

PEDRO RICARDO DE MESQUITA COUTINHO

**Avaliação do efeito do tacrolimo e da eritropoetina na lesão medular
experimental em ratos**

SÃO PAULO

2015

PEDRO RICARDO DE MESQUITA COUTINHO

**Avaliação do efeito do tacrolimo e da eritropoetina 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: Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa Barros Filho

SÃO PAULO

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Coutinho, Pedro Ricardo de Mesquita

Avaliação do efeito do tacrolimo e da eritropoetina na lesão medular experimental em ratos / Pedro Ricardo de Mesquita Coutinho. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Tarcísio Eloy Pessoa Barros Filho.

Descritores: 1.Eritropoetina 2.Tacrolimo 3.Traumatismos da medula espinal 4.Sistema nervoso central/lesões 5.Ratos 6.Neuroimunomodulação/efeitos de drogas

USP/FM/DBD-229/15

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal 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.

DEDICATÓRIA

À minha esposa, Luciana, pela serenidade e incentivo para superar os momentos de dificuldade durante a execução deste projeto, vencendo as dificuldades e fazendo de nosso lar um ambiente de paz.

Aos meus pais, Ricardo e Auxiliadora, que me apoiaram e incentivaram mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, orientador sempre presente e de relevante importância na construção do conhecimento médico científico em nosso país.

Ao Dr. Alexandre Fogaça Cristante, pela imensa atenção dispensada nos últimos três anos da minha vida, no treinamento cirúrgico na área de coluna vertebral, no Instituto de Traumatologia e Ortopedia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Manuel Bomfim Braga Júnior, professor disciplina de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, que brilhantemente coordena o PRODOT (Projeto de Ortopedia e Traumatologia), liga acadêmica da qual orgulhosamente participei. No PRODOT, descobri o fascinante mundo da Ortopedia e Traumatologia.

Ao Dr. Fernando Antônio Mendes Façanha Filho e ao Dr. Guilherme de Moura Colares, que, apesar das adversidades, exercem a atividade médica ortopédica com maestria e dedicação e que têm minha profunda admiração e respeito.

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Gráficos	
Lista de Abreviaturas	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Recepção e seleção dos animais	18
4.1.1. Critérios de inclusão.....	18
4.1.2. Critérios de exclusão	18
4.2. Formação dos grupos experimentais	19
4.3. Lesão medular padronizada.....	20
4.3.1. Procedimento anestésico	20
4.3.2. Antibióticos pré-operatórios e analgesia	20
4.3.3. Laminectomia.....	21
4.3.4. Contusão medular.....	24
4.4. Manutenção dos animais	25
4.5. Avaliação locomotora.....	25
4.6. Realização do potencial evocado motor	26
4.7. Eutanásia	28
4.8. Estudo histológico	29
4.8.1. Remoção da medula espinhal.....	29
4.8.2. Análise histológica	29
4.9. Análise estatística	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Análise funcional locomotora de BBB.....	32
5.2. Análise histológica	36
5.3. Análise eletrofisiológica.....	41

6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tricotomia e incisão da pele aproximadamente de 5 cm	22
Figura 2	Dissecção dos músculos paravertebrais expondo de T8 até T12	22
Figura 3	Remoção dos processos espinhosos	23
Figura 4	Exposição da dura-máter após a laminectomia	23
Figura 5	Sistema NYU Impactor, com microcomputador acoplado ao sistema de impacção e com um animal acomodado sobre uma esponja momentos antes do procedimento de lesão.....	24
Figura 6	Rato anestesiado com os eletrodos acoplados e conectados para realização do potencial evocado motor).....	28
Figura 7	Imagem ilustrativa da contagem de fibras à microscopia (coloração: azul de toluidina; 40 X).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Protocolo das drogas utilizadas nos grupos estudados.....	20
Tabela 2	Resultados da avaliação funcional dos ratos divididos nos grupos Controle, EPO, EPO + FK 506, FK 506 e sham, no 2 ^o , 7 ^o , 14 ^o , 21 ^o , 28 ^o , 35 ^o e 42 ^o dias pós-lesão medular	33
Tabela 3	Média da avaliação funcional de BBB no 2 ^o , 7 ^o , 14 ^o , 21 ^o , 28 ^o , 35 ^o e 42 ^o dias pós-lesão medular por grupo	34
Tabela 4	Valores de p relativos à comparação pareada entre a pontuação BBB dos cinco grupos, utilizando o teste de Mann-Whitney, durante as seis semanas (S) do estudo.....	36
Tabela 5	Resultados da avaliação histológica de necrose na área lesionada, por grupo	37
Tabela 6	Resultados da avaliação histológica de hemorragia na área lesionada, por grupo	37
Tabela 7	Resultados da avaliação histológica de hiperemia na área lesionada, por grupo	37
Tabela 8	Resultados da avaliação histológica de degeneração, na área lesionada, por grupo	38
Tabela 9	Resultados da avaliação histológica de infiltrado celular, na área lesionada, por grupo	38

Tabela 10 Valores de p (significância estatística), na comparação da amplitude média e da latência média dos membros posteriores, pareada entre os grupos experimentais.....	41
---	----

LISTA DE GRAFÍCOS

Gráfico 1	Evolução dos valores médios da avaliação funcional nos sete momentos pós-lesão medular	35
Gráfico 2	Resultado do escore histológico na área lesionada em relação à presença de necrose	39
Gráfico 3	Resultado do escore histológico na área lesionada em relação à presença de hemorragia	40
Gráfico 4	Resultado da contagem de neurônios comparativa entre os cinco grupos	40
Gráfico 5	Resultado da latência média dos membros posteriores por grupo	42
Gráfico 6	Resultado da amplitude média dos membros posteriores por grupo....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	adenosinatrifosfato
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
DPLM	dia pós-lesão medular
ECC	escore combinado comportamental
EPO	eritropoetina
EPOr	receptor de eritropoetina
EPOrh	eritropoetina recombinante humana
et al.	e outros
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FK 506	tacrolimo
FKBP-12	<i>FK binding protein 12</i>
FKBP-52	<i>FK binding protein 52</i>
HE	hematoxilina e eosina
IL	interleucina
Ip	intraperitoneal
LM	lesão medular
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury
MP	metilprednisolona
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Study
NF-AT	fator nuclear de células T ativadas
NGF	fator de crescimento de nervo
NYU	New York University
PAC-43	proteína associada ao crescimento 43
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
SF	soro fisiológico
TRM	trauma raquimedular

RESUMO

Coutinho PRM. Avaliação do efeito do tacrolimo e da eritropoetina na lesão medular experimental em ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2015. 65p.

Os efeitos farmacológicos da eritropoetina (EPO) e do tacrolimo (FK 506) têm sido investigados no tratamento da lesão medular, mas são escassos os trabalhos que avaliam a interação entre essas drogas. Neste estudo experimental, 60 ratos Wistar foram submetidos a lesão contusa da medula espinal produzida pelo sistema NYU Impactor. Os animais foram divididos em cinco grupos, sendo: Controle, que recebeu soro fisiológico; EPO, que recebeu eritropoetina; o EPO + FK 506 recebeu EPO associada ao tacrolimo; o FK 506 recebeu tacrolimo. Todas as drogas e o soro fisiológico foram administrados por via intraperitoneal. O grupo Sham foi submetido à lesão medular, mas não recebeu nenhuma droga. Os animais foram avaliados quanto à recuperação da função locomotora em sete diferentes momentos pelo teste de BBB no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o dias após lesão contusa na medula espinal. No 42^o dia, foi realizada avaliação eletrofisiológica dos animais que, logo após, foram sacrificados para análise dos achados histológicos da medula lesionada. Nosso projeto experimental não revelou diferenças na recuperação da função locomotora, nas análises histológica e eletrofisiológica nos animais submetidos ao tratamento farmacológico com eritropoetina e com tacrolimo, após contusão medular torácica.

Descritores: Eritropoetina; Tacrolimo; Traumatismos da Medula Espinal; Sistema Nervoso Central/lesões; Ratos; Neuroimunomodulação/efeitos de drogas.

ABSTRACT

Coutinho PRM. Effects of tacrolimus and erythropoietin in experimental spinal cord lesion in rats [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2015. 65p.

The pharmacological effects of erythropoietin (EPO) and tacrolimus (FK 506) have been investigated in the treatment of spinal cord injuries, but there are few studies that evaluate the interaction between these drugs. In this experimental study, 60 Wistar rats were submitted to contusion spinal cord injury produced by the NYU Impactor system. The animals were divided into five groups: Control, which received saline only; EPO, which received erythropoietin; EPO + FK 506, which received EPO associated with tacrolimus; and the group FK 506, which received tacrolimus. All drugs and saline were administered intraperitoneally. The Sham group underwent spinal cord injury, but did not receive any drug. The animals were evaluated for recovery of locomotor function in seven different times by the BBB test, in the 2nd, 7th, 14th, 21st, 28th, 35th and 42nd days after spinal cord injury. In 42 days, electrophysiological evaluation was performed, and the animals were, shortly after, sacrificed for histological analysis of the injured spinal cord. Our experimental study did not reveal significant differences in the recovery of locomotor function, nor in the histological and electrophysiological analysis in animals treated with erythropoietin and tacrolimus after thoracic spinal cord injury.

Keywords: Erythropoietin; Tacrolimus; Spinal Cord Injuries; Central Nervous System/injuries; Rats; Neuroimmunomodulation/drug effects.

1. INTRODUÇÃO

O trauma raquimedular (TRM) é uma lesão debilitante e que causa importante perda funcional. Embora a incidência seja inferior a 50 casos por milhão de habitantes em muitos países, a morbidade e a mortalidade associadas são dispendiosas, com despesas hospitalares iniciais de aproximadamente US\$ 95.000, por paciente.¹ A incidência é maior em adultos jovens do sexo masculino, com frequência três a quatro vezes maior que no sexo feminino, e pico entre a terceira e a quarta décadas de vida, como resultado de acidentes ou de violência.¹ Cerca de 55% das lesões medulares ocorrem ao nível da coluna cervical, com 45% das lesões sendo completas.¹ No Brasil, a incidência do traumatismo raquimedular encontra-se em torno de 71 casos novos/ano/milhão de habitantes, cerca de 11.000 casos novos/ano.²

A perda funcional que ocorre após o trauma raquimedular é resultado de um processo complexo que ocorre em duas etapas. A lesão primária, causada por um trauma mecânico, consiste num dano estrutural e alteração fisiológica dos axônios, células do tecido neural e ruptura de vasos sanguíneos.³⁻⁵ Hemorragia e necrose ocorrem na substância cinzenta central nas primeiras horas, seguidas de edema e hemorragia nas sete horas seguintes ao trauma.^{6,7} A redução do fluxo sanguíneo local pode ser causada pela hipotensão arterial sistêmica ou pelo edema e hemorragia locais. Essa isquemia cria um cadeia de reações bioquímicas que resultam na morte celular.^{5,8}

Após o trauma inicial, segue-se a lesão secundária que se estende ao tecido adjacente e tem natureza apoptótica.⁹ Ela está associada a uma cascata de alterações neuroquímicas que ocorre de minutos a dias após a lesão inicial, comumente dependente da síntese de várias enzimas.⁹ Figuram, ainda, entre essas alterações a ativação da cascata do ácido araquidônico,¹⁰ a resposta inflamatória, a produção de espécies reativas de oxigênio,¹¹ o aumento da concentração extracelular de aminoácidos, como o glutamato e o aspartato, devido à degradação de proteínas secundária à lesão celular,¹² o edema e a redução do fluxo sanguíneo na medula espinal.¹³

A diminuição do aporte de oxigênio e de nutrientes às células reduz a quantidade de adenosina trifosfato (ATP) disponível, provocando uma disfunção das bombas eletrolíticas da membrana, com a resultante alteração nas concentrações iônicas intracelulares e extracelulares, devido à saída de potássio e à entrada de

sódio, cálcio e cloreto.¹⁴ Esse processo é responsável pelo edema e morte das células e pela liberação de neurotransmissores aminoacídicos das vesículas sinápticas, como por exemplo, o glutamato e o aspartato.^{11,12,14} A citotoxicidade induzida pelo glutamato resulta de um aumento excessivo do influxo de cálcio nos neurônios, o que leva a ativação da fosfolipase A₂, mobilização de ácidos graxos livres, síntese de eicosanoides, geração de radicais livres e diminuição do ATP.¹⁴ Como consequência, ocorre o estímulo da via glicolítica, aumentando o lactato e reduzindo o pH local, o que provoca, num segundo momento, vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, contribuindo para a formação de radicais livres, que causam morte celular.¹⁴

Muito embora esses processos químicos ocorram principalmente na substância cinzenta medular, a consequente liberação de enzimas líticas e de radicais livres acaba lesando a substância branca adjacente. Esses produtos metabólicos também provocam inflamação e desmielinização.¹⁴

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.¹⁵ Nas décadas de 1980 e de 1990, foram publicados três estudos, todos chamados National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS), que preconizavam que a administração de altas doses de metilprednisolona (MP) seria capaz de proporcionar neuroproteção contra o dano secundário em vítimas de trauma medular agudo.¹⁶⁻¹⁸ Embora altas doses de metilprednisolona em curto período de tempo depois da lesão causem complicações respiratórias, sepse e hemorragia gastrointestinal,¹⁵ continuam sendo usadas no tratamento do trauma raquimedular em muitas instituições, porém as evidências que comprovam sua eficácia são fracas.¹⁹⁻²¹ Há efeitos colaterais nessa terapia, com processo deletério para a regeneração neuronal, por inibir a atividade de células imunitárias, o processamento e eliminação de antígenos por macrófagos, causar discreta neutropenia, exacerbação da necrose pós-isquêmica e inibição do brotamento de axônios.¹⁴

Outras drogas têm sido pesquisadas. Várias investigações experimentais em animais têm sugerido como possíveis agentes terapêuticos o estrogênio,^{22,23} os agonistas dos receptores de estrogênio,²⁴ a progesterona,^{25,26} a eritropoetina (EPO),²⁷ o magnésio¹⁵ e os ligantes de imunofilinas, como o tacrolimo (FK 506).²⁸

A eritropoetina é um fator de crescimento hematopoiético produzido nos rins dos adultos e no fígado de fetos, que estimula a proliferação e diferenciação das células progenitoras eritroides. Muitos mecanismos, que agem em diferentes passos na cascata de danos secundários após o TRM,^{27,29} são relacionados ao efeito neuroprotetor da eritropoetina. Eles são mencionados na literatura como protetores contra lesão do sistema nervoso central pós-isquemia,^{30,31} como tendo função antiapoptótica^{32,33} e anti-inflamatória,³⁴ além de inibidora da peroxidação lipídica.³⁵

Foi demonstrado, por métodos imunistoquímicos, que a eritropoetina é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e se ligar aos seus receptores, que existem em abundância no sistema nervoso central, em capilares dentro da substância branca, nos corpos e nos dendritos proximais dos motoneurônios no corno anterior da medula espinal.^{31,36} Observou-se um efeito neuroprotetor marcante após lesões isquêmicas e de reperfusão que podem suceder procedimentos cardiológicos, nos quais haja diminuição do suprimento sanguíneo para a medula espinal, uma vez que a eritropoetina e seu receptor possuem expressão modulada pela hipoxemia.³¹

Imunofilinas pertencem a uma família de proteínas receptoras para drogas imunossupressoras, como a ciclosporina A, o FK 506 (tacrolimo) e seus análogos não imunossupressores, que são chamadas coletivamente de ligantes de imunofilina.²⁸ Elas possuem alta concentração no sistema nervoso central, cerca de 50 vezes maior que nas células do sistema imune.^{28,37}

Tacrolimo é um neologismo baseado em *Tsukuba macrolid immunosuppressant*, antibiótico macrolídeo produzido pela bactéria *Streptomyces tsukubaensis*, descoberto e isolado em 1984 de uma amostra de solo obtida em *Tsubaka* no Japão.^{38,39} O tacrolimo é uma droga com atividade imunossupressora, capaz de cruzar a barreira hematoencefálica, aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) e utilizada para prevenção de rejeição em transplantes alógenos.

Os efeitos imunossupressores do tacrolimo e da ciclosporina A, suprimindo a proliferação de linfócitos T ocorrem através de um mecanismo comum, a inibição da calcineurina, uma proteína ativadora dos canais de cálcio, após a ligação com suas proteínas receptoras específicas.⁴⁰⁻⁴² Estudos revelaram que existem diferentes tipos de receptores para o tacrolimo, que podem mediar imunossupressão ou regeneração nervosa.^{40,43,44} O receptor FKBP-12 (*FK binding protein*) é uma proteína

citoplasmática que possui peso molecular de 12 kDa e que é responsável pela atividade imunossupressora do tacrolimo via inibição da calcineurina.^{28,43} O efeito neurotrófico ocorre por um mecanismo independente da ativação da calcineurina, após a ligação com a proteína receptora de 52 kDa: a FKBP-52^{37,43-45} que exerce sua atividade biológica, aumentando a expressão de uma proteína neuronal chamada de proteína associada ao crescimento 43 (PAC-43) em neurônios sensitivos no gânglio da raiz dorsal em ratos.^{46,47} Na literatura, além desses efeitos, são atribuídas ao FK 506 as propriedades de restaurador das reservas depletadas de ATP mitocondrial, redutor do edema mitocondrial e redutor do índice de oxidação celular, promovendo a elevação da glutathione,⁴⁸ protetora dos axônios contra lesão secundária após o trauma raquimedular.⁴⁹ Em modelos experimentais, o FK 506 demonstrou regeneração nervosa em lesões nervosas traumáticas⁵⁰ e doenças neurodegenerativas.⁵¹

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é estudar o efeito do tacrolimo e da eritropoetina como agentes neuroprotetores e neurotróficos, de forma isolada ou associada, na lesão medular padronizada em modelo animal.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Carnot e Deflandre,⁵² em 1906, descrevem a presença de reticulócitos em coelhos normais, após a injeção de plasma de coelhos anêmicos, e postulam a existência de um fator humoral, chamado de hemopoetina. Cinco anos mais tarde, Allen⁵³ desenvolve um modelo experimental para produzir lesão medular. Utilizando cães com lesão medular causada pela queda de peso sobre a medula espinal, mantendo a dura-máter íntegra, ele relaciona a intensidade da lesão como o produto em gramas da massa pela altura em centímetros, sendo o resultado expresso em g x cm. Em 1914, Allen⁵⁴ relata que um impacto produzido pela queda de 240 g x cm produz lesão parcial da medula com recuperação melhor que aquele produzido pela queda de 400 g x cm. Observa a presença de edema e hemorragia nas substâncias cinzenta e branca da medula espinal nos primeiros 15 minutos e, após quatro horas do trauma, há evidência de edema nos axônios nas colunas lateral e posterior da substância branca da medula espinal. Salienta que a redução da pressão intramedular por mielotomia melhora a recuperação clínica dos animais do estudo e sugere que o aumento da pressão intramedular causado pelo edema e hemorragia agrava a necrose isquêmica após a lesão traumática inicial.

Na década de 1940, Krumdieck⁵⁵ sugeriu a presença de uma substância eritropoética contida plasma sanguíneo de coelhos anêmicos, que, uma vez injetada em coelhos saudáveis, gera um estímulo proliferativo à medula óssea. O efeito biológico desse estímulo é hiperplasia eritroide, com aumento significativo no número de reticulócitos no sangue dos animais normais. Bonsdorff e Javalisto⁵⁶ dão ao fator humoral que estimula a produção de células vermelhas em coelhos submetidos a hipóxia, anteriormente chamado de hemopoetina, o nome de eritropoetina.

Reissmann⁵⁷ fornece evidências da presença de um mecanismo humoral por experiências em ratos cirurgicamente conectados. O autor demonstra, em 1950, que, quando um dos ratos do par é exposto à hipóxia, a eritropoese é aumentada no rato parceiro com oxigenação normal.

Tarlov,⁵⁸ em estudo publicado em 1954, apresenta um método de avaliação da recuperação da função locomotora em animais que sofreram lesão medular

experimental, no qual o tempo para produzir paralisia e o tempo de compressão medular são inversamente proporcionais ao prognóstico de recuperação dessa função. Para produzir a lesão medular experimental, o autor realiza laminectomia de T12 em cães e introduz um balão que, quando inflado, resulta em lesão medular extradural por compressão.

Prossegue a pesquisa sobre eritropoetina na década de 1950. Jacobson et al.⁵⁹ identificam os rins como sendo o local principal de produção de eritropoetina num mamífero adulto. Descobrem que a nefrectomia bilateral em ratos impede o aumento da eritropoetina no plasma após um estímulo decorrente de sangramento.

Ducker et al.⁵ realizam estudo experimental em 32 macacos *Rhesus*, publicando o trabalho em 1971. Realizam laminectomia da transição torácica e lombar (T12 – L1), expõem a dura-máter e produzem lesão medular por queda livre de um êmbolo colocado a 20 cm de altura. Os grupos são divididos de acordo com a massa do embolo que é de 10, 15, 20 e 25 g. Concluem que a lesão aguda é mais central do que periférica e, de acordo com a intensidade do traumatismo, os danos secundários podem ser limitados à necrose da substância cinzenta central ou podem progredir até a substância branca periférica.

Miyake et al.⁶⁰, em 1977, isolam a eritropoetina da urina de pacientes anêmicos e identificam a sequência de aminoácidos que, mais tarde, possibilitou aos cientistas clonar o gene responsável pela sua produção.

Em 1978, Balentine^{6,61} realiza estudo experimental de lesão medular em ratos produzida pela técnica de queda de peso sobre a medula exposta por laminectomia na região torácica alta. Observa "tubulovesiculação" dos axônios imediatamente após o trauma e edema na substância branca. A necrose axonal inicia-se 30 minutos após o trauma e se completa dentro de 8 a 24 horas. O autor encontra duas anormalidades básicas na mielina: degeneração vesicular e vacuolização intramielínica.

No mesmo ano de 1978, Ducker et al.⁸ medem os níveis de oxigênio tecidual e o fluxo sanguíneo na medula em cães paraplégicos decorrente de trauma medular. Sugerem que a lesão medular produz grande diminuição do fluxo sanguíneo e que os esforços terapêuticos devem ter como objetivo melhorar a oxigenação e aumentar do fluxo sanguíneo para medula.

Na década de 1980, iniciam-se novos estudos com a eritropoetina. Lin et al.⁶² clonam e expressam o gene da eritropoetina humana a partir de uma biblioteca de fago genômico usando sondas oligonucleotídicas. A região codificadora do gene é contida num fragmento HindIII-BamHI de 5,4 quilobases. O gene da eritropoetina, quando introduzido em células de ovário de hamster chinês, produz eritropoetina que é biologicamente ativa *in vitro* e *in vivo*. Eschbach et al.⁶³ administram eritropoetina recombinante humana (EPOrh) no tratamento de pacientes com doença renal terminal, dialíticos, por via endovenosa. Observam que a EPOrh é efetiva e pode reduzir a necessidade de hemotransfusão e pode elevar o hematócrito a níveis normais em pacientes com doença renal terminal.

A linha de estudos sobre lesão experimental, no entanto, não se interrompe. Bresnahan et al.⁶⁴ desenvolvem um aparelho de impacção com função eletromecânica, sensível às características do tecido lesado e que permite manipulação contínua da força de impacto ou do deslocamento tecidual. Descrevem os resultados anatômicos e comportamentais de um determinado índice de impacto e examinam a capacidade do aparelho em produzir uma lesão traumática consistente. Noble e Wrathall⁶⁵ promovem lesão medular contusa e graduada em ratos e examinam a relação entre a substância branca residual e o déficit funcional em diferentes momentos após a lesão. Observam lesões na substância cinzenta com o aspecto de cavidades uma semana após a lesão inicial. A hemorragia é mais evidente entre 15 minutos e 24 horas após a lesão. A presença de áreas contendo cavidades ocorre em todos os grupos, que sofreram lesão, após 24 horas, e essas áreas aumentam significativamente até valores máximos observados após uma semana de lesão. Utilizam uma escala de avaliação da função motora, o escore motor, que é uma modificação do teste de Tarlov. Aplicam, após cada sessão de teste, o escore combinado comportamental (ECC) que varia de zero para o rato normal até 100% para o rato com paralisia dos membros inferiores. Demonstram que há total correlação entre a substância branca residual e o déficit funcional medido pelo ECC e que isso é observado após quatro semanas, quando a lesão está totalmente desenvolvida.

Kino et al.³⁸ isolam, em 1984, a partir de uma amostra de solo obtida em Tsubaka no Japão, o tacrolimo, antibiótico macrolídeo produzido pela bactéria *Streptomyces tsukubaensis*.

A década de 1990 começa com pesquisas sobre o FK 506. Liu et al.⁴¹ demonstram que a ciclosporina A e o FK 506 possuem um passo citoplasmático em comum na sinalização dependente do cálcio. Sugerem que a calcineurina possui esse papel na formação de complexos com a calmodulina.

Tator e Fehlings⁶⁶ enumeram as principais causas de lesão medular, citando os acidentes automobilísticos, traumas esportivos ou em atividades recreativas, acidentes de trabalho e quedas em casa. Relatam que metade desses pacientes com trauma medular apresentam lesão completa sem preservação dos níveis abaixo da lesão. Conceituam os termos lesão primária da medula e lesão secundária. Definem, como lesão primária, o trauma mecânico e a lesão anatômica no instante do trauma e, como lesão secundária, aquela decorrente de uma cascata de episódios bioquímicos. Descrevem as alterações histológicas na medula lesada, incluindo hemorragia, edema, necrose axonal e neuronal, desmielinização, formação cística e infarto. Estudam, por microscopia eletrônica, a microcirculação medular, o fluxo sanguíneo medular, os efeitos da auto-regulação medular no trauma agudo e os efeitos cardiovasculares e hemodinâmicos do trauma medular. Documentam que a hemorragia observada imediatamente após o trauma agudo está associada a zonas isquêmicas na substância branca. Discutem os vários métodos de tratamento sobre os efeitos vasculares da lesão medular aguda, como os bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas opioides e os esteroides. Apresentam evidências de que a isquemia pós-traumática é um mecanismo secundário importante da lesão medular e que pode ser contida com o uso de corticoides. Concluem que os efeitos vasculares pós-traumáticos podem ser tratados. A normotensão pode ser restaurada com a expansão de volume ou vasopressores e o fluxo medular pode melhorar com dopamina, corticoides e expansores de volume.

Behrmann et al.⁶⁷ retomam a pesquisa da lesão experimental. Apresentam um aparelho para produzir contusão medular em ratos, que são comparados com um outro grupo submetido a secção anatômica da medula. Realizam análise histológica e comportamental da recuperação locomotora pela modificação da escala de Tarlov.

Observam a marcha dos animais em campo aberto, em plano inclinado e em grade. Demonstram haver recuperação funcional nos animais que sofreram contusão medular quando comparados com o grupo que foi submetido à secção, e estabelecem correlação entre a recuperação funcional dos animais e a substância branca residual nos cortes histológicos da área experimentalmente lesionada.

Gruner⁶⁸ apresenta um novo modelo de aparelho monitorado para realizar lesão contusa na medula de ratos submetidos a estudo experimental. Salaria que o aparelho é uma alternativa aos anteriormente descritos na literatura, pois permite que o circuito elétrico possa ser utilizado em conexão com o monitor do impactor que estará em contato com a dura-máter, de modo a obter medidas da velocidade de impacto e da quantidade de contusão medular.

Liu,⁴² utilizando a ciclosporina A e o FK 506 como sondas, consegue interceptar a via de transdução de sinal dependente de cálcio que emana do receptor de células T, inibindo assim a ativação de células T *helper*. Dessa forma, biólogos descobriram várias moléculas sinalizadoras intracelulares que participam da geração de segundo mensageiro de Ca que é intermediário na ativação da transcrição de interleucina 2 (IL-2), entre os quais estão a calmodulina, a calcineurina e o fator nuclear de células T ativadas (NF-AT). Assim, Ca²⁺ se liga a calmodulina, que ativa a calcineurina que, por sua vez, pode desfosforilar a subunidade citoplasmática de NF-AT, o que resulta na sua translocação desde o citoplasma para o núcleo para promover transcrição da IL-2. Conforme descrito por Jun Liu, essas drogas manifestam os seus efeitos bloqueando a sinalização intracelular de moléculas. Os dois complexos de imunofilina-fármaco estruturalmente distintos se ligam a e inibem a atividade de fosfatase da calcineurina. O autor conclui que os já conhecidos efeitos antiinflamatórios dos corticoides mostram-se benéficos na preservação celular nas lesões medulares.

Basso et al.⁶⁹ afirmam que os estudos da recuperação locomotora em ratos que sofreram lesão medular têm seguido modificações da escala de Tarlov, o que dificulta a comparação de resultados entre os laboratórios. Apresentam, em estudo publicado em 1995, uma escala de índice de recuperação locomotora em ratos que sofreram lesão medular produzida em laboratório. Demonstram que a escala é eficiente, ampla e não ambígua. Denominam a escala de BBB (Basso, Beattie e

Bresnahan) e concluem que é uma medida válida e previsível da recuperação, sendo capaz de distinguir resultados comportamentais em diferentes tipos de lesões e prever alterações anatômicas no centro da lesão. Afirmam que examinadores, em diferentes laboratórios, podem reproduzir a análise dos resultados do teste BBB, oferecendo uma medida mais discriminativa do resultado comportamental, permitindo uma melhor avaliação do uso de drogas aplicadas após lesão medular.

Basso et al.⁷⁰ padronizam um aparelho, o NYU Impactor, desenhado para realizar lesão medular contusa em ratos. Citam o teste BBB como sendo mais sensível que os demais até então descritos para avaliar a recuperação da função locomotora em ratos que sofreram lesão medular contusa. Demonstram que o sistema NYU Impactor permite produzir uma contusão medular graduada, consistente e reproduzível em todos os ratos. Confirmam que uma maior quantidade de tecido poupado está diretamente relacionada com melhor função locomotora final quando aplicada a escala BBB. Documentam aumento dos movimentos dos membros posteriores em duas semanas após lesão compressiva ou por transecção medular. Concluem que a escala BBB é aplicável, após a utilização do sistema NYU Impactor, na análise da recuperação da função locomotora em ratos com lesão medular contusa.

Bavetta et al.⁴⁹ estudam os efeitos do FK 506 e de outro ligante de imunofilina, o GPI 1046, sobre a sobrevivência e a regeneração de axônios após lesão do fascículo grácil na região torácica da medula espinal, em alguns casos combinada com o esmagamento do nervo ciático, em ratos adultos. Uma dose de FK 506 (0,5 ou 2,0 mg/kg) e de GPI 1046 (10 ou 40 mg/kg) foi administrada por via subcutânea imediatamente após a cirurgia e cinco vezes por semana depois disso. Alguns animais receberam metilprednisolona (MP), em duas doses subcutâneas de 30 mg/kg, além de, ou em vez de, FK 506. Após 1-12 semanas, foi realizado um estudo histológico, no qual se observou um brotamento axonal importante nos locais das lesões em animais com lesão do nervo ciático e tratados com ligantes de imunofilina. Os autores concluem que o FK 506 protege axônios de lesão secundária após o trauma da medula espinal, e, neste modelo experimental, o seu efeito neuroprotetor é maior do que o da MP.

Rodrigues, em 1999,⁷¹ padroniza um modelo de lesão de medula espinal 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.

Metz et al.⁷² relatam, no ano seguinte, que modelos animais são largamente utilizados em estudos fisiopatológicos, tanto quanto em estratégias de tratamento para lesões do sistema nervoso central, porém os autores preocupam-se em verificar se os resultados de estudos em modelos com ratos portadores de lesão medular são aplicáveis aos humanos. Os autores comparam parâmetros funcionais, eletrofisiológicos e morfológicos seguidos de lesão medular em ratos e em humanos e sugerem haver uma relação análoga entre eles. Concluem que as técnicas para avaliação da extensão e gravidade da lesão do sistema nervoso central em ratos e humanos são de valores comparáveis e indicam que o rato pode servir como um animal adequado para pesquisa de alterações morfológicas e funcionais após lesão do sistema nervoso central (SNC) e para avaliação dos efeitos de novas estratégias terapêuticas.

Brines et al.³⁰ afirmam, em 2000, que a eritropoetina (EPO) também medeia neuroproteção quando a forma recombinante (EPOrh) é injetada diretamente em lesão isquêmica cerebral experimental em roedores. Observam expressão abundante do receptor de eritropoetina (EPOr) em capilares do cérebro, o que poderia fornecer uma rota de circulação de EPO para entrar no cérebro. De acordo com essa hipótese, a administração sistêmica de EPOrh antes ou até 6 horas após a isquemia cerebral focal reduz a dimensão da lesão em cerca 50-75%.

Hurlbert²⁰ revisa a literatura, com métodos de medicina baseada em evidência, para avaliar o uso de metilprednisolona na lesão medular aguda. Seus resultados, publicados em 2000, mostram que a metilprednisolona não deve ser recomendada no uso rotineiro para o tratamento da lesão medular aguda não penetrante. O uso prolongado pode ser de risco para o paciente e o autor considera a metilprednisolona uma droga sob investigação. No ano seguinte, Short²¹ publica revisão sistemática da literatura e deixa evidente não haver suporte para o uso de altas doses de metilprednisolona na lesão medular aguda a fim de melhorar a recuperação neurológica.

Gorio et al.³⁴ utilizam, após lesão medular, EPOrh em dois modelos e comparam os resultados funcionais. Uma compressão moderada de 0,6 newtons (N) foi produzida por aplicação de um grampo de aneurisma ao de nível T3 durante 1 minuto; em seguida, EPOrh (1.000 unidades por kg de peso corporal, intraperitoneal), administrada imediatamente após o lançamento de compressão, foi associada com recuperação parcial da função motora em até 12 h após a lesão, que era quase completa após 28 dias. Os animais tratados com solução salina apresentavam apenas fraca recuperação. No segundo modelo, os autores utilizam a EPOrh em dosagem superior (5.000 unidades por kg de peso corporal, i.p. administrada uma vez de 1 hora após a lesão), que produziu uma recuperação superior da função locomotora quando comparada aos controles tratados com solução salina após uma contusão ao nível T9. No modelo de lesão medular mais intensa, a inflamação secundária, assim como a cavitação foram atenuadas pela administração de EPOrh. Essas observações sugerem que EPOrh proporciona recuperação precoce da função locomotora, especialmente após a compressão da medula espinal, com supostas funções de anti-inflamatórias e anti-apoptóticas.

Celik et al.³¹ (2002) produzem isquemia medular em coelhos por oclusão da aorta abdominal, durante 20 minutos, seguida da administração de EPO exógena via endovenosa (350, 800, ou 1.000 UI/kg de peso corporal), imediatamente após soro fisiológico ou o início da reperfusão. A recuperação funcional, assim como a análise histológica comparativa dos animais, foi melhor para aqueles tratados com EPOrh. Essas observações sugerem uma ação benéfica aguda e retardada da EPO exógena no tratamento da lesão isquêmica medular.

Vialle et al.,⁷³ no mesmo ano de 2002, testam um modelo de escala de avaliação locomotora para a lesão medular e propõem um protocolo. Utilizam dois grupos de 10 ratos. O primeiro é submetido a lesão medular após laminectomia ao nível de T9–T10 pelo sistema NYU Impactor, estabelecendo peso de 10 g e altura de 25 mm. O segundo grupo, utilizado como controle, sofreu apenas laminectomia sem lesão do saco dural. Procedem a avaliação da função locomotora dos animais no 7^o, 14^o e 21^o dia após a lesão medular, realizando seis testes. Concluem que o modelo de avaliação testado é eficaz e quantificam de maneira satisfatória a recuperação das funções locomotoras em três dos seis testes.

Kaptanoglu et al.,³⁵ em publicação de 2004, dividem ratos submetidos a trauma raquimedular em sete grupos: três deles tratados com eritropoetina em diferentes doses únicas intraperitoneais (100 UI/kg, 1000 UI/kg e 5000 UI/kg), um com metilprednisolona, um somente com laminectomia, outro com laminectomia e trauma e um grupo com albumina. Observam, à microscopia eletrônica, que a EPO nas doses de 1.000 UI/Kg e a EPO na dose de 5.000 UI/kg inibem a peroxidação lipídica com mais eficácia que a metilprednisolona, e que a neuroproteção ultraestrutural é similar. O melhor resultado bioquímico foi obtido com a EPO na dose de 5.000 UI/kg.

López-Vales et al.⁷⁴ estudam, em 2005, a eficácia do FK 506 em reduzir o dano tecidual secundário após um trauma raquimedular contuso em modelo animal. Após realizarem um trauma contuso em ratos ao nível de T8, injetam metilprednisolona intraperitoneal, FK 506 ou soro fisiológico em grupos distintos. Num grupo adicional, além do FK 506 em bolo, foi injetada uma dose diária 10 vezes menor que a dose inicial. A recuperação funcional foi avaliada usando a caminhada em campo aberto, o teste em plano inclinado, o potencial evocado motor e a observação de reflexos por 14 dias após a cirurgia. Os animais tratados com FK 506 demonstraram, com significância estatística, melhores resultados na função neurológica e amplitude de potencial evocado motor quando comparados aos controles. Esses resultados sugerem que o FK 506 teria ação protetora após o trauma raquimedular.

Arishima et al.³² utilizam ratos submetidos à lesão medular contusa que, em seguida, receberam intraperitonealmente EPO. A partir de uma análise histológica e imunoistoquímica realizada entre seis horas e sete dias após a lesão, concluem, em publicação de 2006, que o tratamento com eritropoetina diminuiu significativamente o número de neurônios e de oligodendrócitos apoptóticos até sete dias após a lesão.

Yousuf et al.,⁴⁸ em seu estudo experimental publicado em 2011, investigam os efeitos neuroprotetores da ciclosporina A e do FK 506 no processo oxidativo na substância branca, após um trauma medular em ratos. Dividem os animais em quatro grupos, cujas medulas foram submetidas a condições de hipóxia por uma hora, exceto no grupo *sham*, e tratados com ciclosporina A e FK 506 e comparados com o grupo controle. Após a hipóxia, foi realizada reperfusão por duas horas e os tecidos, logo em seguida, foram processados e analisados quanto ao edema mitocondrial, aos

níveis de ATP (adenosina trifosfato) mitocondrial, de glutatona, de mieloperoxidase, de peroxidação lipídica e de cálcio. Concluem que essas duas drogas restauram as reservas depletadas de ATP mitocondrial, inibem o aumento de volume mitocondrial e diminuem os índices de oxidação com elevação da glutatona, sugerindo que o FK 506 e a ciclosporina A possuem efeitos antioxidantes.

Cerri et al.⁷⁵ realizam estudo de trauma medular contuso em modelo animal. Nos ratos tratados com EPOrh, os resultados, publicados em 2012, mostram melhora geral tanto na transmissão nas vias sensoriais quanto nas vias espinais motoras poupadas. Foram realizadas pontuação, certificação e avaliação imunoistoquímica do segmento caudal à lesão da medula espinal, sugerindo que as vias medulares poupadas podem contribuir para a melhora da transmissão que, por sua vez, pode ser responsável pela recuperação da função locomotora.

Chen et al.,⁷⁶ em seu estudo experimental publicado em 2013, avaliam o suposto efeito sinérgico do FK 506 e do fator de crescimento de nervo (NGF) para o tratamento de lesões da medula espinal de ratos. A expressão da proteína NF200 em ratos com lesão medular foi determinada utilizando coloração imunoistoquímica, e os níveis de expressão de NF200 RNAm foram observados através da reação da polimerase em cadeia (PCR) reversa. A restauração das funções da medula espinal foi avaliada utilizando a pontuação da escala BBB. A análise dos resultados demonstrou que o tratamento combinado melhora significativamente a expressão de NF 200 assim como as funções da medula espinal quando comparado aos resultados de um único tratamento. Assim, em suas observações experimentais, os autores sugerem que FK 506 e NGF mostram um efeito sinérgico no tratamento da lesão medular em ratos e que o tratamento combinado pode efetivamente promover a regeneração neural e a recuperação funcional em ratos após lesão medular.

Freitag et al.⁷⁷ realizam estudo experimental em ratos, submetidos a trauma medular contuso, divididos em dois grupos, um dos quais tratado farmacologicamente com eritropoetina (EPO) após o trauma e outro controle. Realizam avaliação da função locomotora a partir da pontuação BBB, nas medulas espinais extraídas, realizam estudo de imagem com ressonância magnética reforçada com manganês e, finalmente, uma análise histológica no epicentro da lesão. Concluem, em seu trabalho publicado em 2014, que a ressonância magnética reforçada com manganês descreve com êxito o

efeito terapêutico de EPO no trauma raquimedular agudo. A EPO conduz a recuperação significativa, em ratos, determina resposta imune reduzida e reduz significativamente o número de células apoptóticas no epicentro lesão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e de Traumatologia (IOT) e pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, protocolo de pesquisa número 006/12) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

A produção das lesões, a terapia farmacológica, a realização da análise motora e a eutanásia foram realizadas no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LETRAN) e na Divisão de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP). A análise histológica foi realizada no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo.

Foram selecionados 60 ratos da raça Wistar, que foram aleatoriamente divididos em cinco grupos homogêneos, e realizou-se lesão medular contusa torácica utilizando o equipamento computadorizado de impacto por queda de peso desenvolvido pela Universidade de Nova York (NYU Weight-Drop Impactor).

Utilizou-se, para a avaliação da função locomotora dos animais, em momentos predeterminados do estudo, o protocolo padronizado na instituição, proposto por Basso, Beattie e Bresnahan: o BBB. Ao final do experimento, foi realizada comparação das taxas de recuperação da função locomotora entre os grupos. Os animais, logo após a lesão medular contusa, foram submetidos a primeira avaliação motora pós-lesão, segundo o protocolo BBB, e considerados como portadores de lesão medular. Receberam diferentes tipos de abordagem farmacológica, de acordo com o grupo a que pertenciam.

Os animais foram mantidos em gaiolas e, após um período 48 horas, foram submetidos a uma segunda avaliação locomotora segundo o protocolo padronizado na instituição. No 42^o dia de experimento, foi realizada uma avaliação eletrofisiológica utilizando o potencial evocado motor, para graduação do déficit neurológico.

Os animais foram, após a análise eletrofisiológica, sacrificados e suas medulas analisadas histologicamente quanto a necrose, hemorragia, hiperemia,

degeneração de substância nervosa e infiltrado celular e, além disso, realizada contagem de neurônios.

4.1. Recepção e seleção dos animais

Para a seleção dos ratos a serem submetidos à lesão medular, seguimos os critérios de inclusão e de exclusão estabelecidos por Rodrigues⁷¹ e Santos et al.,⁷⁸ e utilizados no LETRAM, conforme segue.

4.1.1. Critérios de inclusão

Ratos da linhagem Wistar, machos e adultos jovens;

Peso entre 320 e 340 gramas, inclusive;

Pelagem normal sob inspeção visual;

Estado clínico normal avaliado por um veterinário do Biotério de Manutenção da Área de Pesquisas Biológicas do Laboratório de Biomecânica LIM-41 do IOT-HC-FMUSP;

Motricidade normal de acordo com o BBB.

4.1.2. Critérios de exclusão

Óbito após a lesão (durante o experimento);

Alterações cutâneas na área da incisão, observadas macroscopicamente

Autofagia ou mutilação entre os animais;

Infecção profunda e refratária a antibioticoterapia após lesão;

Infecção urinária após 10 dias de tratamento com antibiótico (presença de sangue na urina);

Movimentação normal após a lesão (21 pontos na escala BBB);

Pontuação entre as patas traseiras após a lesão medular superior a três pontos segundo a escala BBB.

Adotou-se como padrão de análise o menor valor entre os lados ou o de maior déficit motor segundo as orientações internacionais da Ohio State University.

4.2. Formação dos grupos experimentais

Realizou-se o cálculo amostral seguindo a fórmula $N = (DP/d)^2$ que matematicamente representa o quadrado da razão entre o desvio padrão (DP) e o valor de Cohen (d) como preconizado, para esse tipo de experimento, na literatura.⁷⁹ Ao utilizar poder de 80%, DP de 2,8 e um d de 0,8, obtém-se N de 12 animais por grupo.

A amostra foi composta por 60 ratos, aleatoriamente divididos e sequencialmente alocados em cada grupo. Os animais, todos da linhagem Wistar, apresentam características iguais e foram divididos em cinco grupos. Em cada um dos quatro primeiros grupos, logo após a lesão medular, foi fornecida uma dose intraperitoneal (ip) de: solução salina a 0,9% no grupo Controle; eritropoetina (1.000 UI/kg) no grupo EPO; eritropoetina (1.000 UI/kg) e tacrolimo (1 mg/kg) no grupo EPO + FK 506; tacrolimo (1 mg/kg) no grupo FK 506. No grupo Sham, foi realizado apenas o trauma medular contuso, sem fornecimento de dose intraperitoneal de qualquer substância.

Tabela 1. Protocolo das drogas utilizadas nos grupos estudados

Grupo	Número de ratos	Resumo do tratamento
Controle	12	LM; 1 ml de SF a 0,9% com 5 minutos
EPO	12	LM; 1.000 UI/kg EPO com 5 minutos
EPO + FK 506	12	LM; 1.000 UI/kg EPO + tacrolimo 1 mg/kg com 5 minutos
FK 506	12	LM; 1 mg/kg de tacrolimo com 5 minutos
Sham	12	LM; sem administração de drogas

LM = lesão medular; SF = soro fisiológico; EPO = eritropoetina.

4.3. Lesão medular padronizada

4.3.1. Procedimento anestésico

Os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de xilazina e 50 mg/kg de quetamina por via intraperitoneal, 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.

4.3.2. Antibióticos pré-operatórios e analgesia

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), em dose de 5 mg/kg, imediatamente após a lesão e uma vez ao dia durante os três dias seguintes.

Após a cirurgia, foram ministrados aos ratos 2 mg/kg de meloxicam (anti-inflamatório não hormonal) uma 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.

4.3.3. Laminectomia

Cada rato foi submetido a laminectomia, conforme a técnica cirúrgica estabelecida no Instituto de Ortopedia e Traumatologia,^{71,80} para a exposição da medula com o auxílio de um microscópio cirúrgico. Em seguida, o animal foi posicionado no equipamento computadorizado para impacto por queda de peso para o procedimento de contusão medular.

Procedeu-se a tricotomia no local da incisão no dorso de cada rato (**Figura 1**). Realizou-se uma incisão de pele, de aproximadamente cinco centímetros, na linha média dorsal para expor a coluna vertebral de T8 a T12 (**Figura 2**). Afastaram-se os músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas de T10 a T11 (**Figura 3**). Identificou-se a última costela, correspondente a T12, e palpam-se os processos espinhosos de T8 e T12, para sua identificação. Utilizou-se um coagulador bipolar para hemostasia, quando necessário. Removeu-se o processo espinhoso e a lâmina de T10 e a metade distal do processo espinhoso de T9 com um saca-bocados. Realizou-se a laminectomia, para visualização do saco dural (**Figura 4**), com dimensão necessária para obter uma margem de segurança, em torno de 0,2 mm, e acomodar adequadamente a extremidade da haste do equipamento computadorizado de impacto.



Figura 1. Tricotomia e incisão da pele aproximadamente de 5 cm.



Figura 2. Dissecção dos músculos paravertebrais expondo de T8 até T12.



Figura 3. Remoção dos processos espinhosos.



Figura 4. Exposição da dura-máter após a laminectomia.

4.3.4. Contusão medular

Utilizou-se o sistema NYU Impactor, desenvolvido na década de 90,⁶⁸ para realizar e monitorar a contusão medular (**Figura 5**). Os procedimentos foram os seguintes:

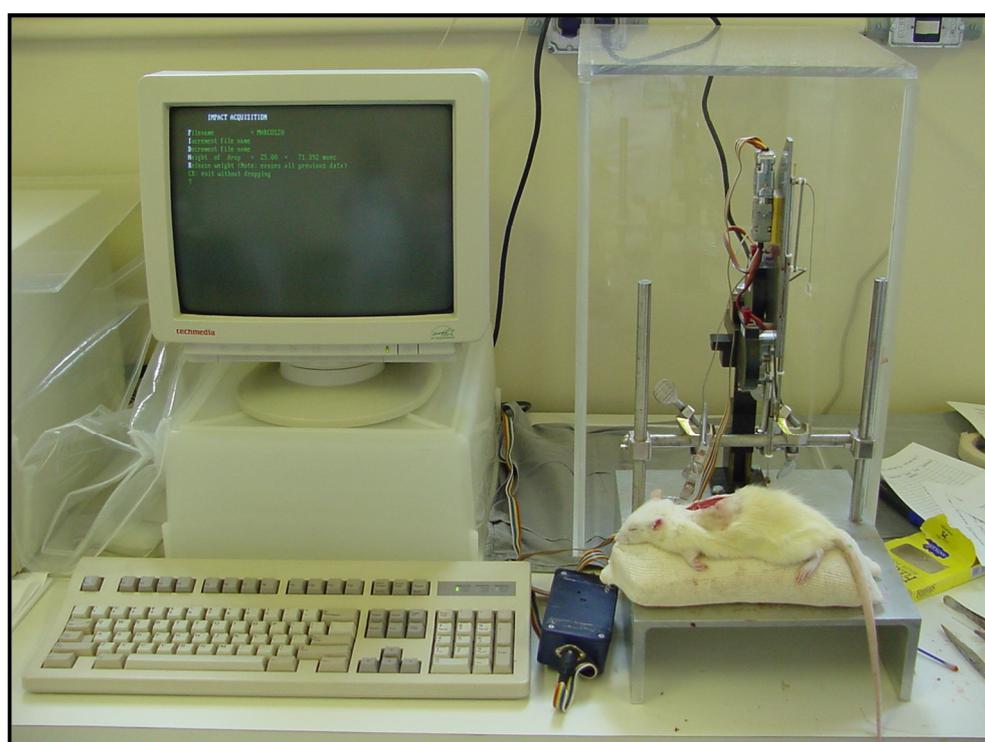


Figura 5. Sistema NYU Impactor, com microcomputador acoplado ao sistema de impacção e com um animal acomodado sobre uma esponja momentos antes do procedimento de lesão.

Posicionou-se o rato no equipamento computadorizado de impacto por queda de peso. Os processos espinhosos de T8 e T11 foram fixados com presilhas e acomodou-se o rato sobre uma esponja. Ajustou-se a haste do equipamento na posição zero (inicial) e prendeu-se a garra de base margem da ferida cirúrgica. Centralizou-se a extremidade da haste do equipamento entre T9 e T10, ajustada para

obter um impacto direto com a medula; o contato foi confirmado por sinal sonoro e luminoso emitidos pelo equipamento. Após elevar-se a haste de 10 g de peso a uma altura de 25 mm, ela foi liberada, com o conseqüente trauma medular moderado e emissão de um sinal luminoso na cor azul.

Colocou-se o rato em uma superfície aquecida e inspecionou-se o sítio de contusão. Procedeu-se a hemostasia de qualquer sangramento presente. A ferida cirúrgica foi suturada por planos com fio de nylon monofilamentado (3.0).

4.4. Manutenção dos animais

O rato foi transferido para uma câmara com temperatura controlada (25 graus Celsius). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas forradas de 60 x 40 cm. Colocou-se, no máximo, cinco ratos em cada gaiola, sob condições adequadas de higiene, de alimentação e de hidratação. Os animais foram mantidos numa mesma gaiola durante o experimento para melhor familiarização e redução da agressividade e das mutilações entre eles. Controlou-se a temperatura ambiente, e mantiveram-se as gaiolas forradas para prevenir úlceras de pressão. Verificou-se a ocorrência de feridas provocadas por autofagia.

A bexiga foi esvaziada duas vezes ao dia, por compressão vesical manual, 6 e 24 horas após a lesão e diariamente quando necessário até o momento da eutanásia. Verificou-se a coloração e o odor da urina.

4.5. Avaliação locomotora

A avaliação da função locomotora foi realizada no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o dias após a lesão medular contusa, seguindo protocolo de avaliação motora BBB. Baseados nos itens dessa escala, observamos os movimentos da articulação do quadril, joelho e tornozelo e a posição do tronco, cauda e patas traseiras. A partir

dessas observações, são atribuídos pontos de zero a 21, sendo o zero correspondente à ausência total de movimentos e o 21, à presença de movimentos normais.

Em nosso estudo, as medidas de locomoção foram realizadas por dois examinadores treinados, sem o conhecimento do grupo de origem do rato, que observaram simultaneamente cada animal pelo tempo mínimo de quatro minutos, com domínio prévio dos atributos da ficha de pontuação (**Anexo A**),⁶⁷ que contém 10 atributos de padrões de recuperação da função locomotora: 1) movimentação dos membros inferiores; 2) posição do tronco; 3) posição do abdome; 4) acomodação das patas; 5) marcha; 6) coordenação; 7) capacidade de limpar as patas; 8) posição predominante das patas traseiras; 9) instabilidade do tronco; 10) posição da cauda de acordo com os termos descritos na escala de avaliação (**Anexo B**).⁶⁷ Os examinadores possuíam uma planilha da escala de BBB, onde realizavam anotações sistemáticas dos resultados, comparando as diferenças encontradas entre eles, para reaplicar o teste, caso necessário, assim, reduzindo o risco de erro de interpretação. Caso houvesse discordância entre as avaliações, decidiu-se pela anotação da menor nota.

4.6. Realização do potencial evocado motor

O potencial evocado motor foi realizado conforme técnica padronizada no Instituto,⁸¹ utilizando um aparelho de eletromiografia de quatro canais, dois eletrodos de agulha monopolares do tipo saca-rolha E0401 da Neuromedical para estimulação elétrica transcraniana, um eletrodo de agulha monopolar para ser utilizado como terra e quatro pares de eletrodos de agulha monopolares para serem utilizados na captação das respostas motoras nos quatro membros.

Em seguida, os animais foram medidos entre a região occipital e a base do início da cauda e pesados, para comparar as latências observadas nos diferentes ratos e para cálculo da dose anestésica a ser aplicada, respectivamente. Foi realizada dose intraperitoneal única de pentobarbital, de 55 a 75 mg/kg, associado com ketamina, 55 a 75 mg/kg, intramuscular. Em seguida, realizou-se a tricotomia da região craniana, para facilitar a colocação dos eletrodos no couro cabeludo.

A captação das respostas musculares foi realizada com a colocação de pares de eletrodos de agulha monopolar, com distância inter-eletrodos definida e fixa, para captação nos membros anteriores e posteriores, inseridos na musculatura proximal e anterior dos quatro membros (**Figura 6**). 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-rolha no couro cabeludo, na região frontal (anodo) e no occipital (catodo), sobre a linha inter-hemisférica, para a estimulação bilateral simultânea. Após a colocação dos eletrodos no rato, ligou-se o equipamento e verificou-se a impedância dos eletrodos, para comprovar a sua boa adaptabilidade, a fim de obter respostas mais nítidas, seguras e fidedignas. Na calibração do aparelho, foram utilizados, na captação das respostas musculares, os seguintes parâmetros: janela de 20 ms, sensibilidade 2 mV/div., filtro de baixa frequência 10 Hz e de alta frequência de 10 KHz, e estimulação elétrica transcraniana através de estímulo único de 0,2 ms de duração.

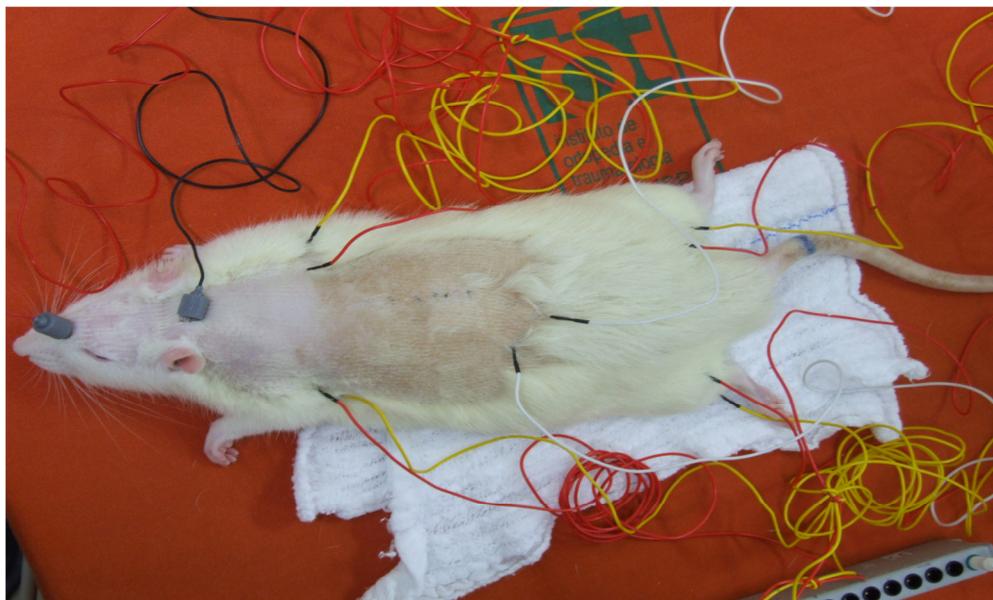


Figura 6. Rato anestesiado com os eletrodos acoplados e conectados para realização do potencial evocado motor

4.7. Eutanásia

Os animais foram sacrificados no 42º dia após a lesão, com injeção de uma dose tóxica para o animal de 140 mg/kg de pentobarbital intraperitoneal, de acordo com as regras e regulamentações da CAPPesq do HC-FMUSP.

4.8. Estudo histológico

4.8.1. Remoção da medula espinhal

A medula do animal foi dissecada e, em seguida, ressecada a partir do nível intervertebral C3 até nível T10 e, posteriormente, aderida linearmente em papel cartão com suas respectivas identificações topográficas, principalmente onde se observaram achados macroscópicos de contusão medular, os quais foram identificados como áreas cefálicas “A” e caudais à lesão “C”. Depois de identificadas e acondicionadas, as medulas foram fixadas em formalina a 10%.

4.8.2. Análise histológica

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

Cada área previamente identificada como lesionada foi seccionada no plano axial de forma macroscópica em intervalos de dois milímetros, partindo da área central da lesão, em uma extensão de um centímetro.

Todos os fragmentos foram submetidos aos processos histológicos que compreendem a desidratação em banhos de álcool, diafanização em xilol e impregnação por parafina líquida. Cada fragmento foi emblocado em parafina e posteriormente identificado com a topografia do respectivo material.

Os blocos parafinados foram encaminhados para o processo de microtomia, cortes histológicos, nos quais se obtêm cortes com, no máximo, cinco micras de espessura, utilizando-se um micrótomo (Leica RM 2055 – elétrico), e disposição em lâminas descartáveis (Erviagas). As lâminas de vidro utilizadas no processo receberam previamente um banho de silane, para se obter um melhor resultado na aderência dos materiais à superfície.

Para a análise qualitativa, as lâminas, contendo cortes transversais da medula no epicentro da lesão e regiões próximas, foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE). Em seguida, classificaram-se as alterações anatomopatológicas como presente (P) e ausente (A), sendo avaliada a presença de: necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância nervosa e infiltrado celular. Atribuiu-se uma pontuação que varia de 0 a 3 (ausente, discreto, moderado e intenso) para cada um dos achados em cada corte da medula histologicamente estudado.

Para a análise quantitativa, foram fotografadas porções medulares, fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% e coradas com azul de toluidina a 1%, com boa representação das células, escolhidas de forma aleatória. Para as fotografias, foi utilizada objetiva de 40 vezes (**Figura 7**). Foram selecionados dois campos de cada segmento, escolhidos ao acaso pelo patologista. As fotos foram analisadas no software Sigma Scan Pro5.0 para a contagem das fibras dos axônios regenerados. Somente os neurônios com diâmetro igual ou maior do que 15 μm foram considerados para contagem.

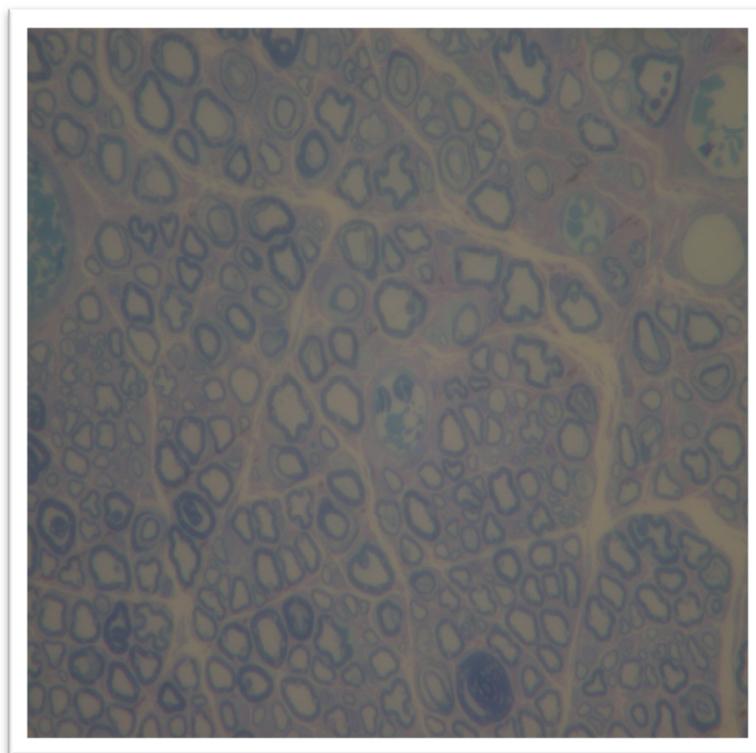


Figura 7. Imagem ilustrativa da contagem de fibras à microscopia (coloração: azul de toluidina; 40 X).

4.9. Análise estatística

Os dados foram colecionados em uma planilha do *software* Microsoft Excel for MAC e posteriormente foram exportados para o *software* SPSS 20.0 for MAC para análise dos dados.

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 HE foi considerada medida subjetiva, e a contagem de neurônios, objetiva.

Toda a amostra foi testada quanto à sua distribuição normal. Como os animais foram testados ao longo de sete momentos, em algumas medidas, e havia cinco grupos, os testes variaram entre paramétricos e não paramétricos para medidas independentes e para medidas repetidas, dependendo da sua distribuição gaussiana ou não. Para análise entre os grupos, foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, na comparação entre mais de dois grupos, e de Mann-Whitney, na comparação pareada entre dois grupos, e análise de variância (ANOVA) de uma via, para análise do BBB, da contagem de células e da análise histológica. Para análise do seguimento de cada grupo, foi utilizado o teste de ANOVA para medidas repetidas. Foi aceito o erro do tipo I com $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Durante a realização deste estudo, cada grupo teve uma perda de dois animais, mas foi mantido o número de 10 ratos por grupo, que é o número necessário de animais, conforme o padronizado no Instituto, para esse tipo de experimento. No grupo controle, os ratos 2 e 6 morreram em decorrência de processo infeccioso na primeira e na terceira semana, respectivamente; no grupo EPO, o rato 5 morreu por autofagia, na quarta semana, e o rato 10 morreu de causa indefinida, na segunda semana; no grupo EPO + FK 506, o rato 2 morreu, na terceira semana, por autofagia e o rato 4 foi excluído, com vida, por infecção urinária intratável; no grupo FK 506, o rato 6 foi excluído, com vida, por autofagia e o rato 9 morreu em decorrência de infecção na segunda semana; no grupo sham, o rato 4 morreu, na segunda semana, por infecção urinária e o rato 1 foi excluído, com vida, por autofagia.

5.1. Análise funcional locomotora de BBB

A **Tabela 2** mostra o resultado da avaliação funcional, segundo a escala locomotora de BBB, de todos os grupos no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o dias após a lesão medular. A partir do 7^o dia pós-lesão medular (DPLM), observou-se diferença com significância estatística na avaliação da função locomotora entre os cinco grupos, conforme mostra a **Tabela 2**, na próxima página.

Tabela 2 – Resultados da avaliação funcional dos ratos divididos nos grupos Controle, EPO, EPO + FK 506, FK 506 e sham, no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o dias pós-lesão medular

Grupo	Rato	2 ^o DPLM	7 ^o DPLM	14 ^o DPLM	21 ^o DPLM	28 ^o DPLM	35 ^o DPLM	42 ^o DPLM	
controle	1	0	2	4	6	8	12	14	
	2	0	óbito	-	-	-	-	-	
	3	0	0	5	6	9	13	14	
	4	0	1	5	4	5	9	14	
	5	0	2	3	3	4	8	8	
	6	0	0	2	2	óbito	-	-	
	7	1	1	3	3	4	5	6	
	8	0	1	1	1	3	2	4	5
	9	0	4	6	6	8	9	13	13
	10	0	3	3	3	7	12	13	12
	11	0	3	5	5	7	9	14	12
	12	0	2	4	4	7	8	9	12
EPO	1	0	4	6	7	9	14	16	
	2	0	4	5	7	12	15	16	
	3	0	1	1	2	8	13	13	
	4	1	2	4	5	4	12	12	
	5	0	0	1	0	óbito	-	-	
	6	0	2	2	2	6	9	10	
	7	0	2	4	7	8	12	15	
	8	0	0	2	5	12	14	14	
	9	1	3	4	9	13	14	14	
	10	1	0	óbito	-	-	-	-	
	11	1	3	4	6	8	6	11	
	12	0	1	2	5	7	9	12	
EPO + FK 506	1	0	0	3	8	14	15	16	
	2	1	0	1	óbito	-	-	-	
	3	1	6	8	9	13	17	17	
	4	-	-	-	-	-	-	-	
	5	1	5	6	12	12	14	15	
	6	1	0	2	4	8	7	12	
	7	0	4	7	8	9	12	15	
	8	0	0	6	7	9	14	13	
	9	1	0	5	7	12	14	17	
	10	0	0	6	4	8	12	13	
	11	0	2	4	7	12	11	11	
	12	1	0	3	8	12	11	11	
FK 506	1	0	2	3	7	4	6	6	
	2	0	4	6	8	11	12	13	
	3	0	5	6	7	5	8	9	
	4	1	4	6	8	8	5	7	
	5	0	4	5	8	12	14	16	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
	7	0	4	3	2	7	8	11	
	8	0	3	4	6	8	6	6	
	9	0	0	óbito	-	-	-	-	
	10	0	0	2	4	3	12	15	
	11	0	2	2	3	5	4	4	
	12	2	5	6	4	6	9	11	
sham	1	-	-	-	-	-	-	-	
	2	1	1	1	3	5	5	7	
	3	0	0	3	3	9	12	12	
	4	0	0	óbito	-	-	-	-	
	5	0	0	4	3	4	8	8	
	6	0	1	2	2	3	5	8	
	7	0	0	0	0	0	1	4	
	8	1	3	3	4	5	5	8	
	9	0	1	4	8	5	6	6	
	10	1	1	2	6	4	5	8	
	11	0	0	0	7	6	8	10	
	12	0	3	4	3	2	4	7	

DPLM: dia de pós-lesão medular

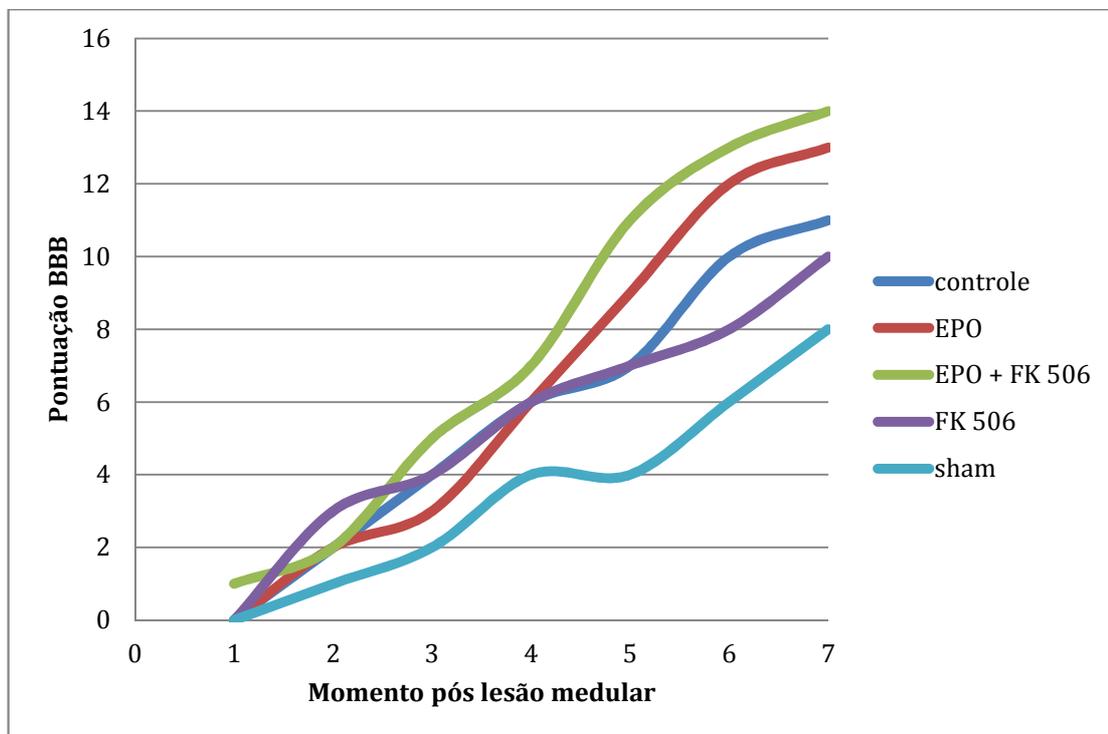
As médias dos valores da avaliação BBB obtidos nos sete momentos é representada na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Média da avaliação funcional de BBB no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o dias pós-lesão medular por grupo

Grupos	2 ^o DPLM	7 ^o DPLM	14 ^o DPLM	21 ^o DPLM	28 ^o DPLM	35 ^o DPLM	42 ^o DPLM	Média por grupo
Controle	0,1	1,9	3,9	5,5	7,1	10	11	5,6
EPO	0,3	2,2	3,4	5,5	8,7	11,8	13,3	6,5
EPO+FK 506	0,5	1,7	5	7,4	10,9	12,7	14	7,5
FK 506	0,3	3,3	4,3	5,7	6,9	8,4	9,8	5,5
Sham	0,3	1	2,3	3,9	4,3	5,9	7,8	3,6

Houve aumento progressivo na pontuação média do BBB em todos os sete momentos do estudo em todos os cinco grupos, como é demonstrado no **Gráfico 1**. Foi realizado estudo estatístico dos resultados comparativos do BBB em cada momento. Através do teste de Kruskal-Wallis e ANOVA, observaram-se diferenças com significância estatística a partir do segundo momento (sétimo dia) de avaliação ($p \leq 0,05$) entre os cinco grupos. Através das comparações dois a dois, realizaram-se testes *post hoc* semanalmente entre os grupos para verificar significância estatísticas entre eles.

Gráfico 1 – Evolução dos valores médios da avaliação funcional nos sete momentos pós-lesão medular



Observa-se melhora progressiva da pontuação BBB em todos os grupos, durante os sete momentos do estudo. No sétimo momento, conforme exibido na **Tabela 4**, verificamos diferença significativa entre o grupo controle e os grupos EPO e EPO + FK 506. Ao final do estudo, os grupos EPO e EPO + FK 506 não apresentaram diferença com significância estatística na pontuação BBB.

Tabela 4 – Valores de p relativos à comparação pareada entre a pontuação BBB dos cinco grupos, utilizando o teste de Mann-Whitney, durante as seis semanas (S) do estudo

Grupos	BBB 1S	BBB 2S	BBB 3S	BBB 4S	BBB 5S	BBB 6 S
Controle versus EPO	0,605	0,495	0,482	0,167	0,83	0,042
Controle versus EPO + FK 506	0,205	0,095	0,028	0,005	0,80	0,032
Controle versus FK 506	0,047	0,143	0,701	0,195	0,032	0,109
Controle versus Sham	0,007	0,049	0,094	0,004	0,002	0,004
EPO versus EPO +FK 506	0,528	0,032	0,014	0,115	0,889	0,929
EPO versus FK 506	0,035	0,045	0,731	0,011	0,000	0,001
EPO versus Sham	0,062	0,260	0,400	0,000	0,000	0,000
EPO + FK 506 versus FK 506	0,030	0,410	0,019	0,000	0,000	0,001
EPO + FK 506 versus Sham	0,316	0,007	0,001	0,000	0,000	0,000
FK 506 versus Sham	0,000	0,008	0,272	0,097	0,224	0,465

5.2. Análise histológica

Os escores atribuídos a cada rato de cada grupo são apresentados nas **Tabelas 5 a 9**. Os **Gráficos 2 a 4** representam os achados mais relevantes encontrados na região lesionada. Houve diferença entre os cinco grupos em relação à presença de necrose e hemorragia celular. Na análise microscópica dos parâmetros hiperemia, degeneração e infiltrado celular no tecido medular na área de contusão, e posteriormente, por meio do teste qui-quadrado, não se observou diferença com significância estatística entre os cinco grupos.

Tabela 5 – Resultados da avaliação histológica de necrose na área lesionada, por grupo

Necrose					
Grupo	Ausente	Discreto	Moderado	Intenso	Total
Controle	3	2	4	0	9
EPO	1	7	1	0	9
EPO + FK 506	1	9	0	0	10
FK 506	0	2	4	4	10
Sham	0	6	2	2	10

Tabela 6 – Resultados da avaliação histológica de hemorragia na área lesionada, por grupo

Hemorragia					
Grupo	Ausente	Discreto	Moderado	Intenso	Total
Controle	1	5	3	0	9
EPO	1	6	2	0	9
EPO + FK 506	1	8	0	1	10
FK 506	1	0	8	1	10
Sham	0	5	3	2	10

Tabela 7 – Resultados da avaliação histológica de hiperemia na área lesionada, por grupo

Hiperemia					
Grupo	Ausente	Discreto	Moderado	Intenso	Total
Controle	2	5	1	1	9
EPO	0	7	2	0	9
EPO + FK 506	2	5	2	1	10
FK 506	0	4	5	1	10
Sham	0	2	5	3	10

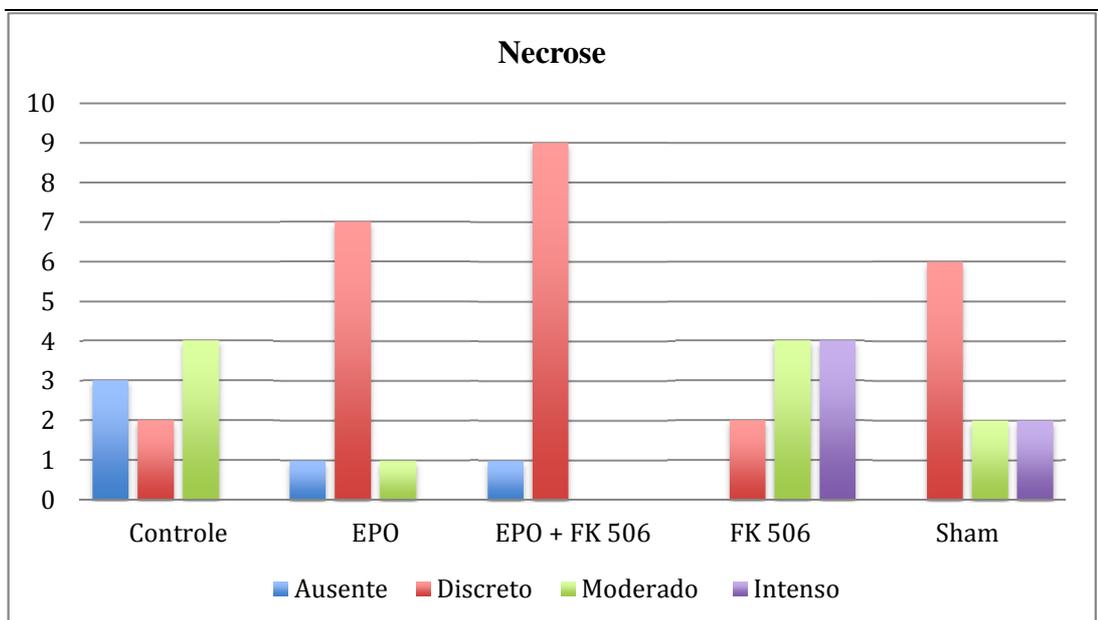
Tabela 8 – Resultados da avaliação histológica de degeneração, na área lesionada, por grupo

Degeneração					
Grupo	Ausente	Discreto	Moderado	Intenso	Total
Controle	3	4	2	0	9
EPO	3	2	4	0	9
EPO + FK	2	4	4	0	10
506					
FK 506	0	3	3	4	10
Sham	0	4	3	3	10

Tabela 9 – Resultados da avaliação histológica de infiltrado celular, na área lesionada, por grupo

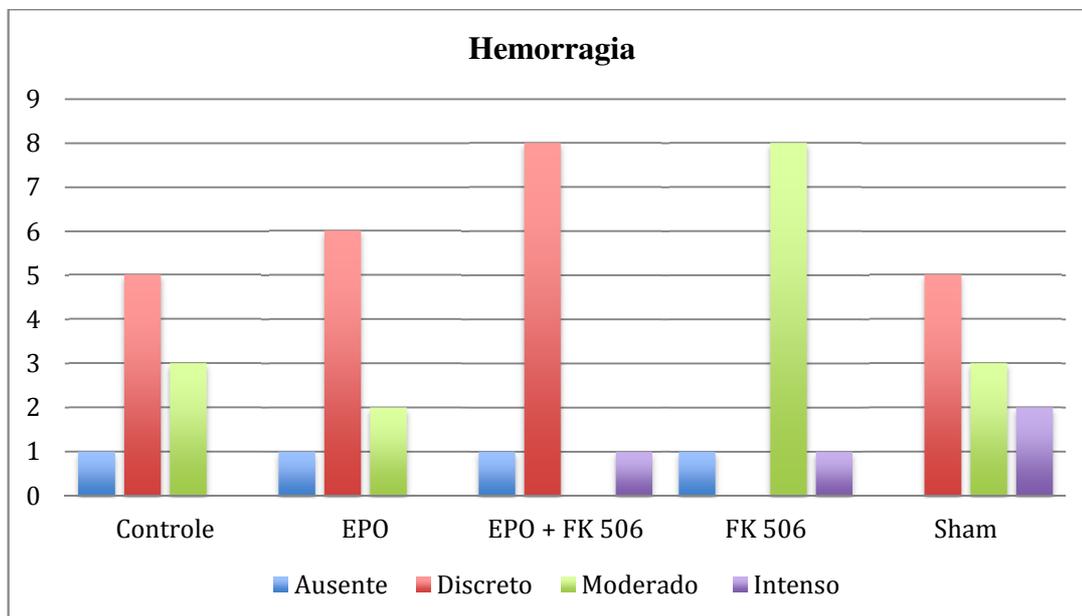
Infiltrado celular					
Grupo	Ausente	Discreto	Moderado	Intenso	Total
Controle	1	4	3	1	9
EPO	2	3	3	1	9
EPO + FK	1	3	4	2	10
506					
FK 506	0	3	3	4	10
Sham	0	5	5	0	10

Gráfico 2 – Resultado do escore histológico na área lesionada em relação à presença de necrose



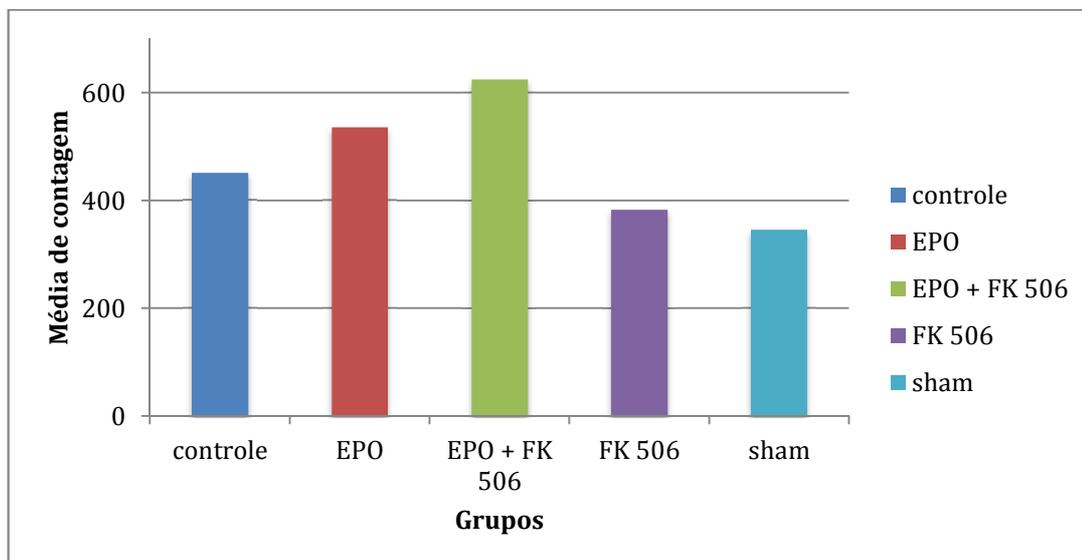
Em relação à necrose, ao se utilizar o teste qui-quadrado, observou-se diferença com significância estatística do grupo controle com grupo sham ($p = 0,054$) e com o grupo da eritropoetina e tacrolimo associados ($p = 0,009$), entre o grupo da eritropoetina com o do tacrolimo ($p = 0,023$) e entre o grupo da eritropoetina associada ao tacrolimo com o do tacrolimo ($p = 0,004$).

Gráfico 3 – Resultado do escore histológico na área lesionada em relação à presença de hemorragia



Em relação à hemorragia, ao se utilizar o teste qui-quadrado, observou-se diferença com significância estatística entre o grupo da eritropoetina e o do tacrolimo ($p = 0,014$), entre o grupo da eritropoetina e tacrolimo associados e o do tacrolimo ($p = 0,001$) e entre o grupo do tacrolimo e o Sham ($p = 0,035$).

Gráfico 4 – Resultado da contagem de neurônios comparativa entre os cinco grupos



Na contagem de neurônios, utilizando o teste ANOVA, verificou-se diferença estatística entre os grupos ($p = 0,001$) em geral. Constatou-se também diferença com significância estatística entre os grupos EPO + FK 506 e FK 506 ($p = 0,011$) e entre os grupos EPO + FK 506 e *sham* ($p = 0,002$)

5.3. Análise eletrofisiológica

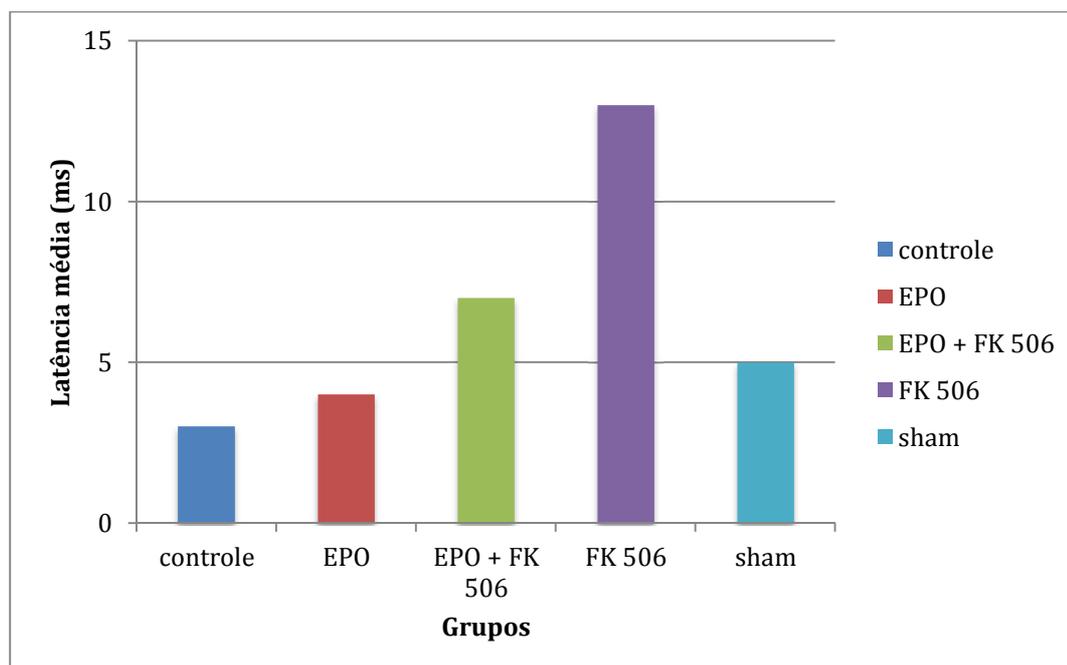
Os **Gráficos 5 e 6** mostram os resultados médios da avaliação eletrofisiológica da latência e da amplitude nos membros inferiores de todos os cinco grupos. A **Tabela 10** exhibe os valores de p (significância estatística), na comparação pareada entre os cinco grupos.

Tabela 10 – Valores de p (significância estatística), na comparação da amplitude média e da latência média dos membros posteriores, pareada entre os grupos experimentais

Grupos	Amplitude média (mA)	Latência média (ms)
Controle versus EPO	0,045	0,001
Controle versus EPO + FK 506	0,000	0,000
Controle versus FK 506	0,000	0,000
Controle versus Sham	0,903	0,000
EPO versus EPO + FK 506	0,000	0,002
EPO versus FK 506	0,000	0,000
EPO versus Sham	0,024	0,151
EPO + FK 506 versus FK 506	0,001	0,001
EPO + FK 506 versus Sham	0,001	0,093
FK 506 versus Sham	0,000	0,000

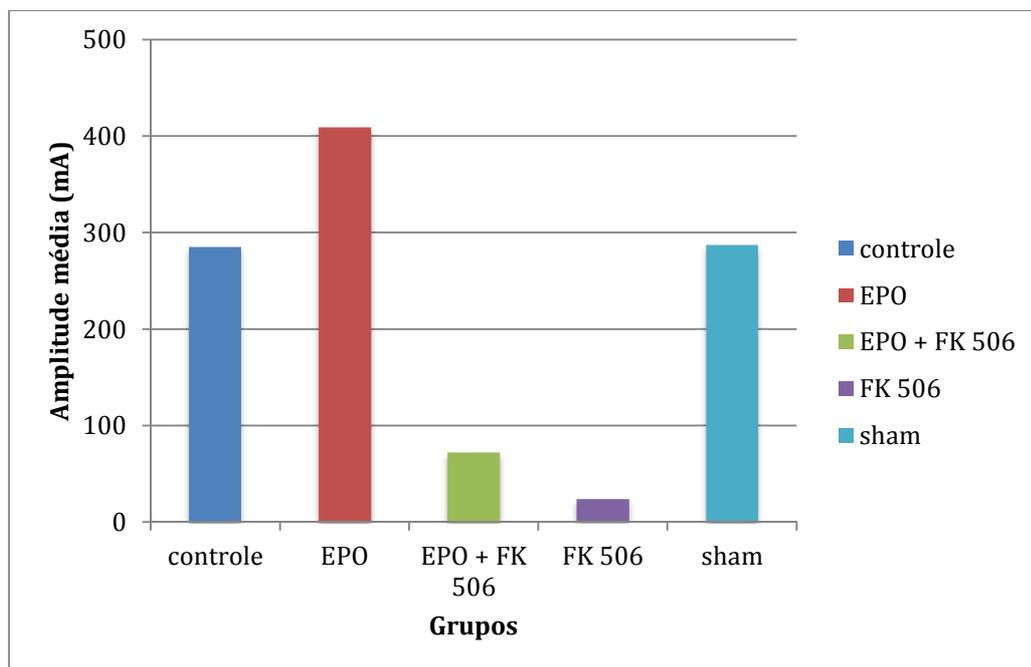
Considerando a amplitude média dos membros posteriores, não houve diferença estatisticamente significativa ao se comparar, pelo teste de Mann-Whitney, o grupo Sham e o Controle. Na latência média dos membros posteriores, não houve diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo sham e os grupos EPO e EPO + FK 506.

Gráfico 5 – Resultado da latência média dos membros posteriores por grupo.



Ao se utilizar o teste Mann-Whitney, observou-se diferença com significância estatística na latência média entre o grupo Controle e todos os outros quatro grupos experimentais. Os maiores valores atingidos pelo grupo FK 506 em relação a todos os outros grupos foram estatisticamente significantes, conforme exibido na **Tabela 10**.

Gráfico 6 – Resultado da amplitude média dos membros posteriores por grupo.



Ao se utilizar o teste Mann-Whitney, observou-se diferença com significância estatística na amplitude média dos membros posteriores entre todos os grupos ($p < 0,05$), exceto entre controle e sham, conforme exibido na **Tabela 10**.

6. DISCUSSÃO

Desde o início do século XX, vários modelos experimentais de lesão medular em animais têm melhorado nossa compreensão da fisiopatologia do trauma raquimedular, da morte celular secundária e dos mecanismos básicos de regeneração. A técnica de queda de peso foi primeiramente descrita por Allen^{53,54} e se tornou o método padrão ouro no estudo do trauma medular em modelo animal em várias instituições. Com os estudos de Basso et al.,⁷⁰ houve grande avanço no estudo experimental da lesão medular, com a utilização do sistema NYU Impactor, que foi desenvolvido em 1992 por Gruner.⁶⁸

Para se realizar a avaliação da resposta motora de um animal submetido a um trauma raquimedular agudo e medicado com uma droga, é necessária a padronização do método de lesão e de avaliação de sua recuperação locomotora.⁷⁰ Nossos experimentos seguiram as normas do MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study), utilizando como animal de experimentação o rato. Apesar das diferenças fisiológicas e funcionais, os fenômenos relacionados à morte celular e à inflamação e o padrão de recuperação da função locomotora, quando os ratos são submetidos a lesão da medula espinal, são semelhantes, apoiando o grande valor dos roedores como modelos animais de pesquisa em trauma raquimedular.^{72,82} Optamos pela utilização de ratos da raça Wistar como animais de experimentação em nosso estudo, de acordo com as normas do MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study).

Utilizamos o NYU Impactor, para produzir a lesão medular contusa nos animais, padronizado em 1999, no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos (LETRAN) do IOT-HC-FMUSP.⁷¹ O sistema NYU Impactor foi selecionado porque nos garante a produção de um trauma medular graduado e controlado, uma vez que permite monitorização precisa da altura de queda do peso, da velocidade do impacto e do índice de compressão em todos os animais.⁶⁸ Esse sistema pode ser graduado com a queda da haste de altura em 12,5, 25 e 50 mm. Escolhemos a altura de 25 mm, porque a altura de 50 mm causa lesão medular completa, com mortalidade alta na primeira semana, e os ratos lesados com a queda do peso a 12,5 mm apresentavam recuperação parcial em 7 a 10 dias.^{70,71,83}

Conforme já adiantamos, desde o início do século passado, diversos autores desenvolveram métodos para a avaliação da recuperação da função locomotora em modelos animais submetidos ao trauma raquimedular contuso experimental.^{58,65,84} Eles criaram sistemas de pontuações, baseados na descrição de um padrão de evolução da recuperação locomotora dos animais, os quais são de difícil aplicação, propiciando falhas de interpretação.⁶⁹ A escala de BBB, descrita por Basso et al., em 1995,⁶⁹ permite avaliar a capacidade de recuperação locomotora de ratos após contusão medular produzida pelo sistema NYU Impactor. Essa escala é um sistema de 21 pontos (**Anexo B**),⁶⁷ baseados em achados comportamentais operacionalmente definidos, os quais seguem a progressão de recuperação desde a paralisia completa (escore 0) até a locomoção normal (escore 21). A sua utilização na avaliação da evolução da recuperação funcional de ratos que sofreram lesão medular contusa, produzida pelo sistema NYU Impactor, já foi previamente examinada e comprovou-se que a escala é válida e aplicável.^{69,70}

Em nosso estudo, sacrificamos os animais no 42^o dia após a lesão medular inicial, pois o objetivo foi analisar os efeitos da recuperação funcional na fase aguda e realizar uma análise histológica dos animais. Os estudos de Basso et al.^{69,70} demonstram, com a análise da evolução da função locomotora, pelo método de BBB, que os animais que sofreram lesão medular contusa pelo sistema NYU Impactor apresentam recuperação importante a partir do 14^o dia após o trauma inicial, sem a utilização de drogas (escore da escala de BBB superior a 10). Os autores demonstram que, até a segunda semana, dificilmente os animais ultrapassam o escore 6 na escala do BBB. Isso foi por nós considerado um fator importante na elaboração do planejamento do estudo, pois uma melhora significativa da função locomotora, em até duas semanas, poderia indicar a possibilidade desta observação ser decorrente da ação das drogas utilizadas.

Verificamos, em nossa análise da função locomotora, melhora significativa do déficit funcional em todos os ratos dentro do mesmo grupo, quando comparado o 2^o com o 42^o dia após a lesão medular. A análise estatística dos escores do teste do BBB, entre o segundo e o sétimo dia, revelou paralisia importante dos membros inferiores dos animais, com escore entre mínimo de 0 e máximo de 7, não havendo diferença significativa dentro dos grupos e entre os grupos. Esses achados sugerem que ocorra inicialmente uma parada transitória da função fisiológica medular,

aparentemente mais grave que o déficit neurológico, que será definitivo, o que está de acordo com o postulado por Basso et al.⁷⁰ Essas observações comprovam que a aplicação de contusão medular pelo sistema NYU Impactor, com carga de 10 g a 25 mm de altura, é capaz de produzir lesão medular incompleta em ratos. Podemos afirmar que a avaliação locomotora pelo método de BBB, nas primeiras 48 horas, não reflete o resultado definitivo da lesão neurológica produzida. Essas observações são concordantes com a literatura.^{70,84}

O potencial para recuperação, após um trauma medular provocado em animais experimentais, é proporcional à quantidade viável de axônios ascendentes e descendentes remanescentes na substância branca e de sua mielinização. As estratégias farmacológicas enfocam o controle do processo lesivo secundário da medula, primariamente a peroxidação lipídica e a maior manutenção possível de elementos da substância branca viáveis.⁸⁵

Modelos experimentais e observações clínicas da lesão medular aguda suportam o conceito da lesão medular secundária, na qual uma lesão mecânica é sucedida por uma série de eventos deletérios que promovem dano tecidual progressivo e isquemia.^{8,86,87} Assim, embora a lesão mecânica primária seja determinada pelas circunstâncias do trauma e seja geralmente irreversível, existe uma cascata de eventos biológicos que resultam na lesão medular secundária, que pode ser amenizada pela ação terapêutica de drogas neuroprotetoras.⁶⁶

Apesar de existirem várias substâncias utilizadas para a atenuação dos efeitos da lesão medular após um trauma agudo, escolhemos a eritropoetina e o tacrolimo para realizarmos este estudo porque, segundo vários autores, essas substâncias têm mostrado benefícios clínicos com melhora da função neurológica.^{30-36,75,76,88}

Muitos mecanismos relacionados ao efeito neuroprotetor da eritropoetina são mencionados na literatura como protetores contra lesão do SNC pós-isquemia,^{30,31} moduladores da função antiapoptótica^{32,33} e com função anti-inflamatória,³⁴ além de inibidores da peroxidação lipídica.³⁵ Os efeitos do tacrolimo são mencionados na literatura como restauradores das reservas depletadas de ATP mitocondrial, redutores do edema mitocondrial e do índice de oxidação celular, promovendo a elevação da glutathione⁴⁸ e protegendo os axônios contra lesão secundária após o trauma raquimedular.⁴⁹

Ao comparamos a progressão da pontuação segundo a escala BBB do grupo controle com a do grupo EPO, verificamos que, a partir da terceira semana, houve recuperação funcional mais rápida do grupo EPO, embora sem significância estatística. Na sexta semana do estudo, os animais do grupo EPO apresentaram maior pontuação BBB, com diferença significativa. A progressão mais rápida e a maior pontuação final na escala BBB, do grupo tratado com eritropoetina, sugerem um possível efeito atenuante na lesão medular secundária. Com a metodologia utilizada, foi possível comprovar essa hipótese, uma vez que se observou diferença estatisticamente significativa no resultado final da avaliação funcional empregada, como também descrito por outros investigadores.⁸⁹ Essa superioridade do grupo tratado com eritropoetina, com significância estatística, apenas na sexta semana do estudo, em comparação com outros autores, pode ser atribuída a várias diferenças no desenho experimental, como a raça, o sexo, e o peso dos ratos utilizados, o tipo de dispositivo empregado para induzir a lesão da medula, tornando-se provável que as características biomecânicas da lesão sejam diferentes entre estudos. O momento e a frequência em que a droga foi administrada também diferem entre os estudos. Embora nossos resultados não anulem o efeito neuroprotetor potencial de eritropoetina que tenha sido previamente documentado por outros investigadores,^{27,34,90} eles apontam para a necessidade de uma investigação experimental mais aprofundada para refinar a abordagem terapêutica na lesão da medula espinal.

No grupo EPO + FK 506, utilizamos a eritropoetina associada ao tacrolimo com o objetivo de avaliar um possível efeito sinérgico das duas drogas nos mecanismos relacionados à neuroproteção da lesão secundária ao trauma medular contuso, uma vez que, na literatura, não há estudos da associação das duas drogas no tratamento do trauma raquimedular. Embora desde a segunda semana, o grupo EPO + FK 506 tenha apresentado a progressão mais acentuada na pontuação BBB, somente ao final do estudo, na sexta semana, apresentou-se estatisticamente superior ao controle, além disso, não apresentou diferença estatisticamente significativa, na pontuação da escala BBB, em relação ao grupo EPO, mas se apresentou diferente, com significância estatística, do grupo FK 506. Isso sugere que a eritropoetina e o

tacrolimo não têm efeito sinérgico quando utilizados em conjunto, com repercussão funcional detectável ao método empregado.

O grupo FK 506, em nossa análise da pontuação BBB, não apresentou diferença com significância estatística quando comparado com o grupo controle, concordando com estudos realizados na última década.^{91,92} Apresentou pontuação inferior com relevância estatística quando comparado ao grupo EPO e EPO + FK 506, na recuperação locomotora dos animais que sofreram lesão medular. Este resultado sugere que a eritropoetina seria responsável pela maior pontuação do BBB, nos grupos EPO e EPO + FK 506. Esses resultados foram discordantes dos encontrados em estudos experimentais recentes.^{76,93} Esses autores concluíram, baseados na avaliação do BBB, que o tacrolimo possui efeitos neuroprotetores, o que pode ter ocorrido em razão da aplicação de metodologias distintas.

Na análise histológica da região lesionada, o grupo da eritropoetina associada ao tacrolimo mostrou-se diferente do grupo controle, uma vez que apresentou número significativamente menor de casos moderados de necrose em relação ao controle. Os grupos tratados com eritropoetina e tacrolimo, de forma isolada, não se mostraram estatisticamente diferentes do controle, embora sejam diferentes entre si. O menor número de casos de necrose moderada no grupo EPO + FK 506 sugere um sinergismo entre a EPO e o FK 506, embora não haja dados na literatura referentes aos efeitos dessa associação medicamentosa. Em relação à hemorragia, os grupos tratados com EPO e EPO + FK 506 não se mostraram diferentes entre si, mas se mostram diferentes do grupo tratado com tacrolimo, uma vez que neste último há uma maior concentração de casos moderados e intensos de hemorragia, embora nenhum dos grupos mostre diferença estatística significativa do controle. Esses resultados sugerem que, na região lesionada, não houve sinergismo da eritropoetina e do tacrolimo na redução dos casos mais graves de necrose, podendo o menor número de casos discretos de hemorragias nos grupos EPO e EPO + FK 506 ter sido consequente ao tratamento com eritropoetina, embora não haja dados na literatura referentes aos efeitos desta associação medicamentosa.

Em relação à contagem de neurônios, observamos que, embora sem diferença significativa quando comparados entre si, os grupos EPO e EPO + FK 506 apresentaram maior contagem de neurônios, com significância estatística, quando

comparados ao grupo do FK 506 isolado. Esse resultado sugere que não há efeito sinérgico da eritropoetina e do tacrolimo na melhora da contagem de neurônios após um trauma medular contuso experimental.

A recuperação eletrofisiológica foi avaliada por meio da amplitude e latência do potencial evocado motor. A amplitude indica recuperação ou ganho de fibras motoras e a latência indica o tempo para aparecer o sinal, ou seja, representa a condução do impulso nas vias axonais poupadas. Nessa análise, de forma inesperada, a média de latência nos membros posteriores do grupo controle foi a menor entre todos os cinco grupos, com significância estatística. O grupo dos animais que receberam o tacrolimo obteve a maior média de latência, ou seja, o pior resultado. Já o grupo que utilizou a eritropoetina obteve a menor média de latência entre as drogas testadas. Na avaliação eletrofisiológica comparativa da amplitude média dos membros posteriores, verificamos diferença com significância estatística entre todos os grupos, exceto o controle e o sham. Os animais dos grupos tratados com tacrolimo e com tacrolimo e eritropoetina associados apresentaram médias de amplitude menores com significância estatística quando comparados ao controle. Já o grupo EPO apresentou maior média de amplitude, com significância estatística, em relação ao controle. Esse resultado sugere que o tacrolimo, isolado ou associado, provoca diminuição na amplitude média dos membros posteriores e aumento na latência média dos membros posteriores, determinando desempenho significativamente pior no grupo de animais que utilizou esta droga, isolada ou associada.

Não encontramos correlação com significância estatística entre os achados eletrofisiológicos, a função locomotora e os achados histológicos, discordando com observado por Basso et al.,⁶⁹ que notaram uma correlação direta entre o tecido neural viável remanescente e a recuperação funcional. Entretanto, aquele estudo utilizou varredura com microscopia eletrônica, com técnica especial para tecido neural, ao passo que nosso estudo utilizou microscopia óptica, com a finalidade de avaliar os achados patológicos gerados pela lesão medular contusa.

A eritropoetina e o tacrolimo são drogas que estão sendo estudadas em modelos animais de lesão medular devido aos seus possíveis efeitos neuroprotetores, mas não se conseguiu ainda estabelecer o regime de dosagem mais eficaz, assim como determinar a janela de tempo de eficácia neuroprotetora. Seria altamente desejável a

realização de novos estudos, para confirmar a eficácia dessas drogas como agentes neuroprotetores, e desenvolver estratégias de neuroproteção farmacológicas no tratamento de lesões contusas da medula espinal.

7. CONCLUSÕES

Nosso projeto experimental não revelou diferenças na recuperação da função locomotora, nas análises histológica e eletrofisiológica nos animais submetidos ao tratamento farmacológico com eritropoetina e com tacrolimo, após contusão medular torácica programada.

8. REFERÊNCIAS

1. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(24 Suppl):S2-12.
2. Masini M. Estimativa da incidência e prevalência de lesão medular no Brasil. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*. 2001;12((2):97-100. Disponível em: <http://www.abnc.org.br/busca.php?ano=2001&palavras=&autores=Masini&ok.x=16&ok.y=8>. Acessado em 2015 (22 abr).
3. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2000;17(10):915-25.
4. Cristante AF, Barros Filho TE, Marcon RM, Letaif OB, Rocha ID. Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(10):1219-24.
5. Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg*. 1971;35(6):700-8.
6. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest*. 1978;39(3):236-53.
7. Sandler AN, Tator CH. Effect of acute spinal cord compression injury on regional spinal cord blood flow in primates. *J Neurosurg*. 1976;45(6):660-76.
8. Ducker TB, Salzman M, Perot PL Jr, Ballantine D. Experimental spinal cord trauma, I: Correlation of blood flow, tissue oxygen and neurologic status in the dog. *Surg Neurol*. 1978;10(1):60-3.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Fu ES, Tummala RP. Neuroprotection in brain and spinal cord trauma. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2005;18(2):181-7.
16. Bracken MB, Shepard MJ, Hellenbrand KG, Collins WF, Leo LS, Freeman DF, et al. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury. Results of the National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg*. 1985;63(5):704-13.
17. 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.
18. 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*. *JAMA*. 1997;277(20):1597-604.

19. 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.
20. Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg*. 2000;93(1 Suppl):1-7.
21. Short D. Is the role of steroids in acute spinal cord injury now resolved? *Curr Opin Neurol*. 2001;14(6):759-63.
22. 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*. 2010;1199:86-9.
23. 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*. 2010;1199:90-4.
24. 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.
25. Fee DB, Swartz KR, Joy KM, Roberts KN, Scheff NN, Scheff SW. Effects of progesterone on experimental spinal cord injury. *Brain Res*. 2007;1137(1):146-52.
26. Labombarda F, González S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, et al. Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2011;231(1):135-46.
27. Fang XQ, Fang M, Fan SW, Gu CL. Protection of erythropoietin on experimental spinal cord injury by reducing the expression of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(14):1631-5.

28. Sosa I, Reyes O, Kuffler DP. Immunosuppressants: neuroprotection and promoting neurological recovery following peripheral nerve and spinal cord lesions. *Exp Neurol*. 2005;195(1):7-15.
29. Matis GK, Birbilis TA. Erythropoietin in spinal cord injury. *Eur Spine J*. 2009;18(3):314-23.
30. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10526-31.
31. Celik M, Gökmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2258-63.
32. Arishima Y, Setoguchi T, Yamaura I, Yone K, Komiya S. Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(21):2432-8.
33. Mofidi A, Bader A, Pavlica S. The use of erythropoietin and its derivatives to treat spinal cord injury. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(9):763-70.
34. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14): 9450-5.
35. Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev*. 2004;27(2):113-20.
36. Sekiguchi Y, Kikuchi S, Myers RR, Campana WM. ISSLS prize winner: Erythropoietin inhibits spinal neuronal apoptosis and pain following nerve root crush. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28(23):2577-84.

37. Ibarra A, Martiñón S. Pharmacological approaches to induce neuroregeneration in spinal cord injury: an overview. *Curr Drug Discov Technol.* 2009;6(2):82-90.
38. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40(9):1249-55.
39. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40(9):1256-65.
40. Gold BG, Zeleny-Pooley M, Wang MS, Chaturvedi P, Armistead DM. A nonimmunosuppressant FKBP-12 ligand increases nerve regeneration. *Exp Neurol.* 1997;147(2):269-78.
41. Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 1991;66(4):807-15.
42. Liu J. FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol Today.* 1993;14(6):290-5.
43. Gold BG, Densmore V, Shou W, Matzuk MM, Gordon HS. Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(3):1202-10.
44. Gold BG. Neuroimmunophilin ligands: evaluation of their therapeutic potential for the treatment of neurological disorders. *Expert Opin Investig Drugs.* 2000;9(10):2331-42.
45. Gold BG, Armistead DM, Wang MS. Non-FK506-binding protein-12 neuroimmunophilin ligands increase neurite elongation and accelerate nerve regeneration. *J Neurosci Res.* 2005;80(1):56-65.

46. Gold BG, Yew JY, Zeleny-Pooley M. The immunosuppressant FK506 increases GAP-43 mRNA levels in axotomized sensory neurons. *Neurosci Lett.* 1998;241(1):25-8.
47. Madsen JR, MacDonald P, Irwin N, Goldberg DE, Yao GL, Meiri KF, et al. Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 1998;154(2):673-83.
48. Yousuf S, Atif F, Keshewani V, Agrawal SK. Neuroprotective effects of Tacrolimus (FK-506) and Cyclosporin (CsA) in oxidative injury. *Brain Behav.* 2011;1(2):87-94.
49. Bavetta S, Hamlyn PJ, Burnstock G, Lieberman AR, Anderson PN. The effects of FK506 on dorsal column axons following spinal cord injury in adult rats: neuroprotection and local regeneration. *Exp Neurol.* 1999;158(2):382-93.
50. Gold BG, Katoh K, Storm-Dickerson T. The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci.* 1995;15(11):7509-16.
51. Steiner JP, Hamilton GS, Ross DT, Valentine HL, Guo H, Connolly MA, et al. Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(5):2019-24.
52. Carnot P, Deflandre C. Sur l' activité hémopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *Académie des Sciences.* 1906;(143);432-5. Disponível em: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k30977/f432.image.r=Sur%20l%E2%80%99%20activit%C3%A9%20h%C3%A9mopoi%C3%A9tique%20du%20s%C3%A9rum%20au%20cours%20de%20la%20r%C3%A9g%C3%A9n%C3%A9ration%20du%20sang.langFR>. Acessado em 2015 (17 abr).
53. 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;LVII(11):878-80. Disponível em: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=448138>. Acessado em 2015 (17 abr).

54. Allen AR. Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *Journal of Nervous & 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 2015 (17 abr).
55. Krumdieck N. Erythropoietic substance in the serum of anemic animals. *Exp Biol Med (Maywood)*. 1943;54(1):14-7.
56. Bonsdorff E, Jalavisto E. A Humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1948;16(2-3):150-70.
57. Reissmann KR. Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood*. 1950;5(4):372-80.
58. Tarlov IM. Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1954;71(5):588-97.
59. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*. 1957;179(4560):633-4.
60. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1977;252(15):5558-64.
61. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. II. Ultrastructure of axons and myelin. *Lab Invest*. 1978;39(3):254-66.
62. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(22):7580-4.
63. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med*. 1987;316(2):73-8.

64. Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD 3rd, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol*. 1987;95(3):548-70.
65. Noble LJ, Wrathall JR. Correlative analyses of lesion development and functional status after graded spinal cord contusive injuries in the rat. *Exp Neurol*. 1989;103(1):34-40.
66. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*. 1991;75(1):15-26.
67. Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma*. 1992;9(3):197-217.
68. Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1992;9(2):123-6; discussion 126-8.
69. Basso DM, Beattie M S, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
70. 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.
71. Rodrigues NR. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1999.
72. Metz GA, Curt A, van de Meent H., Klusman I, Schwab ME, Dietz V. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2000;17(1):1-17.
73. Vialle E, Vialle LRG, Rasera E, Cechinel C, Leonel I, Seyboth C. Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos a lesão medular experimental [Motor recovery evaluation in rats submitted to spinal cord injury]. *Rev Bras Ortop*. 2002;37(3):83-96.

74. López-Vales R, García-Alías G, Forés J, Udina E, Gold BG, Navarro X, et al. FK 506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res*. 2005;81(6):827-36.
75. Cerri G, Montagna M, Madaschi L, Merli D, Borroni P, Baldissera F, et al. Erythropoietin effect on sensorimotor recovery after contusive spinal cord injury: an electrophysiological study in rats. *Neuroscience*. 2012;219:290-301.
76. Chen G, Zhang Z, Wang S, Lv D. Combined treatment with FK506 and nerve growth factor for spinal cord injury in rats. *Exp Ther Med*. 2013;6(4):868-72.
77. Freitag MT, Márton G, Pajer K, Hartmann J, Walder N, Rossmann M, et al. Monitoring of Short-Term Erythropoietin Therapy in Rats with Acute Spinal Cord Injury Using Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *J Neuroimaging*. 2014 [Epub ahead of print].
78. 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.
79. Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score. *J Neurotrauma*. 2002;19(10):1251-60.
80. 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.
81. 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.
82. Wrathall JR. Spinal cord injury models. *J Neurotrauma*. 1992;9 Suppl 1:S129-34.

83. Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Bleggi-Torres LF. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos [Histologic study of experimental spinal cord lesion in rats]. *Rev Bras Ortop.* 1999;34(2):85-9.
84. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol.* 1985;88(1):123-34.
85. Hall ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success? *J Spinal Cord Med.* 2001;24(3):142-6.
86. Tator CH, Rowed DW. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can Med Assoc J.* 1979;121(11):1453-64.
87. Lohse DC, Senter HJ, Kauer JS, Wohns R. Spinal cord blood flow in experimental transient traumatic paraplegia. *J Neurosurg.* 1980;52(3):335-45.
88. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(4):386-92.
89. Mann C, Lee JH, Liu J, Stammers AM, Sohn HM, Tetzlaff W, et al. Delayed treatment of spinal cord injury with erythropoietin or darbepoetin--a lack of neuroprotective efficacy in a contusion model of cord injury. *Exp Neurol.* 2008;211(1):34-40.
90. Ning B, Zhang A, Song H, Gong W, Ding Y, Guo S, et al. Recombinant human erythropoietin prevents motor neuron apoptosis in a rat model of cervical sub-acute spinal cord compression. *Neurosci Lett.* 2011;490(1):57-62.
91. Saganová K, Orendáčová J, Sulla I Jr, Filipčík P, Cízková D, Vanický I. Effects of long-term FK506 administration on functional and histopathological outcome after spinal cord injury in adult rat. *Cell Mol Neurobiol.* 2009;29(6-7):1045-51.

92. Saganová K, Gálik J, Blaško J, Korimová A, Račková E, Vanický I. Immunosuppressant FK506: focusing on neuroprotective effects following brain and spinal cord injury. *Life Sciences*. 2012;91(3-4):77-82.
93. Zhang J, Zhang A, Sun Y, Cao X, Zhang N. Treatment with immunosuppressants FTY720 and tacrolimus promotes functional recovery after spinal cord injury in rats. *Tohoku J Exp Med* 2009;219(4):295-302.

8. ANEXOS

ANEXO A. Ficha de pontuação com os atributos que acompanham a escala de avaliação locomotora de BBB

Rat#: _____ Data: _____ DPO: _____ Escore: E _____ D _____

Movimento do membro						Posição do Tronco		Abdomen	Posição da Pata				Passo		Coordination	Limpar Patas	Posição predominante da pata				Instabilidade do Tronco	Cauda						
Quadril		Joelho		Tornoz.		Lado	Prop		Varrer	Plantar PL.		Dorsal		Planta r			contat olnícia l	Elevar										
E	D	E	D	E	D					E	D	w/o Sup.	w. Sup.	E				D	E	D			E	D	E	D		
Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	E	D	E	D	Arrasto	E	D	E	D	E	D	E	D	I	I	I	I		Acima				
S	S	S	S	S	S			Paralelo							0	0	0	0	0	0	0	0	E	E	E	E		
E	E	E	E	E	E			Alto							F	F	F	F	F	F	F	F	P	P	P	P		Baixo
															C	C	C	C	C	C	C	C						

E= esquerdo D=direito Tornoz=tornozelo

Comment: _____

Ø – Sem movimento
 S – Movimento leve
 E – Movimento extenso

Ø – Nada 0%
 0 – Ocasional <50%
 F – Frequente 51 - 94%
 C – Consistente 95-100%

I – Rotação interna
 E – Rotação Externa
 P - Paralela

ANEXO B. Escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)

-
- 0 Sem movimentos observáveis na pata traseira (PT)
 - 1 Leve movimento de uma das duas articulações, usualmente o quadril e/ou o joelho
 - 2 Extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e um leve movimento de outra
 - 3 Extenso movimento de duas articulações
 - 4 Leve movimento de todas as três articulações da PT
 - 5 Leve movimento de duas articulações e extenso movimento da terceira
 - 6 Extenso movimento de duas articulações e leve da terceira
 - 7 Extenso movimento de todas as três articulações da PT
 - 8 Arrastar ou acomodação plantar da PT sem suporte de peso
 - 9 Acomodação plantar da PT com suporte de peso somente quando imóvel ou ocasional, freqüente ou consistente apoio dorsal e sem apoio plantar da pata
 - 10 Ocasional suporte de peso plantar, sem coordenação PT-PD
 - 11 Freqüente a consistente suporte de peso plantar e sem coordenação PT-PD
 - 12 Freqüente a consistente suporte de peso plantar e ocasional coordenação PT-PD
 - 13 Freqüente a consistente suporte de peso plantar e freqüente coordenação PT-PD
 - 14 Suporte de peso plantar consistente, consistente coordenação PT-PD, posição predominante da pata durante a locomoção em rotação (interna ou externa), quando realizado contato inicial no solo quando solto, ou freqüente suporte plantar, consistente coordenação PT-PD e ocasionais passadas dorsais
 - 15 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD e sem limpeza dos pés ou ocasional limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo
 - 16 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e freqüente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo e rodada ao se levantar
 - 17 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e freqüente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar

- 18 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo e rodada ao se levantar
- 19 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar e o rabo está para baixo parte ou todo o tempo
- 20 Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar, e instabilidade do tronco; o rabo está para cima consistentemente
- 21 Consistentes passadas plantares e coordenação de marcha, consistente limpeza dos pés. Posição predominante da pata é paralela por todo o instante, e consistente estabilidade do tronco; rabo consistentemente elevado

Nota. Leve: movimento parcial menor que a metade da amplitude normal. **Extensivo:** movimento maior que a metade da amplitude. **Varrer:** movimentos rítmicos de extensão para flexão completa e novamente extensão da PT. **Sem suporte de peso:** sem contração dos músculos extensores da PT durante a acomodação plantar da pata ou sem elevação do quarto traseiro. **Suporte de peso:** presença de contração dos músculos extensores da PT durante a acomodação plantar da pata ou elevação do quarto traseiro. **Apoio plantar:** pata em contato plantar com suporte de peso. **Apoio dorsal:** peso suportado pela superfície dorsal em alguns pontos do ciclo da marcha. **Coordenação PT-PD:** para cada passo da pata dianteira um passo da pata traseira é dado. **Ocasional:** menor ou igual a 50%. **Frequente:** maior que a metade, mas não sempre (51-94%). **Consistente:** quase sempre ou sempre (95-100%). **Instabilidade de tronco:** deslocamento lateral do peso que cause balançar de latero-lateral ou colapso parcial do tronco.