

ALDERICO GIRÃO CAMPOS DE BARROS

Avaliação do efeito da interleucina-6 e da eritropoetina na lesão medular 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. Alexandre Fogaça Cristante

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

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

Barros, Alderico Girão Campos de
Avaliação do efeito da interleucina-6 e da eritropoetina na lesão medular em ratos /
Alderico Girão Campos de Barros. -- São Paulo, 2017.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.
Orientador: Alexandre Fogaça Cristante.

Descritores: 1.Interleucina-6 2.Eritropoetina 3.Traumatismos da medula espinal
4.Sistema nervoso central/lesões 5.Ratos

USP/FM/DBD-254/17

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Roberto e Márcia, pelo suporte e amor incondicional, apesar da distância e dos obstáculos.

Às minhas irmãs Carolina, Gabriella e Daniella, por sempre me incentivarem a buscar meus objetivos e a relação de amor que mantemos, mesmo distante, há tantos anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Alexandre Fogaça Cristante, pela oportunidade e incentivo ao desenvolvimento acadêmico e aprimoramento de conhecimentos.

Ao Professores Doutores, Tarcísio Eloy de Barros Filho, Olavo Pires de Camargo e Gilberto Camanho, por permitirem o acesso a esta casa, referência em ensino e pesquisa para o profissional que deseja ingressar na carreira acadêmica e docência.

Aos meus mentores e referências em cirurgia de coluna:

Dr. Luís Eduardo Carelli Teixeira da Silva, pelo brilhantismo e paixão que transmite no dia a dia da prática médica;

Dr. Luís Cláudio Vilella Schettino, pelo estímulo, exemplo de ética e pelas portas abertas em minha vida profissional;

Dr. André Luiz Loyelo Barcellos, pela dedicação e incentivo ao meu desenvolvimento como médico especialista em coluna vertebral e compromisso com os pacientes;

À Dra. América Maria Mendonça Limoeiro, pelo carinho e proteção materna recebidos durante todos esses anos no Rio de Janeiro;

Ao amigo Rodrigo José Fernandes da Costa, pela parceria e ajuda gratuita ao longo dos anos, amigo fiel de todos os momentos;

Ao biólogo Gustavo Bispo dos Santos, pela dedicação e profissionalismo.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

Terminologia Anatômica em Português conforme a Terminologia Anatômica Internacional da Federative Committee on Anatomical Terminology - FCAT (Comissão Federativa de Terminologia Anatômica – CFTA) aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. 1ª 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*, Segunda Edição Brasileira do *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição Revisada (Agosto de 1998) – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM, 1998.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Resumo

Abstract

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Objetivo	5
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1.	Interleucina-6.....	6
2.2.	Eritropoetina	10
2.3.	Lesão medular: modelos experimentais e estudos clínicos	15
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1.	Seleção dos animais.....	25
3.1.1.	Critérios de inclusão	25
3.1.2.	Critérios de exclusão.....	25
3.2.	Formação dos grupos experimentais	26
3.3.	Padrão de lesão medular	27
3.3.1.	Protocolo de anestesia.....	27
3.3.2.	Exposição do saco dural e laminectomia.....	27
3.3.3.	Mecanismo de lesão medular.....	28
3.3.4.	Protocolo de cuidados pós-operatórios.....	31
3.4.	Avaliação motora.....	31
3.5.	Avaliação do potencial evocado somato-sensitivo e motor.....	32
3.6.	Protocolo de eutanásia	33
3.7.	Preparo dos tecidos para avaliação histológica	33
3.7.1.	Análise histológica qualitativa.....	34
3.7.2.	Análise histológica quantitativa.....	35
3.8.	Análise estatística	35

4.	RESULTADOS	36
4.1.	Análise dos dados da escala motora BBB	36
4.2.	Análise dos dados do potencial evocado	38
4.3.	Análise histológica.....	41
5.	DISCUSSÃO	46
6.	CONCLUSÃO	51
7.	ANEXOS	52
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	amplitude
ATP	adenosina trifosfato
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
BSF-2	Fator de diferenciação de células B humanas
EPO	eritropoetina
EPOr	receptor de eritropoetina
EPOrh	eritropoetina recombinante humana
HE	hematoxilina e eosina
IL	interleucina
IL-6-R	receptor de interleucina 6
Ip	intraperitoneal
LAT	latência
LM	lesão medular
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury
MP	metilprednisolona
MR16-1	anticorpo antirreceptor de interleucina 6
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
SF	soro fisiológico
Sgp130	forma solúvel da proteína gp130
TNF	Fator de necrose tumoral
TRM	trauma raquimedular

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Notas da escala BBB (média e desvio padrão) de cada um dos grupos durante as 7 etapas de avaliação36
- Tabela 2.** Descrição dos resultados do potencial evocado, demonstrando a média e o desvio padrão de amplitude (AMP) e latência (LAT) de resposta nos membros inferiores dos animais de cada grupo durante a realização da avaliação do potencial evocado.....38
- Tabela 3.** Comparação entre a latência média (LAT) e amplitude média (AMP) dos membros inferiores, entre os grupos experimentais, considerando os valores de p (significância estatística).....41
- Tabela 4.** Análise histológica qualitativa do tecido medular perilesional dos ratos dos cinco grupos com média, desvio padrão e o correspondente valor de p (significância estatística).....42
- Tabela 5** Comparação dois a dois dos resultados da análise histológica dos grupos e valor de p correspondente43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas do procedimento cirúrgico para realização da lesão medular. A) Tricotomia e incisão longitudinal mediana. B) Dissecção subperiosteal de T8 a T11. C) Garra de fixação nos processos espinhosos para estabilização e padronização da lesão medular28
- Figura 2.** Esquema ilustrativo do equipamento computadorizado NYU Impactor29
- Figura 3.** Etapas de fechamento após realização do procedimento cirúrgico de lesão medular. A) Fechamento da musculatura dorsal. B) Sutura de pele com nylon monofilamentar 2.0.30
- Figura 4.** Realização do exame de potencial evocado com animal sob anestesia.33

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Evolução da pontuação do estudo na escala motora BBB dos cinco grupos ao longo dos sete (2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o dia) períodos de avaliação. Linha azul indica os resultados do grupo EPO, linha verde, do grupo EPO + IL-6, a linha laranja indica a evolução do grupo IL-6, linha roxa é o grupo placebo. A linha preta é o grupo Sham, que não sofreu lesão medular e, portanto, permaneceu com a função inalterada.....37
- Gráfico 2.** Amplitude média (AMP) de resposta dos membros inferiores (MI), de acordo com cada grupo39
- Gráfico 3.** Latência média (LAT) de resposta dos membros inferiores (MI), de acordo com cada grupo40
- Gráfico 4.** Média dos valores do número de fibras da porção cranial (A) da medula espinal dos cinco grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos EPO, EPO/IL-6, IL-6 e placebo, exceto em relação ao grupo Sham, conforme esperado44
- Gráfico 5.** Média dos valores do número de fibras da porção caudal (C) da medula espinal dos cinco grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos EPO, EPO/IL-6, IL-6 e placebo, exceto em relação ao grupo Sham, conforme esperado45

RESUMO

Barros AGC. Avaliação do efeito da interleucina-6 e da eritropoetina na lesão medular em ratos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da interleucina 6 (IL-6) e eritropoetina (EPO) na lesão medular aguda experimental em ratos. **Materiais e Métodos:** A lesão foi induzida pelo equipamento padronizado NYU Impactor, com queda de um peso de 10 g à distância de 12,5 mm de altura. Foram utilizados 50 ratos da linhagem Wistar, divididos em cinco grupos de 10 animais. O grupo EPO, ratos tratados com EPO; grupo EPO/IL-6, animais tratados com EPO e IL-6; grupo IL-6, administração de IL-6; grupo placebo, solução placebo; grupo Sham, procedimento *sham* (apenas laminectomia, sem lesão medular). Todas as drogas e soro fisiológico foram administrados por via intraperitoneal, durante três semanas. Os animais foram acompanhados por 42 dias. A recuperação motora funcional foi monitorada pela escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) nos dias 2, 7, 14, 21, 28, 35 e 42. Exame de potencial evocado foi efetuado no 42^o dia, sendo realizada análise histológica qualitativa e quantitativa após eutanásia. **Resultados:** Os resultados das avaliações da escala BBB mostraram recuperação funcional motora superior no grupo que recebeu EPO. A administração de IL-6 isolada não mostrou benefícios em relação ao grupo que recebeu solução placebo e a associação de IL-6 com EPO mostrou resultados inferiores ao grupo que recebeu apenas EPO. **Conclusão:** Concluímos que uso EPO após lesão medular contusa em ratos mostrou benefícios na recuperação motora. A associação de EPO e IL-6 mostrou benefícios, porém com resultados inferiores aos da EPO isolada. O uso isolado de IL-6 não mostrou benefícios após lesão medular contusa experimental em ratos.

Descritores: Interleucina-6; Eritropoetina; Traumatismos da Medula Espinal; Sistema Nervoso Central/lesões; Ratos.

ABSTRACT

Barros AGC. Evaluation of the effect of interleukin-6 and erythropoietin in spinal cord injury in rats [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introduction: The aim of this study was to evaluate the effect of interleukin-6 (IL-6) and erythropoietin (EPO) in experimental acute spinal cord injury in rats. **Methods:** The injury was induced by a standardized equipment for spinal cord contusion injury, the NYU Impactor, which produced the lesion by means of a 10g weight drop on the animals' spinal cord from a 12.5-mm height. Fifty Wistar rats were divided in five groups of ten animals: Group 1 rats treated with EPO; Group 2 animals treated with EPO and IL-6; Group 3, IL-6 administration; Group 4, placebo solution; Group 5, sham procedure (only laminectomy, without spinal cord injury). All drugs and placebo solution were administered intraperitoneally for three weeks. The animals were followed up for 42 days. The functional motor recovery was monitored by the scale of Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) on days 2, 7, 14, 21, 28, 35 and 42. Evoked potential tests were performed on the 42nd day. Qualitative and quantitative histological analysis were performed after euthanasia. **Results:** The group receiving EPO demonstrated superior functional motor results in the BBB scale. IL-6 administration alone did not show benefits over the placebo group solution and the IL-6 combination with EPO showed results lower than those seen in the group that received only EPO. **Conclusion:** We conclude that using EPO after acute spinal cord injury in rats showed benefits in motor recovery. The association of EPO and IL-6 showed benefits, but with inferior results to the isolated EPO. Isolated use of IL-6 showed no benefit after experimental spinal cord injury in rats.

Keywords: Interleukin-6; Erythropoietin; Spinal Cord Injuries; Central Nervous System/injuries; Rats.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com o entendimento da fisiologia do paciente portador de lesão da medula espinal cresceu bastante desde o início do século passado e, ao longo das últimas décadas, houve grande progresso na pesquisa e cuidados médicos, embora muitos aspectos permaneçam desconhecidos. A cada ano ocorrem, aproximadamente, 40 novos casos de traumatismo raquimedular para cada 1 milhão de habitantes de uma população, estatística que não considera os indivíduos que morrem no local do acidente. É interessante ressaltar que, ao longo das últimas décadas, embora tenham ocorrido mudanças nas causas de lesões traumáticas da medula espinal, sua incidência global permanece inalterada.¹ A debilitação e perda de função, geralmente, são graves, com 45% das lesões sendo completas. A incidência do traumatismo raquimedular no Brasil é semelhante à dos demais países, ocorrendo cerca de 6 a 8 mil casos novos/ano.²

A lesão medular apresenta mecanismos primários e secundários, sendo o mecanismo primário a própria lesão mecânica e a lesão secundária resultante de um ou mais processos bioquímicos e celulares desencadeados pela lesão primária. A lesão primária consiste da interrupção fisiológica e estrutural aguda dos axônios e é resultado de impacto sobre a medula espinal, com conseqüente rompimento dos axônios e ruptura de vasos sanguíneos. Nesse estágio, a morte celular ocorre pelo estresse mecânico e tem natureza necrótica.³ Após a lesão imediata, segue-se a lesão secundária, que atinge o local da lesão e o tecido adjacente e tem natureza apoptótica.⁴

A lesão secundária está associada a uma série de alterações neuroquímicas que ocorrem de minutos a dias após a lesão inicial. A hemorragia e necrose na substância cinzenta central após a lesão leva a redução do fluxo sanguíneo para o segmento medular afetado, gerando isquemia tecidual. Esta redução pode ser causada por alterações do canal vertebral, pela hemorragia e pelo edema significativo da medula espinal ou pela redução da pressão arterial sistêmica. A isquemia cria uma cadeia de reações bioquímicas que resulta em morte celular. Essas reações incluem a ativação da cascata do ácido araquidônico,⁵ resposta inflamatória, produção de espécies reativas de oxigênio,⁶ aumento da concentração extracelular de aminoácidos [glutamato],⁷ edema e redução do fluxo sanguíneo na medula espinal.⁸

A diminuição do aporte de oxigênio e nutrientes às células reduz a quantidade de ATP (adenosina trifosfato) disponível, provocando disfunção das bombas eletrolíticas da membrana, com a resultante alteração nas concentrações iônicas intra e extracelulares. Este processo é responsável pelo edema e morte celulares e pela secreção de neurotransmissores aminoacídicos, como por exemplo, o glutamato. A diminuição do ATP também estimula a 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 e provocando morte celular.

Apesar de esses processos ocorrerem principalmente na substância cinzenta, a consequente liberação de enzimas líticas e radicais livres acaba lesando a substância branca adjacente. Esses produtos metabólicos também provocam inflamação e desmielinização.⁹

As pesquisas realizadas na tentativa de se obter um tratamento mais efetivo para a lesão medular envolvem quatro maneiras de abordagem da lesão medular aguda: a cirúrgica, a por meios físicos, a biológica e a farmacológica. A farmacologia desempenha papel relevante no tratamento da lesão medular. Através de ensaios clínicos e experimentais, contribui efetivamente para o tratamento dos danos medulares secundários.¹⁰

Muitas instituições, baseadas em estudos clínicos preliminares,¹¹ utilizam o tratamento medicamentoso com altas doses de metilprednisolona nas primeiras oito horas após o traumatismo raquimedular, acreditando que esta modalidade de tratamento traga benefícios na recuperação neurológica dos pacientes. Porém, existem críticas importantes a esses relatos^{12,13} e, atualmente, acredita-se que esse benefício seja, no máximo, limitado.¹⁴ Cada vez mais, acredita-se que a corticoterapia possa produzir efeitos colaterais importantes, principalmente em pacientes de alto risco.¹⁵ Dentre esses efeitos, incluem-se: processo deletério para a regeneração neuronal — por inibir a atividade de células imunitárias e o processamento de antígenos por macrófagos, discreta neutropenia, exarcebação da necrose pós-isquêmica e inibição do brotamento de axônios¹⁶ — complicações respiratórias, sepse e hemorragia gastrointestinal, que dificultam o seu uso como padrão de tratamento.¹² Investigações experimentais em animais têm sugerido como possíveis agentes terapêuticos o estrogênio, a progesterona, a eritropoetina e o magnésio.^{14,17} A eritropoetina tem papel hormonal estabelecido na manutenção da homeostase das hemácias circulantes e também atua reduzindo o estresse metabólico em muitos tecidos, como produtor molecular.¹⁸ Alguns estudos demonstraram efeito protetor da eritropoetina na lesão medular isquêmica em coelhos¹⁹ e na lesão traumática em ratos

e coelhos.^{20,21} Acredita-se que a eritropoetina atue diminuindo a morte celular por apoptose e a atividade inflamatória das citocinas,²² promoção de angiogênese,²³ restabelecimento da auto-regulação vascular²⁴⁻²⁶ e redução da peroxidação lipídica.²¹ Por outro lado, ensaio experimental recentemente publicado não mostrou diferenças na recuperação motora, análise histológica e eletrofisiológica com uso de eritropoetina após lesão medular em ratos.²⁷

Os mediadores moleculares regulam e estimulam a velocidade de crescimento dos nervos em regeneração, moderam a atividade inflamatória e combatem o processo de apoptose neuronal. Dentre estas substâncias, destacam-se: as interleucinas 1, 2, 4, 6 e 10, o fator de necrose tumoral (TNF), o interferon-gama, o fator de crescimento neuronal (NGF), o fator de crescimento análogo da insulina (IGF), o fator de crescimento derivado das células da glia (GDNF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento ciliar, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico ácido (aFGF) e a eritropoetina.²⁸⁻³⁰

O efeito das citocinas no processo de lesão e regeneração celular também não está esclarecido. Citocinas produzidas por células T estão envolvidas em respostas imunes benéficas, autoimunidade patológica e inflamação tecidual. Dentre as citocinas que atuam no sistema nervoso, as mais estudadas são o interferon-gama e as interleucinas (IL), IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10. A micróglia e astroglia são a maior fonte destas citocinas em patologias do sistema nervoso central. Os efeitos dessas citocinas nos tecidos nervosos são dinâmicos, isto é, dependem da fonte celular produtora, do local de ação tecidual, do contexto fisiopatológico e da presença de fatores que atuam em conjunto. Assim, podem existir fatores neurotóxicos e neuroprotetores associados à mesma citocina. Enquanto esses complexos mecanismos de ação e interação estão começando a ser desvendados, as citocinas têm um grande potencial como agentes terapêuticos em várias afecções que envolvem o sistema nervoso central.³¹

A regeneração axonal no sítio de reparo pode ser impedida ou dificultada pela formação de tecido cicatricial em excesso, o que pode criar uma barreira mecânica e iniciar o desenvolvimento de brotamentos axonais múltiplos e formação de neuroma. Por esta razão, alguns autores procuram desenvolver agentes capazes de reduzir a formação de cicatriz excessiva e conseguir melhor regeneração axonal. Em um estudo com modelo de lesão de nervo ciático de ratos, o uso de interleucina em baixa dose provocou menor

formação de tecido cicatricial e permitiu melhor regeneração dos axônios lesados.³² Foi identificado recentemente que a IL-6 atua nas células de Schwann em nervos periféricos. A maioria dos genes ativados apresentava função pró-inflamatória.³³ Foi observada, também, a ação da IL-6 em células de Schwann, provocando a liberação de proteína fibrilar ácida glial (GFAP), que é conhecida por ser requerida para a regeneração adequada de nervos lesados.³⁴ Também foi identificada atividade quimiotática da IL-6 através das células de Schwann.³⁵ A célula de Schwann aparentemente é a maior fonte de IL-6.³⁶ Os estudos com citocinas, no entanto, apresentam resultados controversos. Insierra et al. observaram que a ausência de IL-6 aparentemente não prejudicou a regeneração neuronal em modelos de ratos com lesão de nervo ciático.³⁷

Portanto, a finalidade desse estudo foi avaliar, em modelo experimental em ratos, a ação da interleucina-6 e da eritropoetina no tratamento da lesão medular contusa em ratos, utilizando a escala de avaliação motora, o potencial evocado e a análise histológica medular.

1.1. Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos causados pela ação da interleucina-6 e da eritropoetina na lesão medular contusa aguda em ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Interleucina-6

Em 1986, Hirano et al.³⁸ descobrem uma nova interleucina humana, a qual denominam fator de diferenciação de células B humana (BSF-2). O estudo indica que a BSF-2 é funcionalmente e estruturalmente diferente de outras proteínas conhecidas. A sequência primária de BSF-2 deduzida a partir do DNAc revela que BSF-2 é uma nova interleucina que consiste de 184 aminoácidos.

Em 1988, Kawano et al.³⁹ aprofundam a investigação sobre a nova interleucina e propõem um novo nome para o BSF-2, passando a denominá-la IL-6. Os autores defendem uma enormidade de funções biológicas para a IL-6 e afirmam que suas células-alvo não são apenas os linfócitos B. Sugerem ainda sua relação com a patogênese do mieloma múltiplo.

Em 1989, Taga et al.⁴⁰ identificam a proteína gp130, responsável pela ligação entre a IL-6 e seu receptor IL-6-R. Estes resultados indicam que o complexo de IL-6 e IL-6-R pode interagir com uma glicoproteína não ligante de membrana, a gp130, de maneira extracelular, fornecendo o sinal de ação da IL-6.

Em 1993, Narazaki et al.⁴¹ realizam estudo experimental com ratos que indica que a forma solúvel da gp130 (sgp130) circulante no sangue pode regular negativamente o sinal de ação da IL-6. Segundo os autores, este trabalho tem implicações no papel fisiológico da sgp130 naturalmente circulante no soro em modular sinais através da gp130.

Em 1994, Kopf et al.⁴² com a finalidade de elucidar a função em vivo da IL-6, interrompem seu gene através de recombinação homóloga. Os ratos deficientes em IL-6 se desenvolvem normalmente, porém não conseguem controlar a resposta contra vacinas virais e infecções bacterianas. Além disso, a resposta inflamatória de fase aguda após dano tecidual fica severamente comprometida. Os autores concluem que a síntese de IL-6 induzida por lesão ou infecção é um importante sinal do tipo “SOS” para a coordenação da atividade de leucócitos.

Em 1997, Taga e Kishimoto⁴³ escrevem artigo sobre o progresso no entendimento do mecanismo de funcionamento entre a IL-6 e a proteína gp130. Os autores afirmam que, embora as citocinas compartilhem as cadeias beta e gama em comum, principalmente em funções hematopoiéticas e linfoides, a IL-6 possui um padrão de atuação distinto em outros sistemas, como por exemplo, o sistema nervoso.

Ainda em 1997, Romano et al.⁴⁴ defendem que há evidência suficiente que apoia o conceito de que o sistema de IL-6 desempenha um papel positivo inesperado nas reações inflamatórias locais, amplificando o recrutamento de leucócitos.

Em 2001, Hurst et al.⁴⁵ escrevem artigo enfatizando a importância da IL-6 e seu receptor solúvel no controle da resposta inflamatória aguda como recrutador de leucócitos. Os autores afirmam que sinalização de IL-6 solúvel é um passo intermediário importante na resolução da inflamação e defendem a ideia da transição entre a fase inicial, predominantemente, neutrófila e a manutenção do influxo de células mononucleares.

Em 2002, Okazaki et al.⁴⁶ examinam as características do anticorpo antirreceptor de IL-6 em ratos (MR16-1), em *vivo* e em *vitro*. Os autores demonstram que existe evidência suficiente de que o MR16-1 pode ser utilizado para investigar as funções fisiológicas e patológicas da IL-6 em ratos.

Em 2004, Okada et al.⁴⁷ investigaram a eficácia do anticorpo MR16-1 no tratamento da lesão medular aguda em ratos. Imediatamente após lesão medular contusa, os ratos foram injetados por via intraperitoneal com uma dose única de MR16-1 (100 mcg/g). Foi realizada a avaliação histológica e da recuperação neurológica dos animais. Foi observado que o MR16-1 suprimiu os efeitos de diferenciação dos astrócitos promovidos pela IL-6, a formação de tecido cicatricial e o número de células inflamatórias invasoras, havendo melhor recuperação funcional em comparação com o grupo controle. Os autores sugerem que a neutralização da ação de sinalização da IL-6 representa uma opção atraente para o tratamento da fase aguda da lesão medular.

Ainda em 2004, Cafferty et al.⁴⁸ publicam ensaio experimental realizado com ratos. Determinados animais foram submetidos à lesão do nervo ciático sete dias antes de sofrerem lesão bilateral das colunas dorsais da medula espinal e outro grupo sofreu apenas a lesão medular. Os resultados mostraram que houve regeneração dos axônios da coluna dorsal localizados proximais à lesão medular no primeiro grupo. Este estado aumentado de crescimento foi acompanhado por um aumento na expressão da proteína GAP43 associada ao crescimento em animais pré-lesionados, mas não quando os gânglios da raiz

dorsal estavam intactos. Os autores sugerem que a lesão induzida pela suprarregulação de IL-6 é necessária para promover regeneração do sistema nervoso central (SNC). Seus resultados indicam que isto é conseguido através de um estado de crescimento impulsionado da coluna dorsal projetando neurônios sensoriais.

Em 2005, Nakamura et al.⁴⁹ publicam artigo de revisão sobre o papel da IL-6 em modelos de lesão medular em ratos. Baseados em relatos de que a expressão de IL-6 e seu receptor encontram-se aumentados na fase aguda da lesão medular e de que a IL-6 atua como um fator sinalizador da indução de células-tronco neurais em astrócitos, os autores investigaram o efeito do anticorpo MR16-1 e concluíram que ele tem função importante na supressão da resposta inflamatória secundária e da formação de cicatriz glial, com isso facilitando a recuperação funcional.

Em 2007, Pineau e Lacroix⁵⁰ estudam a distribuição espacial e temporal de seis citocinas pró-inflamatórias e identificaram sua fonte celular. Seus resultados mostram que o fator de necrose tumoral (FNT), interleucina-1(IL-1) beta são rapidamente (após 5 e 15 minutos, respectivamente) e transitoriamente expressos após contusão medular em ratos. Após 30 a 45 minutos, essas duas citocinas são vistas em todo o segmento medular analisado e suas duas principais fontes são a micróglia e astrócitos. De 3 a 24 horas, IL-1beta, FNT e IL-6 são encontrados em grandes concentrações ao redor da área medular lesionada. Estudos sobre a localização simultânea revelaram que todas as células do sistema nervoso central, inclusive neurônios, sintetizam citocinas após 3 a 24 horas da lesão medular. Também foi observado que alguns leucócitos infiltrantes foram responsáveis pela produção de citocinas a partir de 12 horas. Os autores concluem que, após uma lesão medular, todas as classes de células neurais, inicialmente, contribuem para a organização da inflamação, enquanto as células imunes recrutadas contribuem mais para a sua manutenção em tempos posteriores.

Em 2009, Shechter et al.⁵¹ publicam estudo sobre a presença de macrófagos infiltrantes encontrados após trauma da medula espinal. Baseados na teoria de que os diferentes subtipos de macrófagos atuam de maneira distinta no sítio da lesão, os autores concluem que os macrófagos infiltrantes presentes na medula espinal após lesão atuam de maneira anti-inflamatória, papel que não pôde ser atribuído às micróglias locais. Esse estudo lança nova luz sobre o debate, de longa data, sobre qual o papel dos macrófagos infiltrantes na recuperação das lesões inflamatórias do sistema nervoso central.

Em 2010, Mukaino et al.⁵² realizam estudo com o objetivo de esclarecer o mecanismo de ação do anticorpo MR16-1 na recuperação funcional após lesão medular em ratos. Realizam análise das células inflamatórias através de citometria de fluxo e estudo imunoistoquímico em ratos geneticamente modificados e observam que o MR16-1 modifica drasticamente o papel central dos macrófagos hematogênicos para a micróglia local na inflamação pós-traumática. Esta mudança foi acompanhada de alteração na expressão de citocinas relevantes na medula espinal traumatizada. Os resultados indicam que a melhora funcional provocada pelo MR16-1 envolve funções microgliais e apontam novos indícios do papel de sinalização patológica da IL-6 na lesão medular aguda.

Em 2012, Guerrero et al.,⁵³ objetivando elucidar os efeitos de um bloqueio temporal do receptor de IL-6 na ativação de macrófagos e na resposta inflamatória durante a fase aguda após a lesão medular em ratos, utilizam anticorpo monoclonal para realização do estudo. Os resultados mostram que o grupo que recebeu o anticorpo monoclonal de IL-6 apresentou maior quantidade de mielina poupada e melhora neurológica superior na avaliação pela escala motora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Avaliação imunoistoquímica das amostras tratadas com o anticorpo identifica regulação negativa das citocinas Th1 e regulação positiva de citocinas Th2. Já no grupo controle, há predomínio de resposta inflamatória com citocinas Th1. O grupo que recebeu o anticorpo bloqueador de IL-6 apresenta menor quantidade de neutrófilos interferon-positivos e uma quantidade maior de micróglia estava presente. Os autores sugerem que o bloqueio temporal da IL-6 após lesão medular anula a atividade inflamatória patológica e promove recuperação funcional através da promoção da formação de macrófagos alternativamente ativados.

Em 2013, Murakami et al.⁵⁴ publicam estudo relatando os efeitos benéficos do anticorpo antirreceptor de IL-6 sobre a dor neuropática após lesão medular em ratos. O anticorpo foi administrado continuamente durante 14 dias e os níveis de IL-6 foram mensurados entre 12 e 72 horas após a lesão. Os animais foram avaliados pela escala locomotora BBB e análise histológica de medula foi realizada no 42º dia. O grupo que recebeu o anticorpo bloqueador de IL-6 apresentou menores concentrações desta interleucina, melhor pontuação na escala locomotora BBB e melhores resultados nos testes de hiperalgesia e alodinia. Esses resultados indicam que a inibição contínua de IL-6 entre as fases iniciais e subaguda após a lesão medular leva a recuperação neurológica superior e a supressão de hiperalgesia e alodinia. Os autores sugerem que a inibição da

inflamação grave pode ser uma abordagem neuroprotetora promissora para limitar a lesão secundária e que o anticorpo antirreceptor IL-6 pode ter um potencial clínico para o tratamento das lesões medulares.

Ainda em 2013, Tan et al.⁵⁵ estudaram o efeito do bloqueio temporário do receptor de IL-6 com uso do anticorpo MR16-1 em ratos que sofreram lesão medular contusa e foram tratados com transplante de células-tronco da medula óssea. O tratamento coadjuvante com MR16-1 melhorou as taxas de sobrevivência, permitindo que algumas células-tronco se diferenciassem em astrócitos e melhorou a função locomotora comparados aos grupos que recebeu apenas o transplante de células-tronco ou MR16-1, de maneira isolada. Houve diminuição do número de citocinas pró-inflamatórias, aumento dos neutrófilos e diminuição das taxas de apoptose. Os autores concluíram que o tratamento com MR16-1 combinado ao transplante de células-tronco ajuda no salvamento de células nervosas após contusão medular de maneira mais eficaz que o transplante isolado, através da diminuição da resposta inflamatória/imune e das taxas de apoptose.

Em 2016, Tanaka et al.⁵⁶ publicam artigo de revisão sobre as implicações terapêuticas da IL-6 e reforçam sua importância na contribuição para as defesas do hospedeiro contra infecções. Entretanto, sua síntese exagerada num ambiente de estresse pode levar a uma resposta sistêmica grave, fenômeno conhecido como “*cytokine storm*”. Nessa revisão, os autores propõem que a possibilidade de bloqueio da IL-6 pode constituir uma nova estratégia terapêutica para uma resposta sistêmica patológica.

2.2. Eritropoetina

Em 1906, Paul Carnot, um professor de medicina na França, e sua assistente, Clotilde Deflandre, propõem a teoria de que a produção de glóbulos vermelhos do sangue é regulada por hormônios.⁵⁷ Após a realização de experimentos em coelhos sujeitos a sangria, os pesquisadores atribuem o aumento das células vermelhas do sangue desses coelhos a um fator humoral chamado hemopoietina.

Nas décadas seguintes, vários pesquisadores reproduzem a teoria proposta por Carnot e Deflandre. Dentre os estudos experimentais publicados, destaca-se o trabalho de Hjort,⁵⁸ Krumdieck⁵⁹ e Erslev.⁶⁰

Em 1948, Bonsdorff e Javalisto,⁶¹ trabalhando em experimentos com coelhos, utilizam pela primeira vez o termo eritropoetina para substância estimuladora da produção de glóbulos vermelhos, até então chamada de hemopoetina.

Em 1950, Reissmann,⁶² após trabalhar em ensaio experimental com ratos conectados por procedimento cirúrgico evidencia que quando um dos ratos sofre hipóxia, o outro animal a ele conectado apresenta aumento na concentração de reticulócitos. O achado fortalece a teoria de um mecanismo humoral.

Em 1957, Jacobson et al.⁶³ identificam o rim como a fonte produtora de eritropoetina. Em 1961, os trabalhos de Fisher e Birdwell⁶⁴ e Kuratowska et al.⁶⁵ encontram resultados semelhantes.

Em 1977, Zanjani et al.⁶⁶ observam que fetos de ovelhas produzem quantidades significativas de eritropoetina em resposta à hemorragia. Nefrectomia bilateral antes da hemorragia falhou em influenciar a formação de eritropoetina. A remoção do baço, em adição aos rins, também não provocou o efeito. Hepatectomia subtotal antes de sangramento, no entanto, inibiu a formação do hormônio nos fetos. Perfusão *in situ* do fígado, mas não do rim, resultou no aparecimento de quantidades significativas do hormônio. Esses resultados sugerem que o fígado é o principal local da produção de eritropoetina em fetos de mamíferos.

Em 1985, Lin et al.⁶⁷ reportam sobre experimento realizado com ovários de hamsters e conseguem isolar o gene da eritropoetina a partir de uma biblioteca de fago genômico. Eritropoetina biologicamente ativa é sintetizada a partir da introdução de seu gene nos ovários dos animais.

Em 1987, Eschbach et al.⁶⁸ publicam estudo clínico avaliando o uso da eritropoetina humana recombinante em 25 pacientes anêmicos com doença renal em estágio final. A eritropoetina humana recombinante foi administrada por via intravenosa três vezes por semana após a diálise. Não foram observadas disfunção de órgão ou outros efeitos tóxicos e anticorpos contra o hormônio recombinante não foram formados. Os resultados demonstram que a eritropoetina humana recombinante é eficaz, pode eliminar a infecção e a necessidade de transfusões, com os seus riscos de sensibilização

imunológica e a sobrecarga de ferro, podendo restaurar o hematócrito normal em muitos pacientes com anemia por doença renal em fase terminal.

Em 1991, Koury et al.⁶⁹ publicam artigo sobre estudo realizado em ratos que consolida o papel hepático como fonte secundária da produção de eritropoetina. Seus resultados demonstram que os hepatócitos são responsáveis pela produção de eritropoetina em ambos os ratos, transgênicos e não transgênicos, e que um segundo tipo de célula com morfologia semelhante às células intersticiais no rim também produz eritropoetina nos fígados dos ratos não transgênicos.

Em 2000, Brines et al.⁷⁰ publicam ensaio experimental demonstrando função adicional da eritropoetina (EPO), além do reconhecido papel central na eritropoiese. A EPO também medeia a neuroproteção. Quando a forma recombinante da eritropoetina (EPOr) foi administrada no cérebro de ratos portadores de lesão isquêmica, foi evidenciada expressão substancial do receptor da EPO em capilares cerebrais, o que pode proporcionar uma via para a circulação de EPO para sua entrada no cérebro. Para confirmação dessa hipótese, a administração sistêmica de EPOr antes ou até seis horas após a isquemia cerebral diminuiu a área da lesão em cerca de 50-75%. EPOr também melhorou o grau de lesão de concussão cerebral e o dano imune em encefalomielite auto-imune experimental. Os autores sugerem ainda que, devido ao excelente perfil de segurança da EPOr, ensaios clínicos devem ser realizados para avaliar sua função como agente neuroprotetor.

Em 2001, Dame et al.⁷¹ estudando fetos humanos, sugerem que a EPO e seus receptores são expressos por neurônios e células gliais da medula espinal, podendo a EPO exercer efeitos neuroprotetores semelhantes em isquemia medular.

Em 2002, Celik et al.¹⁹ publicam modelo de isquemia espinal global transitória em coelhos para testar se a EPO exógena pode atravessar a barreira sangue-medula espinal e proteger seus neurônios motores. Isquemia medular foi produzida em coelhos por oclusão da aorta abdominal durante 20 minutos seguida da injeção de EPOr humana em várias doses ou solução salina. A avaliação neurológica funcional dos animais foi melhor para os animais tratados com EPOr humana 1 h após a recuperação da anestesia, e melhorou dramaticamente ao longo das próximas 48 h. Em contraste, os animais tratados com solução salina apresentaram uma pontuação neurológica menor em 1 h e não houve melhora significativa. A análise histopatológica da medula espinal afetada revelou lesão generalizada dos neurônios motores. Essas observações sugerem uma ação benéfica da EPOr humana

em lesões medulares isquêmicas, agudas e tardias. Devido ao seu excelente perfil de segurança, os autores sugerem ainda a realização de ensaios clínicos com EPOr humana para avaliação do seu potencial de prevenção de apoptose neuronal e prevenção de déficits neurológicos que ocorrem como consequência da lesão isquêmica.

Ainda em 2002, Gorio et al.²⁰ realizam ensaio experimental para avaliar a função neuroprotetora e anti-inflamatória da EPO na recuperação após lesão traumática da medula espinal. O estudo foi constituído de dois modelos. No primeiro modelo, uma compressão moderada de 0,6 N foi produzida por aplicação de um grampo de aneurisma ao nível de T3 durante 1 minuto. EPOr (1.000 UI/kg) administrada imediatamente após a liberação da compressão foi associada com recuperação parcial da função motora dentro de 12 h após a lesão e praticamente completa no 28º dia. Em contraste, os animais tratados com solução salina apresentaram recuperação consideravelmente menor. No segundo modelo utilizado, EPOr (5.000 UI/kg) foi administrada em dose única, 1 h após a lesão. Também foi constatada recuperação neurológica superior comparada aos grupos controles tratados com solução salina após uma contusão de 1 N ao nível de T9. No segundo modelo de lesão da medula espinal (trauma mais grave), a inflamação secundária também foi marcadamente diminuída pela administração de EPOr. Os autores propõem que a EPOr promove recuperação rápida da função neurológica após isquemia da medula espinal. Defendem uma função neuroprotetora, anti-inflamatória e antiapoptótica para o hormônio.

Em 2004, Kaptanoglu et al.,²¹ baseados na importância que a peroxidação lipídica possui na fisiopatologia das lesões medulares traumáticas e na atividade neurotrófica da EPO no SNC, desenvolvem ensaio experimental com ratos. Os animais sofrem lesão medular contusa de 50 g.cm, sendo divididos em sete grupos de acordo com a terapêutica recebida: grupo EPO – apenas laminectomia sem trauma; grupo EPO/IL-6 – trauma sem qualquer medicamento; grupo IL-6 – metilprednisolona na dose de 30 mg/kg; grupo placebo – apenas solução-veículo contendo albumina de soro humano, que é um solvente da EPO. Os grupos 5, 6 e 7 receberam EPO em dose única nas dosagens de 100, 1000 e 500 UI/kg, respectivamente. Os resultados mostraram que a peroxidação aumentou após a lesão. A administração de EPO e metilprednisolona reduziu a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico após o trauma. Os melhores resultados bioquímicos foram obtidos com 5.000 IU/kg de EPO. Microscopia eletrônica mostrou que a EPO protege a medula espinal de lesão. Embora 1.000 UI/kg e 5.000 UI/kg de EPO

inibam a peroxidação lipídica melhor do que a metilprednisolona, a neuroproteção ultraestrutural foi semelhante.

Em 2006, Arishima et al.,⁷² com o objetivo de avaliar o efeito antiapoptótico da EPO após lesão medular traumática, realizam ensaio experimental em ratos. Realizam análise histológica e imunoistoquímica, sendo que os resultados confirmam o efeito antiapoptótico da EPO. O tratamento com EPO diminuiu significativamente a quantidade de neurônios apoptóticos após lesão medular em ratos. Este efeito foi observado até 7 dias após a lesão. Os autores sugerem que a EPO exógena reduz o número de células apoptóticas observadas entre as fases muito precoces e subcrônicas seguintes.

Em 2012, Cerri et al.⁷³ baseados nos resultados de trabalhos prévios que mostram uma recuperação superior na escala locomotora BBB em ratos que receberam EPOrh após lesão medular, realizam ensaio experimental com o objetivo de avaliar o exame eletrofisiológico em modelos de lesão medular contusa após administração de EPO. Foi analisada a transmissão das vias ascendentes e descendentes em toda a medula nos dias 2, 5, 7, 11 e 30 após a lesão, no grupo tratado com EPOrh e no grupo controle tratado com solução salina. Os animais tratados com EPOrh mostraram uma recuperação superior na transmissão sensorial e motora, o que pode ter como consequência uma melhora na avaliação de escala locomotora, conforme demonstrado nos estudos anteriores.

Em 2014, Freitag et al.⁷⁴ avaliam, através da ressonância magnética reforçada com manganês, a terapia com EPO após lesão medular em ratos. Os animais foram divididos em dois grupos, um grupo tratado com EPO e um grupo controle. Laminectomia foi realizada ao nível de T11, seguida de lesão medular contusa. Ressonância magnética reforçada com manganês da cisterna magna foi realizada e a recuperação funcional foi avaliada pela escala BBB. Em seguida, os ratos foram sacrificados e a medula espinal foi extraída para realização de nova ressonância magnética. Os animais tratados com EPO mostraram recuperação funcional significativamente melhor e média mais elevada de alterações na ressonância magnética comparados ao grupo controle. Os autores concluíram que a ressonância magnética reforçada com manganês descreve com êxito o efeito terapêutico de EPO na fase precoce da lesão medular, o que leva a uma recuperação importante em ratos, uma resposta imunológica significativamente diminuída e redução do número de células apoptóticas no local da lesão.

Em 2016, de Mesquita Coutinho et al.²⁷ avaliam os efeitos farmacológicos da EPO e do tacrolimo (FK 506) no tratamento da lesão medular. Nesse 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: grupo controle, que recebeu soro fisiológico; EPO, que recebeu eritropoetina; EPO + FK 506, que recebeu EPO associada ao tacrolimo; e o FK 506, que recebeu somente tacrolimo. O grupo Sham foi submetido a lesão medular, porém, não recebeu qualquer droga. Os animais foram avaliados quanto à recuperação da função locomotora pela escala BBB. Foi realizada avaliação eletrofisiológica e análise dos achados histológicos da medula lesionada. O estudo não revelou diferenças na recuperação da função locomotora, nas análises histológica e eletrofisiológica nos animais submetidos ao tratamento farmacológico com EPO e com tacrolimo, após contusão medular torácica.

Em 2016, Marcon et al.⁷⁵ publicam ensaio experimental desenvolvido com 50 ratos Wistar submetidos a lesão medular contusa. Após o trauma, os animais foram divididos em cinco grupos de acordo com a droga recebida: EPO, gangliosídeo GM-1, solução combinada, placebo e *sham*. Os autores concluem que a EPO e o GM-1 exercem efeitos terapêuticos sobre a regeneração axonal, função motora e eletrofisiológica e que a administração dessas substâncias de maneira combinada potencializa esses efeitos.

2.3. Lesão medular: modelos experimentais e estudos clínicos

O primeiro modelo experimental de lesão de medular em animais foi desenvolvido e publicado por Allen em 1911.⁷⁶ Os animais utilizados pelo pesquisador foram cães, os quais foram submetidos a lesão medular contusa ao nível torácico por queda de peso. A unidade estabelecida para a lesão foi determinada pelo produto da massa do peso em gramas pela distância do peso à medula espinal em centímetros, g x cm. Estudo experimental do mesmo autor, publicado em 1914,⁷⁷ correlaciona a massa do peso com a gravidade da lesão medular sofrida pelo animal e observa os achados histopatológicos de edema e hemorragia surgidos na substância branca e cinzenta minutos após o trauma. O autor ainda sugere que a realização de mielotomia pode trazer benefícios pela redução da pressão intramedular.

Em 1923, McVeigh⁷⁸ publica seu estudo sobre lesão medular através de compressão digital, também em nível torácico, em animais e cadáveres humanos frescos. Evidencia a presença de achados histopatológicos de edema e hemorragia nas substâncias branca e cinzenta, não só na área que sofreu a lesão, mas também em áreas proximais. Observa o caráter progressivo da lesão, com surgimento de alterações até o segundo dia.

Estudo publicado por Tarlov et al.,⁷⁹ em 1953, utiliza um modelo experimental diferente dos anteriores. Após realização de laminectomia ao nível de T12, é realizada uma compressão medular progressiva através da colocação de um balão que é inflado no espaço epidural. O autor também apresenta um modelo de avaliação da função locomotora nos animais lesados e correlaciona o maior tempo de compressão medular com pior prognóstico motor.

Em 1956, Woodward e Freeman⁸⁰ utilizam um modelo experimental de lesão medular isquêmica não traumática em cães. Em seu estudo, os vasos nutridores da medula espinal foram ligados do nível de T6 até o nível de T11. Após o sacrifício dos animais e realização de análise histológica, foram evidenciados perda de neurônios, separação do elementos neurais intersticiais e cavitação.

Em 1969, Ducker e Hamit⁸¹ desenvolvem estudo experimental com cães, dividindo os animais em quatro grupos de acordo com os métodos, físicos ou químicos, utilizados no tratamento da lesão medular, em modelo também provocado por queda de peso na porção torácica da medula espinal. Os animais foram divididos da seguinte maneira, grupo EPO: não recebeu qualquer tratamento; grupo EPO/IL-6: tratamento com hipotermia, através de solução fisiológica resfriada a 0° C; grupo IL-6: administração de dexametasona intramuscular e grupo placebo: administração de metilprednisolona via intratecal. Os autores utilizaram a escala de avaliação motora proposta por Tarlov et al.⁷⁹ e concluem que os grupos que foram tratados com hipotermia e dexametasona intramuscular obtiveram melhor resultado neurológico.

Em 1971, Ducker et al.⁸² realizam ensaio experimental prospectivo randomizado, desta vez com macacos. Os animais são divididos em grupos de acordo com a massa e a distância que o peso cai sobre a transição toracolombar da medula. Os animais foram submetidos à eutanásia em diferentes momentos sendo, então, feita a avaliação histológica medular. Os autores observam que alterações como edema, hemorragia e necrose são diretamente proporcionais à massa e à distância do trauma sofrido. Concluem que a lesão aguda é mais localizada na porção central que na porção periférica da medula

espinal, sendo a substância cinzenta mais suscetível à lesão traumática que a substância branca, embora não consigam determinar o motivo.

Em 1970, Holdsworth⁸³ escreve estudo de extrema importância prática sobre fraturas vertebrais e lesões medulares. O autor classifica as fraturas da coluna vertebral de acordo com o mecanismo de trauma, padrões radiográficos e a presença de déficit neurológico. Também fortalece o conceito de lesão medular completa e incompleta, de acordo com a preservação de sensibilidade sacral e função motora nos segmentos distais à lesão traumática neste último padrão de lesão.

Em 1971, Wagner Jr et al.⁸⁴ publicam ensaio experimental utilizando macacos-rhesus como cobaias que foram submetidas a uma lesão medular contusa, preestabelecida, ao nível de T10, por queda de peso de 20 g localizado a uma distância de 15 cm do saco dural. A análise histológica da medula espinal foi realizada em cinco períodos de tempo diferentes (5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas) após o trauma. O estudo teve importância por enfatizar o caráter progressivo das alterações histopatológicas encontradas na medula espinal. No grupo examinado cinco minutos após a lesão, não foram visualizadas alterações importantes, apenas fluidos serosos sem formação de trombos e a microvasculatura encontrava-se intacta. Já nos grupos examinados uma hora e quatro horas após o trauma, foi encontrada hemorragia crescente, envolvendo tanto a substância branca quanto a substância cinzenta da medula espinal.

Em 1972, Kelly Jr. et al.⁸⁵ publicam ensaio experimental com cães, dividindo as cobaias em quatro grupos, e observam que a concentração de oxigênio está diminuída na medula espinal 30 minutos após a lesão e que a utilização de oxigênio hiperbárico pode aumentar a pressão parcial de oxigênio (PO₂) no tecido neural lesionado.

Em 1976, Dohrmann et al.⁸⁶ publicam artigo com ensaio realizado em gatos. Todos os animais foram submetidos a lesão medular contusa em nível torácico por um trauma preestabelecido de 400 g.cm. Os gatos foram divididos em cinco grupos de acordo com a combinação dos valores de peso e altura (80 g x 5 cm, 40 g x 10 cm, 20 g x 20 cm, 10 g x 40 cm e 5 x 80 cm), mas sempre com o mesmo produto final de 400 g.cm. Os autores encontram que a energia absorvida podia variar em até 100 vezes de um grupo para o outro.

Em 1978, Balentine⁸⁷ aplicou o modelo de lesão medular contusa por queda de peso na região torácica alta de ratos adultos. O autor confirmou o caráter crescente da necrose tecidual, inicialmente localizada na substância cinzenta, com posterior progressão para a substância branca da medula espinal. Afirmou ainda que a necrose

surge 30 minutos após a ruptura de vasos sanguíneos arteriais e venosos, finalizando-se 8 a 24 horas após a lesão.

No mesmo ano de 1978, Ducker et al.,⁸⁸ estudando cães após sofrerem lesão medular traumática, mensuram a concentração tecidual de oxigênio e afirmam que as medidas terapêuticas devem ter por finalidade melhorar a concentração de oxigênio e o aporte sanguíneo para a medula espinal.

Em 1979, Tator e Rowed,⁸⁹ estudando o fluxo sanguíneo após a lesão medular grave em ratos, defendem que, na maioria das lesões completas e incompletas, não ocorre transecção medular. Enfatizam a existência de uma lesão medular secundária e propõem que o tratamento da fase aguda deve visar a interrupção da morte celular secundária. Descrevem os padrões histológicos de lesão vascular na substância cinzenta e branca. Defendem que os corticosteroides têm papel importante na interrupção da resposta inflamatória secundária patológica.

Em 1981, Means et al.⁹⁰ publicam ensaio experimental realizado em gatos que sofreram lesão medular e receberam metilprednisolona durante a fase aguda do traumatismo. Os autores defendem os benefícios deste corticosteroide na recuperação neurológica dos animais. Evidenciam, ainda, que o surgimento de cavidades maiores está relacionado a um pior prognóstico motor.

Em 1982, Anderson et al.⁹¹ publicam ensaio experimental realizado com gatos submetidos a lesão medular contusa por queda de peso. Os animais são divididos em três grupos de acordo com a terapêutica administrada. O grupo EPO não recebe qualquer tratamento medicamentoso, o grupo EPO/IL-6 recebe uma dose de 15 mg/kg/24 h de metilprednisolona e o grupo IL-6 recebe uma dose de 60 mg/kg/24 h de metilprednisolona. Os autores concluem que o grupo que recebeu as maiores doses do corticosteroide permanece com perfusão microvascular superior aos demais grupos.

Em 1985, Bracken et al.⁹² publicam ensaio clínico multicêntrico mostrando os resultados encontrados em pacientes que receberam 1.000 mg em bolo diariamente de metilprednisolona durante 10 dias comparados ao grupo de pacientes que recebeu metilprednisolona numa dose diária de 100 mg em bolo durante 10 dias. Os autores concluíram que não houve diferença significativa na recuperação neurológica entre os grupos. Concluem ainda que o grupo que recebeu dose diária de 1.000 mg de metilprednisolona apresentou maior taxa de infecção de ferida operatória, embora essas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas.

Em 1987, Bresnahan et al.⁹³ aprimoram os estudos experimentais com lesão medular contusa e criam um aparelho de impacção com função eletromecânica, o NYU Impactor. Enfatizam o papel das propriedades mecânicas do impacto no padrão da lesão medular. Defendem que as características do tecido lesado podem influenciar a resposta do aparelho. Os autores avaliam a capacidade de reprodução lesional do método.

Em 1991, Geisler et al.⁹⁴ publicam ensaio clínico randomizado duplo-cego, placebo-controlado, com pacientes portadores de lesão medular aguda. Os pacientes recebem uma dose diária de 1.000mg de gangliosídeo GM-1 nos primeiros três dias após o trauma e continuam a receber durante 18 a 32 dias. São acompanhados com exame neurológico seriado padronizado pela escala de Frankel. Após um ano, os autores encontram melhora neurológica mais importante no grupo que recebeu GM-1 comparados ao grupo que recebeu solução placebo. Os autores propõem ainda que um estudo maior seja realizado para confirmar os achados.

Ainda em 1991, Trato e Fehlings⁹⁵ reforçam o papel da necrose celular pós trauma ocorrida durante a resposta inflamatória secundária no tecido neural. Os autores enfatizam a importância da interrupção da cascata de reações no tratamento da lesão medular aguda.

Em 1992, Bracken et al.¹¹ publicam novo ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, com metilprednisolona *versus* naloxene e solução placebo em portadores de lesão medula aguda. A metilprednisolona é administrada na dose de 30 mg/kg em bolo na primeira hora, seguida de 5,4 mg/kg nas 23 horas seguintes. O naloxene é administrado na dose de 5,4 mg/kg em bolo na primeira hora, seguido de uma dose de 4,0 mg/kg nas 23 horas seguintes. Resultados mostram que ocorreu melhora estatisticamente significativa nos escores sensitivos e motores em lesões completas e incompletas no grupo medicado com metilprednisolona, embora a magnitude desse efeito fosse pequena. Essas diferenças alcançaram resultados estatisticamente significativos devido ao grande tamanho da amostra para o estudo.

Em 1994, Constatini e Young⁹⁶ realizam ensaio experimental em ratos sobre o manejo da lesão medular aguda com metilprednisolona, gangliosídeo GM-1 e associação das duas drogas. Os resultados do estudo mostram que o GM-1 bloqueia a ação da metilprednisolona em ratos. Os autores concluem que essas duas drogas não devem ser administradas em associação aos pacientes.

Em 1995, Basso et al.⁹⁷ alteram o modelo da escala de avaliação locomotora criada por Tarlov et al.⁷⁹ para análise da lesão medular contusa em ratos. Resultados do estudo

confirmam a viabilidade e reprodutibilidade da nova escala proposta. A escala BBB fornece medida confiável aos pesquisadores para avaliar o tratamento da lesão medular em ratos.

Em 1996, Basso et al.⁹⁸ reforçam a validade da escala BBB, afirmando sua sensibilidade superior em relação aos modelos de avaliação locomotora anteriormente descritos e padronizam o aparelho New York University (NYU), elaborado para produzir lesão medular contusa em ratos. Os autores defendem que o sistema NYU pode realizar uma lesão medular reprodutível e graduada, em todos os ratos. Estabelecem que a análise dos efeitos da administração de medicamentos após a lesão medular contusa por queda de peso é mais clara quando um peso de 10 g é posicionado a uma distância de 12,5 e 25 mm de altura.

Em 1998, Bracken et al.⁹⁹ publicam ensaio clínico multicêntrico, randomizado duplo-cego com pacientes portadores de lesão medular aguda diagnosticada nas primeiras oito horas, comparando a eficácia da metilprednisolona, administrada por 24 e 48 horas, e do mesilato de tirilazade, administrado por 48 horas. São avaliadas a recuperação neurológica e as taxas de morbidade e mortalidade um ano após o trauma. Os pacientes que receberam tratamento medicamentoso nas três primeiras horas apresentaram recuperação neurológica semelhante nos três grupos. Nos pacientes que iniciaram o tratamento medicamentoso após três horas de lesão, o grupo que recebeu metilprednisolona por 24 horas apresentou menor taxa de recuperação neurológica, porém os pacientes que receberam metilprednisolona por 48 horas apresentaram maior taxa de recuperação neurológica. Com isso, os autores concluem que, se o tratamento for iniciado nas três primeiras horas, deve ser mantido por 24 horas. Se iniciado entre três e oito horas, a administração de metilprednisolona deve ser mantida por 48 horas.

Ainda em 1998, Ramón-Cueto et al.¹⁰⁰ publicam ensaio laboratorial com ratos que foram submetidos a transplante de células olfatórias gliais após transecção da medula espinal. Os autores iniciam uma nova linha de tratamento para lesão medular, inclusive quando há secção medular. O estudo realizado mostra que as células do bulbo olfatório permeiam e transpõem a fibrose presente na porção medular lesionada percorrendo uma distância de pelos menos 2,5 cm.

Em 2010, Rodrigues et al.¹⁰¹ estabelece um padrão para as lesões medulares contusas por queda de peso em ratos Wistar. Conforme publicado no estudo Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS), o autor utiliza aparelho computadorizado para produzir uma queda de peso provocando lesões padronizadas. Também evidencia que há uma correlação estatisticamente significativa entre o volume da lesão e os parâmetros mecânicos.

Também em 1999, Vialle et al.¹⁰² estudam as alterações histológicas surgidas na medula espinal de ratos após lesão por queda de peso com o aparelho NYU Impactor. Verificam que, seis horas após o trauma, já existe diminuição volumétrica dos neurônios; após 24 horas, são encontradas áreas de vacuolização e, com 48 horas de lesão espinal, há presença de degeneração e vacuolização neuronal importante.

Em 2000, Bracken¹⁰³ publica artigo de revisão sobre a terapêutica farmacológica da lesão medular aguda e conclui que a metilprednisolona é a única medida farmacológica eficaz. Porém, no mesmo ano, Short et al.¹⁰⁴ utilizam critérios de inclusão e exclusão preestabelecidos e encontram resultado diferente. Concluem não haver suporte para o uso de altas doses de metilprednisolona para melhora neurológica na lesão medular aguda.

Em 2001, Humbert¹⁰⁵ realiza revisão sistemática da literatura para avaliar o uso da metilprednisolona no manejo da lesão medular aguda. Baseado nas evidências, o autor conclui que não existe suporte na literatura para o uso deste corticosteroide em lesões medulares agudas e que seu uso por 48 horas pode ser prejudicial ao paciente.

Em 2002, Vialle et al.¹⁰⁶ publicam estudo objetivando avaliar as escalas de avaliação motora para lesão medular contusa em ratos produzida pela NYU Impactor. Os autores concluem que a avaliação motora extensa, apesar de preconizada na literatura, não se mostrou necessária.

Em 2005, Ferreira et al.¹⁰⁷ publicam ensaio experimental objetivando a padronização da técnica para obtenção do potencial evocado motor em ratos através da estimulação elétrica transcraniana. Foram utilizados ratos devidamente anestesiados e preparados. A latência mínima média das respostas dos membros superiores foi de 2,5 ms e de membros inferiores foi de 6,5 ms. A amplitude média das respostas foi de 3,0 mV e de 2,5 mV nos membros superiores e membros inferiores, respectivamente. Os autores concluem que a técnica para captação do potencial evocado motor em ratos apresentada é eficaz na análise da evolução eletrofisiológica da lesão medular, podendo ser reproduzida de modo simples, além de apresentar padrões de qualidade e aplicabilidade semelhantes aos observados na literatura mundial.

Em 2010, Marcon et al.¹⁰⁸ publicam estudo experimental com objetivo de avaliar os efeitos da metilprednisolona administrada previamente à lesão medular contusa em ratos, tanto em relação aos possíveis benefícios, quanto às possíveis complicações surgidas. O autor conclui que não houve diferença nos resultados motores em relação ao grupo controle

e que o grupo que recebeu metilprednisolona quatro horas antes da lesão apresentou maior número de óbitos precoces comparado ao grupo que recebeu a droga após o trauma.

Ainda em 2006, Tator¹⁰⁹ publica extensa revisão da literatura sobre os ensaios clínicos realizados em humanos com lesão medular aguda tratados com agentes farmacológicos. Até o ano da publicação, haviam sido realizados 10 ensaios clínicos. O autor revela que há poucos ganhos para os pacientes, existem várias deficiências no desenho dos estudos e faz várias recomendações para melhorias.

Em 2009, Cristante et al.¹¹⁰ publicam ensaio clínico não randomizado com a finalidade de avaliar o efeito da administração de células-tronco autógenas indiferenciadas no local da lesão medular em pacientes com lesão crônica. A análise foi realizada através do potencial evocado somato-sensitivo. O protocolo de ensaio de 2,5 anos mostrou-se seguro e ocorreu melhora dos potenciais somato-sensitivos em 66,7% dos pacientes com lesão medular completa.

Em 2011, Souza et al.¹¹¹ publicam ensaio experimental visando avaliar a eficácia do GM1, administrado por via intraperitoneal, após lesão medular experimental em ratos. Foram utilizados 20 ratos da raça Wistar machos, adultos jovens, divididos em dois grupos de dez animais. No grupo EPO foi administrado apenas soro fisiológico. Ao grupo EPO/IL-6, administraram-se 30 mg/kg de GM1 diariamente. As lesões foram produzidas seguindo-se o protocolo internacional MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study), com o sistema NYU Impactor. Os animais foram avaliados funcionalmente pela escala BBB. O potencial evocado foi realizado em todos os animais, no 42º dia após o trauma. As avaliações funcionais e por meio de potencial evocado não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Os autores concluíram que o emprego de GM1 intraperitoneal não demonstrou resultados satisfatórios após lesão medular experimental.

Em 2012, Cristante et al.¹⁰ publicam estudo de revisão sobre possíveis abordagens terapêuticas para a lesão da medula espinal. Os autores observam que a maior parte dos estudos divide a abordagem do paciente com lesão aguda da medula espinal em quatro: cirurgia corretiva, método de tratamento físico, biológico ou farmacológico. Os autores defendem que, apesar de a ciência ter progredido bastante em desvendar os mecanismos de proteção celular e neuroregeneração, clinicamente, o tratamento desses pacientes consiste ainda em cuidados de apoio. A combinação de várias estratégias terapêuticas

deve, no mínimo, permitir recuperações funcionais parciais para esses pacientes, o que poderia melhorar a sua qualidade de vida.

Em 2013, Hurlbert et al.¹¹² produzem artigo de revisão sobre a terapia farmacológica da lesão medular aguda. No estudo, os autores criticam a metodologia aplicada na elaboração dos ensaios clínicos envolvendo a metilprednisolona e gangliosídeo GM-1, e afirmam que o uso de altas dose de corticosteroides pode ser prejudicial, inclusive levando à morte.

Em 2015, Letaif et al.¹⁷ publicam ensaio experimental com objetivo de avaliar a influência do tratamento com estrógeno em ratos submetidos a lesão medular contusa por queda de peso. Foram utilizados 20 ratos Wistar, divididos em 2 grupos de 10 animais cada. No grupo EPO, os animais receberam 17-beta estradiol após a lesão medular. Os ratos do grupo EPO/IL-6 foram submetidos apenas a lesão medular (grupo controle). Os ratos foram avaliados pela escala BBB, sofreram também avaliação histológica e exame de potencial evocado. Os resultados das avaliações por exame de potencial evocado revelaram que o grupo experimental apresentou melhora estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Os resultados das avaliações anatomopatológicas pela histomorfometria mostraram melhor recuperação do grupo experimental com relação à proporção numérica e ao diâmetro das fibras nervosas contadas. Os autores concluíram que a administração de estrógeno em ratos submetidos à lesão medular mostrou benefícios na recuperação neurológica e funcional motora dos animais tratados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo deste estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia e pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**Anexo 1**).

A produção das lesões medulares, o tratamento farmacológico, a realização da avaliação 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.

Ratos da linhagem Wistar foram aleatoriamente divididos em cinco grupos homogêneos de 10 animais. Foi realizada lesão medular contusa em nível torácico em todos eles, utilizando-se o equipamento computadorizado de impacto por queda de peso “NYU Weight-Drop Impactor”.⁹⁸ O protocolo utilizado para a avaliação da função locomotora dos ratos em momentos predeterminados do estudo foi o proposto por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).⁹⁸ Os animais foram submetidos à primeira avaliação motora pós-lesão, segundo o protocolo BBB, e consideradas como portadoras de lesão medular. O tratamento medicamentoso recebido foi de acordo com o grupo ao qual o rato pertencia. Foram comparadas as taxas de recuperação da função locomotora entre os cinco grupos ao final do experimento.

Os animais foram mantidos em gaiolas por 48 horas, sendo submetidos a uma segunda avaliação locomotora. No 42^o dia de experimento, foi realizada também uma avaliação eletrofisiológica utilizando o potencial evocado motor para graduação do déficit neurológico. Os animais foram sacrificados após a análise eletrofisiológica e suas medulas espinais analisadas histologicamente quanto a hiperemia, hemorragia, necrose, infiltrado celular, degeneração de substância nervosa e realizada contagem de neurônios.

3.1. Seleção dos animais

Para a seleção dos ratos a serem submetidos à lesão medular, seguimos os critérios de inclusão e de exclusão estabelecidos por Rodrigues et al.¹⁰¹ e Santos et al.¹¹³ e utilizados no LETRAN, conforme segue.

3.1.1. Critérios de inclusão

- Ratos da linhagem Wistar;
- Machos adultos jovens (20 a 21 semanas de vida inclusive);
- Peso entre 340 gramas e 450 gramas inclusive;
- Pelagem normal sob inspeção visual;
- Condição geral de saúde boa;
- Motricidade inicial normal conforme avaliação pela escala BBB;

3.1.2. Critérios de exclusão

- Óbito após lesão;
- Infecção persistente após 10 dias de tratamento com antibioticoterapia;
- Anomalias observadas macroscopicamente na região medular;
- Perda maior que 10% do peso corporal após a lesão;
- Movimentação normal após a lesão (21 pontos na escala BBB);
- Autofagia ou mutilação entre os animais;

3.2. Formação dos grupos experimentais

Os 50 animais foram divididos em cinco grupos:

- **Grupo EPO:** Após lesão medular, os animais receberam eritropoetina recombinante (EPO), na dose de 100 UI/100 g, fabricada pela indústria farmacêutica Janssen-Cilag (Eprex-alfaepoetina, Schaffhausen, Suíça) em ampolas com doses de 10.000 UI e volume de 1 ml, administrada por via intraperitoneal diariamente durante três semanas.¹¹⁴

- **Grupo EPO + IL-6:** Eritropoetina + Interleucina-6 (IL 6). Após lesão medular: EPO na mesma dose e IL-6 na dose de 200 UI/100 g, Actemra, nome genérico tocilizumabe (caixas com 1 frasco-ampola contendo 4 mL de tocilizumabe), fabricada pelo Laboratório Roche, administrada por via intraperitoneal diariamente, também durante três semanas.

- **Grupo IL-6:** Após lesão medular: somente IL-6 na mesma dose, via e tempo.

- **Grupo placebo:** Após lesão medular: placebo, solução fisiológica por via intraperitoneal durante três semanas diariamente.

- **Grupo Sham:** Procedimento *sham*: realizada apenas laminectomia. Não houve lesão medular ou administração de droga.

Os ratos receberam uma marcação na cauda conforme o grupo ao qual pertenciam.

Os avaliadores não tinham conhecimento de qual marcação correspondia a qual grupo.

3.3. Padrão de lesão medular

3.3.1. *Protocolo de anestesia*

Os ratos foram anestesiados com 100 mg/kg de ketamina e 5 mg/kg de xilazina, intraperitonealmente, e para anestesia local foi utilizado o cloridrato de lidocaína com epinefrina. O plano anestésico profundo foi confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda e patas traseiras.¹¹³

3.3.2. *Exposição do saco dural e laminectomia*

Após tricotomia, foi realizada exposição da medula para contusão de maneira padronizada com auxílio de um microscópio cirúrgico. Realizou-se uma incisão na linha média dorsal para expor os arcos posteriores da coluna vertebral, de T8 a T11, com dissecação subperiosteal dos processos espinhosos e lâminas de T9 a T11 (**Figura 1**). Bisturi bipolar auxiliou na hemostasia, quando houve necessidade. Removeram-se, com saca-bocados, o processo espinhoso e a lâmina da vértebra T10 e a metade distal do processo espinhoso da T9 até completa exposição do saco dural e posicionamento da ponta da haste (punção) do NYU Impactor.⁹⁸ Respeitaram-se todos os demais cuidados relacionados por Rodrigues et al.¹⁰¹ e padronizados por Santos et al.¹¹³

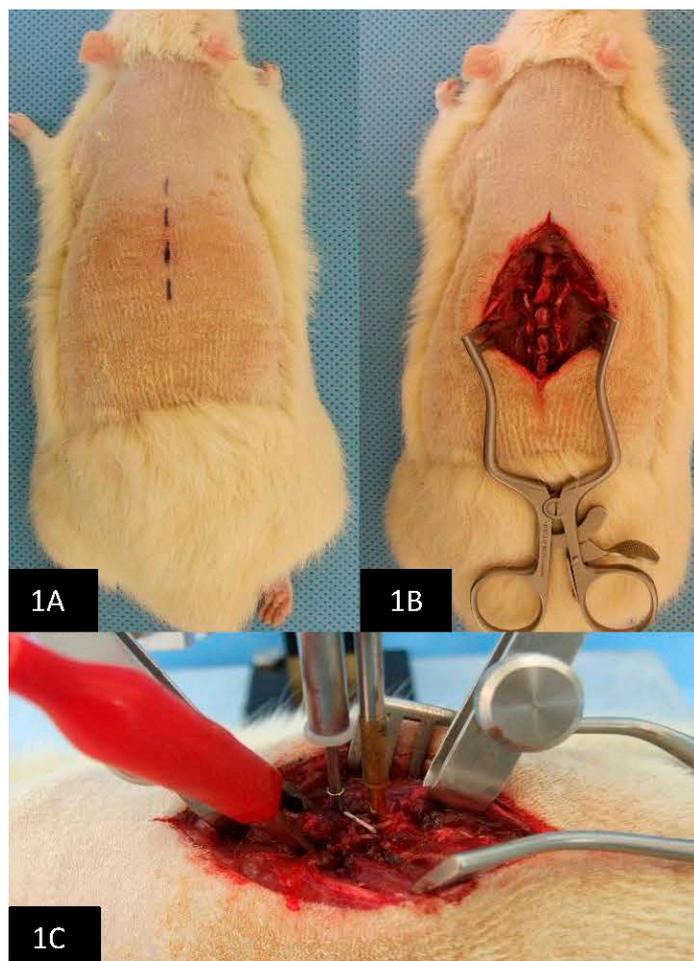


Figura 1 - Etapas do procedimento cirúrgico para realização da lesão medular. A) Tricotomia e incisão longitudinal mediana. B) Dissecção subperiosteal de T8 a T11. C) Garra de fixação nos processos espinhosos para estabilização e padronização da lesão medular.

3.3.3. Mecanismo de lesão medular

Foi utilizado o modelo padronizado para a reprodução de lesão medular moderada contusa por queda de peso, utilizando o dispositivo NYU Impactor. O equipamento computadorizado para impacto medular por queda de peso monitorada NYU Impactor é formado por (**Figura 2**):

- Haste de 10 g a 12,5 mm de altura predeterminada para contusão moderada;
- Tubo guia;
- Sistema de monitoração de posição, velocidade de queda, instante de contato, período de contato, deformação da coluna e deformação absoluta e relativa da medula;
- Dispositivos de interface (instrumentação);
- Microcomputador com sistema operacional Windows instalado;
- Vídeo monitor com conexão VGA (*video graphics array*);
- Placa de interface com saída paralela e temporizador.

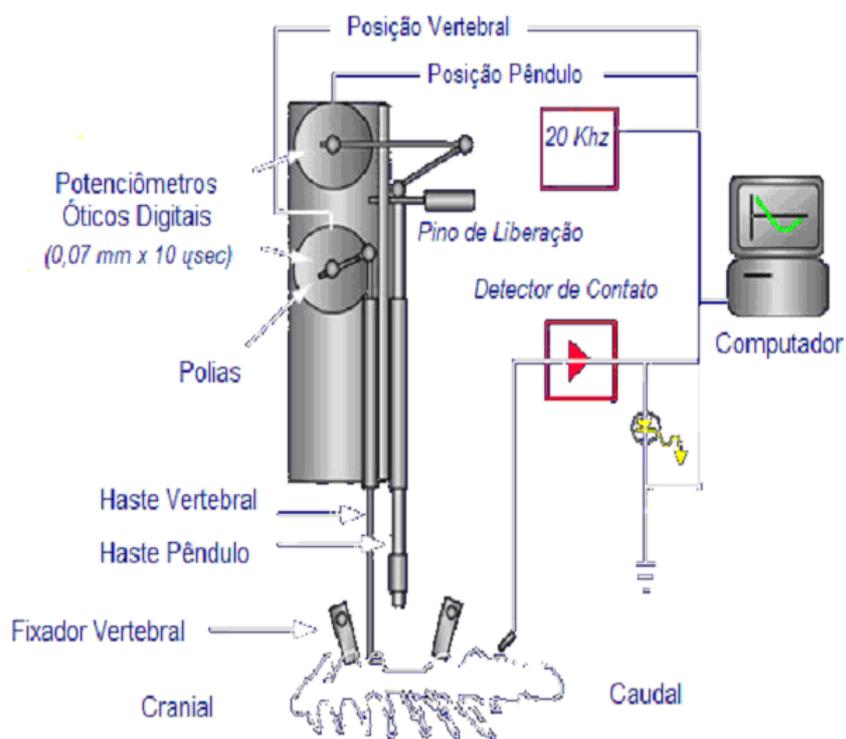


Figura 2 - Esquema ilustrativo do equipamento computadorizado NYU Impactor.

Os animais foram posicionados no NYU Impactor de modo a permitir o pleno contato da ponta da haste (punção) na superfície exposta da medula (margem de segurança de 0,2 mm de cada lado), na altura de T10. As duas garras reguláveis foram ajustadas para a fixação da coluna vertebral, presas aos processos espinhosos das vértebras T8 e T11, respectivamente. As garras têm por finalidade diminuir deformações do corpo do animal e, conseqüentemente, o movimento da coluna, quando ocorre a queda do peso, reduzindo-se os fatores de erros. Assim, produziram-se lesões homogêneas e reproduzíveis. Após a lesão, o sítio da lesão da contusão foi inspecionado e lavado com solução fisiológica de cloreto de sódio à temperatura ambiente. Foi realizada a aproximação dos planos musculares, fasciais e da pele com sutura de ponto simples com fio nylon monofilamentado 2.0 (**Figura 3**).

Foi produzida a contusão por meio da queda de uma haste de impacto pesando 10 g, localizada a uma distância preestabelecida de 12,5 mm do saco dural. A queda da haste ocorreu através de um tubo guia monitorado por computador. Durante a queda, foram monitorados a deformação absoluta e relativa da medula, a velocidade da haste, o instante de contato efetivo e o tempo de contato, com o objetivo de aumentar ao máximo a precisão do mecanismo de lesão medular.

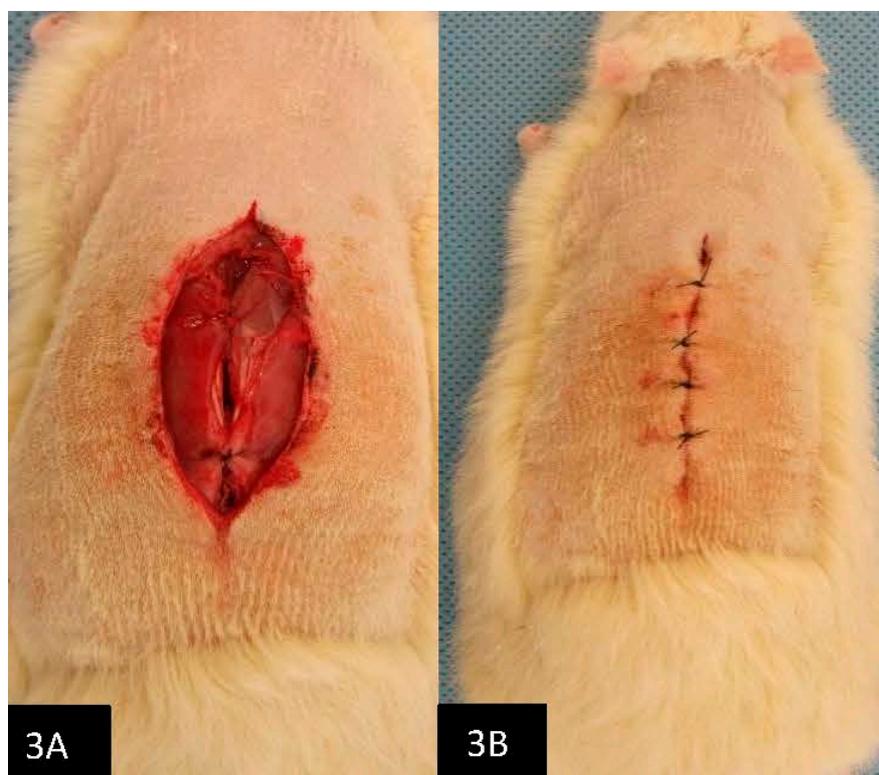


Figura 3 - Etapas de fechamento após realização do procedimento cirúrgico de lesão medular. A) Fechamento da musculatura dorsal. B) Sutura de pele com nylon monofilamentar 2.0.

3.3.4. Protocolo de cuidados pós-operatórios

Após a sutura da pele, realizou-se controle de temperatura para conforto térmico do animal. Foi ministrado meloxicam, 2 mg/kg uma vez ao dia por 7 dias, e cloridrato de tramadol, 5 mg/100 g por via intramuscular por 5 dias.

Todos os animais receberam antibioticoterapia profilática em dose única (cefazolina 2 mg/100 g, via intraperitoneal). Após a lesão medular, os animais perderam os reflexos de urinar, sendo, diariamente, realizadas manobras de extração de urina dos animais por pressão manual na bexiga e avaliação diária do grau de desidratação pelo turgor da pele, sendo verificada a necessidade de antibioticoterapia (levofloxacina, 2,5 mg/kg, por 10 dias) segundo a presença de sangue na urina. Se, após a terapia, o animal continuasse a apresentar sangue na urina, a infecção era considerada intratável e o animal era submetido a morte indolor induzida.

3.4. Avaliação motora

Após 48 horas do procedimento cirúrgico, foram realizadas avaliações motoras seguindo protocolo proposto por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). A função locomotora foi avaliada em sete momentos: 48 horas após a lesão e no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o e 42^o dias. Conforme padronizado pelo protocolo de avaliação motora BBB, observam-se os movimentos da articulação do quadril, joelho e tornozelo e a posição do tronco, cauda e patas traseiras. A partir dessas observações, foram 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, com domínio prévio da ficha de pontuação, 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. Os avaliadores fizeram as observações simultaneamente de cada animal pelo tempo mínimo de quatro minutos. 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 (**Anexos 2 e 3**). Caso houvesse discordância entre as avaliações, decidiu-se pela anotação da menor nota.

Os avaliadores neste estudo não tinham conhecimento de a qual grupo cada rato pertencia ou qual intervenção terapêutica recebeu, porque não sabiam o significado de cada marca na cauda animal. Desta maneira, o cegamento dos avaliadores ficou garantido.

3.5. Avaliação do potencial evocado somato-sensitivo e motor

Foi realizada avaliação de potencial evocado motor no 42^o dia pós-lesão. Para esta avaliação, os animais foram submetidos novamente ao procedimento anestésico, com a dose de 55 a 75 mg/kg de pentobarbital, via intraperitoneal.

A captação das respostas musculares foi realizada com a colocação de pares de eletrodos de agulha monopolar (captador e referência), com distância intereletrodos definida e fixa, para captação em membros superiores e inferiores, inseridos em sua musculatura proximal e anterior. O eletrodo de terra foi colocado na região lombar através de um eletrodo de agulha monopolar (**Figura 4**). A estimulação elétrica transcraniana é realizada com a colocação de dois eletrodos de agulha tipo *corkscrew*, na região frontal (anodo) e occipital (catodo) na linha inter-hemisférica, para estimulação bilateral simultânea. A calibração do aparelho é feita em dois aspectos para captação das respostas musculares: varredura: janela de 20 ms, sensibilidade: 2 mV/div, filtro de baixa frequência: 10 Hz e filtro de alta frequência: 10 KHz e a estimulação elétrica transcraniana através de estímulo único de 0,2 ms de duração.

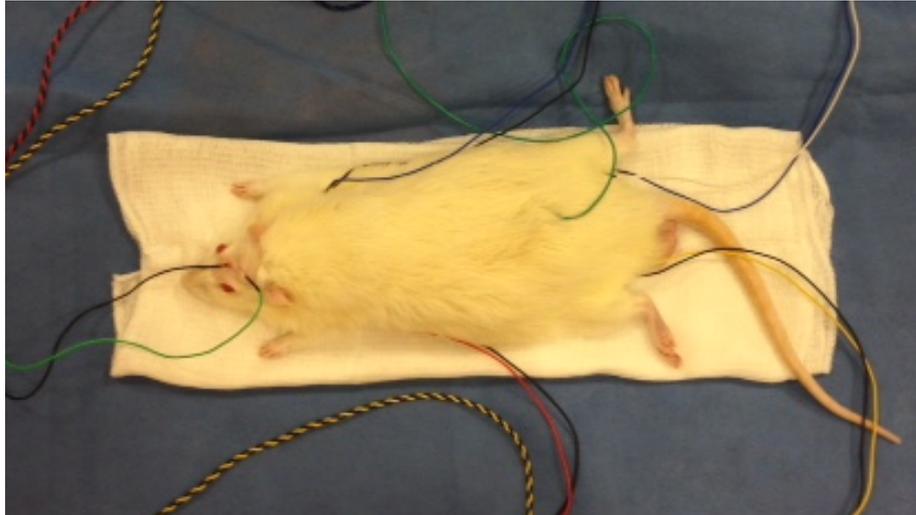


Figura 4 - Realização do exame de potencial evocado com animal sob anestesia.

3.6. Protocolo de eutanásia

A eutanásia foi realizada no 42^o dia com pentobarbital (140 mg/kg) por via intraperitoneal para indução de plano anestésico que, após confirmado, era seguido pela indução de cloreto de potássio por via intravenosa.

3.7. Preparo dos tecidos para avaliação histológica

Após confirmação da morte do animal, a medula espinal foi dissecada e retirada a partir do nível intervertebral C3 até o nível T10. Posteriormente, foi aderida linearmente em papel cartão com as respectivas identificações topográficas, principalmente onde se observaram achados macroscópicos de contusão medular, os quais foram identificados como área “B”. As áreas cefálicas foram marcadas como “A” e as caudais à lesão, como “C”. Depois de identificadas e acondicionadas, as medulas foram fixadas em formol a 10%.

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, em que se obtêm cortes histológicos com, no máximo, cinco micra 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 melhor resultado na aderência dos materiais à superfície.

3.7.1. Análise histológica qualitativa

As lâminas contendo cortes transversais da medula em nível perilesional e regiões próximas (**região B**) foram coradas utilizando o método de hematoxilina-eosina (HE). As alterações anatomopatológicas foram registradas como presente (P) e ausente (A). Foi analisada a presença de: necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância nervosa e infiltrado celular. Pontuação que varia de 0 a 3 (ausente, discreto, moderado e intenso) foi atribuída para cada uma das alterações em questão, em cada corte da medula histologicamente estudado.

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

3.7.2. Análise histológica quantitativa

A análise quantitativa foi realizada através de imagens digitais em grande aumento, utilizando objetiva de 40 vezes de ampliação, das porções medulares cranial e caudal (**regiões A e C**), após fixação em solução de tetróxido de ósmio a 2% e coloração com azul de toluidina a 1%, obtendo-se representação adequada das células neuronais. Foram selecionados dois campos de cada segmento, escolhidos pelo patologista os campos de melhor representação. As imagens foram avaliadas pelo software Sigma Scan Pro5.0 para a contagem das fibras dos axônios regenerados. Foram considerados para contagem somente os neurônios com diâmetro igual ou maior do que 15 μm .

3.8. Análise estatística

Os dados foram registrados 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 42º dia. O potencial evocado motor e os desfechos histológicos 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.

Todos os dados contínuos foram testados quanto à sua distribuição. Como os animais foram testados ao longo de sete momentos, em algumas medidas, e havia cinco grupos, os testes utilizados poderiam ser do tipo para medidas independentes e para medidas repetidas, dependendo do caso, e os testes paramétricos e não paramétricos foram escolhidos dada a distribuição gaussiana. Para análise da comparação entre os grupos, foram utilizados a análise de variância (ANOVA) ou o teste de Kruskal-Wallis. O teste post-hoc foi realizado pelo teste t de Student e pelo teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni. Para a análise temporal a comparação pareada, foi realizada ANOVA de medidas repetidas ou o teste de Friedman. Foi aceita como diferença estatisticamente significativa quando o erro do tipo I foi $\leq 0,05$.

4.2. Análise dos dados do potencial evocado

Os resultados da avaliação do potencial evocado, em 46 ratos, são demonstrados na **Tabela 2**, contendo os valores de média e desvio padrão da latência e amplitude. Os valores médios de amplitude e latência por grupo estão representados nos **Gráficos 2 e 3**, respectivamente. A **Tabela 3** evidencia, de maneira comparativa (grupo por grupo), os valores de amplitude e latência médias, segundo o valor de p (significância estatística).

Tabela 2 - Descrição dos resultados do potencial evocado, demonstrando a média e o desvio padrão de amplitude (AMP) e latência (LAT) de resposta nos membros inferiores dos animais de cada grupo durante a realização da avaliação do potencial evocado.

	Grupo	Média	Desvio padrão
Latência (LAT)	EPO	12,038	2,72
	EPO + IL-6	12,135	1,62
	IL-6	11,842	2,25
	Placebo	6,108	2,33
	Sham	20,791	4,93
Amplitude (AMP)	EPO	126,858	26,18
	EPO/IL-6	103,959	20,66
	IL-6	49,356	4,41
	Placebo	34,413	3,09
	Sham	189,064	6,76

Gráfico 2 - Amplitude média (AMP) de resposta dos membros inferiores (MI), de acordo com cada grupo.

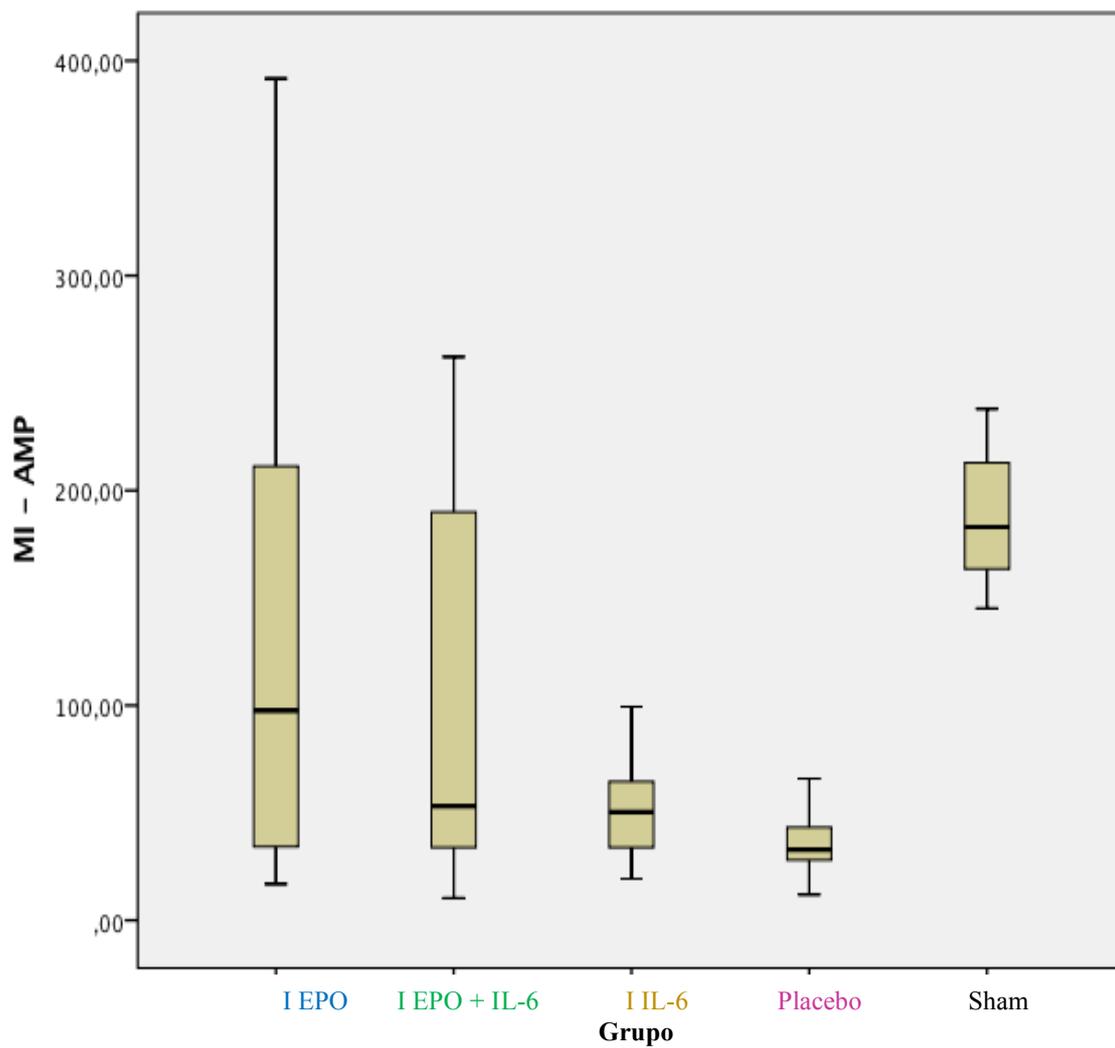


Gráfico 3 - Latência média (LAT) de resposta dos membros inferiores (MI), de acordo com cada grupo.

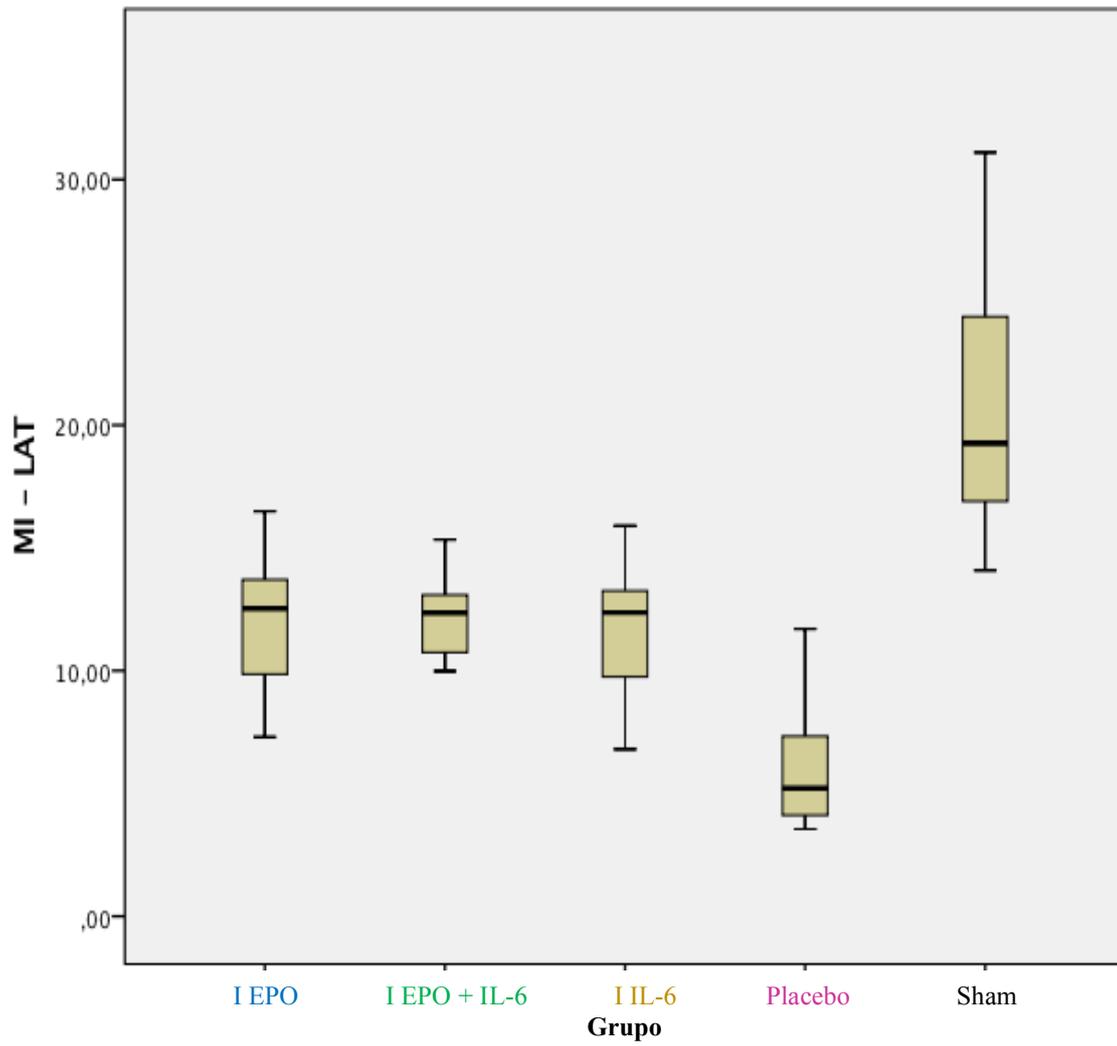


Tabela 3 - Comparação entre a latência média (LAT) e amplitude média (AMP) dos membros inferiores, entre os grupos experimentais, considerando os valores de p (significância estatística).

Grupo	p: AMP média (mA)	p: LAT média (ms)
EPO <i>versus</i> EPO/IL-6	< 1,000	< 1,000
EPO <i>versus</i> IL-6	< 0,003	< 1,000
EPO <i>versus</i> Placebo	< 0,001	< 0,001
EPO <i>versus</i> Sham	< 0,031	< 0,001
EPO/IL-6 <i>versus</i> IL-6	< 0,071	< 1,000
EPO/IL-6 <i>versus</i> Placebo	< 0,009	< 0,001
EPO/IL-6 <i>versus</i> Sham	< 0,001	< 0,001
IL-6 <i>versus</i> Placebo	< 1,000	< 0,001
IL-6 <i>versus</i> Sham	< 0,001	< 0,001
Placebo <i>versus</i> Sham	< 0,001	< 0,001

4.3. Análise histológica

A análise histológica dos escores atribuídos pelo avaliador a cada espécime de cada grupo é apresentada na **Tabela 4**. Para cada variável histológica, foram comparados necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração e infiltrado, verificando-se se houve diferença entre os grupos na região média distal (a "região B") da medula espinal. A avaliação confirmou que há diferença estatisticamente significativa (por meio do teste Kruskal-Wallis), entre os cinco grupos para todas as variáveis, exceto para hemorragia.

Tabela 4 - Análise histológica qualitativa do tecido medular perilesional dos ratos dos cinco grupos com média, desvio padrão e o correspondente valor de p (significância estatística).

Grupos	Necrose	Hemorragia	Hiperemia	Degeneração	Infiltrado celular
EPO	0,83 (0,753)	1,00 (0,894)	1,50 (1,049)	1,17 (0,753)	0,67 (1,033)
EPO + IL-6	0,44 (1,014)	0,22 (0,667)	1,78 (1,093)	1,44 (0,726)	0,44 (0,726)
IL-6	1,20 (0,789)	0,80 (1,135)	2,20 (0,919)	2,10 (0,316)	0,90 (0,994)
Placebo	1,33 (0,866)	1,00 (1,225)	1,56 (0,527)	1,67 (0,500)	1,22 (0,972)
Sham	0,10 (0,316)	0,60 (0,843)	- (-)	- (-)	0,20 (0,632)
p	0,003	0,338	0,0001	0,0001	0,087

*Teste de Kruskal-Wallis.

Como foi identificado pelo teste de Kruskal-Wallis que havia diferença entre os grupos quando comparados em conjunto, o teste de Mann-Whitney foi aplicado, também levando em consideração os resultados da região B da medula, e permitiu fazer comparações dois a dois. Este teste mostrou que havia diferença significativa para algumas comparações e não para outras, como mostra a **Tabela 5**. A tabela confirma que há diferenças significativas entre o grupo Sham (que não sofreu lesão medular) e os grupos EPO, EPO + IL-6, IL-6 e também com o grupo placebo. Não houve diferença entre o grupo EPO e o grupo EPO+ Il-6 ($p > 0,07$).

Tabela 5 - Comparação dois a dois dos resultados da análise histológica dos grupos e valor de p correspondente.

Grupos	Valores de p				
	Necrose	Hemorragia	Hiperemia	Degeneração	Infiltrado celular
EPO <i>versus</i> EPO + IL-6	0,114	0,071	0,536	0,963	0,423
EPO <i>versus</i> IL-6	0,408	0,536	0,161	0,055	0,965
EPO <i>versus</i> Placebo	0,236	0,918	0,758	0,481	0,541
EPO <i>versus</i> Sham	0,016	0,364	0,002	0,001	0,173
EPO + IL-6 <i>versus</i> IL-6	0,053	0,315	0,447	0,028	0,400
EPO + IL-6 <i>versus</i> Placebo	0,063	0,222	0,666	0,387	0,094
EPO + IL-6 <i>versus</i> Sham	0,661	0,356	0,0001	0,0001	0,447
IL-6 <i>versus</i> Placebo	0,720	0,780	0,133	0,156	0,549
IL-6 <i>versus</i> Sham	0,004	0,853	0,0001	0,0001	0,143
Placebo <i>versus</i> Sham	0,006	0,604	0,0001	0,0001	0,017

Nos **Gráficos 4 e 5** estão representados os achados observados da análise histológica quantitativa (objetiva) através da contagem de fibras das regiões medulares cranial (A) e caudal (C). Através do teste Bonferroni, que compara múltiplas variáveis, identificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos EPO, EPO + IL-6, IL-6 e placebo em relação à contagem de fibras, somente o grupo Sham apresentou diferença em relação aos demais.

Gráfico 4 - Média dos valores do número de fibras da porção cranial (A) da medula espinal dos cinco grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos EPO, EPO/IL-6, IL-6 e placebo, exceto em relação ao grupo Sham, conforme esperado.

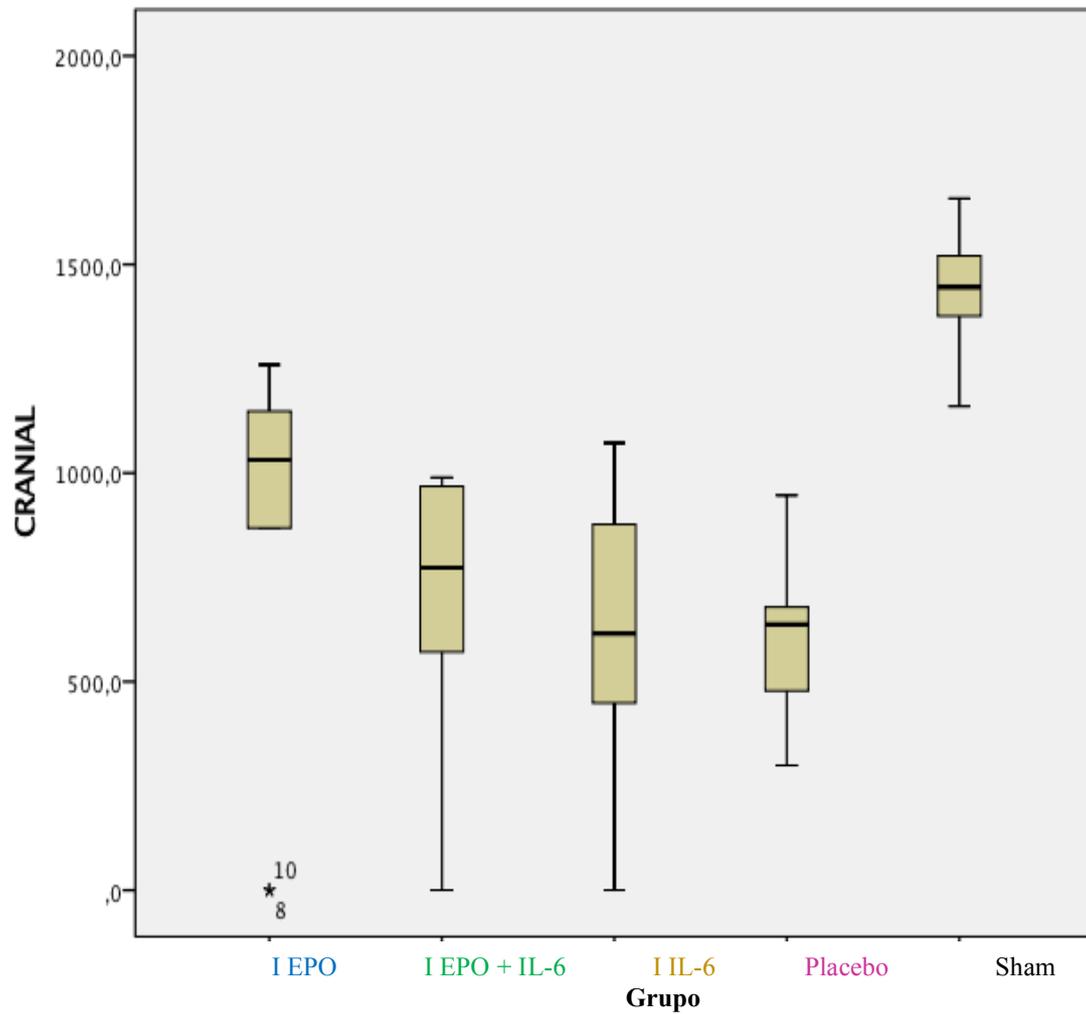
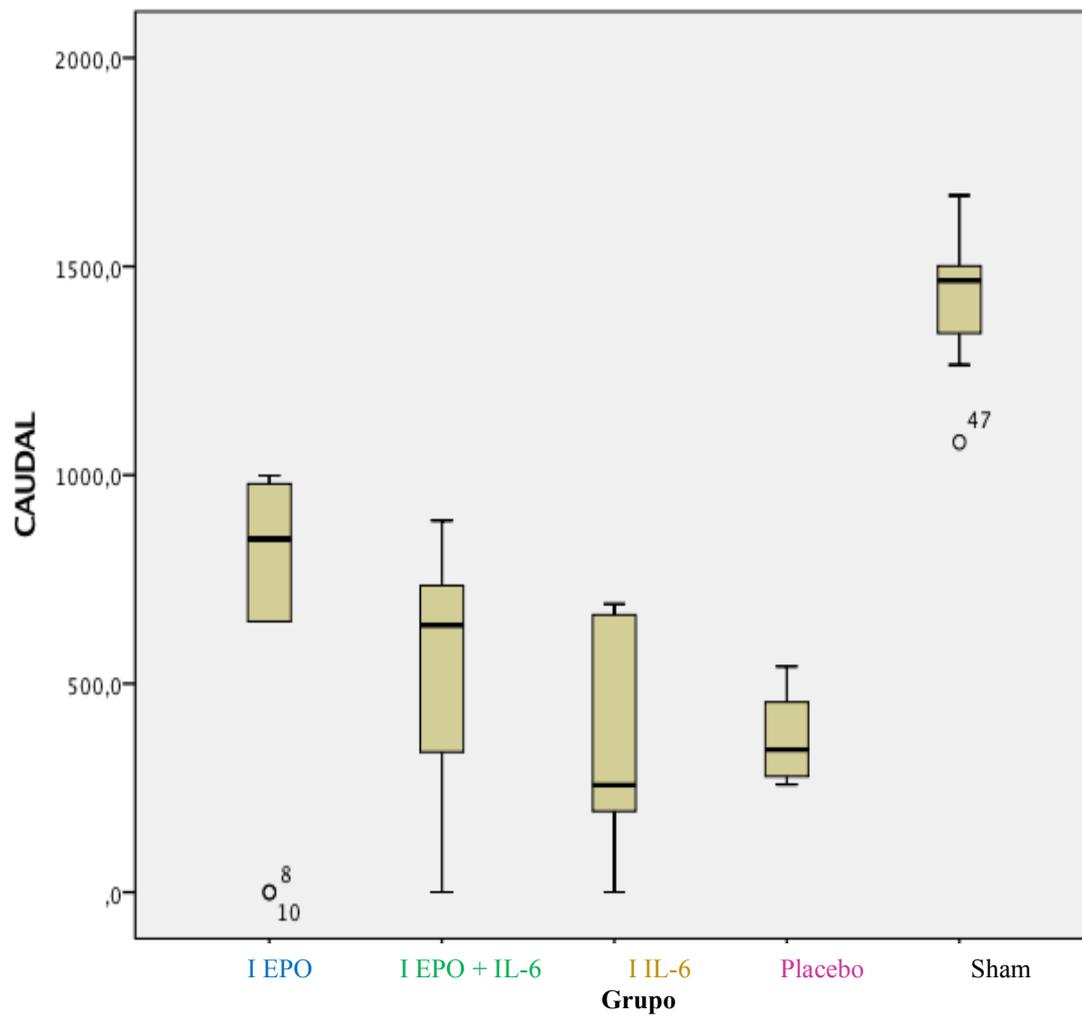


Gráfico 5 - Média dos valores do número de fibras da porção caudal (C) da medula espinal dos cinco grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos EPO, EPO/IL-6, IL-6 e placebo, exceto em relação ao grupo Sham, conforme esperado.



5. DISCUSSÃO

As lesões traumáticas da medula espinal provocam alto impacto na vida do indivíduo, com repercussões fisiológicas, sociais, econômicas e psicológicas enormes. Sua incidência é de aproximadamente 40 novos casos para cada 1 milhão de habitantes e essa proporção permanece inalterada ao longo das décadas, independentemente da região geográfica e situação econômica.¹ Apesar de todo desenvolvimento em várias áreas da ciência experimental, farmacologia, modelos experimentais de lesão medular, prática clínica e cirurgia da coluna vertebral, ainda não existe método de tratamento efetivo que resulte numa completa recuperação funcional e neurológica.¹¹⁵ Uma vez que a irreversibilidade da lesão medular primária já está estabelecida, o objetivo do tratamento farmacológico na lesão medular é interromper a cascata inflamatória responsável pela necrose isquêmica progressiva que ocorre na fase secundária no TRM.⁹⁴ Para isso, diversas classes de drogas têm sido testadas em ensaios experimentais.

A escolha do modelo experimental de lesão medular por queda de peso para realização deste estudo possibilitou a padronização da amostra. Optou-se pelo equipamento computadorizado NYU Impactor, já utilizado em outros ensaios experimentais e disponível no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP). A escolha desse equipamento permite a comparação dos resultados com outras instituições que integram o Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS). Os ratos selecionados foram da linhagem Wistar devido à maior disponibilidade e utilização prévia pelo Centro de Bioterismo da FMUSP.¹⁰¹ O número de animais (n) necessários para a formação dos grupos foi baseado na padronização da MASCIS e em estudos anteriores que adotaram modelo experimental semelhante.^{17,27,108}

O sistema NYU Impactor possui três graduações de altura da haste (12,5 mm, 25 mm e 50 mm). Em nosso estudo, optamos pela altura da haste de 12,5 mm por acreditarmos que a queda de uma altura de 25 mm provoca mais alterações anatomopatológicas que alterações funcionais e a queda de altura de 50 mm apresenta taxas de lesão medular completa e mortalidade elevadas.^{97,116}

Este ensaio experimental foi realizado com avaliações dos resultados de maneira cega. As avaliações pela pontuação na escala BBB, pelo potencial evocado, histológica (quantitativa e qualitativa) e estatística foram realizadas⁷⁵ por profissionais especialistas que não conheciam a qual grupo cada animal pertencia.

A escala de avaliação da recuperação funcional escolhida foi a proposta por Basso, Beattie e Bresnahan, escala BBB.⁹⁷ Esta é a principal escala utilizada para quantificar a recuperação motora em ratos portadores de lesão medular e segue o padrão estabelecido pelo MASCIS. Sua avaliação é considerada válida, reprodutível e permite comparações interinstitucionais.¹¹³

A análise funcional da escala BBB mostrou que os ratos submetidos ao tratamento com EPO (grupo EPO) apresentaram resultados significativamente melhores que os ratos pertencentes aos demais grupos, ao final das seis semanas. O grupo que recebeu tratamento com EPO e IL-6 (grupo EPO/IL-6) apresentou resultados superiores aos grupos IL-6 e placebo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo IL-6 e grupo placebo. No grupo EPO/IL-6, foi administrada EPO associada à IL-6 com a finalidade de investigar uma possível ação sinérgica dessas drogas na interrupção da resposta inflamatória da lesão medular aguda. Ao final das seis semanas do estudo, o grupo EPO/IL-6 apresentou escores inferiores ao grupo EPO que recebeu apenas EPO, porém apresentou resultados superiores ao grupo que recebeu apenas IL-6 (grupo IL-6), com diferenças estatisticamente significantes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo IL-6 e grupo placebo, o que indica que não há benefícios na recuperação motora após lesão medular contusa com a administração de IL-6 isolada. Acreditamos que o resultado do grupo EPO/IL-6 tenha sido superior ao grupo IL-6 devido à presença da EPO apenas, uma vez que não houve diferença entre o grupo que recebeu somente IL-6 (grupo IL-6) e o grupo que recebeu solução placebo (grupo placebo). Além disso, podemos inferir que a presença da IL-6 alterou negativamente a ação da EPO, uma vez que os resultados do grupo EPO/IL-6 foram inferiores aos do grupo EPO. Os resultados do uso da eritropoetina na lesão medular aguda em ratos encontrados na literatura são conflitantes.^{27,75,117} Esta controvérsia talvez possa ser explicada por diferenças existentes na construção dos estudos, como dose, tempo de tratamento, raça dos animais e padrão de lesão medular; e também associadas a mecanismos de atuação da EPO ainda desconhecidos.

A análise neurofisiológica através do potencial evocado padronizada em nosso laboratório permite coleta de dados de amplitude e latência.¹⁰⁷ O potencial evocado motor é um método de análise da propagação dos impulsos elétricos medulares com captação na musculatura dos quatro membros do animal.¹⁰⁹ Para transmissão do estímulo elétrico, é necessária a integridade axonal e mielínica das fibras nervosas. A preservação da bainha de mielina é expressa através do parâmetro de latência, que conceitualmente é o tempo decorrido entre o estímulo e o registro da resposta gráfica do potencial. A integridade do componente axonal é expressa pela amplitude do potencial, seja motor ou somatossensitivo. O parâmetro de amplitude é definido como a voltagem entre o início do potencial e seu pico negativo ou a diferença entre o pico negativo e o positivo.

Em nosso estudo, os valores médios de amplitude encontrados foram superiores no grupo EPO e grupo EPO/IL-6, não havendo diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos. O grupo IL-6 e grupo placebo apresentaram valor médio de amplitude inferior aos dois primeiros grupos, porém sem diferença estatisticamente significativa entre si. Esses achados correlacionam-se com os resultados obtidos com análise da escala funcional BBB, indicando uma melhor recuperação axonal com a administração de EPO. Em relação à avaliação da latência, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam administração de drogas. O grupo Sham apresentou o maior valor médio de latência, o que consideramos contrassenso, pois os animais desse grupo não sofreram lesão medular e apresentaram avaliação normal na escala funcional BBB. Desconsideramos os resultados de latência média obtidos, pois a literatura mostra que esse parâmetro pode sofrer influências pelo pequeno tamanho do animal, e uma quantidade de mínima de fibras nervosas preservadas pode transmitir o impulso elétrico, falseando sua interpretação.⁷⁵

O estudo histopatológico da medula espinal dos animais é importante para avaliar o grau de dano celular e evidências de alterações morfológicas neuronais. Estudos realizados no LETRAN têm sugerido que a coloração com hematoxilina e eosina para avaliação histológica da medula espinal não é sensível o bastante para detectar diferenças significativas.¹⁰¹ Ainda assim, com a finalidade de verificar alguma evidência de lesão tecidual, as amostras foram enviadas para análise histológica pelo método de coloração de hematoxilina e eosina. Em nosso estudo, não houve diferença estatisticamente significativa na análise histológica quantitativa por contagem de células entre os grupos de estudo. O grupo Sham, conforme esperado, apresentou resultados estatisticamente

significativo em relação aos demais grupos, por não ter sofrido lesão medular. A análise histológica qualitativa também não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Atribuímos essa falta de correlação entre os resultados obtidos com a avaliação da escala de locomoção BBB e análise do potencial evocado motor, contrapondo-se aos resultados obtidos com a análise histológica, à metodologia utilizada para o estudo histológico e o modelo de lesão medular utilizado com queda de peso de altura de 12,5 mm, de intensidade moderada.¹¹⁸ A escolha por essa altura prioriza mais alterações funcionais que morfoestruturais.

A IL-6 possui um papel fundamental nas lesões traumáticas do SNC, sendo uma das citocinas pró-inflamatórias mais encontradas na fase aguda e subaguda após traumatismos da medula espinal, participando ativamente da lesão secundária ao tecido nervoso espinal.¹¹⁹ Possui funções importantes na proliferação e diferenciação de linfócitos B e T, secreção de imunoglobulinas e ativação de macrófagos.⁴³ Após sua liberação, a IL-6 liga-se ao seu receptor específico, formando o complexo IL-6/ IL-6-R, que interage com a glicoproteína não ligante de membrana, gp130, de maneira extracelular, fornecendo o sinal de ação da IL-6 dentro das células.⁴⁶

A ocorrência de uma lesão medular é acompanhada de grande aumento na concentração de IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias. Essa elevação inicia-se cerca de 30 minutos após o trauma e permanece por cinco horas, aproximadamente. Após esse período, observa-se um declínio na expressão desses mediadores antes do aparecimento de macrófagos e neutrófilos, 24 horas após o trauma. Este pico precoce sugere que a IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias são principalmente produzidas células do próprio SNC (microglia e neurônios) e não por leucócitos infiltrantes, como pensado inicialmente.¹²⁰ Estudos experimentais corroboram com esta teoria, mostrando que, na presença de uma lesão traumática do SNC, o receptor de IL-6 está presente em oligodendrócitos e neurônios, e que a neurite induzida por IL-6 promove aumento da sobrevivência neuronal pela indução da produção de fatores neurotróficos.^{121,122}

O papel da IL-6 na resposta inflamatória após lesão medular ainda não está muito bem definido. Talvez, esta interleucina tenha tanto uma função como fator neurotrófico quanto como fator citotóxico. Existem algumas explicações para essas funções aparentemente contraditórias. Esse aumento inicial na expressão de IL-6 e de outras citocinas inflamatórias nas primeiras horas após a lesão medular pode ser danoso devido a uma superprodução desses mediadores, ultrapassando uma janela de atuação entre

benefício e toxicidade bastante curta.¹²³ Estudos *in vitro* mostraram que é necessário que as células estejam intactas, sem lesão traumática, para que ocorra efeito neurotrófico da IL-6, o que talvez não aconteça *in vivo*.¹²⁰ As atividades celulares das citocinas são complexas e estão sujeitas a variações de tempo, concentração, receptores e subtipos.^{124,125} Estudos mostram que a injeção de citocinas na medula espinal quatro dias após a lesão promove diminuição da ativação das micróglia, redução do recrutamento de macrófagos circulantes e perda tecidual. Entretanto, quando essas mesmas citocinas são administradas um dia após a lesão, a resposta inflamatória pós-traumática e perda tecidual foi melhor.^{126,127} Em nosso estudo, a administração de IL-6 após lesão medular aguda não mostrou trazer benefícios à recuperação neurológica.

A EPO possui papel descrito como neuroprotetor nas lesões isquêmicas e traumáticas do SNC, demonstrado em ensaios experimentais.¹⁹⁻²¹ Ela atua reduzindo a resposta inflamatória, promovendo angiogênese, inibindo a peroxidação lipídica e modulando a resposta antiapoptótica.^{21,72,128} Em nosso trabalho, observamos que, ao longo das semanas, o grupo EPO apresentou escores superiores na avaliação pela escala BBB e também apresentou valor médio de amplitude mais elevado comparado aos demais grupos. Essa melhor recuperação neurológica, com diferença estatisticamente significativa, identificada nos animais que receberam a EPO como tratamento para lesão medular aguda, nos permite fortalecer a hipótese de função da EPO como agente neuroprotetor.⁷⁵ Acreditamos que a utilização da EPO no tratamento da lesão medular aguda deve ser estudada em trabalhos futuros e que outras variáveis, como dose, tempo de tratamento, via de administração, sinergismo com outras drogas, aplicabilidade clínica, dentre outros fatores, devam ser avaliados.

6. CONCLUSÃO

A administração de eritropoetina após lesão medular contusa experimental em ratos mostrou benefícios na recuperação motora. A associação de eritropoetina e interleucina-6 (IL-6) mostrou benefícios, porém com resultados inferiores aos da eritropoetina isolada. O uso isolado de IL-6 não mostrou benefícios após lesão medular contusa experimental em ratos.

7. ANEXOS

Anexo I. Comissão de ética no uso de animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/09/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **078/14** intitulado: **“Avaliação do efeito de interleucina-6 e da eritropoetina em lesão medular em ratos”** que utilizará **40** animais da espécie **rato**, apresentado pelo **Instituto de Ortopedia e Traumatologia**.

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

Pesquisador (a) Responsável: Alexandre Fogaça Cristante

Pesquisador (a) Executante: Alderico Girão Campos de Barros

CEUA-FMUSP, 04 de Setembro de 2014

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

Anexo II. Ficha de pontuação com os atributos que acompanham a escala de avaliação locomotora de BBB

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

Movimento do membro posterior						Posição do tronco				Abdome	Movimento da pata dianteira						Pisada				Coordenação	Liberação dos dedos				Posição predominante da pata				Instabilidade do tronco	Cauda	
Quadril		Joelho		Tornozelo		Lado		Apoio			Balanço	Apoio da pata				Dorsal		Plantar		Liberação dos dedos		Contato inicial		Elevação								
E	D	E	D	E	D	E	D	E	D			Arastando	E	D	E	D	E	D	E	D		E	D	E	D	E	D	E	D			E
0	0	0	0	0	0	E	D	E	D	Arastando	E	D	E	D	E	D	0	0	0	0	0	0*	0*	I	I	I	I					Para cima (elevada)
S	S	S	S	S	S	E	D	E	D	Arastando	E	D	E	D	E	D	O	O	O	O	O	O	O	E	E	E	E					Para cima (elevada)
E	E	E	E	E	E	Central				Paralelo							F	F	F+	F+	F	F**	F**	P	P	P	P					Para baixo (abaixada)
						Alto				Alto							C	C	C	C	C	C	C									Para baixo (abaixada)

Comentários: _____

Movimento

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

Anexo III. Escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)

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

(continua)

(continuação)

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

(continua)

(continuação)

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Glick T. Spinal cord injury surveillance: is there a decrease in incidence? *Journal of Spinal Cord Medicine*. 2000;23 (suppl):61 [abstract].
2. Lemes EC, Vasconcelos M, Riberto M. Caracterização clínica e das situações de fratura da coluna vertebral no município de ribeirão preto, propostas para um programa de prevenção do trauma raquimedular [Clinical characterization and description cases of vertebral spinal fracture in the municipality of ribeirão preto, proposals for a spinal cord trauma prevention program]. *Coluna/Columna*. 2011;10(1):40-3.
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. 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.
5. 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.
6. 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.

7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Cristante AF, Barros Filho TE, Marcon RM, Letaif OB, Rocha ID. Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics (São Paulo)*. 2012;67(10):1219-24.
11. 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.
12. Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg*. 2000;93(1 Suppl):1-7.
13. Short D. Is the role of steroids in acute spinal cord injury now resolved? *Curr Opin Neurol*. 2001;14(6):759-63.
14. Fu ES, Tummala RP. Neuroprotection in brain and spinal cord trauma. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2005;18(2):181-7.
15. Qian T, Guo X, Levi AD, Vanni S, Shebert RT, Sipski ML. High-dose methylprednisolone may cause myopathy in acute spinal cord injury patients. *Spinal Cord*. 2005;43(4):199-203.

16. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA*. 1997;277(20):1597-604.
17. Letaif OB, Cristante AF, Barros Filho TE, Ferreira R, Santos GB, Rocha ID, et al. Effects of estrogen on functional and neurological recovery after spinal cord injury: An experimental study with rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2015;70(10):700-5.
18. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(6):484-94.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*. 2003;198(6):971-5.
23. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004;103(3):921-6.

24. Grasso G, Sfacteria A, Passalacqua M, Morabito A, Buemi M, Macrì B, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression after experimental spinal cord injury encourages therapy by exogenous erythropoietin. *Neurosurgery*. 2005;56(4):821-7; discussion 821-7.
25. Cayli SR, Kocak A, Yilmaz U, Tekiner A, Erbil M, Ozturk C, et al. Effect of combined treatment with melatonin and methylprednisolone on neurological recovery after experimental spinal cord injury. *Eur Spine J*. 2004;13(8):724-32.
26. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Quartarone C, et al. Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. *Br J Pharmacol*. 1999;127(2):482-8.
27. de Mesquita Coutinho PR, Cristante AF, de Barros Filho TE, Ferreira R, Dos Santos GB. Effects of tacrolimus and erythropoietin in experimental spinal cord lesion in rats: functional and histological evaluation. *Spinal Cord*. 2016;54(6):439-44.
28. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004;16(5):E1.
29. Tansey MG, Frank-Cannon TC, McCoy MK, Lee JK, Martinez TN, McAlpine FE, et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Front Biosci*. 2008;13:709-17.
30. 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.
31. Schroeter M, Jander S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. *Neuromolecular Med*. 2005;7(3):183-95.

32. Atkins S, Loescher AR, Boissonade FM, Smith KG, Occleston N, O’Kane S, et al. Interleukin-10 reduces scarring and enhances regeneration at a site of sciatic nerve repair. *J Peripher Nerv Syst.* 2007;12(4):269-76.
33. Lee HK, Wang L, Shin YK, Lee KY, Suh DJ, Park HT. Interleukin-6 induces proinflammatory signaling in Schwann cells: a high-throughput analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;382(2):410-4.
34. Lee HK, Seo IA, Suh DJ, Hong JI, Yoo YH, Park HT. Interleukin-6 is required for the early induction of glial fibrillary acidic protein in Schwann cells during Wallerian degeneration. *J Neurochem.* 2009;108(3):776-86.
35. Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci.* 2002;22(15):6696-703.
36. Grothe C, Heese K, Meisinger C, Wewetzer K, Kunz D, Cattini P, et al. Expression of interleukin-6 and its receptor in the sciatic nerve and cultured Schwann cells: relation to 18-kD fibroblast growth factor-2. *Brain Res.* 2000;885(2):172-81.
37. Inserra MM, Yao M, Murray R, Terris DJ. Peripheral nerve regeneration in interleukin 6-deficient mice. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126(9):1112-6.
38. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 1986;324(6092):73-6.
39. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature.* 1988;332(6159):83-5.

40. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*. 1989;58(3):573-81.
41. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, et al. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood*. 1993;82(4):1120-6.
42. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 1994;368(6469):339-42.
43. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:797-819.
44. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. 1997;6(3):315-25.
45. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. 2001;14(6):705-14.
46. Okazaki M, Yamada Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mihara M. Characterization of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody. *Immunol Lett*. 2002;84(3):231-40.
47. Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, et al. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res*. 2004;76(2):265-76.

48. Cafferty WB, Gardiner NJ, Das P, Qiu J, McMahon SB, Thompson SW. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *J Neurosci*. 2004;24(18):4432-43.
49. Nakamura M, Okada S, Toyama Y, Okano H. Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005;28(3):197-204.
50. Pineau I, Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol*. 2007;500(2):267-85.
51. Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, et al. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000113.
52. Mukaino M, Nakamura M, Yamada O, Okada S, Morikawa S, Renault-Mihara F, et al. Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation. *Exp Neurol*. 2010;224(2):403-14.
53. Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, Johnson WE, et al. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation*. 2012;9:40.
54. Murakami T, Kanchiku T, Suzuki H, Imajo Y, Yoshida Y, Nomura H, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody reduces neuropathic pain following spinal cord injury in mice. *Exp Ther Med*. 2013;6(5):1194-8.
55. Tan Y, Uchida K, Nakajima H, Guerrero AR, Watanabe S, Hirai T, et al. Blockade of interleukin 6 signaling improves the survival rate of transplanted bone marrow stromal cells and increases locomotor function in mice with spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013;72(10):980-93.

56. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy*. 2016;8(8):959-70.
57. Carnot P, Deflandre C. Sur l'activité hémopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *Académie Sci*. 1906;143:432-5.
58. Hjort E. Reticulocyte increase after injection of anemic serum. *Mag F Laegvidensk*. 1936;97:270-7.
59. Krumdieck N. Erythropoietic substance in the serum of anemic animals. *Experimental Biology and Medicine*. 1943;54(1):14-7.
60. Erslev A. Humoral regulation of red cell production. *Blood*. 1953;8(4):349-57.
61. Bonsdorff E, Jalavisto E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1948;16(2-3):150-70.
62. Reissmann KR. Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood*. 1950;5(4):372-80.
63. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*. 1957;179(4560):633-4.
64. Fisher JW, Birdwell BJ. The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused kidney. *Acta Haematol*. 1961;26:224-32.
65. Kuratowska Z, Lewartowski B, Michalak E. Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood*. 1961;18:527-34.
66. Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med*. 1977;89(3):640-4.

67. 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.
68. 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.
69. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*. 1991;77(11):2497-503.
70. 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.
71. Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate*. 2001;79(3-4):228-35.
72. 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.
73. 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.
74. 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*. 2015;25(4):582-9.

75. Marcon RM, Cristante AF, de Barros TE Filho, Ferreira R, Dos Santos GB. Effects of ganglioside G(M1) and erythropoietin on spinal cord lesions in rats: functional and histological evaluations. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016;71(6):351-60.
76. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA*. 1911;LVII(11):878-80.
77. Allen AR. Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *Journal of Nervous and Mental Disease*. 1914;41(3):141-7.
78. McVeigh JF. Experimental cord crushes: with special reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the cords affected. *Arch Surg*. 1923;7(3):573-600.
79. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1953;70(6):813-9.
80. Woodard JS, Freeman LW. Ischemia of the spinal cord; an experimental study. *J Neurosurg*. 1956;13(1):63-72.
81. Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg*. 1969;30(6):693-7.
82. Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg*. 1971;35(6):700-8.
83. Holdsworth F. Fractures, dislocations, and fracture-dislocations of the spine. *J Bone Joint Surg Am*. 1970;52(8):1534-51.
84. Wagner FC, Dohrmann GJ, Bucy PC. Histopathology of transitory traumatic paraplegia in the monkey. *J Neurosurg*. 1971;35(3):272-6.

85. Kelly DL Jr, Lassiter KR, Vongsvivut A, Smith JM. Effects of hyperbaric oxygenation and tissue oxygen studies in experimental paraplegia. *J Neurosurg.* 1972;36(4):425-9.
86. Dohrmann GJ, Panjabi MM. "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. *Surg Neurol.* 1976;6(5):263-7.
87. 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.
88. Ducker TB, Salcman 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.
89. Tator CH, Rowed DW. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can Med Assoc J.* 1979;121(11):1453-64.
90. Means ED, Anderson DK, Waters TR, Kalaf L. Effect of methylprednisolone in compression trauma to the feline spinal cord. *J Neurosurg.* 1981;55(2):200-8.
91. Anderson DK, Means ED, Waters TR, Green ES. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg.* 1982;56(1):106-13.
92. 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.
93. 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.

94. Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal-cord injury--a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *N Engl J Med.* 1991;324(26):1829-38.
95. 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.
96. Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 1994;80(1):97-111.
97. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995;12(1):1-21.
98. 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.
99. 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.
100. Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci.* 1998;18(10):3803-15.
101. 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.
102. Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Bleggi-Tores 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.

103. Bracken MB. Pharmacological interventions for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2):CD001046.
104. Short DJ, El Masry WS, Jones PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury - a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord.* 2000;38(5):273-86.
105. Hurlbert RJ. The role of steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S39-46.
106. 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.
107. 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.
108. Marcon RM, Souza FI, Teixeira WGJ, Barbarini AF, Colares G, Taricco MA, et al. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar [Experimental study on the action of methylprednisolone on Wistar rats before spinal cord injury]. *Acta Ortop Bras.* 2010;18(1):26-30.
109. Tator CH. Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery.* 2006;59(5):957-82; discussion 982-7.
110. Cristante AF, Barros-Filho TEP, Tatsui N, Mendrone A, Caldas JG, Camargo A, et al. Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. *Spinal Cord.* 2009;47(10):733-8.

111. Souza FI, Barros Filho TEP, Cristante AF. Avaliação do emprego do GM1 após lesão medular experimental em ratos [Evaluation of the use of GM1 after experimental spinal cord injury in rats]. *Coluna/Columna*. 2011;10(4):305-8.
112. Hurlbert RJ, Hadley MN, Walters BC, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, et al. Pharmacological therapy for acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 2013;72 Suppl 2:93-105.
113. 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.
114. Myers RR, Sekiguchi Y, Kikuchi S, Scott B, Medicherla S, Protter A, et al. Inhibition of p38 MAP kinase activity enhances axonal regeneration. *Exp Neurol*. 2003;184(2):606-14.
115. van Middendorp JJ, Barbagallo G, Schuetz M, Hosman AJ. Design and rationale of a Prospective, Observational European Multicenter study on the efficacy of acute surgical decompression after traumatic Spinal Cord Injury: the SCI-POEM study. *Spinal Cord*. 2012;50(9):686-94.
116. Marcon RM, Cristante AF, de Barros Filho TE, de Oliveira RP, dos Santos GB. Potentializing the effects of GM1 by hyperbaric oxygen therapy in acute experimental spinal cord lesion in rats. *Spinal Cord*. 2010;48(11):808-13.
117. 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.
118. Iyer S, Maybhate A, Presacco A, All AH. Multi-limb acquisition of motor evoked potentials and its application in spinal cord injury. *J Neurosci Methods*. 2010;193(2):210-6.

119. Bethea JR, Dietrich WD. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Neurol*. 2002;15(3):355-60.
120. Yang L, Blumbergs PC, Jones NR, Manavis J, Sarvestani GT, Ghabriel MN. Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human traumatic spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(9):966-71.
121. Kossmann T, Hans V, Imhof HG, Trentz O, Morganti-Kossmann MC. Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production in astrocytes. *Brain Res*. 1996;713(1-2):143-52.
122. Hans VH, Kossmann T, Lenzlinger PM, Probstmeier R, Imhof HG, Trentz O, et al. Experimental axonal injury triggers interleukin-6 mRNA, protein synthesis and release into cerebrospinal fluid. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(2):184-94.
123. Zhang M, Tracey KJ. Tumor necrosis factor. In: Thomson AW, Lotze MT, eds. *The cytokine handbook*. 3th ed San Diego: Thomson AW; 1998. p. 517-49.
124. Botchkina GI, Meistrell ME 3rd, Botchkina IL, Tracey KJ. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med*. 1997;3(11):765-81.
125. Sipe KJ, Srisawasdi D, Dantzer R, Kelley KW, Weyhenmeyer JA. An endogenous 55 kDa TNF receptor mediates cell death in a neural cell line. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996;38(2):222-32.
126. Bethea JR. Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword. *Prog Brain Res*. 2000;128:33-42.
127. Klusman I, Schwab ME. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res*. 1997;762(1-2):173-84.

128. 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.