em meio de cultivo DMEM suplementado com NGF durante 6 horas, seguido da incubação das mesmas com MK-801 (antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA) ou M-CPG (antagonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos não-seletivo) durante 30 minutos. Após este período, adicionou-se glutamato ao meio de cultura e manutenção neste meio (antagonista + glutamato) por um período adicional de 12 horas, totalizando 18 horas de cultivo.

Ademais, também avaliou-se a viabilidade das células expostas a agonistas de receptores glutamatérgicos. Para tal, após um período de 6 horas de cultivo, as células foram tratadas com o agonista seletivo de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (500 μ M), o N-metil- D- aspartato (NMDA) ou do agonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, o Trans-ACPD (500 μ M) e mantidas na presença do agonista durante 12 horas. Finalizado o tempo de 18 horas de cultivo, as células foram submetidas ao método de redução do MTT.

3.6. Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizada a técnica de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) a qual permite quantificar a atividade mitocondrial através da formação de cristais de formazana, de coloração azul, produto formado pela redução dos sais tetrazólio MTT pela ação da enzima succinato desidrogenase (MOSMANN, 1983). Para tal, 10^3 células GRDs foram semeadas sobre placas de cultura contendo 100 μ l de meio de cultivo DMEM (Invitrogen Coporation, USA) suplementado com albumina bovina tipo IV (BSA) e fator de crescimento do nervo (Nerve Grow factor – NGF; 100 ng.mL⁻¹) seguido de incubação em atmosfera umidificada a 95% de O₂, 5% de CO₂, a 37°C. Após o tempo de cultivo de 12, 18, 24, 48, 72 ou 96 h, dependendo do protocolo experimental utilizado, foi avaliado a viabilidade celular através da remoção do meio de cultivo e adição de solução contendo tampão fosfato e MTT (5 mg.ml⁻¹ diluído em tampão PBS) por um período de 2 h. Na sequência, os cristais de formazana foram solubilizados

com uma solução de dodecilsulfato de sódio e ácido clorídrico 10 % por 18 h sem agitação ou com agitação em agitador orbital a 30°C e 2,5 Hz. Após esta etapa, 100 µl de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e foi realizada a leitura da absorbância em leitora de placas (ThermoPlate - Reader) com comprimento de onda de 570 nm. Juntamente com as amostras, foi realizado o branco que é composto de meio de cultura, MTT, SDS 10%-HCl nas mesmas proporções contidas nas amostras e incubado nas mesmas condições. A concentração dos cristais de formazana é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Os testes foram realizados em triplicata e a avaliação da viabilidade celular foi medida e um leitor de Elisa (570 nm).

3.7. Avaliação da liberação de LDH

A atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDH) foi medida através de um Kit (Análise Diagnóstica[®]). A LDH é uma enzima citosólica liberada no meio de cultura após a perda da integridade da membrana resultante de necrose ou apoptose, servindo como parâmetro para avaliar a citotoxicidade de compostos químicos. A LDH catalisa a oxidação do lactato, produzindo piruvato, NADH e H⁺. O NADH reduz o metassulfato de fenazina, que, em uma reação acoplada, reduz estequiometricamente o cloreto de iodofenilnitrofenil tetrazólio. A absorbância da formazana de cor vermelha formado, medida em 550 nm, é diretamente proporcional à atividade da LDH. A LDH total foi determinada pela adição de 10% de Triton X-100 e ruptura mecânica das fatias. Esta atividade foi considerada como 100% (WHITAKER, 1969). Para a realização deste experimento, foi retirado 50 µL de meio da cultura de células da placa e foi colocado 200 µL do mix de reação em cada poço. Para o mix de reação foi utilizado um tampão com bicarbonato de sódio, piruvato e NADH.

3.8. Avaliação do efeito anti-apoptótico da FRP

Para avaliar o efeito anti-apoptótico da FRP células do GRD, as mesmas foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com NGF durante 12 horas. Em seguida, as células foram expostas ao glutamato (1 mM) ou ao glutamato (1mM) + FRP (100 µg/ml) por um período adicional de 3 horas. Finalizado este período, foi realizada a técnica de Hoechst (WHITESIDE et al., 1998) onde adicionou-se 500 µL de solução Hoechst (1 µg/mL) em cada poço e as células foram mantidas em estufa por um período de 5 minutos. Em seguida, a solução Hoechst foi removida, os poços foram cuidadosamente

lavados com PBS seguido de avaliação microscópica em microscópio de fluorescência no aumento de 40 x.

3.9. Dosagem intracelular de espécies reativas de oxigênio - EROs

A geração intracelular de EROs foi medida utilizando o ensaio da DCF através da sonda 2',7'- diclorodihidrofluoresceína acetato (DCFH-DA). Quando aplicada em células intactas, a DCFH-DA atravessa a membrana celular e é hidrolisada enzimaticamente por esterases formando um produto não fluorescente DCFH. Na presença de EROs, a DCFH é oxidada gerando o composto altamente fluorescente DCF, cuja fluorescência pode ser quantificada por citometria de fluxo ou fluorimetricamente (WANG, 1999).

Para a realização deste experimento, as células de GRD foram plaqueadas em placas de 96 poços, sendo induzida a morte celular com glutamato na concentração de 1 mM nos tempos de incubação de 1, 3 e 6 horas e colocado em estufa incubadora (5% CO₂, 37°C). Imediatamente foi medida a fluorescência em um comprimento de onda de excitação 488 nm e emissão 520 nm.

A concentração de DCF é calculada baseada na curva de calibração construída usando a DCF padrão. A formação da DCF é calculada como a porcentagem de formação da DCF do grupo controle (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

3.10. Neurotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio

Para indução de morte celular com peróxido de hidrogênio, células do GRD cultivadas em meio DMEM-NGF foram expostas ao peróxido de hidrogênio (100, 200 ou 300 µM), isoladamente ou na presença simultânea de FRP (100 µg/ml) por 6 horas, sendo mantidas em cultivo por um período de 18 horas. Finalizado este período foi realizada a avaliação da viabilidade celular através do método de redução MTT.

3.11. Indução da Lesão Medular

Para a indução da lesão da medula espinhal utilizou-se o modelo descrito por Vanický e colaboradores (2001) com algumas modificações. Para tal, após completa anestesia dos animais com uma mistura 1:1 de quetamina e xilazina (70 e 10 mg/kg), respectivamente, (Bayer, São Paulo, SP, Brasil) por via intra peritoneal, cada animal recebeu uma administração de antibiótico de amplo espectro (cloridrato de oxitetraciclina, 300 mg/kg) por via intramuscular. Após, foi realizada a tricotomia e assepsia do dorso do animal,

seguido da administração subcutânea de anestésico local contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% e epinefrina 1:50000 – Xylestesin®) e incisão na área depilada no sentido rostro-caudal de aproximadamente 3 cm. Em seguida, foi removido o tecido gorduroso da região e o anestésico contendo vasoconstritor foi administrado novamente por via intramuscular, os músculos que se inserem nas vértebras torácicas 10 a 12 foram dissecados, seguido pela remoção dos processos espinhosos. Posteriormente, a coluna espinhal foi fixada através de um fórceps.

Para acessar o canal vertebral, foi realizado um pequeno orifício (1,5 mm de diâmetro) foi feito na vértebra torácica 11 com auxílio de microscópio e broca cirúrgicas. Esta abertura permitiu a inserção de um cateter de embolectomia Fogarty 2F (Lemaitre Catheters, Burlington, MA EUA), previamente calibrado e preenchido com salina, diretamente no espaço epidural, sem rompimento da dura mater, até a altura de T9. O cateter foi então inflado até atingir 3,0 mm de diâmetro, e mantido com este diâmetro por um período de um minuto, que é o tempo necessário para causar o desaparecimento dos reflexos espinhais. Finalizada esta etapa, o cateter foi desinflado e cuidadosamente removido e então realizada a sutura do músculo e da pele. Os animais falso-operados foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, porém o cateter não foi inserido no espaço epidural.

Finalizando o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em ambiente aquecido. Durante 15-20 dias após a cirurgia, as bexigas dos animais lesados foram esvaziadas manualmente, duas vezes ao dia, até o restabelecimento da micção espontânea. Este procedimento foi realizado aplicando-se pressão com os dedos sobre a região do abdômen acima da bexiga urinária do animal. Ainda como parte dos cuidados pós-operatórios, os animais foram mantidos em ambiente limpo e observados diariamente para evitar desconforto e infecção.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: não operados (sem nenhuma intervenção cirúrgica), falso-operados (intervenção cirúrgica, sem inserção do cateter), lesados tratados com veículo (intervenção cirúrgica, com inserção do cateter e administração de salina) e lesados tratados com FRP (intervenção cirúrgica, com inserção do cateter e administração de FRP). O tratamento dos animais com a FRP (10 mg/kg) foi realizado por via i.p., na primeira e sexta hora após a cirurgia e a cada 24 horas subsequentes durante 5 dias consecutivos. O mesmo protocolo de tratamento foi adotado para os animais que receberam salina.

3.12. Avaliação da atividade locomotora dos animais

A atividade locomotora de cada animal foi avaliada a cada dois dias, durante 28 dias consecutivos, por um período de 15 minutos a cada vez, até o momento do sacrifício, utilizando para tal, a escala de atividade locomotora BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) (BASSO et al., 1996). Esta escala varia de 0 a 21 e os principais escores são: 0 - nenhum movimento dos membros traseiros; 1 - movimentos leves de uma ou duas articulações; 4 - movimentos leves de todas as três articulações; 7 - movimento de extensão de todas as três articulações; 10 - suporta ocasionalmente o peso sobre as patas traseiras; 21 - atividade locomotora normal.

3.13. Avaliação da força de preensão – *Grip Force*

Para avaliação da força de preensão, os animais foram, cuidadosamente, acomodados sobre as redes de malhas de arame, sendo que eles seguravam estas redes por determinado período de tempo, nas quais continham medidores de preensão que convertiam a força de preensão (g) das patas dianteiras em um sinal digital.

3.14. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média. Para análise estatística de resultados paramétricos, foi utilizada análise de variância de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls, ou Dunnet quando pertinente. Na comparação dos dados não paramétricos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney, conforme as características de cada situação. Em todas as análises estatísticas utilizadas as diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3.15. Drogas e reagentes

As seguintes drogas foram utilizadas: Glutamato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), MK- 801 (Sigma), M-CPG (Sigma), Trans-ACPD (Sigma), NMDA (Sigma), Cloridrato de Oxitetraciclina (Terramicina[®] Pfizer, São Paulo, SP, Brasil), Quetamina (Bayer, São Paulo, SP, Brasil), Xilazina (Bayer, São Paulo, SP, Brasil), Xylestesin[®] (Cristália, Itapira, São Paulo, SP, Brasil), Papaína (Sigma, Brasil), Colagenase tipo 1A (Sigma, Brasil), Fator de Crescimento do Nervo - NGF (Sigma, Brasil). As soluções de estoque das drogas foram DMEM (Invitrogen Corporation) exceto no caso da FRP que foi diluída em NaCl 0,9%.

RESULTADOS

4.1. Experimentos *in vitro*

4.1.1. Padronização da cultura de neurônios do GRD de ratos adultos

Primeiramente, determinou-se o número ideal de GRD de ratos adultos a serem removidos para fornecer uma densidade celular adequada e adesão consistente nas condições da cultura. Assim, a remoção, digestão e preparação de 14 GRDs proveniente da região toracolombar de um animal forneceu material suficiente para cobrir 24 poços de cultura de 6 mm (Placa de 96 poços) contendo 10^3 células por poço. A partir de então, avaliou-se o tempo de sobrevivência das células do GRD de ratos adultos cultivadas em meio DMEM suplementado ou não com fator de crescimento do nervo (NGF 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O parâmetro utilizado no estudo foi a análise da viabilidade celular através da redução do MTT e a avaliação microscópica das células em cultura.

Na Figura 3, a qual mostra a viabilidade celular das células mantidas em cultura por um período de até 96 horas na presença ou ausência de NGF, pode-se observar adesão celular e sobrevivência máximas no tempo de 18 horas de cultivo. A partir deste período ocorreu uma diminuição gradativa da viabilidade celular, sendo que a suplementação do meio de cultivo com o NGF prolongou de forma significativa o tempo de sobrevivência destas células e o número de células viáveis. Quando comparado ao meio de cultivo sem NGF, a suplementação do meio de cultivo com NGF foi capaz de aumentar em 11% o número de células viáveis ao final de 4 dias de cultivo.

Como ilustra a Figura 4, a avaliação microscópica das culturas primárias de GRD apresentada na Figura 4 permitiu identificar células com formato arredondado e um diâmetro aproximado de 10 μm (setas vermelhas) no período de 24 horas (painel A), bem como a formação de prolongamentos no tempo de 96 horas de cultivo (painel B), sinal indicativo da presença de células neuronais. Ademais, como neste estudo não foi utilizado inibidores de crescimento de células gliais ou de células não neuronais, foi possível observar diversas células (setas pretas) nas adjacências desses possíveis corpos neuronais, indicativo de células gliais.

A exposição destas células à reação de redução do MTT resultou na formação dos cristais de formazana no interior das mesmas, fornecendo uma coloração mais escura a célula (painéis C e D). Sendo assim, padronizou-se o

período de 18 horas de incubação em meio de cultivo suplementado com o fator de crescimento do nervo (NGF 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como o que apresentou as melhores condições para cultivo e sem alteração na viabilidade celular das culturas primárias de células do GRD de ratos adultos. Este período foi utilizado nos protocolos experimentais subsequentes.

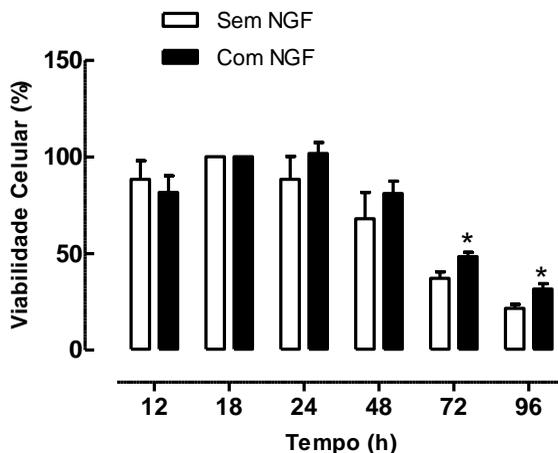


Figura 3. Avaliação da viabilidade celular de células do gânglio da raiz dorsal de ratos na presença (barras escuras) ou ausência (barras brancas) do fator de crescimento do nervo (NGF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) através do método de redução do MTT. Os valores representam a média \pm o E.P.M. de 4 experimentos, realizados em triplicata. Asteriscos denotam significância estatística em relação ao grupo NGF. $P \leq 0,05$, ANOVA de uma via seguido de teste *t* de Student.

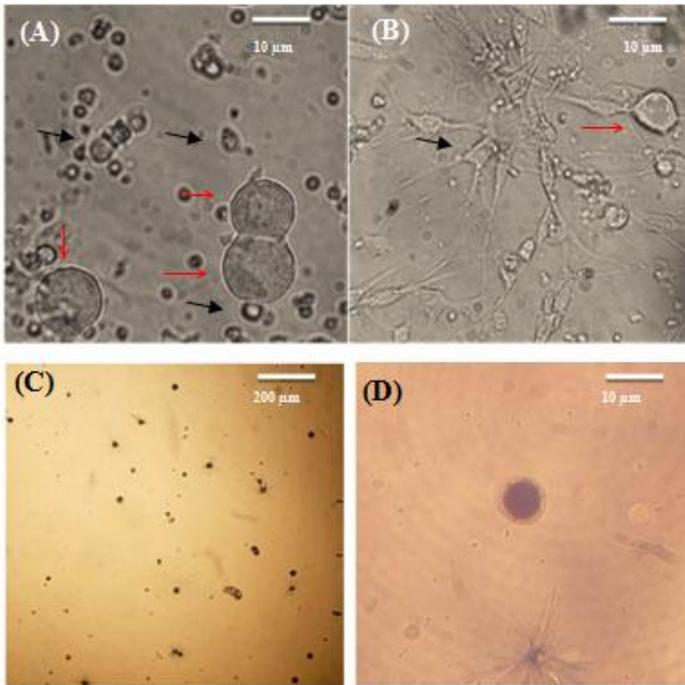


Figura 4. Fotografias de células do gânglio da raiz dorsal mantidos em cultura suplementado com fator de crescimento do nervo durante 24 (A) ou 96 (B) horas. As setas vermelhas indicam possíveis células neuronais enquanto que as setas pretas são indicativas de células gliais. As células em C e D foram mantidas durante 24 horas em cultivo e submetidas ao método de redução do MTT.

Em seguida, com o intuito de confirmar a presença de neurônios nas culturas de GRD, células mantidas durante 18 horas em cultura foram submetidas a análise imunocitoquímica através da imunomarcação com anticorpos específicos para neurônios adultos, o antineurofilamento N (Anti Neu-N); para células progenitoras neurais, a Anti β -tubulina III ou para proteínas do citoesqueleto, o neurofilamento 150 e posterior co-localização através do uso do corante fluorescente nuclear 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Dezoito horas após o cultivo, muitas das células cujos núcleos apresentaram coloração positiva para DAPI também apresentaram marcação positiva para β -Tubulina III (Figura 5C), NEU-N (Figura 5F) e para a proteína NF-150 (Figura 5I) indicando a presença de células neuronais viáveis em

culturas primárias do GRD de ratos adultos. No entanto, estes resultados não permitem distinguir os tipos de neurônios presentes na cultura ou ainda à população de células gliais.

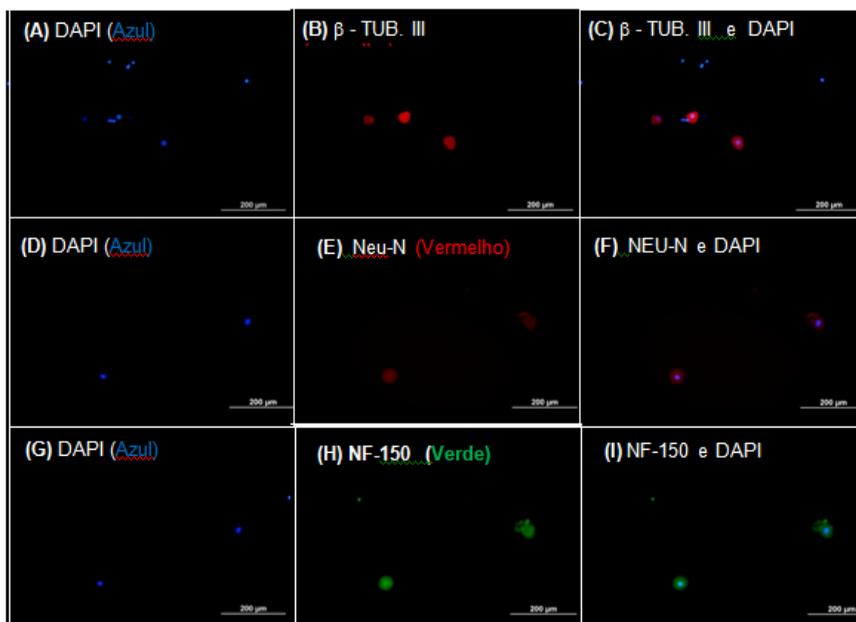


Figura 5. Evidência imunocitoquímica da presença de células neuronais em cultura do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos. Os painéis A, D e G representam micrografias mostrando a marcação dos núcleos celulares com o corante fluorescente nuclear 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI, 1 µg.mL⁻¹). Painéis B, E e F mostram as marcações fluorescentes de células positivas para B Tubulina II, NEU-N e NF -150, respectivamente. Já os painéis C, F e I representam a co-localização de neurônios marcados com β Tubulina II, NEU-N ou NF -150, respectivamente e DAPI.

4.1.2. Padronização do modelo de neurotoxicidade induzida por glutamato em cultura de GRD de ratos adultos

Uma vez padronizada a cultura de neurônios do GRD estudou-se a morte celular induzida por glutamato. Para tal, após um tempo de cultivo

celular de 6, 12 ou 15 horas, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM contendo glutamato (0,001, 0,01, 0,1, 1 ou 10 mM) seguido de um período adicional de cultivo de 12, 6 ou 3 horas, respectivamente, totalizando um tempo de cultivo de 18 horas. Finalizado este período, avaliou-se a viabilidade celular através do método de redução de MTT. Na Figura 6, pode-se verificar que o glutamato foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular de maneira dependente da concentração e do tempo de exposição das células ao agente. Células mantidas durante 12 horas de cultivo em meio contendo 1 mM de glutamato apresentaram 50% de redução da viabilidade celular, sendo este o protocolo experimental adotado nos experimentos subsequentes.

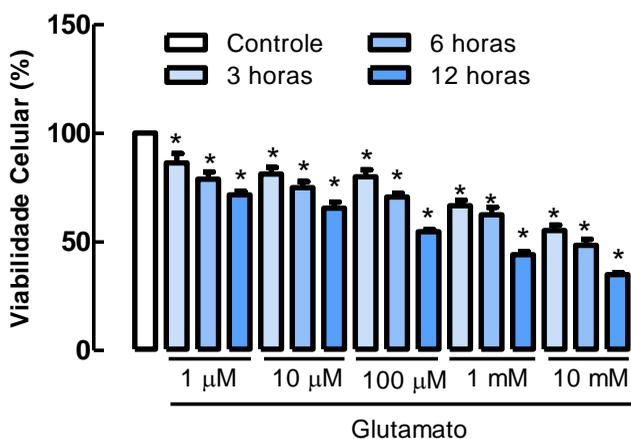


Figura 6. Neurotoxicidade de neurônios do GRD de ratos adultos induzido por incubação de diferentes concentrações de glutamato (Glu 0,001, 0,01, 0,1, 1 ou 10 mM) nos tempos de 3, 6 e 12 h. A incubação das células com glutamato induziu morte celular dependente da concentração e do tempo. Cada barra representa a média \pm E.P.M de 3 experimentos realizados em triplicata. Asteriscos denotam diferenças estatísticas em relação ao controle. $P \leq 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnet).

4.1.3. Efeito da FRP sobre a morte celular induzida por glutamato.

Em seguida, avaliou-se o efeito da fração rica em Proantocianidinas - FRP sobre a morte de células de GRD induzida pela exposição ao glutamato 1mM durante 12 horas. Assim, após 6 horas de cultivo as células foram co-tratadas com glutamato (1 mM) mais FRP (1, 3, 30, 10, 30 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e mantidas em cultura até completar 18 horas. Finalizado o tempo total de

cultivo de 18 horas, foi avaliada a viabilidade celular através do método de redução do MTT. Em outro protocolo experimental, foi avaliado o efeito do pós-tratamento das células do GRD com a FRP. Para tal na sexta hora de cultivo as células foram expostas ao glutamato (1 mM) e mantidas na presença do mesmo por 6 horas adicionais. Completado 12 horas de cultivo, ao meio contendo glutamato (1mM) foi adicionado FRP (1, 3, 30, 10, 30 ou 100 µg/mL) e as células foram mantidas na presença combinada com glutamato e FRP por um período adicional de 6 horas, totalizando 18 horas de cultivo.

A Figura 7 demonstra um importante efeito neuroprotetor da FRP sobre a morte celular induzida por glutamato. O pós-tratamento com a FRP nas concentrações de 10, 30 ou 100 µg/ml inibiu significativamente a morte celular induzida por glutamato (1 mM), sendo que na maior concentração utilizada observou-se um efeito neuroprotetor de 37% sobre a morte induzido pelo glutamato (Figura 7B). Já o co-tratamento (Figura 7A) foi capaz de diminuir a morte celular em 27%. Em adição, quando as células foram expostas somente a FRP na concentração de 1, 3, 30, 10, 30 ou 100 µg/ml por um período de 12 horas não houve qualquer alteração significativa na viabilidade celular das mesmas (Figura 8).

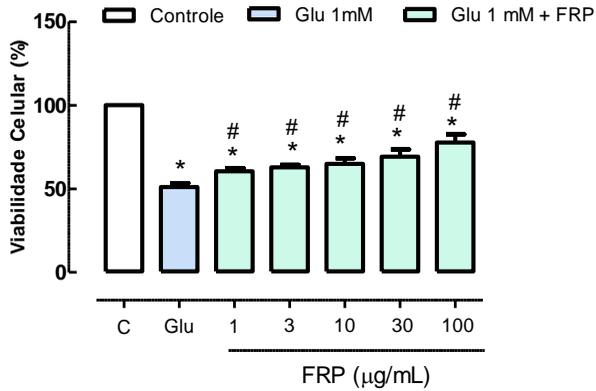
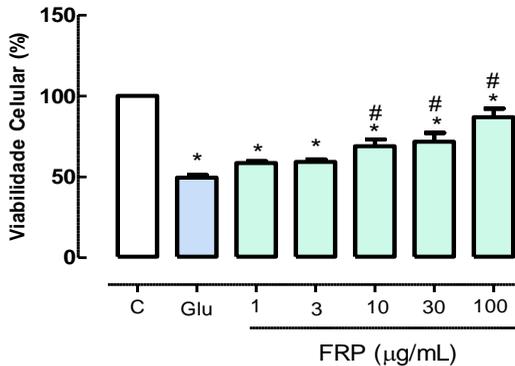
(A) Co-tratamento**(B) Pós-tratamento**

Figura 7. Efeito da fração rica em proantocianidinas (FRP) sobre a morte celular induzida por glutamato. Após 6 horas de cultura em meio DMEM as células foram expostas ao Glu (1 mM) e a FRP (1, 3, 10, 30 ou 100 µg/mL) por 12 horas (co-tratamento) ou pós-tratadas com FRP (1, 3, 10, 30 ou 100 µg/mL) durante 6 horas (B). Cada barra representa a média ± E.P.M de 3 experimentos realizados em triplicata. Asteriscos (*) denotam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle enquanto cerquilhas (#) representam diferenças estatísticas em relação ao grupo glutamato (Glu). $P < 0.05$ (ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls).

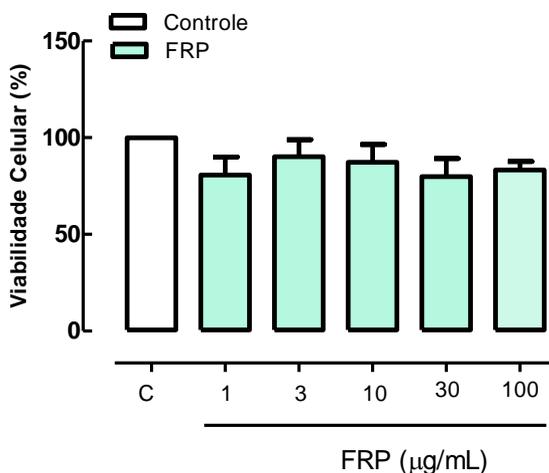


Figura 8. Efeito *per se* da fração rica em proantocianidinas (FRP; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) sobre a viabilidade das células do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos avaliado através do método de redução MTT. Cada barra representa a média \pm E.P.M de 3 experimentos. Não foram encontradas diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. $P \leq 0,05$; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnet).

4.1.4. Avaliação do perfil de liberação da enzima LDH induzido por glutamato.

Com objetivo de investigar o mecanismo da ação neuroprotetora da FRP, investigamos primeiramente o tipo de morte celular induzido pelo glutamato nas culturas de GRD e o efeito da fração sobre este aspecto. Para tal, avaliou-se a possível alteração na permeabilidade da membrana celular induzida por glutamato através da dosagem da enzima LDH, uma enzima citosólica liberada após o rompimento da membrana celular, e que é considerada como um marcador de morte celular por necrose (NORABERG, et al., 1999). A indução da liberação de LDH nas células do GRD se deu através do uso de concentrações crescentes de Triton X, um agente utilizado para romper a membrana da célula e liberar a LDH (WHITAKER, 1969). Na Figura 9, pode-se observar um aumento na liberação de LDH dependente da concentração de Triton X, sendo que na concentração de 30% a liberação de LDH nas culturas de GRD atinge sua liberação máxima. Desta forma utilizou-se Triton-X 10% como controle positivo.

Quando comparado ao controle positivo Triton X 10%, pode-se observar que a exposição das células ao glutamato 0,001, 0,1 e 1 mM foi capaz de aumentar os níveis de LDH de 6,5 % (células controle) para 37, 49 e 63 % respectivamente, indicando uma alteração na permeabilidade da membrana celular induzida por glutamato. Em contraste, o tratamento das células com FRP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ atenuou de forma significativa o aumento da liberação de LDH induzida por 0,1 e 1mM de glutamato. Já quando as células foram co-tratadas com 0,001 mM de glutamato e FRP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a FRP parece ter favorecido o aumento da permeabilidade da membrana e consequente liberação de LDH (Figura 10).

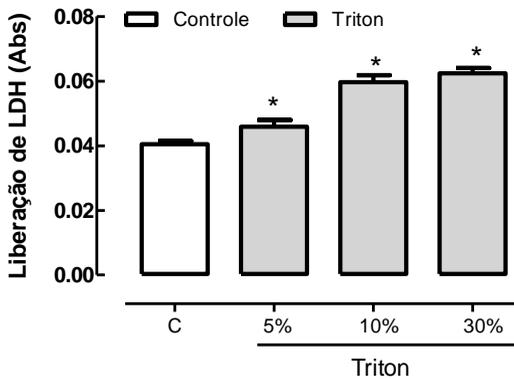


Figura 9. Perfil de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos induzida por triton-X. As células foram incubadas por 12 horas e foi quantificada a liberação de LDH em diferentes concentrações de Triton-X, com objetivo de verificar a concentração ideal que o mesmo leva para romper a membrana e liberar a LDH. Cada barra representa a média \pm E.P.M de 3 experimentos realizados em triplicata. Asteriscos denotam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. $P \leq 0,05$ (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

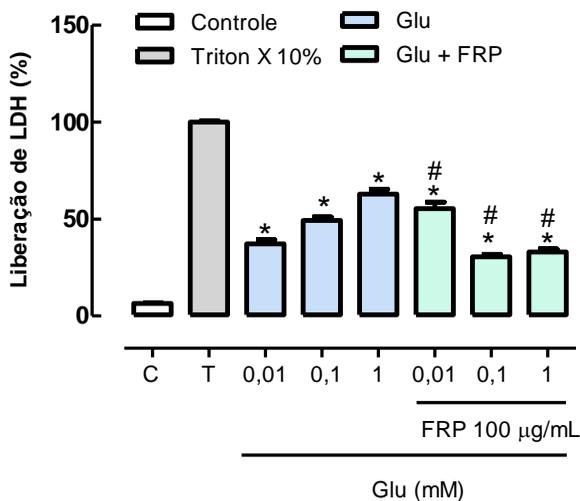


Figura 10. Efeito da fração rica em proantocianidinas (FRP) sobre a liberação de LDH induzida por glutamato em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos. As células foram pré-tratadas com FRP (100 µg/mL) e incubadas com glutamato por 12 h e foi quantificada a liberação da enzima Lactato Desidrogenase - LDH após o período de 18 horas. Cada barra representa a média ± E.P.M de 3 experimentos realizados em triplicata. Asteriscos denotam diferenças estatísticas em relação ao grupo Triton X 10% enquanto cerquilhas (#) representam diferenças estatísticas em relação ao grupo glutamato. $P \leq 0,05$ (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

Nas imagens obtidas de células do GRD mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com NGF durante 12 horas e seguido de exposição ao glutamato (Glu 1 mM), por um período de 3 horas, parece ocorrer aglomerados nucleares e formação de vesículas características de apoptose (Figura 11 B), enquanto que nas células controle (11 A) ou aquelas co-tratadas com glutamato 1 mM e FRP (100 µg/ml; 11 C) estas alterações morfológicas não estiveram presentes.

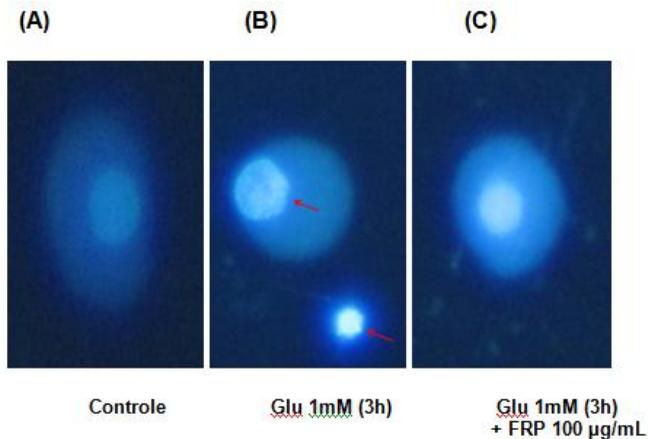


Figura 11. Avaliação da fragmentação de material nuclear induzido pela exposição das células do GRD de ratos adultos ao glutamato. As células foram mantidas em cultura em meio DMEM durante 12 horas e em seguida tratadas com glutamato (1 mM) ou glutamato e FRP (100 µg/mL) durante 3 horas para posterior realização da técnica de coloração de Hoechst. A seta vermelha indica possível fragmentação do núcleo decorrente de apoptose. Aumento de 40 x.

4.1.5. Quantificação da liberação de espécies reativas de oxigênio induzida por glutamato e o possível efeito antioxidante da FRP

A injúria causada por danos excitotóxicos agudos induz uma liberação massiva de glutamato induzindo a ativação de seus receptores com conseqüente produção de radicais livres e dano oxidativo (OBRENOVITCH e URENJAK, 1997). Neste contexto, visando reproduzir mais efetivamente este fenômeno foram avaliados, através do ensaio da DCF (2,7 – diclorofluoresceína), os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) em culturas de células do GRD submetidas ao insulto glutamatérgico. O ensaio da DCF consiste na conversão celular da DCFDA para DCF mediada por EROS e é utilizada como um índice geral de estresse oxidativo (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). A formação de DCF como conseqüência das EROS produzidas, foram monitoradas por espectrofluorímetro. Como pode ser observado na Figura 12, quando comparado às células controle, células expostas ao glutamato (1 mM) durante 1, 3 ou 6 horas apresentaram um aumento significativo nos níveis de EROS nos tempos de 1 e 3 horas. Já no tempo de 6 horas, não foi possível detectar diferenças significativas na

produção de EROS. Em adição, nas células expostas concomitantemente ao glutamato (1mM) e a FRP (100 µg/mL) houve um bloqueio completo da formação de EROS em resposta ao glutamato no tempo de 1 hora de cultivo, bem como uma atenuação parcial nos tempos de 3 e 6 horas, sugerindo que o efeito neuroprotetor observado nas células do GRD tratadas com FRP parece estar relacionado a uma ação antioxidante deste composto.

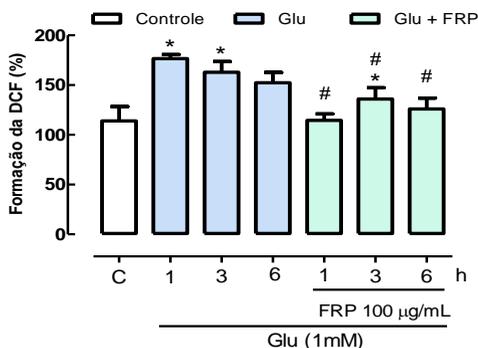


Figura 12. Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células do gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos adultos expostas ao glutamato e o efeito da FRP. As células foram pré-tratadas com FRP (100 µg/mL) por 12 horas e foi quantificada a liberação dos níveis das espécies reativa de oxigênio. Cada barra representa a média ± E.P.M de 3 experimentos realizados em triplicata. Asteriscos (*) representam diferenças estatísticas relativas ao grupo controle e serquilhas (#) em relação ao glutamato (Glu). $P \leq 0.05$ (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

Visando confirmar esta hipótese, foi induzida neurotoxicidade através da exposição das células do GRD ao peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio causa uma diminuição do teor de ATP e leva à formação de radicais hidroxilas. Além disso, induz apoptose via estresse oxidativo (MAILLY et al., 1999). Conforme mostra a Figura 13, pode-se observar que a morte celular induzida pela exposição das células ao peróxido de hidrogênio durante 6 horas foi dependente da concentração deste agente, sendo que na concentração de 100, 200 ou 300 µM ocorreu uma perda de 19, 26 ou 40% na viabilidade celular, respectivamente. O tempo de exposição das células ao peróxido de hidrogênio utilizado neste estudo foi baseado na literatura (MOLZ et al., 2009) e em estudos prévios (resultados não demonstrados). Os resultados

demonstram ainda que o co-tratamento das células com peróxido de hidrogênio e FRP 100 µg/mL durante 6 horas foi capaz de atenuar a morte induzida por peróxido de hidrogênio 100, 200 ou 300 µM em 11, 12 ou 27%, respectivamente.

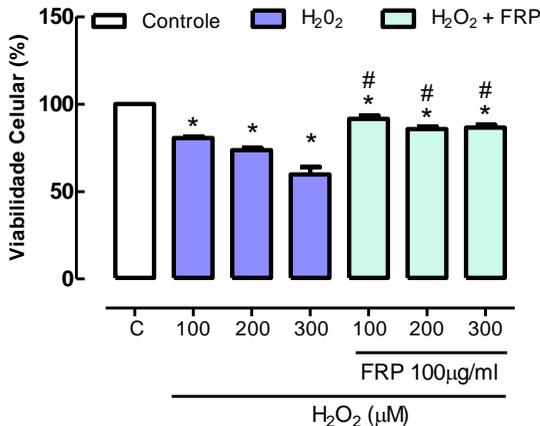


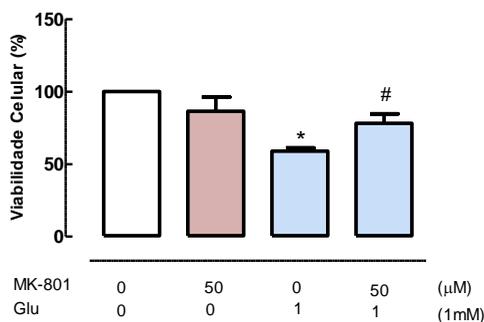
Figura 13. Efeito da fração FRP sobre a morte celular induzida por diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. As células foram co-tratadas com FRP (100 µg/mL) e peróxido de hidrogênio (100, 200, ou 300 µM) durante 6 horas. Cada barra representa a média ± E.P.M de 3 experimentos realizados em triplicata. Asteriscos (*) representam diferenças estatísticas quando comparadas ao grupo controle (C) e cerquilhas (#) quando comparado ao grupo tratado com peróxido de hidrogênio. P<0.05, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls.

4.1.6. Envolvimento de receptores glutamatérgicos no efeito neuroprotetor desencadeado pela FRP.

Por fim, no que se refere aos experimentos realizados *in vitro*, verificou-se a participação de receptores glutamatérgicos na morte celular induzida por glutamato em células do GRD de ratos adultos e o possível efeito da FRP sobre estes receptores. As células foram mantidas em meio de cultivo DMEM suplementado com NGF durante 6 horas seguido da pré-incubação das mesmas com MK-801 (antagonista de receptores NMDA) ou M-CPG (antagonista de receptores glutamatérgicos não-seletivo) durante 30 minutos e posterior adição de glutamato e manutenção neste meio (antagonista + glutamato) por um período adicional de 12 horas, totalizando 18 horas de cultivo. Como pode ser

observado na Figura 14, a exposição das células somente aos antagonistas MK-801 ou M-CPG não alterou a viabilidade celular quando comparado ao grupo controle. Contudo, a incubação das células tanto com MK-801 ou M-CPG foi capaz de recuperar a perda da viabilidade celular induzida pelo insulto glutamatérgico, sugerindo que a morte celular induzida por glutamato em células do GRD envolve a ativação tanto de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA quanto receptores metabotrópicos.

(A)



(B)

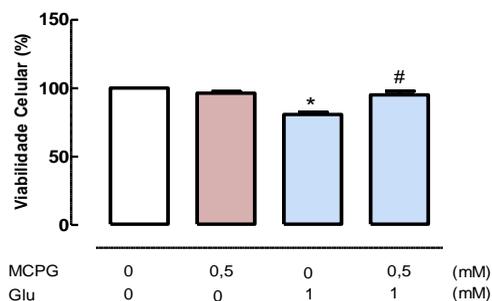


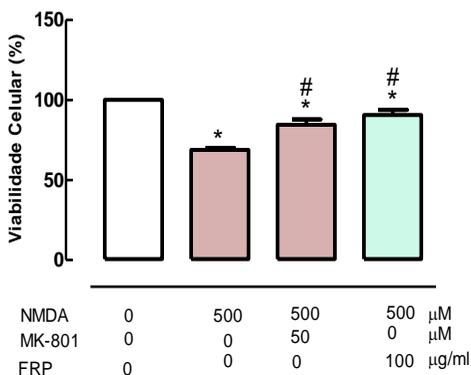
Figura 14. Efeito de antagonistas glutamatérgicos sobre a morte celular induzida por glutamato em cultura do gânglio da raiz dorsal de ratos (GRD) de ratos adultos. As células foram mantidas durante 6 horas em cultura, em seguida incubadas por 30 minutos com MK 801 (50 μM , painel A) ou MCPG (0,5 mM; Painel B) e posteriormente expostas ao glutamato por 12 horas. A avaliação da viabilidade celular

foi realizada pelo método de redução do MTT. Cada barra representa a média \pm e o E.P.M de 3 experimentos realizados em triplicata. Asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas em relação ao controle. Cerquilhas (#) indicam diferenças estatísticas em relação aos grupos tratados com antagonistas. $P \leq 0.05$, ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls).

Visando investigar a relação entre a FRP e os receptores glutamatérgicos, utilizou-se o agonista seletivo de receptores do tipo NMDA, o N-metil- D- aspartato (NMDA), e o agonista não-seletivo de receptores metabotrópicos, o Trans-ACPD. Primeiramente, foi realizada uma curva concentração resposta ao agonista NMDA cuja exposição das células à 100 e 500 μM de NMDA resultou em 10,0 e 50,0% de perda da viabilidade celular, respectivamente (resultados não apresentados). Utilizou-se então a concentração de 500 μM de NMDA nos experimentos subseqüentes. A concentração utilizada para o agonista Trans-ACPD foi determinada através dos dados da literatura (MOLZ et al., 2009).

Células expostas ao agonista glutamatérgico NMDA (500 μM) apresentaram uma diminuição significativa na viabilidade celular a qual foi antagonizada pelo antagonista seletivo de receptores NMDA, o MK 801 e pelo tratamento com a FRP (co-tratamento Glutamato + Fração durante 12 horas) (100 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 15A). A exposição das células do GRD ao agonista metabotrópico Trans-ACPD (100 μM) também induziu perda da viabilidade celular a qual foi recuperada pela pré-incubação das células com M-CPG (0,5 mM, 30 minutos), um antagonista metabotrópico não-seletivo, mas não pelo co-tratamento das células com a FRP (100 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 15B), sugerindo que o efeito neuroprotetor desencadeado pela FRP parece ser mediado em parte pela inibição de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

(A)



(B)

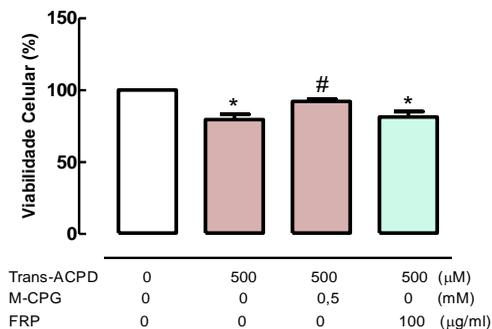


Figura 15. Avaliação da viabilidade de células do GRD de ratos tratadas com agonistas e antagonistas glutamatérgicos e FRP. Em A, as células foram incubadas por 30 minutos com MK 801 e posteriormente expostas ao NMDA ou NMDA e FRP (100 μg/mL) por 12 horas. Em B, as células foram incubadas por 30 minutos com M-CPG e posteriormente expostas ao Trans-ACPD ou Trans-ACPD e FRP (100 μg/mL) por 12 horas. Cada barra representa a média ± e o E.P.M de 3 experimentos realizados em triplicata. Asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas em relação ao controle, enquanto cerquilhas (#) em relação aos grupos NMDA ou Trans-ACPD. $P \leq 0.05$ (ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls).

4.2. Experimentos *in vivo*

4.2.1. Análise da atividade locomotora dos animais submetidos à lesão medular por compressão e o efeito do tratamento sistêmico com a FRP.

Para verificar a reprodutibilidade dos experimentos *in vitro* em um modelo experimental de dano neuronal, utilizou-se o modelo de lesão medular traumática por compressão da medula espinhal de ratos adultos. O modelo consiste na inserção de um cateter do tipo fogarty diretamente no espaço epidural da medula espinhal no nível da oitava vértebra torácica. Este modelo, padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (MARTINI et al., 2011) induz uma paraplegia moderada cuja atividade locomotora dos animais avaliada através da escala de atividade locomotora desenvolvida por Basso e colaboradores (1995), denominada escala BBB, não ultrapassou 8 pontos de um escore máximo de 21 ao final de um período de observação de 28 dias.

Conforme mostra a Figura 16, os animais falso-operados apresentaram atividade locomotora normal (escore 21) durante todo o período de avaliação (28 dias). Por outro lado, os animais submetidos à lesão da medula espinhal apresentaram déficit locomotor completo do trem posterior no segundo dia após o procedimento cirúrgico (escore de 0 pontos), sendo que ao longo das quatro semanas de avaliação, foi observada uma recuperação funcional gradual e parcial, atingindo escore médio de aproximadamente $8,0 \pm 0,6$ no 28º dia característico de paraplegia moderada.

De forma interessante, o tratamento dos animais com a FRP na dose de 10 mg/kg por via i.p., na primeira e sexta horas após a cirurgia e a cada 24 horas subsequentes, uma vez ao dia, durante 5 dias consecutivos aumentou significativamente o escore obtido a partir do sexto dia após a indução da paraplegia. No 28º dia, o tratamento acarretou em escore de $12,0 \pm 0,5$ enquanto que os animais tratados com veículo permaneceram com um escore médio de $8,5 \pm 0,7$, atingindo uma melhora de 41,1% na performance locomotora (Figura 17).

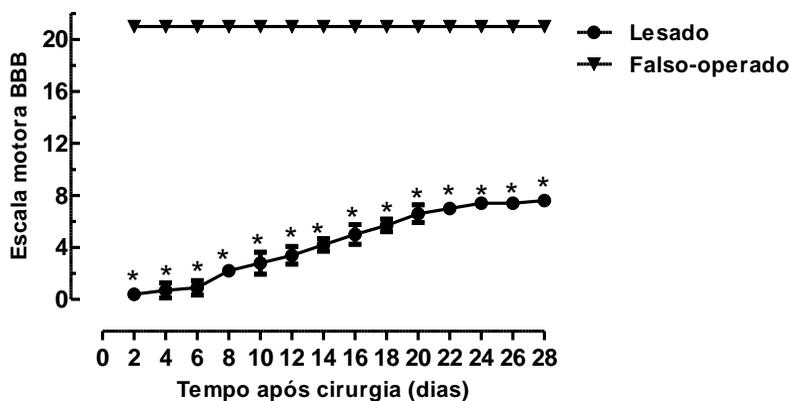


Figura 16. Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos à lesão da medula espinal por compressão através da escala BBB. Cada grupo representa a média \pm E.P.M de 6 (seis) animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação aos animais falso-operados. $P < 0,05$ (Mann-Whitney U test).

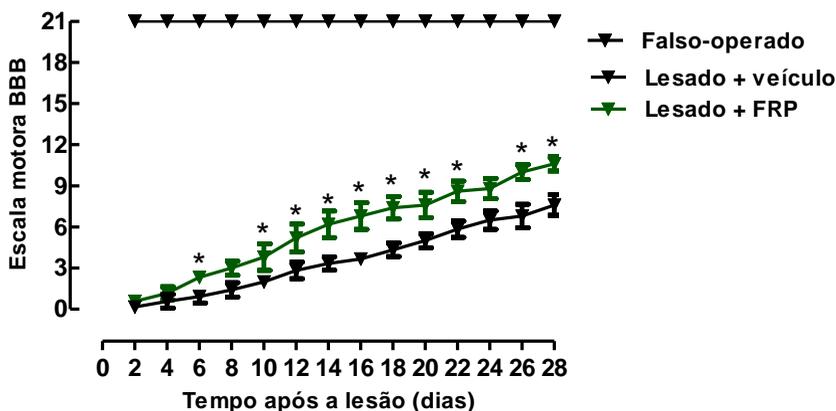


Figura 17. Efeito da FRP sobre o déficit locomotor de ratos submetidos à lesão da medula espinal. O grau de alteração locomotora foi avaliado a cada 2 dias durante 28 dias consecutivos através da escala BBB. Cada grupo representa a média \pm E.P.M de 6 animais. Asteriscos indicam diferenças estatísticas em relação ao grupo tratado com veículo. $P < 0,05$ (Mann-Whitney U test).

4.2.2. Análise da força de preensão dos animais submetidos ao trauma da medula espinal e o efeito da FRP.

Visando investigar o desempenho neuromuscular, os mesmos grupos experimentais submetidos à análise da atividade locomotora (escala BBB) foram avaliados, ao final do vigésimo oitavo dia, no teste da força de preensão (*Grip Force*). Durante o teste, os animais foram cuidadosamente acomodados sobre as redes de malhas de arame as quais continham medidores de preensão que convertiam a força de preensão (g) das patas dianteiras em um sinal digital.

Conforme demonstra a Figura 20, os animais falso-operados atingiram uma força de preensão média de 221 ± 9.7 na pata direita e na pata esquerda foi de 217 ± 8.0 em ambas as patas dianteiras, enquanto que os animais submetidos a lesão da medula espinal e tratados com veículo obtiveram uma força de preensão média de $80 \pm 16,3$ g, ou seja, a lesão da medula espinal induziu uma perda da força de preensão das patas dianteiras direita e esquerda de aproximadamente 63,8 %. Em contraste, quando comparado aos animais falso-operados, o tratamento sistêmico dos animais lesados com a FRP induziu uma perda de força de preensão de somente 32,13%, ou seja, de 221 ± 9 para 150 ± 22 g, respectivamente, sugerindo que a FRP parece auxiliar na recuperação do desempenho neuromuscular (Figura 18).

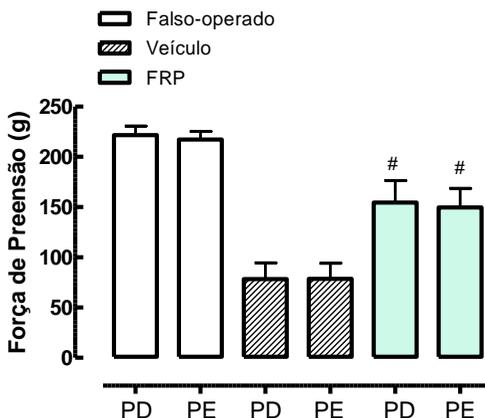


Figura 18. Avaliação da força de preensão 28 dias após a lesão da medula espinal de ratos. Barras brancas representam a força de preensão da pata direita (PD) e da pata esquerda (PE) de animais falso-operados. Barras achuradas representam a força de preensão da pata direita (PD) e da pata esquerda (PE) de animais lesados tratados com veículo. Barras verdes representam a força de preensão da pata direita (PD) e da pata

esquerda (PE) de animais lesados tratados com FRP. Cada valor representa a média \pm E.P.M de 6 animais. Asteriscos (*) indicam o nível de significância em comparação ao veículo, cerquilhas (#) denotam diferenças estatísticas em relação ao grupo veículo. $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls).

O glutamato leva ao dano celular aonde é importante considerar o tempo de exposição ao mesmo. A ativação de receptores para glutamato tem sido demonstrada em inúmeros processos fisiológicos no SNC e periférico. Por outro lado, também foi demonstrado que glutamato pode induzir excitotoxicidade em células neuronais e gliais (CHEN et al., 2000; MATUTE et al., 2002). Dependendo do tipo de célula e da concentração de glutamato utilizada, foi demonstrado que este aminoácido excitatório pode induzir morte celular com características de necrose e/ou apoptose (CHOI, 1987; ANKARCRONA et al., 1998). No entanto, tão importante quanto o estudo do mecanismo envolvido na toxicidade glutamatérgica, é o estudo de compostos que possam interagir com este sistema e dessa forma prevenir ou limitar os efeitos tóxicos deste aminoácido excitatório.

Neste estudo demonstrou-se que o glutamato promove morte celular em cultura de células de GRD com características de necrose e apoptose e de forma dependente da concentração e do tempo de exposição. Na concentração de 1 mM, o glutamato induziu a redução da viabilidade celular com presença de permeabilização da membrana e fragmentação de material nuclear.

O mecanismo primário de morte celular induzida por glutamato envolve o desequilíbrio iônico promovido pela entrada excessiva de cálcio, inicialmente por ativação de seus receptores ionotrópicos e posteriormente atuando também via seus receptores metabotrópicos (MICHAELIS, 1998). O aumento na concentração de glutamato disponibiliza um maior número de moléculas para interagir em seus receptores. Isto poderia explicar o efeito excitotóxico do glutamato dependente da concentração sobre a viabilidade celular.

Além da necrose, a morte celular induzida por glutamato pode se dar de forma programada, sem levar a rompimento da membrana celular, morte esta denominada de apoptose. A morte celular por apoptose descreve um processo ativo de colapso celular que difere morfológicamente da morte por necrose. O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e certos processos patológicos *in vivo* inclui condensação cromatínica, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (ANAZETTI e MELO, 2007). Com relação à morte por apoptose sugerida em nosso estudo, sabe-se que a apoptose de neurônios do GRD induzida por glutamato é dependente da ativação da proteína pró-apoptótica caspase 3 (LIU et al., 2011). Neste contexto, estudos mais aprofundados envolvendo a análise dos eventos que ocorrem durante a apoptose, tais como a liberação de citocromo c, ativação de caspases e fragmentação de DNA

poderiam confirmar esta hipótese. No entanto, estudos adicionais envolvendo a imunodeteção colorimétrica dos terminais UDP, através da técnica de túnel, são ainda necessários para confirmar esta hipótese. Em conjunto, os resultados obtidos até o momento permitem sugerir que a morte celular induzida por glutamato parece envolver tanto uma inibição do aumento da permeabilidade da membrana celular avaliado através da liberação de LDH quanto da fragmentação do material nuclear. Permitem ainda sugerir que a morte celular induzida por glutamato em células do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos envolve tanto a morte por necrose quanto por apoptose.

Considerando que um dos objetivos deste estudo foi estudar o possível papel neuroprotetor da FRP sobre a morte celular induzida por glutamato, verificou-se a influência da FRP na viabilidade celular, permeabilização da membrana e na fragmentação nuclear. A FRP reduziu de forma dependente da concentração a perda da viabilidade celular induzida por glutamato. Na dose de 100 µg/mL a FRP atenuou de forma significativa o aumento da liberação de LDH induzida por 0,1 e 1 mM de glutamato e diminuiu a fragmentação do material nuclear induzido por glutamato. Em conjunto, estes resultados sugerem um importante efeito neuroprotetor da fração rica em proantocianidinas sobre a morte celular induzida por glutamato. No entanto, qual seria o mecanismo pelo qual a FRP promove sua ação neuroprotetora?

Sabe-se que um dos principais processos bioquímicos que levam à morte celular por excitotoxicidade são as espécies reativas de oxigênio - EROs (como: ânion superóxido, radical hidroxila, e peróxido de hidrogênio), geradas em diferentes compartimentos das células por várias reações que degradam a membrana celular. A geração de EROs tem sido exaustivamente implicada diversos transtornos neuronais e neuromusculares, incluindo a doença de Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica familiar e traumas medulares (FACCHINETTI et al., 1998, BAINS e HALL, 2011). As EROs participam do funcionamento normal das células, bem como nos transtornos patológicos como a inflamação, quando estes são gerados podem causar danos em várias macromoléculas no sistema biológico devido a sua instabilidade e reatividade (ATLANTE et al., 2001).

Conforme mencionado anteriormente, a *Croton celtidifolius* possui comprovada atividade anti-inflamatória e antioxidante (RICE-EVANS et al., 1996). A presença dos flavonóides catequina, galocatequina e de proantocianidinas nos extratos da *Croton celtidifolius* promove uma pronunciada atividade antioxidante *in vitro*, diminuindo os níveis de ânions superóxido (NARDI et al., 2003).

Em nosso estudo, a FRP foi capaz de reduzir os níveis de EROs produzidos pelo insulto glutamatérgico, pelo ensaio da DCF. Ademais, a FRP também foi capaz de atenuar de forma significativa a perda da viabilidade

celular das células do GRD expostas ao peróxido de hidrogênio. A utilização de peróxido de hidrogênio como um modelo para indução de morte celular via estresse oxidativo (MAILLY et al., 1999) e a observação de efeitos protetores da FRP sobre esta morte, indica que o mecanismo neuroprotetor observado neste estudo parece envolver a modulação do estresse oxidativo, corroborando estudos prévios do grupo.

Nosso grupo tem demonstrado que a FRP apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante (NARDI et al., 2003, 2007), bem como antinociceptiva com envolvimento de fibras C sensíveis à capsaicina e receptores D₂ dopaminérgicos (DALBO et al., 2006). Além disso, a FRP induz um efeito vasorrelaxante dependente do endotélio através da via GMP-NO e hiperpolarização decorrente à ativação de canais de potássio dependentes de cálcio em artérias de ratos (DALBO et al., 2008). Outros estudos também relatam uma possível ação da FRP sobre receptores gabaérgicos (MOREIRA et al., 2010). No entanto, não há relatos na literatura que apontem para uma ação da FRP sobre receptores glutamatérgicos.

Neste contexto, verificou-se a participação de receptores glutamatérgicos na morte celular induzida por glutamato em células do GRD de ratos adultos e o possível efeito da FRP nestes receptores.

Primeiramente observou-se que a incubação das células do GRD tanto com o antagonista seletivo de receptores NMDA, MK-801, quanto com o antagonista metabotrópico não-seletivo M-CPG, foi capaz de recuperar a perda da viabilidade celular induzida pelo insulto glutamatérgico.

A ativação de receptores NMDA em cultura de neurônios do GRD sensibiliza canais de cálcio do tipo L dependentes de voltagem, o qual contribui para elevação persistente de Ca²⁺ intracelular através de um processo mediado por proteína quinase C. Ademais, o glutamato pode induzir oscilações transitórias de cálcio através da ativação seletiva de receptores metabotrópicos GluR5. A exposição ao glutamato também pode ativar receptores AMPA, os quais conferem permeabilidade ao cálcio causando excitotoxicidade neuronal (SANELLI et al., 2007). No presente estudo, não avaliamos a participação de receptores AMPA na morte de células do GRD induzidas por glutamato, mas comprovamos a participação de receptores NMDA e metabotrópicos na morte de células do GRD de ratos adultos. Em outras palavras, o glutamato atua tanto nos receptores glutamatérgicos ionotrópicos como em receptores glutamatérgicos metabotrópicos.

No entanto, o envolvimento dos demais tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos e seus subtipos somente poderão ser descartados após a utilização de antagonistas específicos destes receptores.

Em adição, quando as células foram expostas ao agonista glutamatérgico NMDA (500 μ M) ocorreu uma diminuição significativa na viabilidade celular a qual foi revertida pelo antagonista seletivo de receptores NMDA, o MK-801 e de pelo tratamento com a FRP (100 μ g/ml). De forma semelhante, a exposição das células do GRD ao agonista metabotrópico Trans-ACPD (100 μ M) também induziu perda da viabilidade celular a qual foi recuperada pela pré-incubação das células com M-CPG, mas não pelo co-tratamento das células com a FRP (100 μ g/ml), sugerindo que o efeito neuroprotetor desencadeado pela FRP parece resultar da inibição de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA mas não do tipo metabotrópicos.

Este conjunto de resultados, provenientes das análises *in vitro* permitem sugerir que o insulto glutamatérgico de células do GRD de ratos adultos acarreta na permeabilização da membrana celular, fragmentação do material nuclear e geração de espécies reativas de oxigênio, efeitos estes conseqüentes à ativação de receptores NMDA e metabotrópicos. Ademais, este estudo demonstra de forma inédita, que esta cascata de eventos pode ser modulada pelo tratamento das células do GRD com a fração rica em proantocianidinas isoladas da casca da planta *Croton celtidifolius*, uma vez que a mesma, foi capaz de inibir a produção de LDH, a fragmentação do material nuclear, a produção de EROs, bem como a perda da viabilidade celular induzida pelo agonista de receptores NMDA e pelo peróxido de hidrogênio.

Em seguida, utilizamos um modelo experimental de neurotoxicidade *in vivo*, isto é, de indução de lesão da medula espinhal em ratos, avaliou-se o efeito do tratamento sistêmico de animais submetidos ao trauma medular sobre a atividade locomotora e neuromuscular. Conforme mencionado anteriormente, o modelo de lesão medular traumática por compressão é um modelo já descrito na literatura (VANICKY et al., 2001) e padronizado pelo nosso grupo, o qual gera uma lesão medular moderada, cujo escore final avaliado pela escala de atividade locomotora BBB permanece em torno de 8 pontos, característico de paraplegia moderada (MARTINI et al., 2011). Este estudo reproduziu os achados mencionados acima, ao detectar uma recuperação limitada e gradual da função motora, que não se completou ao longo das 4 semanas de observação, isto é, o escore máximo obtido foi de 8.5 ± 0.7 . O déficit neurológico persistente caracterizou-se por recuperação parcial dos movimentos de flexão e extensão, alteração no posicionamento das patas posteriores e na coordenação motora.

De forma interessante, quando os animais foram tratados com a FRP na dose de 10 mg/kg por via i.p durante 5 dias consecutivos, obteve-se uma melhora na atividade locomotora que teve início a partir do décimo dia após o trauma, sendo que no vigésimo oitavo dia ocorreu uma melhora de 41,1% no desempenho locomotor. Estes resultados foram surpreendentes e permitem

hipotetizar uma ação da FRP sobre a cascata de eventos que precedem a lesão primária, em especial a excitotoxicidade, a peroxidação lipídica e a geração de radicais livres. Ademais, embora não avaliado neste estudo, a comprovada atividade antiinflamatória da FRP também pode ter contribuído para a melhora da atividade locomotora dos animais paraplégicos observada neste estudo.

A prevenção da excitotoxicidade aguda que se estabelece após o trauma tem sido foco de diversos estudos voltados ao tratamento da lesão medular traumática. Em especial, estudos clínicos realizados com a Gacyclidine (GK-11), um antagonista não competitivo de receptores glutamatérgicos NMDA, administrada endovenosamente até duas horas após o trauma demonstram uma recuperação funcional significativa em humanos (para revisão ver BAUCHET et al., 2008). No entanto, os avanços das pesquisas nesta linha são limitados devido aos efeitos adversos apresentados pelos agentes antiglutamatérgicos quando se faz uso prolongado dos mesmos, especialmente antagonistas NMDA não competitivos, cujos efeitos adversos incluem agitação, sedação, alucinações e déficits de memória (para revisão ver HAWRILUK et al., 2008).

Os achados de MOREIRA e col (2010), os quais demonstram que a administração intraperitoneal de doses altas de FRP (10–30 mg/kg, i.p.) induz respostas comportamentais sugestivas de atividade depressora do SNC não somente reforçam nossa hipótese de uma ação neuroprotetora da FRP decorrente da inibição de receptores NMDA, mas também indicam que o protocolo terapêutico adotado em nosso estudo parece não desencadear efeitos colaterais importantes e aparentes, uma vez que quando avaliou-se a força de preensão de animais submetidos a lesão da medula espinhal foi observada uma melhora acentuada na força de preensão após o tratamento dos animais com a FRP.

Em conjunto, estes resultados fornecem a primeira evidência de que a fração rica em proantocianidinas isoladas da planta *Croton celtidifolius* atenua a morte celular por necrose e por apoptose bem como a produção de EROs induzida por glutamato, inibe a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio e pelo agonista NMDA, mas não aquela induzida pelo agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. A FRP também foi capaz de promover uma melhora na atividade locomotora e na força de preensão de animais submetidos à lesão traumática da medula espinhal.

CONCLUSÕES

- No presente estudo, demonstramos o efeito neuroprotetor da FRP na concentração de 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$, na morte celular induzida por glutamato 1 mM.
- A FRP também atenuou a liberação da enzima lactato-desidrogenase diminuindo a permeabilização da membrana.
- A morte por apoptose foi diminuída pela FRP, na qual não se observa o rompimento da membrana.
- No ensaio da DCF, a FRP reduziu as espécies reativas de oxigênio, produzidos por glutamato, confirmando sua capacidade antioxidante.
- A FRP promoveu um efeito neuroprotetor de células do GRD sobre a morte induzida por peróxido de hidrogênio, comprovando sua atividade antioxidante.
- A FRP parece atuar como antagonista dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, protegendo a morte celular induzida por glutamato.
- Nos estudos *in vivo*, os animais tratados com a FRP na dose de 10 mg/kg, obtiveram um aumento no escore da escala BBB comparados com os animais veículos, mostrando melhora da atividade locomotora.
- No teste da força de preensão, os animais tratados com a FRP tiveram uma melhora na força de preensão, aumentando o desempenho neuromuscular dos membros anteriores.
- Desta maneira, nossos achados reforçam a hipótese de que polifenóis podem ser ferramentas terapêuticas úteis como agentes neuroprotetores na lesão medular traumática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abul-Kasim, K., Strömbeck, A., Sundgren, P.C. Spinal Cord Injuries. In: Berkovsky, T.C. **Handbook of Spinal Cord Injuries**. New York: Nova Science Publishers, p. 483- 499, 2010.
2. Allen R. G.; Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Rad Biol Med**. V. 28, p. 463-499, 2000.
3. Anazetti, M.S., Melo, P.S. Morte celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**. V. 1, p. 37-58, 2007.
4. Andrade, E. L. Participação do receptor TRPA1 na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular em ratos. **Tese de doutorado em Farmacologia**, 2010.
5. Ankarcorna, M. Glutamate induced cell death: apoptosis or necrosis? **Progr. Brain Res**. V. 116, p. 266-272, 1998.
6. Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E., Passrella, S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. **FEBS Letters**. V. 47, p. 1-5, 2001.
7. Atlasi A.M., Mehdi Mehdizadeh M., Bahadori H. M., Taghi Joghataei, T.M. Morphological identification of cell death in dorsal root ganglion neurons following peripheral nerve injury and repair in adult rat. **Iranian Biomedical Journal**. V. 13 (2), p. 65-72, 2009.
8. Bains, M., Hall E.D. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. **Biochim Biophys Acta**. p. 10, 2011.
9. Basso, D. M., Beattie, M. S., Bresnahan, J. C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. **Exp. Neurol**. V. 139, p. 244 -256, 1996.
10. Bartholdi, D., Schwab, M.E. Methyprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat. **Brain Res**. V. 672, p. 177-186, 1995.
11. Bauchet L, Lonjon N, Perrin FE, Gilbert C, Privat A, Fattal C. Strategies for spinal cord repair after injury: a review of the literature and information. **Phys Rehabil Med**. V. 52 (4), p. 330-51, 2009.
12. Beattie MS, Ferguson AR, Bresnahan JC. AMPA-receptor trafficking and injury-induced cell death. **Eur J Neurosci**. V. 32 (2), p. 290-7, 2010.
13. Berne, R. M., Levy, M. N., Stanton, B. A., Koeppe, B. M. **Fisiologia de Berne & Levy**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
14. Buzzo, E., Natali M. R. M., Campos., B. L. L. J., Beraldi, C.E.J. Análise morfométrica dos neurônios NADHA-diaforese positivos do jejuno de

- ratos wistar em diferentes idades **Revista Saúde e Pesquisa**. V. 3 (1), p. 65-70, 2010.
15. Carozzi, VA, Zoia CP, Maggioni D, Verga E, Marmiroli P, Ferrarese C, Cavaletti G. Expression, distribution and glutamate uptake activity of high affinity-excitatory aminoacid transporters in in vitro cultures of embryonic rat dorsal root ganglia. **Neuroscience**. V. 29 (192), p. 275-84, 2011.
 16. Carvalho JC, Silva MF, Maciel MA, Pinto AC, Nunes DS, Lima RM, Bastos JK, Sarti SJ. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of transdehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. **Plant Med**. V. 62, p. 402-404, 1996.
 17. Chen, C-J.; Liao, S-L.; Kup, J-S. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. **J. Neurochem**. V. 75, p. 1557-1565, 2000.
 18. Choi, D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J. Neurosci**. V. 7, p. 369-379, 1987.
 19. Compton, M. M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. **Cancer Metastasis**. N. 11, p. 105-119, 1992.
 20. Costa, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Virtual Quim**. V.1, p. 58-66, 2009.
 21. Costanzo, L.S. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
 22. Curtin, J. F.; Donovan, M.; Cotter, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods**. V. 265, p. 49-72, 2002.
 23. Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P., Salvemini, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol**. V. 53 (1), p. 135-159, 2001.
 24. DalBó, S., Jurgensen, S., Horst, H., Ruzza., A.A., Soethe, D.N., Santos A.R.S Pizzolatti, M.G. and Ribeiro-do-Valle, R.M. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. **J. Pharm**. V. 57 (6), p. 765-771, 2005.
 25. DalBó, S., Jurgensen, S., Horst, H., Soethe, D.N., Santos, A.R.S., Pizzolatti, M.G. and Ribeiro-do-Valle, R.M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* barks: evidence of role of the dopaminergic system. **Pharmacol Bioche. Behav**. V. 85 (2), p. 317-323, 2006.
 26. Dalbó, S., Moreira, E.G., Brandao, F.C., Horst, H., Pizzolatti, M.G., Micke, G.A., Ribeiro-do-Valle, R.M. Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-rich fraction from

- Croton celtidifolius in rat small resistance arteries. **J Pharmacol Sci.** V. 106 (2), p. 234-41, 2008.
27. De Albuquerque MM, Lyra FD, De Mello JF, De Lima, OG, Monache FD, Diu e Laurinete Costa MB. Antimicrobial substances of superior plants. 44. Isolation of diterpene acid from *Croton aff. Argyrophyloides* Muell arg. (Euphorbiaceae). **Rev Inst Antibiotic.** V. 14, p. 83-89, 1989.
 28. Dustin J. Donnely, Philip G. Popovich. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. **Experimental Neurology.** V. 20 (208), p. 378-388, 2007.
 29. Facchinetti, F., Dawson VL., Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. **Cell Mol Neurobiol.** V. 18 (6), p. 667-82, 1998.
 30. Forner, S. Envolvimento dos receptores B₁ e B₂ para as cininas ha hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular em ratos. **Dissertação de mestrado em Farmacologia**, 2012.
 31. Fouilloux, C, Contreras, F, Rivera, M *et al.* **Receptores de glutamato: Implicaciones terapéuticas.** V. 23 (2), p. 99-108, 2004.
 32. Goodman, Louis Sanford, Gilman, Alfred Goodman; Brunton, Laurence. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 11. ed. Porto Alegre, 2010.
 33. Guerrero MF, Carron R, Martin ML, San Roman L, Reguero MT. Antihypertensive an vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. **J Ethnopharmacol.** V. 75, p. 33-36, 2001.
 34. Hargreaves, K.; Dubner, R.; Brown, F.; Flores, C.; Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hiperalgesia. **Pain.** V. 32, p. 77 -88, 1998.
 35. Halliwell, B., and Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *Br. J. Pharmacol.* V. 142, p. 231–255, 2004.
 36. Hawryluk GW, Rowland J, Kwon BK, Fehlings MG. Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury. **Neurosurg Focus.** V. 25 (5), 2008.
 37. Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Chao CC. Differential regulation by cytokines of human astrocyte nitric oxide production. **Glia.** V. 15 (4), p. 491-4, 1995.
 38. Hulseboch, C. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. **Adv. Physiol. Educ.** V. 26, p. 238-255, 2002.
 39. Kehl, J. L., Trempea, M. T., Hargreaves, M. K. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hiperalgesia. **Pain.** V. 85, p. 333-343, 2000.
 40. Kigerl, K., Popovich, P. Drug evaluation: ProCord – a potential cell-based therapy for spinal cord injury. **I drugs.** p. 354-360, 2006.

41. Khasar, S.G. and Levine, J.D. Neonatal capsaicin attenuates mechanical nociception in the rat. **Neurosc. Lett.** V. 205, p. 141-143, 1996.
42. Kushnareva YE, Wiley SE, Ward MW, Andreyev AY, Murphy AN. Excitotoxic injury to mitochondria isolated from cultured neurons. **J Biol Chem.** V. 280 (32), p. 28894–28902, 2005.
43. Lipton, S. A., Rosenberg, P. A. Mechanisms of disease. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. **The New Eng. J. Med.** V. 330, p. 613-622, 1994.
44. Le Bars, D., Gozariu M. and Cadden, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.** V. 53, p. 57-652, 2001.
45. Lucas, R.D., Newhouse, J.P. The toxic effect of sodium L -glutamate on the inner layers of the retina. **AMA Arch. Ophthalmol.** V. 58, p. 193-201, 1957.
46. Liu Z, Li H, Zhang W, Li Y, Liu H, Li Z. Neuregulin-1 β prevents Ca(2+) overloading and apoptosis through PI3K/Akt activation in cultured dorsal root ganglion neurons with excitotoxicity induced by glutamate. **Cell Mol Neurobiol.** V. 31 (8), p. 1195-201, 2011.
47. Lundy-Ekman, L. **Neurociências: fundamentos para a reabilitação.** Tradução: Múndin, F.D.; Oliveira, N.G.; Santos, R.R.; Robaina, T.F.; Varga, V.R.S. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
48. Mailly, F.; Marin, P.; Israel, M; Glowinsky J.; Prénôt, J. Increase in external glutamate end NMDA receptor activation contribute to H₂O₂-induced neuronal apoptosis. **J. Neurochem.** V. 73, p. 1181-1188, 1999.
49. Mandel, S.; Youdim, M.B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radic Biol Med.** V. 37 (3), p. 304-17, 2004.
50. Martini, A. C. Envolvimento das proteínas quinases ativadas por mitógenos espinhais na lesão medular traumática em ratos. **Dissertação de mestrado em Farmacologia**, 2011.
51. Matute, C.; Alberdi, E.; Ibarretxe, G.; Sánchez-Gómez, MV. Excitotoxicity in glial cells. **Eur. J. Pharmacol.** V. 447, p. 239-246, 2002.
52. Mailly, Franck, Philippe Marin, Maurice Israel, Jacques Glowinski, and Joel Premont. Increase in External Glutamate and NMDA Receptor Activation Contribute to H₂O₂-Induced Neuronal Apoptosis. **J. Neurochem.** V. 73, p. 1181–1188, 1999.
53. Matute, C.; Alberdi, E.; Ibarretxe, G.; Sánchez-Gomez, MV. Excitotoxicity in glial cells. **Eur. J. Pharmacol.** V. 447, p. 239-246, 2002.

54. McDonald, J. W. e Johnston, M. V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acid during central nervous system development. **Brain Res. Rev.** V. 15, p. 41-70, 1990.
55. Meldrum, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.** V. 130, p. 1007-1015, 2000.
56. Melo, P. S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell Dev. Biol. Animal.** V. 36, p. 539-543, 2000.
57. Meyer, F., Vialle, L. R., Vialle, E. N., Bleggi-Torres, L. F., Rasera, E., Leonel, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirúrgica brasileira.** V. 18, p. 203-207, 2003.
58. Michaelis, E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Prog. Neurobiol.** V. 54, p. 369-415, 1998.
59. Molz, S., Dal-Cim, Tasca CI. Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition. **Neurochem Int.** V. 55 (7), p. 703-9, 2009.
60. Moreira, E.L.G. Avaliação farmacológica de uma fração rica em proantocianidinas da *Croton celtidifolius* sobre o sistema nervoso central e um modelo animal da doença de parkinson. **Dissertação de mestrado em Farmacologia.** 2010.
61. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** V. 65 (1-2), p. 55-63, 1983.
62. Naito, S e Ueda, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. **J. Neurochem.** V. 44, p. 99-109, 1985.
63. Nardi, G.M., Felippi, R., Dalbo, S., Siqueira-Junior, J.M., Arruda, D.C., Delle Monache, F., Timbola, A.K., Pizzolatti, M.G., Ckless, K., Ribeiro-do-Valle, R.M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine.** V. 10 (2-3), p. 176-84, 2003.
64. Nardi, G.M., Dalbó, S., Monache, F.D., Pizzolatti, M.G., Ribeiro-do-Valle, R.M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.** V. 107 (1), p. 73-8, 2006.
65. Nardi, G.M., Siqueira Junior, J.M., Delle Monache, F., Pizzolatti, M.G., Ckless, K., Ribeiro-do-Valle, R.M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine.** V. 14 (2-3), p. 115-22, 2007.
66. Noraberg, J., Kristensen, W. B., and Zimmer, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slices cultures. **Brain Res.** V. 3, p. 278-290, 1999.

67. Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **J Neurotrauma**. V. 21 (4), p. 429-40, 2004.
68. NSCISC, National Spinal Cord International Statistical Center. Annual report for the spinal cord injury model system. In <http://www.nscisc.uab.edu>. Acesso em 20 de setembro 2011.
69. Obrenovitch, T. P. e Urenjak, J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. **Progr.Neurobiol**. V. 51, p. 39-87, 1997.
70. Olney, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**. V. 164, p. 719-721, 1969.
71. Perdue GP, Bolmster RN, Blake DA, Farnsworth NR. South American plants II: taspine isolation and anti-inflammatory activity. **J Pharm Sci**. V. 68, p. 124-126, 1979.
72. Papassotiropoulos, A., M. Ludwig, W. Naib-Majani, G.S Rao. Induction of apoptosis and secondary necrosis in rat dorsal root ganglion cell culture by oxidized low density lipoprotein. **Neuroscience letters**. V. 209, p. 33-36, 1996.
73. Peng WG, Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Wan P, Li P, Xu Q, Liu QS, Goldman SA, Nedergaard M. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. **Nat Med**. V. 10 (8), p. 821-7, 2004.
74. Piani D, Frei K, Pfister HW, Fontana A. Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including cytokines, leukotrienes or platelet-activating factor. **J Neuroimmunol**. V. 48 (1), p. 99-104, 1993.
75. Piani D, Fontana A. Involvement of the cystine transport system xc- in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. Microglia and tumor rejection. **J Immunol**. V.1 (7), p. 3578-851, 1994.
76. Profyris, C., Cheema, S. S., Zang, D. W., Azari, M. F., Boyle, K., Petratos, S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiol. Dis**. V. 15, p. 415-436, 2004.
77. Rang, H.P., Dale, M. Maurenn. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2007.
78. Rice-Evans, C.A and Miler, N.J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Bioche Soc Trans**. V. 24, p. 790-795, 1996.
79. Robinson, M. B., Dowd, L. A. Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. **Adv. Pharmacol**. V. 37, p. 69-115, 1997.

80. Rossignol S, Barrière G, Alluin O, Frigon A. Re-expression of locomotor function after partial spinal cord injury. **Physiology**. V. 24, p. 127-39, 2009.
81. Sanelli T, Ge W, Leystra-Lantz C, Strong M. J. Calcium mediated excitotoxicity in neurofilament aggregate-bearing neurons in vitro is NMDA receptor dependant. **J Neurol Sci**. V. 256 (1-2), p. 39-51, 2007.
82. Silva, Penildon. **Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
83. Smith, L.B., Downs, R.J. and Klein, R.M. Euphorbiaceas. In: **Flora Ilustrada Catarinense**. p. 408, 1998.
84. Sheardown M, Nielsen EO, Drejer J, Hansen AJ. Specific quisqualate receptor ligand blocks both kainate and quisqualate responses. **Adv Exp Med Biol**. V. 268, p. 65-71, 1990.
85. Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . **J Neurosci**. V. 25 (12), p. 3219-28, 2005.
86. Stone TW, Addae JI. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **Eur J Pharmacol**. V. 5, 447(2-3) p, 285-96, 2002.
87. Tator, C.H. and Fehlings, M.G. Review of the Secondary Injury Theory of Acute Spinal Cord Trauma with Emphasis on Vascular Mechanisms. **Journal of Neurosurgery**. V. 75, p. 15-26, 1991.
88. Thuret, S., Moon, L.D., Gage, F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nature Rev. Neurosci**. V. 7 (8), p. 628-43, 2006.
89. Vanický, I., Urdzíkóvá, L., Saganová, K., Cízková, D., Gálik, J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. **J Neurotrauma**. V. 18, p. 1399-1407, 2001.
90. Wang H; Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radic Biol Med**. V. 27 (5-6), p. 612-6, 1999.
91. Whitaker, J.F. Lactate dehydrogenase as a cytoplasmatic marker in brain. **Clin. Chim. Acta**. V. 24, p. 23-27, 1969.
92. Whiteside G, Cougnon N, Hunt S.P, Munglani R. An improved method for detection of apoptosis in tissue sections and cell culture, using the TUNEL technique combined with Hoechst stain. **Brain research Protocols**. V. 2, p. 160-164, 1998.
93. Yamaura, I.; Yone, K.; Nakahara, S.; Nagamine, T.; Baba, H.; Uchida, K. and Komiyama, S. Mechanism of Destructive Pathologic Changes in the Spinal Cord under Chronic Mechanical Compression. **Spine**. V. 27, p. 21-26, 2002.

94. Vanický, I., Urdzíkova, L., Saganová, K., Cízková, D., Gálik, J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. **J Neurotrauma**. V. 18, p. 1399-1407, 2001.
95. Volterra A, Trotti D, Floridi S, Racagni G. Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications. **Ann N Y Acad Sci**. V. 738, p. 153-62, 1994.
96. Zerangue N, Arriza JL, Amara SG, Kavanaugh MP. Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. **J Biol Chem**. V. 270 (12), p. 6433-5, 1995.
97. Zhen, L., Hao, L., Weiwei, Z., Yizhao, L., Huaxiang, L., Zhenzhong, L. Neuregulin-1b prevents Ca^{2+} overloading and apoptosis through PI3K/Akt activation in cultured dorsal root ganglion neurons with excitotoxicity induced by glutamate. **Cell Mol Neurobiol**. V. 31, p. 1195–1201, 2011.