
OLAVO BIRAGHI LETAIF

Avaliação do efeito do estrógeno na lesão medular experimental em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Dr. Raphael Martus Marcon

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Letaif, Olavo Biraghi
Avaliação do efeito do estrógeno na lesão medular experimental em ratos /
Olavo Biraghi Letaif. -- São Paulo, 2014.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ortopedia e Traumatologia.
Orientador: Raphael Martus Marcon.

Descritores: 1.Traumatismos da medula espinal 2.Estrógeno 3.Sistema nervoso
central/lesões 4.Ratos

USP/FM/DBD-167/14

DEDICATÓRIA

À minha linda esposa, Leila, companheira, amiga, confidente e ajuda nas horas felizes e nas mais difíceis. Meu trabalho e minha profissão são reflexos do seu carinho, apoio, força e incentivo contínuo.

À minha família, e em especial aos meus pais, Nelson e Flavia, pelos exemplos de dedicação, amor, honestidade, seriedade e ética que pautam meus passos profissionais e pessoais todos os minutos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP), exemplo de líder, pelo apoio, incansável ajuda e pelas contínuas oportunidades de aprimoramento.

Ao Professor Doutor Olavo Pires de Camargo (IOT-HC-FMUSP), pela confiança e pelo exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino.

Ao Professor Doutor Gilberto Luis Camanho (IOT-HC-FMUSP), pelo exemplo profissional e incentivo.

Ao Doutor Reginaldo Perilo Oliveira, diretor científico do Grupo de Coluna da Disciplina de Coluna Vertebral (IOT-HC-FMUSP), pela confiança no meu trabalho, apoio constante, por todas as oportunidades e ensinamentos transmitidos, e pela chefia onipresente.

Ao Professor Doutor Alexandre Fogaça Cristante, chefe do Grupo de Coluna da Disciplina de Coluna Vertebral (IOT-HC-FMUSP), pelo exemplo de trabalho incansável e perfeccionista, liderança incontestável, pela ajuda e pelo incentivo a tantas oportunidades de crescimento profissional.

Ao Doutor Raphael Martus Marcon, Chefe do Grupo de Coluna da Disciplina de Coluna Vertebral (IOT-HC-FMUSP), pela confiança, apoio e incentivo ao meu trabalho, além de ajuda constante no meu desenvolvimento profissional dentro da cirurgia de coluna.

Ao Doutor Ricardo Ferreira, pela dedicação na realização dos exames de potencial evocado.

Ao biólogo Gustavo Bispo dos Santos, pela dedicação e profissionalismo com que conduz o nosso laboratório de lesão medular.

Ao estatístico Henry Dan Kiyomoto, pela competência e paciência na análise e discussão dos dados.

Aos meus colegas do Grupo de Coluna do IOT-HCFMUSP, companheiros de aprendizado, fontes de ensinamentos, constantes consultores e, sobretudo, amigos que me ajudam a crescer.

Aos meus colegas assistentes do IOT-HCFMUSP, exemplos de profissionais competentes e capazes, referências e amigos.

Às enfermeiras da Enfermaria de Coluna do IOT-HC-FMUSP, pelo exemplo de dedicação, eficiência e pela ajuda ao longo de todos esses anos.

A todos os funcionários do IOT-HC-FMUSP que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Terminologia Anatômica em Português conforme a Terminologia Anatômica Internacional da Federative Committee on Anatomical Terminology - FCAT (Comissão Federativa de Terminologia Anatômica – CFTA) aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. 1^a ed. (Brasileira). São Paulo: Editora Manole Ltda; 2001. 248p.

Utilizaram-se a terminologia e as definições estatísticas conforme o Guia para Expressão da Incerteza de Medição. 2^a ed. (Brasileira) do Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição Revisada (agosto de 1998). Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM; 1998.

SUMÁRIO

Listas de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Lista de Gráficos	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo.....	6
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1. Modelos de lesão medular experimental	8
2.2. Métodos de avaliação da lesão medular	11
2.3. Tratamento da lesão medular	13
3. MÉTODOS.....	21
3.1. Ética.....	22
3.2. Animais de experimentação.....	22
3.3. Formação dos grupos experimentais.....	23
3.4. Modelo experimental de lesão medular	24
3.4.1. Protocolo de anestesia.....	24
3.4.2. Laminectomia	25
3.4.3. Contusão medular pelo NYU Impactor	27
3.5. Procedimento após lesão	30
3.6. Tratamento medicamentoso com estrógeno.....	32

3.7. Protocolo de avaliação da capacidade locomotora pela escala	
BBB.....	32
3.8. Análise por potencial evocado motor.....	35
3.9. Eutanásia.....	36
3.10. Exame necroscópico e anatomopatológico	38
3.10.1. Microscopia	40
3.11. Análise estatística.....	43
3.11.1. Análise estatística da avaliação funcional	44
3.11.2. Análise estatística do potencial evocado.....	44
3.11.3. Análise estatística da avaliação histológica.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Análise dos dados obtidos pela escala funcional BBB	47
4.2. Análise dos dados obtidos através do potencial evocado	49
4.3. Dados histológicos.....	50
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÕES.....	72
7. ANEXOS.....	74
8. REFERÊNCIAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Amp	amplitude
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
ATA	atmosfera(s)
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
df	<i>degrees of freedom</i>
E2	17-beta estradiol
GM1	gangliosídeo
IOT-USP	Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo
IR	índice de regeneração dos axônios
Lat	latência
LETRAN	Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Study
PFA	paraformaldeído

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Estatística descritiva com a média e desvio padrão das notas de BBB de cada um dos grupos, em cada semana de observação, e o correspondente valor do p (significância estatística) 48
- Tabela 2.** Estatística descritiva com a média e desvio padrão dos valores de amplitude (AMP) de resposta e latência (LAT) de resposta durante avaliação por potencial evocado no membro inferior e o correspondente valor do p (significância estatística) 50
- Tabela 3.** Estatística descritiva com a média e desvio padrão das notas obtidas na análise histológica qualitativa de cada um dos grupos, em cada uma das variáveis analisadas e o correspondente valor do p (significância estatística) 51
- Tabela 4.** Estatística descritiva com os dados de média e desvio padrão retirados da proporção entre o número de fibras distais/fibras proximais e entre o diâmetro das fibras distais/fibras proximais nos diferentes grupos e o correspondente valor do p (significância estatística)..... 57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Procedimentos para a realização da lesão medular através de equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso NYU Impactor. A – detalhe da laminectomia, com exposição da medula espinal; B – detalhe das garras de fixação nos processos espinhosos e C – vista geral do posicionamento do animal no dispositivo de impacto. 26
- Figura 2.** Equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso NYU Impactor. Acima diagrama esquemático sem escala A e abaixo vista geral do dispositivo de impacto B 29
- Figura 3.** Determinação da capacidade locomotora após lesão pela escala BBB de avaliação funcional (Basso et al. 1995). A – rato posicionado na caixa forrada com campo azul para facilitar observação e B – rato em vista lateral, avaliação da movimentação do quadril, joelho e tornozelo da pata posterior direita e posição da cauda..... 33
- Figura 4.** Posicionamento dos eletrodos para exame de potencial evocado 36

- Figura 5.** Desenho esquemático da medula espinhal com a área do corno ventral delimitada por uma linha transversal logo abaixo do canal central, segundo Grossman et al. (2001a, 2001b). Essa área foi selecionada para a contagem dos neurônios.... 41
- Figura 6.** Imagem ilustrativa da contagem de fibras na microscopia (coloração: azul de toluidina; aumento: 40 vezes)..... 42
- Figura 7.** Imagem ilustrativa da medição do diâmetro das fibras na microscopia (coloração: azul de toluidina; aumento: 40 vezes) 42
- Figura 8.** Imagem ilustrativa do grau acentuado de degeneração da substância nervosa do tecido medular lesado dos ratos (aumento: 100 vezes, coloração: hematoxilina-eosina)..... 55
- Figura 9.** Imagem ilustrativa do grau acentuado de hiperemia do tecido medular lesado dos ratos (aumento: 100 vezes, coloração: hematoxilina-eosina) 55
- Figura 10.** Imagem ilustrativa do grau moderado de infiltrado celular e degeneração cística do tecido medular lesado dos ratos (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina)..... 56

Figura 11. Imagem ilustrativa de uma região sem alterações, proximal à lesão (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina) .. 56

Figura 12. Imagem exemplificando a quantidade de fibras na região proximal a lesão (aumento: 40 vezes, coloração por azul de toluidina) 58

Figura 13. Imagem exemplificando a quantidade de fibras na região distal à lesão (aumento: 40 vezes, coloração por azul de toluidina) 58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Evolução das médias das notas do BBB de cada um dos grupos em cada semana de observação. 49
- Gráfico 2.** Média da pontuação da necrose encontrada em cada um dos grupos..... 52
- Gráfico 3.** Média da pontuação da hemorragia encontrada em cada um dos grupos. 52
- Gráfico 4.** Média da pontuação da hiperemia encontrada em cada um dos grupos..... 53
- Gráfico 5.** Média da pontuação da degeneração de substância nervosa encontrada em cada um dos grupos 53
- Gráfico 6.** Média da pontuação do infiltrado celular encontrado em cada um dos grupos 54
- Gráfico 7.** Média dos valores do número de fibras em cada um dos grupos 59
- Gráfico 8.** Média dos valores do diâmetro das fibras em cada um dos grupos..... 60

Letaif OB. Avaliação do efeito do estrógeno na lesão medular experimental em ratos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do tratamento com estrógeno em ratos submetidos à lesão medular aguda experimental. A lesão foi produzida por meio de um equipamento computadorizado para impacto medular, o NYU Impactor, que promoveu a queda de um peso de altura de 12,5 mm sobre a medula do animal. Utilizamos 20 ratos Wistar que foram separados em dois grupos de 10 animais cada: Grupo 1, com ratos submetidos a lesão medular e depois a terapia com 17-beta estradiol ainda sob anestesia, o grupo experimental; Grupo 2, com ratos submetidos apenas à lesão medular, o grupo controle. Os animais foram observados por 42 dias. A recuperação funcional motora foi avaliada pela escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) nos dias 2, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a lesão, e pelo exame de potencial evocado motor no dia 42. Foi também realizada avaliação histopatológica da área da lesão medular após eutanásia, no dia 42. Os resultados das avaliações da escala BBB evidenciaram que o grupo experimental apresentou melhora significativamente superior em relação ao outro grupo desde o 28^o dia até o 42^o dia de observação. Os resultados das avaliações por exame de potencial evocado revelaram que o grupo experimental apresentou melhora estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Os resultados das avaliações anatomopatológicas pela histomorfometria mostraram melhor recuperação neurológica do grupo experimental com relação à proporção numérica e ao diâmetro das fibras nervosas contadas. A conclusão é que a administração de estrógeno em ratos submetidos à lesão medular mostrou benefícios na recuperação neurológica e funcional motora dos animais tratados.

Descritores: Traumatismos da medula espinal; Estrógeno; Sistema nervoso central/lesões; Ratos.

Letaif OB. Evaluation of the effect of estrogen on experimental spinal cord injury in rats [Master's dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Abstract

This study aimed to evaluate the influence of estrogen treatment in rats with experimental acute spinal cord injury. The injury was produced using a computerized device for spinal cord impact, the NYU Impactor, which promoted the injury by the falling of a weight on the animal's spine from a 12.5 mm-height. Twenty male Wistar rats were divided into two groups of 10 animals each: Group 1, rats with spinal cord injury and undergoing estrogen therapy with 17-beta estradiol, while still anesthetized, the experimental group; Group 2, rats that underwent spinal cord injury only, the control group. Animals were observed for 42 days. The neurological recovery was verified by assessing functional motor recovery by the scale of Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) on the 2nd, 7th, 14th, 21st, 28th, 35th and 42nd days after injury, and by quantifying motor evoked potential in the 42nd day. Histopathological evaluation of the area of spinal cord injury was performed after euthanasia in the 42nd day. Results of the BBB scale evaluation showed that the experimental group had significantly greater improvement compared to the other group since the 28th day until the 42nd day of observation. The results of evaluations by the evoked potential test revealed that the experimental group showed statistically significant improvement compared to the control group. The results of the histomorphometry evaluations showed better neurological recovery in the experimental group with respect to the numerical proportion and diameter of nerve fibers counted. The conclusion is that the administration of estrogen in rats with spinal cord injury showed benefits in neurological and functional motor recovery of the treated animals.

Key words: Spinal cord injuries; Estrogen; Central nervous system/injuries Rats.

1. INTRODUÇÃO

O paciente com lesão medular encontra-se frequentemente em uma situação incapacitante, irreversível e de custo socioeconômico muito elevado. O dano medular causa significativa piora na qualidade de vida da vítima e está associado a alterações fisiopatológicas nos sistemas respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, neurológico, urogenital e musculoesquelético. A magnitude dessas alterações pode ser diretamente correlacionada com a gravidade do dano neurológico (Sekhon e Fehlings, 2001). A lesão pode originar de traumatismos, tumores, infecção, lesão vascular ou até mesmo causada iatrogenicamente.

A lesão medular acomete, com maior frequência, adultos jovens durante a fase mais produtiva de suas vidas, como resultado de acidentes ou violência. Embora sua incidência seja inferior a 50 por milhão, a morbidade e a mortalidade associadas são dispendiosas, com despesas hospitalares iniciais de aproximadamente 95.000 dólares por indivíduo (Sekhon et al., 2001). Além disso, a debilitação e a perda de função, geralmente, são importantes, com 45% das lesões sendo completas (Sekhon et al., 2001). A América Latina tem uma alta incidência de lesões medulares traumáticas: 25/milhão de habitantes (intervalo de confiança: 14-27), com até 21% resultando em morte. A taxa global está entre 236 e 4.187/milhão (Lee et al., 2014). No Brasil, a incidência do traumatismo raquimedular encontra-se em torno de 40 casos novos/ano/milhão de habitantes, cerca de 6 a 8 mil casos novos/ano (Greve, 1997).

A perda funcional que ocorre após o trauma raquimedular é resultado de um processo complexo que ocorre em duas etapas. Inicialmente, no local da

lesão ocorre morte celular pelo estresse mecânico (Beattie et al., 2000). Após a lesão imediata, segue-se a lesão secundária, de diferente natureza da primária, que atinge o local da lesão e o tecido adjacente (Ray et al., 2001).

A lesão secundária está associada a alterações neuroquímicas (cascata reativa) que ocorrem de minutos a dias após a lesão inicial e incluem ativação da cascata do ácido araquidônico (Sharma et al., 1993), resposta inflamatória, produção de espécies reativas de oxigênio (Ding et al., 2000), aumento da concentração extracelular de aminoácidos (glutamato) (Farooque et al., 1996), edema e redução do fluxo sanguíneo na medula espinhal (O'Connor et al., 2005).

A diminuição do aporte de oxigênio e nutrientes às células reduz a quantidade de trifosfato de adenosina (ATP) disponível, provocando uma disfunção das bombas eletrolíticas da membrana, com a resultante alteração nas concentrações iônicas intra e extracelulares. Este processo é responsável pelo edema e morte das células e pela secreção de neurotransmissores aminoacídicos, como por exemplo, o glutamato (Farooque et al., 1996; O'Connor et al., 2005). A diminuição do ATP também estimula a via glicolítica, aumentando o lactato e reduzindo o pH local, o que provoca, num segundo momento, uma vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, contribuindo para a formação de radicais livres, que causam morte celular. A citotoxicidade induzida pelo glutamato resulta de um aumento excessivo do influxo de Na⁺ e Ca²⁺ nos neurônios, o que leva a ativação de proteases, formação de radicais livres e peroxidação lipídica (O'Connor et al., 2005; Sekhon, 2001).

Muito embora esses processos químicos ocorram principalmente na substância cinzenta medular, a conseqüente liberação de enzimas líticas e radicais livres acaba lesando a substância branca adjacente. Esses produtos metabólicos também provocam inflamação e desmielinização (Amar et al., 1999).

Como a lesão primária é irreversível, os esforços terapêuticos têm se concentrado em reduzir a lesão secundária e em promover a regeneração axonal. Atualmente, porém, não há nenhuma estratégia farmacológica com benefício comprovado (Fu et al., 2005). Embora altas doses de metilprednisolona, em curto período de tempo depois da lesão, continuem sendo usadas no tratamento do trauma raquimedular em muitas instituições, as evidências que comprovam sua eficácia são fracas (Bracken et al., 1998; Hurlbert, 2000; Short, 2001). Há efeitos colaterais dessa terapia, com processo deletério para a regeneração neuronal pela inibição da atividade de células imunitárias (Bracken et al., 1992). Ocorrem exarcebação da necrose pós-isquêmica e inibição do brotamento de axônios (Bracken et al., 1997), além de complicações respiratórias, sepse e hemorragia gastrointestinal, que dificultam o seu uso como padrão de tratamento (Fu et al., 2005).

Investigações experimentais em animais têm sugerido como possíveis agentes terapêuticos o estrogênio (Samantaray et al., 2010a; Samantaray et al. 2010b), os agonistas do estrogênio (McDowell et al., 2011), a progesterona (O'Connor et al., 2005), a eritropoietina, o magnésio (Fu et al., 2005), os inibidores de proteases (Ray et al., 2011), os antidepressivos inibidores seletivos da recaptção da serotonina (Kao et al., 2006; Ung et al.,

2008; Gerin et al., 2010; Cristante et al., 2013) e os precursores da serotonina (Hayashi et al., 2010). Também existem estudos experimentais que buscam elucidar o possível sinergismo entre fatores farmacológicos ou não de intervenção na lesão medular (Constantini et al., 1994).

Há múltiplos mecanismos pelos quais o estrogênio pode exercer um efeito neuroprotetor: pelas suas propriedades antiinflamatórias, inclusive na ativação da microglia (Dhandapani et al., 2007), pelo aumento do aporte de oxigênio ao tecido lesado, elevando os níveis de proteínas antiapoptóticas e atenuando o influxo pós-traumático de cálcio (Sribnick et al., 2003).

Em células nervosas, foi demonstrado que o estrogênio protege contra a morte celular mediada por glutamato (Brann et al., 2007; Olsen et al., 2010) e por estresse oxidativo (Prokai et al., 2007). Ele também melhora a recuperação no trauma cerebral (Wang et al., 2006), na isquemia cerebral (Suzuki et al., 2006) e em lesões do sistema nervoso periférico (Islamov et al., 2002). São necessários, entretanto, mais trabalhos que estudem o uso do estrogênio no tratamento do trauma raquimedular (Sribnick et al., 2003; Yune et al., 2004), para a redução da lesão secundária e da gravidade das disfunções autonômicas (Webb et al., 2006; Hubscher et al., 2010).

A medula não precisa necessariamente ser totalmente reconstruída para a recuperação da qualidade de vida do paciente com lesão medular. Benefícios significativos podem ser obtidos através de pequenas reparações teciduais (Blight, 1983). O paciente pode não readquirir a capacidade de deambular, mas as melhoras do controle esfinteriano, da recuperação da

musculatura respiratória ou da função da mão representam ganhos muito importantes para estes pacientes.

1.1. Objetivo

O objetivo deste trabalho é estudar, após seis semanas, os resultados funcionais e histológicos do tratamento com estrogênio como agente neuroprotetor imediatamente após a lesão medular padronizada e reprodutível produzida pelo MASCIS Impactor ou NYU Impactor (Basso et al., 1996).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Modelos de lesão medular experimental

Allen (1911) é o primeiro pesquisador a criar um modelo experimental animal, reprodutível e quantificável, de lesão da medula espinal, através da queda de peso direto sobre a dura-máter de cães. Deste modo, consegue produzir uma lesão dinâmica da medula espinal, padronizada por meio do controle da gramatura e da altura da queda do peso, com o resultado expresso em gramas-centímetros (g.cm).

Allen (1914) testa diferentes intensidades de impacto, no modelo experimental animal, para lesão controlada da medula. Demonstra que um impacto pela queda de 240 g.cm produz lesão parcial da medula, com recuperação neurológica superior ao produzido pela queda de 400 g.cm. A redução da pressão intramedular por mielotomia melhora a recuperação clínica dos animais do estudo. O autor sugere que o aumento da pressão intramedular causado pelo edema e hemorragia agrava a necrose isquêmica após a lesão traumática inicial.

McVeigh (1923) estuda as alterações histológicas ocorridas em cães submetidos à lesão da medula espinal através de compressão digital no nível TVII-TVIII e em medulas espinais obtidas de cadáveres frescos também submetidas à compressão entre os dedos. Acredita que as lesões experimentais produzidas em cães e em medulas espinais humanas obtidas de necropsia são comparáveis às lesões medulares vistas nos homens.

Tarlov et al. (1953) realizam estudo experimental em cães, testando a perda e a recuperação das funções sensitiva e motora nesses animais. Apresentam um método de avaliação da função locomotora em animais que sofreram lesão medular experimental.

Noble e Wrathall (1985) concluem que a técnica de queda de peso de 10 gramas de diferentes alturas (2,5 cm; 5,0 cm; 7,5 cm; 10 cm e 17,5 cm) sobre a medula de ratos pode ser usada para produzir lesões leves, moderadas e graves, sendo, portanto, apropriada para modelos de estudos da lesão contusa da medula espinal nestes animais.

Noble e Wrathall (1987) descrevem um modelo de aparelho para provocar lesão experimental por contusão da medula espinal em ratos, utilizando a queda de peso. Utilizam pinças para fixar os processos espinhosos adjacentes e diminuem as variáveis que podem produzir lesões assimétricas. A energia de impacto é mais direcionada para a medula espinal, com diminuição do efeito amortecedor da caixa torácica, da coluna vertebral e dos movimentos respiratórios. O modelo torna-se um dos mais utilizados atualmente.

Basso et al. (1996) padronizam um aparelho, o New York University, Impactor (NYU Impactor) desenhado para realizar lesão medular contusa em ratos. Citam a escala BBB como sendo mais sensível que as demais até então descritas para avaliar a recuperação da função locomotora em ratos que sofreram lesão medular contusa. Demonstram que o sistema NYU permite produzir uma contusão medular graduada, consistente e reprodutível em todos os ratos. Afirmam que um exame dos efeitos terapêuticos para

índices lentos e rápidos de recuperação é mais evidente nos grupos graduados com 12,5 e 25 mm de altura da queda do peso de 10 g sobre a medula. Confirmam que a quantidade de tecido medular íntegro está diretamente relacionada com a melhor função locomotora final quando aplicada a escala BBB. Documentam aumento dos movimentos dos membros inferiores em duas semanas após lesão compressiva ou por transecção medular. Concluem que a escala BBB é aplicável, após a utilização do sistema NYU, na análise da recuperação da função locomotora em ratos com lesão medular contusa.

Rodrigues (1999) padroniza um modelo de lesão de medula espinhal em ratos Wistar e utiliza equipamento computadorizado para impacto por queda de peso de acordo com parâmetros determinados pelo Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS). Verifica a existência de correlação estatisticamente significativa entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. Conclui que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas em ratos.

Rodrigues et al. (2010) publicam a padronização de um modelo de lesão de medula espinhal em ratos Wistar. Verificam a existência de correlação estatisticamente significativa entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. Concluem o artigo demonstrando que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas em ratos.

Santos et al. (2011) padronizam o modelo de lesão e avaliação utilizado no laboratório LETRAN (Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos). Utilizam 20 ratos Wistar divididos em quatro

grupos, diferenciando o nível de gravidade da lesão raquimedular; realizando lesões intermediárias padronizadas, através do sistema do MASCIS: Grupo 1 - 12,5 mm (lesão leve); Grupo 2 - 25 mm (lesão moderada); Grupo 3 - 50 mm (lesão grave); Grupo 4 - animais que não sofrem lesão (grupo controle). Após 48 horas, é avaliada função motora, segundo escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Os autores concluem que o modelo de lesão medular utilizando o sistema MASCIS e a avaliação funcional proposta por Basso, Beattie e Bresnahan é reprodutível, podendo ser utilizada, permitindo troca de informações entre os diferentes pesquisadores.

2.2. Métodos de avaliação da lesão medular

Blight (1983) descreve um método de amostragem sistemática linear para contagem e mapeamento de axônios mielinizados em secções transversas da medula espinhal, em modelo animal com gatos.

Basso et al. (1995) estudam a lesão medular contusa em ratos fazendo uma modificação da escala locomotora desenvolvida por Tarlov et al. (1953). Os dados obtidos indicam que a escala é válida e é uma medida preditiva da recuperação motora. Ela é capaz de distinguir resultados comportamentais devidos às diferentes lesões e de prever alterações anatômicas no centro da lesão. Os testes inter-ratos indicam que examinadores com experiência na sua aplicação conseguem aplicá-la consistentemente e obter resultados similares.

Esta nova escala, chamada BBB (Basso, Beattie e Bresnahan), oferece aos avaliadores uma medida mais discriminatória dos resultados comportamentais para avaliar o tratamento depois da lesão da medula espinal.

Alisauskiene et al. (2005) propõem revisão sobre as técnicas de estimulação elétrica. O potencial evocado motor age estimulando o córtex, com captação e arquivamento dos dados nos músculos-alvo contralaterais. Sugerem que a estimulação elétrica transcraniana tem amplas aplicações na neurologia, na reabilitação neurológica e na psiquiatria.

Ferreira et al. (2005) demonstram experimentalmente a padronização da técnica para obtenção do potencial evocado motor em 50 ratos Wistar através da estimulação elétrica transcraniana. Concluem que a técnica para captação do potencial evocado motor apresentada nesse estudo é eficaz na análise da evolução eletrofisiológica da lesão medular, inédita no nosso meio, podendo ser reproduzida de modo simples, com padrões de qualidade e aplicabilidade similares aos observados na literatura científica mundial.

Tator (2006) elabora revisão da literatura, enfatizando o importante papel do potencial evocado somato-sensitivo na avaliação neurofisiológica de pacientes portadores de lesão medular. Acredita que o potencial evocado será indispensável como critério de inclusão, acompanhamento e avaliação final nas pesquisas clínicas.

2.3. Tratamento da lesão medular

Anderson et al. (1985) relatam uma série de eventos fisiopatológicos que ocorrem no tecido medular lesado, subsequentes ao trauma raquimedular agudo. Citam, como eventos secundários ao trauma: necrose hemorrágica, isquemia, edema, inflamação, perda de cálcio no espaço extracelular e perda de potássio no espaço intracelular. Lembram a importância da peroxidação lipídica, que pode lesar, direta e indiretamente, as células. Afirmam que a metilprednisolona, em estudos experimentais de lesão medular em animais, tem sido efetiva na prevenção da ocorrência dessa cascata de eventos secundários que levam à lesão medular.

Barros Filho et al. (1990) analisam 428 casos de trauma raquimedular no período de 1982 a 1987, encontrando como etiologias mais frequentes os ferimentos por arma de fogo, acidentes em água rasa e queda de objeto sobre o paciente. Verificam que apenas aproximadamente um quarto dos pacientes (28%) é atendido nas primeiras seis horas após o acidente.

Bracken e Holford (1993) publicam artigo em que apresentam os resultados observados pelo National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS). Relatam a condução de um estudo randomizado e controlado das terapias que podem melhorar a lesão medular (NASCIS) e outro (NASCIS2) que comparou o uso de altas doses de metilprednisolona ou nalaxone ao placebo. Referem que o início do tratamento dentro das primeiras oito horas representa melhora significativa da função motora com seis semanas, seis

meses e um ano após a lesão. Afirmam que a metilprednisolona, aplicada precocemente após lesão medular, melhora a função motora de pacientes diagnosticados inicialmente com lesão completa e incompleta. Concluem que esta análise respalda o uso de metilprednisolona em altas doses para o tratamento das lesões medulares no trauma raquimedular.

Bracken (2000) apresenta uma revisão sistemática dos agentes farmacológicos para o tratamento da lesão medular aguda. Conclui, nessa revisão, que altas doses de metilprednisolona são a única terapia farmacológica que mostra ter eficácia no tratamento da lesão medular aguda.

Short et al. (2000) realizam outra revisão sistemática da literatura utilizando critérios de inclusão, exclusão e validade predefinidos. Fica evidente, nessa revisão, não haver suporte para o uso de altas doses de metilprednisolona na lesão medular aguda a fim de melhorar a recuperação neurológica.

Hurlbert (2001) mostra, após revisão da literatura, que o uso rotineiro da metilprednisolona não deve ser recomendado na lesão medular aguda não penetrante. O seu uso prolongado pode ser de risco para o paciente e a metilprednisolona é considerada uma droga em investigação.

Barros Filho et al. (2002), em estudo experimental, com vinte ratos adultos submetidos a lesão hemimedular, transplantam células do sistema nervoso fetal no sítio da lesão em quinze destes ratos. Cinco animais permanecem como grupo controle sem transplante. Os ratos são sacrificados após 48 horas e submetidos a exame histológico. Os pesquisadores encontram que, em 60% dos casos, as células fetais

transplantadas permanecem viáveis e observam que a reação inflamatória é maior do que no grupo controle.

Islamov et al. (2002) demonstram que em camundongos submetidos a lesão do nervo ciático, a administração de estrógeno potencializa a regeneração das fibras nervosas e a área média do axônio.

Sribnick et al. (2003) revisam o papel do estrógeno como substância neuroprotetora. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram as propriedades anti-inflamatórias do estrógeno. Seus efeitos incluem: aumento do fluxo sanguíneo ao tecido lesado, ativação de proteínas anti-apoptóticas e atenuação do influxo pós-traumático de cálcio nas células lesionadas.

Yune et al. (2004) utilizam ratos submetidos à lesão medular experimental para demonstrar os efeitos benéficos do 17-beta-estradiol (E2). A substância melhora os valores da escala motora “BBB” e diminui o tamanho da lesão histológica nos indivíduos tratados.

Sribnick et al. (2005) conduzem experimento em modelo animal de ratos divididos em três grupos: os submetidos apenas a laminectomia torácica; os que sofrem laminectomia associada a administração de 17-beta estradiol na dose de 4 mg/kg; e o terceiro, com laminectomia associada a administração de dimetil-sulfóxido (veículo). Os ratos que receberam estrógeno apresentam redução do edema, da inflamação e da perda de mielina nas áreas de penumbra, vistas à microscopia, sugerindo seu potencial com agente neuroprotetor.

Marcon (2006) estuda os possíveis efeitos benéficos da utilização da metilprednisolona utilizada previamente ao trauma raquimedular, como

forma de prevenir prováveis lesões associadas a algumas intervenções cirúrgicas. Não observa nenhum efeito benéfico da utilização prévia ao trauma e descreve possíveis complicações associadas ao uso da droga.

Suzuki et al. (2006) revisam a literatura encontrando evidências de que o estrógeno tem papel neurotrófico e neuroprotetor em diversos modelos *in vivo* e *in vitro*.

Wang et al. (2006) buscam embasamento na literatura para o emprego de possíveis agentes neuroprotetores na lesão cerebral. Entre as substâncias com importante potencial benéfico, destaca-se o estrógeno.

Webb et al. (2006) demonstram que o 17-beta-estradiol diminui a disreflexia autonômica em camundongos submetidos a lesão medular. O estrógeno diminui as respostas à estimulação visceral, o grau de inflamação crônica tecidual e a quantidade de proteínas inflamatórias.

Brann et al. (2007) discutem o papel do estrógeno e de seus receptores seletivos como agentes neuroprotetores nos casos de isquemia cerebral e lesão de células neurais. Através de revisão da literatura, os autores expõem os mecanismos potenciais através dos quais a ação neuroprotetora ocorreria.

Dhandapani et al. (2007) revisam o papel do estrógeno como possível ativador de astrócitos e na neuroproteção desencadeada através de vias de ativação celular.

Prokai et al. (2007) destacam o papel neuroprotetor do estrógeno e de seus compostos através de suas propriedades antioxidativas, principalmente pela inibição da peroxidação lipídica. Mecanismos não genômicos

(extranucleares) de proteção às células neuronais são encontrados em grande quantidade de trabalhos científicos na literatura.

Ritz et al. (2008) demonstram, em ratos machos submetidos a lesão medular experimental, que a administração de 17-beta estradiol na dose de 4 mg/kg intraperitonealmente, imediatamente após a lesão, pode apresentar efeitos neuroprotetores. Os resultados experimentais sugerem que o estrógeno protege a medula espinhal através da liberação precoce de citocinas e respostas celulares astrogliais. Houve melhora significativa da função motora do grupo tratado quando comparado com o grupo controle e esse achado manteve-se mesmo após quatro semanas da lesão inicial.

Cristante et al. (2009a) mostram, em estudo experimental de lesão medular em ratos Wistar, possíveis efeitos benéficos da utilização da combinação das vitaminas C e E nas análises anatomopatológicas, por provável efeito antioxidante e menor resposta inflamatória, apesar de esta diferença não se traduzir em uma melhora funcional.

Cristante et al. (2009b) avaliam o efeito da infusão de células-tronco indiferenciadas autógenas no sítio de lesão, em pacientes com lesão medular crônica (mais de dois anos). Através de avaliação com potencial evocado somato-sensitivo, observam que 66,7% dos pacientes apresentam melhora em dois anos e meio de acompanhamento.

Hubscher et al. (2010) estudam, em modelo animal com ratos, o papel do 17 beta-estradiol como agente potencial para modulação e prevenção da dor segmentar após a lesão medular. Ratas com produção normal de

estrógeno e ratos após receberem estrógeno demonstraram diminuição da sensibilidade à dor após a lesão medular.

Marcon et al. (2010a) demonstram, em ratos submetidos a lesão medular experimental, que existe papel sinérgico da associação do tratamento do gangliosídeo GM1 com a terapia com oxigênio em câmara hiperbárica. O grupo que recebeu o tratamento combinado mostrou melhor recuperação da função motora em relação aos outros grupos.

Olsen et al. (2010) realizam estudo experimental com ratos submetidos a lesão medular e demonstram que a administração de doses fisiológicas de estrógeno causa benefícios neuroprotetores. Essa ação se dá pelo aumento da expressão de canais de potássio (Kir4.1) e transportadores de glutamato (que removem o excesso da substância) nas células da glia, como os astrócitos.

Samantaray et al. (2010a) submetem ratos adultos à laminectomia de T10 e os dividem em dois grupos. Um grupo é submetido ao procedimento sem lesão medular e o outro grupo é submetido à lesão medular e posteriormente recebe, durante 48 horas, estrógeno em infusão contínua subcutânea. O estrógeno diminui significativamente o número de neurônios marcados com lesão do tipo TUNEL (*deoxyuridine triphosphate biotin nick end labeling*, um marcador de morte celular) nas amostras caudais do tecido medular lesado.

Samantaray et al. (2010b) apresentam diversos estudos demonstrando que o estrógeno é um agente potencialmente ideal no tratamento farmacológico da lesão medular. Seus efeitos são em diferentes receptores distribuídos no sistema reprodutor feminino, mas também em ambos os

sexos nos sistemas nervoso, cardíaco e imunológico. O estrógeno demonstra efeitos anti-inflamatórios, de angiogênese, antioxidativo, antiapoptótico e protetor contra dano isquêmico ao tecido nervoso. A substância tem a vantagem de ser um hormônio natural endógeno.

Sribnick et al. (2010) avaliam os efeitos do estrógeno administrado na dose de 4 mg/kg em ratos machos, 15 minutos e 24 horas após a lesão medular experimental. O tratamento com estrógeno reduziu a atividade da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), bloqueou a translocação do fator kappaB nuclear, preveniu a reatividade glial, atenuou a morte neural, inibiu a ativação e atividade da calpaína e caspase-3, diminuiu o dano axonal, reduziu a perda de mielina na área de lesão primária e na área de penumbra e melhorou a função motora quando se comparou este grupo com os animais não tratados.

Ray et al. (2011) discutem o papel do estrógeno como agente neuroprotetor, inclusive produzindo vários fatores de sobrevivência celular. Ele causa inibição da inflamação e ativação de diferentes proteases de cisteína em modelos animais. As atividades de neuroproteção são múltiplas dentro da cascata de eventos da lesão secundária.

McDowell et al. (2011) demonstram o efeito neuroprotetor da genisteína (GEN), um agonista beta estrogênico, em cultura de motoneurônios (VSC4.1) de ratos estimulada a produzir citocinas pró-inflamatórias. O efeito protetor se dá em virtude da redução do influxo de cálcio, inibição de fatores apoptóticos, redução da resposta inflamatória e manutenção da integridade mitocondrial.

Fouad et al. (2011) revisam a literatura, enfatizando a ausência de métodos terapêuticos eficientes para o tratamento dos pacientes portadores de lesão medular.

Rong et al. (2012) realizam experimento em modelo animal com ratos submetidos à lesão medular controlada, divididos em três grupos: controle; com administração prévia de 17-beta estradiol (E2); e tratados sem qualquer droga ativa. Após o sacrifício dos animais, os pesquisadores mantiveram culturas *in vitro* de células neurais. O pré-tratamento com E2 manteve significativamente a viabilidade das células neurais, atenuou a apoptose e inibiu a fosforilação induzida por glutamato. Os resultados sugerem que o papel neuroprotetor do E2 é parcialmente mediado pela inibição da fosforilação da JNK (quinase c-Jun N-terminal).

Cristante et al. (2013) mostram, em modelo animal experimental, com ratos submetidos à lesão medular controlada, que a administração de antidepressivo associado a treinamento motor na esteira leva à melhora do desempenho motor (escala BBB) e melhora os padrões de latência e amplitude dos potenciais evocados motores obtidos. A associação das duas modalidades de tratamento apresenta resultados superiores aos obtidos com os tratamentos isoladamente, e por sua vez superiores aos encontrados no grupo controle (sem qualquer tratamento).

3. MÉTODOS

3.1. Ética

Este protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – HC-FMUSP).

3.2. Animais de experimentação

Foram avaliados 20 ratos Wistar machos, com peso variando de 300 a 420 g, com 20 a 21 semanas de vida, oriundos do Centro de Bioterismo da FMUSP. No momento da recepção, todos os ratos foram avaliados quanto ao estado geral (pelagem e estado clínico normais) e à motricidade (motricidade normal), condições para inclusão no estudo.

Foram acondicionados até cinco ratos de uma mesma ninhada por gaiola (40 x 60 cm). Mantiveram-se as gaiolas em ambiente climatizado, em condições de higiene, alimentação e hidratação adequadas no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP.

Foi realizado o manuseio contínuo dos animais antes da lesão para acostumá-los aos experimentadores e para estimulá-los a movimentarem-se

(condicionamento), facilitando a avaliação da capacidade motora após a lesão experimental.

Foi estabelecido que seriam excluídos os casos de:

- Óbito após lesão medular experimental;
- Anomalias na área lesada da medula observadas macroscopicamente;
- Autofagia ou mutilação entre os animais;
- Movimentação normal na primeira avaliação após lesão (21 pontos na escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) de avaliação funcional).

Todas as complicações foram registradas para posterior análise estatística.

3.3. Formação dos grupos experimentais

Os ratos foram separados aleatoriamente (por sorteio simples) e formaram dois grupos de 10 animais cada, todos submetidos à lesão medular experimental com o equipamento computadorizado, conforme descrito adiante:

- Grupo Estradiol – ratos submetidos à lesão medular e a terapia com estrogênio, sob anestesia;

- Grupo Controle – ratos submetidos apenas à lesão medular e que não foram tratados, grupo controle.

3.4. Modelo experimental de lesão medular

3.4.1. Protocolo de anestesia

Os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de xilazina e 50 mg/kg de quetamina por via intraperitoneal (Tranquilli et al. 2007), e para anestesia local foi utilizado o cloridrato de lidocaína com epinefrina (adrenalina). Os reflexos palpebral e pupilar foram monitorizados para manter o animal em plano anestésico; quando necessário, foi realizada a administração de um terço da dose inicial como reforço anestésico. O plano anestésico profundo foi, ainda, confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda e patas traseiras (Nessler et al., 2006; Santos et al., 2011).

3.4.2. Laminectomia

A exposição da medula para contusão controlada foi realizada com o auxílio de um microscópio cirúrgico. Após tricotomia, realizou-se uma incisão na linha média dorsal para expor os arcos posteriores da coluna vertebral, de TVIII a TXII. Descolaram-se os músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas de TIX a TXI. A hemostasia, quando necessária, foi realizada com um coagulador bipolar. Removeram-se, com um micro saca-bocados, o processo espinhoso e a lâmina da vértebra TX e a metade distal do processo espinhoso da TIX até expor a medula e permitir o posicionamento da ponta da haste (punção) do MASCIS Impactor ou NYU Impactor (New York University, 1993).

Respeitaram-se todos os demais cuidados relacionados por Rodrigues et al., (2010) e padronizados por Santos et al., (2011) (Figura 1).

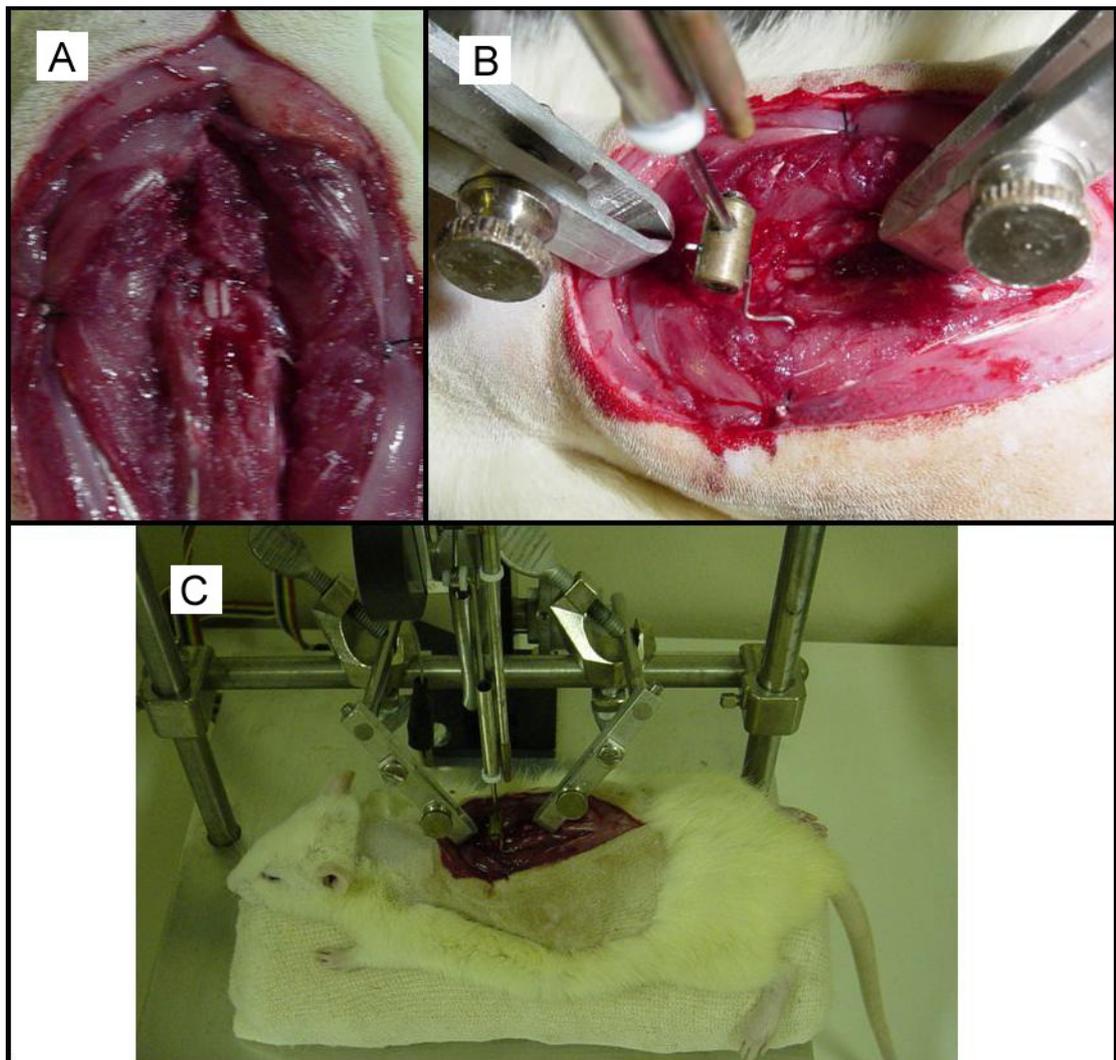


Figura 1. Procedimentos para a realização da lesão medular através de equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso NYU Impactor. A – detalhe da laminectomia, com exposição da medula espinal; B – detalhe das garras de fixação nos processos espinhosos e C – vista geral do posicionamento do animal no dispositivo de impacto.

3.4.3. Contusão medular pelo NYU Impactor

Adotou-se, neste estudo, o modelo experimental de lesão medular do MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study), padronizado para ratos Wistar (Rodrigues, 1999). Decidiu-se pela produção de lesões moderadas através do equipamento computadorizado para impacto por queda de peso MASCIS Impactor ou NYU Impactor descrito na Figura 2, disposta adiante.

O NYU Impactor, equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso monitorada, compõe-se de:

- Dispositivo de impacto (haste de 10 g, disposta à altura de 12,5 mm, predeterminada para contusão moderada, tubo-guia e sistema de monitoração de posição, velocidade de queda, instante de contato, período de contato, deformação da coluna e deformação absoluta e relativa da medula);
- Dispositivos de interface (instrumentação);
- Microcomputador IBM-PC compatível;
- Vídeo monitor VGA;
- Placa de interface com saída paralela e temporizador.

O equipamento foi construído de maneira a produzir um impacto direto de alto rendimento, reduzir atritos e a resistência do ar e a permitir uma contusão reproduzível. O impacto experimental consistiu na queda de uma haste de impacto de 10 g de peso de uma altura predeterminada de

12,5 mm entre a ponta da haste (punção) e a superfície da medula espinal em queda livre, através de um tubo-guia, monitorado por computador (velocidade da haste, deformação absoluta e relativa da medula, instante de contato efetivo e tempo de contato), de maneira a reduzir os fatores de imprecisão. A contusão medular moderada foi produzida pelo NYU Impactor seguindo os procedimentos, cuidados, regulagens, controles, monitoração, limpeza e esterilização da haste constantes em seu manual e os recomendados por Constantini e Young (1994) e Rodrigues et al. (2010).

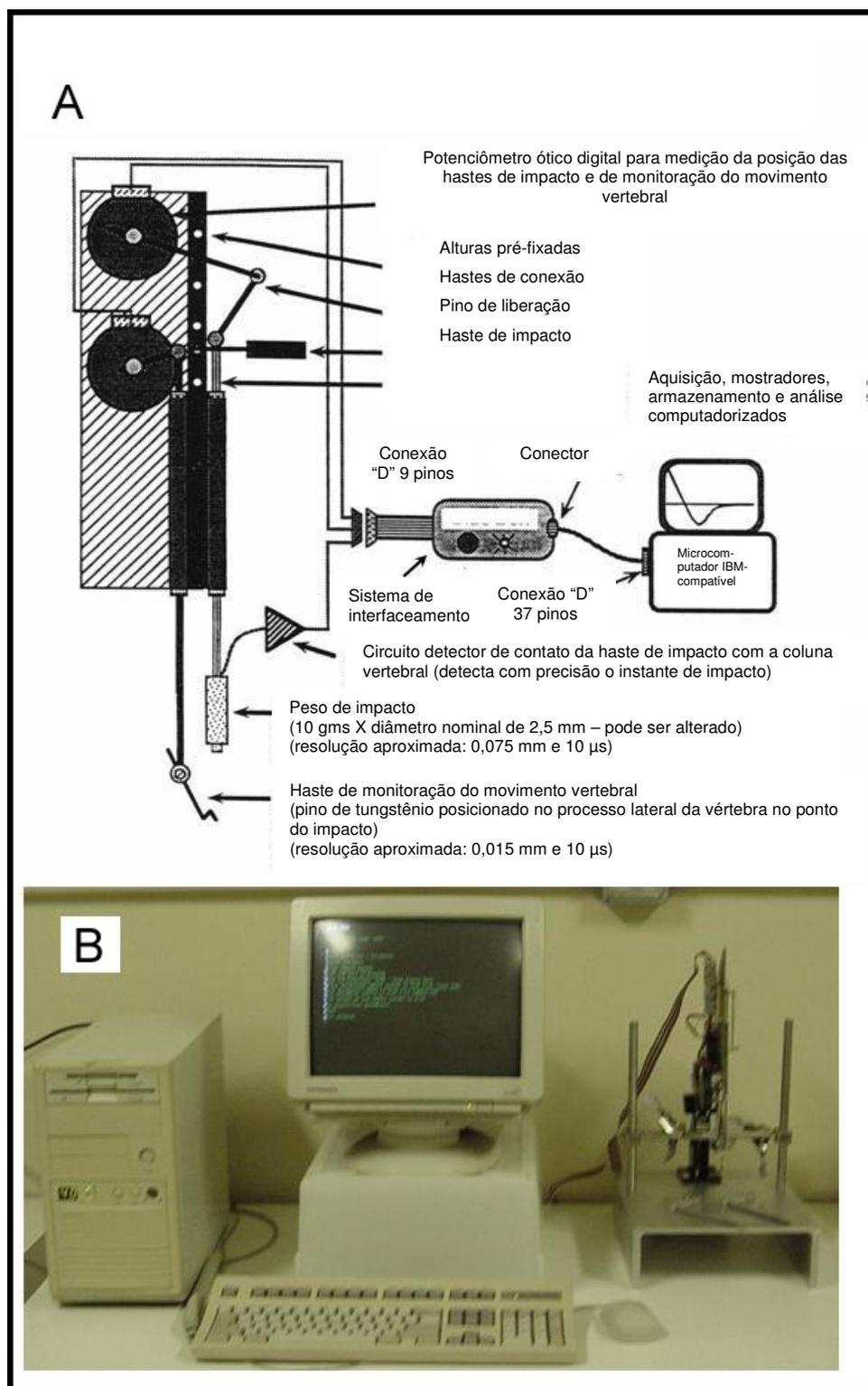


Figura 2. Equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso NYU Impactor. Acima diagrama esquemático sem escala A e abaixo vista geral do dispositivo de impacto B (Marcon et al., 2010b).

Os ratos foram posicionados no NYU Impactor de maneira a permitir o contato pleno da ponta da haste (punção) com a superfície exposta da medula (folga de 0,2 mm de cada lado), na altura de TX. Duas garras reguláveis, para a fixação da coluna vertebral, foram ajustadas presas aos processos espinhosos das vértebras TVIII e TXI, respectivamente. As garras diminuíram as deformações do corpo do rato (baixa rigidez) e, conseqüentemente, o movimento da coluna, quando ocorre a queda do peso, reduzindo-se os fatores de erro. Assim, produziram-se lesões homogêneas e reproduzíveis.

3.5. Procedimento após lesão

Após a limpeza da cicatriz cirúrgica, foi aplicada uma camada da pomada Fibrase (associação de fibrinolisinase, desoxirribonuclease, cloranfenicol). Os animais foram submetidos a antibioticoprofilaxia para prevenir e/ou reduzir a infecção na ferida cirúrgica e nas vias urinárias. Administrou-se intraperitonealmente, cefazolina sódica (antibiótico), com dose de 5 mg/kg, imediatamente após a lesão e uma vez ao dia durante os três dias seguintes. Caso a infecção persistisse, o uso do antibiótico era prolongado. Ração e água foram oferecidos logo que o animal ficou totalmente acordado.

Após a cirurgia, foram ministrados aos ratos 2 mg/kg de meloxicam (anti-inflamatório não hormonal) 1 vez ao dia, por 7 dias, e 5 mg/100 gramas de cloridrato de tramadol (opioide) por via intramuscular, por 5 dias, para alívio da dor. Esses medicamentos também foram administrados aos animais do grupo controle, pelo mesmo período de tempo, para que não houvesse viés nas avaliações comportamentais.

Após a lesão medular, os animais perderam o reflexo de urinar, tendo sido necessário realizar o esvaziamento da bexiga. Este procedimento era realizado por meio de uma manobra manual na região vesical, em uma frequência de acordo com as necessidades individuais de cada animal, sendo realizado no mínimo duas vezes por dia durante os três primeiros dias pós-operatórios. O esvaziamento era realizado até que o animal recuperasse a função de urinar espontaneamente.

Os ratos retornaram às mesmas gaiolas de origem (40 x 60 cm), sendo mantidos nos mesmos grupos de até cinco animais, nas mesmas condições ambientais (manejo, alimentação *ad libitum*, troca periódica da maravalha e limpeza da gaiola) até o final do experimento (por 42 dias), quando foram submetidos a eutanásia.

Durante o período de avaliação pela escala BBB, os ratos foram observados quanto a mutilações, infecções ou outras alterações (critérios de exclusão e complicações).

3.6. Tratamento medicamentoso com estrógeno

Foi utilizado como tratamento medicamentoso o hormônio 17-beta estradiol, na dose de 4 mg/kg intraperitonealmente, imediatamente após a lesão medular (ao final da sutura da pele) seguindo a metodologia de Sribnick et al. (2005), Ritz et al. (2008) e Sribnick et al. (2010). Estradiol foi administrado ao grupo de estudo enquanto os animais ainda estavam sob efeito da anestesia e sedação.

3.7. Protocolo de avaliação da capacidade locomotora pela escala BBB

A recuperação da capacidade locomotora após lesão medular foi medida pela escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) de avaliação funcional (Basso et al., 1995). A BBB (Basso et al., 1995, 1996) é a principal escala utilizada para quantificar a recuperação motora em ratos com lesão medular em estudos realizados pelo MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study) (Basso et al., 1995) e foi adotada pelas instituições que integram o MASCIS e pelo LETRAN. O uso dessa escala foi padronizado em nosso laboratório por Santos et al. em 2011. Trata-se de uma escala de avaliação da recuperação locomotora em ratos com lesão medular nos níveis torácicos, baseada em critérios observacionais da movimentação do animal durante a marcha, e que

atribui uma pontuação de 0 a 21 para graduar a gravidade de lesão neurológica. A escala BBB de avaliação funcional baseia-se em critérios observacionais específicos, definições simples e não ambíguas dos termos e permite uma rápida e precisa descrição do desempenho locomotor.

Todos os ratos dos grupos foram avaliados pela escala BBB no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o dias após a lesão medular.

A avaliação consistiu em colocar o rato no centro de uma caixa de observação de 80 x 80 cm e borda com 17 cm de altura, forrada com um campo cirúrgico azul escuro para maior contraste com a pelagem clara dos ratos durante o período de observação (Figura 3).

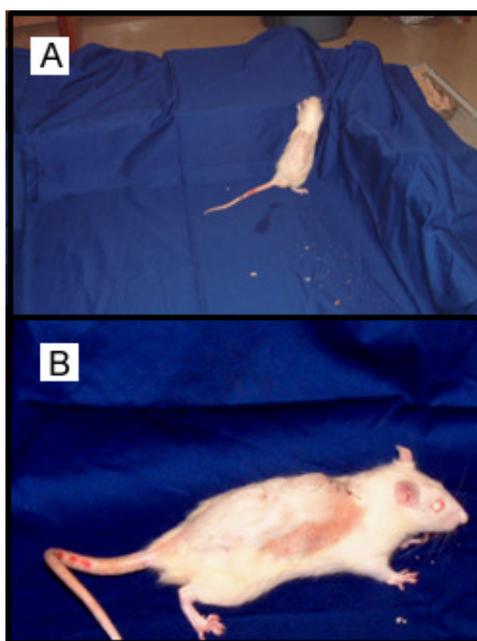


Figura 3. Determinação da capacidade locomotora após lesão pela escala BBB de avaliação funcional (Basso et al. 1995). A – rato posicionado na caixa forrada com campo azul para facilitar observação e B – rato em vista lateral, avaliação da movimentação do quadril, joelho e tornozelo da pata posterior direita e posição da cauda (Marcon et al., 2010b).

Avaliou-se a capacidade locomotora do rato. As observações sobre o movimento das articulações da pata posterior (quadril, joelho e tornozelo) de cada lado, a posição do tronco, do abdome, o deslocamento da pata (fase de balanço da marcha) e o modo de contato da pata com o solo, a coordenação, os dedos, o contato e a liberação da pata com o solo, a instabilidade do tronco e a posição relativa da cauda, em relação ao lado direito e esquerdo, foram anotados em formulário próprio. O formulário, formatado para uso nesta pesquisa, permitiu o registro da identidade, do número de dias após a lesão medular e dos comentários (Anexo 1), e facilitou a descrição do movimento e a definição da pontuação.

A avaliação de cada rato foi realizada por dois observadores simultaneamente, adequadamente treinados, sem conhecimento do grupo de origem do rato e cegos também quanto às avaliações dos colegas, de maneira a não interferir nos resultados um do outro. Caso houvesse discordância entre as avaliações, decidiu-se pela anotação da menor nota.

Caso o rato, posicionado no centro da caixa, permanecesse imóvel por 15 a 20 segundos, era estimulado a movimentar-se por meio de toques com um lápis. A avaliação da capacidade locomotora do rato durou entre quatro a cinco minutos, durante os quais foram anotadas as características do movimento executado, no respectivo formulário.

Apresentamos, nos Anexos, o modelo traduzido do formulário BBB original e as pontuações possíveis com as respectivas definições operacionais das categorias e atributos da escala BBB de avaliação funcional (Anexo 1 e 2).

3.8. Análise por potencial evocado motor

No 42^o dia pós-lesão, os ratos foram submetidos novamente ao procedimento anestésico com 10 mg/kg de xilazina e 50 mg/kg de quetamina por via intraperitoneal para realização do exame de potencial evocado motor, para registrar os valores de amplitude e latência de resposta nas patas após estímulo elétrico transcraniano (Ferreira et al., 2005; Souza et al., 2011).

A captação das respostas musculares foi realizada como seguinte método: pares de eletrodos de agulha monopolar (captador e referência), com distância inter-eletrodos definida e fixa, são inseridos na musculatura proximal e anterior dos membros dianteiros e traseiros à direita e à esquerda. O eletrodo terra é colocado na região lombar através de um eletrodo de agulha monopolar. A estimulação elétrica transcraniana é realizada com a colocação de dois eletrodos de agulha tipo saca-rolhas, na cabeça dos ratos, na região frontal (anodo) e occipital (catodo) na linha inter-hemisférica, para estimulação bilateral simultânea (Figura 4). Após a colocação dos eletrodos no rato, inicia-se o equipamento e verifica-se a impedância dos eletrodos, para comprovar a boa adaptabilidade deles, a fim de obter respostas mais nítidas, seguras e fidedignas. A calibração do aparelho é feita em dois aspectos da captação das respostas musculares: varredura, janela de 20 ms; sensibilidade, 2 mV/div.; filtro de baixa frequência, 10 Hz, e filtro de alta frequência, 10 kHz, e a estimulação elétrica transcraniana é realizada através de estímulo único de 0,2 ms de duração.

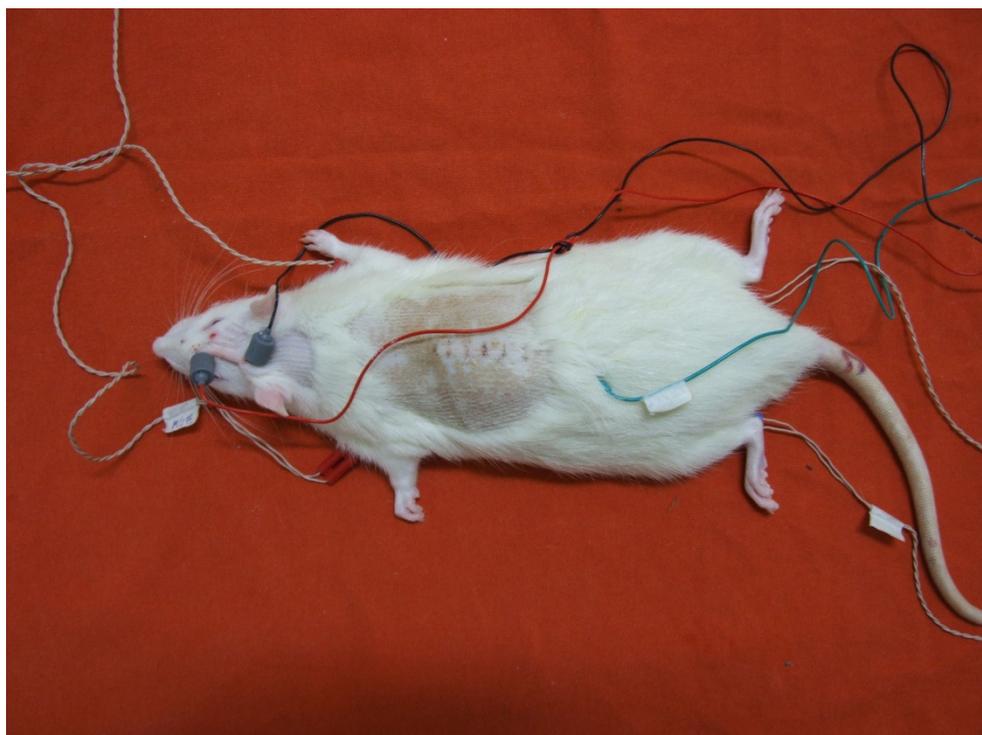


Figura 4. Posicionamento dos eletrodos para exame de potencial evocado

3.9. Eutanásia

Ao final do período de experimentação (após 42 dias), todos os ratos foram submetidos a eutanásia conforme legislação em vigor e seguindo os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991).

Todos os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca no 42^o dia pós-lesão. Antes do procedimento, os animais foram colocados em uma câmara com halotano (5%) para promover uma leve sedação, seguida de dose letal de quetamina e xilazina, intraperitoneal. Além disso, foi administrada dose de 0,05 ml de heparina sódica (100 UI/ml, pH 6,18) intraperitoneal, para

prevenir a formação de coágulos. Apenas após a observação de anestesia profunda, por meio de fortes pinçadas na cauda, patas e esterno, sem que se observasse qualquer reação do animal, a perfusão foi iniciada. Em casos de demonstração de qualquer sensibilidade, foram aguardados aproximadamente cinco minutos e, caso a resposta persistisse, dose adicional de anestésico era aplicada e o procedimento, repetido.

O tórax foi aberto com tesoura de pontas arredondadas e uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo. Com uma tesoura pontiaguda, realizou-se leve corte no átrio direito e o animal foi então perfundido com solução tampão fosfato 0,2 M a 36 °C em pH 7,4 (necessária para remover o sangue, preservando ao máximo a estrutura dos vasos sanguíneos), seguido de solução de paraformaldeído (PFA) tamponado a 4%, em pH 7,4, 100 ml/100 g, (necessário para fixação das estruturas a serem coletadas).

Após finalização da perfusão do animal, um segmento de 2,5 cm da medula espinhal (incluindo o foco de lesão) foi cuidadosamente extraído e colocado em PFA tamponado a 4% e solução tampão a 0,1 M, por 24 horas e, em seguida, em sacarose a 20%. A medula foi mantida na sacarose até serem realizados os cortes histológicos.

Os animais foram submetidos à morte indolor induzida com tiopental, 65 mg/100 g, e cloreto de potássio por via endovenosa.

3.10. Exame necroscópico e anatomopatológico

O exame necroscópico dos ratos foi iniciado de modo a permitir a identificação macroscópica de possíveis alterações em relação ao padrão normal. Na inspeção externa, observou-se a presença de possíveis lesões associadas à autofagia ou mutilação.

A inspeção interna foi iniciada com a retirada da coluna vertebral, realizando-se nova incisão dorsal extensa. Após a exposição da coluna, cortou-se, com uma tesoura, um segmento desde TVIII até TXII. Com um micro saca-bocados, retiraram-se cuidadosamente todas as estruturas ósseas e de partes moles adjacentes à medula até expô-la completamente. Realizou-se avaliação visual macroscópica da medula no local da contusão para se verificar qualquer anomalia (critério de exclusão).

Realizou-se incisão ventral, com toracotomia e laparotomia associadas. Os pulmões foram inspecionados para a identificação de possíveis alterações, como a presença de empiema ou condensação. No abdômen, focalizou-se a inspeção da bexiga, para a identificação de bexiga neurogênica flácida (com aumento importante do volume) ou de alterações sugestivas de infecção (hiperemia e hematúria). Os dados assim coletados foram listados para posterior análise estatística de complicações associadas.

O material da medula seccionada recebido para análise histológica foi previamente fixo linearmente em papel cartão com suas respectivas identificações topográficas. Principalmente onde se observavam os achados

macroscópicos de contusão medular, esta era identificada como área “B”, sendo então também designadas as áreas craniais à lesão, como “A”, e as áreas caudais à lesão, como “C”. Depois de identificadas e acondicionadas, as medulas foram fixas em formalina a 10%.

Cada área previamente identificada como “A”, “B” e “C” foi seccionada no plano axial em intervalos de dois milímetros, partindo da área central da lesão. Todos os fragmentos foram submetidos aos processos histológicos que compreendem a desidratação em banhos de álcool, diafanização em xilol e a impregnação por parafina líquida. Cada fragmento foi bloqueado em parafina e posteriormente identificado com a topografia do respectivo material.

Os blocos parafinados foram encaminhados para o processo de microtomia (cortes histológicos), no qual se obtêm cortes com cinco micra de espessura, utilizando-se um micrótomo (Leica RM 2055 – elétrico) e lâminas descartáveis.

As lâminas de vidro utilizadas no processo receberam previamente um banho de silane, para se obter um melhor resultado na aderência dos materiais à sua superfície.

3.10.1. Microscopia

As avaliações em microscopia foram realizadas por um único patologista, experiente e vinculado ao LETRAN, cego quanto à alocação dos animais nos grupos.

Segmentos da medula já identificados (“A”, “B” e “C”) e cortados transversalmente foram submetidos à análise por duas técnicas de avaliação histológicas diferentes.

- **Análise qualitativa:**

Cortes transversais da medula no epicentro da lesão e regiões próximas (segmentos “B”) foram corados com hematoxilina e eosina e foram avaliados com relação às seguintes variáveis: necrose, hemorragia, hiperemia, infiltrado celular e degeneração de substância nervosa. Essas variáveis foram avaliadas de acordo com um escore no qual a pontuação zero indica ausência; 1, presença discreta; 2, moderada e 3, intensa da variável analisada.

- **Análise quantitativa:**

As porções medulares, seccionadas, proximais (“A”) e distais (“C”) ao centro da lesão medular foram fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% e coradas com azul de toluidina a 1%. Essas áreas medulares foram avaliadas da seguinte forma: dois campos de cada segmento, escolhidos ao acaso pelo patologista, com boa representação das células, foram fotografados com objetiva de 40 vezes de magnificação. As fotos foram

analisadas no software Sigma Scan Pro5.0 para a contagem das fibras dos axônios regenerados (Figura 5). Somente os neurônios com diâmetro igual ou maior do que 15 μm foram considerados para contagem (Chopek e Gardiner, 2010) (Figuras 6 e 7). O número de axônios regenerados no segmento distal e o número dos axônios proximais foram aplicados à seguinte fórmula (Bertelli et al, 2004; Grossman, 2001a, 2001b):

$$\text{IR} = (\text{número de axônios no segmento distal/número de axônios no segmento proximal}) \times 100.$$

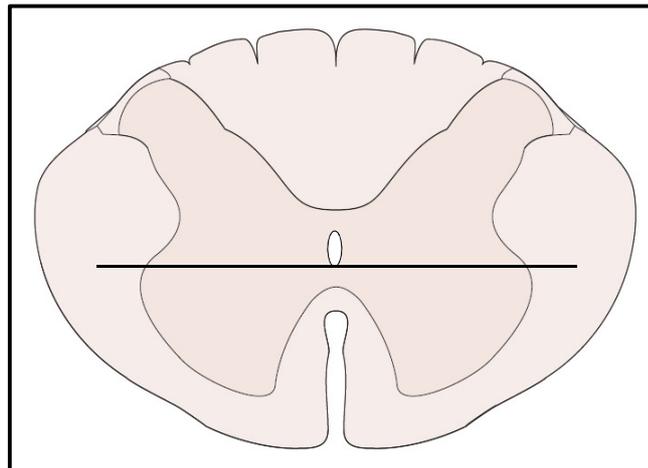


Figura 5. Desenho esquemático da medula espinhal com a área do corno ventral delimitada por uma linha transversal logo abaixo do canal central, segundo Grossman et al. (2001a, 2001b). Essa área foi selecionada para a contagem dos neurônios.

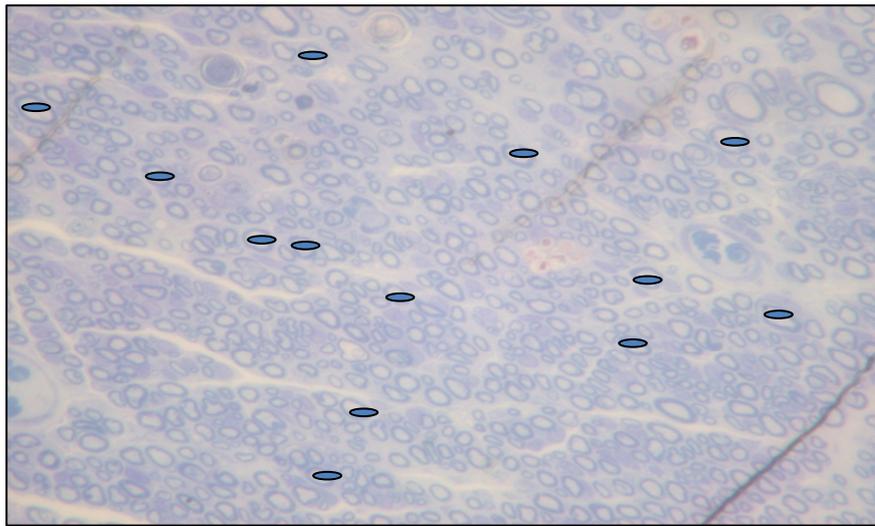


Figura 6. Imagem ilustrativa da contagem de fibras na microscopia (coloração: azul de toluidina; aumento: 40 vezes).

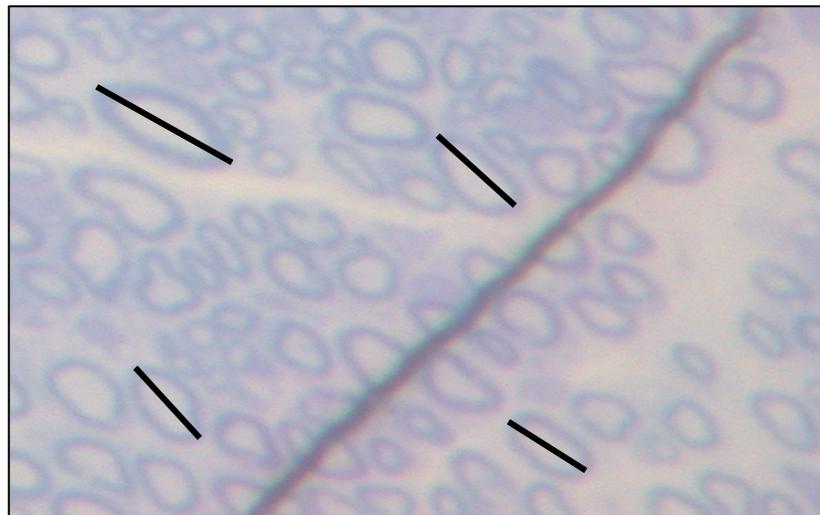


Figura 7. Imagem ilustrativa da medição do diâmetro das fibras na microscopia (coloração: azul de toluidina; aumento: 40 vezes).

3.11. Análise estatística

A formatação dos bancos de dados e a análise estatística foram realizadas através do *software* estatístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 19.0 para Windows.

O desfecho primário foi o índice BBB na avaliação do 42^o dia. Os desfechos histológicos e de potencial evocado também passaram por análise estatística como desfechos secundários, sendo que a análise histológica com colocação por hematoxilina e eosina foi considerada medida subjetiva, e a contagem de neurônios, objetiva.

A estatística descritiva foi apresentada pela média e pelo desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Nos casos em que houve comportamento normal de sua distribuição de frequência, o teste t de Student, teste paramétrico, e a análise de variância (ANOVA) foram utilizados. O número de fatores foi readequado para cada situação da análise. Utilizamos o teste t para todas as variáveis, exceto para a contagem de axônios, na qual utilizamos o teste de qui-quadrado.

Partimos da hipótese de nulidade, considerando a probabilidade do erro do tipo I de 5%.

3.11.1. Análise estatística da avaliação funcional

Inicialmente foi realizado um teste t para avaliar se as notas aplicadas às patas pertencentes a um mesmo rato eram equivalentes. A nota de cada indivíduo foi incluída como àquela correspondente à média aritmética de suas patas.

Os valores médios dos escores BBB foram comparados utilizando-se um modelo de efeitos mistos com dois fatores: grupo (estradiol, controle) e semana de avaliação (primeira, segunda, terceira, quarta, quinta e sexta), considerando medidas repetidas ao longo das semanas. A existência de um possível efeito de interação entre esses fatores também foi avaliada. Em seguida, foi utilizado o teste t para comparar as médias e os desvios-padrão das notas nos diferentes grupos.

3.11.2. Análise estatística do potencial evocado

Inicialmente, foi realizado um teste t para avaliar se os valores de amplitude e de latência obtidos para as patas pertencentes a um mesmo rato eram equivalentes. Esse teste evidenciou que as patas de cada rato apresentaram valores de amplitude e latência de respostas equivalentes e, a

partir dessa constatação, incluímos cada um dos membros traseiros como um indivíduo nos demais cálculos estatísticos.

As distribuições das medidas da amplitude e da latência nos dois grupos de estudo foram comparadas utilizando-se o teste t, teste paramétrico, através das médias e dos desvios-padrão dos valores.

3.11.3. Análise estatística da avaliação histológica

Os dois grupos do estudo foram comparados com relação à média e desvio-padrão dos valores. Para análise estatística dos dados obtidos com a avaliação histológica qualitativa, foi utilizado o teste não paramétrico chi-quadrado; para a avaliação histológica quantitativa, foi empregado o teste paramétrico, teste t.

4. RESULTADOS

Não houve perda de ratos nos grupos, de modo que os 10 ratos de cada grupo sobreviveram até a aplicação da escala BBB no 42^o dia de observação, até a realização do exame de potencial evocado motor e tiveram suas medulas extraídas para exame anatomopatológico e histológico.

4.1. Análise dos dados obtidos pela escala funcional BBB

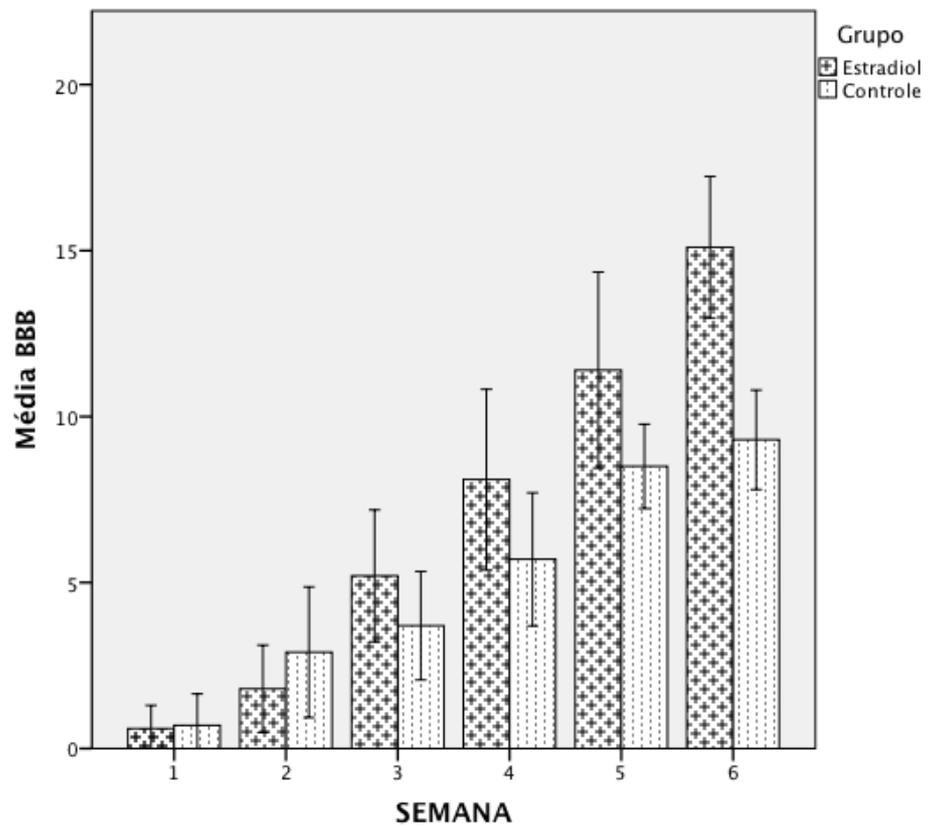
A Tabela 1 apresenta medidas descritivas do escore BBB para cada grupo de estudo e semana de avaliação.

Tabela 1. Estatística descritiva com a média e desvio padrão das notas de BBB de cada um dos grupos, em cada semana de observação, e o correspondente valor do p (significância estatística)

	Grupo	Amostra (N)	Média	Desvio padrão	p
Semana 1	Estradiol	10	0,6	0,699	0,791
	Controle	10	0,7	0,949	
Semana 2	Estradiol	10	1,8	1,317	0,159
	Controle	10	2,9	1,969	
Semana 3	Estradiol	10	5,2	1,989	0,082
	Controle	10	3,7	1,636	
Semana 4	Estradiol	10	8,1	2,726	0,038
	Controle	10	5,7	2,003	
Semana 5	Estradiol	10	11,4	2,951	0,014
	Controle	10	8,5	1,269	
Semana 6	Estradiol	10	15,1	2,132	0,000
	Controle	10	9,3	1,494	

Os dados acima revelam que o grupo de ratos que recebeu a administração de 17-beta estradiol apresentou notas na escala BBB significativamente maiores que os ratos do grupo controle, nas observações realizadas nos 28^o, 35^o e 42^o dias. O Gráfico 1 ilustra a evolução das notas dos dois grupos ao longo do tempo.

Gráfico 1. Evolução das médias das notas do BBB de cada um dos grupos em cada semana de observação.



4.2. Análise dos dados obtidos através do potencial evocado

A Tabela 2 apresenta medidas descritivas para os dados das variáveis amplitude e latência, segundo os grupos de estudo.

Tabela 2. Estatística descritiva com a média e desvio padrão dos valores de amplitude (AMP) de resposta e latência (LAT) de resposta durante avaliação por potencial evocado no membro inferior e o correspondente valor do p (significância estatística)

	Grupo	Amostra (N)	Média	Desvio padrão	p
LAT	Estradiol	20	3,68	0,80	0,000
	Controle	20	53,06	48,16	
AMP	Estradiol	20	14,34	16,90	0,007
	Controle	20	2,91	0,95	

O grupo de ratos controle apresentou valores de amplitude significativamente menores e valores de latência significativamente maiores que os valores do grupo Estradiol; ou seja, para análise do potencial evocado, o grupo controle apresentou desempenho significativamente pior que o outro grupo.

4.3. Dados histológicos

A análise histológica subjetiva, com coloração de hematoxilina-eosina, resultou nos dados descritivos que estão expostos na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Estatística descritiva com a média e desvio padrão das notas obtidas na análise histológica qualitativa de cada um dos grupos, em cada uma das variáveis analisadas e o correspondente valor do p (significância estatística)

	Grupo	Amostra (N)	Média	Desvio padrão	p
Necrose	Estradiol	10	1,90	0,568	0,125
	Controle	10	1,50	0,527	
Hemorragia	Estradiol	10	1,90	0,568	0,957
	Controle	10	1,90	0,316	
Hiperemia	Estradiol	10	2,30	0,823	0,188
	Controle	10	1,90	0,568	
Degeneração de substância nervosa	Estradiol	10	1,60	0,843	0,619
	Controle	10	1,70	0,675	
Infiltrado celular	Estradiol	10	1,70	0,949	0,813
	Controle	10	1,80	1,033	

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à análise histológica subjetiva.

Os Gráficos 2 a 6 mostram as médias dos valores encontrados nos dois grupos com relação a cada uma das variáveis analisadas no estudo histológico.

Gráfico 2. Média da pontuação da necrose encontrada em cada um dos grupos.

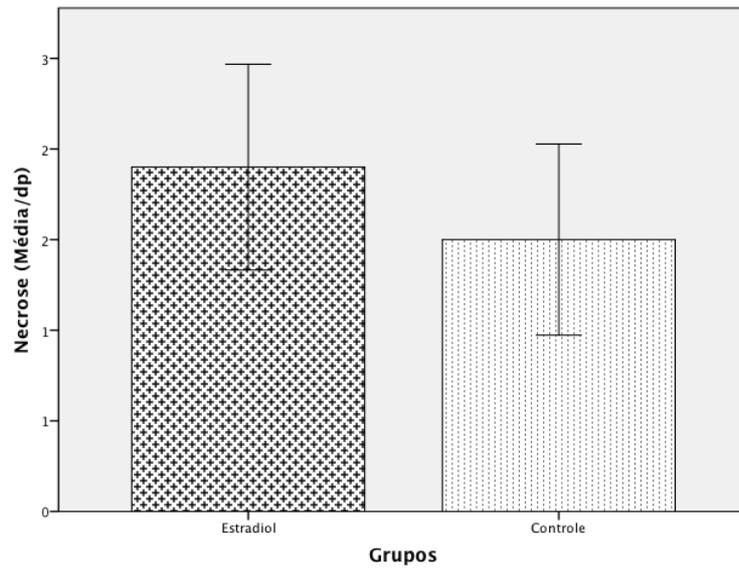


Gráfico 3. Média da pontuação da hemorragia encontrada em cada um dos grupos.

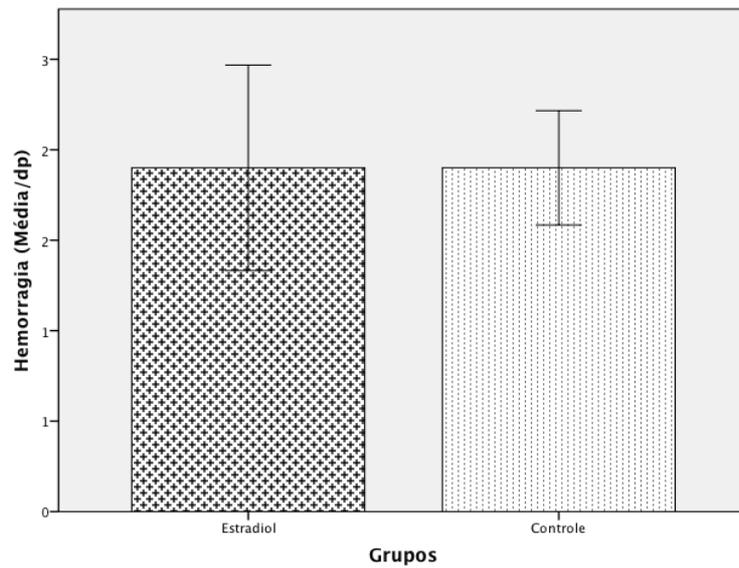


Gráfico 4. Média da pontuação da hiperemia encontrada em cada um dos grupos.

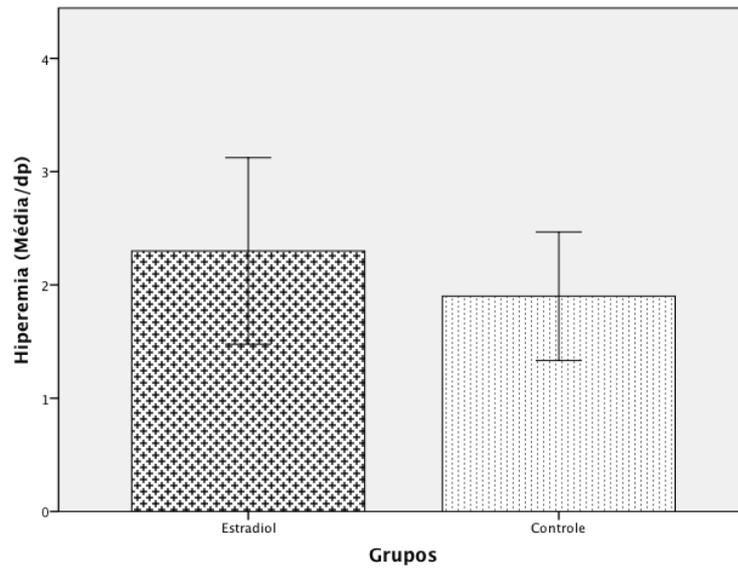


Gráfico 5. Média da pontuação da degeneração de substância nervosa encontrada em cada um dos grupos.

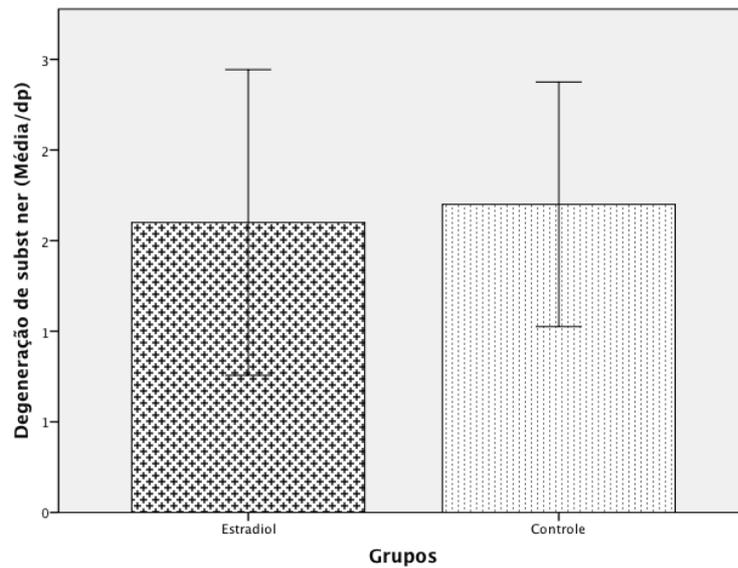
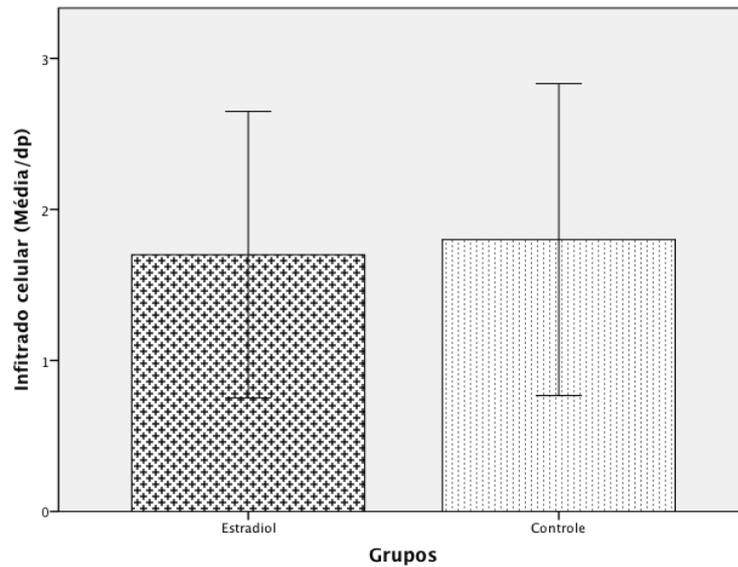


Gráfico 6. Média da pontuação do infiltrado celular encontrado em cada um dos grupos.



As Figuras 8 a 10 mostram, respectivamente, exemplos de alterações da normalidade das seguintes variáveis: degeneração da substância nervosa, hiperemia e infiltrado celular. A Figura 11 mostra, na sequência, um caso sem alterações patológicas.

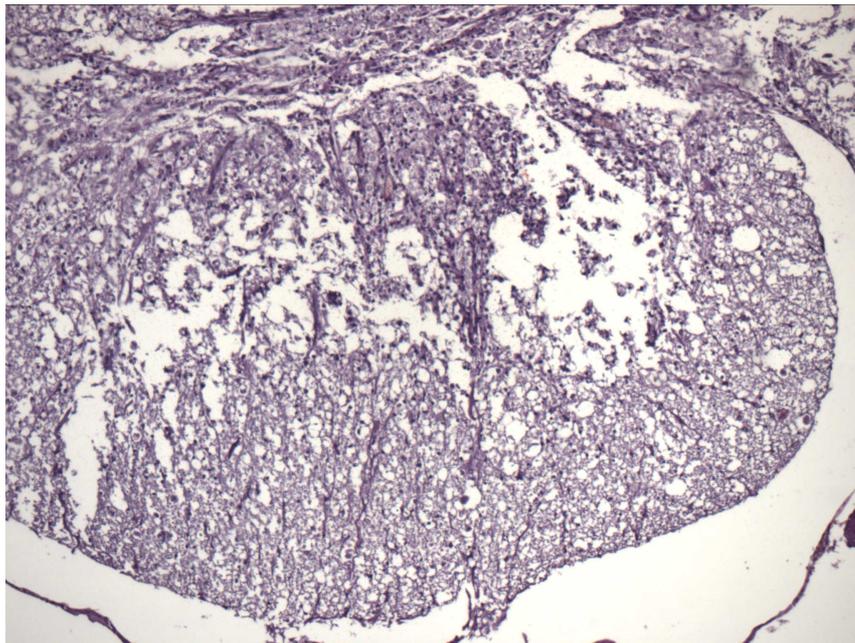


Figura 8. Imagem ilustrativa do grau acentuado de degeneração da substância nervosa do tecido medular lesado dos ratos (aumento: 100 vezes, coloração: hematoxilina-eosina).

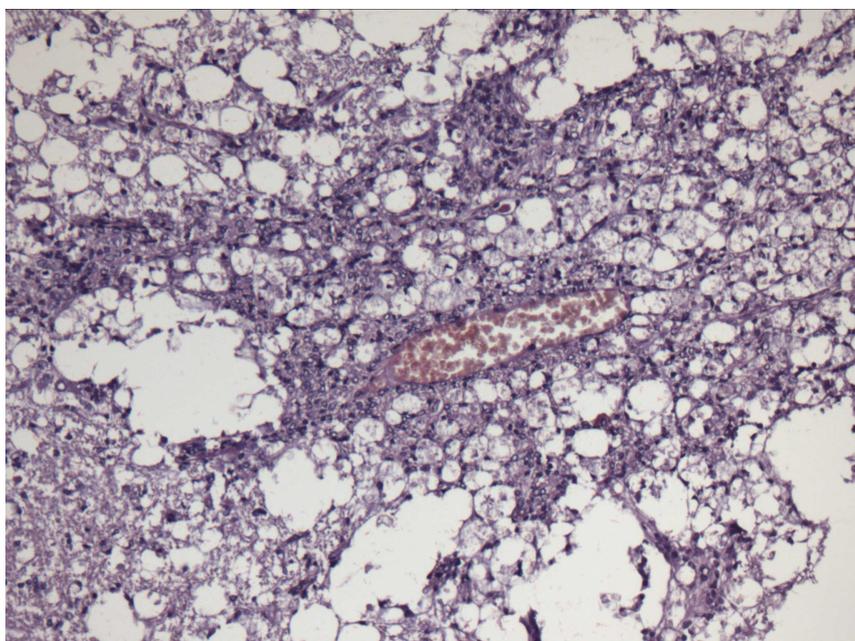


Figura 9. Imagem ilustrativa do grau acentuado de hiperemia do tecido medular lesado dos ratos (aumento: 100 vezes, coloração: hematoxilina-eosina).

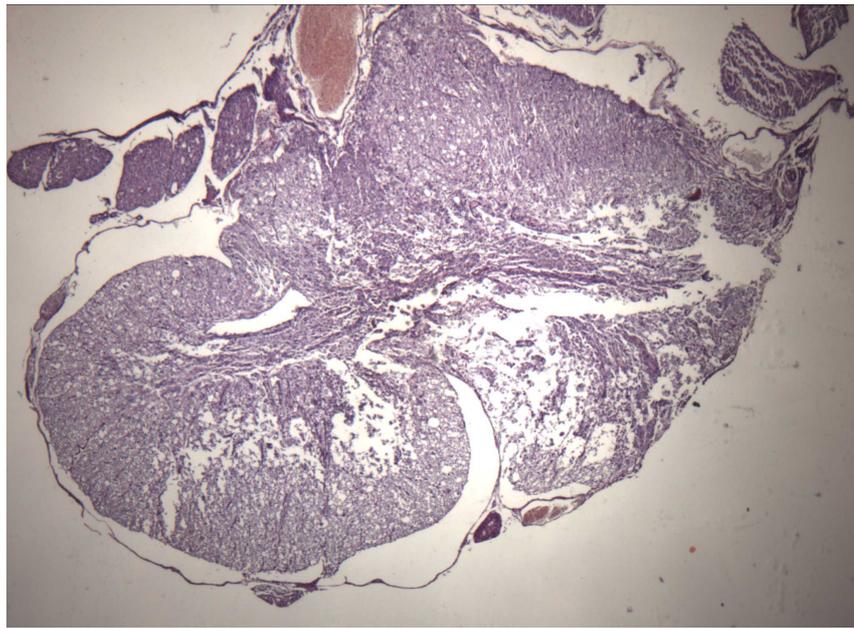


Figura 10. Imagem ilustrativa do grau moderado de infiltrado celular e degeneração cística do tecido medular lesado dos ratos (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina).

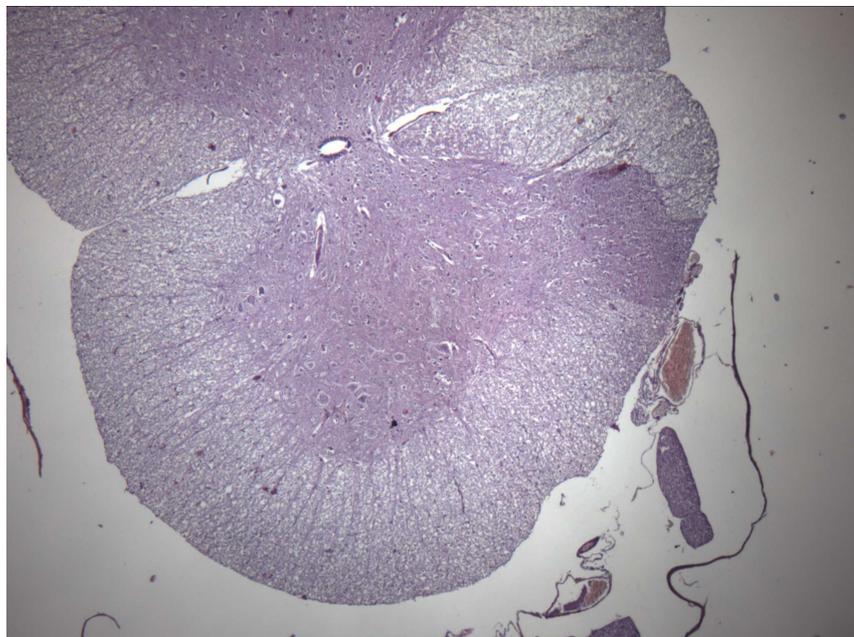


Figura 11. Imagem ilustrativa de uma região sem alterações, proximal à lesão (aumento: 40 vezes, coloração: hematoxilina-eosina).

A análise histológica prosseguiu com a avaliação quantitativa através da coloração com azul de toluidina. A contagem média do número de fibras e medida do diâmetro das fibras está exposta na Tabela 4, de acordo com os grupos de tratamento. A Figura 12 mostra o sistema de contagem de fibras na região proximal à lesão e a Figura 13, na região distal.

Tabela 4. Estatística descritiva com os dados de média e desvio padrão retirados da proporção entre o número de fibras distais/fibras proximais e entre o diâmetro das fibras distais/fibras proximais nos diferentes grupos e o correspondente valor do p (significância estatística)

	Grupo	Amostra (N)	Média	Desvio padrão	p
Número de fibras	Estradiol	10	92,632	16,164	0,00
	Controle	10	56,933	13,032	
Diâmetro das fibras	Estradiol	10	92,427	19,097	0,00
	Controle	10	55,132	20,075	

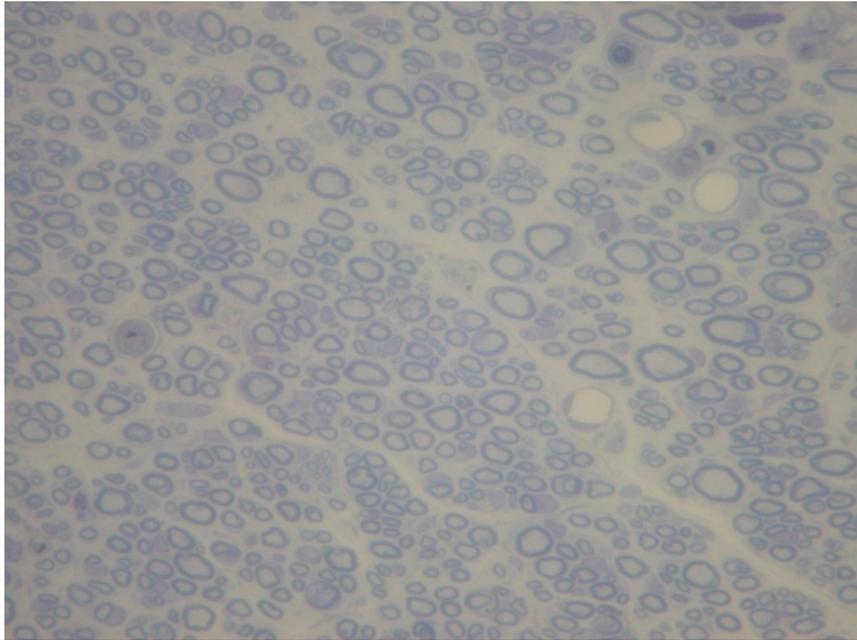


Figura 12. Imagem exemplificando a quantidade de fibras na região proximal a lesão (aumento: 40 vezes, coloração por azul de toluidina).

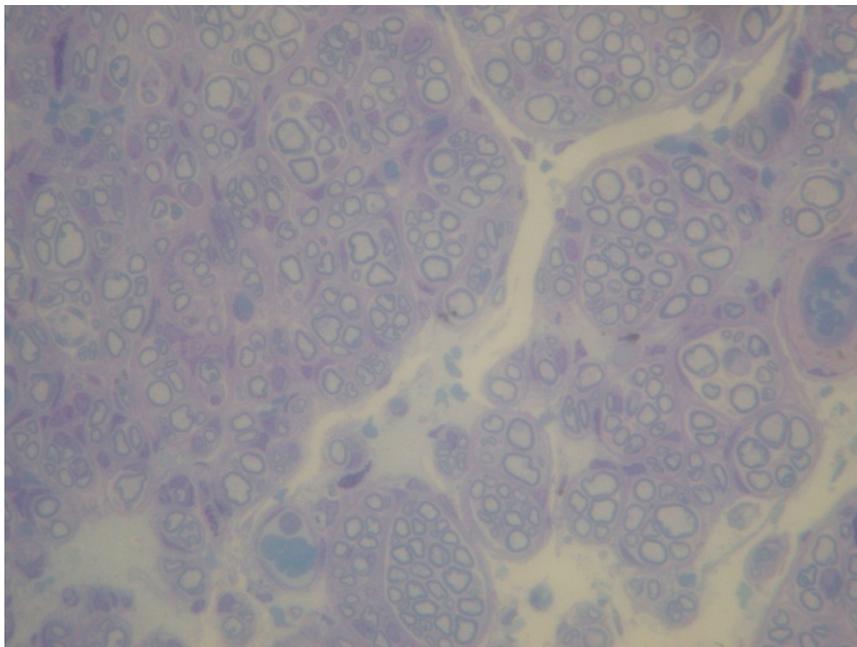


Figura 13. Imagem exemplificando a quantidade de fibras na região distal à lesão (aumento: 40 vezes, coloração por azul de toluidina).

O teste t foi aplicado para comparar as proporções entre o número de fibras e o diâmetro das fibras entre os grupos. Esses resultados foram expostos na Tabela 4 e demonstram que houve diferença estatisticamente significativa no que tange à proporção de número de fibras entre os grupos. O grupo controle apresentou um resultado pior, ou seja, inferior quando comparado ao grupo que recebeu o estrógeno. Os Gráficos 7 e 8 mostram, respectivamente, a média dos valores encontrados para número de fibras e diâmetro das fibras nos dois grupos experimentais.

Gráfico 7. Média dos valores do número de fibras em cada um dos grupos.

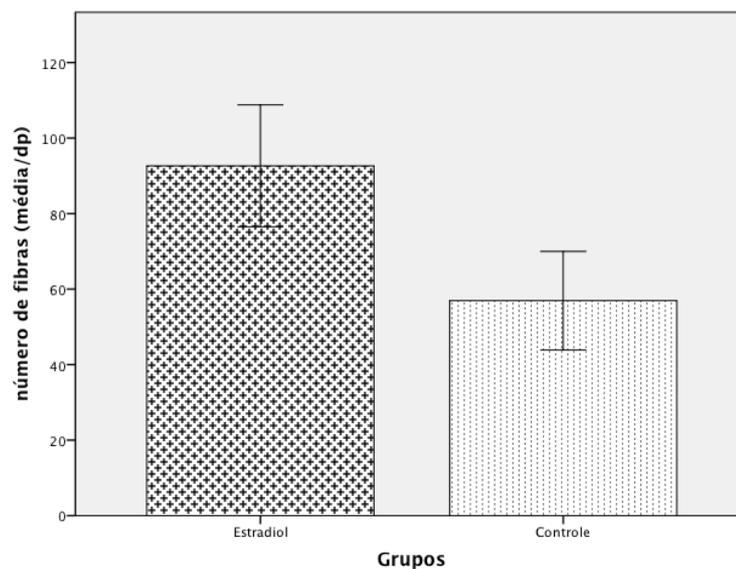
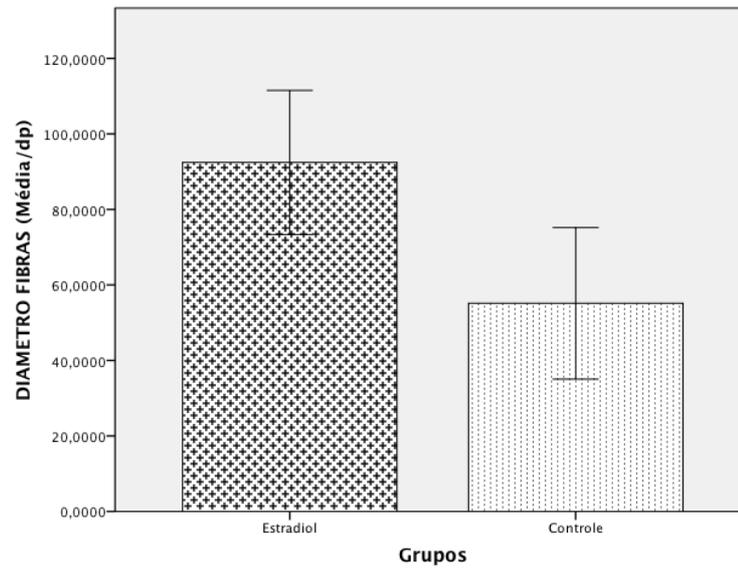


Gráfico 8. Média dos valores do diâmetro das fibras em cada um dos grupos.



5. DISCUSSÃO

Desde o final da década de 70 e início da de 80, iniciou-se a instalação de formas de cuidado cientificamente embasadas em evidência e tratamentos mais completos e assertivos. Isso foi possível em razão de avanços no conhecimento da fisiopatologia envolvida na lesão medular, da irrigação sanguínea deste tecido, das técnicas cirúrgicas, da segurança anestésica e dos instrumentais de estabilização da coluna vertebral.

Os protocolos, em linhas gerais, eram regidos pelos seguintes conceitos: descompressão do canal vertebral o mais rapidamente possível para permitir melhor chance de recuperação neurológica; estabilização rígida da coluna vertebral que permitisse a mobilização precoce sem a necessidade de aparatos de sustentação e de imobilização externa; reabilitação precoce, com fisioterapia motora e respiratória, reeducação de esfíncteres e acompanhamento psicológico, visando evitar as graves complicações decorrentes da lesão medular. Com isso, o prognóstico dos pacientes melhorou, porém ainda pouco era feito em relação à lesão medular propriamente dita.

Recentemente, ainda se considerava o sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos como incapaz de reparar-se ou regenerar-se após algum grau de lesão (Yamamoto et al., 2001). Contudo, demonstrou-se que, para recuperação da qualidade de vida do paciente com lesão medular, a medula não necessariamente precisaria ser totalmente reconstruída. Grandes benefícios podem advir de reparações anatômicas mínimas (Blight, 1983).

No tratamento da lesão medular aguda, os fármacos, em termos práticos, têm apenas papel coadjuvante. Ainda há a necessidade de melhores evidências quanto ao mecanismo de ação e eficácia dessas substâncias (Bracken, 2000; Short et al., 2000; Hurlbert, 2001; Wang et al., 2006; Fouad et al., 2011). Já as técnicas cirúrgicas, por outro lado, avançaram muito. O uso de materiais de implante modernos e aperfeiçoados propicia cirurgias de reconstrução de fraturas instáveis. O tratamento cirúrgico tem vantagens consagradas, como a prevenção de danos teciduais adicionais e a facilitação da reabilitação precoce. Porém, isoladamente, esses tratamentos não são suficientes para a melhora definitiva do estado neurológico e há a necessidade de terapias complementares. Diversos estudos, em andamento, avaliam a regeneração do sistema nervoso central com o uso de fatores neurotróficos, do enxerto de nervos periféricos associados ou não a fatores neurotróficos, de anticorpos bloqueadores dos fatores inibitórios da regeneração, do enxerto de células do sistema nervoso e de células-tronco (Barros Filho et al., 2002).

O modelo experimental através de queda de peso, em ratos Wistar, para a produção de lesão medular mediana, foi o selecionado neste estudo porque permite a padronização e a uniformização da amostra. A escolha de ratos Wistar deveu-se à maior disponibilidade e utilização em laboratórios brasileiros, à sua disponibilidade pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e, principalmente, devido à padronização realizada e adotada pelo Laboratório de Estudos do

Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP) (Rodrigues et al., 2010). O equipamento computadorizado NYU Impactor, disponível no LETRAN, assim como nos principais centros de pesquisa que integram o Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS), permite a comparação interinstitucional dos resultados.

O número de animais (n) para a formação dos grupos baseou-se no padronizado pela MASCIS e em pesquisas anteriores, que adotaram modelo experimental semelhante (Marcon, 2006; Cristante et al., 2009b; Santos et al., 2011). Um critério de inclusão rígido é necessário para se eliminarem fatores de interferência, que são: ratos de raça e gênero únicos, idades entre 20 e 21 semanas, peso variando de 300 a 420 g, e sem alteração de motricidade ou do estado geral, avaliado pela pelagem. A homogeneização da amostra é essencial para a obtenção de confiabilidade e reprodutibilidade.

Escolhemos o emprego do estrógeno, na forma de 17-beta estradiol (E2), para administração aos ratos por haver literatura científica demonstrando o efeito benéfico desse tipo de tratamento sobre a plasticidade neuronal (Islamov et al., 2002; Suzuki et al., 2006; Dhandapani et al., 2007; Olsen et al., 2010; Ray et al., 2011). Além disso, o estradiol é considerado o estrogênio mais importante sob o ponto de vista funcional nos seres humanos, tem ação multissistêmica, incluindo o sistema nervoso e o sistema musculoesquelético (Samantaray et al., 2010b), e é uma substância amplamente disponível e comercializada em nosso meio.

Há publicações científicas que mostram que o estrógeno e seus agonistas têm benefícios neurológicos tanto quando são administrados antes da lesão neurológica, como agentes neuroprotetores, quanto já numa fase mais crônica do dano tecidual neurológico (Webb et al., 2006; Ritz et al., 2008; Samantaray et al., 2010a; McDowell et al., 2011; Rong et al., 2012). Os benefícios seriam inclusive extensivos a ambos os gêneros (Hubscher et al., 2010; Samantaray et al., 2010b).

Os principais efeitos do estrógeno e de seus agonistas são: melhora da perfusão sanguínea tecidual, ativação de proteínas e cascatas intracelulares antiapoptóticas, propriedades antioxidativas, inibição da peroxidação lipídica, redução do edema e da inflamação tecidual, redução da perda de mielina, ativação de células da glia (Sribnick et al., 2003; Sribnick et al., 2005; Brann et al., 2007; Dhandapani et al., 2007; Prokai et al., 2007; Olsen et al., 2010; McDowell et al., 2011). Os resultados práticos dos efeitos do estrógeno podem ser medidos através da melhora funcional motora em escalas padronizadas como a BBB, diminuição de dano visto na análise histológica e diminuição da dor após a lesão medular (Yune et al., 2004; Ritz et al., 2008; Hubscher et al., 2010; Sribnick et al., 2010). Nosso estudo analisou, conjuntamente, diferentes ações do estrógeno. Primariamente, avaliou a função motora através da escala BBB, e secundariamente, realizou as avaliações histológicas quantitativas e qualitativas, bem como mediu a recuperação motora pelo potencial evocado.

A avaliação dos resultados de nosso trabalho foi cega. Os pesquisadores que aplicaram a escala funcional BBB, o médico que realizou

os exames de potencial evocado, o pesquisador que realizou a análise histológica e o estatístico que analisou os dados obtidos eram cegos quanto a que grupo pertencia cada animal.

A escala de avaliação da recuperação funcional de Basso, Beattie e Bresnahan, escala BBB (Basso et al 1995, 1996), é a principal escala utilizada para quantificar a recuperação motora em ratos com lesão medular, que segue estudos realizados pelo MASCIS. A avaliação pela escala funcional BBB é tida como válida, reprodutível e permite a comparação de resultados e troca de experiências (Santos et al., 2011).

A avaliação por potencial evocado permite dados objetivos de amplitude e latência e também foi padronizada em nosso laboratório por Ferreira et al., em 2005. O potencial evocado motor por meio de estimulação elétrica transcraniana é um método de avaliação da propagação dos impulsos elétricos medulares, com a captação nos músculos-alvo dos membros dianteiros e traseiros. Na prática, determina dois valores importantes: a latência, que significa “velocidade”, “tempo para aparecer o sinal”, e a amplitude, que determinaria a “recuperação”, ou “ganho de fibras”, sendo que quanto maior, melhor. O potencial evocado motor tem estreita correlação com os achados do exame clínico. O potencial somato-sensitivo pode ser utilizado nas avaliações medulares, mas tem grande limitação quando há predominância da síndrome da medula anterior. O potencial evocado motor não demonstra esta limitação (Alisauskiene et al., 2005; Tator, 2006).

A análise histológica de cortes da medula, no sítio da lesão, 1 cm cranial e 1 cm caudal à lesão, também é importante para avaliar grau de

lesão histológica e indícios de neuroplasticidade. O estudo histológico foi realizado com três cortes em cada segmento medular: cranial, caudal e na topografia da lesão.

Após a eutanásia, o exame necroscópico dos ratos foi realizado de modo a permitir a identificação macroscópica de possíveis alterações em relação ao padrão normal. Vários estudos realizados no LETRAN mostram que a metodologia atualmente disponível no laboratório, com coloração de hematoxilina-eosina para o exame anatomopatológico de amostras do sítio de lesão medular, não tem se mostrado suficientemente sensível para a visualização de diferenças significativas (Rodrigues, 1999). Mesmo assim, após a eutanásia, amostras dos tecidos medulares foram retiradas do sítio da lesão e submetidas ao exame histológico, pelo método de coloração de hematoxilina e eosina, com a finalidade de comprovar sinais da lesão tecidual. Este estudo se fez necessário para certificação de que o traumatismo fora efetivo na produção da contusão medular. Adicionalmente, neste estudo, empregamos avaliação histológica objetiva, com coloração por azul de toluidina, para comparar a proporção do número de fibras distais à lesão em relação ao número de fibras proximais à lesão (Bertelli et al, 2004; Grossman, 2001a, 2001b).

Embora em nossa experiência seja muito comum a perda e exclusão de ratos por autofagia ou por infecção urinária (Santos et al., 2011), neste nosso estudo não ocorreu perda nos grupo, até o fim (42º dia) da experimentação.

A análise funcional pela escala BBB demonstrou que o grupo de ratos submetido ao tratamento com estrógeno apresentou resultados

significativamente melhores que os ratos pertencentes ao grupo controle. Há superioridade do escore funcional do grupo estradiol em relação ao outro, após o 28^o dia. Essa diferença, somente a partir da quarta semana de estudo, pode significar que a ação do estrógeno sobre a função motora é efetiva, mas não ocorre agudamente já nos primeiros dias. Podemos também interpretar que esta ação tem efeito contínuo e crescente com o passar dos dias.

Na análise dos resultados da avaliação por potencial evocado, obtivemos desempenho significativamente melhor do grupo experimental em relação ao grupo controle. O grupo experimental apresentou recuperação neurológica superior ao grupo controle quando analisados os dados obtidos a partir do exame de potencial evocado motor. É provável que o potencial evocado motor seja mais sensível que a escala funcional BBB no que tange à detecção de melhoras neurológicas, mesmo que sutis, nos ratos. A pontuação do exame de potencial evocado é mais objetiva que a atribuída na escala BBB.

Não houve diferença estatisticamente significativa nas análises histológicas com a coloração por hematoxilina-eosina. Não encontramos diferença comparando-se os fragmentos do sítio da lesão dos dois grupos experimentais, em todos os itens analisados (necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância nervosa, e infiltrado celular). Tal constatação provavelmente se deve ao fato de o método de análise disponível ser pouco sensível para a detecção de possíveis diferenças entre os grupos. Além disso, a utilização de lesão moderada (por meio de lesão

provocada por queda do peso de altura de 12,5 mm de altura) priorizou as possíveis alterações funcionais em detrimento das alterações anatomopatológicas (Marcon et al., 2010). Contudo, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na contagem de fibras e na proporção das fibras contadas (número de fibras distais à lesão/número de fibras proximais à lesão). Muito embora esta seja também uma alteração histológica entre os grupos, pode-se explicá-la pelo fato de a avaliação pela medida de axônios ser mais precisa e sensível que a qualitativa. Talvez esta abordagem diversa de técnica microscópica seja suficiente para justificar as diferenças encontradas. Outros estudos futuros e uma maior população amostral poderão comprovar esses achados.

Comparando nossos resultados com outros trabalhos semelhantes (Yune et al., 2004; Sribnick et al., 2005; Ritz et al., 2008; Hubscher et al., 2010; Olsen et al., 2010; Samantaray et al., 2010a; Sribnick et al., 2010; Rong et al., 2012), vimos que diferentes autores demonstram o benefício do estrógeno administrado a ratos submetidos à lesão medular contusa controlada quando comparados com ratos controles. Nossos achados estão em concordância com a mais recente literatura científica (Yune et al., 2004; Sribnick et al., 2005; Suzuki et al., 2006; Wang et al., 2006; Webb et al., 2006; Brann et al., 2007; Dhandapani et al., 2007; Prokai et al., 2007; Ritz et al., 2008; Hubscher et al., 2010; Olsen et al., 2010; Samantaray et al., 2010a; Sribnick et al., 2010; Ray et al., 2011; Rong et al., 2012). Porém, este trabalho tem a originalidade de analisar conjuntamente função (recuperação)

motora e avaliações histológicas objetiva (contagem de axônios) e subjetiva (escores de avaliação das variáveis).

Este estudo tem ainda a vantagem de estender o tempo de experimentação por seis semanas. Os valores da avaliação funcional pelo BBB, por exemplo, são significativamente maiores a partir da quarta semana no nosso trabalho, diferentemente do observado por Yune et al., em 2004, e por Ritz et al., em 2008, trabalho no qual a melhora foi mais precoce. Este último autor inclusive refere piora da função motora após a quarta semana, ou seja, o oposto do que observamos. Os ratos no estudo de Sribnick et al., em 2005, foram sacrificados com 48 horas após a lesão medular, ao passo que, no nosso estudo, foram sacrificados apenas no 42^o dia e ainda conservavam os benefícios da administração do estradiol, imediatamente após a lesão. Os benefícios mais prolongados da terapia estrogênica também puderam ser vistos no trabalho de Hubscher et al., em 2010, que também estenderam a experimentação até a sexta semana. Olsen et al., em 2010, mantiveram a administração do estrógeno após a lesão medular por um período de 21 dias, mostrando bons resultados na fisiologia celular. A manutenção do tratamento de forma prolongada em nosso estudo, ao invés de dose única, poderia ter contribuído para diferenças ainda mais expressivas e mais precoces entre os dois grupos. Segundo Sribnick et al., em 2010, o estrógeno parece ter benefícios na recuperação da função motora inclusive em casos crônicos de lesão medular. Essa diferença entre administração precoce ou tardia do estradiol não pôde ser avaliada pelo desenho do nosso estudo.

Implicações clínicas deste tipo de experimento consistem na percepção de que a recuperação funcional de pacientes paraplégicos pode ser influenciada por terapias medicamentosas baratas e disponíveis. Uma vantagem teórica do uso do 17-beta estradiol seria o emprego de uma substância endógena (Samantaray et al., 2010b) ao invés de outra sintética, o que pode ser uma vantagem em termos de custo de desenvolvimento e com relação a possíveis efeitos adversos.

A ciência está aos poucos desvendando os mecanismos de proteção celular e neuroregeneração. Contudo, a realidade na prática clínica ainda é parcialmente satisfatória, pois se dispõe apenas de tratamento de suporte para os pacientes com lesão medular. Modelos animais são uma importante fonte de pesquisa e esperança, na busca por tratamentos efetivos que um dia possam ser eventualmente extrapolados para incrementar a recuperação funcional de pacientes com lesão medular.

6. CONCLUSÕES

A administração de estrógeno imediatamente após lesão medular experimental mostrou benefícios na recuperação neurológica funcional motora dos animais tratados comparados com os controles, não tratados. Os benefícios podem ser observados a partir da quarta semana após a lesão.



7. ANEXOS



Anexo 1. Escala BBB de avaliação funcional (Basso et al., 1995)

Rato: _____ Data: ____/____/____ Dias de pós-operatório: _____ Pontuação: _____ Esquerdo: _____ Direito: _____

Movimento do membro posterior						Posição do tronco				Abdome	Movimento da pata dianteira				Pisada				Coordenação	Liberação dos dedos				Posição predominante da pata				Instabilidade do tronco	Cauda			
Quadril		Joelho		Tornozelo							Lado		Apoio		Balanço	Apoio da pata				Dorsal		Plantar		Contato inicial		Elevação						
E	D	E	D	E	D	L	D	A	P	Arrastando	E	D	Sem suporte de peso			Com suporte de peso		E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
0	0	0	0	0	0	E	D	E	D				Paralelo	E	D	E	D	E	D	0	0			0	0	0	0			0	0	0*
S	S	S	S	S	S	E	D	E	D	Alto	E	D				E	D	E	D	O	O	O	O	O	O	O	O	E	E	E	E	
E	E	E	E	E	E	Central							Paralelo	E	D	E	D	E	D	F	F	F+	F+	F	F**	F**	F**	Instabilidade do tronco	Para baixo (abaixada)			
E	E	E	E	E	E	Alto	E	D	E	D	E	D				C	C	C	C	C	C	C	C	P	P	P	P					

Comentários: _____

Movimento

0 = Nenhum; S = Suave (discreto); E = Extenso; + = Pisada dorsal > 4 passos da pata posterior; * = Liberação < 50%; ** = Dedos arrastando > 4 passos da pata posterior; 0 = Nunca (0%); O = Ocasional (< 50%); F = Frequente (51-94%); C = Consistente (95-100%); I = Rotação interna; E = Rotação externa; P = Paralelo.

Anexo 2. Escala BBB de avaliação funcional de 21 pontos de Basso et al. (1995)

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior.
8	Pedalada sem suporte de peso <u>ou</u> apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) <u>ou</u> passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de piso frequente a consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior.

(continua)

(continuação)

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio <u>ou</u> passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.

(continua)

(continuação)

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.

Definições	
Discreta	Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Extensa	Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Pedalada	Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente se inclina lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior.
Sem suporte de peso	Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Com suporte de peso	Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou elevação da coxa.
Passada plantar	A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para a frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso.
Passada dorsal	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo.
Coordenação dos membros anterior e posterior	Para todo passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam.
Ocasional	Menos do que ou igual à metade das vezes, $\leq 50\%$.
Frequente	Mais do que a metade, mas não sempre, 51- 94%.
Consistente	Quase sempre ou sempre, 95 – 100%.
Instabilidade do tronco	Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco.

Anexo 3. Comitê de ética em pesquisa



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/12/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **504/11** intitulado: **“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRÓGENO NA LESÃO MEDULAR DE RATOS”** que utilizará **30** animais da espécie **Ratos Wistar**, apresentado pelo **Departamento de ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Alexandre Fogaça Cristante

Pesquisador (a) Executante: Olavo Biraghi Letaif

CEP-FMUSP, 15 de Dezembro de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador interino
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

8. REFERÊNCIAS

Alisauskiene M, Truffert A, Vaiciene N, Magistris MR. Transcranial magnetic stimulation in clinical practice. *Medicina (Kaunas)*. 2005;41(10):813-24.

Allen AR. Remarkes on histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *Journal of Nervous and Mental Disease*. 1914;41(3):141-7. Disponível em: http://journals.lww.com/jonmd/Citation/1914/03000/Remarks_on_the_Histopathological_Changes_in_the.2.aspx. Acessado em 2014 (17 abr).

Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. *The Journal of the American Medical Association*. 1911;57(11):878-80. Disponível em: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=448138>. Acessado em 2014 (17 abr).

Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 1999;44(5):1027-39; discussion 1039-40.

Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, et al. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1985;2(4):257-67.

Barros Filho TE, Taricco MA, Oliveira RP, Greve JM, Santos LC, Napoli MM. Estudo epidemiológico dos pacientes com traumatismo da coluna vertebral e déficit neurológico, internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP [Epidemiological study of patients with spinal cord injuries and neurologic deficit, admitted to the Institute of Orthopedics and Traumatology at the Hospital das Clinicas of the School of Medicine of the University of São Paulo]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1990;45(3):123-6.

Barros Filho TEP, Oliveira RP, Tsanaclis AM, Barros EMKP, Cristante AF, Palma RM, et al. Modelo experimental de transplante de células do sistema nervoso central fetal para lesão de medula espinal em ratos [An experimental model for the transplantation of fetal central nervous system cells to the injured spinal cord in rats]. *Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo*. 2002;57(6):257-64.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996;139(2):244-56.

Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2000;17:915-25.

Bertelli JA, dos Santos AR, Taleb M, Calixto JB, Mira JC, Ghizoni MF. Long interpositional nerve graft consistently induces incomplete motor and sensory recovery in the rat. An experimental model to test nerve repair. *J Neurosci Methods*. 2004;134(1):75-80.

Blight AR. Cellular morphology of chronic spinal cord injury in the cat: analysis of myelinated axons by line-sampling. *Neuroscience*. 1983;10(2):521-43.

Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg*. 1993;79(4):500-7.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, et al. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg*. 1992;76(1):23-31.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. JAMA. 1997;277(20):1597-604.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. J Neurosurg. 1998;89(5):699-706.

Bracken MB. Pharmacological interventions for acute spinal cord injury. Cochrane Database Syst Rev. 2000;(2):CD001046.

Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. Steroids. 2007;72(5):381-405.

Chopek JW, Gardiner PF. Life-long caloric restriction: Effect on age-related changes in motoneuron numbers, sizes and apoptotic markers. Mech Ageing Dev. 2010;131(10):650-9.

Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (Cobea). Princípios éticos na experimentação animal. São Paulo: Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (Cobea); 1991. Disponível em: http://www.univap.br/ipd/docs/principios_eticos_na_experimentacao_animal.pdf. Acessado em 2014 (17 abr).

Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 1994;80(1):97-111.

Cristante AF, Barros Filho TE, Oliveira RP, Marcon RM, Rocha ID, Hanania FR, et al. Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2009b;47(6):458-63.

Cristante AF, Barros-Filho TE, Tatsui N, Mendrone A, Caldas JG, Camargo A, et al. Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. *Spinal Cord.* 2009a;47(10):733-8.

Cristante AF, Filho TE, Oliveira RP, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB. Effects of antidepressant and treadmill gait training on recovery from spinal cord injury in rats. *Spinal Cord.* 2013;51(6):501-7.

Dhandapani KM, Brann DW. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol.* 2007;42(1-2):70-5.

Ding WX, Shen HM, Ong CN. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 2000;32(3):547-55.

Farooque M, Hillered L, Holtz A, Olsson Y. Changes of extracellular levels of amino acids after graded compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using microdialysis. *J Neurotrauma,* 1996;13(9):537-48.

Ferreira R, Oliveira AR, Barros Filho TEP. Padronização da técnica para captação do potencial evocado motor em ratos através da estimulação elétrica transcraniana [Standardization of motor evoked potential captivation technique in rats through transcranial electric stimulus]. *Acta Ortop Bras.* 2005;13(3):112-4.

Fouad K, Krajacic A, Telzlaff W. Spinal cord injury and plasticity: opportunities and challenges. *Brain Res Bull.* 2011;84(4-5):337-42.

Fu ES, Tummala RP. Neuroprotection in brain and spinal cord trauma. *Current Opin Anaesthesiol.* 2005;18(2):181-7.

Gerin CG, Hill A, Hill S, Smith K, Privat A. Serotonin release variations during recovery of motor function after a spinal cord injury in rats. *Synapse*. 2010;64(11):855-61.

Greve JM. Traumatismos raquimedulares nos acidentes de trânsito e uso de equipamentos de segurança. *Diagn Tratamento*. 1997;2(1):10-3.

Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR. Relationship of altered glutamate receptor subunit mRNA expression to acute cell loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol*. 2001;168(2):283-9.

Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol*. 2001;168(2):273-82.

Hayashi Y, Jacob-Vadakot S, Dugan EA, McBride S, Olexa R, Simansky K, et al. 5-HT precursor loading, but not 5-HT receptor agonists, increases motor function after spinal cord contusion in adult rats. *Exp Neurol*. 2010;221(1):68-78.

Hubscher CH, Fell JD, Gupta DS. Sex and hormonal variations in the development of at-level allodynia in a rat chronic spinal cord injury model. *Neurosci Lett*. 2010;477(3):153-6.

Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg.* 2000;93(1 Suppl):1-7.

Hurlbert RJ. The role steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S39-46.

Islamov RR, Hendricks WA, Jones RJ, Lyall GJ, Spanier NS, Murashov AK. 17Beta-estradiol stimulates regeneration of sciatic nerve in female mice. *Brain Res.* 2002;943(2):283-6.

Kao T, Shumsky JS, Jacob-Vadakot S, Himes BT, Murray M, Moxon KA. Role of the 5-HT_{2C} receptor in improving weight-supported stepping in adult rats spinalized as neonates. *Brain Res.* 2006;1112(1):159-68.

Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, Wing PC. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord.* 2014;52(2):110-6.

Marcon RM, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Cristante AF, Taricco MA, Colares G, et al. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar [Experimental study on the action of methylprednisolone on Wistar rats before spinal cord injury]. *Acta Ortop Bras.* 2010b;18(1):26-30.

Marcon RM, Cristante AF, de Barros Filho TE, de Oliveira RP, dos Santos GB. Potentializing the effects of GM1 by hyperbaric oxygen therapy in acute experimental spinal cord lesion in rats. *Spinal Cord*. 2010a;48(11):808-13.

Marcon RM. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.

McDowell ML, Das A, Smith JA, Varma AK, Ray SK, Banik NL. Neuroprotective effects of genistein in VSC4.1 motoneurons exposed to activated microglial cytokines. *Neurochem Int*. 2011;59(2):175-84.

McVeigh JF. Experimental cord crushes: with especial reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the cord affected. *Archives of Surgery*. 1923;7(3):573-600. Disponível em: <http://archsurg.ama-assn.org/cgi/content/summary/7/3/573>. Acessado em 2014 (17 abr).

Nessler JA, De Leon RD, Sharp K, Kwak E, Minakata K, Reinkensmeyer DJ. Robotic gait analysis of bipedal treadmill stepping by spinal contused rats: characterization of intrinsic recovery and comparison with BBB. *J Neurotrauma*. 2006;23(6):882-96.

New York University Medical Center. Impactor. NYU spinal cord contusion system. Operation manual. Impactor software version 7.0. New York, 1993.

Noble LJ, Wrathall JR. An inexpensive apparatus for producing graded spinal cord contusive injury in the rat. *Exp Neurol*. 1987;95(2):530-3.

Noble LJ, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol*. 1985;88(1):135-49.

O'Connor CA, Cernak I, Vink R. Both estrogen and progesterone attenuate edema formation following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res*. 2005;1062(1-2):171-4.

Olsen ML, Campbell SC, McFerrin MB, Floyd CL, Sontheimer H. Spinal cord injury causes a wide-spread, persistent loss of Kir4.1 and glutamate transporter 1: benefit of 17 beta-oestradiol treatment. *Brain*. 2010;133(Pt 4):1013-25.

Prokai L, Simpkins JW. Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. *Pharmacol Ther*. 2007;114(1):1-12.

Ray SK, Matzelle DD, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. Cell death in spinal cord injury (SCI) requires de novo protein synthesis. Calpain inhibitor E-64-d

provides neuroprotection in SCI lesion and penumbra. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;939:436-49.

Ray SK, Samantaray S, Smith JA, Matzelle DD, Das A, Banik NL. Inhibition of cysteine proteases in acute and chronic spinal cord injury. *Neurotherapeutics.* 2011;8(2):180-6.

Ritz MF, Hausmann ON. Effect of 17beta-estradiol on functional outcome, release of cytokines, astrocyte reactivity and inflammatory spreading after spinal cord injury in male rats. *Brain Res.* 2008;1203:177-88.

Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar [Standardization of spinal cord injury in Wistar rats]. *Acta Ortop Bras.* 2010;18(4):182-6.

Rodrigues NR. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1999.

Rong W, Wang J, Liu X, Jiang L, Wei F, Zhou H, et al. 17 β -estradiol attenuates neural cell apoptosis through inhibition of JNK phosphorylation in SCI rats and excitotoxicity induced by glutamate in vitro. *Int J Neurosci.* 2012;122(7):381-7.

Samantaray S, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. Physiological low dose of estrogen-protected neurons in experimental spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2010a;1199:86-9.

Samantaray S, Sribnick EA, Das A, Thakore NP, Matzelle D, Yu SP, et al. Neuroprotective efficacy of estrogen in experimental spinal cord injury in rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2010b;1199:90-4.

Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar [Spinal cord injury experimental model and motion evaluation protocol in wistar rats]. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(2):87-91.

Sekhon LH., Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S2-12.

Sharma HS, Olsson Y, Nyberg F, Dey PK. Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability, blood flow, edema and serotonin levels following spinal cord injury: an experimental study in the rat. *Neuroscience.* 1993;57(2):443-9.

Short D. Is the role of steroids in acute spinal cord injury now resolved? *Curr Opin Neurol.* 2001;14(6):759-63.

Short DJ, El Masry WS, Jones PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord*. 2000;38(5):273-86.

Souza FI, Barros Filho TEP, Cristante AF. Avaliação do emprego do GM1 após lesão medular experimental em ratos [Evaluation of the use of GM1 after experimental spinal cord injury in rats]. *Coluna/Columna*. 2011;10(4):305-8.

Sribnick EA, Samantaray S, Das A, Smith J, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. Postinjury estrogen treatment of chronic spinal cord injury improves locomotor function in rats. *J Neurosci Res*. 2010;88(8):1738-50.

Sribnick EA, Wingrave JM, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. Estrogen as a neuroprotective agent in the treatment of spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;993:125-33; discussion 159-60.

Sribnick EA, Wingrave JM, Matzelle DD, Wilford GG, Ray SK, Banik NL. Estrogen attenuated markers of inflammation and decreased lesion volume in acute spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res*. 2005;82(2):283-93.

Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine*. 2006;29(2):209-15.

Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1953;70(6):813-9.

Tator CH. Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery*. 2006;59(5):957-82; discussion 982-7.

Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia. 4th ed. Australia: Blackwell Publishing; 2007.

Ung RV, Landry ES, Rouleau P, Lapointe NP, Rouillard C, Guertin PA. Role of spinal 5-HT₂ receptor subtypes in quipazine-induced hindlimb movements after a low-thoracic spinal cord transaction. *Eur J Neurosci*. 2008;28(11):2231-42.

Wang KK, Larner SF, Robinson G, Hayes RL. Neuroprotection targets after traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol*. 2006;19(6):514-9.

Webb AA, Chan CB, Brown A, Saleh TM. Estrogen reduces the severity of autonomic dysfunction in spinal cord-injured male mice. *Behav Brain Res*. 2006;171(2):338-49.

Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, Kawaichi M, Fukamizu A, Kishi N, et al. Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(48):45031-40.

Yune TY, Kim SJ, Lee SM, Lee YK, Oh YJ, Kim YC, et al. Systemic administration of 17beta-estradiol reduces apoptotic cell death and improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2004;21(3):293-306.