

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**EFEITOS DO DANTROLENE SÓDICO E SUCCINATO DE METILPREDNISOLONA
NA NEUROPROTEÇÃO E MORTE CELULAR, NA MEDULA ESPINHAL DE RATOS
SUBMETIDOS A TRAUMA COMPRESSIVO AGUDO.**

ISABEL RODRIGUES ROSADO

**BELO HORIZONTE – MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2011**

Isabel Rodrigues Rosado

**EFEITOS DO DANTROLENE SÓDICO E SUCCINATO DE METILPREDNISOLONA
NA NEUROPROTEÇÃO E MORTE CELULAR, NA MEDULA ESPINHAL DE RATOS
SUBMETIDOS A TRAUMA COMPRESSIVO AGUDO.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.
Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias
Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária

Dedico este trabalho aos meus pais Sebastião Carlos da Silva Rosado e Ivonilde Rodrigues Rosado.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado essa família maravilhosa.

Aos meus pais Sebastião Carlos da Silva Rosado e Ivonilde Rodrigues Rosado pelo exemplo de amor, honestidade, trabalho, força, coragem e bondade.

Aos meus irmãos Lucas e Sara, por muitos momentos felizes vividos juntos, por toda cumplicidade e amizade.

Ao Endrigo, meu amor, meu amigo e companheiro por todo apoio e paciência nos momentos difíceis, e por participar na execução deste trabalho.

A Eliane Gonçalves de Melo, por ter acreditado em mim e aceitado me orientar. Por despertar em mim a paixão pela neurologia, e pelos ensinamentos na execução do experimento e na redação da dissertação.

As colegas e amigas Fabíola Bono Fukushima e Fátima Caetano Caldeira que tanto me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

As amigas Paula Mayer Costa, Karen de Oliveira Maciel e Carla Osório Silva por participarem de etapas essenciais durante a realização do meu mestrado.

Ao Mário Lavor, Bruno Lapertosa, Bruno Torres, Bernardo Di Caro, e aos alunos de iniciação científica Ana Luisa, Laís e Guilherme, pelo importante auxílio no experimento.

Aos amigos da patologia Jankerle e Júnéo pela grande ajuda com a histopatologia e imunoistoquímica.

As técnicas do Laboratório de Patologia Rose e Eliane, por terem me ajudado e ensinado com o processamento do material.

Aos professores Andréa Pacheco Batista Borges, Milene Alvarenga Rachid, e Rubens Antônio Carneiro por aceitarem participar da banca de dissertação.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Ao Laboratório Cristália e a BD pelos fármacos e materiais cedidos.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 - INTRODUÇÃO	13
2 - REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 - Fisiopatogenia do trauma medular agudo.....	14
2.1.1 - Isquemia.....	14
2.1.2 - Excitotoxicidade.....	14
2.1.3 - Liberação de cálcio pelas reservas intracelulares.....	15
2.1.4 - Necrose e apoptose.....	16
2.1.5 - Estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	17
2.1.6 - Inflamação.....	18
2.2 - Tratamento do trauma medular.....	19
2.2.1 - Modelos experimentais para desenvolvimento e avaliação de terapias.....	19
2.2.2 - Terapias farmacológicas para o tratamento do trauma medular.....	22
2.2.3 - Succinato sódico de metilprednisolona.....	23
2.2.4 - Dantrolene sódico.....	23
3 - MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 - Animais.....	24
3.2 - Procedimento cirúrgico.....	25
3.3 - Grupos experimentais.....	26
3.4 - Avaliação motora.....	27
3.5 - Avaliação anatomopatológica da medula espinhal.....	27
3.6 - Imunoistoquímica.....	27
3.7 - TUNEL.....	28
3.8 - Análises estatísticas.....	28
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 - Avaliação motora.....	29
4.2 - Avaliação anatomopatológica da medula espinhal.....	31
4.3 - Quantificação de corpos neuronais - Imunoistoquímica.....	35
4.4 - Avaliação da morte celular pela técnica de TUNEL.....	37
5 - CONCLUSÃO	38

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
7 - ANEXO - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO CETEA/UFMG.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido propriônico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
HE	Hematoxilina-eosina
IL-1	Interleucina-1
IP3	Inositol trifosfato
KA	Cainato
NASCIS II	National Acute Spinal Cord Injury
NMDA	N-metil-D-aspartato
RIRs	Receptores sensíveis a rianodino
SNC	Sistema nervoso central
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Discriminação dos escores do teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e classificação das fases de recuperação.	21
Tabela 2 -	Medianas dos escores obtidos pelo Teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) em ratos Wistar submetidos a trauma medular sem tratamento (CP – G2), e tratados com succinato sódico de metilprednisolona (SM – G3), associação de succinato sódico de metilprednisolona e dantrolene sódico (SM/DS – G4), e dantrolene sódico (DS – G5), nos diferentes dias de avaliação.	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A) Fotografia do procedimento de trauma medular compressivo em ratos Wistar, demonstrando a laminectomia (seta); B) trauma medular utilizando aparelho estereotáxico (seta). 26
- Figura 2 - Fotografia da medula espinhal de um animal submetido a trauma, mostrando região correspondente ao local do trauma com uma pequena depressão e área hemorrágica (seta). 31
- Figura 3 - A) Fotografia da medula espinhal de um animal do grupo G1 (controle negativo); B) visão em detalhe da substância cinzenta, mostrando corpos neuronais íntegros, permitindo visualizar núcleo, nucléolo e substância de Nissl (seta). C) Fotografia da região de epicentro de medula de um animal submetido a trauma. D) Fotografia de região cranial da medula de um animal do G2 (controle positivo); E) de um animal do G3 (SM); F) do grupo G4 (SM/DS); G) do G5 (DS). H) Fotografia do segmento caudal da medula espinhal de um animal submetido a trauma, permitindo visualizar região de malacia no funículo dorsal; I) visão em detalhe da região de malacia repleta de células gitter, infiltrado inflamatório e debris celulares; J) visão em detalhe da substância cinzenta com neurônios degenerados (setas); K) substância branca com degeneração e tumefação axonal e de bainhas de mielina (setas)..... 34
- Figura 4 - Gráfico das médias de neurônios marcados por campo pelo anticorpo Anti-NeuN, em cortes obtidos da medula espinhal de ratos Wistar submetidos a laminectomia (CN – G1), ou a trauma medular sem tratamento (CP – G2), e com tratamento com succinato sódico de metilprednisolona (SM – G3), associação de succinato sódico de metilprednisolona e dantrolene sódico (SM/DS – G4), e dantrolene sódico (DS – G5), 8 dias após o trauma. 36
- Figura 5 - A) Fotografia de corte histológico submetido à imunistoquímica, proveniente da medula espinhal de um animal em que foi realizado apenas laminectomia, demonstrando neurônios viáveis marcados pelo anticorpo anti-NeuN. B) Fotografia de corte histológico submetido à imunistoquímica, proveniente da medula espinhal de um animal com trauma, demonstrando neurônios íntegros marcados (seta), e neurônios degenerados não marcados pelo anticorpo anti-NeuN (asteriscos). 36
- Figura 6 - Gráfico das médias de células marcadas por campo pela técnica de TUNEL em cortes obtidos da medula espinhal de ratos wistar submetidos a laminectomia (CN – G1), ou a trauma medular sem tratamento (CP – G2), e os com trauma medular e tratados com succinato sódico de metilprednisolona (SM – G3), associação de succinato sódico de metilprednisolona e dantrolene sódico (SM/DS – G4), e dantrolene sódico (DS – G5), 8 dias após trauma..... 38

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos do dantrolene sódico, do succinato sódico de metilprednisolona, bem como a associação desses medicamentos, no tratamento de ratos submetidos a trauma medular espinhal compressivo agudo. Para tanto, foram utilizados 25 *Rattus norvegicus*, distribuídos igualmente em cinco grupos. No G1 (grupo controle negativo) os animais foram submetidos à laminectomia dorsal da vértebra T12, e receberam solução fisiológica. Nos demais grupos, além da laminectomia, os animais foram submetidos ao trauma medular compressivo, sendo que o G2 (grupo controle positivo) recebeu solução fisiológica 0,9%, o G3 (SM) 30mg/kg de succinato sódico de metilprednisolona, o G4 (SM/DS) 10mg/Kg de dantrolene sódico e 30mg/kg de succinato sódico de metilprednisolona, e o G5 (DS) 10mg/kg de dantrolene sódico. Realizou-se avaliação clínica dos animais empregando-se o teste BBB. Os animais foram eutanasiados oito dias após o procedimento cirúrgico, as medulas espinhais foram colhidas, sendo obtidas as secções craniais e caudais ao epicentro para avaliação morfológica (HE), pela imunistoquímica com anticorpo Anti-NeuN, e pela técnica de TUNEL. Não houve diferença significativa entre os grupos G2, G3, G4 e G5 nos resultados obtidos após avaliação da atividade motora utilizando o teste BBB, nem entre as médias de neurônios marcados pelo anticorpo anti-NeuN e células marcadas pela técnica de TUNEL ($P < 0,05$). Deste modo, conclui-se que o succinato sódico de metilprednisolona, o dantrolene sódico e, a associação desses dois medicamentos não foram capazes de promover melhora na função motora, e de reduzir a morte de neurônios e células da glia em ratos submetidos ao presente modelo experimental de trauma medular compressivo agudo, com avaliação sendo realizada oito dias após o trauma.

Palavras-chave: Dantrolene sódico, metilprednisolona, trauma medular, ratos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effects of dantrolene sodium, methylprednisolone, and their association in the treatment of rats subjected to compressive acute spinal cord injury. Therefore, 25 *Rattus norvegicus* were equally distributed into five groups. In G1 (negative control group), the animals were submitted to dorsal laminectomy of the T12 vertebra and received 0,9 % saline. In the other groups, in addition to laminectomy, the animals were subjected to compressive spinal cord injury, G2 (positive control group) received 0,9 % saline, G3 (SM) 30mg/kg of methylprednisolone, G4 (SM/DS) 10mg/Kg of dantrolene sodium and 30mg/kg of methylprednisolone, and the G5 (DS) 10mg/kg of dantrolene sodium. The animals were clinically evaluated using the BBB test. The animals were euthanized eight days after injury and the spinal cords were collected. Cranial and caudal sections to the epicenter were obtained for morphological evaluation (HE), for immunohistochemical staining with Anti-NeuN antibody, and for TUNEL staining. No significant statistical differences were found between groups G2, G3, G4, and G5 in clinical recovery determined by the BBB test, means of intact neurons stained with Anti-NeuN antibody and TUNEL stain cells ($P < 0,05$). Concluding, methylprednisolone, dantrolene sodium and the association of these two drugs have not been able to promote motor function improvement, and to reduce neurons and glia cells death, in rats subjected to the present experimental model of acute compressive spinal cord injury, with evaluation being carried out eight days after trauma.

Keywords: Dantrolene sodium, methylprednisolone, spinal cord injury, rats.

1- INTRODUÇÃO

O trauma agudo da medula espinhal é um problema comum nas medicina veterinária e humana, que pode levar a déficits neurológicos permanentes das funções motora, sensorial e autonômica (Olby, 2010). Estima-se que 2% dos casos admitidos em hospitais veterinários são de trauma a medula espinhal. Os indivíduos acometidos estão sujeitos a dois tipos de trauma medular, o intrínseco e o extrínseco. A lesão intrínseca pode ocorrer devido a patologias de discos intervertebrais, e o tipo extrínseco pode ser provocado por fraturas, luxações e subluxações decorrentes de atropelamentos (Webb et al. 2010). Nos cães, as causas mais comuns são as herniações agudas de disco intervertebral, embolismo fibrocartilaginoso e atropelamentos. Nos gatos, ocorrem as mesmas patologias, porém com diferença na frequência, sendo os traumas decorrentes de acidentes com automóveis mais comuns, seguidos por herniações de disco intervertebrais e tromboembolismo (Olby, 2010).

Nos seres humanos, as causas mais comuns são traumas decorrentes de acidentes automobilísticos, quedas no trabalho ou durante a prática de esportes, e violência (Sekhon e Fehlings, 2001; Rowland et al., 2008). Esta patologia exerce impacto econômico e social não só nos indivíduos acometidos, mas em suas famílias e em toda sociedade, pois esses indivíduos passam a depender de seus familiares para realizarem atividades de seu cotidiano, e necessitam de altas despesas com cuidados médicos. A média de dias de hospitalização de um paciente nos dois primeiros anos após trauma medular é de 171 dias, com um custo médio nesse período inicial de 95203 dólares (Sekhon e Fehlings, 2001).

A complexidade da fisiopatogenia do trauma agudo à medula espinhal, associada ao caráter progressivo da injúria decorrente dos eventos secundários, dificultam as intervenções terapêuticas nesta patologia. Apesar de décadas dedicadas à pesquisas objetivando a recuperação funcional e a qualidade de vida dos pacientes, e da disponibilidade de propostas de tratamento, como antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais, terapia celular, dentre outros, o tratamento para esta condição ainda continua frustrante (Hamann e Shi, 2009).

Dentre alguns estudos promissores, ressalta-se o de Torres et al. (2010) que avaliaram a utilização do dantrolene sódico no trauma medular agudo e observaram diminuição da morte de neurônios por apoptose. Outro trabalho com resultados favoráveis, foi o de Lee et al. (2008) que observaram que o succinato sódico de metilprednisolona diminuiu a apoptose de oligodendrócitos após trauma medular experimental agudo. Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação de bainha de mielina de diversos axônios, logo, a preservação destas células pode reduzir a desmielinização dos axônios e o comprometimento da função axonal que ocorre após trauma medular (Matute, 2009).

Baseado nesses dois estudos sugere-se a hipótese de que a associação desses dois fármacos pode reduzir a morte de neurônios e de oligodendrócitos, determinando maior neuroproteção e preservação do tecido nervoso.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o efeito do succinato sódico de metilprednisolona, do dantrolene sódico, da associação desses medicamentos em ratos submetidos a trauma medular agudo. Os objetivos específicos foram avaliar esses tratamentos na recuperação da

função neurológica, na redução da intensidade de lesão, e diminuição da morte de neurônios e células da glia, após trauma compressivo agudo à medula espinhal.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Fisiopatogenia do trauma medular agudo

A fisiopatogenia do trauma medular agudo compreende mecanismos de injúrias primárias e secundárias. O evento primário é o dano mecânico direto às membranas celulares e aos vasos sanguíneos constituintes da medula espinhal, o qual desencadeia os mecanismos secundários, que são responsáveis por expandir e exacerbar a lesão (Bartholdi e Schwab, 1995). Os principais eventos secundários são isquemia (Sakurai et al., 2003; Alatorre et al., 2007), excitotoxicidade (Gomes-Leal et al., 2004; Bernardis e Akers., 2006), estresse oxidativo, peroxidação lipídica (Christie et al., 2008; Sun et al., 2010), inflamação (Gomes-Leal et al., 2004), necrose e apoptose (Liu et al., 1997; Das et al., 2005; Çolak et al., 2009).

2.1.1 - Isquemia

O trauma mecânico à medula espinhal provoca espasmos nos vasos superficiais, e hemorragia no interior do parênquima medular. O tamanho da área hemorrágica é proporcional à gravidade do impacto. Inicialmente, a hemorragia ocorre principalmente na substância cinzenta, que é mais vascularizada, e posteriormente estende-se para substância branca (Taoka et al., 2001; Alatorre et al., 2007). No epicentro da lesão, a hemorragia atinge quase toda a substância cinzenta e quantidades variadas de substância branca. Nos segmentos cranial e caudal ela localiza-se principalmente no centro do funículo dorsal (Grossman et al., 2001). Acredita-se que a hemorragia danifica o tecido, pois as

áreas hemorrágicas são substituídas pela formação de uma cavidade. Esses eventos provocam isquemia, pois tanto os vasoespasmos quanto as áreas hemorrágicas comprometem o fluxo sanguíneo para o parênquima medular (Mautes et al., 2000). A isquemia provoca falha nas bombas iônicas responsáveis pela manutenção do gradiente iônico através das membranas celulares. Isso ocorre porque elas necessitam de oxigênio e glicose para obter o ATP utilizado no transporte ativo desses íons. Dessa forma, o comprometimento desse transporte iônico resulta em desequilíbrio osmótico, tumefação celular, e morte dessas células por necrose (Sakurai et al., 2003; Crack e Taylor, 2005; Hamann e Shi, 2009).

Outro mecanismo desencadeador de injúria celular é a reperfusão dos tecidos após isquemia. A reperfusão resulta na geração de radicais livres derivados do oxigênio, que danificam diversos constituintes celulares (Shan et al., 2010). Os neurônios motores são as células constituintes do sistema nervoso central (SNC) mais vulneráveis a isquemia (Sakurai et al., 2003).

2.1.2 - Excitotoxicidade

No trauma medular, as injúrias mecânica e isquêmica aos neurônios provocam intensa despolarização de suas membranas celulares, e por isso induz a liberação de grande quantidade de glutamato (Bernardis e Akers, 2006). O glutamato é o principal neurotransmissor responsável pela transmissão sináptica excitatória no SNC. A interação desse neurotransmissor com os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido propiônico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) e cainato (KA), promove abertura dos canais e o influxo de íons Na^+ , K^+ , e Ca^{2+} (Alberdi et al., 2002). Após trauma medular, a ativação desses receptores por uma quantidade excessiva de neurotransmissores resulta em um grande

aumento nos níveis intracelulares desses íons, sendo que o Ca^{2+} exerce um papel central como desencadeador de morte celular (Liu et al., 1997; Li e Stys, 2000; Thorell et al., 2002). A despolarização das membranas provocada pela ativação dos receptores induz a abertura dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem, resultando em mais influxo desse íon. Além disso, com o aumento na concentração intracelular de Na^+ , as células tentam diminuir a quantidade intracelular desse íon eliminando-o para o meio extracelular em troca de mais Ca^{2+} para o meio intracelular (Alberdi et al., 2002). Esse processo de morte celular induzida por quantidade excessiva de glutamato é denominado excitotoxicidade (Li e Stys, 2000; Liu et al., 2002; Das et al., 2005; Liu et al., 2010).

Outra molécula importante envolvida no controle do fluxo de Ca^{2+} é o ATP. Em condições normais, o ATP funciona como um sinalizador extracelular que regula as funções biológicas dos neurônios e células da glia (Amadio et al., 2002; Liu et al., 2010). Porém, após insulto tóxico, ocorre liberação de grande quantidade dessa molécula no meio extracelular. Em poucos segundos, ela ativa receptores P2X, e provoca um rápido aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} (Peng et al., 2009). O aumento deste íon induz a liberação de mais glutamato, contribuindo para propagação da excitotoxicidade e da injúria secundária (Agrawal e Fehlings, 1997; Amadio et al., 2002; Wang et al., 2004; Peng et al., 2009).

Além dos neurônios, a excitotoxicidade também pode afetar células da glia, pois elas possuem receptores do tipo AMPA, KA (Agrawal e Fehlings, 1997; Gallo e Ghiani, 2000; Park et al., 2003) e P2X (Peng et al., 2009). Os astrócitos são as células da glia mais abundantes no SNC e as mais resistentes a excitotoxicidade. Eles possuem diversas funções como, fornecer suportes estrutural e metabólico para outras células, e participar das sinapses regulando

as concentrações de íons e de glutamato no espaço extracelular (Gallo e Ghiani, 2000; Takuma et al., 2004). Portanto, a morte dessas células contribui ainda mais para propagação da excitotoxicidade (Agrawal e Fehlings, 1997; Park et al., 2003; Takuma et al., 2004; Liu et al., 2010). Os oligodendrócitos são células da glia encontradas principalmente na substância branca. Eles formam a bainha de mielina que isola os axônios e facilita a propagação dos potenciais de ação (Matute, 2009). Como são muito susceptíveis a excitotoxicidade (Park et al., 2003; Sánchez-Gómez et al., 2003), a sua morte após trauma medular provoca desmielinização dos axônios e comprometimento da função axonal. As células da micróglia são responsáveis pela resposta imune no SNC (Matute, 2009) e são rapidamente recrutadas no local da lesão por citocinas, mas também pela ativação dos receptores AMPA e KA. Quando ativadas, elas liberam citocinas pró-inflamatórias que contribuem para propagação da injúria secundária (Gallo e Ghiani, 2000). A excitotoxicidade pode provocar necrose por até sete dias após o evento primário (Gomes-Leal et al., 2004).

2.1.3 - Liberação de cálcio pelas reservas intracelulares

O aumento de Ca^{2+} intracitoplasmático que ocorre após trauma medular não se deve somente pelo seu influxo do meio extracelular, mas também através de sua liberação a partir de reservas intracelulares. O Ca^{2+} proveniente de reservas internas é liberado do retículo endoplasmático por canais associados a receptores para inositol trifosfato (IP3), e receptores sensíveis a rianodino (RIRs) (Thorell et al., 2002; Ouardouz et al., 2003). Acredita-se que este tipo de liberação seja dependente do influxo desse íon do meio extracelular. Dessa forma, após a ativação dos receptores AMPA pelo glutamato, ocorre abertura dos canais iônicos, influxo de Ca^{2+} , que por sua

vez desencadeia a liberação desse íon do retículo endoplasmático através de canais ligados a RIRs e a IP3 (Liu et al., 1997; Morton-Jones et al., 2008). Em condições normais, a associação da liberação das reservas internas ao influxo através de canais ligados a receptores para glutamato tem a finalidade de amplificar a sinalização dependente de Ca^{2+} . Este processo está envolvido em funções fisiológicas dos neurônios, como transporte axonal e geração do potencial de ação (Morton-Jones et al., 2008). Entretanto, o excesso de glutamato decorrente de trauma medular estimula a liberação de grandes quantidades de Ca^{2+} intracelular proveniente de reservas internas, o que pode determinar a morte celular por apoptose. Portanto, a apoptose é decorrente do esgotamento das reservas internas de Ca^{2+} , ou pela ativação de proteases e endonucleases que degradam alguns constituintes celulares (Lam et al., 1994; Wang et al., 2002; Ouardouz et al., 2003).

2.1.4 - Necrose e apoptose

Necrose e apoptose são duas formas distintas de morte celular, que provocam diferentes alterações nos tecidos adjacentes. O tipo de morte celular depende da intensidade e da duração de exposição aos insultos, e de sua interferência na função mitocondrial e no metabolismo energético celular. A necrose frequentemente ocorre quando as células sofrem injúrias física ou química intensas (Wang, 2000; Sánchez-Gómez et al., 2003; Das et al., 2005), e na presença de grande redução no metabolismo celular e nas concentrações de ATP (Sakurai et al., 2003). É um processo passivo, em que ocorre tumefação das células e de suas organelas, com ruptura e extravasamento de seu conteúdo interno para o meio extracelular. Este processo resulta em infiltração do local por células inflamatórias, que colaboram para expansão da lesão (Ankarcrona, et al., 1995). Dentro das primeiras 24 horas após trauma

medular, ocorre intensa necrose neuronal (Liu et al. 1997).

A apoptose é a morte celular programada que ocorre em condições fisiológicas, e é necessária para manter a população de células normais nos diversos tecidos. Entretanto, ela ocorre em condições patológicas como forma de mecanismo de defesa quando as células são danificadas por diferentes condições e fatores tóxicos (Aslan et al., 2009). As caspases são as principais proteínas desencadeadoras de apoptose. Podem ser ativadas pela calpaína (Ray et al., 2003; Das et al., 2005; Çolak et al., 2009), e pelas vias intrínseca e extrínseca. A calpaína é uma protease intracelular que é ativada pelo Ca^{2+} e degrada proteínas do citoesqueleto (Liu et al., 2002; Das et al., 2005), de receptores de membranas (Wang, 2000) e da mielina, podendo provocar morte celular por necrose ou apoptose (Ray et al., 2003; Çolak et al., 2009). A mitocôndria exerce um papel fundamental na via intrínseca, pois para tentar controlar a homeostase do Ca^{2+} ela retira o excesso desse íon do citoplasma, e com isso ele se acumula em seu interior, provocando despolarização de suas membranas (Carriedo et al., 2000; Sánchez-Gómez et al., 2003). Quando as concentrações de Ca^{2+} continuam elevando-se, e a despolarização torna-se persistente, ocorre abertura dos poros de permeabilidade de suas membranas (Ankarcrona, et al., 1995, Kruman e Mattson, 1999). Há liberação de citocromo C no citoplasma, que ativa a caspase-9, e em seguida a caspase-3 (Kruman e Mattson, 1999; Wang, 2000; Liu et al., 2002; Sánchez-Gómez et al., 2003). A caspase-3 é uma protease que degrada proteínas do citoesqueleto, enzimas, e proteínas relacionadas à reparação do DNA, desencadeando morte celular por apoptose (Wang, 2000; McEwen e Springer, 2005; Çolak et al., 2009). A via extrínseca ocorre mediante ação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α) que, ao se ligarem a seus receptores, ativam a caspase-8, e em seguida a caspase-3, desencadeando a morte celular também por apoptose (Gross et al., 1999).

A abertura dos poros de permeabilidade, que estão diretamente envolvidos na apoptose, pode ser influenciada pelas proteínas da família BCL-2. Esta família é composta por proteínas pró-apoptóticas, como por exemplo a Bax (Dargusch, et al., 2001), e anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e Bcl-x_L (Lam et al., 1994; Sánchez-Gómez et al., 2003; Lee et al., 2008). As proteínas pró-apoptóticas localizam-se no citoplasma, e após serem ativadas sofrem alteração conformacional e ligam-se às membranas, especialmente da mitocôndria, onde atuam promovendo abertura dos poros de permeabilidade (Gross, et al., 1999; Dargusch et al, 2001). Por outro lado, as anti-apoptóticas são encontradas nas membranas perinucleares do retículo endoplasmático e das mitocôndrias, onde exercem suas funções anti-apoptóticas através do bloqueio da abertura do poro de permeabilidade na superfície da mitocôndria (Lee et al., 2008), da inibição da peroxidação lipídica (Kruman e Mattson, 1999), e também pela redução na liberação de Ca²⁺ de reservas internas (Lam et al., 1994). Dessa forma, a proporção entre Bax e Bcl-2 ou Bcl-x_L determina a ocorrência ou não de apoptose (Gross et al., 1999; Dargusch et al., 2001; Ray et al., 2003).

Portanto, a apoptose provocada pelo trauma medular contribui para o aumento progressivo da lesão inicial, e não se restringe somente ao local da injúria mecânica direta, nem ao período imediato após a injúria. Dentro das primeiras 24 horas, neurônios e células da glia, tanto na substância branca como na cinzenta, morrem por apoptose. Após oito dias, ocorre uma segunda onda de apoptose de oligodendrócitos da substância branca (Liu et al., 1997; McEwen e Springer, 2005).

Uma vez que cada oligodendrócito é responsável pela formação da bainha de mielina de diversos axônios, a apoptose de apenas uma célula leva a desmielinização de muitas fibras, mesmo as que não foram acometidas diretamente pelo trauma inicial (Liu et al., 1997; Dong et al., 2003). A desmielinização compromete a transmissão do impulso e pode favorecer a destruição de axônios e a morte dos corpos neuronais (Dong et al., 2003).

2.1.5 - Estresse oxidativo e peroxidação lipídica

As reações metabólicas normais das células que utilizam oxigênio produzem radicais livres, os quais são removidos por moléculas antioxidantes endógenas. Entretanto, após o trauma medular, diversas alterações como a reperfusão após isquemia (Shan et al., 2010), despolarização e alterações no funcionamento das mitocôndrias pelo excesso de Ca⁺ (Carriedo et al., 2000), e reação inflamatória acarretam em produção de grandes quantidades de radicais livres (Diaz-Ruiz et al., 2009). Nas condições em que o organismo não consegue remover o excesso de radicais livres, eles se tornam citotóxicos, processo denominado estresse oxidativo. A peroxidação lipídica corresponde à reação dessas moléculas com os fosfolípídeos constituintes das membranas celulares, resultando no aumento de sua permeabilidade e no comprometimento de sua função (Christie et al., 2008). Como a medula espinhal possui uma grande proporção de ácidos graxos polinsaturados, este evento secundário exerce um papel importante na fisiopatologia do trauma medular (Crack e Taylor, 2005). Existem dois picos de peroxidação lipídica após o trauma medular, o primeiro depois de uma a seis horas, e o segundo de 24 a 120 horas (Christie et al., 2008).

Os radicais livres também podem danificar diversas proteínas celulares e ácidos nucleicos, resultando na disfunção de organelas, alteração da homeostase do Ca^{2+} , e geração de mais radicais livres (Shan et al., 2010), que também pode provocar morte celular por necrose ou apoptose (Ankarcrona, et al., 1995; Kruman e Mattson, 1999).

2.1.6 - Inflamação

A inflamação é um mecanismo de defesa e reparo que ocorre em resposta a injúria tecidual. O trauma mecânico à barreira hematoespinal provoca aumento de sua permeabilidade e extravasamento de proteínas plasmáticas para o interior do parênquima medular e atração de células inflamatórias para o local da lesão (Mautes et al., 2000). Além disso, a injúria às células endoteliais e aos astrócitos que constituem a barreira hematoespinal, estimula a liberação de citocinas próinflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose TNF- α que recrutam mais células inflamatórias para o local da lesão (Wang et al., 2004). Essas citocinas atuam por quimiotaxia e, promovem aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial (Carlson et al., 1998).

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegarem ao local da injúria, e se distribuem principalmente ao redor das áreas de necrose provocadas pela hemorragia e excitotoxicidade (Bartholdi e Schwab, 1995; Gomes-Leal et al., 2005). Essas células fagocitam debris celulares, liberam proteases e radicais livres derivados de oxigênio, danificam as células endoteliais, provocam aumento da permeabilidade vascular e expansão da área inicial de necrose (Carlson et al., 1998; Gomes-Leal et al., 2005). Em seguida, os macrófagos e as células da micróglia são atraídos para o local da lesão (Loane e Byrnes, 2010). Inicialmente, as células da micróglia são mais encontradas na

substância cinzenta, posteriormente invadem a substância branca, e são identificadas em maior quantidade em torno de três a sete dias após o trauma. Assim como os neutrófilos, elas também fagocitam debris celulares e liberam radicais livres derivados de oxigênio (Carlson et al., 1998; Gomes-Leal et al., 2005). A infiltração do parênquima medular por essas células resulta em maior lesão tecidual, diminui a regeneração axonal e provoca a morte de neurônios em locais adjacentes ao epicentro da injúria (Weaver et al., 2005; Gomes-Leal et al., 2005; Loane e Byrnes, 2010). Estas células interagem com os axônios que foram seccionados, provocando a retração de sua porção cranial (Gomes-Leal et al., 2005; Horn et al., 2008). Além disso, os macrófagos e as células da micróglia ativadas secretam mais IL-1 e TNF- α (Carlson et al., 1998; Gomes-Leal et al., 2005).

Diversos efeitos responsáveis pela expansão da lesão após trauma medular foram observados associados ao aumento nos níveis do TNF- α . Acredita-se que esta citocina aumenta a sensibilidade dos neurônios à excitotoxicidade (Han e Whelan, 2010), a expressão de receptores para glicocorticóides endógenos (Yan et al., 1999), interage com receptores e ativa alguns genes pró-inflamatórios (Xu et al., 1998). Os oligodendrócitos são muito sensíveis ao TNF- α , e sua morte após exposição a esses fatores exerce um papel importante na desmielinização (Gallo e Ghiani, 2000). Ele também estimula a proliferação de astrócitos formando uma cicatriz glial que compromete a regeneração axonal por constituir uma barreira física e química, uma vez que os astrócitos também liberam mais citocinas pró-inflamatórias (Hausmann, 2003; Takuma et al., 2004). Portanto, a utilização de agentes que diminuem a infiltração do tecido lesado por células inflamatórias pode ser benéfica e reduzir a lesão tecidual (Weaver et al., 2005).

2.2 - Tratamento do Trauma medular

2.2.1 - Modelos experimentais para desenvolvimento e avaliação de terapias

Os modelos experimentais são importantes ferramentas para o desenvolvimento e avaliação de terapias (Mautes et al., 2000). Existem diversos tipos de modelos experimentais de trauma, mas os principais são contusivo (Yan et al., 1999; Lee et al., 2008; Bernards e Akers, 2006; Torres, et al., 2010b), compressivo (Braugher et al., 1987; Taoka et al., 2001; Christie et al., 2008), isquêmico (Alatorre et al., 2007), por transecção (Nash et al., 2002) e por hemiseção (Weaver et al., 2005; Alatorre et al., 2007). Cada modelo provoca injúrias que reproduzem alguns aspectos do dano mecânico primário e dos eventos secundários, e resultam na formação de uma lesão que acomete tanto a substância branca como a cinzenta (Mautes et al., 2000).

Como a possibilidade de recuperação da função neurológica aumenta quanto menor for o tamanho da lesão, e maior a quantidade de tecido preservado, devem ser utilizados métodos de análises morfológica, morfométrica e técnicas como a imunoistoquímica, para descrever e avaliar a gravidade da lesão, bem como quantificar a sua extensão e o tecido preservado (Braugher et al., 1987; Fehlings e Tator, 1995; Hausmann, 2003).

Na análise morfológica, o trauma medular contusivo ou compressivo, de intensidade moderada a grave, resulta em uma área central de malacia (epicentro), com formação de uma cavidade. Esta cavidade apresenta-se preenchida por debris celulares, e circundada por macrófagos, e por células gitter, que são micróglia ativas repletas de vacúolos formados em decorrência da fagocitose de mielina. Ao redor da área de cavitação é possível identificar uma faixa de substância branca

cujas arquitetura permanece preservada, mas onde podem ser encontrados axônios em degeneração, tumefação das bainhas de mielina, e câmaras de digestão (Fehlings e Tator, 1995; Liu et al., 1997; Grossman et al., 2001; Rabchevsky et al., 2002; Çolak et al., 2009). A tumefação da bainha de mielina corresponde ao acúmulo de líquido e a separação da bainha de mielina de seus axônios, provavelmente como consequência de excitotoxicidade (Gomes-Leal et al., 2005). As câmaras de digestão são axônios degenerados sofrendo fagocitose por macrófagos e células da micróglia. No epicentro da lesão essas alterações são mais graves, aproximadamente 2mm cranial e caudal ao epicentro elas tornam-se moderadas, enquanto que a 4mm no sentido cranial e caudal ao epicentro a lesão restringe-se principalmente ao funículo dorsal (Grossman et al., 2001).

A quantificação de células neuronais é um meio efetivo para medir o tecido integro, sendo importante para definir a intensidade da injúria e para avaliar tratamentos. Para isso são necessários métodos que facilitem a identificação e a contagem precisa dessas células (Jongen-Rêlo e Feldon, 2002; Casella et al., 2004). Em 1992, Mullen et al. desenvolveram um anticorpo monoclonal que reconhece uma proteína nuclear específica dos neurônios, que se expressa nos núcleos e no citoplasma dos corpos neuronais. Desde seu desenvolvimento, esse anticorpo (NeuN) tem sido utilizado como marcador neuronal para imunoistoquímica em estudos com culturas celulares e em diagnósticos histopatológicos. Isto é possível porque a reatividade dessa proteína diminui em diferentes condições patológicas como após isquemia (Ünal-Çevik et al., 2004), e excitotoxicidade (Jongen-Rêlo e Feldon, 2002) e trauma (Lee et al., 2008).

Já a técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP nick-end labeling) possibilita

identificar a fragmentação de DNA, que é uma característica da apoptose. Por esse motivo, ela é muito utilizada em estudos para detectar morte de neurônios e de oligodendrócitos após injúria à medula espinhal (Liu et al., 1997; Wang et al., 2004; McEwen e Springer, 2005; Aslan et al., 2009; Shan et al., 2010).

Os testes comportamentais possuem como principal objetivo avaliar a recuperação funcional dos animais submetidos ao trauma medular experimental. O primeiro modelo de avaliação elaborado com este intuito foi relatado por Tarlov e Klinger (1954) citado por Basso et al. (1995). Inicialmente, esses testes eram meramente qualitativos, e apresentavam sensibilidade reduzida. Este modelo foi sendo aperfeiçoado com tendência a quantificar a recuperação neurológica, e a correlacioná-la com a quantidade de tecido nervoso preservado (Basso et al., 1995; Basso, 2004).

Com este objetivo, surgiu o escore de deambulação desenvolvido por Basso, Beattie e Bresnahan, denominado teste BBB. O teste BBB contém 22 escores em ordem crescente, que foram elaborados a partir da recuperação de ratos submetidos ao trauma medular agudo. A recuperação é organizada pela escala em três fases, inicial, intermediária e tardia. Na fase inicial são observados movimentos discretos de uma ou duas articulações dos membros pélvicos. A partir da observação desses movimentos é escolhido um escore correspondente que varia de 0 a sete. Ao final dessa fase, os animais conseguem fazer movimentos completos de extensão das articulações

desses membros. A fase intermediária é caracterizada pelo posicionamento da pata sobre o piso, com início de apoio de seu peso e pelo grau de coordenação entre os membros torácicos e pélvicos (escores de oito a 13). O posicionamento da pata pode variar entre apoio da superfície dorsal ou plantar sobre o piso. O animal começa a sustentar seu peso de forma progressiva, o que pode ser visualizado pela contração dos músculos do membro pélvico e também pela elevação da pelve. A cauda geralmente permanece em contato com o piso para auxiliar no equilíbrio de apoio do animal. Inicialmente, as passadas dos membros pélvicos ocorrem em menor número em relação às dos membros torácicos. Essa coordenação entre os membros torácicos e pélvicos é classificada em ausente, ocasional (frequência $\leq 50\%$), freqüente (frequência 51-94%) ou consistente (frequência 95-100%). Na última fase de recuperação cujos escores variam de 14 a 21, o animal consegue sustentar completamente seu peso, apresenta coordenação motora consistente, e são avaliados detalhes da locomoção, como posição da pata em relação ao tronco, elevação dos dedos durante as passadas, estabilidade de tronco e elevação da cauda (Tab. 1) (Basso et al., 1995).

A escolha do teste utilizado é fundamental, pois ele deve gerar dados confiáveis e reprodutíveis (Basso, 2004). O BBB tem sido muito utilizado em estudos para avaliar o efeito de tratamentos na recuperação funcional após lesão medular (Rabchevsky et al., 2002; Wang et al., 2004; Weaver et al., 2005; Peng et al. 2009; Torres et al., 2010; Wu et al., 2010).

Tabela 1 – BBB – Discriminação dos escores do teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e classificação das fases de recuperação.

ESCORE	DEFINIÇÃO
0	Nenhum movimento observável dos membros.
1	Movimento discreto de uma ou duas articulações, geralmente coxo-femoral e/ou do joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação OU Movimento extenso de uma articulação e discreto de outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto das três articulações.
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira
7	Movimento extenso das três articulações.
8	Pedalada sem suporte de peso OU Apoio plantar sem suporte de peso.
9	Apoio plantar com suporte de peso na fase de apoio OU Passada dorsal com suporte de peso ocasional, freqüente ou consistente ou Ausência de passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e ausência de coordenação entre membros torácicos e pélvicos.
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e ausência de coordenação.
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação ocasional.
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação freqüente.
14	Passo plantar com suporte de peso e coordenação consistentes. Com rotação externa ou interna da pata no contato inicial com piso e antes de liberar os dedos (final da fase de apoio). OU passo plantar freqüente, coordenação consistente e passos dorsais ocasionais.
15	Passo plantar e coordenação consistentes e dedos encostam constantemente ou freqüentemente no piso durante a elevação do membro. A pata está predominantemente paralela ao corpo no contato inicial.
16	Passo plantar e coordenação consistentes e os dedos encostam ocasionalmente durante o avanço do passo. A pata está predominantemente paralela no contato inicial e rotacionada quando se eleva durante o avançar do passo.
17	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos encostam ocasionalmente no piso, a pata

	está paralela no contato inicial e quando animal avança.
18	Passo plantar e coordenação consistentes, os dedos praticamente não encostam mais na superfície. A pata está paralela no contato inicial e rotacionada no momento de elevação da pata.
19	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está baixa parte ou todo tempo.
20	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima, porém há instabilidade do tronco.
21	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima e há estabilidade do tronco.

2.2.2 - Terapias farmacológicas para o tratamento do trauma medular

Uma vez que o paciente sofreu trauma medular, a inibição dos processos secundários de injúria pode ser o meio mais importante de intervenção para terapias. Entretanto, apesar de a injúria secundária ser a princípio passível de prevenção, não existe atualmente opções de tratamento efetivas (Nash et al., 2002; Christie et al., 2008; Rowland et al., 2008; Peng et al., 2009). Nesse contexto, uma variedade de terapias tem sido investigadas, como por exemplo, o uso da N-acetilcisteína com antioxidante (Liu et al., 2002; Shan et al., 2010), antagonistas de receptores para ATP como o *Brilliant Blue G* (Wang et al., 2004, Peng et al., 2009), bloqueadores de canais de cálcio como a Nimodipina e nifedipina (Thorell et al., 2002), e inibidores da calpaína (Ray et al., 2003; Das et al., 2005; Çolak et al., 2009). Entretanto, apesar de alguns desses fármacos demonstrarem bons resultados em pesquisas com modelos experimentais, eles não foram eficientes quando testados em estudos clínicos (Rowland et al., 2008).

2.2.3 - Succinato sódico de metilprednisolona

Até a última década, a utilização de altas doses de metilprednisolona foi considerada a única terapia aceita para tratamento do trauma medular. Pesquisas com modelos experimentais de trauma medular demonstraram que a administração desse fármaco em altas doses obteve resultados positivos como, redução na área de hemorragia, da peroxidação lipídica (Taoka et al., 2001; Shan et al., 2010), da apoptose de oligodendrócitos (Lee et al., 2008), da quantidade de células inflamatórias ativadas no local da injúria (Weaver et al., 2005; Wu et al., 2010), e melhora da recuperação da função motora (Braugher et al. 1987; Taoka et al., 2001).

Com base nesses e em diversos outros estudos, como o segundo do National Acute Spinal Cord Injury (NASCIS II), a utilização da metilprednisolona passou a ser implementada como terapia de rotina em pacientes com trauma medular. O protocolo utilizado neste estudo e adotado na rotina consistia em administração de uma dose inicial de 30mg/kg em bolus, até

oito horas após trauma, seguida por infusão de 5,4 mg/kg por hora, durante as primeiras 24 horas. Com a utilização desse protocolo de tratamento, os pacientes alcançaram melhora na função motora de acordo com o NASCIS II. É interessante ressaltar que os resultados foram favoráveis com a administração da primeira dose nas primeiras oito horas após trauma medular (Bracken et al., 1990), pois é nesse período que demonstrou-se a maior expressão de receptores glicocorticóides nos corpos neuronais e nas células da glia (Yan et al., 1999).

Apesar do mecanismo de ação da metilprednisolona ainda ser desconhecido, acredita-se que ela ative receptores glicocorticóides, que se ligam a sequências de DNA específicas, e interferem na regulação gênica e na produção de diversos fatores (Yan et al., 1999). Esse mecanismo está associado ao aumento na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-x_L (Lee et al. 2008), e na redução de fatores próinflamatórios como o TNF- α (Xu et al., 1998; Yan et al., 1999).

A utilização de metilprednisolona para tratamento de trauma medular tem sido questionada e discutida. Em estudos retrospectivos realizados com humanos que sofreram trauma medular, e receberam tratamento segundo o protocolo proposto pelo NASCIS, foi observado que não houve melhora significativa na função motora dos pacientes (Lee et al., 2007; Suberviola et al., 2008). Além disso, também em modelos experimentais utilizando este mesmo protocolo, ou com outros diferentes, não ocorreu redução da peroxidação lipídica (Christie et al., 2008), da resposta inflamatória (Bartholdi e Schwab, 1995; Bernards e Akers, 2006; Christie et al., 2008; Torres et al., 2010), da morte de neurônios e oligodendrócitos (Wu et al. 2010), e nem houve recuperação funcional (Rabchevsky et al., 2002).

Outra desvantagem da utilização de altas doses de metilprednisolona são os efeitos colaterais como complicações respiratórias, gastrointestinais (Diaz-Ruiz, et al., 2000; Matsumoto et al., 2001; Lee et al., 2007, Christie et al., 2008), e hiperglicemia (Suberviola et al., 2008).

Apesar de todas essas considerações, a metilprednisolona ainda continua a ser utilizada por muitos médicos no tratamento do trauma medular agudo, e tem sido estudada em associação com diferentes terapias (Diaz-Ruiz et al., 2000; Nash et al., 2002; Wu et al., 2010).

2.2.4 - Dantrolene sódico

O Dantrolene sódico é um antagonista de receptores rianodinos (RIRs) (Zhao et al., 2001). Ele é constituído por moléculas pequenas, muito lipossolúveis e após sua administração endovenosa, mantém concentrações citoplasmáticas dentro da faixa terapêutica por cinco horas. Ele possui meia-vida de eliminação de 12 horas, metabolização hepática e excreção pela urina e bile (Flewellen et al., 1983; Krause et al., 2004).

O dantrolene é aprovado pela Food and Drugs Alimentation para o tratamento da hipertermia maligna (Muehlshlegel et al., 2009). A hipertermia maligna é uma desordem genética em que indivíduos expostos a anestésicos voláteis apresentam liberação excessiva de Ca²⁺ do retículo endoplasmático, provocando contraturas musculares, e aceleração de seu metabolismo. A administração desse fármaco nestes pacientes promove relaxamento muscular através do bloqueio da liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático, que consiste em um processo necessário para contração muscular (Zhao et al, 2001; Krause et al., 2004).

Como o Ca^{2+} exerce um papel central na função e na injúria neuronal, acredita-se que o dantrolene pode ser utilizado como agente neuroprotetor (Wei et al., 2000; Muehlschlegel e Sims, 2009). Partindo dessa hipótese, estudos *in vitro* demonstraram que este medicamento promoveu neuroproteção em células neuronais submetidas à isquemia (Wang et al., 2002), à excitotoxicidade (Düzenli et al., 2005), e a estresse oxidativo desencadeado por exposição a toxinas (Wei et al., 2000). Além disso, o dantrolene também determinou neuroproteção em modelos experimentais de doença degenerativa (Chen et al., 2008) e de status epilepticus (Niebauer e Gruenthal, 1999), e foi capaz de inibir parcialmente a vasoconstrição em estudo *in vitro* (Salomone et al., 2009), e em estudo clínico em pacientes após trauma craniano (Muehlschlegel et al., 2009).

O dantrolene sódico também foi avaliado em modelo experimental *in vitro* de compressão medular, onde as medulas tratadas apresentaram recuperação na atividade eletrofisiológica (Thorell et al., 2002), e também *in vivo*, no qual a administração deste fármaco imediatamente após o trauma preveniu déficits neurológicos, peroxidação lipídica (Aslan et al., 2009) e apoptose (Torres, 2010).

Por outro lado, o dantrolene demonstrou forte ação inibitória na atividade de glutatona redutase que é uma importante enzima antioxidante. Como a diminuição da atividade dessa enzima pode causar aumento do estresse oxidativo, e com isso provocar morte celular por apoptose, esse seria um efeito indesejável para o seu uso (Senturk et al., 2008).

A dose normalmente utilizada em estudos com modelos experimentais é de 10mg/kg, e quanto mais precoce a administração desse medicamento maior o efeito neuroprotetor (Niebauer e Gruenthal, 1999;

Aslan et al., 2009; Muehlschlegel e Sims, 2009; Torres et al., 2010a). Como o dantrolene é um potente relaxante muscular que possui efeitos sedativos, os animais ficam bem menos ativos nas primeiras horas após a sua administração (Chen et al., 2008). Nos seres humanos, os efeitos colaterais mais comuns são tonturas, fraqueza e sonolência (Muehlschlegel e Sims, 2009).

Portanto, o tratamento do trauma medular agudo objetiva diminuir os eventos secundários, e com isso impedir a expansão da lesão (Hausmann, 2003). Como diversos fatores e mecanismos estão envolvidos na injúria secundária, é improvável que o tratamento com um único agente seja eficaz. Logo, a associação de agentes terapêuticos que atuem em diferentes vias envolvidas na injúria secundária pode ser um tratamento mais efetivo (Nash et al., 2002; Weaver et al., 2005; Shan et al., 2010).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

A execução deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob certificado de número 172/10 (Anexo I).

3.1 - Animais

Foram utilizados 25 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com aproximadamente três meses de idade e com peso médio de 350g. Os animais foram igualmente divididos em cinco grupos, e receberam água e ração comercial para roedores *ad libitum*. Foram mantidos em três animais por caixa plástica forrada com maravalha, e permaneceram no biotério do Centro Experimental de Pequenos Animais (CEPA) da Escola de Veterinária da UFMG durante todo período experimental, sendo submetidos a ciclos de

12 horas com luz e 12 sem luz e temperatura controlada.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a um período de aclimatação (14 dias), com a finalidade de adaptação ao manejo, incluindo à avaliação da capacidade motora pós-traumática. Durante esse período, os animais foram desverminados com tiabendazol¹, na dose de 100mg/kg, por via oral, totalizando duas doses intervaladas de 14 dias.

3.2 - Procedimento cirúrgico

Imediatamente antes do procedimento cirúrgico, os animais foram pré-medicados com o antibiótico cefalotina sódica², na dose de 60mg/kg, e analgésico cloridrato de tramadol³, na dose de 4mg/kg, ambos por via subcutânea. A indução e manutenção anestésica foram realizadas com isoflurano⁴, administrado por meio de máscara em sistema semi-aberto.

Sob anestesia, os animais tiveram a região toracolombar dorsal depilada, sendo então posicionados em decúbito esternal e fixados sobre uma placa de vidro. Esta, por sua vez, foi colocada sobre uma mesa cirúrgica confeccionada com duas placas de polietileno paralelas entre si e separadas por quatro hastes de alumínio. Entre as duas placas foi colocada uma bolsa térmica com água aquecida a 80°C. A placa em contato com o animal era perfurada permitindo maior troca de calor entre o animal e a bolsa térmica. Foi realizada antissepsia na região previamente depilada, utilizando-se iodopovidona degermante⁵ e solução de

álcool iodado. A seguir, foi realizada incisão mediana dorsal de pele e tecido subcutâneo entre a 10^a vértebra torácica e a 1^a vértebra lombar (T10 a L1). As inserções dos músculos epaxiais foram seccionadas, e estes afastados lateralmente. Com o auxílio de uma goiva realizou-se ostectomia do processo espinhal da 12^a vértebra torácica (T12). Em seguida, foi retirada a lâmina dorsal da vértebra (laminectomia), empregando-se *drill* pneumático⁶ neurológico e microscópio cirúrgico⁷ (Fig. 1a). A broca do drill foi irrigada de forma intermitente com solução fisiológica⁸ para evitar o aquecimento tecidual.

Após visualização da medula espinhal, foi realizado trauma mecânico compressivo sobre a duramáter com emprego de um aparelho estereotáxico modificado a partir do modelo proposto por Silva et al. (2008). O trauma foi realizado posicionando-se por cinco minutos sobre a medula uma haste estéril de inox cirúrgico com peso de 70g, exercendo pressão em uma superfície de 1mm² (Fig. 1b). Posteriormente a retirada da haste, o local foi irrigado com solução fisiológica e, em seguida, os músculos foram aproximados com sutura padrão Reverdin. O espaço morto foi reduzido empregando-se sutura padrão simples contínua, e a dermorrafia foi realizada com pontos simples separados. Todas as suturas foram realizadas utilizando-se fio polipropileno⁹ 3-0.

¹ Thiaben®, Uci-farma, São Paulo, Brasil.

² Cefalotina sódica injetável 1g., Antibióticos do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil.

³ Tramadon®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil.

⁴ Isoforine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil.

⁵ Biotrat®, LMFarma. São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

⁶ With ECCOS®, Aesculap Laboratórios B. Braun S.A.

⁷ Opto DM Plus, Opto Eletrônica S.A., São Carlos, São Paulo, Brasil.

⁸ Cloreto de sódio a 0,9%, Laboratório Sanobiol Ltda., São Paulo, Brasil.

⁹ Prolene®, Ethicon Incorporations, Brasil.

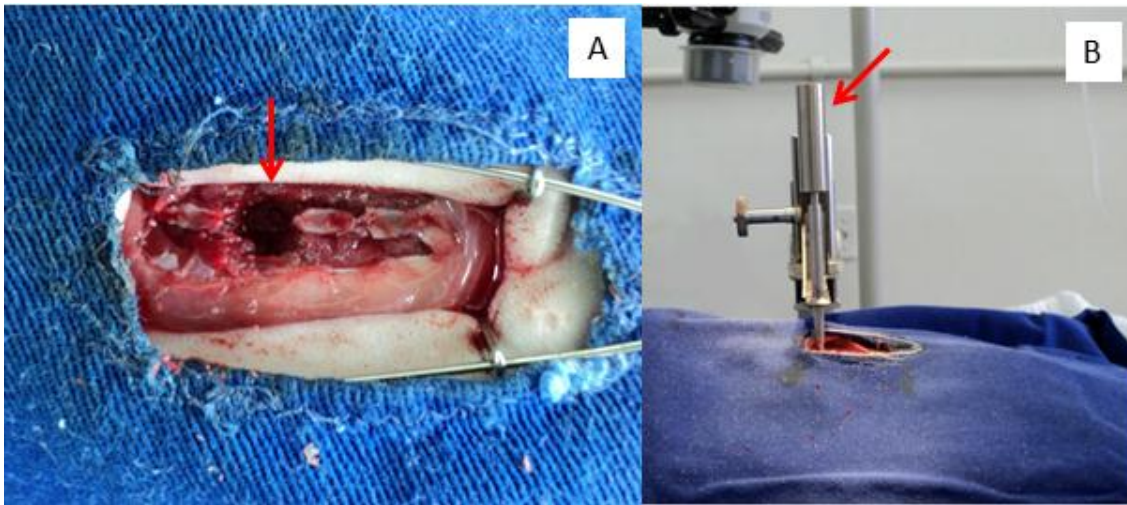


Figura 1 – A) Fotografia do procedimento de trauma medular compressivo em ratos Wistar, demonstrando a laminectomia (seta); B) trauma medular utilizando aparelho estereotáxico (seta).

Após a cirurgia, os animais receberam oxigenoterapia e foram mantidos em caixa aquecida a 37°C até recuperação anestésica, e devolvidos a suas caixas originais. No pós-operatório, receberam, por via oral, cloridrato de tramadol, na dose de 4mg/kg, a cada oito horas, por três dias consecutivos, e cefalexina¹⁰, na dose de 60mg/Kg, a cada 12 horas por sete dias consecutivos. Massagem vesical para auxílio da micção foi realizada em todos os animais, duas vezes ao dia, durante os oito dias de avaliação.

3.3 - Grupos experimentais

Os animais foram divididos igualmente em cinco grupos experimentais:

G1 – Controle negativo (CN): Os animais foram submetidos à laminectomia, e receberam solução fisiológica pelas vias intraperitoneal (uma hora após) e intravenosa (três horas após).

G2 – Controle positivo (CP): Os animais foram submetidos à laminectomia associada

a trauma compressivo, e receberam solução fisiológica pelas vias intraperitoneal (uma hora após) e intravenosa (três horas após).

G3 – Succinato sódico de metilprednisolona (SM): Os animais foram submetidos à laminectomia associada ao trauma compressivo, após uma hora receberam solução fisiológica pela via IP, e três horas após succinato sódico de metilprednisolona (30mg/kg) pela via IV.

G4 – Associação de dantrolene sódico e succinato sódico de metilprednisolona (SM/DS): Os animais foram submetidos à laminectomia associada ao trauma compressivo, após uma hora receberam dantrolene sódico (10mg/kg) pela via IP, e três horas após succinato sódico de metilprednisolona (30mg/kg) pela via IV.

G5 – Dantrolene sódico (DS): Os animais foram submetidos à laminectomia associada ao trauma compressivo, após uma hora receberam dantrolene sódico (10mg/kg) pela via IP, e três horas após solução fisiológica pela via IV.

O volume administrado de solução fisiológica foi equivalente ao que o animal

¹⁰ Keflex®, Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo Ltda., Brasil.

receberia se fosse tratado com succinato sódico de metilprednisolona e dantrolene sódico. A administração IV foi realizada na veia da cauda, e a administração intraperitoneal com os animais contidos manualmente.

3.4 - Avaliação motora

A atividade motora dos animais foi avaliada utilizando-se o teste BBB (Basso et al., 1995). As avaliações foram realizadas 24 horas antes do procedimento cirúrgico e, diariamente, iniciando-se 24 horas após a intervenção cirúrgica até o sétimo dia. No oitavo dia, ou seja, no dia da eutanásia, não foi realizada avaliação da atividade motora. Nos dias de avaliação os animais foram filmados, e posteriormente os vídeos foram avaliados sempre pelos mesmos dois observadores, que sem saber a qual grupo pertenciam os animais, classificaram o tipo de atividade motora, segundo o teste BBB (Tab. 1).

3.5 - Avaliação anatomopatológica da medula espinhal

No oitavo dia após o trauma, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico¹¹ (100mg/kg), por via IP. Imediatamente após, foi realizada perfusão com tampão fosfato (200ml) (pH 7,4) e formaldeído tamponado a 4% (200ml), ambos por via intracardíaca. As colunas vertebrais foram retiradas e fixadas em solução de formaldeído tamponado a 4% (pH 7,4). Após sete dias de fixação do tecido, as medulas espinhais foram dissecadas, e os segmentos medulares entre T8 e L3, com aproximadamente 2,8 cm, foram coletados e divididos em seções: cranial ao epicentro, epicentro, e caudal ao epicentro da lesão. Estes foram processados de acordo com técnicas rotineiras para inclusão em parafina histológica. Os

¹¹ Thiopentax ®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Brasil.

segmentos medulares foram cortados em micrótomo, em cortes sequenciais de 4µm, provenientes do epicentro, e 4 mm cranial e caudal a este. Os cortes foram corados por hematoxilina-eosina para avaliação pela microscopia óptica e realização de análise morfológica descritiva.

3.6 - Imunoistoquímica

Cortes histológicos provenientes de segmentos medulares localizados 4 mm cranial ao epicentro da lesão foram submetidos à imunoistoquímica para avaliação de corpos neuronais, utilizando-se anticorpos monoclonais (anti-NeuN)¹². Estes segmentos foram escolhidos por possuírem arquitetura tecidual com melhor preservação quando comparados aos cortes oriundos da região de epicentro e caudal. Seções foram montadas em lâminas silanizadas¹³ e posteriormente foram desparafinadas e desidratadas, segundo protocolo padrão. Foram realizados recuperação antigênica por meio de aquecimento das lâminas por 40 minutos em solução de ácido cítrico a 0,05% (20 minutos em banho maria e 20 minutos em repouso na mesma solução); bloqueio das peroxidases endógenas em solução de metanol e peróxido de hidrogênio (3% H₂O₂), por 30 minutos, em câmara escura; bloqueio de epítomos inespecíficos com *protein block*¹⁴, por 30 minutos também em câmara úmida e escura. Em seguida, as seções histológicas foram incubadas overnight, na câmara úmida e escura, com o anticorpo primário monoclonal (Neu-N 1:1000). Após este período, o anticorpo secundário¹⁵ foi adicionado, e os cortes incubados da mesma forma por 45 minutos. Em seguida, foi acrescido o complexo

¹² Anti-NeuN, Chemicon Temecula, EUA.

¹³ (3-Aminopropyl)triethoxysilane, Sigma-Aldrich, EUA.

¹⁴ Protein Block(Serum Free), DAKO, EUA.

¹⁵ LSAB™, Link for AP/HRP, DAKO, EUA.

estreptoavidina biotina peroxidase¹⁶ e novamente incubado por mais 30 minutos. As reações foram reveladas com 3-3' diaminobenzina peroxidase (DAB)¹⁷ por 30 segundos, lavadas em água corrente por 10 minutos, e contra coradas com hematoxilina de Harris. Após estas etapas, procederam-se a desidratação padrão, e montagem das lâminas com lamínulas e bálsamo do Canadá.

A contagem de corpos neuronais marcados pelo anticorpo monoclonal Neu-N foi realizada com auxílio de graticula de 121 pontos¹⁸, e com objetiva de 40x, sendo contados dez campos localizados na substância cinzenta de cada corte. Em seguida, foram obtidas as médias de células marcadas por campo.

3.7 - TUNEL

A fragmentação do DNA de células da glia na substância branca da medula espinhal foi avaliada pelo método TUNEL (*TdT mediated dUTP nickendlabeling*) utilizando o kit comercial¹⁹. Foram obtidos cortes de segmentos medulares localizados aproximadamente 4 mm craniais ao epicentro da lesão. Os cortes foram montados em lâminas silanizadas que posteriormente foram desparafinadas e desidratadas segundo protocolo padrão para técnica de túnel. Inicialmente, os cortes foram permeabilizados com triton X-100, 0,5% em água destilada, durante 10 minutos e em seguida, tratados com proteinase K, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A inativação da peroxidase endógena foi realizada através de imersão das laminas em solução de H₂O₂ e metanol, a 3%, por 30 minutos. Após serem lavados em TBS, foram encubados com *TdT Equilibration*

buffer, por 20 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente com *TdT Labeling Reaction Mixture*, por 90 minutos, em câmara úmida, a 37°C. Após este procedimento, a reação foi bloqueada com *Stop Solution*, também a 37°C, por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados *Blocking Buffer* a temperatura ambiente por dez minutos e o anticorpo 1× conjugado por 30 minutos, em câmara úmida a temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram marcadas com DAB e contracoradas com *Methyl Green*.

Para quantificação de células marcadas, foram contados 15 campos localizados na substância branca, com auxílio de graticula de 121 pontos, em objetiva de 40x. Em seguida foram obtidas as médias de células marcadas por campo.

3.8 - Análises estatísticas

As medianas dos escores obtidos a partir das avaliações motoras (BBB) foram comparadas entre grupos pelo teste de Kruskal Wallis, e entre os dias dentro de um mesmo grupo pelo teste de Friedman. As médias de neurônios marcados obtidos a partir da imunistoquímica com anticorpo anti-NeuN foram comparadas entre grupos pelo teste de SNK. As médias de células marcadas pela técnica de TUNEL foram transformada pela função Log(X), e posteriormente comparadas também pelo teste SNK. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad InStat® 3.05, com 95% como nível de significância (p-valor < 0,05 indica diferença significativa).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo empregado induziu trauma grave em todos animais, achados semelhantes à realidade da neurologia em pronto atendimento, em que a maioria dos pacientes são acometidos por lesão com essa intensidade (Sekhon e Fehlings, 2001).

¹⁶ LSAB™, Streptavidin/HRP, DAKO, EUA.

¹⁷ DAB, DAKO, EUA.

¹⁸ Olympus

¹⁹ FragEL® DNA Fragmentation Detection Kit TdT Enzyme, Merck, Darmstadt, Germany.

Alguns animais tiveram retenção urinária secundariamente à disfunção neurológica, e algumas vezes essas alterações estavam associadas à hematúria. Assim como nos seres humanos, alterações como infecções urinárias e falência renal são complicações comuns decorrentes da retenção urinária após trauma medular (Sekhon e Fehlings, 2001). Dessa forma, a realização de massagem vesical foi essencial para prevenir essas complicações. Distúrbios como infecção ou deiscência de pontos na ferida cirúrgica não foram observados. Os animais não apresentaram hiperalgesia após trauma medular, devido à analgesia com cloridrato de tramadol, administrado como medicação pré-anestésica e no pós-operatório.

Optou-se em realizar a avaliação oito dias após trauma com o objetivo de observar a ação destes medicamentos nos eventos secundários da fase aguda, como a morte celular por apoptose, que ocorre em dois picos sendo o primeiro 24 horas após trauma, e o segundo oito dias após trauma (Liu et al., 1997; McEwen e Springer, 2005).

4.1 - Avaliação motora

A avaliação motora pelo teste de BBB possibilita observar e graduar a recuperação funcional dos animais submetidos a trauma medular, bem como comparar a eficácia de tratamentos testados (Basso et al. 1995; Basso, 2004). A avaliação dos animais antes da intervenção cirúrgica permitiu verificar a normalidade dos animais nesse período, e comparar a deambulação de um mesmo animal entre os períodos pré e pós-operatórios.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais do grupo G1 (CN - controle negativo) apresentaram marcha normal, suporte de peso nos quatro membros, cauda elevada e estabilidade do tronco, o que corresponde ao escore máximo 21. A

avaliação dos animais desse grupo foi importante para confirmar que a laminectomia não provocou nenhum déficit motor, pois a medula desses animais foi utilizada como controle negativo nas análises morfológicas, imunoistoquímica e no TUNEL.

Como conseqüência do trauma compressivo grave à medula espinhal, na primeira avaliação, realizada 24 horas após procedimento cirúrgico, os animais manifestaram paraplegia, que consistiu em ausência de qualquer movimento nos membros pélvicos (escore 0) a movimentos discretos de uma ou duas articulações (escore 1). Estes resultados foram observados nos animais pertencentes aos grupos G2 (CP - controle positivo), G3 (SP - succinato sódico de metilprednisolona), G4 (DS/SM - associação de dantrolene sódico e succinato sódico de metilprednisolona), e G5 (DS - dantrolene sódico). Torres et al. (2010b) e Peng et al. (2009) também observaram que todos os animais desenvolveram paraplegia no primeiro dia após trauma grave à medula espinhal.

Em relação à comparação das medianas dos escores obtidos entre os diferentes grupos, não houve diferença significativa entre os grupos G2, G3, G4 e G5, em nenhum dos dias de avaliação ($p > 0,05$) (Tab.2). Resultado semelhante foi obtido por Torres et al. (2010b) que não observaram melhora na função motora avaliada pelo teste BBB em animais tratados com metilprednisolona também em dose única de 30mg/Kg, mas com administração cinco minutos após trauma medular grave. É interessante mencionar que isso ocorreu mesmo com a avaliação por um período de seis semanas, e que os resultados obtidos nos animais tratados foram piores quando comparados ao grupo não tratado. Weaver et al. (2005) também não obtiveram bons resultados com esse medicamento, tanto no tratamento do

trauma compressivo grave quanto no moderado.

Por outro lado, Braughler et al. (1987), Taoka et al. (2001), e Nash et al. (2002) observaram que o tratamento da injúria medular compressiva com metilprednisolona resultou em melhora funcional. Entretanto, o trauma empregado nestes estudos foi menos intenso evidenciado pelo fato de que os animais já apresentavam paraparesia nas primeiras 24 horas após o trauma, ou seja, movimentos das articulações dos membros pélvicos. Além disso, o método utilizado para avaliação neurológica não foi tão detalhado quanto o BBB, podendo incorrer em avaliações mais subjetivas. Rabchevsky et al. (2002) também obtiveram resultados promissores na utilização da metilprednisolona em trauma agudo da medula espinhal. Eles a avaliaram no trauma contusivo seguindo protocolo do NASCIS II, com primeira dose administrada cinco minutos após o trauma, e observaram melhora na função motora após 42 dias de avaliação.

Em relação ao dantrolene, Torres et al. (2010a) ao utilizar o mesmo modelo de trauma compressivo, e o mesmo protocolo do presente experimento, também não observaram melhora na função motora dos animais após 8 dias de avaliação. No entanto, Aslan et al. (2009), observaram que a administração de dantrolene imediatamente após trauma à medula espinhal de coelhos resultou em melhora significativa na função motora 24 horas após a injúria. Essa diferença pode ter sido significativa porque o modelo de trauma compressivo empregado provocou injúria menos grave, uma vez que, nas primeiras 24 horas após trauma todos os animais apresentavam paraparesia. Além disso, a avaliação motora empregada por esse pesquisador foi a proposta por Tarlov (1954). O método de Tarlov propõe uma

avaliação menos precisa e mais subjetiva que o BBB, pois a avaliação motora é classificada em apenas cinco escores. Esta falta de detalhamento do método permite que pequenas variações não sejam classificadas pelos examinadores (Basso, 2004).

Portanto, os resultados obtidos após avaliação da atividade motora dos animais submetidos a trauma compressivo de intensidade grave à medula espinhal, indicam que a utilização de succinato sódico de metilprednisolona, de dantrolene e da associação desses dois medicamentos não foi capaz de promover melhora funcional. Esses resultados sugerem que, apesar desses fármacos reduzirem por diferentes vias os mecanismos secundários da injúria medular, não houve diminuição da manifestação dos déficits neurológicos.

Tabela 2 - Medianas dos escores obtidos pelo Teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) em ratos Wistar submetidos à trauma medular sem tratamento (CP – G2), e tratados com succinato sódico de metilprednisolona (SM – G3), associação de succinato sódico de metilprednisolona e dantrolene sódico (SM/DS – G4), e dantrolene sódico (DS – G5), nos diferentes dias de avaliação.

Dias de avaliação	Trauma + Solução fisiológica	Trauma + Metilprednisolona	Trauma + Metilprednisolona + Dantrolene	Trauma + Dantrolene
Pré-operatório (1 ^o)	21	21	21	21
2 ^o	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	1 ^{Aa}
3 ^o	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	1 ^{Aa}
4 ^o	0 ^{Aa}	1 ^{Aa}	0 ^{Aa}	1 ^{Aa}
5 ^o	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}	0 ^{Aa}	1 ^{Aa}
6 ^o	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}
7 ^o	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}

Medianas seguidas por letras maiúscula distintas na mesma coluna, e minúsculas na linha, diferem pelo teste de Kruskal Wallis (P<0,05).

4.2 - Avaliação anatomopatológica da medula espinhal

À avaliação macroscópica, as medulas espinhais dos animais pertencentes ao grupo G1(CN) não apresentaram nenhuma alteração. Por outro lado, nos grupos G2 (CP), G3 (SM), G4 (DS/SM) e G5 (DS), a dura-máter e leptomeninges estavam aderidas ao corpo vertebral na região da

vértebra torácica 12. Na superfície dorsal da medula correspondente a essa vértebra, havia uma região de depressão com uma pequena área de hemorragia (Fig.2).



Figura 2 - Fotografia da medula espinhal de um animal submetido a trauma, mostrando região correspondente ao local do trauma com uma pequena depressão e área hemorrágica (seta).

À microscopia, os três segmentos avaliados (cranial, epicentro, e caudal) das medulas dos animais do grupo G1 (CN)

apresentaram preservação da arquitetura normal. Nesses segmentos, a medula apresentava forma arredondada, envolvida

pelas meninges, e no seu interior havia a substância cinzenta em formato de “H”, circundada pela substância branca. No centro da substância cinzenta, havia o canal ependimário delimitado pelas células ependimárias (Fig.3a). Nos cornos ventrais da substância cinzenta haviam corpos neuronais íntegros, permitindo visualizar núcleo, nucléolo e substância de Nissl (Fig.3b). Essas características demonstraram que a realização de laminectomia não provocou alterações morfológicas na medula espinhal, conforme já sugerido pelos escores máximos obtidos por esse grupo nas avaliações pelo teste BBB.

Nos animais submetidos ao trauma, grupos G2, G3, G4, G5, os padrões histológicos observados foram bem semelhantes. Na região do epicentro havia malacia grave, variando de focalmente extensa a difusa, acometendo grande parte das substâncias branca e cinzenta. Esta região apresentava-se repleta de debris celulares, infiltrado inflamatório, células de gitter, e algumas câmaras de digestão. Ao redor desta lesão, a pequena faixa de substância branca remanescente demonstrava degeneração axonal e tumefação grave da mielina, de distribuição difusa. Em alguns animais uma pequena quantidade de substância cinzenta permaneceu preservada nos cornos ventrais, onde foi possível identificar degeneração e morte neuronal, gliose, e focos de hemorragia perivascular (Fig. 3c epicentro).

A avaliação de cortes histológicos provenientes da região cranial dos grupos G2 (CP), G3 (SM), G4 (DS/SM) e G5 (DS), demonstrou região de malacia focal, acometendo o funículo dorsal. No centro dessa região observou-se uma cavitação repleta de debris celulares, infiltrado inflamatório e células de gitter. Os animais apresentaram degeneração axonal e tumefação de mielina discreta e multifocal, acometendo o funículo dorsal ao redor da área de cavitação, e o funículo ventral (Fig.

3d, 3f, 3g). No grupo G3, isto é que recebeu tratamento com metilprednisolona, a malácia foi menos intensa. Porém, a degeneração axonal e a tumefação da mielina foi de intensidade mais grave (Fig 3e).

Os segmentos medulares caudais obtidos dos animais dos grupos G2, G3, G4, G5 também apresentaram região de malacia focal, acometendo o funículo dorsal (Fig.3h). No centro dessa região observou-se uma cavitação repleta de debris celulares, infiltrado inflamatório e células de gitter (Fig.3i). Na substância cinzenta havia degeneração neuronal moderada, principalmente nos cornos ventrais (Fig.3j). A degeneração axonal e da mielina era de intensidade moderada, multifocal, acometendo os funículos dorsal e ventral (Fig.3k).

Grossman et al. (2001), sugeriram que as regiões de malacia e cavitação correspondem aos locais onde ocorreu hemorragia nas primeiras horas após a lesão, pois a hemorragia acomete principalmente o funículo dorsal, estendendo-se nos sentidos cranial e caudal (Grossman et al., 2001). Dessa forma, como nos segmentos craniais do grupo G3 (SM), ocorreu malácia menos intensa, a hemorragia pode ter sido menor, pois Taoka et al. (2001) verificaram que o tratamento com metilprednisolona reduziu a área hemorrágica após trauma medular compressivo devido a sua atuação no endotélio vascular. Outra possibilidade é que, a diminuição da lesão neste segmento pode ter ocorrido devido à ação antiinflamatória da metilprednisolona, pois existe correlação positiva entre quantidades de células inflamatórias e extensão da lesão (Carlson et al.,1998). Em 2008, Horn et al. verificaram que os macrófagos são responsáveis pela retração axonal após trauma, mas para isso é necessário que eles estejam ativados e que os axônios estejam em degeneração. Portanto, mesmo com

redução da quantidade de macrófagos, se houver lesão de mielina e degeneração axonal, não ocorre recuperação funcional, o que explicaria a inexistência de diferença significativa entre os grupos tratados. Além disso, a redução na área de malacia ocorreu somente no segmento cranial, portanto

muitos axônios sofreram degeneração no epicentro e na região caudal e, como relatado por Fehlings e Tator (1995), a quantidade axônios preservados apresenta correlação positiva com a recuperação funcional.

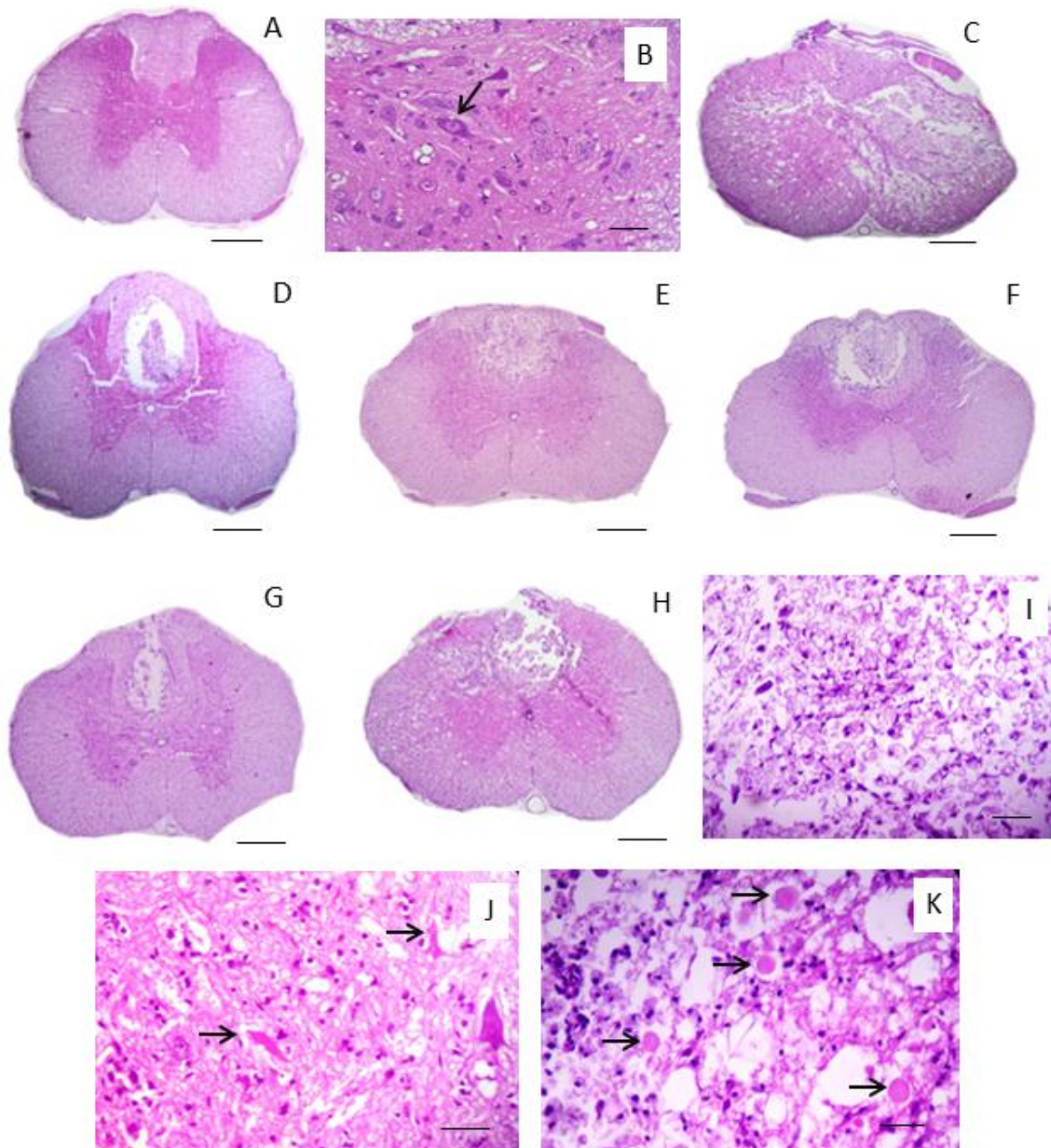


Figura 3 - A) Fotografia da medula espinhal de um animal do grupo G1 (controle negativo); B) visão em detalhe da substância cinzenta, mostrando corpos neuronais íntegros, permitindo visualizar núcleo, nucléolo e substância de Nissl (seta). C) Fotografia da região de epicentro de medula de um animal submetido a trauma. D) Fotografia de região cranial da medula de um animal do G2 (controle positivo); E) de um animal do G3 (SM); F) do grupo G4 (SM/DS); G) do G5 (DS). H) Fotografia do segmento caudal da medula espinhal de um animal submetido a trauma, permitindo visualizar região de malacia no funículo dorsal; I) visão em detalhe da região de malacia repleta de células gitter, infiltrado inflamatório e debris celulares; J) visão em detalhe da substância cinzenta com neurônios degenerados (setas); K) substância branca com degeneração e tumefação axonal e de bainhas de mielina (setas) (Figuras 3A, C, D, E, F, G, H: barra = 233 μ m; figuras 3B, I, J, K: barra = 23 μ m).

4.3 - Quantificação de corpos neuronais - Imunoistoquímica

A contagem de neurônios viáveis é um meio efetivo para medir o tecido íntegro, definir a intensidade da injúria e avaliar tratamentos. Para isso foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-NeuN que reconhece e liga-se a proteína nuclear específica dos neurônios, e facilita a identificação e a contagem dessas células (Jongen-Rêlo e Feldon, 2002, Casella et al., 2004). Como a região do epicentro e caudal à lesão apresentam destruição tissular mais intensa, optou-se por quantificar essas células nos segmentos craniais.

O número médio de neurônios marcados por campo foi maior no grupo submetido apenas à laminectomia (G1) quando comparado aos grupos traumatizados (G2, G3, G4 e G5) ($P < 0,05$) (Fig.4 e 5). Entretanto, não houve diferença entre as médias de neurônios marcados por campo nos grupos G2, G3, G4 e G5 ($P < 0,05$) (Fig.4 e 5). Com isso, podemos sugerir que no presente modelo de trauma compressivo grave, a metilprednisolona, o dantrolene, ou sua associação não promoveu neuroproteção.

Lee et al. (2008), Christie et al. (2008), e Wu et al. (2010) também não observaram neuroproteção associada a utilização de succinato sódico de metilprednisolona para

tratamento do trauma medular. Em estudos realizados por Bartholdi e Schwab (1995) e Wu et al. (2010), apesar da metilprednisolona reduzir a resposta inflamatória, isso não resultou em maior sobrevivência de neurônios nem de oligodendrócitos. Mais interessante ainda é que Bernards e Akers (2006) relataram que a metilprednisolona mesmo quando administrada segundo o protocolo no NASCIS, não diminuiu a excitotoxicidade, a peroxidação lipídica nem a reação inflamatória. Por outro lado, Taoka et al. (2001) e Diaz-Ruiz (2000) verificaram que este medicamento foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica, porém o período de avaliação foi de apenas 24 horas, ou seja, avaliou apenas o primeiro pico de peroxidação lipídica.

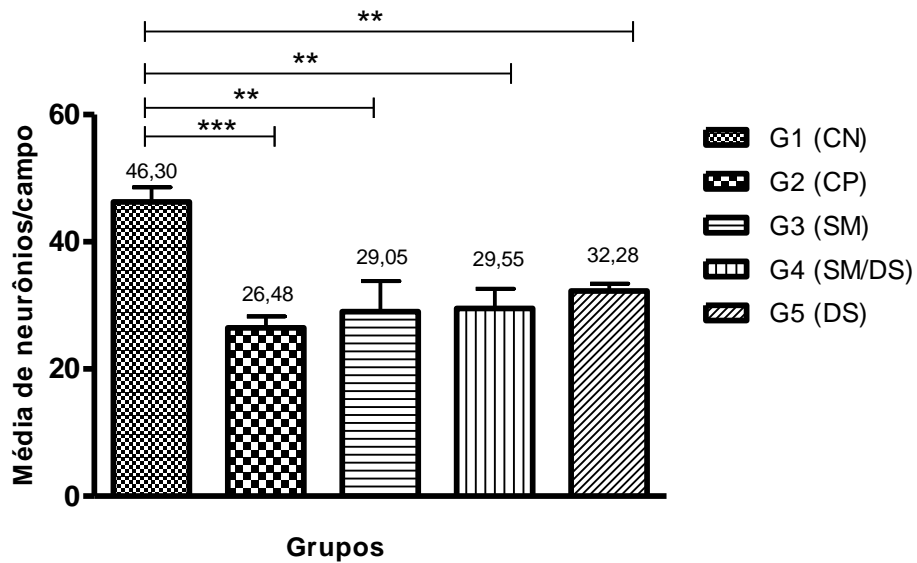


Figura 4 - Gráfico das médias de neurônios marcados por campo pelo anticorpo Anti-NeuN, em cortes obtidos da medula espinal de ratos Wistar submetidos a laminectomia (CN – G1), ou a trauma medular sem tratamento (CP – G2), e com tratamento com succinato sódico de metilprednisolona (SM – G3), associação de succinato sódico de metilprednisolona e dantrolene sódico (SM/DS – G4), e dantrolene sódico (DS – G5), 8 dias após o trauma.

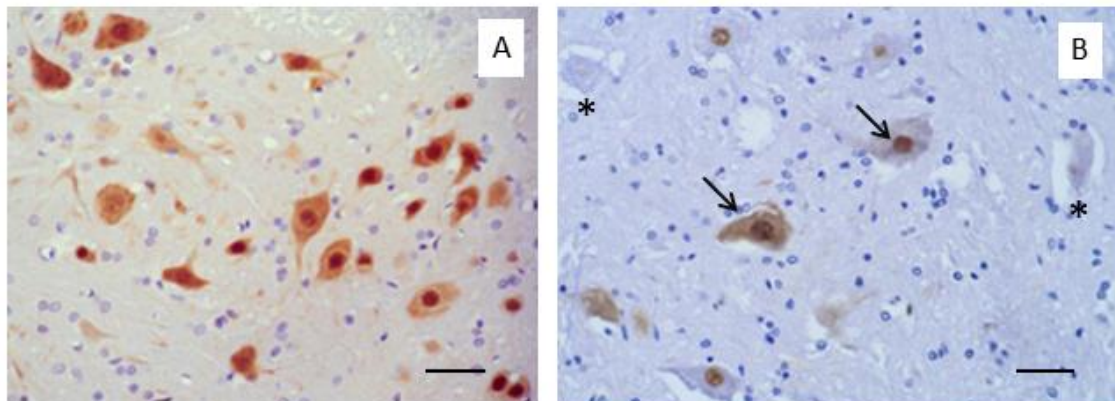


Figura 5 - A) Fotografia de corte histológico submetido à imunohistoquímica, proveniente da medula espinal de um animal em que foi realizado apenas laminectomia, demonstrando neurônios viáveis marcados pelo anticorpo anti-NeuN. B) Fotografia de corte histológico submetido à imunohistoquímica, proveniente da medula espinal de um animal com trauma, demonstrando neurônios integros marcados (seta), e neurônios degenerados não marcados pelo anticorpo anti-NeuN (asteriscos)

4.4 - Avaliação de morte celular pela técnica de TUNEL

A técnica de TUNEL permite a detecção de fragmentação do DNA, ou seja, a identificação de morte celular (Liu et al., 1997). No presente trabalho a quantificação de células com fragmentação do DNA foi realizada na substância branca dos segmentos craniais ao epicentro da lesão, pois a segunda onda de apoptose que ocorre oito dias após o trauma, acomete principalmente os oligodendrócitos constituintes da substância branca adjacente ao epicentro da lesão (Liu et al., 1997; McEwen e Springer, 2005).

O número de células marcadas por essa técnica foi maior nos animais pertencentes aos grupos G2, G3, G4, e G5 quando comparados ao G1 ($P < 0,05$) (Fig.6). Isto significa que a morte celular foi maior nos grupos traumatizados em comparação ao submetido apenas a laminectomia. Não houve diferença significativa entre os grupos G2, G3, G4, e G5 ($P < 0,05$), ou seja, nenhum dos tratamentos diminuiu a morte de células da glia na substância branca (Fig.6).

Estes resultados diferem dos obtidos por Lee et al. (2008), que observaram que a administração de metilprednisolona 15 minutos após trauma diminuiu a apoptose de oligodendrócitos. Essa divergência pode ser devido ao fato de que no presente trabalho a metilprednisolona foi administrada somente três horas após trauma.

Wang et al. (2002), ao avaliarem a ação neuroprotetora do dantrolene *in vitro*, em células neuronais submetidas a privação de oxigênio e glicose, verificaram redução parcial da morte celular. Já, Thorell et al. (2002) avaliaram o dantrolene em um modelo *in vitro* de trauma medular compressivo, e também observaram redução parcial da injúria. Portanto, esses dois autores obtiveram melhora somente

parcial, provavelmente porque a liberação de Ca^{+} proveniente de reservas internas também ocorre através de receptores para IP3, os quais não são bloqueados pelo dantrolene. Essa possibilidade é condizente com o estudo de Liu et al. (1997), Li e Stys (2000) e Alberdi et al. (2002) que demonstraram que o aumento de Ca^{+} intracelular pode ser provocado pelo influxo através de canais ativados por receptores AMPA e, também, pela abertura dos canais de Ca^{+} dependentes de voltagem, e inversão na troca de Na^{+} por Ca^{+} . Logo, como são muitas as formas de aumento do Ca^{+} intracelular, é perfeitamente plausível que o dantrolene não consiga diminuir sozinho a alteração na homeostase desse íon, pois conforme relatado por Zhao et al. (2001), ele bloqueia somente a liberação através de RIRs presentes no retículo endoplasmático. Essas possibilidades sugerem então que talvez, seja este o motivo pelo qual o dantrolene não demonstrou ação neuroprotetora, nem na redução de morte de células da glia na substância branca, no presente modelo experimental de trauma medular.

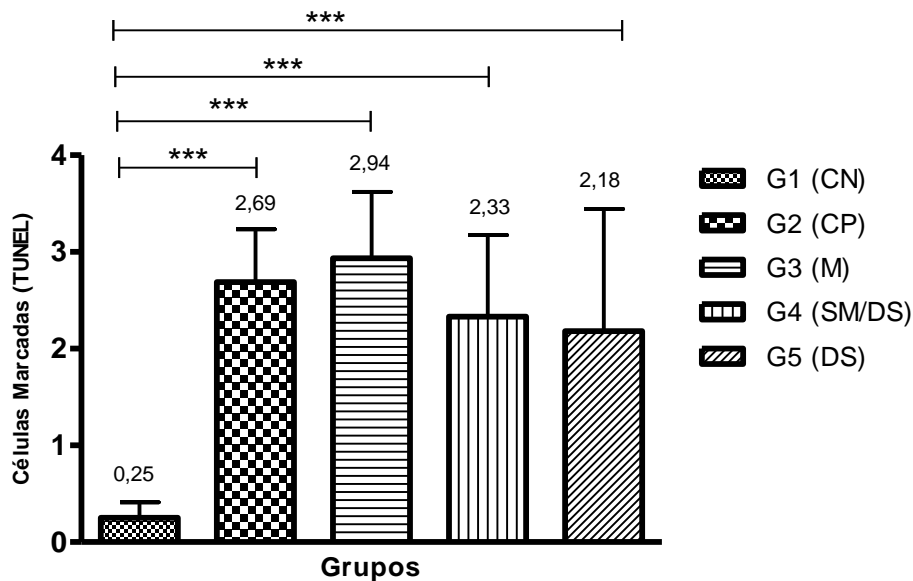


Figura 6 - Gráfico das médias de células marcadas por campo pela técnica de TUNEL em cortes obtidos da medula espinal de ratos wistar submetidos a laminectomia (CN – G1), ou a trauma medular sem tratamento (CP – G2), e os com trauma medular e tratados com succinato sódico de metilprednisolona (SM – G3), associação de succinato sódico de metilprednisolona e dantrolene sódico (SM/DS – G4), e dantrolene sódico (DS – G5), 8 dias após trauma.

5 - CONCLUSÃO

O succinato sódico de metilprednisolona, o dantrolene sódico e a associação desses dois medicamentos não promoveu melhora na função motora, diminuição da morte de neurônios e células da glia, em ratos submetidos ao presente modelo experimental de trauma medular, com a avaliação sendo realizada oito dias após o trauma.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, S.K.; FEHLINGS, M.G. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal Cord injury. *J. Neurosc.*, v.17, n.3, p.1055-1063, 1997.

ALATORRE, W.E.B.; MARTINEZ, D.G.; CORRAL, S.A.R.; et al. Critical ischemia time in a model of spinal cord section. A study performed on dogs. *Eur. Spine J.*, v.16, p.563-572, 2007.

ALBERDI, E.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V.; MARINO, A.; et al. Ca⁺ influx through AMPA or Kainate receptors alone is sufficient to initiate excitotoxicity in cultured oligodendrocytes. *Neurobiol.Dis.*, v.9, p.234-243, 2002.

AMADIO, S.; D'AMBROSI, N.; CAVALIERE, F.; et al. P2 receptor

modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacol.*, v.42, p.489-501, 2002.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E. et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.*, v.15, p.961-973, 1995.

ASLAN, A.; CEMEK, M.; BUYUKOKUROGLU, M.E.; et al. Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury. *Eur. Spine J.*, 2009.

BARTHOLDI, D.; SCHWAB, M.E. Methylprednisolone inhibits early inflammatory process but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat. *Brain. Res.*, v.672, p.177-186, 1995.

BASSO, D.M. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *J. Neurotrauma*, v.21, n.4, p.395-404, 2004.
BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma*, v.12, n.1, 1995.

BERNARDS, C.M.; AKERS, T. Effect of postinjury intravenous or intrathecal methylprednisolone on spinal cord excitatory amino-acid release, nitric oxide generation, PGE₂ synthesis, and myeloperoxidase content in a pig model of acute spinal cord injury. *Spinal cord*, v.44, p.594-604, 2006.

BRACKEN, M.B.; SHEPARD, M.J.; COLLINS, W.F.; et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury: results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study, *N. Engl. J. Med.*, v.322, p.1405-1411, 1990.

BRAUGHLER, J.M.; HALL, E.D.; MEANS, E.D.; et al. Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinato dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.*, v.102, p.77-88, 1987.

CASELLA, G. T. B.; BUNGE, M. B.; WOOD, P. M. Improved immunocytochemical identification of neural, endothelial, and inflammatory cell types in paraffin-embedded injured adult rat spinal cord. *J. Neurosci. Methods.*, v.139, p.1-11, 2004.

CARLSON, S.L.; PARRISH, M.E.; SPRINGER, J.E.; et al. Acute inflammatory response in spinal cord injury following impact injury. *Exp. Neurol.*, v.151, p.77-88, 1998.

CARRIEDO, S.G.; SENSI, S.L.; HONG, Z.Y.; et al. AMPA exposure induce mitochondrial Ca²⁺ overload and ROS generation in spinal motor neurons. *J. Neurosci.*, v.20, n.1, p.240-250, 2000.

CHEN, X.; TANG, T.S.; TU, H.; et al. Deranged calcium signalling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J. Neurosci.*, v.28, n.48, p.12713-12724, 2008.

CHRISTIE, S.D.; COMEAU, B.; MYERS, T.; et al. Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone. *Neurosurg. Focus.*, v.25, n.5, p.1-6, 2008.

ÇOLAK, A.; KAYA, M.; KARAOĞLAN, A.; et al. Calpain inhibitor AK 295 inhibits calpain-induced apoptosis and improves neurologic function after traumatic spinal cord injury. *Neurocirurgia*, v.20, p.245-254, 2009.

CRACK, P.J., TAYLOR, J.M. Reactive oxygen species and the modulation of

- stroke. *Free Radic. Biol. Med.*, v.38, p.1433-1444, 2005.
- DARGUSCH, R.; PAISECKI, D.; TAN, S.R.; et al. The role of Bax in glutamate-induced nerve cell death. *J. Neurochem.*, v.76, p.295-301, 2001.
- DAS, A.; SRIBNICK, E.A.; WINGRAVE, J.M.; et al. Calpain activation in apoptosis of ventral spinal cord 4.1 (VSC4.1) motoneurons exposed to glutamate: calpain inhibition provides functional neuroprotection. *J. Neurosci. Res.*, v.81, p.551-562, 2005.
- DIAZ-RUIZ, A.; ALCARAZ-ZUBELDIA, M.; MALDONADO, V. et al. Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats. *Neurosci. Lett.*, v.42, p.56-59, 2009.
- DIAZ-RUIZ, A.; RIOS, C.; DUARTE, D.; et al. Lipid peroxidation inhibition in spinal Cord injury: cyclosporin A VS methylprednisolone. *Neuroreport*, v.11, p.1765-1767, 2000.
- DONG, H.; FAZZARO, A.; XIANG, C.; et al. Enhanced oligodendrocyte survival after spinal cord injury in Bax-deficient mice and mice with delayed Wallerian degeneration. *J. Neurosci.*, v.23, n.25, p.8682-8691, 2003.
- DÜZENLI, S.; BAKURIDZE, K.; GEPIREMEN, A. The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. *Toxicology*, v.19, p.589-594, 2005.
- FEHLINGS, M. G.; TATOR, C. H.; 1995. The relationship among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.132, 220-228, 1995.
- FLEWELLEN, E.H.; NELSON, P.E.; JONES, W.P.; et al. Dantrolene dose-response in awake man: implications for management of malignant hyperthermia. *Anesthesiology*, v.59, 275-280, 1983.
- GALLO, V.; GHIANI, C.A. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs, and new functions. *Trends Pharmacol. Sci.*, v.21, p.252-258, 2000.
- GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; FREIRE, M.A.; et al. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.190, p.456-467, 2004.
- GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; PICANÇO-DINIZ, C.W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. *Brain Res.*, v.1066, p.57-70, 2005.
- GROSS, A.; MCDONELL, J.M.; KORSMEYER, J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, v.13, p.1899-1911, 1999.
- GROSSMAN, S.D.; ROSENBERG, L.J.; WRATHALL, J.R. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp. Neurol.*, v.168, p.273-282, 2001.
- HAMANN, K.; SHI, R. Acrolein scavenging: a potential novel mechanism of attenuating oxidative stress following spinal cord injury. *J. Neurochem.*, v.111, p.1348-1356, 2009.
- HAN, P.; WHELAN, P.J. Tumor necrosis factor alpha enhances glutamatergic transmission onto spinal motoneurons. *J. Neurotrauma*, v.27, p.287-292, 2010.

- HAUSMANN, O.H. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal cord*, v.41, p.369-378, 2003.
- HORN, K.P.; BUSCH, S.A.; HAWTHORNE, A.L.; et al. Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *J. Neurosci.*, v.28, n.38, p.9330-9341, 2008.
- JONGEN-RÊLO, A.L.; FELDON, J. Specific neuronal protein: A new tool for histological evaluation of excitotoxic lesions. *Physiol. Behav.*, v.76, p.449-456, 2002.
- KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M.U.; FIEGE, M.; et al. Dantrolene – A review of its 2pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anesthesia*, v.59, p.364-373, 2004.
- KRUMAN, I.I.; MATTSON, M.P.; Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.*, v.72, p.529-549, 1999.
- LAM, M.; DDUBYAK, G.; CHEN, L: et al. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, p.6569-6573, 1994.
- LEE, H.C.; CHO, D.Y.; LEE, W.Y. Pitfalls in treatment of acute cervical spinal cord injury using high-dose methylprednisolone: a retrospect audit of 111 patients. *Surg. Neurol.*, v.68, p.37-41, 2007.
- LEE, J.M.; YAN, P.; XIAO, Q.; et al. Methylprednisolone protects oligodendrocytes but not neurons alter spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v.28, n.12, p.3141-3149, 2008.
- LIU, H.N.; MOLINA-HOLGADO, E.; ALMAZAN, G. Glutamate-stimulated production of inositol phosphates is mediated by Ca^{2+} influx in oligodendrocyte progenitors. *Eur. J. Pharmacol.*, v.338, p.277-287, 1997.
- LI, S.; STYS, P.K. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J. Neurosci.*, v.20, p.1190-1198, 2000.
- LIU, H.N.; GIASSON, B.I.; MUSHYNSKI, W.E.; et al. AMPA receptor-mediated toxicity in oligodendrocyte progenitors involves free radical generation and activation of JNK, calpain and caspase 3. *J. Neurochem.*; v.82, p.398-409, 2002.
- LIU, X.Z.; XU, X.M.; HU, R. et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v.15, n.14, p.5395-5406, 1997.
- LIU, Y.P.; YANG, C.S.; CHEN, M.C.; et al. Ca^{2+} - dependent reduction of glutamate aspartate transporter GLAST expression in astrocytes by P2X7 receptor-mediated phosphoinositide 3-kinase signalling. *J. Neurochem.*, v.113, p.213-227, 2010.
- LOANE, D.J.; BYRNES, K.R. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*, v.7, p. 366-377, 2010.
- MATSUMOTO, T., TAMAKI, T.; KAEAKAMI, M. Early complications of high-dose methylprednisolone sodium succinato treatment in the follow-up of acutecervical spinal cord injury, *Spine*, v.26, p.426-430, 2001.
- MATUTE, C. Calcium dyshomeostasis in white matter pathology. *Cell. calcium*, v.47, p.150-157, 2009.
- MAUTES, A.E.M.; WEINZIERL, M.R.; DONOVAN, F.; et al. Vascular events after

- spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Physical therapy*, v.80, n.7, p.673-687, 2000.
- MCEWEN, M.; SPRINGER, J.E. A mapping study of caspase-3 activation following acute spinal cord contusion in rats. *J. Histochem. Cytochem.*, v.53, n.7, p.809-819, 2005.
- MORTON-JONES, R.T.; CANNELL, M.B.; HOUSLEY, G.D. Ca^{2+} entry via AMPA-type glutamate receptors triggers Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from ryanodine receptors in rat spiral ganglion neurons. *Cell. Calcium*, v.43, p.356-366, 2008.
- MUEHLSCHLEGEL, S.; RORDORF, G.; BODOCK, M.; et al. Dantrolene mediates vasorelaxation in cerebral vasoconstriction: A case series. *Neurocrit. Care*, v.10, p.116-121, 2009.
- MUEHLSCHLEGEL, S.; SIMS, J.R. Dantrolene: mechanisms of neuroprotection and possible clinical applications in the neurointensive care unit. *Neurocrit. Care*, v.10, n.1, p.103-115, 2009.
- MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, v.116, p.201-211, 1992.
- NIEBAUER, M.; GRUENTHAL, M. Neuroprotective effects of early vs. late administration of dantrolene in experimental status epilepticus. *Neuropharmacology*, v.38, p.1343-1348, 1999.
- OLBY, N. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. *Vet. Clin. Small Anim.*, v.40, p.791-807, 2010.
- OUARDOUZ, M; NIKOLAEVA, M.A; CODERRE, E.; et al. Depolarization-induced Ca^{2+} release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca^{2+} channel activation of ryanodine receptors. *Neuron.*, v.40, p.53-63, 2003.
- NASH, H.H.; BORKE, R.C.; ANDERS; J.J. Ensheating cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat pinal cord. *J. Neurosci.*, v.22, n.16, p.7111-7120, 2002.
- PARK, E.; LIU Y.; FEHLINGS, M.G. Changes in glial cell white matter AMPA receptor expression after spinal cord injury and relationship to apoptotic cell death. *Exp. Neurol.*, v.182, p.35-48, 2003.
- PENG, W.; COTRINA, M.L.; HAN, X.; et al. Systemic administration of fan antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *PNAS*, v.106, n.30, p.12489-12493, 2009.
- RABCHEVSKY, A.G.; FUGACCIA, I.; SULLIVAN, P.G.; et al. Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. *J. Neurosc. Res.*, v.68, p.7-18, 2002.
- RAY, S.K.; HOGAN, E.L.; BANIK, N.L. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res. Rev.* v.42, p.169-185, 2003.
- ROWLAND, J.W.; HAWRYLUK, G.W.J.; KWON, B.; et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg. Focus*, v.25, n.5, p.1-14, 2008.
- SALOMONE, S.; SOYDAN, G.; MOSKOWITZ, M.A.; et al. Inhibition of cerebral vasoconstriction by Dantrolene and Nimodipine. *Neurocrit. Care*, v.10, p.93-102, 2009.
- SAKURAI, M.; NAGATA, T.; ABE, K.; et al. Oxidative damage and reduction of

- redox factor-1 expression after transient spinal cord ischemia in rabbits. *J. Vasc. Surg.*, v.37, p.446-452, 2003.
- SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V.; ALBERDI, E.; IBARRETXE, G.; et al. Caspase-dependent and caspase-independent oligodendrocyte death mediated by AMPA and kainite receptors. *J. Neurosci.*, v.23, n.29, p.9519-0528, 2003.
- SEKHON, L.H.S.; FEHLINGS, M.G. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, v.26, p.s2-s12, 2001.
- ŞENTÜRK, M.; GÜLÇİN, I.; ÇİFTCI, M.; et al. Dantrolene inhibits human erythrocyte glutathione reductase. *Biol. Pharm. Bull.*, v.31, n.11, p.2036-2039, 2008.
- SHAN, L.; MA, S.; QIU, X.; et al. Hydroxysafflor Yellow A protects spinal cords from ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Neurosci.*, v.11, n.8, p.1-8, 2010.
- SILVA, C.M.O.; MELO, E.G.; ALMEIDA, A.E.R.F. et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.3, 2008.
- SUBERVIOLA, B.; GONZÁLEZ-CASTRO, A.; LORCA, J.; et al. Early complications of high-dose methylprednisolone in acute spinal cord injury patients. *Injury*, v.39, p.748-752, 2008.
- SUN, F.; LIN, C.L.G.; MCTIGUE, D.; et al. Effects of axon degeneration on oligodendrocyte lineage cells: dorsal rhizotomy evokes a repair response while axon degeneration rostral to spinal contusion induces both repair and apoptosis. *Glia*, v.58, p.1304-1319, 2010.
- TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress in Neurol.*, v.72, p.111-127, 2004.
- TAOKA, Y.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M.; et al. Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J. Neurotrauma*, v.18, p.533-543, 2001.
- TARLOV, M.; KLINGER, H. Spinal cord compression studies. II. Time limits for recovery after acute compression in dogs. *J. Neurotrauma*, v.9, p. 271-290, 1954.
- THORELL, W.E.; LEIBROCK, L.G.; AGRAWAL, S.K. Role of RyRs and IP3 after traumatic injury to spinal cord white matter. *J. Neurotrauma*, v.19, n.3, p.335-342, 2002.
- TORRES B.B.J.; CALDEIRA, F.M.C.; GOMES, M.G.; et al. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal cord after traumatic injury in rats. *Int. J. Exp. Path.*, v.91, p. 530-536, 2010a.
- TORRES, S.; SALGADO-CEBALLOS, H.; TORRES, J.L.; et al. Early reactivation versus antioxidant therapy after traumatic spinal cord injury in adult rats. *Neuropathol.*, v.30, p.36-43, 2010b.
- ÜNAL-ÇEVİK, I.; KILINÇ, M.; GÜRSOY-ÖZDEMİR, Y.; et al. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: cautionary note. *Brain Res.* v.1015, p.169-174, 2004.
- WANG, K.K.W. Calpain and Caspase: can you tell the difference? *TINS*, v.23, n.1, p.20-26, 2000.
- WANG, X.; ARCUINO, G.; TAKANO, T.; et al. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat. Med.*, v.10, n.8, p.821-827, 2004.

WANG, C.; NGUYEN, H.N.; MAGUIRE, J.L.; et al. Role of intracellular calcium stores in cell death from oxygen-glucose deprivation in neuronal cell line. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.22, p.206-214, 2002.

WEAVER, L.C.; GRIS, D.; SAVILLE, L.R.; et al. Methylprednisolone causes minimal improvement after spinal cord injury in rats, contrasting with benefits of an anti-integrin treatment. *J. Neurotrauma*, v.22, n.12, p.1375-1387, 2005.

WEBB, A.A.; NGAN, S.; FOWLER, J.D. Spinal cord injury I: A synopsis of the basic science. *Can. Vet J.*, v.51, p.485-492, 2010.

WEI, H.; LEEDS, P.; CHEN, R.; et al. Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentrations of 3-hydroxykynurenine: characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression. *J. Neurochem.*, v.75, p.81-90, 2000.

WU, J.; YANG, H.; QIU, Z. Effect of combined treatment with methylprednisolone and Nogo-A monoclonal antibody alter rat spinal cord injury. *J. Int. Med. Res.*, v.38, p.570-582, 2010.

XU, J.; FAN, G.; CHEN, S.; et al. Methylprednisolone inhibition of TNF- α expression and NF- κ B activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v.9, p.135-142, 1998.

YAN, P.; XU, J.; LI, Q.; et al. Glucocorticoid receptor expression in the spinal cord after traumatic injury in adult rats. *J. Neurosci.*, v.19, n.21, p.9355-9363, 1999.

ZHAO, F.; LI, P.; CHEN, S.R.W.; et al. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor. *The J. Biol. Chem.*, v.276, n.17, p.13810-13816, 2001.

7. ANEXO - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO CETEA/UFMG