
ALESSANDRO GONZALEZ TORELLI

**Estudo experimental com avaliação funcional e imuno-
histoquímica do efeito do monogangliosídeo G(M1) e da
eritropoetina na lesão medular contusa em camundongos
Balb/C**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa de
Barros Filho

SÃO PAULO
2021

ALESSANDRO GONZALEZ TORELLI

**Estudo experimental com avaliação funcional e imuno-
histoquímica do efeito do monogangliosídeo G(M1) e da
eritropoetina na lesão medular contusa em camundongos
Balb/C**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Tarcísio Eloy Pessoa de
Barros Filho

SÃO PAULO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Torelli, Alessandro Gonzalez

Estudo experimental com avaliação funcional e
imunohistoquímica do efeito do monogangliosídeo G(M1)
e da eritropoetina na lesão medular contusa em
camundongos Balb/C / Alessandro Gonzalez Torelli. --
São Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.

Orientador: Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho.

Descritores: 1.Eritropoetina 2.Gangliosídeo G(M1)
3.Compressão da medula espinal 4.Medula espinal
5.Camundongos Balb C

USP/FM/DBD-382/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Diva**, pelo exemplo de fortaleza, amor incondicional, dedicação e abdicção em favor dos filhos. Sem ela nada seria possível.

Aos meus irmãos, **Cristiano e Rodrigo**, pelo amor, amizade, dedicação e inestimável suporte familiar durante toda a trajetória da minha vida.

Ao meu Pai, **Benedito** (in memoriam).

À minha esposa, **Rita**, por sua inteligência sagaz, suporte e delicadeza.

Ao meu filho, **Antonio**, que em seu sorriso carrega todo o sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, meu sincero agradecimento pelo apoio à minha formação profissional, pela confiança e pelas oportunidades oferecidas.

Ao Professor Doutor **Olavo Pires de Camargo**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade, apoio e confiança.

Ao Professor Doutor **Gilberto Luis Camanho**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade, apoio e confiança.

Ao Doutor **Reginaldo Perilo Oliveira**, Chefe do Grupo de Coluna do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos, pelas inúmeras oportunidades oferecidas e por ter me apoiado e acolhido desde o início no grupo.

Ao Professor Doutor **Alexandre Fogaça Cristante**, Chefe do Grupo de Coluna Cervical e Trauma Raquimedular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas

incontáveis e valiosas oportunidades oferecidas dentro e fora do ambiente acadêmico, pelos ensinamentos, pela paciência, pela inestimável contribuição a minha formação profissional, pelo forte exemplo de dedicação profissional, postura ética e da força do trabalho.

Ao Professor Doutor **Raphael Martus Marcon**, Chefe do Grupo de Deformidades da Coluna Vertebral do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas incontáveis e valiosas oportunidades oferecidas dentro e fora do ambiente acadêmico, pelos ensinamentos em campo cirúrgico e fora dele, pela inestimável contribuição à minha formação profissional, pelo inabalável bom humor, altruísmo e pelo forte exemplo de dedicação profissional, postura ética e da força do trabalho.

Ao médico veterinário **Gustavo Bispo dos Santos**, pela dedicação e inestimável contribuição a realização deste trabalho.

Ao estatístico **Rogério Ruscitto do Prado**, pela competência na análise e discussão dos dados.

À **Camila Gomes da Rocha D'Agostino**, bibliotecária-chefe da biblioteca do IOT-HCFMUSP (Instituto de Ortopedia e Traumatologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), e outros profissionais que contribuíram para revisão e escrita deste trabalho.

À **Vera Paschon** pela execução e leitura das lâminas de imuno-histoquímica.

Aos meus colegas do Grupo de Coluna do IOT-HCFMUSP (Instituto de Ortopedia e Traumatologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), pelos ensinamentos, companheirismo e amizade ao longo desses anos, em especial ao Doutor **Ivan Dias da Rocha**, Doutor **Pedro de Araújo Petersen** e à enfermeira **Tania Fernanda Cardoso da Silva**.

A **todos os funcionários do IOT-HC-FMUSP** que possibilitaram a realização desta pesquisa.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Nomes das estruturas anatômicas baseados na Terminologia Anatômica: Terminologia Anatômica Internacional, Editora Manole, 1a ed. São Paulo, 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5a edição, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto nº 6583/2008.

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journal 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 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*.

SUMÁRIO**Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas****Listas de figuras****Lista de tabelas****Resumo****Abstract**

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	OBJETIVO.....	5
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1	Modelos de experimentos em lesão da medula espinal: evolução histórica	7
2.2	Estudos sobre irrigação tecidual na lesão da medula espinal: evolução histórica	17
2.3	Estudos experimentais sobre substâncias terapêuticas	20
2.4	Métodos de avaliação da lesão medular experimental: evolução histórica	31
2.5	Estudos sobre lesão medular experimental em camundongos	35
3	MÉTODOS.....	44
3.1	Ética.....	44
3.2	Animais de experimentação.....	45
3.3	Grupos experimentais.....	47
3.4	Modelo experimental de lesão medular.....	48
3.4.1	Protocolo de anestesia.....	48
3.4.2	Procedimento cirúrgico e lesão medular experimental.....	49
3.4.3	Cuidados após lesão medular.....	52
3.5	Intervenções experimentais: G(M1) e eritropoietina.....	53
3.6	Avaliação da capacidade locomotora pela escala BMS e MFS (Anexos B e C).....	54
3.7	Protocolo de eutanásia (CONCEA).....	55
3.8	Protocolo de necrópsia e avaliação medular.....	56

3.9	Preparo dos tecidos e avaliação imuno-histoquímica.....	57
3.10	Análise estatística.....	58
4	RESULTADOS.....	61
4.1	Análise funcional.....	61
4.2	Análise imuno-histoquímica.....	71
5	DISCUSSÃO.....	77
6	CONCLUSÃO.....	88
7	ANEXOS.....	90
8	REFERÊNCIAS.....	95

ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
anti-GFAP	Anticorpo policlonal anti-gliial fibrillary acidic protein
AKP	Proteína-quinase B
ATP	Adenosina de Trifosfato
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
BMS	Basso Mouse Scale
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
cm	Centímetro
COBEA	Conselho Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAPI	4'-6-diamino-2-fenil-indol
EPO	Eritropoietina
EPO-r	Receptores de eritropoietina
EPO-rh	Eritropoietina recombinante
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
G(M1)	Gangliosídeo M1
g.cm	Gramas. centímetros
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-eosina
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia

IOT-HCFMUSP	Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
JAK-2	Janus tirosina-quinase 2
kg	Quilogramas
LETRAN	Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos Periféricos
MAC	Macintosh
MASCIS	Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study
mBBB	Modificação da escala de Basso, Beattie e Bresnahan
MBP	Myelin basic protein
MFS	Mouse Function Scale
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mm de Hg	Milímetros de mercúrio
MSF	Hindlimb Motor Function Scale
n	Número da amostra
NYU-Impactor	New York University Impactor
O.C.T	Optimal Cutting Temperature
PB	Tampão de fosfato
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidil-inositol-quinase 3
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
T10	Décima vértebra torácica
T11	Décima primeira vértebra torácica
T12	Décima segunda vértebra torácica
T5	Quinta vértebra torácica
T6	Sexta vértebra torácica
T7	Sétima vértebra torácica

T8	Oitava vértebra torácica
T9	Nona vértebra torácica
UI	Unidades Internacionais
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Sequência de procedimentos cirúrgicos realizada nos camundongos para exposição medular. A) Tricotomia e marcação da extensão da incisão; B) Incisão longitudinal sobre coluna vertebral e afastamento dos músculos nos processos espinhosos de T7 a T11; C) Laminectomia com pinça; D) Detalhe mostrando medula torácica exposta..... 50
- Figura 2 -** Produção da lesão medular experimental. A) Posicionamento do camundongo sobre a plataforma e fixação de processos espinhosos proximais e distais à área de exposição medular; B) Acoplamento da plataforma ao sistema NYU-Impactor; C) Posicionamento da haste de impacto em contato com a medula, porém, sem compressão para definir o nível zero; D) Elevação da haste de impacto à altura de 12,5 mm preparando-a para causar contusão medular por queda de peso..... 52
- Figura 3 -** Perfis médios da escala BMS segundo grupos e respectivos erros padrões..... 63
- Figura 4 -** Perfis médios da escala MFS segundo grupos e respectivos erros padrões..... 64
- Figura 5 -** Imunofluorescência de proteína básica da mielina (MBP, verde) contracorado com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, azul) em secções longitudinais da medula espinhal de camundongos submetidos à lesão medular por contusão. A) Microfotografia da medula espinhal de animal do grupo controle (SF) marcada com MBP; B) Zoom digital da área selecionada de A; C) Microfotografia da medula espinhal de animal com lesão medular e tratado com GM1; D) Zoom digital da área selecionada de C; E) Microfotografia da medula espinhal de animal com lesão medular e tratado com 72

eritropoietina; F) Zoom digital da área selecionada de E; G) Microfotografia da medula espinhal de animal com lesão medular e tratado com GM1 + eritropoietina; H) Zoom digital da área selecionada de G.....

Figura 6 - Valores médios e respectivos erros padrões do número de axônios segundo grupos..... 73

Figura 7 - Valores médios e respectivos erros padrões da soma dos comprimentos dos axônios segundo grupos..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição das escalas funcionais antes da lesão segundo grupos e resultado dos testes comparativos	61
Tabela 2 -	Descrição das escalas de funcionalidade segundo grupos e momentos de avaliação após indução da lesão e resultado dos testes comparativos.....	62
Tabela 3 -	Resultado das comparações múltiplas da escala BMS segundo grupos e momentos de avaliação.....	65
Tabela 4 -	Resultado das comparações múltiplas da escala MFS segundo grupos e momentos de avaliação.....	68
Tabela 5 -	Descrição dos parâmetros da imuno-histoquímica segundo grupos e resultado dos testes comparativos.....	74
Tabela 6 -	Comparações múltiplas dos parâmetros da imuno-histoquímica entre os grupos.....	75

RESUMO

Torelli AG. *Estudo experimental com avaliação funcional e imuno-histoquímica do efeito do monogangliosídeo G(M1) e da eritropoietina na lesão medular contusa em camundongos balb C* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2021.

Após a lesão medular inicial, segue-se a necrose celular que, inicialmente, está restrita a essa área. À medida que eventos metabólicos e vasculares desencadeados pela lesão inicial vão somando-se a esse processo, tecidos intactos sofrem lesão secundária apoptótica. Dessa forma, a área de dano celular é ampliada e, conseqüentemente, o comprometimento neurológico e funcional desses pacientes é agravado. Os esforços terapêuticos nos casos de lesão medular têm se concentrado em reduzir a lesão secundária e em promover a regeneração axonal. Atualmente, porém, não há estratégias farmacológicas com benefício comprovado e aplicabilidade clínica no tratamento de pacientes acometidos por lesões medulares. Estudos realizados, a partir de lesão medular programada em modelos animais, têm sugerido que algumas drogas como a eritropoietina (EPO) e o gangliosídeo G(M1) demonstraram efeitos neuroprotetores e neurotróficos quando administrados imediatamente após a lesão. Neste estudo, estabeleceu-se como objetivo a avaliação desses possíveis efeitos funcionais e imuno-histoquímicos da (EPO) e do G(M1) tanto de forma isolada como combinada. Para tal, um modelo de lesão medular contusa foi reproduzido em camundongos Balb C, com o objetivo de avaliar desempenho dessas drogas em um modelo de pesquisa com cobaias que oferecem maior facilidade de manuseio, maior resistência e menor custo. Por sorteio, os 32 camundongos foram divididos em quatro grupos: grupo G(M1), composto por animais que sofreram lesão medular e administração de gangliosídeo G(M1) (30 mg/kg); grupo (EPO), composto por animais que sofreram lesão medular e administração de eritropoietina (1000 UI/kg); grupo combinado, composto por animais que sofreram lesão medular e administração concomitantemente de G(M1) e de eritropoietina (EPO); grupo salina, configurou o controle e foi composto por animais que sofreram lesão medular e que receberam injeção de solução salina (0,9%). Para todos os grupos, a administração das drogas foi via intraperitoneal e as lesões medulares experimentais foram provocadas pelo equipamento NYU-Impactor. Os animais foram avaliados segundo a escala BMS e MFS. Após a eutanásia, foi realizada a análise imuno-histoquímica do tecido medular proveniente da área da lesão. O grupo G(M1) apresentou melhor desempenho funcional em ambas as escalas, e o grupo com tratamento combinado apresentou desempenho funcional intermediário entre o grupo G(M1) e o grupo eritropoietina. O pior resultado foi o do grupo salina. A análise das medulas espinhais por imuno-histoquímica mostrou que o número e o comprimento de axônios mielinizados foram significativamente maiores no grupo

da eritropoietina do que em qualquer outro grupo que sofreu intervenção ($p < 0,01$). Esta pesquisa mostrou que o G(M1) e a eritropoietina exercem efeitos terapêuticos na regeneração axonal em camundongos submetidos à lesão experimental da medula espinhal e que a administração de apenas G(M1) teve as pontuações mais altas nas escalas BMS e MFS.

DESCRITORES: Eritropoietina; Gangliosídeo G(M1); Compressão da medula espinhal; Medula espinhal; Camundongos Balb C.

ABSTRACT

Torelli AG. *An experimental study with functional and immunohistochemical assessments on the effect of monoganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord contusion injury in BALB/c mice* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2021.

After the initial spinal cord injury, cell necrosis follows, restricting initially to this area. As metabolic and vascular events triggered by the initial injury are added to this process, intact tissues suffer secondary, apoptotic injury. Thus, the area of cell damage is extended and, consequently, the neurological and functional impairment of these patients is aggravated. Therapeutic efforts in cases of spinal cord injury have focused on reducing secondary injury and promoting axonal regeneration. However, there are no pharmacological strategies with proven benefit and clinical applicability in treating patients affected by spinal cord injuries. Studies carried out from programmed spinal cord injury in animal models have suggested that some drugs such as erythropoietin (EPO) and ganglioside GM1 demonstrated neuroprotective and neurotrophic effects when administered immediately after the injury. This study aimed to evaluate these possible functional and immunohistochemical effects of EPO and GM1, alone and in combination. A model of spinal cord contusion injury was reproduced in BALB/c mice to evaluate the performance of these drugs in a research model that offer an ease handling, greater resistance, and lower cost. Thirty-two mice that suffered spinal cord injury were randomly divided into four groups: GM1 group, receiving standard ganglioside GM1 (30 mg/kg); EPO group, receiving erythropoietin (1000 IU/kg); combination group, receiving both drugs; and control group, receiving an injection of saline solution (0.9%). All animals were subjected to experimental spinal cord injury using the NYU Impactor device and received intraperitoneal treatment. The animals were evaluated according to the Basso Mouse Scale (BMS) and Hindlimb Mouse Function Score (MFS). After euthanasia, immunohistochemical analysis of the spinal cord tissue was performed. The group with the best functional performance on both scales was the GM1 group, and the combination group had intermediate functional performance between the GM1 and the EPO group. The worst result was the control group. Immunohistochemical analysis showed that the numbers and the length of myelinated axons were significantly greater in the EPO group than in any other intervention group ($p < 0.01$). This research showed that GM1 and erythropoietin have therapeutic effects on axonal regeneration in mice subjected to experimental spinal cord injury and administration of GM1 alone had the highest scores on the BMS and MFS scales.

DESCRIPTORS: Erythropoietin; G(M1) ganglioside; Spinal cord compression; Spinal cord; Mice; Mice, BALB C.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Resultante de acidentes ou de violência, a lesão medular acomete, com maior frequência, adultos jovens entre 20 e 40 anos de idade. Embora sua incidência represente 23 casos novos por 1 milhão de habitantes/ano ao redor do mundo e a prevalência anual entre 220 e 285 mil casos^{1,2}, a morbidade e a mortalidade associadas são altamente dispendiosas³⁻⁵. Ademais, gastos para a adaptação da residência e de automóveis, cuidados diários e encargos trabalhistas são os principais componentes de despesas extras iniciais. Além do impacto financeiro, constatam-se altas taxas de mortalidade entre os indivíduos acometidos por lesão medular ao compará-las com as taxas referentes à população geral⁵. Outro fator importante refere-se à debilitação e à perda de função, pois quase metade dos casos atingem um comprometimento funcional completo abaixo do nível da lesão medular.

No Brasil, a exata incidência do traumatismo raquimedular não é conhecida. No entanto, estima-se que sejam constatados de 50 a 100 novos casos ao ano por milhão de habitantes, cerca de 11 mil novos casos ao ano⁶.

A perda funcional decorrente da lesão medular é resultado de uma atividade multifatorial contínua que é melhor compreendida quando dividida em dois momentos predominantes. Iniciada no epicentro da contusão, o decesso celular é ocasionado pela energia mecânica transferida ao tecido, promovendo necrose⁷. Segue-se, após a agressão medular, a expansão da lesão para o tecido nervoso adjacente previamente saudável aumentando, dessa forma, a área acometida, levando à intensificação local da morte celular programada^{8,9}.

A lesão que se segue ao trauma inicial está associada a alterações biomoleculares que começam imediatamente após a contusão. Alterações metabólicas profundas relacionadas à resposta inflamatória, aos produtos provenientes da degradação de moléculas de oxigênio e à via de ativação do ácido araquidônico levam a um aumento da concentração extracelular de aminoácidos, edema e diminuição da irrigação sanguínea para a medula espinhal¹⁰⁻¹³.

A queda no aporte de oxigênio e de importantes substratos diminui a disponibilidade no ambiente intracelular de adenosina de trifosfato (ATP), a liberação de glutamato decorrente desse desequilíbrio celular leva a edema e apoptose celular¹⁴.

Em seguida, o aumento do lactato e a redução do pH local, secundários à queda nos níveis de (ATP), provocam dilatação vascular e maior aporte sanguíneo, colaborando para criação moléculas reativas de oxigênio. Nesse ambiente de desequilíbrio homeostático, os neurônios sofrem uma ativação de proteases intracelulares com conseqüente peroxidação lipídica, provocando um aumento da morte celular. O acúmulo dessas substâncias acentua o processo inflamatório na substância branca e a sua desmielinização¹⁵.

Os esforços nas buscas por um tratamento eficiente da vítima de lesão medular estão concentrados em se obter uma diminuição da progressão da lesão neurológica para os tecidos circunjascentes ainda saudáveis e para a tentativa de recuperação dos axônios na região da lesão. No entanto, atualmente, não há uma opção medicamentosa disponível para uso na prática clínica diária¹⁶. Embora muitas instituições continuem a usar altas doses de metilprednisolona no tratamento do trauma raquimedular, as publicações que

suportavam essas medidas têm sido alvo de críticas quanto à qualidade e metodologia empregada nesses estudos¹⁶⁻¹⁸. Há efeitos colaterais nessa terapia, inclusive para o processo de regeneração neuronal^{19,20} e possíveis complicações clínicas graves desencorajam o seu uso regular¹⁶.

Nos últimos anos, inúmeras publicações colocam o estrogênio e seus agonistas²¹⁻²³ com potencial efeito terapêutico, bem como outras drogas como o gangliosídeo G(M1), a eritropoetina^{24,25}, o magnésio¹⁶ e o tacrolimus²⁶.

O G(M1) mostrou seus benefícios em diversos estudos para o tratamento de lesões neurológicas secundárias decorrentes de acidentes vasculares cerebrais, de neuropatia periférica associada ao diabetes e de doença de Parkinson^{27,28}. Suspeita-se que o G(M1) atue inibindo o edema celular através da ativação de bombas iônicas, promovendo dessa forma, um reequilíbrio do metabolismo celular²⁹ e, principalmente, promovendo o aumento de fatores protetores neurotróficos endógenos. Essa atuação reduz a intensidade da lesão celular secundária após o trauma medular, intensifica os mecanismos adaptativos de plasticidade neural e promove as reconexões entre os neurônios que podem resultar numa melhora funcional³⁰.

Já a eritropoietina, uma glicoproteína produzida nos rins dos adultos, é capaz de promover a proteção celular em vários tecidos, incluindo o tecido nervoso. De acordo com a literatura atual, os principais efeitos atribuídos a essa glicoproteína são a promoção do bloqueio de apoptose, a modulação de eventos na cascata inflamatória, a promoção da proteção e a otimização do reparo microvascular e a regeneração neuronal^{25,26}.

A eritropoietina apresenta ação neuroprotetora e vem sendo estudada no tratamento do trauma raquimedular³¹⁻³⁵. Estudos imuno-histoquímicos

identificaram tanto a eritropoietina quanto seus receptores no cérebro humano, especialmente em tecidos em formação. O mecanismo celular e molecular desse efeito neuroprotetor ainda não é bem conhecido³⁶.

Procura-se, há muito, uma maneira de acelerar ou de potencializar o processo natural de regeneração neuronal. Estudos biomoleculares recentes abriram caminhos nessa busca ao identificar o papel do G(M1) e da eritropoietina em modelos experimentais de regeneração nervosa, mas o número de estudos que comprovem seu potencial para a aplicação clínica ainda é reduzido.

Nesse sentido, o presente estudo foi motivado pela possibilidade da aplicação do G(M1) e da eritropoietina combinados no tratamento da lesão medular em camundongos, pois a utilização dessas substâncias pode representar um avanço na qualidade da regeneração nervosa.

Benefícios significativos podem ser obtidos com uma recuperação anatômica mínima, pois uma regeneração medular mínima pode afetar positivamente a rotina diária do paciente lesado medular.

É necessário salientar a importância dos modelos de experimentação nas pesquisas relacionadas à lesão provocada da medula espinhal para aprimorar o conhecimento dos processos fisiopatológicos primários e secundários decorrentes do trauma raquimedular. Modelos desenvolvidos com cães, gatos, macacos e ratos foram amplamente utilizados nas últimas décadas, sendo os modelos com ratos os mais frequentes^{37,38}.

Nas últimas duas décadas, houve um grande número de trabalhos envolvendo experimentos em animais. A maioria utilizou modelos com ratos, 71%, já 16% dos estudos utilizaram camundongos³⁹.

Os modelos de experimentação que utilizam camundongos mostram-se mais vantajosos em comparação a modelos que utilizam outros roedores. Eles apresentam menores custos e maior facilidade de criação e manuseio⁴⁰. A esses dois fatores, soma-se a existência de diversas linhagens de camundongos que foram modificados geneticamente para atender uma necessidade específica dentro de determinada área de interesse acadêmico. Por exemplo, algumas linhagens de camundongos modificados geneticamente apresentam deficiência nos mecanismos biomoleculares dentro da cascata de resposta inflamatória. Eventualmente, ao desenhar-se um estudo que compara a resposta ao trauma medular entre esses camundongos modificados e camundongos sem modificação, pode-se obter novas descobertas que aumentem a compreensão do papel da resposta inflamatória na regeneração medular. Estima-se que existam, atualmente, mais de duas mil linhagens de camundongos modificadas geneticamente⁴¹⁻⁴⁸.

1.1 OBJETIVO

Este estudo tem por objetivo avaliar o efeito funcional e imuno-histológico que o tratamento com G(M1) e com eritropoetina apresentam de forma isolada e combinada como agentes neuroprotetores e neurotróficos na lesão medular contusa em camundongos Balb C.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Modelos de experimentos em lesão da medula espinal: evolução histórica

Os primeiros trabalhos documentados utilizando animais com o objetivo de estudar a lesão medular datam do fim do século XIX.

Em 1890, **Schmaus*** (apud Yeo et al.⁴⁹, 1976) utilizou coelhos submetidos a golpes contusos em coluna torácica com objetivo de analisar macroscopicamente suas medulas. Em suas análises, o autor aponta a identificação de cavitações intramedulares. No ano seguinte, Watson** (apud Yeo⁴⁹, 1976) tentou reproduzir em cães os resultados observados em coelhos por Schmaus, mas não obteve sucesso.

De acordo com **Dohrmann⁵⁰ (1972)**, em 1897 e em 1898, Kirchgasser*** e Scagliosi****, respectivamente, reproduziram o método de Schmaus para lesão de medula espinal em coelhos. No entanto, não houve identificação de sangramento no interior da medula ou comprometimento estrutural da vértebra associado ao trauma. Em seus trabalhos, Kirchgasser e Scagliosi descrevem,

* Schmaus H. Beiträge zur pathologischen anatomie der Rückenmarkerschütterung. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1890;122(3):470-95.

** Watson BA. An experimental study of lesions arising from severe concussions. *Zent.bl. Allg. Pathol.* 1891;2:74.

*** Kirchgässer G. Experimentelle unteruchugen über rückenmarkserchütterung. *Deustsche Z Nervneh.* 1897; 11:406-19.

**** Scagliosi G. Ueber die Gehirnerschütterung und die daraus im Gehirn und Rückenmark hervorgerufenen histologischen Veränderungen. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1898; 152(3):487-525.

porém, a degeneração da substância branca e dos axônios das porções mais ventrais da medula espinhal.

Uma padronização de lesão da medula espinhal passível de reprodução foi descrita pela primeira vez por **Allen⁵¹ (1911)**, cujo estudo foi realizado com cães. Na realização desse modelo, os canais vertebrais desses animais foram abertos cirurgicamente, os sacos durais expostos e, por meio de queda de peso, produzia-se uma contusão. Esse sistema mostrou-se eficiente para produzir lesão padronizada na medula espinhal, controlando-se a massa e altura de queda do peso com os resultados expressos em gramas multiplicados por centímetros (g.cm).

O mesmo autor, em 1914, documentou uma relação direta e proporcional entre a magnitude da contusão medular e o pior prognóstico funcional associada a essa lesão. Na avaliação microscópica das medulas espinais que sofreram a contusão, ele também observou edema e hemorragia intramedular no primeiro quarto de hora após a contusão e edema axonal tardio. A partir da observação de que a mielotomia apresenta impacto positivo na recuperação funcional dos animais do estudo, **Allen⁵² (1914)** estabelece a hipótese de que o aumento da pressão intramedular agravaria a isquemia já presente em função do edema e hemorragia causada pela lesão inicial.

Ayer⁵³, em **1919**, testou um modelo com injeção de parafina no espaço extradural que não se mostrou eficaz como método reprodutível de lesão medular.

Em trabalho publicado em **1923**, **Mcveigh⁵⁴** descreveu um modelo de lesão medular em cães. Os animais foram submetidos à laminectomia entre a sétima e oitava vertebra torácica e, posteriormente, suas medulas eram comprimidas

pelo cirurgião com seus próprios dedos. Por meio de análises histopatológicas, observou-se edema medular presente dentro das primeiras 8 horas após lesão e piora progressiva até o segundo dia após lesão. A partir da comparação entre esses achados e os estudos cadavéricos, o autor identificou semelhanças relacionadas, principalmente, aos fatores mecânicos associados à lesão medular e às alterações histológicas presentes. Dessa forma, foi estabelecida uma correlação entre as características encontradas em modelos de experimentação de trauma medular e as alterações presentes em humanos com trauma raquimedular, estimulando o aprofundamento do estudo da contusão da medula espinhal com a aplicação de modelos de experimentação em animais⁵⁴.

O modelo estudado por **Tarlov et al.**⁵⁵, em **1953**, e **Tarlov e Klinger**⁵⁶, em **1954**, padronizou a lesão medular em cães através da colocação de um balão inflável no espaço extradural, o que promovia uma compressão gradual de seu conteúdo. Os autores estudaram o comprometimento e o reestabelecimento das funções sensitivas e motoras desses animais e desenvolveram uma escala para avaliação dessas funções. Assim, foi possível observar que a recuperação neurológica dos cães dependia da quantidade de tempo em que a medula ficou submetida à compressão para gerar paralisia^{55,56}.

Woodard e Freeman⁵⁷, em **1956**, desenvolveram em cães uma padronização de lesão medular por isquemia. Nessa publicação, os autores seccionaram vasos sanguíneos e raízes nervosas entre as sexta e nona vértebras torácicas dos animais. Os cães foram sacrificados entre a primeira e a quarta semanas após lesão. Na avaliação histológica das medulas, foram analisadas as características presentes relacionadas à isquemia leve ou grave. Nas duas situações, foram encontradas formação de cavitações e diminuição de

neurônios. De acordo com os autores, nos casos de isquemia grave, especificamente, essas alterações apresentaram-se muito mais pronunciadas⁵⁷.

Ducker et al.⁵⁸ (1971) realizaram um estudo randomizado, prospectivo envolvendo macacos. Nesse estudo, os animais foram submetidos a intensidades diferentes de trauma na medula espinhal, resultante do impacto de um peso em queda sobre a medula. Foram combinados pesos de diferentes massas com diferentes alturas de queda. A resultante da multiplicação dessas variáveis era dada em unidades de grama multiplicada pela altura em centímetros (g.cm).

Inicialmente, os 32 macacos utilizados no estudo foram divididos em quatro grupos em função da energia do trauma: 200 g.cm; 300 g.cm; 400 g.cm; 500 g.cm. Nesse agrupamento inicial, cada animal foi randomizado em subgrupos, a saber, subaguda e aguda. Seis horas após a lesão, seguia-se o sacrifício dos animais do subgrupo aguda. Já com os animais do subgrupo subaguda, o sacrifício era realizado de cinco a seis dias após a lesão. A análise microscópica das medulas extraídas dos animais foi feita por pesquisadores cegos ao estudo. As alterações histológicas foram graduadas em leve, moderada e grave.

No subgrupo subaguda, foram realizados testes neurológicos motores e classificados por uma escala criada pelos autores. Observou-se que o comprometimento da medula espinhal está diretamente relacionado à intensidade do trauma, no entanto, as mudanças presentes na análise histológica não correspondem aos achados clínicos. Os autores observaram, também, que nas contusões de menor intensidade houve recuperação funcional e modificações no tecido nervoso compatíveis com um padrão centromedular; nas contusões com intensidades intermediárias houve paresia significativa com

acometimento da substância branca e as lesões de maior intensidade evoluíram com paraplegia e acometimento de toda medula⁵⁸.

Ainda em **1971**, **Fairholm e Turnbull**⁵⁹ estudaram a microcirculação da medula espinal após lesão causada por queda de peso. Os animais do experimento, cães e coelhos, foram sacrificados em tempos variáveis após a lesão (10 minutos e 14 dias). No processo de eutanásia, os animais receberam solução coloidal de bário para contraste. Os achados mais significativos das microangiografias estavam presentes nos animais sacrificados entre o sétimo e décimo quarto dias que se seguiram à contusão da medula. Durante a análise da vascularização da região de interesse, foram definidas duas regiões distintas na medula espinhal: Setor 1 correspondente à região posterocentral onde os capilares perderam a capacidade de transporte do sangue; Setor 2 (área contígua ao setor 1) onde não havia comprometimento vascular. Com esse estudo, conclui-se que há correlação direta entre conservação microvascular e a regeneração axonal⁵⁹.

Dohrmann et al.⁶⁰ desenvolveram, em **1976**, um aparelho para a produção de lesões experimentais da medula espinal padronizadas. O aparelho permitia a monitorização da velocidade de deformação medular no momento do trauma, energia e impulso.

O desenvolvimento de aparelhos que padronizam a quantidade de energia transferida à medula produziu um grande ganho em termos de acurácia e reprodutibilidade da lesão. Assim, foi possível estabelecer uma melhor correlação entre trauma e grau de disfunção neurológica como também uma melhor análise comparativa entre os diferentes métodos de tratamentos.

Ainda em **1976**, e com a participação de Panjabi e Wagner, **Dohrmann**⁶¹ estudou a associação da energia do trauma e alteração funcional em 15 gatos submetidos à lesão medular espinal. Nesse experimento, foi utilizado seu aparelho de queda de peso recém-desenvolvido e padronizado no estudo anterior. Esses animais foram submetidos à laminectomia entre o nível da quinta e sexta vértebras torácicas. As cargas de trauma foram distribuídas da seguinte forma entre os grupos: Grupo 1 - 5g e 80 cm; Grupo 2 - 10 g e 40 cm; Grupo 3 - 20 g e 20 cm; Grupo 4 - 40 g e 10 cm; Grupo 5 - 80 g e 5 cm.

Nos registros desse estudo observa-se que, apesar de uma única carga de 400 g.cm ter sido aplicada, o grau de lesão diferiu entre os grupos, levando a diferentes resultados funcionais. Assim, o estudo de Panjabi e Dohrmann conclui que a quantidade de energia cinética a qual a medula é submetida influencia de forma diretamente proporcional a gravidade da lesão medular encontrada.

Rivlin e Tator⁶² desenvolveram, em **1977**, uma nova metodologia para avaliação funcional em ratos. Para tanto, serviram-se de uma superfície plana e com ângulo de inclinação variável, sobre a qual eram colocados os ratos. Observava-se a maior inclinação possível, na qual os animais podiam ser mantidos sem escorregar. Foram comparados um grupo controle, sem lesão medular, e outro com secção medular completa em nível torácico. Os registros apontam diferenças entre os dois grupos.

Em **1978**, **Balentine**⁶³ estudou ratos submetidos a trauma medular padronizado. As análises das medulas foram realizadas em função do tempo após a lesão. Nesse experimento, observou-se o desenvolvimento de necrose medular de forma contínua, iniciando-se na substância cinzenta e progredindo

para a substância branca. Houve suspeita de que a ruptura vascular levou ao processo de necrose observado nas medulas estudadas.

De la Torre^{38,64}, em **1981 e 1984**, fez uma revisão de estratégias de pesquisa sobre lesão da medula espinal. De acordo com o autor, na fase crônica, principalmente em primatas, há pouca regeneração axonal e, quando presente, decorre de brotamento axonal. Dessa forma, sugere-se que a utilização de fatores de crescimento ou mesmo tecido neural fetal poderiam promover regeneração da medula espinal lesada.

No ano de **1985**, **Gale et al.**⁶⁵ descreveram uma modificação da escala, desenvolvida por Tarlov, para avaliar a função motora de ratos que sofreram lesão medular. De acordo com os autores, cada membro traseiro foi avaliado separadamente e pontuado numa graduação de zero a cinco pontos, na qual zero corresponde a nenhum movimento e cinco corresponde a movimento normal. Nesse estudo, também foram avaliados parâmetros sensitivos como sensibilidade e temperatura.

Noble e Wrathall⁶⁶, em **1987**, concluem que a fixação da medula próxima à área de laminectomia, ou seja, processos espinhosos proximais e caudais, diminui a complacência da coluna vertebral e da caixa torácica. Dessa forma, é possível uniformizar o trauma, pois há menor dissipação da energia na medida em que há diminuição do amortecimento provocado pelos movimentos da coluna e da caixa torácica. Os autores concluem que essa técnica permite graduar a intensidade da lesão desejada em ratos. Concluem ainda que o modelo de lesão em rato é apropriado para os estudos de lesão medular espinal contusa.

Behrmann et al.⁶⁷ apresentaram, em **1992**, um aparelho que se propunha a causar lesão medular contusa em ratos. Nessa ocasião, compararam-se

aspectos comportamentais da recuperação motora entre um grupo que sofreu lesão medular contusa por queda de peso e outro que sofreu transecção medular completa. Os grupos também foram submetidos à análise histológica. Esse estudo demonstra recuperação funcional em animais que sofreram trauma contuso em comparação aos animais submetidos à secção medular.

Em **1992**, **Gruner**⁶⁸ apresentou um aparelho com monitorização de parâmetros físicos que permitia a uniformização da quantidade de energia envolvida na contusão experimental em medulas espinhais de ratos. A inovação desse aparelho está relacionada à possibilidade de se obter medidas de velocidade de impacto e quantificar a energia transferida à medula durante uma contusão.

Basso et al.⁶⁹, em **1995**, publicaram uma adaptação da escala desenvolvida por **Tarlov e Klinger**⁵⁶ (**1954**). Conhecida por escala BBB (Basso, Beattie, Bresnahan), essa modificação consiste em medida preditiva da recuperação motora, a partir da qual é possível prever o padrão de modificações encontradas no epicentro da região de contusão da medula. Essa escala apresenta reprodutibilidade entre examinadores.

No ano seguinte, **Basso et al.**⁷⁰ (**1996**) padronizaram um modelo experimental completo, utilizando o *New York University Impactor* (NYU-Impactor), para provocar lesão medular espinal em ratos e a escala BBB padronizada para avaliação funcional. Assim, foi demonstrada a capacidade desse sistema de gerar lesões medulares graduadas, de forma consistente e reprodutível, e a alta sensibilidade para avaliar a função motora de ratos submetidos à contusão medular da escala BBB.

Ainda nesse estudo de **Basso et al.**⁷⁰ (1996), aponta-se que a melhor recuperação motora está diretamente relacionada à quantidade de tecido preservado na área de contusão medular.

No experimento chamado MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) desenvolvido pelos responsáveis pela BBB, essa escala foi submetida a testes de confiabilidade por meio da comparação de três grupos de observadores: um grupo composto por avaliadores experientes e treinados na utilização da escala e outros dois grupos sem experiência prévia à utilização. Nesse experimento, também foi comparada a confiabilidade individual e em grupo dos examinadores. Os resultados do MASCIS indicam que a escala BBB é de fácil aplicação mesmo para indivíduos inexperientes com a técnica. No entanto, sua confiabilidade é maior quando utilizada por examinadores experientes.

Em 1999, o modelo experimental NYU-Impactor foi padronizado no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) por Rodrigues, com a publicação de seu artigo sobre o estudo de lesão medular espinal em ratos Wistar. O autor seguiu a padronização estabelecida pelo MASCIS. Seus resultados confirmam a correlação entre a magnitude da lesão e energia envolvida no trauma. O autor confirma que é possível obter lesões medulares padronizadas em ratos Wistar aplicando-se esse modelo. No ano de 2010, a técnica foi consolidada em nosso meio com a publicação dessa padronização⁷¹.

Metz et al.⁷², no ano **2000**, publicaram artigo relatando que modelos animais são amplamente utilizados em estudos sobre fisiopatologia e tratamento para lesões medulares. Nesse artigo, os autores analisam se esses modelos

apresentam correlação com o que é encontrado em lesões similares em seres humanos e se há um paralelo entre os achados identificados em estudos de modelos animais e aqueles encontrados em nossa espécie. Os dados obtidos sugerem haver um paralelo entre os achados presentes em estudos com animais e aqueles presentes em humanos. Dessa forma, os autores apresentam a conclusão de que modelos de lesão medulares utilizando ratos são adequados para pesquisas relacionadas aos efeitos de potenciais tratamentos de lesão medular, bem como para aprofundar o conhecimento da fisiopatologia dessas lesões com estudos funcionais e alterações morfológicas.

Em **2011**, **Santos et al.**⁷³ em trabalho realizado no LETRAN, padronizaram o modelo de lesão da medula espinal e sua respectiva avaliação funcional em ratos da raça Wistar. Nesse estudo, foram utilizados 20 ratos divididos em quatro grupos com níveis diferentes de energia de trauma transferido à medula gerando, portanto, diferentes níveis de gravidade das lesões da medula espinal padronizadas pelo sistema MASCIS. Em todos os grupos que sofreram lesão, utilizou-se peso de 10 g, mas com diferentes alturas de queda. No grupo 1, peso a 12,5 mm de altura; no grupo 2, peso a 25 mm; no grupo 3, peso a 50 mm; no grupo 4, os animais não sofreram lesão medular (controle). Esses animais foram avaliados 48 horas após a lesão por meio da escala BBB, padronizada por Basso, Bettie e Bresnahan. Concluiu-se que o modelo pode ser reproduzido em nosso laboratório.

2.2 Estudos sobre irrigação tecidual na lesão da medula espinal: evolução histórica

Em **1975**, um experimento envolvendo ovelhas com medulas espinais lesadas foi realizado por **Yeo et al.**⁷⁴. Esse estudo, no qual se utilizou microscopia e mielografia com contraste e com isótopos, define que os mecanismos dinâmicos relacionados à lesão tecidual envolvem a disfunção da microcirculação medular, com presença de edema, extravasamento e congestão intramedular. Os autores observaram, ainda, um padrão semelhante de recuperação motora e sensitiva que sugere que o hipofluxo sanguíneo e a baixa oferta de oxigênio tecidual contribuem sobremaneira na fisiopatologia do déficit neurológico que se segue ao trauma.

Balentine^{63,75}, em **1978**, estudando ratos adultos Sprague Dawley que sofreram trauma contuso da medula espinhal em região de coluna torácica baixa, observou sob microscopia óptica e eletrônica as mudanças nos vasos sanguíneos e o desenvolvimento de necrose tecidual em função do tempo decorrido após lesão. Segundo o autor, foram observadas necrose fibrinoide e rotura de vasos arteriais e venosos imediatamente após o trauma. Ademais, uma zona de necrose fusiforme surgiu dentro do intervalo de 8 a 24 horas após o trauma. Essas observações são consistentes em necrose isquêmica decorrente do trauma medular contuso e secundárias, principalmente, a rotura de vasos sanguíneos maiores que ocorrem no momento do trauma.

Nesse mesmo ano, **Rivlin e Tator**⁷⁶ (**1978**) estudaram o fluxo sanguíneo na medula espinal de 12 ratos albinos após lesão medular espinal experimental

provocada por técnica de compressão extradural por clipagem. Essa técnica provoca deficit funcional grave nos animais. Nos períodos de 15 minutos, 2 horas e vinte e 4 horas após a provocação da lesão medular, foram avaliados os fluxos sanguíneos na medula espinal através de técnica de autorradiografias com ¹⁴C-antipirina. Com 15 minutos e 2 horas, tanto a substância branca como a cinzenta apresentaram fluxo sanguíneo gravemente comprometido. Após 24 horas, o reestabelecimento do fluxo sanguíneo foi mínimo. O comprometimento da perfusão também foi observado a distâncias consideráveis, tanto proximais como distais ao ponto de lesão inicial da medula espinal. Esse estudo mostra que o comprometimento do fluxo sanguíneo após trauma medular perdura por pelo menos 24 horas.

Ainda em **1978**, **Ducker et al.**^{77,78} estudaram, inicialmente em cães, e depois em macacos, a oxigenação medular e irrigação sanguínea medular após a lesão experimental que provocava paraplegia nesses animais. No primeiro estudo envolvendo cães, os autores observaram uma diminuição de 15,2 para 6,1 ml/min/100g do fluxo sanguíneo na região central da medula entre o período de 2 a 3 horas após o trauma. Nesse mesmo período, os animais também tiveram uma redução importante nos níveis de oxigênio tecidual intramedular, a saber, de 35-39 mm de Hg para 17-24 mm de Hg.

Já no estudo envolvendo macacos, traumas medulares foram aplicados com intensidades diferentes. Por técnica de depuração de Argônio, foram avaliados o fluxo sanguíneo, oxigênio e dióxido de carbono teciduais e monitorização do potencial evocado somato-sensorial. Os autores observaram, novamente, uma diminuição importante do fluxo sanguíneo e dos níveis de oxigênio tecidual na medula contundida considerando o período de 2 a 3 horas

após o trauma. Somente 8% dos animais mantiveram o potencial evocado somato-sensorial preservado dentro de 5 minutos que se segue à lesão. Para **Ducker et al. (1978)**, os dois estudos sugerem que os esforços no tratamento dessas lesões devem se concentrar nesse período crítico de poucas horas de intervalo.

Tator e Rivlin⁷⁶, em **1978**, reforçaram a importância das alterações microvasculares na medula na fisiopatologia do trauma medular e no prognóstico dessas lesões. Para os autores, o tratamento precoce na fase hiperaguda do trauma é importante, pois diminui a lesão secundária decorrente da isquemia e infarto da substância branca e cinzenta, melhorando, dessa forma, o prognóstico funcional dos indivíduos acometidos por tais lesões.

Lohse et al.⁷⁹ (**1980**), ao investigarem o fluxo sanguíneo em gatos, produziram lesão medular em nível torácico. Foram aplicadas contusões medulares com intensidades variadas, uma baixa com valor de 100 g.cm e outra alta com valor de 260 g.cm. O fluxo sanguíneo foi avaliado antes da lesão e imediatamente após. A metodologia de avaliação do fluxo sanguíneo envolvia técnica de análise de depuração de moléculas de hidrogênio. Esteve universalmente presente entre os grupos estudados um aumento de pressão arterial e arritmias cardíacas. Foi observado um aumento no fluxo sanguíneo, 6 horas após o trauma, só no grupo em que foram aplicadas contusões de alta intensidade.

Nesse trabalho, os autores apontam que a lesão isquêmica da substância branca na fase aguda é responsável pelo comprometimento neurológico permanente associado ao trauma medular grave.

Albin e White⁸⁰, em **1987**, realizaram estudo de levantamento epidemiológico, fisiopatológico e sobre terapias experimentais relacionadas à lesão medular. Somam-se à lesão mecânica inicial provocada no momento do trauma: a hemorragia, a diminuição de perfusão, o edema, a diminuição da tensão de oxigênio tecidual e a necrose tecidual.

2.3 Estudos experimentais sobre substâncias terapêuticas

Na década de 1960, diversas substâncias foram estudadas para o tratamento da lesão medular espinal. Dentre elas estão o estradiol, metilprednisolona, gangliosídeo, opioides, eritropoetina e outras drogas com ação sobre o sistema nervoso central.

Em **1969**, **Ducker e Hamit⁸¹** estudaram o uso de corticosteroides em modelo padronizado de trauma contuso medular em cães. Esses animais foram divididos em quatro grupos: um grupo controle; um grupo composto por animais que receberam tratamento por hipotermia através irrigação do local da ferida com solução salina resfriada; um grupo composto por animais que receberam tratamento com dexametasona intramuscular 3 horas após a lesão e metilprednisolona nos 7 dias seguintes e um grupo composto por animais que receberam uma única dose de metilprednisolona intratecal. Os autores observaram melhor desempenho neurológico e funcional nos grupos que receberam dexametasona e hipotermia com tratamento.

Hansebout et al.⁸² (1975) estudaram hipotermia e corticosteroides. Os autores provocaram lesão da medula espinal em cães através do uso de balões que comprimiam a medula por 1 hora.

Os cães foram divididos em cinco grupos: Grupo 1, que configurou o controle e no qual os animais sofreram laminectomia; Grupo 2, no qual os animais sofreram laminectomia e foram submetidos a sistema de troca de calor a 37 graus (normotermia); Grupo 3, no qual os animais sofreram laminectomia e lesão medular; Grupo 4, no qual os animais sofreram laminectomia, lesão medular e foram submetidos ao uso de corticosteroide e Grupo 5, no qual os animais sofreram laminectomia, lesão medular e foram submetidos a resfriamento a 6 °C por 4 horas. Foi observado, pelos autores, que os grupos que receberam tratamento apresentaram taxas de recuperação significativamente maiores quando comparado aos grupos sem tratamento algum.

De la Torre⁸³, também em **1975**, realizou experimento de lesão medular contusa em cães. Nesse estudo, o tratamento consistiu na administração de soro fisiológico, manitol, dexametasona ou dimetil-sulfoxide. Tanto o soro fisiológico quanto o manitol não mostraram efeito positivo na recuperação neurológica. Já os cães que receberam dexametasona ou dimetil-sulfoxide apresentaram recuperação parcial ou total das funções neurológicas.

Kuchner e Hansebout⁸⁴, em **1976**, realizaram outro estudo com lesão experimental medular espinal em cães. Na ocasião, as lesões foram provocadas por compressão através de balão pressurizado a 160 mm de Hg no espaço epidural no nível da décima terceira vértebra torácica. Esses animais foram submetidos a tratamentos com dexametasona parenteral isolada, hipotermia ou

associação dos dois tratamentos. A hipotermia foi alcançada sem uso de irrigação contínua e através da colocação de uma miniatura de bolsa de troca de calor no local da lesão, mantendo a temperatura a 6 °C por 4 horas. Após 7 semanas de seguimento, os cães submetidos a tratamento tanto com dexametasona como com hipotermia local apresentaram capacidade para deambulação, o que não ocorreu no grupo de cães que não receberam tratamento algum. O grupo que recebeu tratamento combinado apresentou desempenho funcional fraco nas primeiras semanas após o trauma, porém, ao fim das 7 semanas, foi o grupo com melhor desempenho motor.

Em 1977, **Yeo et al.**⁸⁵ estudaram o efeito da metilprednisolona sobre as alterações patológicas associadas à necrose central presente na medula espinal após o trauma. Os autores estudaram metilprednisolona subaracnoidea, Alfametilparatirosina e oxigênio hiperbárico. No grupo controle, encontraram intensa deterioração central da substância cinzenta, inclusive com formação de cisto na porção centromedular. Apesar dessas alterações descritas, todos os animais desse grupo recuperaram algum grau de função neurológica. Pouco impacto positivo foi encontrado no grupo tratado com metilprednisolona subaracnoidea apresentando ao final achados muito similares àqueles encontrados no grupo controle. A alfametilparatirosina apresentou melhor desempenho em todos os desfechos analisados. Em função da toxicidade dessa droga em humanos, sua aplicação clínica não é possível.

Nos 20 anos seguintes, foram publicados inúmeros estudos experimentais pesquisando a ação da metilpednisolona na recuperação funcional após lesão da medula espinal. Dentre esses estudos, citamos o publicado por **Means et al.**⁸⁶ em 1981, no qual foi avaliada, em gatos, a ação desse medicamento na

preservação do tecido neural lesado no trauma contuso e a recuperação clínica desses animais. A lesão medular foi provocada pela colocação de peso de 170 g sobre a medula por 5 minutos. Os animais foram separados em um grupo que recebeu metilprednisolona por 9 dias, tendo o início da aplicação do medicamento 2 horas após o trauma medular. O grupo controle sofreu a lesão medular e não recebeu tratamento medicamentoso algum. Após 60 sessenta dias, esses animais sofreram eutanásia e suas medulas foram retiradas e preparadas para análise sob microscopia óptica. Foram observados parâmetros morfométricos e porcentagem de área cavitária e esses dados foram comparados com as respectivas avaliações funcionais. Quanto maior a cavitação pior foi o desempenho nas avaliações funcionais. Esse trabalho traz evidências de um potencial benefício da aplicação de metilprednisolona nesse contexto.

Young e Flamm⁸⁷ (1982) estudaram diferentes doses de metilprednisolona no tratamento da lesão medular contusa. Em seu experimento, aplicaram doses elevadas de metilprednisolona nos primeiros 45 minutos após trauma. Observaram uma rápida reversão das alterações isquêmicas tipicamente vistas na fase aguda de trauma. O fluxo sanguíneo aumentou na substância branca, apesar da hipotensão sistêmica frequentemente presente em associação à aplicação de altas doses desse fármaco. Foi identificada uma recuperação de cálcio iônico no interstício e, também, da avaliação eletrofisiológica.

Braugler e Hall⁸⁸ (1983) aplicaram doses diferentes em bolus de metilprednisolona, variando de 7,5 a 60 mg/Kg, 30 minutos após o trauma medular espinal em gatos. Segundo os autores, houve um aumento rápido de lactato e da taxa lactato/piruvato após o trauma. O Lactato dobrou dentro de 5

minutos após o trauma, atingiu seu pico em 2 horas e permaneceu significativamente alto por aproximadamente 8 horas. O piruvato, por outro lado, caiu abruptamente na primeira hora após o trauma e elevou-se lentamente nas 8 horas subsequentes ao trauma. Tanto a elevação do lactato, quanto a queda do piruvato na primeira hora, foram completamente evitadas pela administração endovenosa, de uma dose, de 30 mg/Kg de succinato de metilprednisolona dentro de meia hora da ocorrência do trauma. Esses resultados sugerem, segundo os autores, que altas doses endovenosas desses corticosteroides podem promover um melhor fluxo sanguíneo ao seguimento medular acometido e, conseqüentemente, diminuir a intensidade da lesão medular secundária.

Hall.⁸⁹ (1992) testou diferentes doses de metilprednisolona em um estudo cujos resultados apontam na direção de que se a droga for administrada em uma dose tão elevada quanto 30 mg/Kg imediatamente após o trauma, há redução da isquemia medular pós-traumática. Doses altas de metilprednisolona dentro das primeiras 8 horas pós-trauma melhora a recuperação funcional de animais de experimentação como também de pacientes.

Yoon et al.⁹⁰ (1999), utilizando o modelo de lesão medular NYU-Impactor, estudaram o uso de metilprednisolona aplicada em alta dose (30 mg/Kg) dentro de 10 minutos subsequentes ao trauma. A partir desse estudo, os autores concluem que seu uso reduz de forma significativa a lesão medular em 24 horas.

Em nosso meio, no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos do IOTHC FMUSP (LETRAN), **Marcon et al.⁹¹ (2010)** testaram a utilização da metilprednisolona antes do trauma medular em ratos Wistar. Verificaram que, além de não trazer benefício, houve complicações relacionadas ao uso da droga.

Na década de 1990 iniciaram-se estudos envolvendo associação de drogas. **Constantini e Young**⁹², em **1994**, estudaram conjuntamente a ação da metilprenisolona e do monogangliosídeo G(M1) em ratos submetidos a contusões medulares de diferentes gravidades. Os autores observaram que a metilprednisolona em dose única, administrada após o trauma, apresentou efeito benéfico ao diminuir a gravidade da lesão e prevenir a hiponatremia desencadeada pelo trauma medular. Quanto à ação do G(M1) utilizado sem metilprednisolona não foram evidenciados efeitos benéficos. A associação das duas drogas, por sua vez, apresentou pior resultado comparado ao uso isolado de ambas. Portanto, houve um efeito do G(M1) que antagonizava a ação da metilprednisolona.

Em **2001**, **Taoka et al.**⁹³ identificaram que o mecanismo de ação pelo qual a metilprednisolona reduz a gravidade da lesão medular pós-traumática é através da inibição da peroxidação lipídica da membrana celular endotelial que ocorre através da ativação leucocitária e não pela inibição da ação do fator de necrose tumoral alfa. Assim, os autores apontam que a metilprednisolona atenua a lesão da medula espinhal bloqueando a intensificação da permeabilidade do endotélio no local do trauma.

Em **2011**, **Souza et al.**⁹⁴, a fim de estudar eficácia do G(M1), aplicaram essa droga via intraperitoneal em um grupo de ratos Wistar e a compararam com aplicação de soro fisiológico pela mesma via em outro grupo de animais dessa mesma espécie. As aplicações foram feitas logo após a lesão medular experimental produzidas, seguindo-se o protocolo internacional MASCIS, com o sistema NYU-Impactor. A conclusão dos autores foi de que a aplicação de G(M1)

intraperitoneal não apresentou resultados promissores após contusão medular experimental.

Na década de 1990 foram publicadas algumas revisões que levantaram o que havia de pesquisas sobre drogas e substâncias endógenas para tratamento da lesão medular aguda.

Nockels e Young⁹⁵ (1992) relataram que, na fase tardia, a mielina provoca uma redução na capacidade de regeneração axonal, e que ao se bloquear esses fatores haveria maior regeneração na medula espinal. Em **1996**, **Schwab e Bartholdi⁹⁶** fizeram um levantamento dos conhecimentos existentes até aquele momento, que foram obtidos através de estudos experimentais sobre trauma medular. Nesse levantamento, foi salientada a importância de se minimizar o dano secundário aliado a uma otimização do uso das sinapses remanescentes, incremento da plasticidade neural e regeneração axonal como importantes objetos de investigação em pesquisas futuras.

Gebrin et al.⁹⁷, em **1997**, identificaram atividade do G(M1) que favorecia uma maior preservação funcional de arcos reflexos envolvendo a bexiga, intestino e sexual em pacientes com deficits crônicos do sistema nervoso central. Mesmo que um número reduzido de axônios se mantivesse íntegros, eles eram capazes de preservar parte da função neurológica.

Kao et al.⁹⁸ (2006) demonstraram que os receptores de serotonina, quando estimulados, podem melhorar a capacidade de sustentação de peso dos membros posteriores em ratos lesados medulares.

Gerin et al.⁹⁹ (2010) sugeriram que a ativação de vias serotoninérgicas na porção anterior da medula espinal teria participação na recuperação da função motora após lesão medular em ratos. Nesse experimento foi implantado um

probe de microdiálise, na porção ventral da medula em ratos com lesão medular incompleta, para avaliar a evolução da ativação dessa via fazendo um paralelo com a recuperação motora identificada em teste funcional. Nesse mesmo ano, **Hayashi et al.¹⁰⁰ (2010)** verificaram, em ratos, que a ativação seletiva dos receptores serotoninérgicos não é efetiva nas lesões incompletas. Porém, o precursor da serotonina 5-hidroxitriptofano tem sucesso na melhora da função motora em ratos com lesão leve a moderada.

Em **2013, Cristante et al.¹⁰¹**, em um estudo com ratos Wistar submetidos à lesão da medula espinal padronizada utilizando-se o NYU-Impactor, administraram antidepressivo fluoxetina associado a treinamento motor. Os autores dividiram os animais em quatro grupos: grupo 1- os animais foram submetidos à lesão medular padronizada e a um programa de treino de marcha; grupo 2- lesão medular associada à fluoxetina intraperitoneal; grupo 3- lesão medular, fluoxetina intraperitoneal e treino de marcha; grupo 4- somente lesão medular sem qualquer tratamento. Foi observado no estudo que o treinamento em esteira leva à melhora do desempenho motor assim como da avaliação eletrofisiológica. A combinação de treinamento de marcha e uso de fluoxetina apresentou melhores resultados do que aqueles obtidos com os tratamentos isoladamente.

Miyake et al.¹⁰², em **1977**, ao analisar a urina de pacientes com anemia isolou a eritropoietina, uma glicoproteína que controla a hematopoiese. Essa citocina atua diretamente na medula óssea sobre as células precursoras de eritrócitos desempenhando papel fundamental na produção dessas células. Uma vez identificada a sequência de aminoácidos que a compunha foi possível clonar os genes envolvidos em sua síntese. **Lin et al.¹⁰³ (1985)** obtiveram sucesso na

clonagem do gene da eritropoetina humana e a partir desse momento seu uso terapêutico foi difundido.

Muitos estudos experimentais testaram o uso da Eritropoetina recombinante (EPO-rh) e seu efeito protetor do sistema nervoso central. Há grande interesse em sua ação sobre a medula espinal e conseqüentemente há inúmeros estudos investigando sua ação sobre a medula em modelos experimentais de trauma medular. **Brines et al.¹⁰⁴ (2000)** identificaram grande quantidade de receptores de eritropoetina (EPO-r) em capilares cerebrais, o que forneceria, provavelmente, permeabilidade para circulação de EPO no interior cérebro vencendo dessa forma, a barreira hematoencefálica.

Gorio et al.¹⁰⁵ (2002) avaliaram dois modelos de tratamento em roedores. No primeiro modelo, os animais foram submetidos à compressão medular por grampo de aneurisma ao nível da terceira vertebra torácica. Imediatamente após a liberação do grampo, um grupo de animais recebeu EPO-rh na dose de 1000 UI por Kg de peso corporal intraperitoneal e o outro grupo apenas solução salina. No grupo que recebeu eritropoetina, os animais apresentaram recuperação funcional parcial dentro de 12 horas e quase completa dentro de 28 dias. No entanto, o grupo de animais que receberam apenas solução salina apresentaram apenas uma recuperação modesta. No segundo modelo utilizado, a administração de EPO-rh foi na dose de 5000 ui por Kg de peso corporal intraperitoneal 1 hora após a lesão causada por compressão por grampo 50% mais intensa do que no primeiro modelo. Nesse segundo modelo, também houve recuperação funcional superior do grupo que recebeu EPO-rh em comparação ao grupo que recebeu apenas solução salina. No grupo submetido ao trauma contuso grave, a resposta inflamatória tardia também foi atenuada pela utilização

de EPO-rh. Esses achados sugerem que a EPO-rh proporciona melhor recuperação precoce da função medular, como também apresenta função neuroprotetora, anti-inflamatórias e estabilizadora de membrana celular.

Celik et al.¹⁰⁶ (2002) provocaram lesão isquêmica da medula por 20 minutos em animais de experimentação e em seguida administraram EPO via endovenosa em diferentes doses, tendo o grupo controle recebido apenas soro fisiológico logo após a liberação da oclusão arterial. Tanto parâmetros funcionais como histológicos apresentaram melhor desempenho no grupo que recebeu EPO-rh em comparação àqueles que receberam solução salina.

Nagai et al.¹⁰⁷ (2001) investigaram em estudo a interferência que as citocinas pró-inflamatória têm sobre a expressão de receptores da eritropoietina em células do sistema nervoso central humano. Os resultados sugeriram que as citocinas pró-inflamatórias participam da regulação da expressão de receptores dessa glicoproteína em neurônios humanos, astrócitos e micróglia.

Kaptanoglu et al.¹⁰⁸ (2004), ao estudar ratos que foram submetidos a trauma raquimedular padronizado, separados em sete grupos, aplicaram em três desses grupos diferentes doses únicas intraperitoneais de eritropoietina (100 UI/kg, 1000 UI/kg e 5000 UI/kg) imediatamente após a lesão, um com metilprednisolona, um somente com laminectomia, outro com laminectomia e trauma e um último grupo recebeu albumina. Na análise da ultraestrutura visualizada através da microscopia eletrônica, observou-se que a EPO, nas dosagens de 1000 UI/kg e 5000 UI/kg, inibia de forma mais eficaz a peroxidação lipídica quando comparada a inibição provocada pela metilprednisolona. A dosagem de eritropoietina com melhor desempenho no estudo foi a de 5000 UI/kg.

Arishima et al.¹⁰⁹ (2006) investigaram o efeito antiapoptótico da eritropoietina no trauma medular em ratos. Os animais foram submetidos à lesão medular contusa padronizada e então receberam eritropoietina intraperitoneal. Em Avaliação histológica e imuno-histoquímica, os autores utilizaram marcadores caspase-3 e de células ativas entre 6 horas e 7 dias após a lesão. Concluiu-se que a atividade molecular da eritropoietina promove uma redução importante de apoptose dos axônios e oligodendrócitos no intervalo de 1 semana após a lesão. Além disso, promove intensa redução do número de caspase-3 de células imunorreativas por via intramedular.

Cerri et al.¹¹⁰ (2012) demonstraram em ratos que a administração aguda de eritropoietina humana recombinante (EPO-rh), após uma lesão medular contusa, melhora a recuperação da função motora do membro posterior, medida através da escala BBB (Basso, Beattie, Bresnahan) locomotora. Essa escala avalia a atividade locomotora global, sem testar se a recuperação motora induzida por EPO-rh é devida a uma recuperação paralela de vias sensoriais e/ou motoras. O objetivo desse estudo foi utilizar um teste eletrofisiológico para avaliar a transmissão de ambas as vias ascendente e descendente através do cordão lesionado em 2, 5, 7, 11 e 30 dias após a lesão, em animais tratados com EPO-rh e com solução salina. Potenciais motores evocados por estimulação cortical foram registrados na medula espinhal, e os potenciais sensoriais evocados por estimulação espinhal foram registrados no nível cortical. Em animais tratados com EPO-rh, os resultados mostram uma melhora geral, tanto na transmissão sensorial quanto na motora, através de vias espinhais poupadas, supostamente via sistema reticuloespinhal, em relação aos controles com solução salina. No geral, essas características são concomitantes às mudanças

observadas no escore BBB, sugerindo que as vias neurais da medula espinhal poupadas pela EPO podem contribuir para uma melhor transmissão do impulso, que, por sua vez, pode ser responsável pela recuperação da função locomotora.

2.4 Métodos de avaliação da lesão medular experimental: evolução histórica

Tarlov et al.^{55,56}, em **1953** e **1954**, publicaram estudo no qual provocavam lesão medular em cães por compressão com balão intracanal em nível torácico. Os autores também desenvolveram um método de avaliação funcional desses animais. Esse trabalho mostra um dos primeiros esforços para padronização da lesão medular e dos métodos de avaliação funcional dos animais de experimentação e é considerado um dos precursores de inúmeros estudos sobre esse tema que surgiram nos anos seguintes.

Rivlin e Tator⁶², em **1977**, desenvolveram um método de avaliação da função motora em ratos. O método desenvolvido por eles utilizava uma rampa com inclinação ajustável, na qual os animais eram colocados e avaliados quanto à capacidade de permanecerem sobre a rampa sem escorregar. Os autores observaram diferenças consistentes entre os ratos sem lesão medular e aqueles que sofreram lesão experimental.

Em **1983**, **Blight**¹¹¹ descreveu um método que avaliava a quantidade de axônios mielinizados no epicentro da lesão medular experimental em felinos.

Gale et al.⁶⁵ (1985) desenvolveram um protocolo para avaliação do comprometimento funcional de ratos submetidos à lesão medular contusa. Esse protocolo, apesar de simples, exige curto período de treinamento do avaliador e combina vários testes, nos quais o principal componente da avaliação é a escala motora. Os animais são observados em campo aberto, sendo que cada membro traseiro é observado individualmente e pontuados conforme seu grau de movimentação em uma escala graduada de zero (sem movimento) a cinco (caminhada normal). As escalas de avaliação funcional utilizadas atualmente seguem o mesmo princípio e não deixam de ser um aprimoramento das escalas predecessoras.

Noble e Wrathall¹¹² (1989) estudaram o desenvolvimento de alterações histopatológicas e deficits funcionais e os avaliaram quantitativamente após lesões contusas leves, moderadas e graves da medula espinal em ratos. A área da secção transversal da medula espinal na região da contusão, onde se encontra o dano tecidual máximo, e as áreas de hemorragia, de substância cinzenta e de substância branca remanescentes foram determinadas de 15 min a 8 semanas após a lesão. De 24 h a 8 semanas após a lesão, os deficits funcionais foram quantificados usando um escore comportamental combinado que é baseado nos resultados de vários testes comportamentais funcionais. Uma análise estatística de regressão foi usada para examinar as correlações entre a quantidade de substância branca residual na medula, a gravidade do impacto contuso e o deficit funcional ao longo do tempo após a lesão.

Nesse estudo, os autores apontam a observação de uma correlação significativa entre a quantidade de substância branca residual e o grau de lesão inicial em 24 horas após a lesão e em todos os momentos subsequentes.

Basso et al.⁶⁹, em **1995**, publicaram um estudo com o objetivo de desenvolver uma escala de avaliação locomotora eficiente, abrangente e inequívoca com o objetivo de padronizar as medidas de desfecho locomotor em laboratórios. Os autores submeteram ratos adultos (n=85) à contusão medular no nível de T7-9 por queda de peso. O comportamento locomotor dos animais foi avaliado antes da lesão, no primeiro ou no segundo dia de pós-operatório e, em seguida, por até 10 semanas. Categorias e atributos de pontuação foram identificados, operacionalmente definidos e classificados com base na sequência observada de padrões de recuperação locomotora. Essas categorias formaram a escala locomotora de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB).

Os dados obtidos por **Basso et al.**⁶⁹ (**1995**) evidenciam que a escala BBB é capaz de prever o padrão de recuperação da motricidade e diferenciar o comportamento do animal diante de diferentes padrões de lesão. Com ela é possível, também, inferir as modificações anatômicas encontradas na região central da área de lesão medular. Testes de confiabilidade entre observadores indicam que os examinadores com experiência em testes comportamentais podem aplicar a escala de forma consistente e obter resultados semelhantes. A escala de avaliação motora (BBB) oferece aos pesquisadores uma medida mais discriminativa do resultado comportamental para avaliar os tratamentos após a lesão medular.

Os mesmos autores, em **1996**, desenvolveram um aparelho que realizava lesão medular contusa em ratos de forma padronizada, conhecido por "NYU-Impactor"⁷⁰. Os autores também consideraram o teste BBB como o mais sensível para avaliar a função locomotora em ratos que sofreram lesão medular. Os resultados indicam que a escala é facilmente aplicável mesmo por observadores

pouco experientes e que se aproximam dos resultados obtidos nas avaliações realizadas por equipes experientes. A experiência melhora a consistência das pontuações da equipe.

Vialle et al.¹¹³ (1999) aplicaram, em um estudo experimental com ratos, o protocolo de lesão medular utilizando o aparelho desenvolvido por **Basso et al.**⁷⁰ (1996). O objetivo do estudo foi analisar as lâminas histológicas das medulas contundidas dos animais, coloridas com hematoxilina-eosina. Os animais sofreram eutanásia em diferentes momentos após a lesão. A partir dos resultados obtidos, os autores fazem observações: os ratos sacrificados após 6 horas da lesão apresentavam diminuição do volume dos neurônios; os ratos sacrificados com 1 dia após a lesão apresentavam queda do número de neurônios e presença incipiente de vacúolos intramedulares; após 2 dias da lesão, os ratos apresentavam importante comprometimento neuronal e presença abundante de vacúolos.

Em 2011, **Santos et al.**⁷³ padronizaram um modelo de lesão medular e avaliação em ratos que atualmente é utilizado em nosso laboratório LETRAN. Nesse modelo, os animais são divididos em quatro grupos com 5 ratos Wistar em cada. Excetuando-se o grupo controle, todos os demais animais recebem diferentes energias de trauma medular através da variação da altura inicial do peso de 10 gramas utilizado para contundir a medula, segundo padronização desenvolvida pelo MASCIS. Assim, configura-se: Grupo 1 - lesão leve (12,5 mm); Grupo 2 - lesão moderada (25 mm); Grupo 3 - lesão grave (50 mm); Grupo 4 - grupo controle (não sofreram lesão). Após a lesão, a função motora é avaliada segundo escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) dentro das 48 horas que se seguem à lesão.

De acordo com esses resultados, a padronização de lesão medular e o sistema de avaliação funcional adotados nos estudos podem ser reproduzidos.

A partir da realização desse estudo, o protocolo que inclui lesão medular padronizada e avaliação funcional passou a ser adotado em todos os estudos realizados em nosso laboratório.

2.5 Estudos sobre lesão medular experimental em camundongos

Kuhn e Wrathall⁴¹, em trabalho publicado em **1998**, advogam a favor da utilização de camundongos em estudos experimentais para lesão da medula espinal. A partir dos resultados de seus estudos, os autores reforçam as vantagens da utilização de animais transgênicos.

Servindo-se de um modelo que utilizou queda de pesos com massas e alturas distintas, Kuhn e Wrathall estudaram as alterações histológicas provocadas na medula desses animais por diferentes energias de traumas como também avaliaram o seu desempenho funcional. Os autores observaram que a área de tecido medular lesado é proporcional ao trauma transferido.

Farooque¹¹⁴ descreveu, em **2000**, uma escala de avaliação funcional para camundongos, intitulada "MFS" (*Hindlimb Motor Function Scale*). Essa escala foi posteriormente aprimorada por **Isaksson et al.**¹¹⁵ (**2000**). Nesse experimento, os camundongos foram submetidos à lesão da medula espinal por compressão com intensidades entre leve, moderada e grave. Os resultados demonstram que há uma correlação direta entre a gravidade da lesão e os resultados obtidos na

análise funcional pela escala MFS e da quantidade de lesão tecidual observada em análise histológica. Nesse estudo, os autores concluem que o modelo é reprodutível e que a intensidade da compressão tem correlação direta com o dano neurológico. A escala de avaliação proposta é eficaz para a avaliação funcional em experimentação com camundongos.

Jakeman et al.¹¹⁶ (2000) adaptaram um modelo de lesão medular experimental em ratos para aplicação em camundongos. Nesse estudo, a lesão foi provocada por contusão medular padronizada na medula espinal de camundongos com dispositivo de impulso eletromagnético da haste. Para avaliação do desfecho funcional, foi utilizada a escala de **Tarlov e Klinger**⁵⁶ (1954). Observou-se que havia uma correlação entre energia transferida à medula no momento do trauma e a avaliação funcional. Dos parâmetros analisados para inferir a quantidade de energia transferida, o ápice de força de contusão, a energia transferida ao tecido durante o momento de contato e o impulso estavam diretamente relacionados à pontuação da avaliação funcional já no primeiro dia após a lesão medular. Com 4 semanas após a lesão, as variáveis que apresentavam maior correlação com o desfecho funcional foram o ápice e impulso de movimento do cilindro de impacto. As mensurações dessas variáveis apresentaram alta sensibilidade. A sua utilização em camundongos oferece a vantagem experimental de permitir a opção por animais geneticamente modificados quando essa característica se mostrar vantajosa para determinado desenho de estudo.

Seki et al.⁴³ (2003) compararam camundongos transgênicos que foram submetidos à lesão medular contusa experimental. Todos os animais apresentavam mutação com expressão do gene bcl-2, que previne apoptose

celular. Os camundongos transgênicos apresentaram melhor recuperação motora e menor comprometimento tecidual na análise histopatológica e, portanto, a expressão aumentada do gene bcl-2 poderia ter aplicabilidade no tratamento da lesão da medula espinal.

Sroga et al.¹¹⁷ (2003) utilizaram ratos e camundongos submetidos a trauma medular experimental com a intenção de comparar as respostas inflamatórias em cada espécie. Diferenças substanciais foram encontradas entre elas. Em análise histológica, constatou-se a presença de cavitações na medula de ratos após o trauma, enquanto nas medulas analisadas dos camundongos houve formação de tecido conectivo denso no local da contusão. Na análise imunohistoquímica, observou-se uma similaridade quanto à resposta da micróglia e de macrófagos, enquanto a resposta linfocítica e de células dendríticas eram claramente distintas. Em ratos, a migração de linfócitos T para área de lesão ocorre na fase inicial do processo inflamatório, entre o terceiro e o sétimo dia, e em camundongos a migração ocorre tardiamente, em torno do décimo quarto dia. Em camundongos, ocorre migração predominante de um tipo celular que se assemelha a fibrócitos e não a células dendríticas, como ocorre em ratos. A partir da análise dos resultados, os autores concluem que o processo de cicatrização entre ratos e camundongos é distinto.

Sheng et al.¹¹⁸ (2004) descreveram um modelo de lesão da medula espinal em camundongos através da colocação de microtúbulo de silicone com 1,5 mm de diâmetro no espaço subaracnoideo. Os camundongos C57Bl/6J foram separados em quatro grupos de até oito animais e submetidos à lesão medular experimental através da colocação e manutenção de um tubo de silicone no espaço epidural, provocando compressão da medula espinal por períodos

distintos em cada grupo experimental. Conforme a divisão, os autores apresentaram: Grupo 1 - 1 minuto; grupo 2 - 30 minutos; grupo 3 - 60 minutos e grupo 4 - 120 minutos. Transcorrido o tempo programado, o tubo era retirado de forma percutânea através de um fio guia. Os animais foram submetidos à avaliação funcional motora por meio da escala BBB, marcha em barra cilíndrica e apreensão em tela metálica. Foi realizada, ainda, uma análise histológica por coloração hematoxilina-eosina ao nível da lesão em todos os animais. Os autores, de acordo com seus resultados, apontam que a piora funcional observada nos três testes e o aumento da área cicatricial identificada no estudo histológico estavam diretamente relacionados ao tempo de compressão. Como esperado, quanto maior o tempo de compressão medular, maior a área cicatricial na medula e pior o desempenho dos animais nas escalas de avaliação funcional.

Farooque et al.¹¹⁹ (2006) analisaram a influência do gênero sexual em um experimento com lesão medular padronizada em camundongos C57Bl/6. Os animais foram divididos em grupos compostos pelo sexo masculino e pelo sexo feminino e submetidos à lesão medular experimental. Com 2 semanas de evolução após o trauma, os animais eram submetidos à avaliação funcional pela escala BBB, em seguida sacrificados e a medula contundida era preparada para análise histológica. Foi notado um desempenho funcional superior entre as fêmeas, estatisticamente significativo, quando comparado aos machos na mesma condição. Na análise histológica, evidenciou-se menor hemorragia e sinais inflamatórios nas fêmeas. Os autores concluíram que animais de sexos diferentes apresentam resposta inflamatória, bem como desempenho funcional diferentes entre si. Nesse sentido, apresentam a hipótese de que hormônios,

como o estrógeno por exemplo, podem apresentar papel neuroprotetor e interferir na resposta inflamatória pós-trauma medular.

Basso et al.¹²⁰ (2006) desenvolveram a BMS (*Basso Mouse Scale*). Trata-se de uma escala de avaliação do desempenho funcional de camundongos submetidos ao trauma medular contuso experimental. É uma adaptação da escala BBB desenvolvida para ratos, já citada anteriormente neste texto. Os autores testaram diferentes linhagens de camundongos, submetendo-os a diferentes graus de lesão medular contusional ou transecção medular em nível torácico. A partir da comparação entre as escalas BBB e BMS, os autores apontam que a escala BMS apresenta menor variabilidade intra e entre observadores, em comparação com a escala BBB, e é capaz de demonstrar uma correlação correta e diretamente proporcional entre o grau de comprometimento medular no local da lesão e os achados na avaliação comportamental.

Li et al.¹²¹ (2006) aplicaram um modelo de lesão medular em camundongos com o objetivo de comparar as diferentes escalas existentes. Os autores compararam a escala BBB, uma modificação dessa escala a (mBBB), a BMS e o teste de marcha em plano inclinado. Segundo os autores, a escala (mBBB) apresentou menor variabilidade interobservador quando comparada às demais, além de correlacionar melhor a intensidade/gravidade da contusão aos dados obtidos na análise histológica.

Pitzer et al.⁴⁵ (2010) estudaram a ação do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF ou *Granulocyte-colony stimulating factor*) no trauma medular contuso em camundongos. O G-CSF mostrou, em estudos anteriores, sua ação neuroprotetora e estimuladora de crescimento neural tanto *in vitro* como *in vivo*. Nesse estudo, os autores utilizaram camundongos selvagens e

transgênicos que apresentavam expressão aumentada de G-CSF no sistema nervoso central. Após lesão medular experimental padronizada, os camundongos selvagens receberam G-CSF e foram comparados com os camundongos transgênicos e com grupo controle sem lesão. Os autores observaram que o receptor de G-CSF sofreu regulação após a lesão da medula espinal e que o G-CSF diminuiu, significativamente, a apoptose celular no modelo experimental. O tratamento com G-CSF ocasionou um melhor desempenho funcional em ambos os grupos. Dessa forma, aponta-se que o G-CSF reduz morte celular.

Kim et al.¹²² (2010) estudaram camundongos C57BL/6 fêmeas. Esses animais foram divididos em cinco grupos. Em quatro desses grupos, os animais foram submetidos à lesão medular e um grupo controle que sofreu laminectomia sem lesão. Todos os animais foram submetidos à ressonância magnética dentro de 3 horas após a lesão. Todos os animais foram submetidos à avaliação funcional seriada nas 2 semanas seguintes. Aplicou-se a escala BMS. Após sofrerem eutanásia, as medulas lesadas foram preparadas para análise histológica. Os autores observaram forte correlação entre os achados presentes na ressonância magnética àqueles encontrados na análise histológica e avaliação motora. Assim, os autores concluíram que os achados presentes na ressonância magnética podem aumentar a capacidade de entendimento da lesão medular e sua fisiopatologia e apresentam potencial de interferir na decisão terapêutica, como também prognosticar a recuperação da função motora.

Sato et al.⁴⁷ (2012) compararam as respectivas respostas ao trauma medular por transecção completa da medula ao nível torácico. Para tal, os

autores utilizaram camundongos transgênicos com supressão de interleucina-1 e camundongos selvagens. No seguimento após a lesão, os animais foram acompanhados com testes funcionais motores por 14 dias. Os autores observaram que os camundongos transgênicos tiveram desempenho funcional significativamente superior àqueles encontrados nos camundongos selvagens. Uma das respostas encontradas para justificar essa diferença seria que a inibição da interleucina-1 diminui a inflamação da medula espinhal.

Kubota et al.⁴⁶ (2012) também compararam camundongos transgênicos a camundongos selvagens. A linhagem transgênica escolhida pelos autores apresentava supressão da expressão de mieloperoxidase. Atribuiu-se à mieloperoxidase a produção de um metabólito oxidativo neurotóxico, o ácido hipocloroso. O objetivo foi avaliar o papel da mieloperoxidase na resposta inflamatória que se segue ao trauma medular em camundongos. Após sofrerem lesão medular contusa, esses dois grupos de animais foram seguidos com avaliações funcionais seriadas conhecidas como escala de locomoção motora em campo aberto. Os autores identificaram nos locais das lesões medulares maior produção de ácido hipocloroso nos animais selvagens, quando comparados aos transgênicos. Também observaram maior lesão tecidual e pior desempenho funcional nesse grupo. Desse estudo, os autores concluíram que o ácido hipocloroso acentua a lesão tecidual secundária que se segue ao trauma medular inicial.

Forgione et al.¹²³ (2017) reforçam a importância dos modelos experimentais de lesão medular em animais para o entendimento da fisiopatologia e para aplicação de testes terapêuticos antes de ensaios clínicos em humanos. Em seu modelo experimental, a lesão medular foi provocada por

compressão com clipe vascular no nível cervical (C6-7). Os animais foram divididos em dois grupos. Um grupo submetido à lesão medular e um grupo controle submetido apenas à laminectomia. Os desfechos analisados foram função motora após a lesão utilizando as escalas BMS, "CatWalk" e análise histológica do local da lesão medular. Os autores observaram uma recuperação parcial da função motora em ambos os testes e acentuação da resposta inflamatória presente no estudo histológico. Esse modelo experimental mostrou-se viável para estudar lesões cervicais em camundongos.

Em revisão sistemática, **Sharif-Alhoseini et al.**¹²⁴ (2017) levantaram 2209 artigos publicados desde 1946 até 2016, dos quais 43,4% são publicações sobre trauma medular experimental com modelos animais contusionais.

Desse quadro, a maioria dos estudos descreve a utilização de ratos como animais de experimentação, 72,4%, e apenas 16% dos modelos utilizam camundongos. Avaliação histológica esteve presente em 63,2% das publicações e a técnica de coloração por HE foi utilizada em aproximadamente 47% dos protocolos. Dos mais de dois mil estudos analisados, a avaliação funcional como desfecho primário esteve presente em aproximadamente 63% deles. A maioria das escalas utilizadas eram motoras (89%) e menos de 20 % fizeram avaliações sensitivas.

3. MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Ética

Este protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesp) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) por meio da Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo 072/16, **Anexo A**).

No presente estudo foram seguidos de forma meticulosa os padrões éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os animais utilizados neste estudo foram obtidos junto ao Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O presente estudo será realizado no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN).

3.2 Animais de experimentação

Foram utilizados neste estudo 32 camundongos Balb C. Os critérios de inclusão eram animais machos, com peso variando de 70 a 100 g e com idade entre 10 e 12 semanas de vida. Todos os animais devem apresentar pelagem e estado clínico normais, bem como condições normais de motricidade. O objetivo dessa avaliação foi assegurar que todos estavam saudáveis e apresentavam capacidade de movimentação normal no início do estudo. Todos os animais foram pesados ao início e ao final do estudo.

No primeiro contato com os animais, todos os camundongos foram submetidos à inspeção pelo pesquisador e pelo veterinário responsável pelo laboratório para avaliação do estado geral.

Nesse sentido, os critérios de exclusão estabelecidos nesse estudo seguem listados:

- a) Óbito após o trauma medular experimental;
- b) Más formações ou anomalias anatômicas visíveis à inspeção visual da região a ser operada;
- c) Automutilação ou canibalismo entre os animais durante o período de observação;
- d) Ausência de deficit neurológico e motricidade normal na primeira avaliação após contusão medular – pontuação 9 na escala BMS (*Basso Mouse Scale*), que consiste numa avaliação funcional específica para avaliação

de camundongos e que mostraria falha da obtenção de lesão medular experimental;

e) Infecção do sítio cirúrgico.

As complicações foram registradas para serem utilizadas por ocasião das análises estatísticas dos resultados. A decisão referente à quantidade de animais necessária para a realização do estudo foi baseada na literatura atual que utiliza camundongos para estudos com finalidades e métodos similares ao presente experimento^{39,118,122,125}.

Todos os animais, durante a realização do estudo, foram mantidos em gaiolas com ambiente climatizado, em condições adequadas de higiene, alimentação e hidratação. As gaiolas foram acondicionadas no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP. Cada gaiola, cujas dimensões eram de 30 x 19,8 cm x 13,3 cm, contava com até três camundongos de uma mesma ninhada. Os animais foram frequentemente manuseados pela equipe de cuidadores do laboratório com o objetivo de acostumá-los à equipe técnica do laboratório e de condicioná-los a se movimentarem regularmente permitindo, assim, maior facilidade por ocasião das subseqüentes avaliações da motricidade após a contusão medular experimental.

3.3 Grupos experimentais

Os camundongos foram distribuídos, por sorteio simples, em quatro grupos de oito animais cada, todos submetidos à lesão medular experimental, conforme descrito adiante:

- a) Grupo salina – camundongos sofreram contusão medular e receberam solução salina (0,9%) por via intraperitoneal, grupo controle;
- b) Grupo G(M1) – camundongos sofreram contusão medular e receberam gangliosídeo G(M1) (30 mg/kg) por via intraperitoneal;
- c) Grupo eritropoetina – camundongos sofreram contusão medular e receberam de eritropoetina (1000 UI/kg) por via intraperitoneal;
- d) Grupo combinado – camundongos sofreram contusão medular e receberam de forma combinada G(M1) (30 mg/kg) e eritropoetina (1000 UI/kg) por via intraperitoneal.

3.4 Modelo experimental de lesão medular

3.4.1 Protocolo de anestesia

O procedimento anestésico antecedeu todos os procedimentos cirúrgicos realizados e ocorreu em duas etapas.

Uma etapa pré-anestésica obtida através da associação de Diazepam na dose de 0,5 mg/kg, Atropina em dose de 0,04 mg/Kg e Cloripromazina na dose de 30 mg/Kg, todos por via intraperitoneal, e Acepromazina na dose de 0,25 mg/100g por via intramuscular.

Em seguida, na segunda etapa, utilizou-se, para a anestesia propriamente dita, a associação de Ketamina em dose de 90 mg/Kg e Xilazina em 5 mg/Kg. A manutenção do plano anestésico adequado foi confirmada através da ausência de reflexos córneos e de dor à compressão da cauda por pinçamento. Caso o plano anestésico não fosse obtido de forma satisfatória, era feita uma nova aplicação de reforço com um terço da dose das drogas da segunda etapa da anestesia^{73,126}.

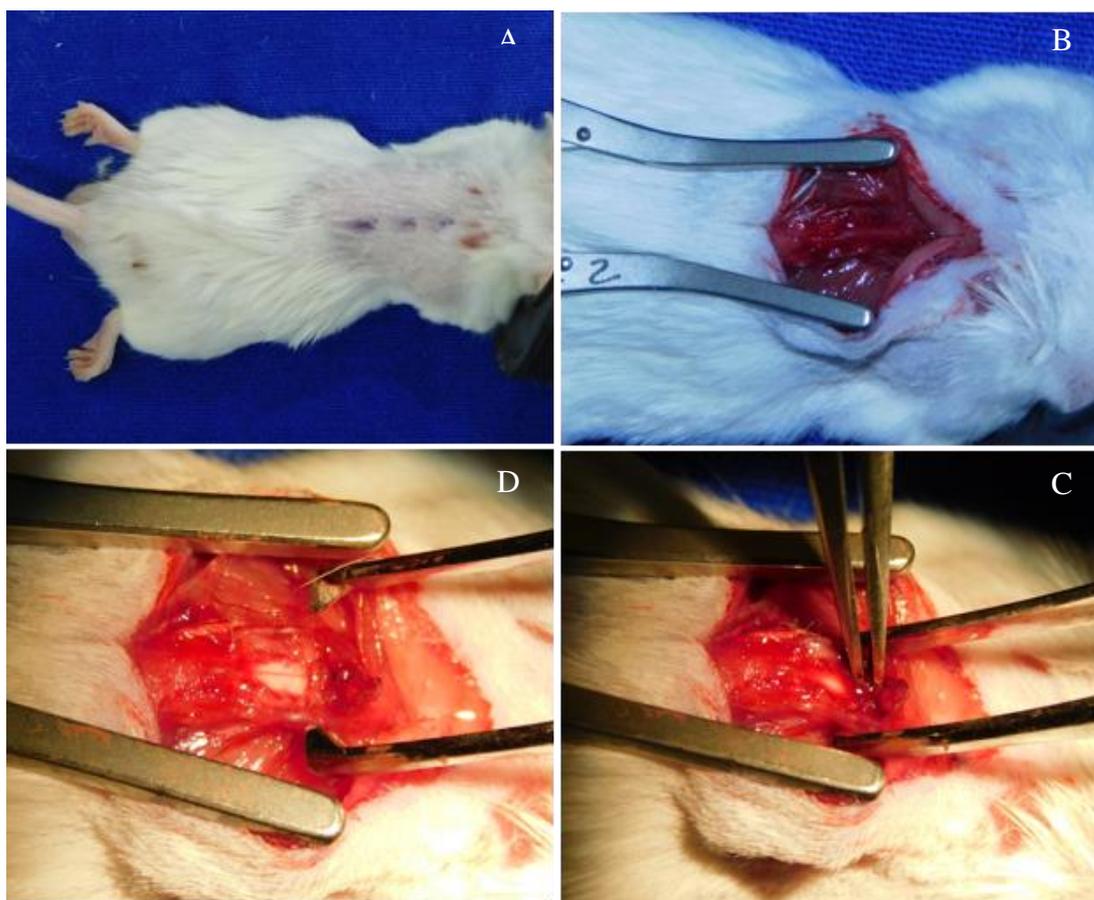
3.4.2 Procedimento cirúrgico e lesão medular experimental

Com a confirmação do plano anestésico através do pinçamento da pata traseira, do pinçamento da cauda e da observação da ausência de reflexo da córnea, cada um dos animais foi submetido à tricotomia, que se estendia do nível T5 ao T12, aproximadamente, em região dorsal.

Após a adequada antissepsia com solução alcoólica de clorexidine, os camundongos foram submetidos à incisão longitudinal em região dorsal, que se estendia do nível T7 ao T11, aproximadamente.

Foi realizada dissecação romba dos planos musculares e seu afastamento lateral dos respectivos processos espinhosos e lâminas. Foi executada laminectomia em nível T9 com subsequente exposição medular. A identificação precisa do nível de laminectomia foi realizada através da contagem das vertebrae, que é feita, primeiramente, identificando-se a costela mais distal. Essa região corresponde à localização da décima terceira vértebra torácica, e a partir dessa referência contavam-se as vértebras no sentido de distal para proximal até a identificação da nona vertebra torácica, local em que é feito o procedimento.

Em função de configurarem estruturas diminutas, todo o procedimento cirúrgico foi realizado com auxílio de microscópio cirúrgico minimizando o risco de lesões iatrogênicas à medula espinal. Conforme segue na **Figura 1**:



Fonte: Acervo pessoal do autor

Figura 1 - Sequência de procedimentos cirúrgicos realizada nos camundongos para exposição medular. A) Tricotomia e marcação da extensão da incisão; B) Incisão longitudinal sobre coluna vertebral e afastamento dos músculos nos processos espinhosos de T7 a T11; C) Laminectomia com pinça; D) Detalhe mostrando medula torácica exposta

Para promover a contusão medular, foi obedecido o protocolo internacional MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study)⁷⁰. As lesões medulares foram obtidas utilizando-se o sistema NYU Impactor⁷³.

Primeiramente, o animal foi posicionado em uma placa de suporte e teve sua coluna vertebral alinhada de forma a ficar paralela à placa de apoio e em aproximadamente 90° de alinhamento em relação à haste de impacto. Uma vez posicionado, a coluna vertebral do camundongo era imobilizada através de pinças autostáticas fixadas em uma vértebra proximal e distal à área de

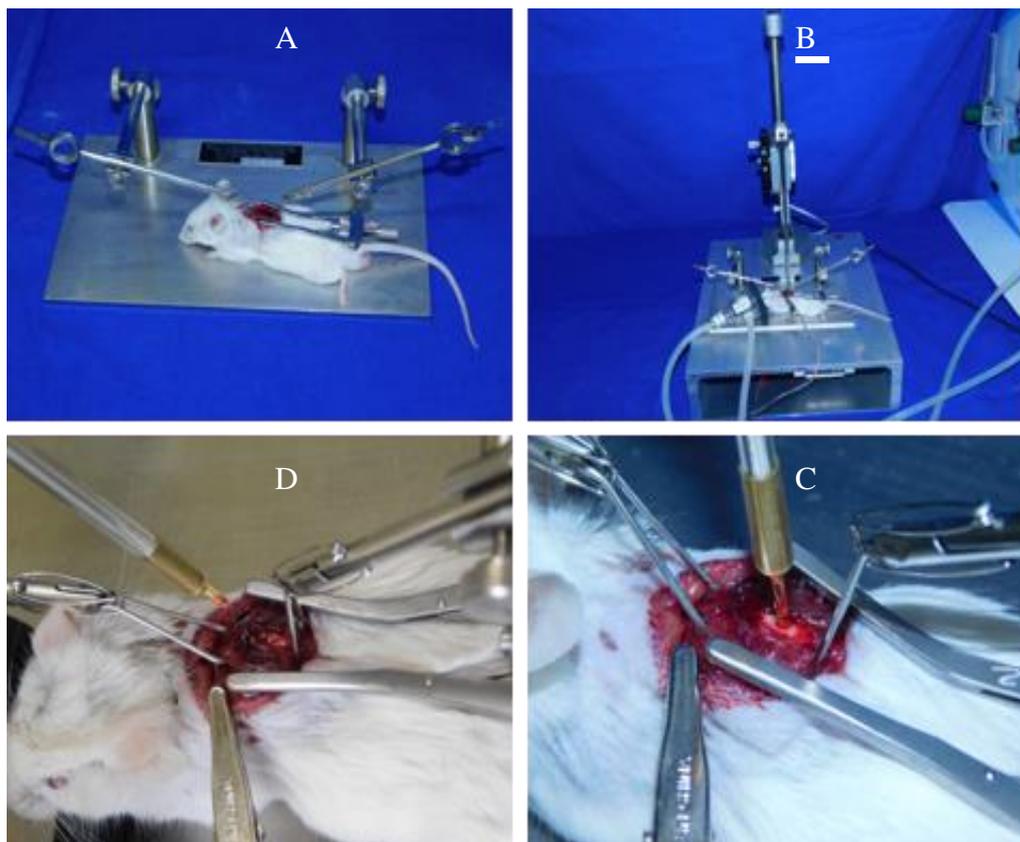
laminectomia e exposição medular. O objetivo desse procedimento foi minimizar o movimento do animal durante o impacto, o que dissiparia parte da energia do trauma podendo interferir na padronização da lesão⁶⁶.

Em seguida, uma haste de 8g foi posicionada de forma a tocar a medula, porém sem provocar lesão. Essa manobra permitiu identificar o ponto definido como altura zero, a partir do qual se programou a altura estabelecida para queda do peso. Neste estudo, a altura foi definida em 12,5 mm com o objetivo de provocar uma lesão medular moderada, conforme protocolo padronizado e validado em nosso laboratório para experimentos com camundongos³⁹.

O aparelho utilizado apresenta um circuito elétrico que acusa, através do acionamento automático de um sinal sonoro, o momento em que a haste entra em contato com a medula, facilitando uma aproximação cuidadosa da haste e minimizando o risco de lesão iatrogênica.

Uma vez definidos esses parâmetros e o correto posicionamento e fixação do animal, a haste foi solta da altura 12,5 mm em direção à medula exposta provocando, dessa forma, uma lesão medular moderada, como se observa na **Figura 2**.

O aparelho utilizado dispõe de sistema computadorizado de monitorização de parâmetros físicos que permite confirmar a homogeneidade das contusões experimentais. Esse sistema permite que se produza lesão medular reprodutível e eficaz com mínima variação entre uma aplicação e outra.



Fonte: Acervo pessoal do autor

Figura 2 - Produção da lesão medular experimental. A) Posicionamento do camundongo sobre a plataforma e fixação de processos espinhosos proximais e distais à área de exposição medular; B) Acoplamento da plataforma ao sistema NYU-Impactor; C) Posicionamento da haste de impacto em contato com a medula, porém, sem compressão para definir o nível zero; D) Elevação da haste de impacto à altura de 12,5 mm preparando-a para causar contusão medular por queda de peso

3.4.3 Cuidados após lesão medular

Após o procedimento cirúrgico descrito na seção anterior, os camundongos tiveram o sítio cirúrgico inspecionado e lavado com soro fisiológico. A ferida operatória foi fechada a partir de planos profundos com fio de nylon

monofilamentar 2.0⁷³. Em seguida, foi aplicado um creme antisséptico. Os animais foram acondicionados em suas respectivas gaiolas tendo livre acesso à alimentação e água. Foi aplicado um regime rigoroso de higiene das gaiolas com trocas frequentes do substrato.

Diante do risco de bexiga neurogênica, por ocasião da lesão medular, foi realizada diariamente a manipulação vesical através de massagem para esvaziamento vesical a cada 8 horas por 5 dias. Durante todo o experimento, os animais foram monitorizados e examinados diariamente com o intuito de identificar qualquer complicação como, por exemplo, automutilação, infecção urinária ou do sítio cirúrgico.

Todos os animais receberam Buprenorfina na dose de 0,01 a 0,05 mg/Kg, por via subcutânea para analgesia, e para profilaxia antibiótica foi administrado amoxicilina na dose de 15 mg/Kg a cada 12 horas por via intraperitoneal. Todos os medicamentos foram administrados em todos os grupos, inclusive no grupo controle.

3.5 Intervenções experimentais: G(M1) e eritropoietina

Imediatamente após a lesão medular contusa e ainda sob efeito da anestesia e sedação, os camundongos dos grupos G(M1) isolado e G(M1) combinado com eritropoietina receberam injeção intraperitoneal dessa droga na dose de 30 mg/Kg.

De forma análoga, a eritropoietina foi administrada aos camundongos do grupo eritropoietina isolada e do grupo eritropoietina em combinação com G(M1). A dose administrada foi de 1000 UI/Kg logo após a lesão medular experimental. É importante salientar que nos grupos que receberam ambas as drogas, elas foram administradas em pontos intraperitoneais distintos e por seringas diferentes.

No grupo em que os camundongos foram submetidos à lesão medular e sem aplicação de G(M1) ou eritropoietina, os animais receberam injeção intraperitoneal de solução salina a 0,9%.

3.6 Avaliação da capacidade locomotora pela escala BMS e MFS (Anexos B e C)

Para realização da avaliação motora BMS, os animais foram observados sobre uma superfície plana em campo aberto de 52 x 87 x 66 cm e deixados livres para se locomoverem. A observação dos animais foi realizada por dois pesquisadores treinados e "cegos" em relação a qual grupo cada animal pertencia e quanto à avaliação do colega. As avaliações seriadas após a intervenção foram realizadas nos 2°, 14°, 28°, 42° dias após a lesão medular experimental e os examinadores responsáveis classificaram, segundo a BMS (*Basso Mouse Scale*)¹²⁰, o padrão de marcha desses animais e a pontuação obtida nessa escala. No caso de divergência entre os examinadores, a menor nota entre as duas era a escolhida.

Essa escala considera a movimentação das articulações dos membros traseiros e seus respectivos posicionamentos, a estabilidade do tronco, a coordenação entre os membros dianteiros e o posicionamento da cauda. De forma equivalente ao que é aplicado na clássica escala BBB⁶⁹, utilizada na avaliação de ratos, na escala BMS¹²⁰ cada membro posterior é avaliado de forma separada e o resultado da avaliação é a média da pontuação entre um membro e o outro.

A escala MFS, desenvolvida em **2000** por **Farooque¹¹⁴, Isaksson et al.¹¹⁵**, é específica para avaliação funcional motora de camundongos. Os parâmetros analisados nessa escala são o padrão de movimentação do membro traseiro e a capacidade do animal de deambular sobre barras de diferentes diâmetros, o que demonstra a destreza e equilíbrio do camundongo. A pontuação na escala MFS é graduada de zero a 13 pontos, sendo zero a ausência de movimentação em membros traseiros e 13 pontos para animais com movimentação normal em ambos os membros.

3.7 Protocolo de Eutanásia (CONCEA)

Todos os animais sofreram eutanásia no 42º dia de experimento. O protocolo utilizado para esse procedimento foi o publicado, em 2018, na "Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA"¹²⁷.

Para o procedimento de eutanásia, os animais encontravam-se inconscientes sob efeito de anestesia. Foram realizadas a toracotomia e a

exsanguinação através de perfuração cardíaca. Concomitantemente à exsanguinação, o ventrículo esquerdo dos camundongos foi perfundido com solução fisiológica, por meio de punção e bombeamento contínuo e controlado a um fluxo de 1ml/s, de modo a garantir a remoção do sangue e preservar ao máximo as estruturas dos vasos sanguíneos da medula espinal. Por fim, os animais foram induzidos a morte indolor através da infusão de 5 ml de solução de cloreto de potássio (19,1%) por via endovenosa.

3.8 Protocolo de necrópsia e avaliação medular

Após a eutanásia, seguiu-se uma minuciosa inspeção da carcaça com o objetivo de identificar alterações anatômicas que fugissem ao padrão da normalidade. Em seguida, a coluna vertebral foi cuidadosamente ressecada da sexta à décima segunda vértebra torácica e retirada em bloco. Uma vez que a coluna vertebral foi isolada, a medula foi extraída e foram acondicionadas em tubos Falcon, contendo 30 ml de solução de sacarose a 10% em temperatura ambiente, e mantidas nessa solução por no máximo 24 horas até o preparo das lâminas¹²⁸, devidamente identificados e encaminhados ao serviço de patologia do IOT-HCFMUSP.

Deu-se sequência à inspeção de órgãos cavitários em busca de qualquer anomalia ou sinal de doença subclínica após a extração completa da medula. Caso alguma anormalidade fosse encontrada, o animal seria excluído do estudo.

Todos os achados foram registrados e serão oportunamente descritos como complicações associadas ao experimento.

Ao fim desse processo, as carcaças foram acondicionadas, identificadas e devidamente descartadas de acordo com o protocolo de descarte de carcaças da FMUSP¹²⁷.

3.9 Preparo dos tecidos e avaliação imuno-histoquímica

Para a realização do estudo imuno-histoquímico das peças anatômicas, os segmentos das medulas espinhais torácicas foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em tampão de fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,3 por 8 horas e submetidos à crioproteção em diluições sequenciais de sacarose (10%, 20% e 30%) a 4°C. Após serem embebidos em composto O.C.T (*Optimal Cutting Temperature*), foram cortados no plano sagital e coronal (12 micrometros) em criostato. Os cortes foram incubados de um dia para o outro com os anticorpos primários MBP (MBP, do inglês: *myelin basic protein*) em solução contendo soro normal de cabra a 5% e Triton X-100 0,3% diluídos em PBS em temperatura ambiente. Após lavagem com PB 0,1M, os cortes foram incubados com anticorpo secundário acoplado a compostos fluorescentes (Alexa 488) na diluição 1:500. As lâminas foram marcadas com 4'-6-diamino-2-fenil-indol (DAPI) para detecção dos núcleos (diluição 1:60000), também diluído em Triton X-100 0,3%/PB 0,1M por 2 horas em temperatura ambiente. Finalmente

foi feita uma lavagem com PB 0,1M e as lâminas foram fechadas com meio de montagem e lamínula para visualização em microscópio de fluorescência.

3.10 Análise estatística

Os animais tiveram suas funções motoras analisadas utilizando duas escalas distintas, a BMS e MFS. Os momentos das avaliações foram: antes da lesão, 2 dias, 2 semanas, 4 semanas e 6 semanas após a lesão. Ao término da última avaliação, parte dos animais foram sacrificados e tiveram sua medula espinal extraída e encaminhada para preparo e análise imuno-histoquímica a fim de se avaliar o número de axônios e o comprimento dos axônios regenerados no local da lesão.

O objetivo do estudo é verificar se existe diferenças nos parâmetros funcionais entre os grupos em cada momento da avaliação e se há diferença no resultado da imuno-histoquímica entre os grupos experimentais.

Foram descritas as escalas funcionais antes da lesão segundo grupos com uso de medidas de resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparados entre os grupos com uso de análises de variâncias (ANOVA)^{129,130}. Já as medidas da imuno-histoquímica foram descritas segundo grupos com uso de medidas de resumo e comparadas entre os grupos com uso de modelos lineares generalizados com distribuição (MLG) Poisson, e função da ligação identidade para o número de axônios e com distribuição Normal e função de ligação logarítmica para a soma dos comprimentos dos axônios¹³¹. As

análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para identificar quais grupos foram diferentes¹³⁰.

Os parâmetros de funcionalidade foram descritos segundo os grupos ao longo do seguimento e comparados entre os grupos e momentos de avaliação com uso de equações de estimação generalizadas (EEG), com distribuição Normal e função da ligação identidade assumindo matriz de correlações autorregressiva de primeira ordem entre os momentos¹³¹. Os resultados foram seguidos de comparações múltiplas de Bonferroni para identificar entre quais grupos e momentos ocorreram as diferenças quando significativas¹³⁰.

As análises foram realizadas com uso do *software* IBM-SPSS *for Windows* versão 20.0 e tabulados com uso do *software* Microsoft-Excel 2003 e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise funcional

Durante a análise funcional dos camundongos, tanto pela escala BMS como pela escala MFS, não foi observada diferença estatisticamente significativa nas pontuações entre os lados esquerdo e direito em cada animal em ambas as escalas. Para efeito de cálculo estatístico, quando os valores obtidos na avaliação de um animal diferiam entre lado esquerdo e direito, optou-se por considerar no cálculo o valor de menor pontuação entre os lados.

A descrição dos resultados da escala BMS e MFS podem ser vistos na

Tabela 1 e 2.

Tabela 1 - Descrição das escalas funcionais antes da lesão segundo grupos e resultado dos testes comparativos

Variável	SF (N = 8)	GM1 (N = 8)	eritropoietina (N = 8)	GM1 + eritropoietina (N = 8)	p
BMS					>0,999
média ± DP	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	
mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	
MFS					0,451
média ± DP	11,4 ± 1,2	10,5 ± 1,1	11 ± 1,1	11 ± 0,9	
mediana (mín.; máx.)	11 (10; 13)	11 (9; 12)	11 (10; 13)	11 (10; 13)	
ANOVA					

A Tabela 1 mostra que as escalas funcionais foram em média estatisticamente iguais entre os grupos antes da lesão ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Descrição das escalas de funcionalidade segundo grupos e momentos de avaliação após indução da lesão e resultado dos testes comparativos

Variável/Grupo	Momento de avaliação				p Grupo	p Momento	p Interação
	2 dias	2 semanas	4 semanas	6 semanas			
BMS					<0,001	<0,001	<0,001
SF							
média ± DP	0 ± 0	1,1 ± 0,6	2 ± 0	2,8 ± 0,5			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 0)	1 (0; 2)	2 (2; 2)	3 (2; 3)			
GM1							
média ± DP	0,1 ± 0,4	1,8 ± 0,5	3,1 ± 0,4	4,6 ± 0,5			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	2 (1; 2)	3 (3; 4)	5 (4; 5)			
eritropoietina							
média ± DP	0 ± 0	1,8 ± 0,7	2,4 ± 0,5	3,3 ± 0,7			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 0)	2 (1; 3)	2 (2; 3)	3 (2; 4)			
GM1 + eritropoietina							
média ± DP	0 ± 0	1,5 ± 0,9	3,4 ± 0,5	3,9 ± 0,6			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 0)	1,5 (0; 3)	3 (3; 4)	4 (3; 5)			
MFS					<0,001	<0,001	<0,001
SF							
média ± DP	0 ± 0	0,9 ± 0,4	2 ± 0,8	2,6 ± 0,5			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 0)	1 (0; 1)	2 (1; 3)	3 (2; 3)			
GM1							
média ± DP	0,1 ± 0,4	1,8 ± 0,5	4 ± 0,5	6,8 ± 0,7			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	2 (1; 2)	4 (3; 5)	7 (5; 7)			
eritropoietina							
média ± DP	0 ± 0	1,9 ± 0,6	2,4 ± 0,7	4,3 ± 0,5			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 0)	2 (1; 3)	2 (2; 4)	4 (4; 5)			
GM1 + eritropoietina							
média ± DP	0 ± 0	1,8 ± 1	4,4 ± 0,7	5,4 ± 0,7			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 0)	2 (0; 3)	4,5 (3; 5)	5,5 (4; 6)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade com matriz de correlações AR(1) entre os momentos

A Tabela 2 corrobora os achados sugeridos nas figuras 3 e 4, sendo que, tanto na escala BMS como na escala MSF o comportamento médio dos animais ao longo do seguimento foi estatisticamente diferente entre os grupos ($p_{\text{Interação}} < 0,001$).

As figuras 3 e 4 sugerem que os animais que receberam GM1 apresentaram aumentos nas escalas mais rapidamente que os animais que receberam SF ou somente eritropoietina.

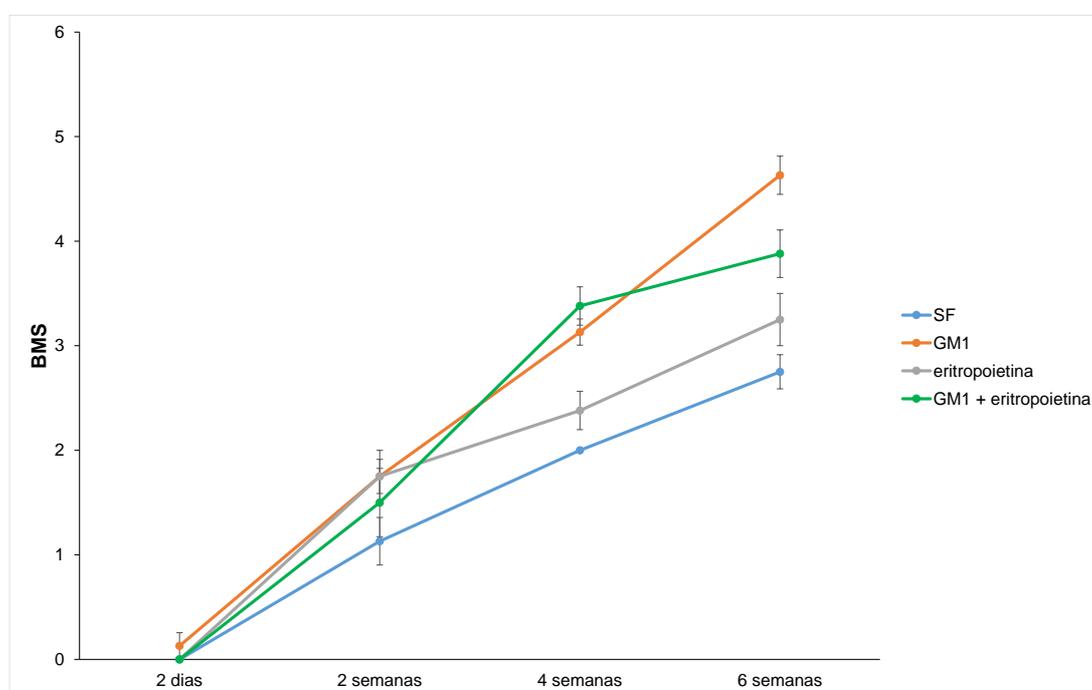


Figura 3 - Perfis médios da escala BMS segundo grupos e respectivos erros padrões

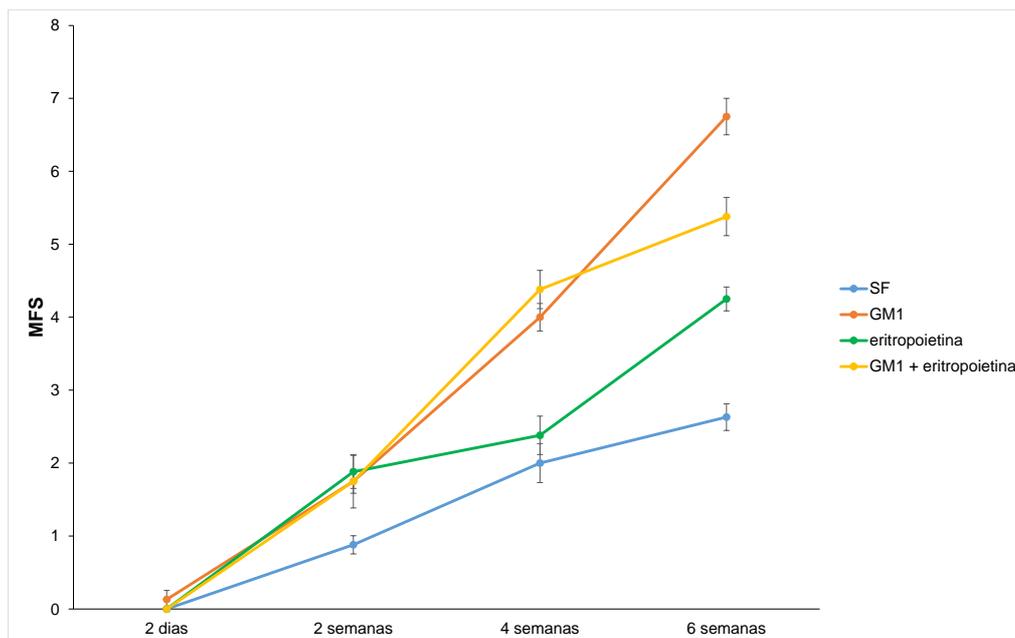


Figura 4 - Perfis médios da escala MFS segundo grupos e respectivos erros padrões

As Tabelas 3 e 4 mostram que, em ambas as escalas, as diferenças médias entre os grupos só começaram a ocorrer a partir de 4 semanas, sendo os grupos que usaram GM1 maiores que o grupo SF em 4 semanas e maiores que o grupo SF e eritropoietina em 6 semanas ($p < 0,05$), com pequenas diferenças entre as escalas. Ao longo do seguimento, o único grupo que apresentou aumento médio nas escalas em todos os momentos de avaliação foi o GM1 ($p < 0,05$), os demais grupos também aumentaram em média ao longo dos momentos de avaliação, mas nem sempre o aumento foi estatisticamente significativo, principalmente entre duas avaliações consecutivas, por exemplo, no grupo eritropoietina, de 2 para 4 semanas, não houve aumento médio estatisticamente significativo em nenhuma das escalas ($p > 0,999$).

Tabela 3 - Resultado das comparações múltiplas da escala BMS segundo grupos e momentos de avaliação

Momento/ Grupo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
2 dias	SF vs GM1	-0,13	0,26	1	>0,999	-1,02	0,77
	SF vs eritropoietina	0,00	0,26	1	>0,999	-0,90	0,90
	SF vs GM1 + eritropoietina	0,00	0,26	1	>0,999	-0,90	0,90
	GM1 vs eritropoietina	0,13	0,26	1	>0,999	-0,77	1,02
	GM1 vs GM1 + eritropoietina	0,13	0,26	1	>0,999	-0,77	1,02
	eritropoietina vs GM1 + eritropoietina	0,00	0,26	1	>0,999	-0,90	0,90
2 semanas	SF vs GM1	-0,63	0,26	1	>0,999	-1,52	0,27
	SF vs eritropoietina	-0,63	0,26	1	>0,999	-1,52	0,27
	SF vs GM1 + eritropoietina	-0,38	0,26	1	>0,999	-1,27	0,52
	GM1 vs eritropoietina	0,00	0,26	1	>0,999	-0,90	0,90
	GM1 vs GM1 + eritropoietina	0,25	0,26	1	>0,999	-0,65	1,15
	eritropoietina vs GM1 + eritropoietina	0,25	0,26	1	>0,999	-0,65	1,15
4 semanas	SF vs GM1	-1,13	0,26	1	0,001	-2,02	-0,23
	SF vs eritropoietina	-0,38	0,26	1	>0,999	-1,27	0,52
	SF vs GM1 + eritropoietina	-1,38	0,26	1	<0,001	-2,27	-0,48
	GM1 vs eritropoietina	0,75	0,26	1	0,392	-0,15	1,65
	GM1 vs GM1 + eritropoietina	-0,25	0,26	1	>0,999	-1,15	0,65
	eritropoietina vs GM1 + eritropoietina	-1,00	0,26	1	0,011	-1,90	-0,10

continua

Resultados

								continuação
6 semanas	SF vs	GM1	-1,88	0,26	1	<0,001	-2,77	-0,98
	SF vs	eritropoietina	-0,50	0,26	1	>0,999	-1,40	0,40
	SF vs	GM1 + eritropoietina	-1,13	0,26	1	0,001	-2,02	-0,23
	GM1 vs	eritropoietina	1,38	0,26	1	<0,001	0,48	2,27
	GM1 vs	GM1 + eritropoietina	0,75	0,26	1	0,392	-0,15	1,65
	eritropoietina vs	GM1 + eritropoietina	-0,63	0,26	1	>0,999	-1,52	0,27
SF	2 dias vs	2 semanas	-1,13	0,24	1	<0,001	-1,96	-0,29
	2 dias vs	4 semanas	-2,00	0,25	1	<0,001	-2,89	-1,11
	2 dias vs	6 semanas	-2,75	0,26	1	<0,001	-3,65	-1,85
	2 semanas vs	4 semanas	-0,88	0,24	1	0,028	-1,71	-0,04
	2 semanas vs	6 semanas	-1,63	0,25	1	<0,001	-2,52	-0,73
	4 semanas vs	6 semanas	-0,75	0,24	1	0,191	-1,59	0,09
GM1	2 dias vs	2 semanas	-1,63	0,24	1	<0,001	-2,46	-0,79
	2 dias vs	4 semanas	-3,00	0,25	1	<0,001	-3,89	-2,11
	2 dias vs	6 semanas	-4,50	0,26	1	<0,001	-5,40	-3,60
	2 semanas vs	4 semanas	-1,38	0,24	1	<0,001	-2,21	-0,54
	2 semanas vs	6 semanas	-2,88	0,25	1	<0,001	-3,77	-1,98
	4 semanas vs	6 semanas	-1,50	0,24	1	<0,001	-2,34	-0,66
eritropoietina	2 dias vs	2 semanas	-1,75	0,24	1	<0,001	-2,59	-0,91
	2 dias vs	4 semanas	-2,38	0,25	1	<0,001	-3,27	-1,48
	2 dias vs	6 semanas	-3,25	0,26	1	<0,001	-4,15	-2,35
	2 semanas vs	4 semanas	-0,62	0,24	1	>0,999	-1,46	0,21
	2 semanas vs	6 semanas	-1,50	0,25	1	<0,001	-2,39	-0,61
	4 semanas vs	6 semanas	-0,88	0,24	1	0,028	-1,71	-0,04

continua

Resultados

								continuação
GM1 + eritropoietina	2 dias vs	2 semanas	-1,50	0,24	1	<0,001	-2,34	-0,66
	2 dias vs	4 semanas	-3,38	0,25	1	<0,001	-4,27	-2,48
	2 dias vs	6 semanas	-3,88	0,26	1	<0,001	-4,77	-2,98
	2 semanas vs	4 semanas	-1,88	0,24	1	<0,001	-2,71	-1,04
	2 semanas vs	6 semanas	-2,38	0,25	1	<0,001	-3,27	-1,48
	4 semanas vs	6 semanas	-0,50	0,24	1	>0,999	-1,34	0,34

Comparações múltiplas de Bonferroni

conclusão

Tabela 4 - Resultado das comparações múltiplas da escala MFS segundo grupos e momentos de avaliação

Momento/ Grupo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
2 dias	SF vs GM1	-0,13	0,29	1	>0,999	-1,15	0,90
	SF vs eritropoietina	0,00	0,29	1	>0,999	-1,03	1,03
	SF vs GM1 + eritropoietina	0,00	0,29	1	>0,999	-1,03	1,03
	GM1 vs eritropoietina	0,13	0,29	1	>0,999	-0,90	1,15
	GM1 vs GM1 + eritropoietina	0,13	0,29	1	>0,999	-0,90	1,15
	eritropoietina vs GM1 + eritropoietina	0,00	0,29	1	>0,999	-1,03	1,03
2 semanas	SF vs GM1	-0,88	0,29	1	0,325	-1,90	0,15
	SF vs eritropoietina	-1,00	0,29	1	0,073	-2,03	0,03
	SF vs GM1 + eritropoietina	-0,88	0,29	1	0,325	-1,90	0,15
	GM1 vs eritropoietina	-0,13	0,29	1	>0,999	-1,15	0,90
	GM1 vs GM1 + eritropoietina	0,00	0,29	1	>0,999	-1,03	1,03
	eritropoietina vs GM1 + eritropoietina	0,13	0,29	1	>0,999	-0,90	1,15
4 semanas	SF vs GM1	-2,00	0,29	1	<0,001	-3,03	-0,97
	SF vs eritropoietina	-0,38	0,29	1	>0,999	-1,40	0,65
	SF vs GM1 + eritropoietina	-2,38	0,29	1	<0,001	-3,40	-1,35
	GM1 vs eritropoietina	1,63	0,29	1	<0,001	0,60	2,65
	GM1 vs GM1 + eritropoietina	-0,38	0,29	1	>0,999	-1,40	0,65
	eritropoietina vs GM1 + eritropoietina	-2,00	0,29	1	<0,001	-3,03	-0,97

continua

Resultados

								continuação
6 semanas	SF vs GM1	-4,13	0,29	1	<0,001	-5,15	-3,10	
	SF vs eritropoietina	-1,63	0,29	1	<0,001	-2,65	-0,60	
	SF vs GM1 + eritropoietina	-2,75	0,29	1	<0,001	-3,78	-1,72	
	GM1 vs eritropoietina	2,50	0,29	1	<0,001	1,47	3,53	
	GM1 vs GM1 + eritropoietina	1,38	0,29	1	<0,001	0,35	2,40	
	eritropoietina vs GM1 + eritropoietina	-1,13	0,29	1	0,014	-2,15	-0,10	
SF	2 dias vs 2 semanas	-0,88	0,28	1	0,244	-1,88	0,13	
	2 dias vs 4 semanas	-2,00	0,29	1	<0,001	-3,03	-0,97	
	2 dias vs 6 semanas	-2,63	0,29	1	<0,001	-3,65	-1,60	
	2 semanas vs 4 semanas	-1,13	0,28	1	0,009	-2,13	-0,12	
	2 semanas vs 6 semanas	-1,75	0,29	1	<0,001	-2,78	-0,72	
	4 semanas vs 6 semanas	-0,63	0,28	1	>0,999	-1,63	0,38	
GM1	2 dias vs 2 semanas	-1,62	0,28	1	<0,001	-2,63	-0,62	
	2 dias vs 4 semanas	-3,88	0,29	1	<0,001	-4,90	-2,85	
	2 dias vs 6 semanas	-6,63	0,29	1	<0,001	-7,65	-5,60	
	2 semanas vs 4 semanas	-2,25	0,28	1	<0,001	-3,25	-1,25	
	2 semanas vs 6 semanas	-5,00	0,29	1	<0,001	-6,03	-3,97	
	4 semanas vs 6 semanas	-2,75	0,28	1	<0,001	-3,75	-1,75	
eritropoietina	2 dias vs 2 semanas	-1,88	0,28	1	<0,001	-2,88	-0,87	
	2 dias vs 4 semanas	-2,38	0,29	1	<0,001	-3,40	-1,35	
	2 dias vs 6 semanas	-4,25	0,29	1	<0,001	-5,28	-3,22	
	2 semanas vs 4 semanas	-0,50	0,28	1	>0,999	-1,50	0,50	
	2 semanas vs 6 semanas	-2,38	0,29	1	<0,001	-3,40	-1,35	
	4 semanas vs 6 semanas	-1,88	0,28	1	<0,001	-2,88	-0,87	

continua

Resultados

		continuação						
GM1 + eritropoietina	2 dias vs 2 semanas	-1,75	0,28	1	<0,001	-2,75	-0,75	
	2 dias vs 4 semanas	-4,38	0,29	1	<0,001	-5,40	-3,35	
	2 dias vs 6 semanas	-5,38	0,29	1	<0,001	-6,40	-4,35	
	2 semanas vs 4 semanas	-2,63	0,28	1	<0,001	-3,63	-1,62	
	2 semanas vs 6 semanas	-3,63	0,29	1	<0,001	-4,65	-2,60	
	4 semanas vs 6 semanas	-1,00	0,28	1	0,051	-2,00	0,00	

Comparações múltiplas de Bonferroni

conclusão

4.2 Análise imuno-histoquímica

O tratamento com eritropoietina aumenta a remielinização axonal 6 semanas após lesão medular.

Utilizando um anticorpo específico contra a proteína básica da mielina (MBP, do inglês: *myelin basic protein*), avaliamos a remielinização axonal 6 semanas após contusão da medula espinhal. Como pode ser observado na figura 5 (A - H), forem realizados cortes longitudinais da medula espinhal de camundongos dos grupos controle (SF), GM1, eritropoietina e a combinação de GM1 + eritropoietina que foram marcados com MBP e contracolorados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Usando o plugin NeuroJ do programa de análise de imagens ImageJ, o número de axônios mielinizados foi estimado sendo aproximadamente $27,40 \pm 11,42$ para o grupo controle (SF), $99,8 \pm 31,12$ para o grupo GM1, $161,60 \pm 60,30$ para o grupo eritropoietina, $6,40 \pm 10,65$ para o grupo eritropoietina + GM1. O grupo eritropoietina foi diferente significativamente dos grupos controle (SF), GM1 + eritropoietina como mostra a figura 6 ($N = 5$, $P < 0,05$). A soma do comprimento dos axônios mielinizados foi quantificada utilizando o mesmo software sendo aproximadamente $15,97 \pm 5,62$ polegadas para o grupo controle SF); $53,23 \pm 6,54$ polegadas para o grupo GM1; $120,14 \pm 34,38$ polegadas para o grupo eritropoietina e $39,31 \pm 31,02$ polegadas para o grupo GM1 + eritropoietina. Mais uma vez o grupo eritropoietina foi diferente significativamente dos grupos controle (SF) como mostra a figura 7 ($N = 5$, $P < 0,05$). O teste

estatístico adotado para avaliação do nível de significância foi ANOVA de uma via seguida do pós-teste Holm-Sidak.

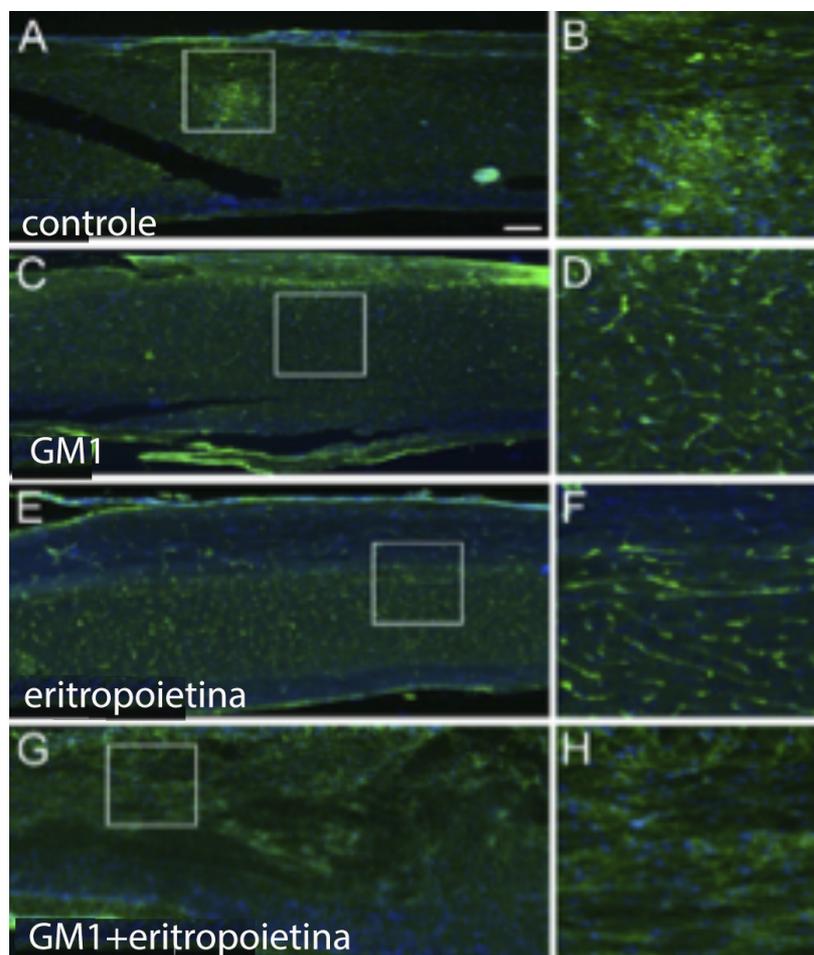


Figura 5 - Imunofluorescência de proteína básica da mielina (MBP, verde) contracorado com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, azul) em secções longitudinais da medula espinhal de camundongos submetidos à lesão medular por contusão. A) Microfotografia da medula espinhal de animal do grupo controle (SF) marcada com MBP; B) Zoom digital da área selecionada de A; C) Microfotografia da medula espinhal de animal com lesão medular e tratado com GM1; D) Zoom digital da área selecionada de C; E) Microfotografia da medula espinhal de animal com lesão medular e tratado com eritropoietina; F) Zoom digital da área selecionada de E; G) Microfotografia da medula espinhal de animal com lesão medular e tratado com GM1 + eritropoietina; H) Zoom digital da área selecionada de G

A figura 6 sugere menos axônios mielinizados nos grupos controle (SF) e GM1+eritropoietina e mais axônios no grupo eritropoietina.

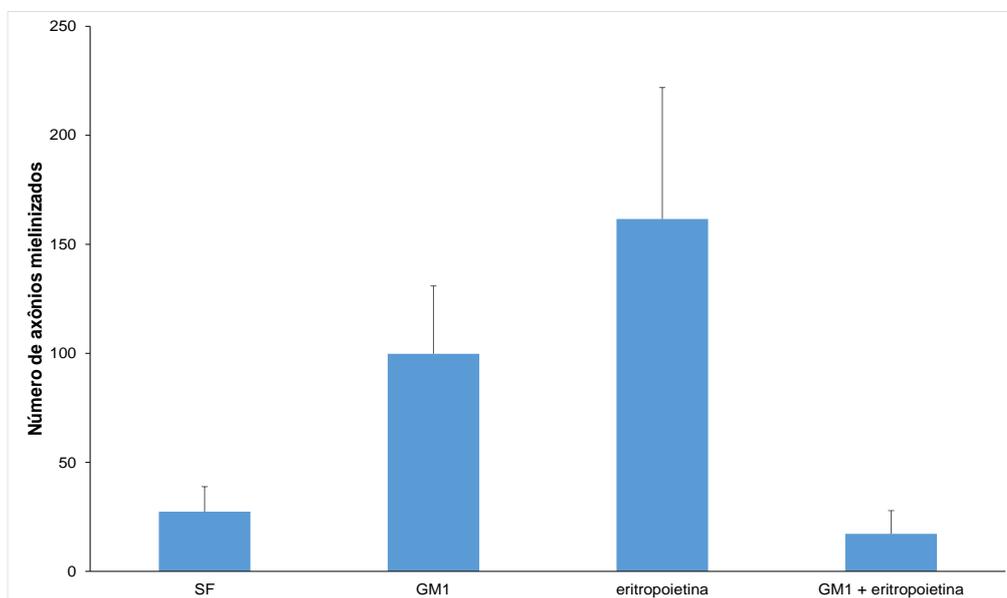


Figura 6 - Valores médios e respectivos erros padrões do número de axônios segundo grupos

Pela figura 7, parece que a soma dos comprimentos dos axônios mielinizados foi menor no grupo controle (SF) e maior no grupo eritropoietina.

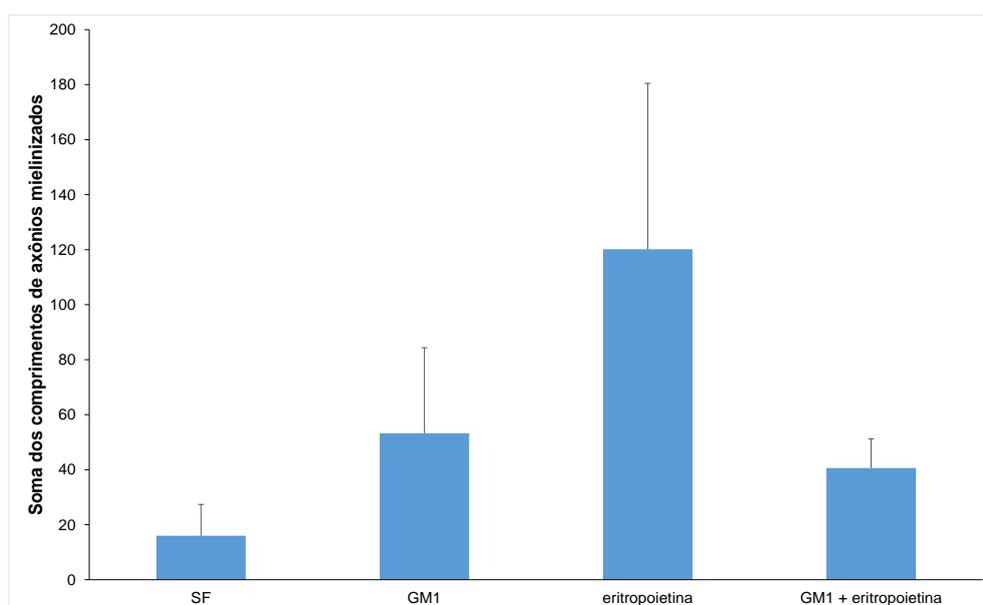


Figura 7 - Valores médios e respectivos erros padrões da soma dos comprimentos dos axônios segundo grupos

A Tabela 5 mostra que, tanto o número de axônios mielinizados como a soma dos comprimentos dos axônios mielinizados, apresentaram em média diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,001$ e $p = 0,024$ respectivamente).

Tabela 5 - Descrição dos parâmetros da imuno-histoquímica segundo grupos e resultado dos testes comparativos

Variável	SF (N = 8)	GM1 (N = 8)	eritropoietina (N = 8)	GM1 + eritropoietina (N = 8)	p
Número de axônios mielinizados					<0,001
média ± DP	27,4 ± 25,5	99,8 ± 69,6	161,6 ± 134,8	17,2 ± 23,8	
mediana (mín.; máx.)	21 (2; 59)	110 (31; 205)	123 (19; 330)	9 (1; 59)	
Soma dos comprimentos dos axônios mielinizados					0,024*
média ± DP	16 ± 12,6	53,2 ± 14,6	120,1 ± 76,9	40,6 ± 60,2	
mediana (mín.; máx.)	14,2 (3,8; 30,9)	52,6 (30,1; 67)	157,8 (8,4; 184,2)	11,7 (1; 143,1)	

MLG com distribuição Poisson e função de ligação identidade; * MLG com distribuição normal e função de ligação logarítmica

A Tabela 6 mostra que o número médio de axônios mielinizados diferiu estatisticamente entre todos os grupos ($p < 0,05$), sendo maior no grupo eritropoietina e menor no grupo GM1 + eritropoietina. Já a soma dos comprimentos dos axônios mielinizados foi maior no grupo eritropoietina em comparação ao grupo controle (SF) ($p = 0,001$) e em comparação ao grupo GM1 + eritropoietina ($p = 0,028$) apenas.

Tabela 6 - Comparações múltiplas dos parâmetros da imuno-histoquímica entre os grupos

Variável	Comparação		Diferença média	Erro Padrão	gl	p	IC (95%)	
							Inferior	Superior
Número de axônios mielinizados	SF vs	GM1	-72,4	5,0	1	<0,001	-85,7	-59,1
	SF vs	eritropoietina	-134,2	6,1	1	<0,001	-150,4	-118,0
	SF vs	GM1 + eritropoietina	10,2	3,0	1	0,004	2,3	18,1
	GM1 vs	eritropoietina	-61,8	7,2	1	<0,001	-80,9	-42,7
	GM1 vs	GM1 + eritropoietina	82,6	4,8	1	<0,001	69,8	95,4
	eritropoietina vs	GM1 + eritropoietina	144,4	6,0	1	<0,001	128,6	160,2
Soma do comprimento dos axônios mielinizados	SF vs	GM1	-37,3	28,1	1	>0,999	-111,5	37,0
	SF vs	eritropoietina	-104,2	28,1	1	0,001	-178,4	-29,9
	SF vs	GM1 + eritropoietina	-24,6	28,1	1	>0,999	-98,9	49,6
	GM1 vs	eritropoietina	-66,9	28,1	1	0,105	-141,2	7,3
	GM1 vs	GM1 + eritropoietina	12,7	28,1	1	>0,999	-61,6	86,9
	eritropoietina vs	GM1 + eritropoietina	79,6	28,1	1	0,028	5,3	153,8

Comparações múltiplas de Bonferroni

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O paciente vítima de trauma raquimedular, desde o primórdio da medicina moderna, sempre foi considerado um paciente de difícil manejo e, por décadas, essa condição manteve-se com taxas de mortalidade elevadas já nas primeiras semanas e meses que se seguiam à lesão. Somente na segunda metade do século XX teve início um movimento para organização de centros especializados multidisciplinares exclusivamente dedicados ao tratamento desses pacientes. Essa iniciativa levou a uma queda na mortalidade e abriu caminho para um melhor entendimento das necessidades especiais exigidas no tratamento desse tipo de lesão.

Inicialmente, os avanços no tratamento concentraram-se na estabilização da coluna vertebral, reabilitação e prevenção de complicações clínicas associadas. Por outro lado, houve parca evolução no tratamento farmacológico direcionado à recuperação e regeneração neuronal. Acreditou-se, por décadas, na incapacidade de recuperação do neurônio motor superior. Hoje, entretanto, sabemos que apesar de limitada, a regeneração axonal é possível e grande esforço tem sido direcionado a se encontrar uma droga que promova a recuperação neuronal.

Nas últimas décadas, estudos experimentais têm se debruçado sobre a pesquisa de drogas potencialmente capazes de diminuir a lesão secundária e que promovam a regeneração axonal através do sítio de lesão medular.

Em função da alta complexidade metabólica envolvida nos mecanismos moleculares associados à lesão medular secundária, a combinação de múltiplas

frentes de tratamentos, considerando-se cada via metabólica de forma independente, podem trazer resultado mais promissores. A combinação de fármacos, cada qual atuando em vias específicas de forma separada ou combinada, pode levar a melhores resultados funcionais como sugerem algumas publicações¹³². O presente estudo, seguindo essa linha de tratamento, buscou avaliar a ação isolada e combinada do G(M1) e eritropoietina em camundongos.

Acredita-se que o mecanismo de ação do G(M1) promova uma redução do edema neuronal pelo aumento da atividade de bombas iônicas, reequilibrando dessa forma a homeostase celular¹²⁷ e, principalmente, aumentando fatores protetores neurotróficos endógenos. Já a eritropoietina promove um bloqueio de apoptose, modulação da cascata inflamatória, proteção e otimização do reparo microvascular e a regeneração neuronal^{25,26}.

A eritropoietina tem sido bastante estudada nos últimos anos; além da ação já conhecida sobre a medula óssea, ela também apresenta ação sobre células-tronco neurais promovendo diferenciação celular e proliferação de oligodendrócitos¹³³. Efeitos neurotróficos importantes como a estimulação da regeneração axonal e brotamentos dendríticos também são atribuídos a ela.

Em estudos pré-clínicos, a administração de EPO e seus derivados melhorou significativamente o resultado funcional após lesão do SNC ou da medula espinhal^{134,135}.

Inúmeras publicações mostram que diante de uma lesão do sistema nervoso central em animais, a EPO apresenta ação anti-apoptótica que se assemelha a ação que já apresenta sobre a medula óssea. Ela promove atenuação dos processos inflamatórios após lesão neurológica, reduzindo citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral¹³⁶.

Uma outra forma de ação pouco compreendida da eritropoietina é a promoção da produção de moléculas protetoras, como o fator neurotrófico derivado do cérebro.

Em nosso laboratório está padronizado o modelo experimental consagrado pelo MASCIS⁷³ e, nos últimos anos quase que de forma exclusiva, utilizamos o rato Wistar em nossos experimentos, levando a inúmeras publicações nacionais e internacionais.

Recentemente foi padronizado no LETRAN o modelo de lesão medular em camundongos³⁹, inaugurando uma nova linha de pesquisa em nosso laboratório utilizando essa cobaia. Em razão dela conferir maior facilidade em seu manuseio e possuir menor custo operacional⁴⁸, permitindo tanto a expansão na quantidade de trabalhos experimentais em animais, quanto o teste de novos fármacos para tratamento do trauma raquimedular e também, eventualmente, o teste de drogas potencialmente promissoras para ensaios clínicos. Essas vantagens, levaram-nos a optar pela utilização dessa cobaia e desse modelo de lesão medular em nosso trabalho.

A decisão do número de animais utilizados na execução do trabalho baseou-se na padronização definida pelo MASCIS e em publicações resultantes de experimentos realizados no LETRAN e em outras instituições que também adotaram modelos experimentais equivalentes^{39,132}.

O desfecho primário considerado foi funcional, uma vez que se mostra mais adequado para avaliação da ação de fármacos do que outros parâmetros como a análise bioquímica ou microscópica de tecidos. Por sua vez, o estudo imunohistoquímico foi considerado um desfecho secundário.

As escalas funcionais escolhidas BMS e MFS são específicas para aplicação em camundongos, e amplamente utilizadas nesse tipo de experimento, apresentando excelente concordância inter e intraobservador^{114,120}.

A utilização de camundongos em nosso laboratório é recente. A nossa experiência na aplicação das duas escalas mais utilizadas na literatura atual para avaliação funcional motora de camundongos, a BMS e a MFS, ainda não atingiu o mesmo nível da que temos na já bastante utilizada BBB. Por esse motivo e por não termos ainda uma escala preferencial optou-se pela utilização concomitante de ambas as escalas de avaliação nesse estudo. Ressaltamos que a comparação formal de escalas não era o objetivo do presente estudo, de modo que não foi realizada.

As escalas foram aplicadas nos mesmos momentos e de forma separada sem qualquer interferência de uma sobre a outra. Os resultados também foram analisados e apresentados de forma separada entre as duas escalas, e se revelaram equivalentes, independentemente de qual delas foi utilizada.

Ambas as escalas foram de fácil aplicação. Para publicações futuras, pode-se considerar a aplicação de apenas uma das duas escalas, aquela que o pesquisador estiver mais familiarizado e julgar que ofereça maior conforto em sua utilização, uma vez que ambas são concordantes em termos de resultados³⁹.

As avaliações obrigatoriamente foram cegas para diminuir a influência dos examinadores sobre a pontuação funcional dos animais.

O G(M1) já foi testado em nosso laboratório de forma isolada e em combinação com outros fármacos. Recentemente demonstramos um efeito sinérgico entre G(M1) e eritropoietina em ratos Wistar¹³².

Porém, Diferentemente do resultado do estudo com ratos Wistar, não encontramos um sinergismo entre G(M1) e eritropoietina promovendo melhor recuperação neurológica em camundongos Balb C¹³².

Em nosso estudo, os achados sugerem que há uma ação parcialmente inibitória da eritropoietina sobre o G(M1). A avaliação funcional, feita tanto pela escala BMS quanto pela MFS, mostrou que no grupo em que foi aplicada uma combinação dessas duas drogas, houve uma pior avaliação funcional quando comparado ao grupo em que o G(M1) foi aplicado isoladamente. Por sua vez, o grupo G(M1) associado à eritropoietina teve um melhor desempenho quando comparado ao grupo em que foi aplicada eritropoietina isoladamente. Essa diferença foi estatisticamente significativa a partir da quarta semana de avaliação. Esses achados levantam a hipótese de que as combinações dessas drogas apresentem um efeito inibitório da regeneração neuronal quando testadas em camundongos. Possivelmente a eritropoietina apresente uma ação antagônica ao G(M1) na promoção da regeneração axonal através do local onde se provocou a lesão medular.

As combinações dessas duas drogas têm um efeito sobre a regeneração neuronal que difere entre espécies distintas de mamíferos, o que pode dificultar, de alguma forma, a transposição de um estudo experimental em animais para um estudo clínico em humanos. Dados da literatura já mostram que há uma resposta diferente entre ratos e camundongos tanto do ponto de vista funcional quanto do ponto de vista histológico de reparação tecidual, microambiente metabólico, vascular e celular na área regenerativa após lesão¹²¹.

O achado mais importante em ratos foi a cavitação e formação cística intramedular no local da lesão, já em camundongos o aspecto histológico mais

marcante foi a presença de fibrose massiva, intensa celularidade no local da lesão e ausência de cavitação. Essa diferença de resposta ao trauma, entre espécies distintas de cobaias, pode explicar, em parte, a diferença encontrada em nosso estudo com camundongos daqueles estudos com ratos Wistar. Na fase preliminar de preparação desse trabalho, havia uma expectativa de que o estudo em camundongos provavelmente confirmaria os dados encontrados em estudos com desenhos semelhantes que utilizaram ratos e testaram G(M1) e eritropoietina nesse contexto de trauma medular no qual foi identificado um sinergismo entre esses medicamentos¹²¹.

Pouco se conhece sobre as interações moleculares e vias metabólicas de ação de ambos os medicamentos. O G(M1) sendo uma molécula anfifílica presente na membrana celular neuronal apresenta forte interação de sua porção hidrofílica com inúmeros receptores e proteínas de membrana, promovendo sua regulação e ativação. Estudos apontam para mais de 300 moléculas que tem suas funções reguladas por ação direta do G(M1)¹³⁷. As mais importantes são a tirosina-quinase A, fator neurotrófico derivado de célula glial, fator neurotrófico derivado do cérebro, fator de crescimento de nervo, integrina e outros. Já a eritropoietina tem sua ação celular promovida principalmente por ativação de receptores de membrana específicos da eritropoietina e seus mecanismos de ação mais conhecidos seguem majoritariamente três vias metabólicas de sinalização intra-celular, a via Janus tirosina-quinase 2 (JAK-2), a proteína-quinase B (AKP) e a via fosfatidil-inositol-quinase 3 (PI3K). Até o presente momento não foi identificado em que parte dessas complexas vias metabólicas podem ocorrer interações entre o G(M1) e eritropoietina de forma que este último provoque uma ação que antagonize, mesmo que de forma parcial, a ação do

primeiro em camundongos. Dados provenientes de estudos sobre a estrutura molecular dos tipos de G(M1) em humanos e outros mamíferos mostram que há uma estabilidade e bastante similaridade dessa estrutura entre espécies, porém, foi identificada somente em humanos, uma deleção no gene que codifica parte da estrutura molecular o G(M1) conferindo propriedades químicas ligeiramente distintas com relação a sua afinidade por outras moléculas presentes na membrana celular. Dessa forma, apesar de ainda não identificada, pode haver diferenças estruturais moleculares e metabólicas entre ratos e camundongos que expliquem a diferença funcional encontrada nesse trabalho. No futuro, com o avanço e melhor compreensão das vias de sinalização celular envolvidas na preservação e reparação de tecido neural, será possível levantar hipóteses para melhor explicar esses achados.

Na análise de imuno-histoquímica o grupo que recebeu eritropoietina apresentou maior número de axônios mielinizados, como também maior comprimento total da somatória das fibras nervosas na área da lesão. Estes achados foram estatisticamente significantes. A razão do grupo eritropoietina apresentar maior regeneração axonal ao estudo de imuno-histoquímica ao mesmo tempo em que apresenta o pior desempenho funcional nas escalas BMS e MFS quando comparado aos grupos onde se utilizou G(M1), pode estar relacionado a fatores ainda desconhecidos e ao processo de cicatrização da lesão medular em camundongos, em que há predomínio de fibrose e presença de fibroblastos e miofibroblastos no epicentro da lesão medular. Apesar de a eritropoietina promover um aumento de axônios e fibras nervosas nessa região ela não foi capaz de promover uma condução do estímulo nervoso de forma eficaz que conseguisse transpor essa área de fibrose tecidual. No que diz

respeito aos achados encontrados na imuno-histoquímica, outras hipóteses plausíveis podem ser levantadas.

Há evidências na literatura de que a eritropoietina estimula a regeneração axonal, porém, ainda não está confirmado que ela promove estímulo à formação de novas sinapses¹³⁵. Além disso, um brilhante artigo publicado por **Inman e Steward**¹³⁸ em 2003 mostrou, quando do estudo da regeneração axonal em medulas lesadas de camundongos, através de traçadores celulares imuno-histoquímicos, que os axônios regenerados identificados na análise imuno-histoquímica correspondiam a apenas àqueles provenientes de tratos ascendentes sensitivos. Axônios provenientes de tratos descendentes como córtico-espinhais, por exemplo, não conseguiam regenerar e penetrar a área de lesão medular. Seria prudente supor que a regeneração axonal vista na imuno-histoquímica em nosso trabalho trate-se de fibras ascendentes sensitivas e, portanto, não seria esperado necessariamente uma concordância entre os resultados funcionais e imuno-histoquímicos. Uma maior proliferação e regeneração de axônios sensitivos não resultaria em um melhor desempenho nas escalas BMS e MFS que se apoiam em parâmetros motores de avaliação.

O G(M1) atua principalmente promovendo a homeostase celular e fatores endógenos neuroprotetores. Como houve um melhor desempenho funcional no Grupo G(M1) quando comparado ao grupo G(M1) associado à eritropoietina e, por sua vez, como esse segundo grupo teve um resultado melhor quando confrontado ao grupo da eritropoietina isolada, esse achado pode estar relacionado a uma maior eficiência do G(M1) em aumentar sinapses e preservar fibras nervosas na área de penumbra da lesão, por meio da manutenção e promoção da homeostase celular, evitando dessa forma, a apoptose celular e

não necessariamente a promoção e regeneração de fibras através da área de contusão.

Parte importante do processo de evolução científica é trazer, frequentemente, mais perguntas do que respostas. Nesse trabalho foi possível identificar uma ação promotora de regeneração neuronal tanto do G(M1) e da eritropoietina que levou a uma melhora funcional em camundongos.

Outra informação obtida, igualmente importante, foi o comportamento diferente dessas drogas quando aplicadas em diferentes espécies. Fato de suma importância quando se pretende testar em ensaios clínicos com humanos drogas que foram promissoras em estudos experimentais. Estudos de trauma medular realizados em camundongos apresentam algumas limitações quando comparados aqueles em que se utilizam ratos. A principal limitação está justamente nos mecanismos de reparação tecidual, já citado anteriormente nesse texto. Diferentemente do que vemos em camundongos as características histológicas de reparação tecidual verificadas em ratos se aproxima bastante daquela vista em humanos e por esse motivo seria em tese um animal mais adequado para esses estudos. Porém, o camundongo apresenta enorme variedade de linhagens isogênicas com mutações específicas que podem ser muito interessantes nesse contexto de trauma medular. Por exemplo, ao se utilizar uma linhagem de camundongos com mutação específica que leva a disfunção de determinada proteína envolvida na cascata metabólica de regeneração celular podemos aumentar a compreensão dessas vias e chegar às respostas das questões levantadas nesse e em outros trabalhos. Principalmente no que diz respeito aos mecanismos moleculares de ação das drogas a serem testadas.

Esse trabalho ao utilizar camundongo como animal de experimentação abre novas possibilidades de linhas de pesquisas na área de trauma medular e vem complementar aquilo que já vem sendo feito há anos em nosso laboratório com os ratos, principalmente o Wistar.

A existência de uma enorme variedade de linhagens de camundongos modificados geneticamente, somada a padronização dessa técnica em nosso laboratório, vai nos permitir confeccionar estudos com metodologias e desenhos especificamente voltados a responder questões complexas relacionadas às vias metabólicas de lesão e reparação tecidual além dos ensaios experimentais voltados para identificação de drogas capazes de promover o reparo tecidual.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que tanto o G(M1) como a eritropoietina apresentam ação terapêutica promovendo recuperação da função motora em camundongos Balb C submetidos à lesão medular experimental.

O G(M1) levou a um melhor desempenho funcional dos camundongos quando utilizado de forma isolada.

O grupo submetido à terapia combinada teve um desempenho funcional inferior ao grupo G(M1) isolado e superior ao grupo eritropoietina isolada.

Todos os grupos que receberam G(M1) e eritropoietina combinados, ou de forma isolada, apresentaram desempenho funcional superior ao grupo controle que recebeu soro fisiológico.

A análise imuno-histoquímica das medulas extraídas dos camundongos ao fim do estudo, enviadas para análise microscópica, mostrou um processo de regeneração axonal mais exuberante no grupo eritropoietina quando comparado aos demais grupos.

O grupo eritropoietina apresentou melhor desempenho tanto em número de axônios regenerados quanto na somatória dos comprimentos das fibras.

7. ANEXOS

7 ANEXOS

ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Amalido, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Estudo experimental com avaliação funcional, eletrofisiológica, histológica e imunohistoquímica do efeito do monogangliósídeo G(M1) e da eritropoetina na lesão medular contusa em camundongos Balb C”, registrada como nº 072/16, sob a responsabilidade de Alexandre Fogaça Cristante e Alessandro Gonzalez Torelli, apresentado pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 07.12.2016

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 06-06-2016 Término: 18-12-2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/C
Nº de animais	40
Peso/Idade	10 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério da FMUSP

CEUA-FMUSP, 07 de Dezembro de 2016

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

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

ANEXO B – Planilha para preenchimento da escala BMS

Camundongo: XX. Grupo: XX. Data: / /

BMS Scale	Score	Esquerdo	Direito	Média
Ausência de movimentos	0			
Tornozelo com movimento discreto	1			
Tornozelo com movimentos amplos	2			
Movimento óbvio dos membros posteriores	3			
Pisada dorsal	3			
Apoio pata	3			
Apoio pata plantar com peso	4			
Frequente e consistente passada plantar	5			
Menor que 50% de membro anterior e posterior coordenados e paralelos no contato inicial	5			
Menor que 50% de membro anterior e posterior coordenados com contato inicial e patas paralelas	6			
maior que 50% de membro anterior e posterior coordenados e patas rodadas	6			
maior que 50% de membro anterior e posterior coordenados e paralelos no contato inicial	7			
Patas paralelas e tronco estável	7			
Tronco estável e cauda 50% cima/50% baixo	8			
Moderada instabilidade de tronco	8			
Estabilidade normal e cauda sempre para cima	9			

ANEXO C – Planilha para preenchimento da escala MFS

Camundongo: XX.

Grupo: XX.

Data: / /

MFS	Score	Esquerdo	Direito	Média
Ausência de movimentos	0			
Movimentos ocasionais	1			
Óbvio movimento em 1 membro posterior	2			
Óbvio movimento em 2 membros posteriores	3			
Passada de 1 membro posterior	4			
Impulso com 2 membros posteriores	5			
Apoia o peso e não deambula	6			
Deambulação com patas rodadas	7			
Deambulação normal em baixa velocidade	8			
Barra 2 cm	9			
Barra 1,5 cm	10			
Barra 1 cm	11			
Barra 0,7 cm	12			
Barra 0,5 cm	13			

ANEXO D – Ficha Janus do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
FICHA DO ALUNO

5140 - 3510561/1 - Alessandro Gonzalez Torelli

Email: alessandro.torelli@usp.br
Data de Nascimento: 29/06/1976
Cédula de Identidade: RG - 27.656.244-6 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Médico - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2006

Curso: Doutorado Direto
Programa: Ciências do Sistema Musculoesquelético
Data da Matrícula: 30/11/2016
Início da Contagem de Prazo: 30/11/2016
Data Limite para o Depósito: 25/11/2021
Orientador: Prof(a). Dr(a). Tarcisio Eloy Pessoa de Barros Filho - 30/11/2016 até o presente. Email: petbarros@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, 30/11/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 09/01/2019
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 30/11/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021
Impresso em: 06/10/2021 09:38:56

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
FICHA DO ALUNO

5140 - 3510561/1 - Alessandro Gonzalez Torelli

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MPT5795-2/1	Bases Éticas, Metodológicas e Gerenciais em Pesquisa	03/03/2017	15/06/2017	225	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
MPRS738-4/1	Gestão de Serviços de Saúde	06/03/2017	14/05/2017	150	10	85	A	N	Concluída
MOT5742-1/6	Aplicação da Metodologia Científica na Pesquisa do Aparelho Locomotor	10/03/2017	22/06/2017	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MPT5740-5/4	Telemedicina	07/04/2017	01/06/2017	120	8	80	B	N	Concluída
MPRS765-1/4	Políticas e Sistemas de Saúde	11/04/2017	05/06/2017	120	8	87	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	15	24	26
Estágios:			
Total:	15	24	26

Créditos Atribuídos à Tese: 176

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021
Impresso em: 06/10/2021 09:38:56

8. REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord*. 2006;44(9):523-9.
2. Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, Wing PC. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord*. 2014;52(2):110-6.
3. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*. 2001;26(24 Suppl):S2-12.
4. Lidal IB, Huynh TK, Biering-Sorensen F. Return to work following spinal cord injury: a review. *Disabil Rehabil*. 2007;29(17):1341-75.
5. Hagen EM, Lie SA, Rekand T, Gilhus NE, Gronning M. Mortality after traumatic spinal cord injury: 50 years of follow-up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(4):368-73.
6. Masini M. Estimativa da incidência e prevalência de lesão medular no Brasil. *J Bras Neurocirurg*. 2001;12(2):97-100.
7. 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.
8. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2000;17(10):915-25.

9. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999;49(6):377-91.
10. Sharma H, Olsson Y, Nyberg F, Dey PK. Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability, blood flow, edema and serotonin levels following spinal cord injury: an experimental study in the rat. *Neuroscience.* 1993;57(2):443-9.
11. Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2006;23(3-4):264-80.
12. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery.* 1999;44(5):1027-39.
13. 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.
14. 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.
15. Schroeter M, Jander S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. *Neuromolecular Med.* 2005;7(3):183-95.
16. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings MG, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. 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.
17. Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg.* 2000;93(1 Suppl):1-7.
 18. Short D. Is the role of steroids in acute spinal cord injury now resolved? *Curr Opin Neurol.* 2001;14(6):759-63.
 19. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon JC, Marshall LF. 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.
 20. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. 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. *JAMA.* 1997;277(20):1597-604.
 21. Samantaray S, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. Physiological low dose of estrogen-protected neurons in experimental spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1199:86-9.
 22. Samantaray S, Sribnick EA, Das A, Thakore NP, Matzelle D, Yu SP, Ray SK, Wei L, Banik NL. Neuroprotective efficacy of estrogen in experimental spinal cord injury in rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1199:90-4.

23. McDowell ML, Das A, Smith JA, Varma AK, Ray SK, Banik NL. Neuroprotective effects of genistein in VSC4. 1 motoneurons exposed to activated microglial cytokines. *Neurochem Int.* 2011;59(2):175-84.
24. Matis GK, Birbilis TA. Erythropoietin in spinal cord injury. *Eur Spine J.* 2009;18(3):314-23.
25. Fang XQ, Fang M, Fan SW, Gu CL. Protection of erythropoietin on experimental spinal cord injury by reducing the expression of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta. *Chin Med J (Engl).* 2009;122(14):1631-5.
26. Sosa I, Reyes O, Kuffler D. Immunosuppressants: neuroprotection and promoting neurological recovery following peripheral nerve and spinal cord lesions. *Exp Neurol.* 2005;195(1):7-15.
27. Walker JB, Harris M. GM-1 ganglioside administration combined with physical therapy restores ambulation in humans with chronic spinal cord injury. *Neurosci Lett.* 1993;161(2):174-8.
28. Coulson-Thomas VJ, Lauer ME, Soleman S, Zhao C, Hascall VC, Day AJ, Fawcett JW. Tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) is constitutively expressed in adult central nervous system (CNS) and associated with astrocyte-mediated glial scar formation following spinal cord injury. *J Biol Chem.* 2016;291(38):19939-52.
29. Gebrin AS, Cunha AS, Da-Silva CF, Barros Filho TE, Azze RJ. Perspectivas de recuperação do lesado medular. *Rev Bras Ortop.* 1997;32(2):103-8.
30. Cuello AC, Garofalo L, Kenigsberg R, Maysinger D. Gangliosides potentiate in vivo and in vitro effects of nerve growth factor on central cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(6):2056-60.

31. Cohrs G, Goerden S, Lucius R, Synowitz M, Mehdorn HM, Held-Feindt J, Knerlich-Lukoschus F. Spatial and cellular expression patterns of erythropoietin-receptor and erythropoietin during a 42-day post-lesional time course after graded thoracic spinal cord impact lesions in the rat. *J Neurotrauma*. 2018;35(3):593-607.
32. Ozkunt O, Sariyilmaz K, Gemalmaz HC, Gurgen SG, Yener U, Dikici F. Investigation of efficacy of treatment in spinal cord injury: Erythropoietin versus methylprednisolone. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2017;25(3):2309499017739481.
33. Zhao L, Jing Y, Qu L, Meng X, Cao Y, Tan H. Expression of adrenomedullin in rats after spinal cord injury and intervention effect of recombinant human erythropoietin. *Exp Ther Med*. 2016;12(6):3680-4.
34. Hong Z, Hong H, Chen H, Wang Z, Hong D. Protective effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury by reducing the C/EBP-homologous protein expression. *Neurol Res*. 2012;34(1):85-90.
35. Butovsky O, Bukshpan S, Kunis G, Jung S, Schwartz M. Microglia can be induced by IFN- γ or IL-4 to express neural or dendritic-like markers. *Mol Cell Neurosci*. 2007;35(3):490-500.
36. Sekiguchi Y, Kikuchi S, Myers RR, Campana WM. ISSLS prize winner: erythropoietin inhibits spinal neuronal apoptosis and pain following nerve root crush. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28(23):2577-84.
37. Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. *Exp Neurol*. 1992;116(1):40-51.

38. de la Torre JC. Spinal cord injury models. *Prog Neurobiol*. 1984;22(4):289-344.
39. Borges PA, Cristante AF, Barros-Filho TEP, Natalino RJM, Santos GBD, Marcon RM. Standardization of a spinal cord lesion model and neurologic evaluation using mice. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73:e293.
40. Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol*. 2007;9(9):993-9.
41. Kuhn PL, Wrathall JR. A mouse model of graded contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1998;15(2):125-40.
42. Joshi M, Fehlings MG. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J Neurotrauma*. 2002;19(2):175-90.
43. Seki T, Hida K, Tada M, Koyanagi I, Iwasaki Y. Role of the bcl-2 gene after contusive spinal cord injury in mice. *Neurosurgery*. 2003;53(1):192-8.
44. Kouyoumdjian P, Lonjon N, Prieto M, Haton H, Privat A, Asencio G, Perrin FE, Gaviria M. A remotely controlled model of spinal cord compression injury in mice: toward real-time analysis. *J Neurosurg Spine*. 2009;11(4):461-70.
45. Pitzer C, Klussmann S, Krüger C, Letellier E, Plaas C, Dittgen T, Kirsch F, Stieltjes B, Weber D, Laage R, Martin-Villalba A, Schneider A. The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury. *J Neurochem*. 2010;113(4):930-42.

46. Kubota K, Saiwai H, Kumamaru H, Maeda T, Ohkawa Y, Aratani Y, Nagano T, Iwamoto Y, Okada S. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(16):1363-9.
47. Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, Iwakura Y, Atsumi T, Shioda S. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2012;9:65.
48. Bryda EC. The mighty mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med*. 2013;110(3):207-11.
49. Yeo JD. A review of experimental research in spinal cord injury. *Paraplegia*. 1976;14(1):1-11.
50. Dohrmann GJ. Experimental spinal cord trauma: a historical review. *Arch Neurol*. 1972;27(6):468-73.
51. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. *JAMA*. 1911;57(11):878-80.
52. Allen AR. Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact: an experimental study. *J Nerv Ment Dis*. 1914; 41(3):141–7.
53. Ayer JB. Cerebrospinal fluid in experimental compression of the spinal cord. *Arch NeurPsych*. 1919;2(2):158-64.
54. McVeigh JF. Experimental cord crushes: With especial reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the cord affected. *Arch Surg*. 1923;7(3):573-600.

55. 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.
56. Tarlov IM, Klinger H. Spinal cord compression studies. II. Time limits for recovery after acute compression in dogs. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1954;71(3):271-90.
57. Woodard JS, Freeman LW. Ischemia of the spinal cord; an experimental study. *J Neurosurg*. 1956;13(1):63-72.
58. Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg*. 1971;35(6):700-8.
59. Fairholm DJ, Turnbull IM. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries. *J Neurosurg*. 1971;35(3):277-86.
60. Dohrmann GJ, Panjabi MM, Wagner FC, Jr. An apparatus for quantitating experimental spinal cord trauma. *Surg Neurol*. 1976;5(5):315-8.
61. Dohrmann GJ, Panjabi MM. "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. *Surg Neurol*. 1976;6(5):263-7.
62. Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg*. 1977;47(4):577-81.
63. 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.
64. de la Torre JC. Spinal cord injury: review of basic and applied research. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1981;6(4):315-35.

-
65. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol.* 1985;88(1):123-34.
 66. Noble LJ, Wrathall JR. An inexpensive apparatus for producing graded spinal cord contusive injury in the rat. *Exp Neurol.* 1987;95(2):530-3.
 67. Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma.* 1992;9(3):197-217.
 68. Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma.* 1992;9(2):123-6.
 69. 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.
 70. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, Holford TR, Hsu CY, Noble LJ, Nockels R, Perot PL, Salzman SK, Young W. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma.* 1996;13(7):343-59.
 71. Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Padronização da lesão de medula espinal em ratos Wistar. *Acta Ortop Bras.* 2010; 18(4):182-6.
 72. Metz GA, Curt A, van de Meent H, Klusman I, Schwab ME, Dietz V. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2000;17(1):1-17.

73. Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza Fld, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(2):87-91.
74. Yeo JD, Payne W, Hinwood B, Kidman AD. The experimental contusion injury of the spinal cord in sheep. *Paraplegia.* 1975;12(4):279-98.
75. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. II. Ultrastructure of axons and myelin. *Lab Invest.* 1978;39(3):254-66.
76. Rivlin AS, Tator CH. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *J Neurosurg.* 1978;49(6):844-53.
77. Ducker TB, Salcman M, Lucas JT, Garrison WB, Perot PL, Jr. Experimental spinal cord trauma, II: Blood flow, tissue oxygen, evoked potentials in both paretic and plegic monkeys. *Surg Neurol.* 1978;10(1):64-70.
78. 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.
79. Lohse DC, Senter HJ, Kauer JS, Wohns R. Spinal cord blood flow in experimental transient traumatic paraplegia. *J Neurosurg.* 1980;52(3):335-45.
80. Albin MS, White RJ. Epidemiology, physiopathology, and experimental therapeutics of acute spinal cord injury. *Crit Care Clin.* 1987;3(3):441-52.
81. Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1969;30(6):693-7.
82. Hansebout RR, Kuchner EF, Romero-Sierra C. Effects of local hypothermia and of steroids upon recovery from experimental spinal cord compression injury. *Surg Neurol.* 1975;4(6):531-6.

-
83. De La Torre JC, Johnson CM, Goode DJ, Mullan S. Pharmacologic treatment and evaluation of permanent experimental spinal cord trauma. *Neurology*. 1975;25(6):508-14.
 84. Kuchner EF, Hansebout RR. Combined steroid and hypothermia treatment of experimental spinal cord injury. *Surg Neurol*. 1976;6(6):371-6.
 85. Yeo JD, Stabback S, McKenzie B. Central necrosis following contusion to the sheep's spinal cord. *Paraplegia*. 1977;14(4):276-85.
 86. 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.
 87. Young W, Flamm ES. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg*. 1982;57(5):667-73.
 88. Braughler JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg*. 1983;59(2):256-61.
 89. Hall ED. Importance of pharmacologic considerations in the evaluation of new treatments for acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1992;9(2):173-5.
 90. Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat. *Yonsei Med J*. 1999;40(4):313-20.
 91. Marcon RM, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Cristante AF, Taricco MA, Colares G, Barbarini AF, Teixeira WGJ, Souza FI. Estudo experimental da

-
- ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar. *Acta Ortop Bras.* 2010; 18(1):26-30.
92. 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.
93. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Johno M. Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J Neurotrauma.* 2001;18(5):533-43.
94. Souza FI, Barros Filho TEP, Cristante AF. Avaliação do emprego do GM1 após lesão medular experimental em ratos. *Coluna/Columna.* 2011; 10(4): 305-8.
95. Nockels R, Young W. Pharmacologic strategies in the treatment of experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 1992;9(suppl 1):S211-7.
96. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* 1996;76(2):319-70.
97. Gebrin AS, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TEP, Azze RJ. Perspectivas de recuperação do lesado medular. *Rev Bras Ortop.* 1997;32(2):103-8.
98. Kao T, Shumsky JS, Jacob-Vadakot S, Himes BT, Murray M, Moxon KA. Role of the 5-HT_{2C} receptor in improving weight-supported stepping in adult rats spinalized as neonates. *Brain Res.* 2006;1112(1):159-68.
99. Gerin CG, Hill A, Hill S, Smith K, Privat A. Serotonin release variations during recovery of motor function after a spinal cord injury in rats. *Synapse.* 2010;64(11):855-61.
100. Hayashi Y, Jacob-Vadakot S, Dugan EA, McBride S, Olexa R, Simansky K, Murray M, Shumsky JS. 5-HT precursor loading, but not 5-HT receptor
-

-
- agonists, increases motor function after spinal cord contusion in adult rats. *Exp Neurol*. 2010;221(1):68-78.
101. Cristante AF, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB. Effects of antidepressant and treadmill gait training on recovery from spinal cord injury in rats. *Spinal Cord*. 2013;51(6):501-7.
102. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1977;252(15):5558-64.
103. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(22):7580-4.
104. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(19):10526-31.
105. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(14):9450-5.
106. Celik M, Gökmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M. 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.
107. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons,

-
- astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(4):386-92.
108. 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.
109. 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.
110. Cerri G, Montagna M, Madaschi L, Merli D, Borroni P, Baldissera F, Gorio A. Erythropoietin effect on sensorimotor recovery after contusive spinal cord injury: an electrophysiological study in rats. *Neuroscience.* 2012;219:290-301.
111. Blight AR. Cellular morphology of chronic spinal cord injury in the cat: analysis of myelinated axons by line-sampling. *Neuroscience.* 1983;10(2):521-43.
112. Noble LJ, Wrathall JR. Correlative analyses of lesion development and functional status after graded spinal cord contusive injuries in the rat. *Exp Neurol.* 1989;103(1):34-40.
113. Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Bleggi-Torres LF. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop.* 1999;34(2):85-9.
114. Farooque M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta Neuropathol.* 2000;100(1):13-22.

115. Isaksson J, Farooque M, Olsson Y. Spinal cord injury in ICAM-1-deficient mice: assessment of functional and histopathological outcome. *J Neurotrauma*. 2000;17(4):333-44.
116. Jakeman LB, Guan Z, Wei P, Ponnappan R, Dzwonczyk R, Popovich PG, Stokes BT. Traumatic spinal cord injury produced by controlled contusion in mouse. *J Neurotrauma*. 2000;17(4):299-319.
117. Sroga JM, Jones TB, Kigerl KA, McGaughy VM, Popovich PG. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J Comp Neurol*. 2003;462(2):223-40.
118. Sheng H, Wang H, Homi HM, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Pearlstein RD, Warner DS. A no-laminectomy spinal cord compression injury model in mice. *J Neurotrauma*. 2004;21(5):595-603.
119. Farooque M, Suo Z, Arnold PM, Wulser MJ, Chou CT, Vancura RW, Fowler S, Festoff BW. Gender-related differences in recovery of locomotor function after spinal cord injury in mice. *Spinal Cord*. 2006;44(3):182-7.
120. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 2006;23(5):635-59.
121. Li Y, Oskouian RJ, Day YJ, Kern JA, Linden J. Optimization of a mouse locomotor rating system to evaluate compression-induced spinal cord injury: correlation of locomotor and morphological injury indices. *J Neurosurg Spine*. 2006;4(2):165-73.

122. Kim JH, Loy DN, Wang Q, Budde MD, Schmidt RE, Trinkaus K, Song SK. Diffusion tensor imaging at 3 hours after traumatic spinal cord injury predicts long-term locomotor recovery. *J Neurotrauma*. 2010;27(3):587-98.
123. Forgione N, Chamankhah M, Fehlings MG. A mouse model of bilateral cervical contusion-compression spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2017;34(6):1227-39.
124. Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajighadery A, Khalatbari MM, Safdarian M, Meknatkhah S, Rezvan M, Chalangari M, Derakhshan P, Rahimi-Movaghar V. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord*. 2017;55(8):714-21.
125. Marques SA, Garcez VF, Del Bel EA, Martinez AM. A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment. *J Neurosci Methods*. 2009;177(1):183-93.
126. Nessler JA, De Leon RD, Sharp K, Kwak E, Minakata K, Reinkensmeyer DJ. Robotic gait analysis of bipedal treadmill stepping by spinal contused rats: characterization of intrinsic recovery and comparison with BBB. *J Neurotrauma*. 2006;23(6):882-96.
127. Brasil. Ministério da Ciência T, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. *Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA*. Brasília (DF): Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações; 2018.
128. Scouten CW, O'Connor R, Cunningham M. Perfusion fixation of research animals. *Microscopy Today*. 2006;14(3):26-33.

129. Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.
130. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied linear statistical models*. 4th ed. Illinois: McGraw-Hill; 1996.
131. McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. 2nd ed. New York: Chapman and Hall; 1989.
132. 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.
133. Jantzie LL, Miller RH, Robinson S. Erythropoietin signaling promotes oligodendrocyte development following prenatal systemic hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Res*. 2013;74(6):658-67.
134. Grasso G, Sfacteria A, Erbayraktar S, Passalacqua M, Meli F, Gokmen N, Yilmaz O, La Torre D, Buemi M, Iacopino DG, Coleman T, Cerami A, Brines M, Tomasello F. Amelioration of spinal cord compressive injury by pharmacological preconditioning with erythropoietin and a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *J Neurosurg Spine*. 2006;4(4):310-8.
135. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*. 2004;305(5681):239-42.

136. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med.* 2003;198(6):971-5.
137. Chiricozzi E, Lunghi G, Di Biase E, Fazzari M, Sonnino S, Mauri L. GM1 ganglioside is a key factor in maintaining the mammalian neuronal functions avoiding neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):868.
138. Inman DM, Steward O. Ascending sensory, but not other long-tract axons, regenerate into the connective tissue matrix that forms at the site of a spinal cord injury in mice. *J Comp Neurol.* 2003;462(4):431-49.