

Fabíola Bono Fukushima

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO
PROPOFOL E DO ETOMIDATO EM RATOS SUBMETIDOS
AO TRAUMA MEDULAR ESPINAL**

Tese apresentada à UFMG, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em
Ciência Animal, na área de Medicina e
Cirurgia Veterinárias

Orientadora
Profa. Eliane Gonçalves de Melo

Co-orientadores
Prof. Humberto Pereira Oliveira
Prof. Renato Santiago Gomez

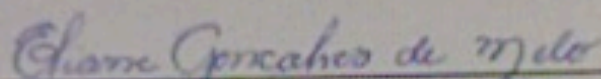
Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2012

F961a Fukushima, Fabíola Bono, 1981-
Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol e do etomidato em ratos submetidos
ao trauma medular espinal / Fabíola Bono Fukushima. - 2012.
85 p. : il.
Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo
Co-orientadores: Humberto Pereira Oliveira, Renato Santiago Gomez
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

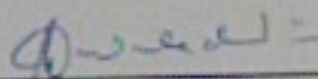
1. Rato como animal de laboratório - Teses. e. Traumatismos da medula espinal -
Teses. 3. Medicamentos - Administração - Teses. I. Melo, Eliane Gonçalves de.
II. Oliveira, Humberto Pereira. III. Gomez, Renato Santiago. IV. Universidade Federal
de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD - 636.088 5

Tese defendida e aprovada em 09 de março de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



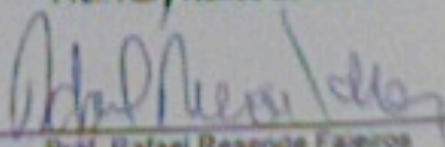
Prof.^a Eliane Gonçalves de Melo
Presidente



Prof. Carlos Augusto Araújo Valadão



Prof. Aury Nunes de Moraes



Prof. Rafael Resende Faleiros



Prof.^a Milene Alvarenga Rachid

"Aquilo que está escrito no coração não necessita de agendas porque a gente não esquece. O que a memória ama fica eterno."

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Ao Fer, meu grande e eterno amor, por estar sempre ao meu lado, por me esperar pacientemente e me amar incondicionalmente;

Aos meus pais e avós, pelo amor e pelo apoio durante todos esses anos, por terem feito de mim, o que sou hoje;

À Professora Eliane, minha orientadora, por me mostrar os caminhos com carinho e amizade, e por acreditar em mim;

À Fátima, minha grande amiga, pela amizade e companheirismo, por ser o meu braço direito, “o tico do meu teco”, e por dividir comigo as dificuldades e as conquistas;

Aos Professores Humberto e Renato Gomez, meus co-orientadores, por me guiarem durante a execução e escrita deste trabalho;

À Professora Milene Alvarenga, por auxiliar a mim e a toda equipe de neurologia nas avaliações histológicas, sempre de forma tão doce;

Aos Professores Geraldo Eleno, Rafael Faleiros, Christina Malm e Cleuza Rezende, por terem participado dessa longa caminhada, meu eterno carinho por vocês;

Ao Professor Álvaro Falcão, que com suas habilidades, nos ajudou a desenvolver o dispositivo para trauma medular;

Ao Professor Maurício Gino, pela amizade, paciência e ajuda na preparação das imagens;

Ao Professor Marcos Pinotti Barbosa, da Escola de Engenharia, pela disponibilidade e boa vontade em ajudar nas avaliações da dinâmica do trauma;

Aos Professores Aury Nunes, Carlos Valadão e, novamente, aos Professores Milene Alvarenga e Rafael Faleiros, por aceitarem participar da banca examinadora dessa tese, ajudando a lapidar este trabalho;

Aos amigos Bruno Lapertosa, Paula, Mário, Isabel, Karen, Carla, Pablo, Jankerle e Juneo, por toda ajuda, amizade, companheirismo e carinho. Sem vocês, teria sido tudo mais difícil;

Aos colegas Bruno Torres e Bernardo por me ajudarem na fase experimental deste trabalho;

Às funcionárias Eliane, Rosilene, Débora e Luzete, pela paciência e amizade;

Aos funcionários do Hospital Veterinário, pelo carinho e ajuda sempre;

Aos animais, ah eles!, razão eterna de meu estudo;

Ao CNPq por me conceder a bolsa de doutorado e por financiar este projeto;

À Escola de Veterinária da UFMG, por permitir que tudo isso fosse possível.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - Receptor ionotrópico do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiônico.

ANOVA - Análise de variância.

Apaf-1 - Fator ativador de protease apoptótica-1.

ATP - Trifosfato de adenosina.

BSA - Albumina sérica bovina.

c-DNA - Fita complementar de DNA, sintetizada a partir do RNA mensageiro.

CON⁻ - Grupo controle negativo.

CON⁺ - Grupo controle positivo.

CTL - Grupo controle negativo.

DAB - Diaminobenzidina, método de revelação para imunoistoquímica.

DAPI - 4',6-Diamidina-2-Fenilindola, corante nuclear fluorescente,.

DEPC - Água tratada com dimetil pirocarbonato.

DISC - Complexo sinalizador da indução de morte celular.

DI-TME - Dispositivo indutor de trauma medular espinal.

ETO - Grupo etomidato.

GABA_a - Receptor ionotrópico ácido gama-amino-butírico do tipo a.

HE - Técnica básica de Hematoxilina e Eosina.

IHQ - Imunoistoquímica.

IP - Intraperitoneal.

KCl - Cloreto de Potássio.

K₂HPO₄ - Fosfato de potássio di-básico.

LMT - Grupo laminectomia.

NaCl - Cloreto de Sódio.

NADH - Dinucleotídeo adenina nicotinamida, agente redutor, doador de elétrons.

NADP⁺ - Fosfato de dinucleotídeo adenina nicotinamida, forma reduzida.

Na₂HPO₄ - Fosfato de sódio di-básico.

NaH₂PO₄ - Fosfato de sódio mono-básico.

Neu-N - Proteína nuclear neurônio-específica.

NMDA - Receptor ionotrópico do N-Metil-D-Aspartato.

PBS - Solução tampão de fosfato.

PRO - Grupo propofol.

RT-PCR em tempo real - Reação em cadeia de polimerase transcriptase reversa, em tempo real.

SC - Subcutâneo.

SNC - Sistema nervoso central.

SNK - Teste de Student-Newman-Keuls.

SYBR green - Corante nuclear fluorescente.

T12 - Décima segunda vértebra torácica.

TBS - Salina tamponada de Trizma Base (Tris).

Teste de BBB - Teste de deambulação em campo aberto de Basso, Bettie e Bresnahan.

TME - Trauma medular espinal.

TNF: Fator de necrose tumoral.

TRM - Grupo trauma.

TTC - Coloração com trifeniltetrazolium.

TUNEL - Técnica de detecção *in situ*, de DNA celular fragmentado.

SUMÁRIO

FOLHA DE ASSINATURAS	iii
EPÍGRAFE	v
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE QUADROS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Modelos de indução de trauma medular espinal agudo	13
2.2 Fisiopatologia do trauma medular espinal agudo	13
2.3 Morte celular pós-trauma medular espinal	14
2.4 Neuroproteção anestésica	15
2.4.1 Propofol	16
2.4.2 Etomidato	17
2.5 Avaliação da atividade locomotora em campo aberto	17
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Experimento 1 - Padronização do trauma medular espinal experimental em ratos	27
4.1.1 Dispositivo indutor de trauma medular espinal	27
4.1.2 Procedimento cirúrgico e colheita de amostra líquor	27
4.2 Experimento 2: Avaliação da neuroproteção	29
4.2.1 Protocolo anestésico	29
4.2.2 Tratamentos	30
4.2.3 Avaliação neurológica	30
4.2.4 Avaliações histológica e imunoistoquímica	31
4.2.5 Avaliação da expressão gênica de indicadores de apoptose	33
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6. RESULTADOS	41

6.1 Experimento 1: Padronização do trauma medular espinal experimental em ratos	43
6.2 Experimento 2 - Avaliação da neuroproteção do propofol e do etomidato	43
6.2.1 Avaliação neurológica	43
6.2.2 Avaliações histológica e imunohistoquímica	45
6.2.2.1 Área da lesão	45
6.2.2.2 Marcação imunoistoquímica para proteína Neu-N	46
6.2.2.3 Detecção da fragmentação de DNA por TUNEL	49
6.2.2.4 Marcação por imunofluorescência para Bax	51
6.2.3 Avaliação da expressão gênica de indicadores da apoptose	53
7. DISCUSSÃO	55
7.1 Experimento 1 - Padronização do trauma medular espinal experimental em ratos	57
7.2 Experimento 2 - Avaliação da neuroproteção do propofol e do etomidato	58
8. CONCLUSÕES	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO 1 - Certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal	81
ANEXO 2 - Protocolo geral para imunoistoquímica (Neu-N)	82
ANEXO 3 - Protocolo para TUNEL: <i>FragEL Fragmentation Kit - TdT Enzyme</i>	83
ANEXO 4 - Protocolo para imunofluorescência (Bax)	84
ANEXO 5 - Medianas de deambulação em campo aberto (BBB) de ratos submetidos à laminectomia como controle negativo (CON⁻) e trauma medular espinal associado a anestesia com propofol (PRO), etomidato (ETO) ou placebo como controle positivo (CON⁺).	85

Lista de Figuras

Figura 1	Desenvolvimento do dispositivo para trauma medular espinal (DI-TME) para ratos. Em A, vista lateral do microscópio Winkel-Zeiss utilizado como base para o DI-TME. Em B, vista lateral superior do dispositivo para trauma medular. O dispositivo possui estrutura metálica de microscópio, uma plataforma de polietileno (PP) para posicionamento do animal, cremalheira lateral (CL) para regulagem transversal e longitudinal da mesa e parafuso de macrométrio (seta vermelha) para regulagem da altura do suporte em L (seta amarela). Observe a haste de aço inoxidável (seta preta), que causaria o impacto, contida em um tubo de mesmo material, fixado à extremidade livre do suporte em L, dentro do qual ela desliza antes de atingir a medula espinal exposta.	28
Figura 2	Procedimento cirúrgico para indução de trauma medular espinal em ratos: posicionamento da haste metálica para queda a uma altura de 15 mm.	29
Figura 3	Animal submetido ao trauma medular espinal experimental sendo observado no campo aberto para avaliação da capacidade locomotora. Observe ausência de apoio dos membros posteriores.	31
Figura 4	Concentração de glutamato no líquor de ratos submetidos a anestesia com isoflurano (CTL), laminectomia dorsal (LMT) e trauma medular espinal (TRM), com coleta de líquor 50 minutos e sete dias após o procedimento cirúrgico (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$). $n=3$.	43
Figura 5	Gráfico das medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, ao longo de sete dias, de ratos submetidos a laminectomia como controle negativo (CON^-) e ao trauma medular espinal associado aos tratamentos com propofol (PRO), etomidato (ETO) e placebo como controle positivo (CON^+), $n= 12$.	44
Figura 6	Média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem da área de lesão em relação ao tecido medular total em ratos submetidos a trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo como controle positivo (CON^+), propofol (PRO) e etomidato (ETO). Avaliação aos sete dias pós-operatório. ($n=5$).	45
Figura 7	Fotomicroscopias de secções transversais da medula espinal, na região do epicentro da laminectomia e/ou do trauma aos sete dias pós-operatório, coradas com hematoxilina e eosina (HE). Em A, animal do grupo controle negativo; em B, grupo controle positivo; em C, grupo etomidato; em D, grupo propofol (Barra = 398 μm).	46
Figura 8	Fotomicroscopias de secções transversais da medula espinal, na região do epicentro da laminectomia e/ou do trauma sete dias após procedimento cirúrgico, submetidas à marcação imunoistoquímica para Neu-N. Em A, marcação de corpos neuronais, na substância cinzenta, em um animal do grupo controle negativo (CON^-) (Barra = 115 μm). Observar a distribuição das células Neu-N positivas e a integridade do tecido medular. Em B, detalhes da região central, englobando canal ependimário de corte histológico do grupo CON^- (Barra = 64 μm). Em C, E e G marcação de corpos neuronais em animais dos grupos controle positivo (CON^+), etomidato (ETO) e propofol (PRO), respectivamente (Barra = 115 μm). Observar a distribuição das células Neu-N positivas e o tecido medular lesado. Em D, F e H, detalhes da região central, englobando canal ependimário, de animais dos grupos CON^+ , ETO e PRO, respectivamente (Barra = 64 μm).	47
Figura 9	Contagem média ($\pm$ erro padrão) de neurônios Neu-N positivos por campo em	49

	ratos submetidos a laminectomia, como controle negativo (CON⁻) e trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), etomidato (ETO) e propofol (PRO). Avaliação aos sete dias pós-operatório. (*p<0,05 e **p<0,001).	
Figura 10	Fotomicroscopias de secções transversais da medula espinal, na região do epicentro da laminectomia e/ou do trauma aos sete dias de pós-operatório, submetidas à imunomarcação por TUNEL. Observar núcleos marcados pelo TUNEL nos diferentes grupos experimentais (setas). Em A, grupo controle negativo (CON⁻). Em B, grupo controle positivo (CON⁺). Em C, grupo etomidato (ETO). Em D, grupo propofol (PRO) (Barra = 58 µm).	50
Figura 11	Contagem média (± erro padrão) de células TUNEL positivas por campo em ratos submetidos a laminectomia, como controle negativo (CON⁻) e trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), etomidato (ETO) e propofol (PRO). Avaliação aos sete dias pós-operatório. (*p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001).	51
Figura 12	Fotomicroscopias de secções transversais da medula espinal, na região do epicentro da laminectomia e/ou do trauma sete dias após o procedimento cirúrgico, submetidas à marcação por imunofluorescência com anticorpo anti-Bax. Observar intensidade de marcação das células nos diferentes grupos experimentais. Em A, grupo controle negativo (CON⁻). Em B, grupo controle positivo (CON⁺). Em C, grupo etomidato (ETO). Em D, grupo propofol (PRO) (Barra = 82 µm).	52
Figura 13	Média da intensidade integrada de pixels (± erro padrão) da marcação por imunofluorescência para anticorpo anti-Bax, em ratos submetidos a laminectomia, como controle negativo (CON⁻) e trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), propofol (PRO) e etomidato (ETO). Avaliação aos sete dias pós-operatório. (*p<0,05).	53
Figura 14	Médias da expressão gênica relativa (± erro padrão) de Bax (à esquerda) e de Bcl-XI (à direita) em ratos submetidos a trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), etomidato (ETO) e propofol (PRO), em relação ao grupo laminectomia, como controle negativo (CON⁻). Avaliação aos sete dias pós-operatório.	54
Figura 15	Médias da expressão gênica relativa (± erro padrão) de Caspase-9 (à esquerda) e de Caspase-3 (à direita) em ratos submetidos a trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), etomidato (ETO) e propofol (PRO), em relação ao grupo laminectomia, como controle negativo (CON⁻). Avaliação aos sete dias pós-operatório. (*p<0,05).	54

Lista de Quadros

Quadro 1	Escores e características locomotoras segundo o teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação da capacidade locomotora de ratos após trauma medular agudo.	18
Quadro 2	Genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.	35

RESUMO

A intervenção terapêutica na fase aguda do trauma medular espinal (TME) visa a controlar os eventos neurotóxicos secundários e interromper sua progressão. Nesse cenário, os anestésicos gerais se tornaram alvo de diversos estudos, uma vez que modulam proteínas responsáveis pela transmissão de sinais no sistema nervoso e que, comumente, são alteradas pela injúria medular. Dada a importância do emprego de um modelo para trauma medular padronizado e aos resultados promissores dos anestésicos injetáveis nos traumas ao sistema nervoso central, este trabalho objetivou padronizar um dispositivo indutor de trauma medular espinal para ratos e avaliar o efeito neuroprotetor do propofol e do etomidato em ratos submetidos ao trauma medular espinal. Para tanto, dois estudos foram conduzidos. No experimento I, foram utilizados 15 ratos, distribuídos em três grupos: controle negativo (CTL), laminectomia (LMT) e trauma (TRM). Os animais do grupo CTL foram submetidos apenas a anestesia geral e colheita de líquido. Nos grupos LMT e TRM, os animais foram submetidos a laminectomia dorsal da décima segunda vértebra torácica (T12), tendo os animais de TRM sofrido trauma medular espinal contuso pela queda de uma haste metálica de 10g a uma altura de 15mm sobre a dura mater exposta. Para avaliar o efeito do trauma infligido à medula, foi avaliada a concentração de glutamato no líquido no grupo CTL, 50 minutos após o procedimento cirúrgico e aos sete dias. Para o experimento II, 48 ratos machos adultos foram distribuídos igualmente em quatro grupos: controle negativo (CON⁻), controle positivo (CON⁺), propofol (PRO) e etomidato (ETO). Após anestesia com cetamina e xilazina, foi realizada laminectomia em T12 em todos os animais e TME nos grupos CON⁺, PRO e ETO. Decorrida uma hora, aplicou-se, por via intraperitoneal, solução fisiológica 0,9% (1,5 mL/kg), propofol (30 mg/kg) ou etomidato (3 mg/kg), de acordo com o grupo. Avaliou-se o déficit neurológico dos animais durante sete dias, utilizando a escala de avaliação de deambulação em campo aberto de BBB (Basso, Bettie e Bresnahan) e, após esse período, os animais foram submetidos a eutanásia e a medula espinal foi colhida para avaliação de viabilidade neuronal, fragmentação de DNA e expressão de indicadores de ativação das vias da apoptose, Bax, Bcl-Xl, Caspase-9 e Caspase-3. Os estudos foram conduzidos segundo delineamento inteiramente casualizado, sendo as comparações estatísticas realizadas pelos testes de Student-Newman-Keuls, Kruskal Wallis e Friedman ($p < 0,05$). Na avaliação da concentração de glutamato no líquido, foi observada maior quantidade desse neurotransmissor excitatório nos grupos LMT e TRM que no CTL, mostrando que o procedimento cirúrgico causou aumento de sua concentração. Contudo, a maior concentração de glutamato no grupo TRM que no LMT aos 50 minutos pós-trauma evidenciou um quadro de excitotoxicidade agudo causado pelo trauma espinal, sendo portanto padronizado o dispositivo indutor de trauma medular espinal. No experimento II, para o teste BBB, foi observada recuperação clínica mais precoce no grupo ETO, indicando uma melhor modulação da lesão secundária ao TME. Na avaliação de indicadores de apoptose, houve menor expressão da proteína Bax e da contagem média de corpos apoptóticos nos grupos ETO e PRO, bem como menor expressão gênica de Caspase-3 no grupo PRO quando comparados ao grupo CON⁺, indicando um possível efeito neuroprotetor desses fármacos. Conclui-se que o dispositivo indutor de trauma medular foi capaz de causar lesão medular espinal padronizada, caracterizada por quadro de excitotoxicidade. Além disso, o propofol e o etomidato possuem efeito neuroprotetor aos sete dias pós-trauma medular espinal, quando administrados na fase aguda da lesão espinal, estando envolvida a inibição do processo de morte celular por apoptose.

Palavras-chave: trauma medular espinal, neuroproteção, propofol, etomidato, rato.

ABSTRACT

Therapeutic intervention in the acute phase of spinal cord injury (SCI) aims to control the secondary neurotoxic process and to interrupt its progression. Thus, general anesthetics became target of diverse studies, since they can modulate proteins related to nervous system transmission, which are altered after spinal injury. Due to the importance of a standardized model of spinal cord injury and the promising results of injectable anesthetics in central nervous system injuries, this work intended to standardize a spinal cord injury device and to evaluate the neuroprotective effects of propofol and etomidate in rats submitted to contusive spinal cord injury. Therefore, two experiments were conducted. In the first one, 15 male rats were distributed in three groups: negative control (CTR), laminectomy (LMT), and trauma (TRM). Animals from group CTR were only submitted to general anesthesia and liquor collection. For the groups LMT and TRM, the animals were submitted to dorsal laminectomy of the twelfth thoracic vertebra (T12), being TRM animals submitted to SCI caused by the dropping of a 10g metallic rod from a 15mm height right above the exposed dura mater. In order to evaluate the effect of the spinal injury, glutamate concentration in the liquor was measured in CTR group, 50 minutes after the surgical procedure, and seven days later. For the second experiment, 48 adult male rats were equally distributed in four groups: sham (CON), positive control (CON⁺), propofol (PRO), and etomidate (ETO). After anesthesia with ketamine and xylazine, T12 laminectomy was performed in all animals, while only the animals from groups CON⁺, PRO, and ETO were submitted to SCI. One hour after the spinal injury, animals from groups CON⁺, PRO, and ETO received, intraperitoneally, a single dose of saline solution (1.5 mL/kg), propofol (30 mg/kg), and etomidate (3 mg/kg), according to the group. Neurological deficits of the animals was observed during seven days, using the BBB locomotor scale, and after that period, the animals were euthanized, and the spinal cord was collected for evaluation of neuronal viability, DNA fragmentation, and expression of apoptosis indicators, Bax, Bcl-XI, Caspase-9, and Caspase-3. The study was conducted following a completely randomized design, and the statistics comparisons were performed through SNK, Kruskal Wallis, and Friedman tests ($p < 0.05$). For glutamate concentration, higher concentration of this excitatory neurotransmitter in groups LMT and TRM than CTL, showed that the surgical procedure caused such increase. Nevertheless, the higher concentration of glutamate in TRM group, compared to LMT group 50 minutes after trauma, evidenced an acute excitotoxicity process caused by the SCI, standardizing therefore the spinal cord injury device. In experiment II, for the BBB test, earlier neurological improvement was observed for ETO group, pointing to a better modulation of the SCI secondary lesion. For the evaluation of apoptosis indicators, there was under-expression of Bax gene and fewer apoptotic bodies for ETO and PRO groups, as well as under-expression of Caspase-3 gene for PRO group when compared to CON⁺, indicating the neuroprotective effect of these drugs. Concluding, the SCI was able to cause standardized SCI, characterized by excitotoxicity. In addition to that, this study showed that propofol and etomidate have neuroprotective effect by the seventh day after spinal cord injury, when administered in the acute phase of the spinal lesion by the inhibition of the apoptosis pathway.

Key-words: spinal cord injury, neuroprotection, propofol, etomidate, rat.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O trauma medular espinal agudo é um evento catastrófico que, por vezes, produz sequelas que persistem por toda a vida do paciente e incluem perda parcial ou completa das funções motora e sensorial (Lou et al., 1998). Na medicina, as causas são diversas, sendo frequentemente acometido o homem, adulto jovem, com idade entre 20 e 39 anos (Tuono, 2008). A lesão medular nesses pacientes culmina com desgastes emocional e físico, somados ao elevado impacto econômico-social que acarreta ao país, isso decorrente de gastos médicos e da própria invalidez (Taoka e Okajima, 1998). Nos animais, a lesão medular ocorre, geralmente, por trauma externo (acidentes de trânsito ou quedas) e de trauma interno, principalmente por extrusão de disco intervertebral (Jeffery e Blackemore, 1999). Os animais acometidos, em muitos casos, são eutanasiados, levando também ao estresse emocional do proprietário (Bergman et al., 2000).

De modo geral, a lesão medular traumática resulta das forças biomecânicas e físicas que ocasionam o dano imediato e correspondem à lesão primária, de caráter irreversível. Em seguida, desencadeia-se uma cascata de eventos celulares e moleculares conhecidos como lesão secundária, os quais determinam a gravidade do dano tecidual. Dentre os mecanismos de lesão secundária que se estabelecem minutos ou horas após uma lesão traumática, destaca-se o aumento da concentração de aminoácidos excitatórios no meio extracelular, em especial o glutamato (McAdoo et al., 1999; Leonard e Kirby, 2002; Beattie, 2004).

Com o intuito de facilitar a compreensão desses mecanismos e ainda possibilitar a avaliação da eficácia de diferentes terapias, modelos experimentais de trauma medular espinal (TME) em animais foram desenvolvidos (Gaviria et al., 2000; Cayli et al., 2006; Silva et al., 2008; Torres et al., 2010). O primeiro modelo de TME contuso foi descrito por Allen (1911) e consistia em um peso em queda sobre a medula espinal. Esse modelo foi modificado ao longo dos anos, a fim de se alcançar uma técnica reprodutível, simples e de baixo custo (Taoka e Okajima, 1998; Gruner, 1992; Torres et al., 2010).

Como existe potencial para intervenções farmacológicas durante a fase aguda do processo patológico do trauma medular, estudos têm sido realizados com o intuito de limitar os estágios da cascata bioquímica e, assim, melhorar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (Jeffery e Blackemore, 1999; Bergman et al., 2000; Lu et al., 2000). Sob a hipótese de que mesmo pequenos ganhos em intervenções neuroprotetoras podem surtir efeitos relevantes na recuperação neurológica pós-trauma, os agentes anestésicos gerais injetáveis, dentre esses, o propofol e o etomidato, tornaram-se alvo de estudos relativos à injúria medular. Pesquisas com metodologias variadas têm demonstrado que esses fármacos possuem propriedades neuroprotetoras, mediadas por menor liberação de aminoácidos excitatórios, redução da peroxidação lipídica e da apoptose, reduzindo assim a perda tecidual e os déficits motores pós-trauma (Kaptanoglu et al., 2002; Cayli et al., 2006; Yamamoto et al., 2010; Yu et al., 2010).

Desse modo, dada a importância dessa afecção na traumatologia veterinária e na sociedade, bem como os possíveis benefícios clínicos das terapias neuroprotetoras, seria interessante avaliar o efeito neuroprotetor do etomidato e do propofol após trauma medular espinal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Modelos de indução de trauma medular espinal agudo

A escassez de modelos de contusão para roedores que correlacionem, de forma confiável, o grau de lesão com a intensidade do dano à medula espinal e com o déficit funcional, constitui um dos maiores desafios para que estratégias farmacológicas possam ser desenvolvidas e aplicadas a pacientes com TME. O modelo ideal deve reproduzir a natureza do trauma, resultando em um grau de lesão suficiente para ocasionar déficit funcional mensurável e, ainda, ser reversível e quantificável após a intervenção terapêutica (Cao et al., 2005; Zhang et al., 2008).

Historicamente, Allen (1911) foi quem descreveu o primeiro modelo experimental de trauma medular contuso em cães. O modelo se caracterizava pela queda de um determinado objeto, a partir de uma dada altura, sobre a medula espinal exposta, resultando em um impacto cuja energia era o produto dessa altura, medida em centímetros, pela massa do objeto, em gramas, sendo o atrito desconsiderado. Embora muitos pesquisadores tenham empregado esse modelo, a variabilidade no grau do trauma medular representou a principal limitação (Rivlin e Tator, 1978), sendo, deste modo, estabelecidas outras metodologias aplicadas em ratos. Dentre estas, a mais comumente empregada é o trauma contuso, o qual mimetiza as lesões causadas pela luxação ou fratura de uma vértebra em humanos e também em animais (Metz et al., 2000; Kim et al., 2009).

Ao longo dos anos, foram realizadas modificações ao trauma contuso (Ford, 1983; Carlson et al., 1998), algumas com tecnologias sofisticadas para o maior controle das variáveis biomecânicas (Gruner, 1992; Farooque, 2000; Gaviria et al., 2000; Ma et al., 2001; Zhang et al., 2008; Kim et al., 2009).

Além da técnica de contusão, foram também propostos a compressão por clip ou pinça (Rivlin e Tator, 1978), a compressão por balão extradural (Khan e Griebel, 1983), a transecção

medular (Basso et al., 1996a; Abe et al., 1999; Siegenthaler et al., 2007) e a compressão por peso (Silva et al., 2008; Torres et al., 2010), cada qual com vantagens e desvantagens na simulação do trauma medular.

Deste modo, a utilização de modelos de TME padronizados permitiu o desenvolvimento de protocolos terapêuticos diversos (Gaviria et al., 2000; Bull'on et al., 2005; Cakir et al., 2005; Kalayci et al., 2005; Otha et al., 2005; Cayli et al., 2006; Usul et al., 2006).

2.2 Fisiopatologia do trauma medular espinal agudo

Modelos experimentais e observações clínicas de indivíduos com injúria medular aguda demonstraram a ocorrência de um processo denominado de lesão primária, decorrente da transferência de energia cinética do trauma para a medula espinal. Esta é caracterizada como um evento passivo, geralmente de natureza irreversível (Bergman et al., 2000; Leonard e Kirby, 2002), que evolui para a liberação de eletrólitos, metabólitos e enzimas das células acometidas, ativando um conjunto de processos secundários (Lou et al., 1998; Beattie, 2004).

Estes processos secundários compreendem uma cascata complexa de reações bioquímicas, que amplificam tanto a morte celular, seja ela por necrose ou apoptose, quanto a degeneração axonal (Jeffery e Blakemore, 1999). Estas alterações se iniciam minutos ou horas após uma lesão traumática (Carlson et al., 1998) e podem se prolongar por dias ou meses (Liu et al., 1997; Lu et al., 2000), aumentando progressivamente a extensão da lesão (Beathie, 2004) e os déficits neurológicos (Carlson et al., 1998).

Durante a fase inicial que se segue ao TME, observa-se no local hemorragia petequial e trombose intravascular, decorrentes da ruptura traumática de vênulas e arteríolas. Adicionalmente, instala-se edema, principalmente, devido ao aumento da permeabilidade vascular ao redor da lesão inicial (Amar e Levy, 1999; Hagg e Oudega, 2006), o que reduz o fluxo sanguíneo medular e

leva à hipóxia (Hwan et al., 2006). A isquemia é exacerbada ainda pela hipotensão secundária à perda da auto-regulação medular, aumentando a sensibilidade às alterações hemodinâmicas sistêmicas (Tator e Fehlings, 1991).

Paralelamente, a isquemia esgota o suprimento de trifosfato de adenosina (ATP), levando à disfunção de processos dependentes de energia, como a bomba de sódio e potássio, responsável pela homeostase celular. Deste modo, íons passam a se mover passivamente através da membrana celular, de acordo com o gradiente de concentração. Isto leva ao efluxo de potássio e ao influxo de sódio, cloreto e cálcio, o que causa edema celular agudo (Amar e Levy, 1999).

Devido à isquemia e ao distúrbio eletrolítico que se instalam, tem início uma cascata de outras reações, conhecida como excitotoxicidade, que está relacionada à liberação exacerbada de neurotransmissores excitatórios endógenos, em especial o glutamato e o aspartato (Tymianski e Tator, 1996; Xu et al., 2004). Em relação ao glutamato, o aumento de sua concentração extracelular pode também se estabelecer através de mecanismos não-isquêmicos, já que a lesão traumática direta à célula produz o acúmulo local deste neurotransmissor e expõe as células adjacentes ao risco de dano excitotóxico (Lipton e Rosenberg, 1994).

O glutamato liberado pode atuar em diversas famílias de receptores, cada qual com distintas propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas (Lipton e Rosenberg, 1994), e que incluem os receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiônico (AMPA) e kainato, além dos receptores metabotrópicos, dependentes de segundo mensageiro. Deste modo, a ativação glutamatérgica de receptores específicos, principalmente os NMDA, aumenta o influxo neuronal de cálcio, que exerce papel crucial na regulação intracelular de sódio e potássio; na ativação de diversas enzimas fundamentais ao metabolismo e na sobrevivência neuronal, bem como na liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (Arundine e Tymianski, 2003).

Paralelamente, os desequilíbrios nos fluxos de cálcio, decorrentes tanto da isquemia quanto da excitotoxicidade, desencadeiam processos

dependentes deste íon, como ativação da fosfolipase-A₂, mobilização de ácidos graxos livres, geração de radicais livres de oxigênio e depleção de reservas de energia pela ativação de ATP dependente de cálcio. Também são atribuídas a este desequilíbrio iônico a modificação de componentes do citoesqueleto, alterações na fosforilação mitocondrial oxidativa, degeneração axonal e ativação de enzimas líticas (Lipton e Rosenberg, 1994; Tymianski e Tator, 1996). Por este motivo, a elevação na concentração de cálcio citoplasmática é postulada como sendo a via comum final, responsável pela morte celular em vários tecidos (Lipton e Rosenberg, 1994; Tymianski e Tator, 1996).

A resposta inflamatória aguda também corresponde a um importante fator no desenvolvimento da lesão secundária. Ela envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Bareyre e Schwab, 2003), relacionadas com o recrutamento de neutrófilos e micróglia (Carlson et al., 1998). Embora o processo inflamatório que se estabelece após o trauma medular espinal seja essencial para eliminar debris e auxiliar na cicatrização, seus benefícios podem ser suplantados pelo acúmulo de moléculas tóxicas produzidas pelas células inflamatórias e que lesam o tecido íntegro, como é o caso da produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos (Trivedi et al., 2006).

2.3 Morte celular pós-trauma medular espinal

De forma geral, o TME induz a formação de cavitações e a desmielinização no tecido nervoso, que podem progredir de forma centripeta, pela morte de neurônios e de células da glia durante a fase de lesão secundária, com consequente déficit neurológico. A morte celular ocorre por dois processos distintos: necrose e apoptose (Lu et al., 2000; Hagg e Oudega, 2006).

A morte celular por necrose, resposta passiva aos eventos deletérios pós-trauma medular espinal, é caracterizada por tumefação celular, perda de capacidade de produzir energia (ATP),

dano mitocondrial e perda da homeostase celular (Beattie et al., 1998; Lu et al., 2000). Essas alterações, em conjunto, levam à ruptura de organelas e à lise da membrana celular, determinando o extravasamento do conteúdo intracelular e a exacerbação da reação inflamatória local (Kwon et al., 2004).

A morte celular por apoptose, denominada morte programada, é um processo ativo que envolve a transcrição de genes e síntese protéica. É caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas que incluem a contração celular, a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA internucleossomal. São também observadas alterações na membrana celular que facilitam o reconhecimento e fagocitose dos corpos apoptóticos, sem a indução de resposta inflamatória (Majno e Joris, 1995; Lou et al., 1998).

A apoptose pode resultar de duas cascatas bioquímicas distintas conhecidas como vias extrínseca e intrínseca (mitocondrial), que se cruzam em diferentes pontos (Majno e Joris, 1995). Sucintamente, a ativação da via apoptótica extrínseca é iniciada pelo acoplamento de proteínas específicas (ligantes) a receptores transmembrana presentes na célula, como fator de necrose tumoral (TNF) e Fas, que transmitem sinais extracelulares de perigo à célula. Subsequentemente, ocorre ativação da caspase-8 e a formação de um complexo sinalizador da indução de morte (DISC), associada à ativação de outras caspases, como caspase-3, que cliva as proteínas intracelulares estruturais e regulatórias, culminando na apoptose.

De modo semelhante, a ativação da via intrínseca envolve a efetivação da via extrínseca, mas, devido à menor ativação de caspase-8, a via mitocondrial é iniciada. Desse modo, a caspase-8 cliva e ativa o Bid, um fator pró-apoptótico responsável pela liberação do citocromo-C da membrana mitocondrial interna e, como resultado, esta membrana torna-se permeável, levando ao edema dessa organela, seguido de ruptura da sua membrana externa (Schultz e Harrington, 2003).

Na via intrínseca pode ocorrer também a participação do fator protease ativador da apoptose (Apaf-1), que, por sua vez, ativa as

pró-caspases-9 e 3 (Adrain e Martin, 2001). Neste processo, a família de proteínas Bcl-2 possuem papel importante em prevenir (Bcl-2 e Bcl-xl) ou permitir (Bax) a apoptose, pois controlam a liberação do citocromo-C mitocondrial. Após a ativação das caspases 8 e 9, ocorre a clivagem e ativação de outras caspases da cadeia, como a caspase-3, levando à fragmentação do DNA celular (Adrain e Martin, 2001; Kawaguchi et al., 2005; Galluzzi et al., 2009).

Mesmo sendo um processo complexo, a morte celular neuronal por apoptose pode ser manipulada para criar estratégias que limitem esse processo e, assim, a melhorar a função motora pós-trauma medular espinal (Taoka e Okajima, 1998).

2.4 Neuroproteção anestésica

Os pacientes com TME que apresentam lesões associadas a outros sistemas orgânicos requerem intervenção cirúrgica em um curto espaço de tempo. Adicionalmente, indivíduos com compressão crônica da medula espinal devido à presença de neoplasias primárias ou metastáticas extradurais necessitam de anestesia geral para a descompressão medular (Grissom et al., 1994). Assim, considerando a importância dos procedimentos anestésicos nas diferentes situações clínicas, estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o efeito dos agentes anestésicos nos períodos pré, trans ou pós-trauma (Grissom et al., 1994; Sang et al., 2006; Yamamoto et al., 2010). Isto no intuito de prevenir ou reduzir as lesões secundárias relacionadas ao TME ou melhorar a recuperação neurológica (Baptiste e Fehlings, 2006; Cayli et al., 2006; Sakai et al., 2007). Contudo, a influência dos agentes anestésicos nos eventos relacionados ao TME ainda é pouco estudada (Cayli et al., 2006).

Os primeiros estudos sobre neuroproteção anestésica se basearam em avaliações eletrofisiológicas *in vivo*, que demonstraram que o tiopental sódico suprimia a atividade elétrica neuronal (Michenfelder, 1974; Kassel et al., 1980). Esse mecanismo de neuroproteção inicialmente proposto estava relacionado à

redução da demanda metabólica de oxigênio cerebral e, desta maneira, os neurônios da área isquêmica se tornavam menos susceptíveis ao insulto (Traul et al., 2008). Depois disso, foram conduzidos ensaios *in vitro* e *in vivo* com agentes anestésicos injetáveis e inalatórios (Reeker et al., 2000; Haelewyn et al., 2003; Elser et al., 2004; Turner et al., 2005; Pape et al., 2006; Statler et al., 2006; Kitano et al., 2007) que apontaram efeitos benéficos ou não. Durante esse período, surgiu o interesse em avaliar o efeito neuroprotetor dos anestésicos nos traumas medulares espinais (Haelewyn et al., 2003; Cayli et al., 2006). Estudos mais recentes demonstraram que esse efeito neuroprotetor ocorre por mecanismos múltiplos, incluindo a modulação daqueles relacionados à morte celular (Acquaviva et al., 2004; Engelhard et al., 2004a; Engelhard et al., 2004b).

2.4.1 Propofol

O propofol, cuja nomenclatura química é 2,6-diisopropilfenol, é um agente anestésico injetável da classe alquilfenol, com propriedades sedativa e hipnótica. O propofol é indicado para indução e manutenção de anestesia geral, bem como para sedação prolongada de pacientes adultos intubados e sob ventilação mecânica em unidades de terapia intensiva (Kay e Rolly, 1977; Borgeat et al., 1994; Wilbur e Zed, 2001). Esse anestésico age potencializando a transmissão inibitória GABA-érgica por meio da hiperpolarização pré-sináptica (Kikuchi et al., 1998; Murugaiah e Hemmings, 1998), diminuindo a liberação de glutamato e inibindo canais para cálcio e sódio (Ratnakumari e Hemmings, 1997; Buggy et al., 2000; Kitayama et al., 2002).

Como indica a própria classe farmacológica, é caracterizado por uma estrutura fenólica semelhante à da vitamina E e, portanto, com propriedades antioxidantes (Acquaviva et al., 2004). Por este motivo, o propofol se tornou um fármaco amplamente estudado, demonstrando ser capaz de proteger as células em modelos de estresse oxidativo, incluindo a mucosa intestinal (Santos et al., 2003; Liu et al., 2007), o miocárdio (Ko et al., 1997; Zhao et al., 2010);

os rins (Wang et al., 2007; Sánchez-Conde et al., 2008; Assad et al., 2009), a musculatura esquelética (Ergün et al., 2010) e o encéfalo (Yamaguchi et al., 2000; Engelhard et al., 2004; Adembri et al., 2006). Ensaios experimentais com modelos de isquemia e reperfusão demonstraram que a eliminação de radicais livres e a inibição da peroxidação lipídica estão envolvidas nesse mecanismo protetor (Peters et al., 2001; Vasileiou et al., 2009).

Com relação à proteção do sistema nervoso central (SNC), o propofol foi capaz de inibir a morte de neurônios (Yamaguchi et al., 2000; Engelhard et al., 2004a; Engelhard et al., 2004b; Adembri et al., 2006) e de astrócitos (Sitar et al., 1999; Peters et al., 2001; Acquaviva et al., 2004), bem como de reduzir a área de infarto e melhorar a recuperação funcional após isquemia e reperfusão encefálica (Statler et al., 2006). O mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, mas a neuroproteção pode ser decorrente da redução do metabolismo cerebral, potencialização de mecanismos inibitórios mediados pelos receptores GABA_A, bem como pela alteração do fluxo sanguíneo cerebral, pela sua atividade antioxidante (Daskalopoulos et al., 2001; Acquaviva et al., 2004; Bayona et al., 2004). Recentemente, os mecanismos de redução do número de receptores para glutamato e aumento da recaptação deste neurotransmissor também foram relatados (Cai et al., 2011).

Modelos de isquemia e reperfusão medular demonstraram que o propofol reduziu a peroxidação lipídica (Ke et al., 2005; Zeng et al., 2009b); normalizou o potencial motor evocado; preservou a integridade neuronal (Kumagai et al., 2006; Yamamoto et al., 2010) e inibiu o acúmulo de neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato) (Zeng et al., 2009a; Zeng et al., 2009b). Foram observadas também redução da reação inflamatória (Lin et al., 2008a) e da apoptose na medula espinal (Ke et al., 2005) associadas com recuperação funcional (Lin et al., 2008b).

Em modelos de TME, os estudos demonstraram resultados promissores quanto ao efeito neuroprotetor do propofol. Kaptanoglu et al. (2002) observaram que a administração de propofol imediatamente após o trauma medular contuso foi capaz de reduzir a peroxidação

lipídica. De modo semelhante, Gerçek et al. (2007) observaram redução da concentração de radicais livres de oxigênio (peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, hipoclorito, peroxinitrito e radicais superóxido) associada ao pré-condicionamento com propofol no trauma medular contuso experimental, de forma dose dependente.

2.4.2 Etomidato

O etomidato é um composto imidazólico carboxilado, cuja nomenclatura química é 1-(1-feniletil)1-H-imidazol-5-éter etil ácido carboxílico. É um potente fármaco hipnótico não-barbitúrico, com propriedades anticonvulsivantes (Wauquier, 1983). O etomidato potencializa a transmissão inibitória, secundária à ativação de subunidades específicas (β_2 e β_3) dos receptores GABA_A (Murugaiah e Hemmings, 1998; Lambert et al., 2005). Ele é usado para indução de anestesia e intubação orotraqueal rápidas em emergências, devido ao seu perfil hemodinâmico favorável e rápido início de ação (Smith et al., 2000; Yeung e Zed, 2002; Warner et al., 2009). Entretanto, a administração como infusão contínua é contraindicada, pois o uso prolongado do etomidato pode causar inibição persistente da função adrenocortical, com redução dos níveis de cortisol e de aldosterona (Zed et al., 2006).

Os estudos acerca dos efeitos não anestésicos do etomidato encontram-se, ainda, em estágio inicial, com resultados, muitas vezes, negativos (Drummond et al., 1995; Yagmurdu et al., 2004; Hanouz et al., 2008; Yuzer et al., 2009; Ergün et al., 2010). Foi demonstrado que o etomidato reduz a injúria neuronal no hipocampo de ratos submetidos à isquemia parcial do encéfalo frontal (Watson et al., 1992), inibe o aumento extracelular da concentração de glutamato e glicina (Patel et al., 1995) e atenua os déficits pós-traumáticos funcionais e histológicos na medula espinal (Cayli et al., 2006). O etomidato produziu, ainda, neuroproteção contra o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia (Ates et al., 2006). Contudo, a sua administração prolongada, antes e durante isquemia e reperfusão do córtex

cerebral não trouxe benefícios (Drummond et al., 1995).

Em relação à medula espinal, o efeito neuroprotetor do etomidato ocorreu a partir da manutenção da atividade antioxidante endógena (Cayli et al., 2006; Yu et al., 2010) e do balanço iônico (Yu et al., 2010), tanto em modelo de trauma medular contuso quanto de isquemia e reperfusão, quando administrado antes e durante a isquemia (Yu et al., 2010) ou imediatamente após o trauma (Cayli et al., 2006).

2.5 Avaliação da atividade locomotora em campo aberto

A avaliação comportamental em experimentos envolvendo trauma medular espinal objetiva: (1) associar o déficit funcional com a gravidade, localização e duração da lesão, (2) documentar a recuperação após a lesão medular com e sem a intervenção terapêutica em questão, e (3) identificar a integridade dos sistemas motor e sensorial envolvidos na recuperação pós-trauma (Basso, 2004).

Neste cenário, a ferramenta ideal para o estudo comportamental deve ser de fácil uso, sensível a pequenas mudanças de comportamento e capaz de avaliar rapidamente a função locomotora em um grande número de animais (Basso et al., 1995). Assim, diversos métodos de avaliação comportamental foram propostos, cada qual com suas vantagens, desvantagens e adaptações. Como exemplo, podem-se citar os testes de plano inclinado (Rivlin e Tator, 1978; Gale et al., 1985), placa quente (Gale et al., 1985), deambulação em barras (Hicks e D'Amato, 1975) e deambulação em campo aberto (Basso et al., 1995), dos filamentos de Von Frey (Liebscher et al., 2005) e de potencial eletrofisiológico evocado (Fehlings et al., 1987), dentre tantos outros. Apesar de existirem várias opções, o teste de locomoção em campo aberto utilizando a escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) tem sido o mais amplamente utilizado em estudos de TME (Scheff et al., 2002).

A escala BBB (Quadro1) foi descrita pela primeira vez em 1995, com o objetivo de

otimizar a avaliação locomotora proposta por Tarlov, muito utilizada naquela época. É um sistema de 22 pontos ordinais baseado em características comportamentais. Foi proposta com o objetivo de avaliar a recuperação funcional dos membros posteriores em ratos, após lesão medular espinal torácica (Basso et al., 1996a, Basso et al., 1996b, Metz et al., 2000). O escore 0 representa ausência de movimentação, enquanto o 21 corresponde a locomoção normal. Os escores de 1 a 8 representam o retorno de movimentos isolados nas articulações coxofemoral, femoro-tibio-patelar e tibio-társica. Os escores de 9 a 13 descrevem o retorno do apoio da pata e de movimentos coordenados com os membros anteriores. Os escores de 14 a 20 indicam o retorno da elevação dos dígitos durante o passo, do posicionamento apropriado da pata, da

estabilidade do tronco e da posição da cauda (Quadro 1) (Basso et al., 1996b, Šedý et al., 2008).

Para avaliação pelo teste BBB, o rato deve se locomover livremente em um campo aberto moldado em formato circular, com 90 cm de diâmetro e sete centímetros de altura, durante quatro minutos. O animal pode ser filmado para posterior avaliação por dois avaliadores que definem o escore, com base nos movimentos dos membros posteriores direito e esquerdo durante o período de um minuto (Basso et al., 1996a). É ideal realizar condicionamento prévio para familiarizar os animais ao procedimento e evitar o estresse durante as sessões, aumentando assim a atividade locomotora dos ratos no campo aberto (Basso et al., 1995; Šedý et al., 2008).

Quadro 1: Escores e características locomotoras segundo o teste de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) para avaliação da capacidade locomotora de ratos após trauma medular agudo.

Escores	Características	Comentários
0	Sem movimento observável dos MPs.	
1	Movimento discreto de uma das articulações dos MPs.	Discreto: $\leq 50\%$ da articulação.
2	Movimento extenso de uma articulação e possível movimento discreto de outra articulação dos MPs.	Extenso: $> 50\%$ da articulação.
3	Movimento extenso de duas articulações dos MPs.	2 articulações: coxofemoral e femorotibiopatelar.
4	Movimento discreto das três articulações dos MPs.	3 articulações: coxofemoral, femorotibiopatelar e tibiotársica.
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira dos MPs.	Terceira, geralmente tibiotársica.
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira dos MPs.	
7	Movimento extenso das três articulações dos MPs.	
8	Passada sem suporte de peso <i>ou</i> posicionamento plantar sem suporte de peso.	Extensão rítmica das três articulações.
9	Posicionamento plantar com suporte de peso somente em estação <i>ou</i> passada dorsal com suporte de peso ocasional, frequente ou consistente e sem apoio plantar.	Suporte de peso: contração do MP durante o posicionamento plantar da pata ou elevação do trem posterior em estação. Coordenação: 1 passo do MP para 1 passo do MA, passos do MP alternados.
10	Passos ocasionais com suporte de peso sem coordenação dos MPs com	Ocasional: $> 5\%$ e $\leq 50\%$.

	os MAs (MP-MA).	Passos: contato da face plantar com suporte de peso, avanço dos MPs para restabelecer contato plantar.
11	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso sem coordenação MP-MA.	Frequente: 51-94% do tempo.
12	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso e coordenação MP-MA ocasional	Consistente: > 95% do tempo.
13	Passos frequentes a consistentes com suporte de peso e coordenação MP-MA frequente.	
14	Passada plantar consistentemente coordenada, com a posição da pata predominantemente rotacionada durante contato inicial e retirada; passada plantar frequente, coordenação MP-MA consistente e ocasional passada dorsal.	Rotacionada: rotação interna ou externa da pata traseira, em estação ou durante o início do movimento
15	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos ausente ou ocasional durante avanço do membro, posicionamento da pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial.	Paralela: pata traseira paralela ao corpo, em estação ou durante o início do movimento
16	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos frequente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e rotacionada na retirada.	
17	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos frequente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada.	
18	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada.	
19	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda abaixada por parte ou todo o tempo de avaliação.	Cauda abaixada: cauda toca a superfície durante as passadas
20	Passadas plantares coordenadas consistentes, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda consistentemente elevada e instabilidade de tronco.	Cauda elevada: cauda não toca a superfície Instabilidade de tronco: mudança de peso lateralmente durante mudanças bruscas de direção e quedas
21	Marcha coordenada consistente, elevação dos dígitos consistente, pata predominantemente paralela ao corpo durante contato inicial e retirada, cauda consistentemente elevada e estabilidade de tronco consistente.	Estabilidade de tronco: pelve e cauda alinhados com o corpo durante a locomoção.

Cada escore representa um grupo único de características locomotoras (Adaptado de Basso et al., 1996b).
MP: membro posterior, MA: membro anterior.

Apesar de ser um exame de simples realização, requer treinamento minucioso dos avaliadores. Além disso, uma desvantagem importante do teste BBB é a não linearidade da escala, já que os escores mais baixos abrangem aspectos

grosseiros da locomoção, enquanto que os mais elevados incluem aspectos mais refinados do movimento, sem contudo representar uma melhora considerável na capacidade locomotora do animal (Sêdy et al., 2008). Por esta razão,

diversas modificações foram propostas, inclusive com a utilização de ferramentas tecnológicas (von Euler et al., 1997, Lankhorst et al., 1999; Metz et al., 2000, Wong et al., 2009), mas o escore BBB permanece como o padrão para avaliação clínica de ratos submetidos ao trauma da medula espinal torácico (Sědy et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Determinar os efeitos do propofol e do etomidato na evolução das lesões induzidas pelo trauma medular espinal experimental padronizado em ratos.

3.1 Objetivos específicos

Padronizar e validar o dispositivo para trauma medular espinal desenvolvido pela Escola de Veterinária da UFMG, mediante quantificação da concentração de glutamato no líquido céfalo-raquidiano.

Verificar os efeitos do propofol e do etomidato na recuperação na função locomotora pós-trauma medular espinal.

Avaliar se o propofol e o etomidato interferem na viabilidade neuronal e na morte celular aos sete dias pós-trauma medular espinal.

Estudar os mecanismos envolvidos na neuroproteção desses fármacos pela quantificação da expressão de indicadores das vias da apoptose: Bax, Bcl-Xl, Caspase-9 e Caspase-3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo 1).

Os ratos foram acondicionados em caixas plásticas com três a quatro animais em cada e receberam ração comercial para roedores¹ e água *ad libitum*, sendo submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas, em ambiente com temperatura entre 20 e 25°C. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Centro Experimental de Pequenos Animais (CEPA) da Escola de Veterinária da UFMG.

4.1 Experimento 1 - Padronização do trauma medular espinal experimental em ratos

Foram utilizados 15 ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, pesando entre 300 e 450 g, os quais foram submetidos a procedimento cirúrgico, com ou sem TME contuso, induzido por um dispositivo especialmente desenvolvido para essa finalidade.

4.1.1 Dispositivo indutor de trauma medular espinal

O dispositivo indutor de trauma medular espinal (DI-TME) para ratos foi desenvolvido pelo Prof. Álvaro Enéas Ribeiro Falcão de Almeida do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da UFMG, adaptando o aparelho descrito por Torres et al. (2010). O DI-TME consistiu de uma base de microscópio antigo² (Fig. 1A), na qual uma placa de polietileno, de uso culinário, de 23,0 x 19,5 cm, foi fixada com parafusos à mesa e ao *charriot* do microscópio, onde o animal era posicionado. Um suporte em forma de L de 4,0 (lado fixo) por 8,0 cm (lado livre) e 1,2 cm de largura, contendo um tubo de 0,5 cm

de diâmetro e 7,2 cm de comprimento, a 0,4 cm de sua extremidade livre, foi fixado ao braço do microscópio, com capacidade para se movimentar no sentido vertical, utilizando o parafuso do macrométrico, para o adequado posicionamento da haste metálica que causou o impacto sobre a medula espinal exposta (Fig. 1B).

4.1.2 Procedimento cirúrgico e colheita de amostra de líquido

Para realização dos procedimentos descritos abaixo, fez-se pré-medicação com cloridrato de tramadol³ (5 mg/kg, SC), indução e manutenção anestésica com isoflurano⁴, administrado por meio de máscara facial, em sistema de não-reinalação. Após atingirem plano anestésico cirúrgico, caracterizado por imobilidade, relaxamento muscular e perda da sensibilidade da cauda, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos:

Grupo CTL - controle negativo (n=3): foi realizada apenas a colheita de líquido.

Grupo LMT - laminectomia (n=6): os animais foram submetidos à laminectomia dorsal, sem trauma medular espinal. A colheita de líquido foi realizada aos 50 minutos (n=3) e aos sete dias após o procedimento cirúrgico (n=3).

Grupo TRM - trauma (n=6): os animais foram submetidos à laminectomia dorsal e ao trauma medular espinal contuso. A colheita de líquido foi realizada aos 50 minutos (n=3) e aos sete dias após o trauma medular (n=3).

Os animais do grupo controle negativo (CTL) foram submetidos apenas a anestesia geral com isoflurano em máscara facial seguida de colheita de líquido, sem procedimento cirúrgico. Os animais dos grupos laminectomia (LMT) e trauma (TRM) foram posicionados em decúbito esternal no dispositivo para trauma medular (Fig. 1) e o campo operatório, preparado assepticamente.

¹ Nuvilab® CR-1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo - PR, Brasil.

² Winkel-Zeiss Diagnostic Microscope n. 61999, Göttingen, Germany.

³ Tramadol® 50mg/mL, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira - SP, Brasil.

⁴ Isoforine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira - Sp, Brasil.

Para manter a temperatura corporal dos animais entre 36 e 37°C, uma bolsa de água a 80°C foi posicionada sob a plataforma do dispositivo,

sendo a temperatura monitorada a cada 15 minutos por termômetro retal.

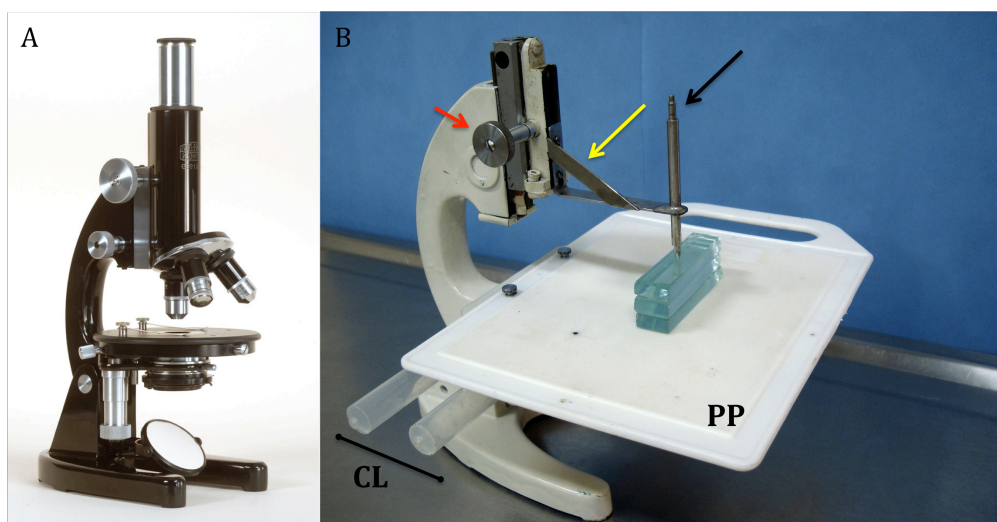


Figura 1: Desenvolvimento do dispositivo para trauma medular espinal (DI-TME) para ratos. Em A, vista lateral do microscópio Winkler-Zeiss utilizado como base para o DI-TME. Em B, vista lateral superior do dispositivo para trauma medular. O dispositivo possui estrutura metálica de microscópio, uma plataforma de polietileno (PP) para posicionamento do animal, cremalheira lateral (CL) para regulação transversal e longitudinal da mesa e parafuso de macrométrio (seta vermelha) para regulação da altura do suporte em L (seta amarela). Observe a haste de aço inoxidável (seta preta), que causaria o impacto, contida em um tubo de mesmo material, fixado à extremidade livre do suporte em L, dentro do qual ela desliza antes de atingir a medula espinal exposta.

Para o procedimento cirúrgico, foi realizada incisão de pele e de tecido subcutâneo na linha média dorsal, estendendo-se da oitava vértebra torácica (T8) a primeira lombar (L1). As inserções dos músculos epiaxiais foram incisadas e estes, afastados lateralmente. Com o auxílio de uma pinça hemostática Köcher, foi realizada a osteotomia do processo espinal da décima segunda vértebra torácica (T12) e em seguida, procedeu-se o desgaste da lâmina dorsal da respectiva vértebra com *drill* pneumático neurológico⁵, até que, através do osso, fosse possível visualizar a veia dorsal da medula. As brocas do *drill* foram constantemente irrigadas com solução fisiológica⁶ para evitar o aquecimento do tecido

ósseo. Para realizar a abertura da lâmina dorsal de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro e exposição da medula espinal, utilizou-se uma pinça hemostática de Halsted curva de 10 cm. Em seguida, o dispositivo foi ajustado utilizando a cremalheira lateral da base do microscópio, de modo a permitir o posicionamento da haste metálica no centro da área da laminectomia (Fig. 2). A haste foi confeccionada de aço inoxidável, com peso de 10 g, 9,3 cm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro, extremidade de 2,3 mm de diâmetro com bordas arredondadas e gradações em intervalos de 5,0 mm. O trauma medular espinal foi aplicado sobre a dura-máter, na linha média dorsal da medula espinal, pela queda da haste metálica de uma altura de 15 mm. Após o TME, o local foi irrigado com solução fisiológica e, em seguida, realizou-se a aproximação da musculatura e redução de espaço morto, empregando-se sutura em padrão simples

⁵ ECCOS® Aesculap, Laboratório B.Braun, São Gonçalo – RJ, Brasil.

⁶ Cloreto de sódio a 0,9%, Laboratório Sanobiol Ltda, Pouso Alegre – MG, Brasil.

contínuo com fio de polipropileno⁷ 3-0. A sutura de pele foi realizada em pontos simples separados utilizando-se o mesmo fio. Ao término das suturas, a anestesia foi descontinuada e os animais foram mantidos em plataforma de aquecimento, à 38°C, para recuperação anestésica. Para controle da dor pós-operatória, todos os animais receberam 5 mg/kg de cloridrato de tramadol⁸, por via oral, a cada 12 horas por cinco dias.

Decorridos 50 minutos (n = 6 animais) e sete dias (n = 6 animais) do procedimento cirúrgico, os animais dos grupos LMT e TRM foram novamente anestesiados com isoflurano para colheita de líquor e eutanásia. Para tanto, os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico⁹, com a cabeça reflexionada ventralmente, facilitando, deste modo, a punção do espaço atlanto-occipital. Após a colheita de 50 a 80 µL de líquor, todos os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico¹⁰ (100 mg/kg), por via intraperitoneal.

As amostras de líquor foram imediatamente processadas para dosagem enzimática dos níveis de glutamato, pela fluorescência emitida pela produção de NADH (um produto naturalmente fluorescente quando excitado por luz ultravioleta) na presença de glutamato desidrogenase e NADP⁺ (Nicholls et al., 1987). Para o ensaio, foram adicionados 1,5 mL de solução de incubação KRB (122 mM NaCl; 3,1 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 1,8 mM Na₂HPO₄; 0,2 mM NaH₂PO₄; pH 7,4), 5,0 µL de NADP⁺ (1 mM), 50 U de glutamato desidrogenase, e 50 µL da amostra. Após 10 minutos, a emissão da fluorescência foi detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro¹¹, com excitação ajustada no comprimento de onda de 350 nm e emissão em 450 nm.

⁷ Prolene®, Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos – SP, Brasil.

⁸ Tramadon® 100mg/mL, solução oral, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira – SP, Brasil.

⁹ Estereotáxico 1 Torre (EFF 331), Insight® Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto - SP, Brasil.

¹⁰ Tiopentax® 1g, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira - Sp, Brasil.

¹¹ Spectrofluorophotometer (RF-5301 PC), Shimadzu Scientific Instruments, Tokio, Japan.

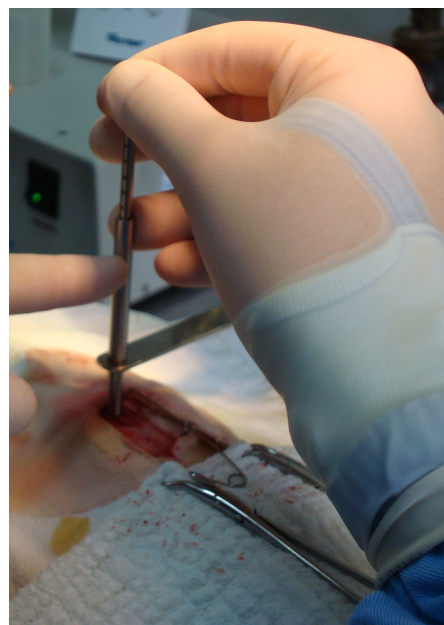


Figura 2: Procedimento cirúrgico para indução de trauma medular espinal em ratos: posicionamento da haste metálica para queda a uma altura de 15 mm.

4.2 Experimento 2 - Avaliação da neuroproteção

Foram utilizados 48 ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Sprague-Dawley, pesando entre 300 e 450 g, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB), da UNICAMP.

4.2.1 Protocolo anestésico

Para realização do TME, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina¹² (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina¹³ (8 mg/kg), associados na mesma seringa e aplicados intraperitonealmente (Flecknell, 2009; Guizar-

¹² Ketamina Agener 10%, Agener União – Saúde Animal, São Paulo – SP, Brasil.

¹³ Virbaxyl® 2%, Virbac – Saúde Animal, São Paulo – SP, Brasil.

Sahagún et al., 2009). Para tanto, os animais foram contidos manualmente em decúbito dorsal e posicionados com a cabeça mais baixa que os membros pélvicos, sendo a injeção realizada no quadrante inguinal esquerdo. Após atingirem plano anestésico, o campo cirúrgico foi preparado para cirurgia asséptica, e os ratos foram posicionados em decúbito esternal sobre a base do DI-TME. Todos os animais foram pré-medicados com cloridrato de tramadol (5 mg/kg) e receberam cefalotina sódica¹⁴ (60 mg/kg) como antibiótico profilático, ambos por via subcutânea, 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. Os ratos foram mantidos sob respiração espontânea em máscara facial com oxigênio a 100%. Adicionalmente, a base do DI-TME foi aquecida de modo a manter a temperatura corporal dos animais entre 36 e 37°C, a qual foi monitorada, constantemente, por termômetro retal.

O TME foi realizado como descrito no Experimento 1. Para controle da dor pós-operatória, todos os animais receberam 5 mg/kg de cloridrato de tramadol, por via oral, a cada 12 horas por cinco dias.

4.2.2 Tratamentos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com 12 ratos cada:

Grupo CON⁻ - controle negativo: os animais deste grupo foram submetidos a laminectomia dorsal em T12, sem contudo, ser realizado o trauma medular espinal.

Grupo CON⁺ - controle positivo: os animais foram submetidos a laminectomia dorsal em T12 e trauma medular espinal. Uma hora após o trauma, receberam solução fisiológica (0,15 mL/100 g) por via intraperitoneal.

Grupo PRO - propofol: os animais foram submetidos a laminectomia dorsal em T12 e trauma medular espinal. Uma hora após o

trauma, receberam propofol¹⁵ (30 mg/kg) por via intraperitoneal.

Grupo ETO - etomidato: os animais foram submetidos a laminectomia dorsal em T12 e trauma medular espinal. Uma hora após o trauma, receberam etomidato¹⁶ (3 mg/kg) por via intraperitoneal.

4.2.3 Avaliação neurológica

Antes do procedimento cirúrgico, todos os animais foram adaptados em um campo aberto (*open field*) de um metro de diâmetro e 20 cm de altura, para reduzir o estresse da manipulação e facilitar as avaliações pós-operatórias. Durante o período de adaptação, os animais foram colocados dois a dois no campo aberto durante 10 minutos, diariamente, por três dias, permitindo que eles se movimentassem livremente e explorassem o ambiente.

A função locomotora dos animais foi avaliada 24 horas antes da intervenção cirúrgica, 24 horas após a laminectomia e diariamente, durante sete dias. O exame neurológico consistiu na avaliação da capacidade locomotora, baseando-se na observação da atividade espontânea do animal em campo aberto, sem obstáculos (Fig. 3). Para tanto, todos os animais foram observados e filmados durante três minutos e, posteriormente os vídeos foram assistidos por dois avaliadores sem conhecimento do grupo a que pertenciam. De acordo com a escala BBB, cada animal recebeu um escore, que variou de 0 a 21 (Quadro 1).

¹⁴ Keflin® 1g, Antibióticos do Brasil Ltda., Cosmópolis – SP, Brasil.

¹⁵ Propovan® 1%, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira – SP, Brasil.

¹⁶ Etomidato 2 mg/mL – Produto genérico, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira – SP, Brasil.



Figura 3: Animal submetido ao trauma medular espinal experimental sendo observado no campo aberto para avaliação da capacidade locomotora. Observe ausência de apoio dos membros pélvicos.

4.2.4 Avaliações histológica e imunohistoquímica

Sete dias após o trauma medular, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico¹⁷ (100 mg/kg) por via intraperitoneal e submetidos a perfusão transcardíaca com PBS (solução tampão de fosfato) a 0,15M (137 mM NaCl; 30 mM KCl; 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM K₂HPO₄, pH 7,4) e em seguida, com solução de formaldeído tamponado a 10%. Sete dias após fixação em solução de formaldeído, a coluna vertebral foi dissecada, e um segmento de medula espinal de 0,7 cm foi colhido, equivalente ao epicentro da lesão. Posteriormente, os fragmentos foram processados pela técnica de rotina para inclusão em parafina e submetidos a cortes transversais seriados de 4,0 µm.

¹⁷ Tiopentax® 1g, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira – SP, Brasil.

Para avaliação da área de lesão, três cortes histológicos seriados do epicentro da lesão, intervalados de aproximadamente 150 µm, foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina¹⁸, sendo a morfologia avaliada em microscópio óptico (Luna, 1968). Os cortes foram fotografados e, em seguida, foi determinada a relação entre a área de tecido medular com alterações morfológicas dividida pela área total da medula espinal, utilizando *software* ImageJ® (versão 1.33u, *National Institutes of Health, USA*).

Adicionalmente, foi realizada imunohistoquímica para avaliação da expressão de anticorpo primário anti-NeuN (1:1000)¹⁹ para contagem neuronal. Para cada animal, foram coradas três lâminas com cortes histológicos seriados,

¹⁸ H&E – Sigma - Aldrich, St. Louis, MO - USA.

¹⁹ NeuN - Chemicon Internacional Inc., Temecula, CA - USA.

intervalados de aproximadamente 150 µm. A técnica de imunistoquímica seguiu os padrões determinados pelo fabricante e as lâminas foram visualizadas à microscopia óptica. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas silanizadas e armazenados em estufa a 37°C. Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em uma sequência gradual de alcoóis. Realizou-se a recuperação antigênica em tampão citrato em água destilada (0,01 M, pH 6,0) a 98°C, bloqueio das peroxidases em peróxido de hidrogênio a 3% em álcool metílico, seguido pela incubação em soro bloqueio²⁰ e pernoite em anticorpo primário a 4°C. No dia seguinte, foi feita incubação em anticorpo secundário universal¹⁹, seguida pelo complexo estreptavidina-biotina-peroxidase²¹, revelação em diaminobenzidina (DAB)²² e contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Anexo 2). Para controle negativo foi utilizada solução PBS (10,4 mM Na₂HPO₄; 3,6 mM NaH₂PO₄, 123,2 mM NaCl, pH 7,2) substituindo o anticorpo primário. A contagem de células marcadas foi realizada em microscópio óptico, em objetiva de 40x, com auxílio de uma grátula reticulada em 121 pontos²³. Foram contados os corpos neuronais marcados pelo anticorpo Neu-N em dez campos histológicos. O número de campos foi determinado de modo a abranger toda a substância cinzenta. O resultado obtido correspondeu à média de células Neu-N positivas por campo.

Foi realizada ainda a avaliação da fragmentação de DNA, *in situ*, pelo método TUNEL (*TdT mediated-dUTP Nick End Labeling*). Assim, foi utilizado um corte histológico de cada animal, representando o ponto central do epicentro da lesão. Após desparafinização, os cortes histológicos foram processados utilizando-se *kit* comercial²⁴, de acordo com as instruções do fabricante. Os cortes foram submetidos a desparafinização em xilol e hidratação em uma

sequência gradual de alcoóis. Em seguida, foi realizada a permeabilização das amostras com 0,5% de triton X-100 em água destilada, recuperação antigênica com proteinase K em Tris base (NH₂C(CH₂OH)₃) a 0,01 M, bloqueio das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, seguida de incubação em tampão para equilíbrio, inserção de nucleotídeos em tampão de reação TdT em câmara umidificada, incubação em estreptavidina-biotina-peroxidase, revelação com DAB em peróxido de hidrogênio e contra-coloração com *Methyl Green* (Anexo 3). Para controle negativo foi utilizada solução TBS (salina tamponada de Trizma Base) (60 mM NaCl; 20 mM Tris Base, pH 7,6) substituindo a enzima TdT. De forma semelhante à marcação da proteína Neu-N, a contagem de células marcadas foi realizada em microscópio óptico, em objetiva de 40x, com auxílio de uma grátula reticulada em 121 pontos. Foram contados corpos apoptóticos marcados em 15 campos, abrangendo as substâncias cinzenta e branca, e o resultado obtido correspondeu à média de células TUNEL positivas por campo.

Foi realizada também avaliação por imunofluorescência da expressão de anticorpo primário anti-Bax para avaliação da ativação da via intrínseca da apoptose. Para essa avaliação foi utilizado um corte histológico de cada animal, representando o ponto central do epicentro da lesão. De forma sucinta, os cortes foram mantidos sob luz ultravioleta durante duas horas para redução da autofluorescência. Em seguida, foram desparafinados em xilol e hidratados em uma sequência gradual de alcoóis. Realizou-se permeabilização com triton X-100 a 0,1%, recuperação antigênica em tampão citrato (0,01 M, pH 6,0) a 98°C, bloqueio das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% em álcool metílico e com soro de cabra a 5% em albumina sérica bovina (BSA) a 1%. Para maior controle da autofluorescência, os cortes foram ainda incubados em Sudan Black B a 0,01% em etanol 70° e em seguida, incubados pernoite com anticorpo primário anti-Bax (diluição 1:100)²⁵ a 4°C. No dia seguinte, foi feita incubação em

²⁰ Protein block, Serum Free (X0909-1), Dako North America Inc., Carpinteria, CA - USA.

²¹ Universal LSAB[®] + kit/HRP, Rb/Mo/Goat (K0690-1), Dako North America Inc., Carpinteria, CA - USA.

²² Liquid DAB⁺ (K3468-1), Dako North America Inc., Carpinteria, CA - USA.

²³ Olympus[®], Eyepiece Micrometer 20.4mm OCM 10/10/SQ, Dublin - Ireland.

²⁴ FragEL[®] DNA Fragmentation Detection Kit TdT Enzyme, Merck, Darmstadt, Germany.

²⁵ Bax P-19 (SC 526), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz – CA, USA.

anticorpo secundário²⁶ e DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole)²⁷ (Anexo 4). Para controle negativo foi utilizada solução de BSA a 1% em PBS 0,15 M (137 mM NaCl; 30 mM KCl; 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM K₂HPO₄, pH 7,2) substituindo o anticorpo primário. As lâminas permaneceram congeladas a -20°C e protegidas da luz, até o momento da leitura. Os cortes histológicos foram avaliados em um microscópio invertido de fluorescência²⁸ equipado com sistema ApoTome, utilizando-se filtro 488 nm e objetiva de 20x, sendo fotografados três campos por corte distribuídos no funículo dorsal e nos cornos dorsais. O tempo de exposição foi ajustado e padronizado na lâmina controle negativo e, sem seguida, usado igualmente em todos os cortes.

As imagens foram avaliadas utilizando *software* ImageJ[®]. Para cada imagem, quantificou-se, de forma sistemática e com o auxílio desse *software*, a média da densidade integrada de pixels das células, subtraída do *background*.

4.2.5 Avaliação da expressão gênica de indicadores de apoptose

Foi empregada a técnica de PCR transcriptase-reversa (RT-PCR) em tempo real para avaliação da expressão gênica de Bax, Bcl-Xl, Caspase-3 e Caspase-9 como forma de avaliar a ativação das vias de apoptose. Os primers referentes aos genes para Caspases-9 e 3 e o gene normalizador (β -actina) foram delineados utilizando a base de dados de nucleotídeos do portal do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e as ferramentas para análise de sequências gênicas (*Pick Primers e Blast*). Os primers para Bax e Bcl-Xl foram obtidos a partir de estudos anteriores em ratos (Li et al., 2005; Nagel et al., 2010).

Para tanto, sete dias após a laminectomia e TME, sete animais de cada grupo foram eutanasiados com tiopental sódico (100 mg/kg

IP). Após a eutanásia, os animais foram dissecados de forma asséptica e um fragmento de medula espinal do sítio da lesão, de 5,0 mm de comprimento, foi colhido e congelado, imediatamente, em nitrogênio líquido, para posterior conservação a -80°C em freezer de ultra-baixa temperatura²⁹. A extração do RNA total foi realizada em três etapas. Na primeira (fase de homogeneização), as amostras de tecido foram trituradas e misturadas em 1,0 mL de reagente Trizol³⁰, seguida pela incubação a temperatura ambiente por cinco minutos para permitir a completa dissociação dos complexos nucleotídeos. Na etapa seguinte (fase de separação), foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e, após agitação manual, os microtubos foram incubados à temperatura ambiente por três minutos e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Como resultado da centrifugação, a mistura foi separada em três fases, mas apenas a fase aquosa superior, que continha o RNA, foi colhida. Na terceira etapa (fase de precipitação do RNA), foi adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico e o material foi incubado a -80°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1,0 mL de etanol a 75%. Os microtubos foram novamente centrifugados a 7.500 g por cinco minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado mais uma vez. O *pellet* de RNA foi ressuspensionado em 20 μ L de água DEPC³¹, livre de RNase, e incubado por 10 minutos a 55°C para ser então estocado a -80°C.

Para confecção do cDNA, a concentração de RNA de cada animal foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm por espectrofotometria. Com base nesses valores, foram realizadas as reações de transcrição reversa. Este processo consistiu na diluição de 1,0 μ g de RNA de modo a se obter 8,0 μ L de solução final. Após a adição de 2,0 μ L de RT Enzyme Mix e 10,0 μ L de 2X RT Reaction

²⁶ Alexa Fluor[®] 488, goat anti-rabbit (A11008), Invitrogen, Carlsbad - CA, USA.

²⁷ DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis - MO, USA.

²⁸ Microscópio Axiovert 200M, Carl Zeiss, Göttingen, Germany.

²⁹ Revco DxF, Thermo Fisher Scientific, Waltham - MA, USA.

³⁰ Trizol[®], Invitrogen, Carlsbad - CA, USA.

³¹ Água tratada com dimetil pirocarbonato (DEPC), Invitrogen, Carlsbad - CA, USA.

Mix³² ao RNA, as amostras foram incubadas em um termociclador de acordo com o seguinte programa: 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 85°C por cinco minutos. A reação foi finalizada com a adição de 1,0 µL de *E. coli* RNase H²⁵ em cada amostra e incubação por mais 20 minutos a 37°C. Os microtubos foram armazenados a -20°C para posterior realização do RT-PCR em tempo real.

Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados 12,5 µL do reagente *SYBR Green*³³, 5 pM de cada iniciador, 1,0 µL de Rox a 50 nM, 7,0 µL de água DEPC e 2,5 µL de cada cDNA em um volume final de 25 µL. Esta mistura e cada cDNA foram pipetados em uma placa de 96 poços³⁴ e a leitura foi feita no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System³⁵. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA de *Rattus norvegicus* (Quadro 2). A expressão gênica foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, na qual os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente em relação ao grupo CON, após normalização baseada na expressão de beta actina da referida espécie animal.

³² SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, Carlsbad - CA, USA.

³³ SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, Carlsbad - CA, USA.

³⁴ 96-well optical reaction plate with barcode, Applied Biosystems, Carlsbad - CA, USA.

³⁵ 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Carlsbad - CA, USA.

Quadro 2: Genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.

Gene	Iniciadores (<i>Primers</i>) (sequências de nucleotídeos 5' a 3')	Tamanho do produto	Nº acesso	Referência
Beta actina	forward: GCGTCCACCCGCGAGTACAA reverse: ACATGCCGGAGCCGTTGTCG	118	NM_031144.2	-
Caspase-3	forward: AGGCGACTACTGCCGGAGTCTG reverse: CTCTGTACCTCGGCAGGCCTGAAT	70	NM_012922.2	-
Caspase-9	forward: TGGAGGAGGCTGACCGGCAA reverse: CCACAGCTCCGCGACTTGCA	77	NM_031632.1	-
Bax	forward: CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC reverse: AGTTGCCATCAGCAAACATGTCA	147	NM_017059.1	Nagel et al., 2010
Bcl-XI	forward: CCCCAGAAGAACTGAACCA reverse: AGTTTACCCCATCCCGAAAG	300	NM_031535.2	Li et al., 2005

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Empregou-se delineamento inteiramente casualizado, sendo os dados analisados pelo *software* Prism 4 for Mac (*GraphPad Software - Demo Version*, La Jolla, CA, USA). Para determinar se os dados eram paramétricos (concentração de glutamato no líquido, contagem de células marcadas para anticorpos NeuN e Bax, TUNEL e expressão gênica por PCR em tempo real de Bax, Bcl-Xl, Caspase-9 e Caspase-3), empregou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e o teste de homocedasticidade de Bartlett. As variáveis com distribuição normal (área da lesão, Neu-N, Bax e TUNEL) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação das médias de Student-Newman-Keuls (SNK). As variáveis descontínuas (concentração de glutamato e expressão gênica de Bax, Bcl-Xl, Caspase-3 e Caspase-9) foram normalizadas por meio de transformação logarítmica, em base 10. Os dados transformados que passaram nos testes de normalidade foram analisadas como tal. Para a dosagem de glutamato, empregou-se ANOVA de duas vias, para as demais variáveis, ANOVA de uma via. A razão da expressão relativa de Bax/Bcl-Xl manteve sua distribuição descontinua, mesmo após transformação logarítmica, sendo as medianas comparadas pelos testes de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn.

Para avaliação neurológica, expressa em escores, foi utilizado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos em cada momento de avaliação e teste de Friedman para comparação de momentos em cada grupo. Para ambas as avaliações, as comparações foram realizadas pelo teste post-hoc de Dunn. Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5%.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1 - Padronização do trauma medular espinal experimental em ratos

Os valores médios ($\pm$ erro padrão) da concentração de glutamato no líquor foram de $3,85 \pm 0,86$ (CTL); $56,6 \pm 10,60$ (LMT 50

minutos); $159,4 \pm 31,78$ (TRM 50 minutos); $51,11 \pm 7,31$ (LMT 7 dias) e $32,84 \pm 12,41$ (TRM 7 dias) pmol por miligrama de proteína.

A concentração de glutamato no líquor foi maior nos animais dos grupos LMT e TRM aos 50 minutos e aos sete dias após a cirurgia em relação ao grupo CTL ($p < 0,001$). A concentração de glutamato do grupo TRM foi maior em relação ao grupo LMT somente aos 50 minutos após a cirurgia ($p < 0,05$) (Fig. 4).

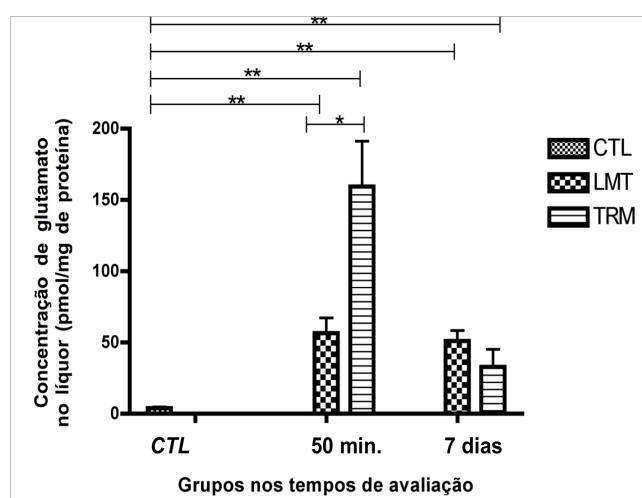


Figura 4: Concentração de glutamato no líquor de ratos submetidos a anestesia com isoflurano (CTL), laminectomia dorsal (LMT) e trauma medular espinal (TRM), com coleta de líquor 50 minutos e sete dias após o procedimento cirúrgico (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$). $n=3$.

6.2 Experimento 2 - Avaliação da neuroproteção do propofol e do etomidato

6.2.1 Avaliação neurológica

Todos os animais apresentaram escore 21 na avaliação pré-trauma, caracterizado por marcha normal, suporte de peso nos quatro membros, cauda elevada e estabilidade do tronco.

Os animais do grupo CON⁻ mantiveram o escore máximo no teste após o procedimento cirúrgico (Fig. 5). Nos animais dos grupos ETO e PRO, foi observada, no primeiro dia pós-trauma,

paraparesia simétrica dos membros pélvicos, com movimentação discreta a extensa de três articulações, sem suporte de peso, característica dos escores 5 a 8 do teste BBB. No grupo CON⁺ foi evidenciada paraparesia com movimentação discreta de apenas uma ou duas articulações, representada pelo escore 1.

Na comparação entre os dias de avaliação em cada grupo (teste de Friedman e post-hoc com teste de Dunn, $p < 0,05$), o escore BBB indicou diferença significativa entre a avaliação pré-trauma e os três primeiros dias pós-trauma para o grupo ETO ($p < 0,01$) e os quatro dias iniciais

para os grupos PRO ($p<0,05$) e CON^+ (Anexo 5).

Na comparação entre tratamentos para os dias de avaliação (teste de Kruskal-Wallis e post-hoc com teste de Dunn, $p<0,05$), observou-se diferença significativa entre os grupos submetidos ao trauma medular espinal, ETO ($p<0,05$), PRO ($p<0,01$) e CON^+ ($p<0,001$) e o grupo controle negativo (CON^-). Diferença essa

que persistiu até o quarto dia, pois, no quinto dia pós-trauma, a deambulação em campo aberto do grupo ETO se igualou à do grupo CON^- ($p>0,05$). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com anestésico (ETO e PRO) e o grupo controle positivo (CON^+) (Anexo 5).

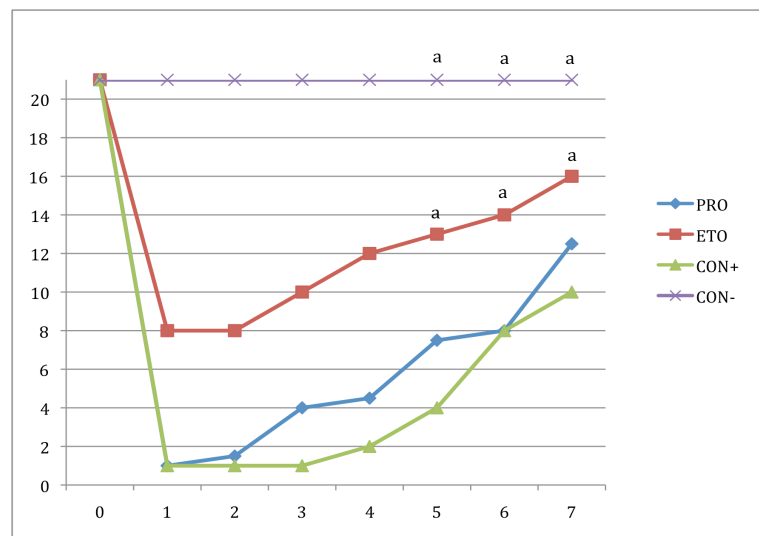


Figura 5: Gráfico das medianas do escore BBB de deambulação em campo aberto, ao longo de sete dias, de ratos submetidos a laminectomia como controle negativo (CON^-) e ao trauma medular espinal associado aos tratamentos com propofol (PRO), etomidato (ETO) e placebo como controle positivo (CON^+), $n=12$.

6.2.2 Avaliações histológica e imunohistoquímica

6.2.2.1 Área da lesão

Nos animais do grupo CON⁺, a medula espinal apresentou preservação da arquitetura normal, sendo identificadas a substância cinzenta internamente, em forma de H, o canal central da medula intacto e a substância branca externamente, a qual apresentava fibras axonais, células da neurógliia e vasculatura sem alterações (Summers et al., 1994) (Fig. 7A). Para os grupos CON⁺, PRO e ETO, houve perda

da arquitetura normal, com área de lesão focal localizada predominantemente no funículo dorsal, com malácia discreta na área central da lesão, degeneração axonal moderada bilateral difusa e discreta proliferação de células da glia (Figs. 7B, 7C e 7D).

A avaliação morfométrica da área da lesão resultou nas porcentagens de $10,23\% \pm 1,3$; $13,37\% \pm 2,8$ e $14,07\% \pm 4,9$ para os grupos PRO, ETO e CON⁺, respectivamente (Fig. 6). Apesar de ter sido observada menor área de lesão no grupo PRO, não se constatou diferença estatística na comparação entre esses grupos ($p=0,068$).

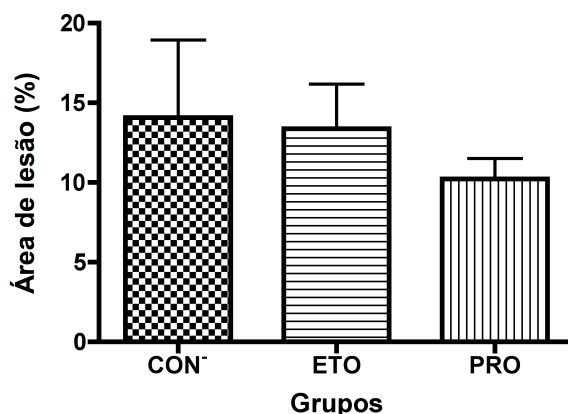


Figura 6: Média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem da área de lesão em relação ao tecido medular total em ratos submetidos a trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo como controle positivo (CON⁺), propofol (PRO) e etomidato (ETO). Avaliação aos sete dias pós-operatório. (n=5).

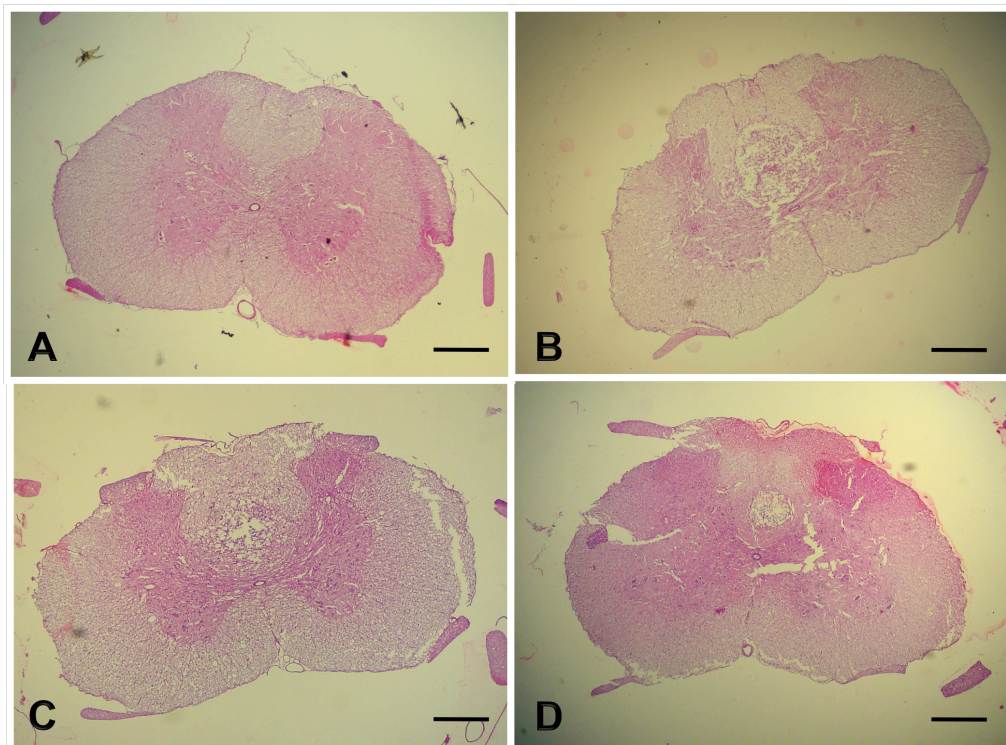


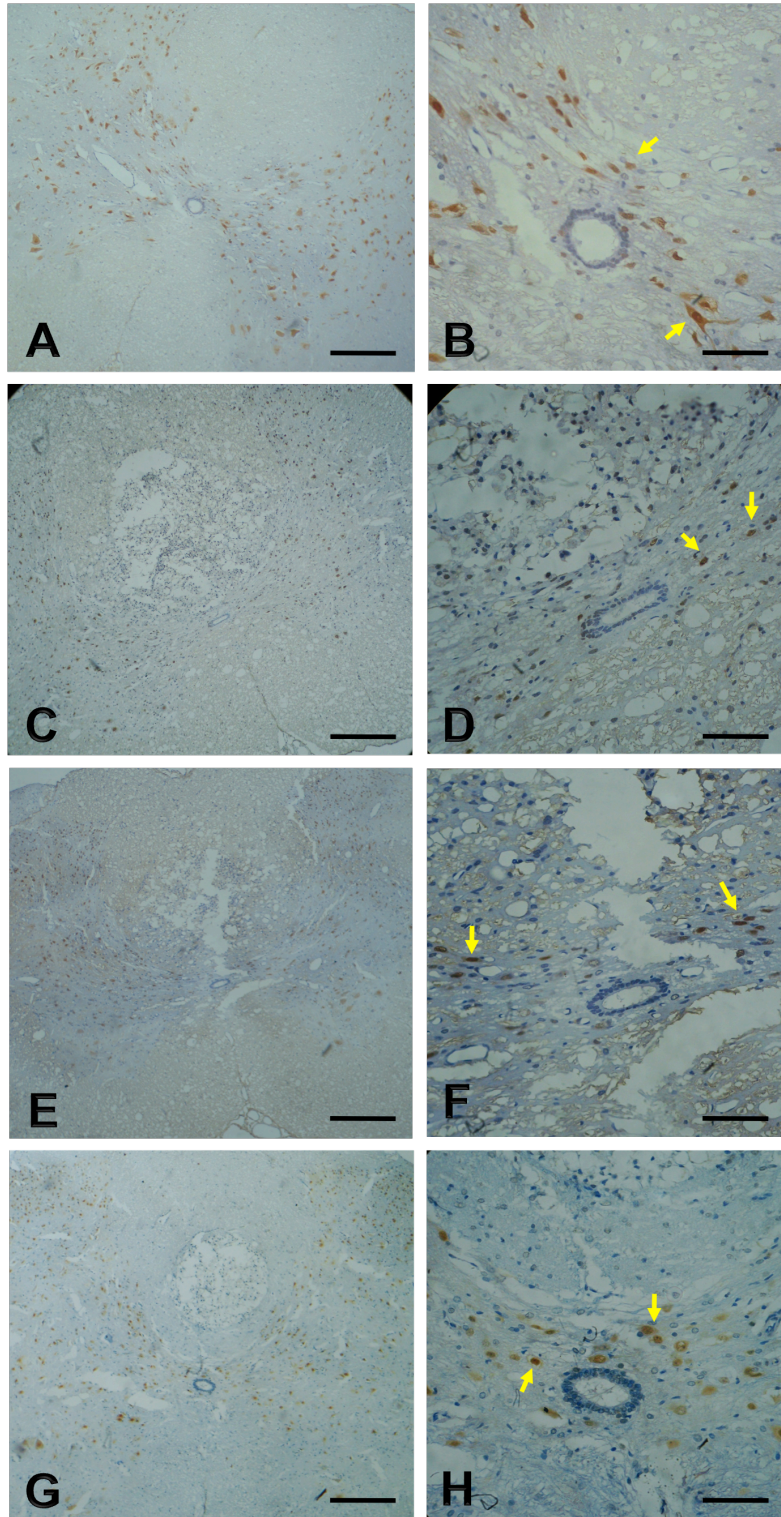
Figura 7: Fotomicroscopias de secções transversais da medula espinal, na região do epicentro da laminectomia e/ou do trauma aos sete dias pós-operatório, coradas com hematoxilina e eosina (HE). Em A, animal do grupo controle negativo; em B, grupo controle positivo; em C, grupo etomidato; em D, grupo propofol (Barra = 398 μ m).

6.2.2.2 Marcação imunoistoquímica para proteína Neu-N

No presente estudo, a diluição do anticorpo anti-Neu-N na proporção 1:1000 e o tempo de DAB de 30 segundos permitiram a identificação dos neurônios com características morfológicas preservadas, sem, contudo, evidenciar marcação inespecífica de células da glia. Assim, foram consideradas células Neu-N positivas quando o núcleo e/ou o citoplasma estavam marcados (Fig. 8).

A contagem média de neurônios marcados para proteína Neu-N por campo (média $\pm$ erro padrão) foi $43,16 \pm 2,08$; $26,71 \pm 2,98$; $32,39 \pm 2,60$ e $33,78 \pm 1,57$, para os grupos CON⁻, CON⁺, ETO e PRO, respectivamente. Foi observada diferença significativa entre os grupos CON⁻ e CON⁺ ($p < 0,001$), CON⁻ e ETO ($p < 0,05$), e CON⁻ e PRO ($p < 0,05$) (Fig. 9). Apesar da contagem de células Neu-N positivas ter sido menor no grupo CON⁺, não foi observada diferença significativa entre os animais do grupo controle positivo (CON⁺) e aqueles tratados com propofol (PRO) ou etomidato (ETO).

Figura 8: Fotomicroscopias de secções transversais da medula espinal, na região do epicentro da laminectomia e/ou do trauma sete dias após procedimento cirúrgico, submetidas à marcação imunoistoquímica para Neu-N. Em A, marcação de corpos neuronais, na substância cinzenta, em um animal do grupo controle negativo (CON⁻) (Barra = 115 µm). Observar a distribuição das células Neu-N positivas e a integridade do tecido medular. Em B, detalhes da região central, englobando canal endimário de corte histológico do grupo CON⁻ (Barra = 64 µm). Em C, E e G marcação de corpos neuronais em animais dos grupos controle positivo (CON⁺), etomidato (ETO) e propofol (PRO), respectivamente (Barra = 115 µm). Observar a distribuição das células Neu-N positivas e o tecido medular lesado. Em D, F e H, detalhes da região central, englobando canal endimário, de animais dos grupos CON⁺, ETO e PRO, respectivamente (Barra = 64 µm).



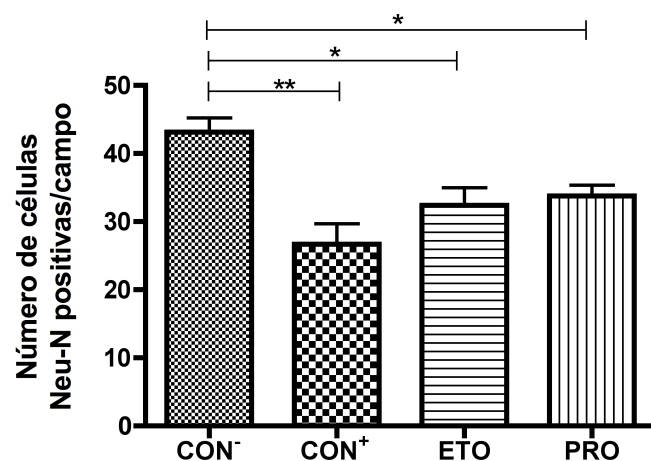


Figura 9: Contagem média ($\pm$ erro padrão) de neurônios Neu-N positivos por campo em ratos submetidos a laminectomia, como controle negativo (CON⁻) e trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), etomidato (ETO) e propofol (PRO). Avaliação aos sete dias pós-operatório. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

6.2.2.3 Detecção da fragmentação de DNA por TUNEL

Em relação ao grupo CON⁻, houve contagem mínima de núcleos corados, sendo obtida média ($\pm$ erro padrão) de $0,31 \pm 0,04$ células TUNEL positivas por campo. Para os demais grupos, a contagem média ($\pm$ erro padrão) por campo foi $3,12 \pm 0,56$; $1,37 \pm 0,17$ e $1,84 \pm 0,22$ para os grupos CON⁺, ETO e PRO, respectivamente. O número de células marcadas foi

significativamente maior nos animais dos três grupos submetidos ao trauma medular, PRO ($p < 0,01$), ETO ($p < 0,01$) e CON⁺ ($p < 0,001$), que no grupo CON⁻ (Fig. 10).

Na comparação entre os grupos submetidos ao trauma medular espinal, observou-se contagem significativamente menor nos grupos PRO ($p < 0,01$) e ETO ($p < 0,05$) que no CON⁺. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos ETO e PRO (Fig. 11).

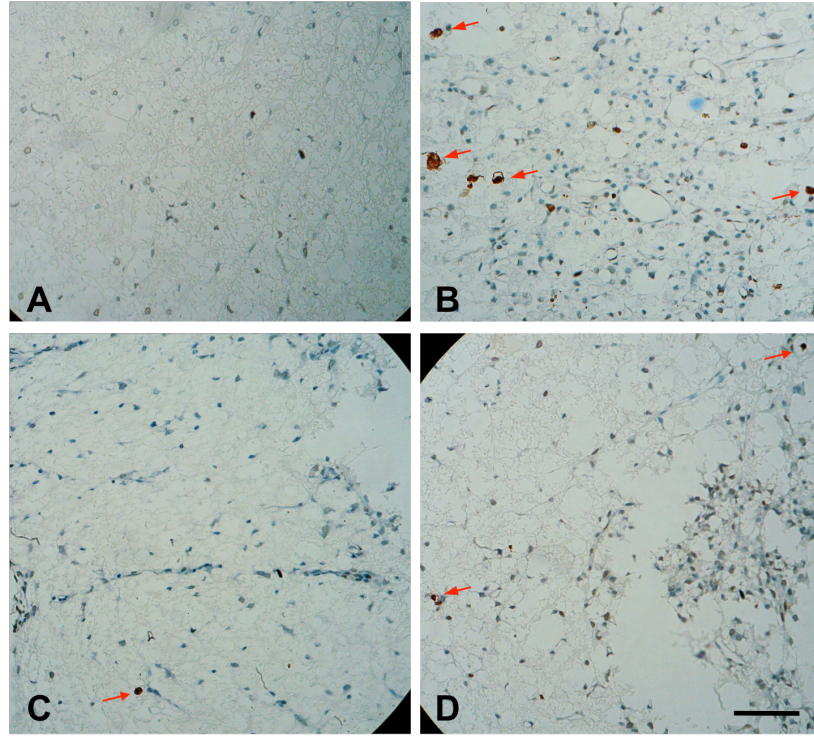


Figura 10: Fotomicroscopias de secções transversais da medula espinal, na região do epicentro da laminectomia e/ou do trauma aos sete dias de pós-operatório, submetidas à imunomarcção por TUNEL. Observar núcleos marcados pelo TUNEL nos diferentes grupos experimentais (setas). Em A, grupo controle negativo (CON⁻). Em B, grupo controle positivo (CON⁺). Em C, grupo etomidato (ETO). Em D, grupo propofol (PRO) (Barra = 58 μ m).

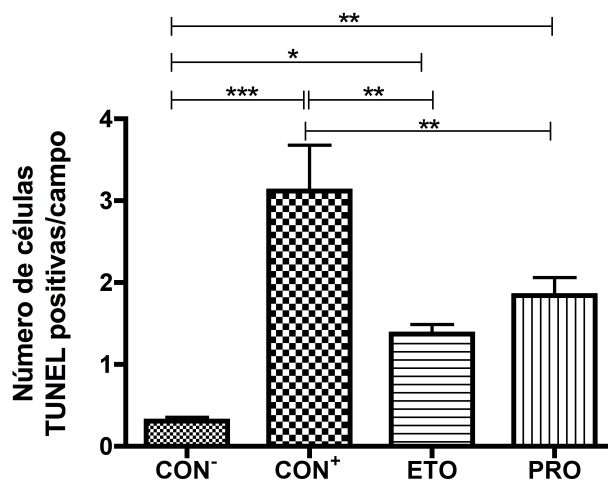


Figura 11: Contagem média ($\pm$ erro padrão) de células TUNEL positivas por campo em ratos submetidos a laminectomia, como controle negativo (CON⁻) e trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), etomidato (ETO) e propofol (PRO). Avaliação aos sete dias pós-operatório. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

6.2.2.4 Marcação por imunofluorescência para Bax

Na avaliação da média de intensidade integrada de pixels para o anticorpo anti-Bax, foi observada maior intensidade de marcação nos animais do grupo CON⁺ que nos grupos CON⁻, ETO e PRO (Fig. 12). Os seguintes valores foram obtidos (média $\pm$ erro padrão): 16,03 $\pm$

0,86; 25,79 $\pm$ 4,21; 22,13 $\pm$ 4,05 e 20,68 $\pm$ 4,66 para os grupos CON⁻, CON⁺, ETO e PRO, respectivamente.

Na comparação das médias entre os grupos, houve diferença significativa entre os grupos CON⁻ e CON⁺ ($p < 0,05$), mas os grupos tratados com anestésicos, ETO e PRO, foram estatisticamente semelhantes ao grupo CON⁻ (Fig. 13).

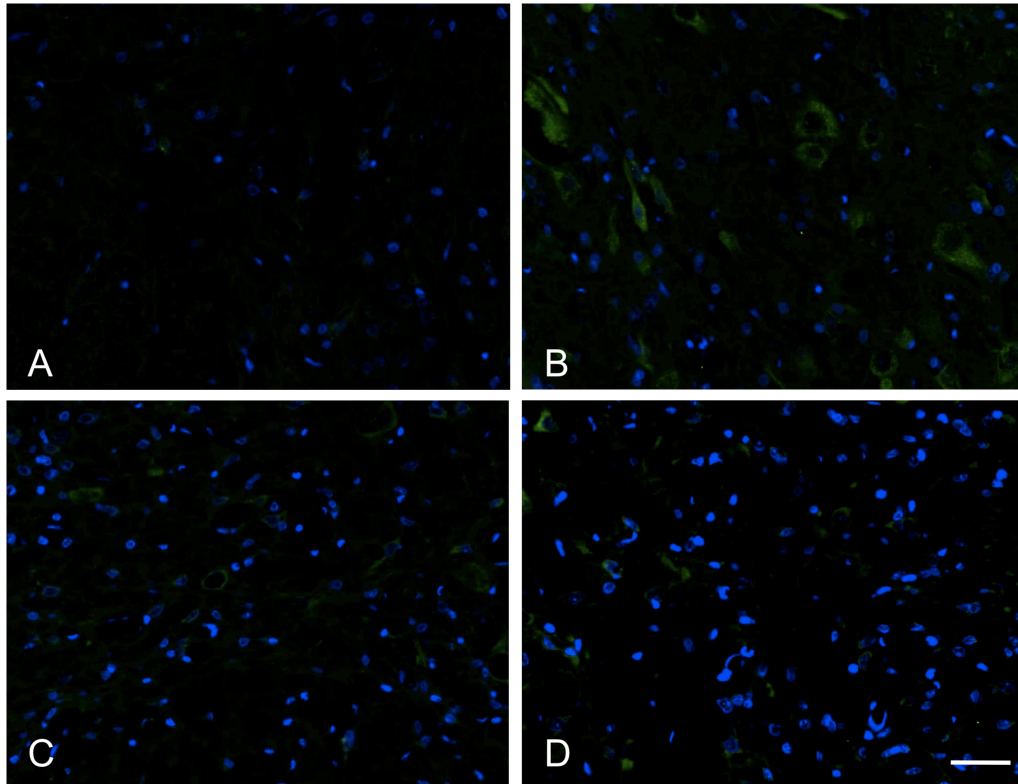


Figura 12: Fotomicroscopias de secções transversais da medula espinal, na região do epicentro da laminectomia e/ou do trauma sete dias após o procedimento cirúrgico, submetidas à marcação por imunofluorescência com anticorpo anti-Bax. Observar intensidade de marcação das células nos diferentes grupos experimentais. Em A, grupo controle negativo (CON⁻). Em B, grupo controle positivo (CON⁺). Em C, grupo etomidato (ETO). Em D, grupo propofol (PRO) (Barra = 82 μ m).

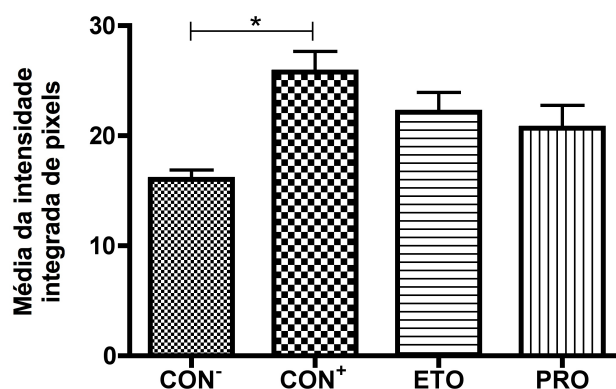


Figura 13: Média da intensidade integrada de pixels ($\pm$ erro padrão) da marcação por imunofluorescência para anticorpo anti-Bax, em ratos submetidos a laminectomia, como controle negativo (CON⁻) e trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), propofol (PRO) e etomidato (ETO). Avaliação aos sete dias pós-operatório. (* $p < 0,05$).

6.2.3 Avaliação da expressão gênica de indicadores da apoptose

Foram obtidos os seguintes resultados para expressão gênica relativa de Bax (média $\pm$ erro padrão): $1,936 \pm 0,655$; $1,324 \pm 0,491$ e $0,74 \pm 0,198$ nos grupos CON⁺, ETO e PRO, respectivamente (Fig. 14). Apesar de ter sido observada maior expressão de Bax no grupo CON⁺ que nos grupos tratados, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,417$).

Também não foi observada diferença significativa entre os grupos para expressão relativa de Bcl-Xl ($p=0,674$), como observado nos resultados de média $\pm$ erro padrão: $0,629 \pm$

$0,232$; $0,567 \pm 0,115$ e $0,401 \pm 0,182$ para os grupos CON⁺, ETO e PRO, respectivamente (Fig. 14).

Visto que a razão relativa de mediadores pró e anti-apoptóticos determina a quantidade de citocromo C disponível para formação do apoptosoma (Huerta et al., 2007), calculou-se também a relação de Bax/Bcl-Xl. Contudo, de modo semelhante ao observado para essas variáveis de forma individual, embora tenha sido observada uma menor relação Bax/Bcl-Xl no grupo ETO, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Para essa avaliação, os resultados de mediana foram 7,24; 3,84 e 4,26 para os grupos CON⁺, ETO e PRO, respectivamente.

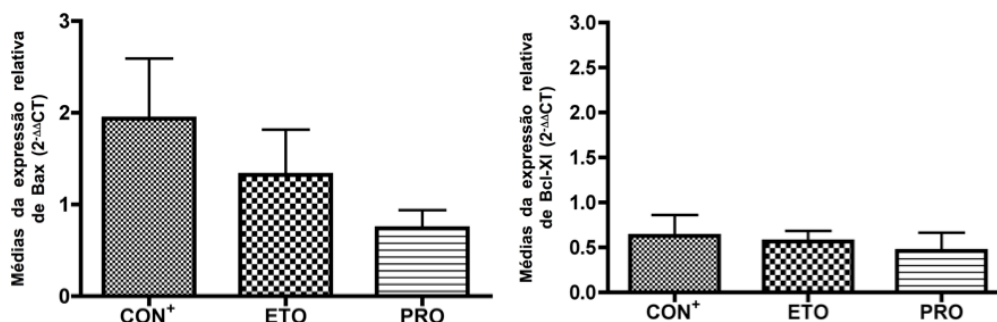


Figura 14: Médias da expressão gênica relativa ($\pm$ erro padrão) de Bax (à esquerda) e de Bcl-XI (à direita) em ratos submetidos a trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), etomidato (ETO) e propofol (PRO), em relação ao grupo laminectomia, como controle negativo (CON⁻). Avaliação aos sete dias pós-operatório.

Com relação às caspases, também não foi observada diferença significativa na expressão relativa de caspase-9 ($p=0,555$). Para esse gene, foram obtidos os seguintes resultados de média $\pm$ erro padrão: $0,479 \pm 0,121$; $0,52 \pm 0,059$ e $0,426 \pm 0,109$ para CON⁺, ETO e PRO, respectivamente (Fig. 15).

Para a expressão gênica de caspase-3, os seguintes resultados de média $\pm$ erro padrão

foram obtidos: $0,906 \pm 0,208$; $0,649 \pm 0,08$ e $0,323 \pm 0,086$ para CON⁺, ETO e PRO, respectivamente (Fig. 15). Na comparação estatística, foi observada diferença significativa entre os grupos CON⁺ e PRO, e entre ETO e PRO ($p<0,05$). Apesar da expressão desse gene ter sido menor para o grupo ETO que para o CON⁺, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

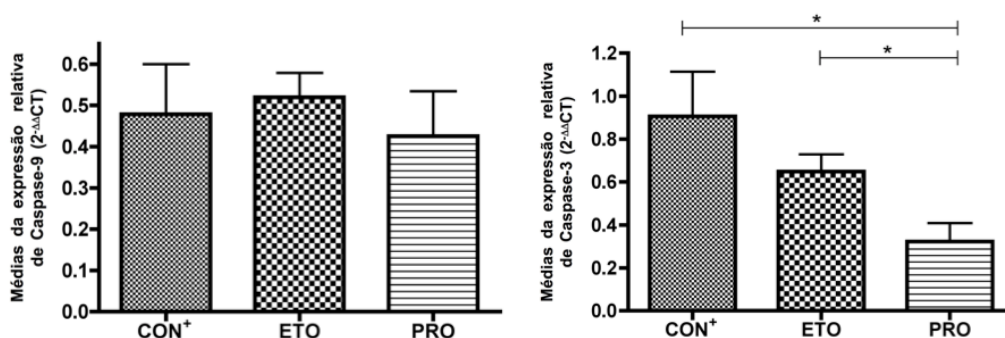


Figura 15: Médias da expressão gênica relativa ($\pm$ erro padrão) de Caspase-9 (à esquerda) e de Caspase-3 (à direita) em ratos submetidos a trauma medular espinal associado ao tratamento com placebo, como controle positivo (CON⁺), etomidato (ETO) e propofol (PRO), em relação ao grupo laminectomia, como controle negativo (CON⁻). Avaliação aos sete dias pós-operatório. (* $p<0,05$).

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

7.1 Experimento 1 - Padronização do trauma medular espinal experimental em ratos

Em se tratando de TME contuso experimental, a utilização de uma haste metálica em queda sobre a dura-máter exposta é uma descrição recorrente, com modificações dos modelos propostos por Allen (1911) e Gruner (1995). Com base nesses modelos, a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais desenvolveu esse dispositivo indutor de trauma medular espinal em ratos, como uma adaptação do modelo inicialmente proposto por Silva et al. (2008) e Torres et al. (2010) e utilizado por Costa (2010), Drummond (2010), Caldeira (2011) e Rosado (2011). Exceto pela ausência de um potenciômetro, que avaliaria os parâmetros dinâmicos do impacto, o trauma medular espinal contuso aqui empregado se assemelha ao descrito por Gruner (1995), o qual tem sido extensamente utilizado por diferentes grupos de pesquisa (Basso et al., 1996a; Velardo et al., 2004; Lee et al., 2008).

Apesar de tecnicamente simples, a técnica de trauma medular contuso, descrito no presente estudo, exigiu treinamento do cirurgião para realização da laminectomia, sem que ocorresse lesão medular acidental. A utilização de *drill* pneumático permitiu o rápido desgaste da lâmina dorsal da vértebra T12, mas a retirada da mesma foi finalizada, cuidadosamente, com uma pinça hemostática de Halsted. O diâmetro de abertura da lâmina (5,0 mm) constituiu ponto fundamental da técnica, possibilitando que a haste atingisse a medula sem, no entanto, tocar o tecido ósseo adjacente.

Em relação à dosagem de glutamato no líquido, esta é uma ferramenta versátil, utilizada em estudos de neurociências variados, tanto para mensurar o efeito antinociceptivo de fármacos (Souza et al., 2008), quanto para avaliar a intensidade de lesão no sistema nervoso central (McAdoo et al., 1999).

No presente trabalho, a colheita de líquido em quantidade suficiente para dosagem enzimática de glutamato no espectrofluorímetro não se

mostrava compatível com a vida, sendo então realizada a eutanásia dos animais.

Os resultados da dosagem de glutamato evidenciam para a liberação aguda desse neurotransmissor. Entretanto, sua concentração elevada não persiste por longo período de tempo, como já demonstrado por Liu et al. (1991) e McAdoo et al. (1999), que observaram redução da concentração de glutamato no líquido duas horas após a indução do trauma medular.

Além disso, esses dados demonstram que a energia potencial (E_p) de 0,00147 J, resultante da haste de 10 g em queda a 15 mm de altura sobre a dura-máter, foi capaz de causar lesão medular de intensidade suficiente para induzir quadro de excitotoxicidade, caracterizado pelo aumento da concentração de aminoácidos excitatórios no local da lesão. Como já descrito por outros autores (Amar e Levy, 1999; McAdoo et al., 1999; Leonard e Kirby, 2002), esse quadro é fundamental na fisiopatologia do TME, determinando o aumento do influxo de cálcio intracelular e a morte celular.

Apesar de não ter sofrido trauma medular, o grupo laminectomia (LMT) também mostrou concentração de glutamato significativamente maior que os animais submetidos apenas à anestesia e coleta de líquido (CTL). Mas essa resposta já era esperada, haja vista que a elevação da concentração deste neurotransmissor ocorre também por estímulo nociceptivo (Souza et al., 2008), o qual foi provocado pela própria intervenção cirúrgica.

Desse modo, os resultados obtidos mostram que o dispositivo permitiu a obtenção de trauma medular contuso em ratos, com elevação de glutamato no meio extracelular, caracterizando um quadro de excitotoxicidade. Esse modelo padronizado de TME em ratos foi, portanto, utilizado no Experimento 2 do presente trabalho.

7.2 Experimento 2 - Avaliação da neuroproteção do propofol e do etomidato

O trauma medular contuso, adotado no presente estudo, foi capaz de induzir, de forma eficiente, lesão aguda no tecido medular, de intensidade leve a moderada, como demonstrado pelas alterações deambulatórias observadas no período pós-cirúrgico, de acordo com a classificação de Basso et al. (1995). Com isso, promoveu-se maior preservação do tecido nervoso, com índices de morte celular decorrentes de apoptose, ao invés de necrose, mais evidente no trauma medular grave. Adicionalmente, consideraram-se estudos acerca da neuroproteção encefálica induzida por fármacos anestésicos que demonstraram efeito protetor mais eficaz e duradouro em condições de isquemia e reperfusão de menor intensidade (Sano et al., 1993; Engelhard et al., 2004a; Engelhard et al., 2004b).

Apesar de diversos estudos já terem avaliado o efeito neuroprotetor de agentes anestésicos em modelos de isquemia e reperfusão encefálica, ainda são escassos os trabalhos sobre a neuroproteção do propofol e do etomidato em isquemia e reperfusão medular. Com relação ao efeito protetor desses fármacos em animais submetidos ao trauma medular contuso, os estudos são ainda mais incipientes, não sendo encontrada na literatura consultada a comparação dos efeitos anti-apoptóticos do etomidato e do propofol no trauma medular, como proposto no presente trabalho.

Com relação às doses de propofol e etomidato, as metodologias correspondentes variam entre os estudos, incluindo as vias de administração desses fármacos, o tipo e a intensidade do trauma, bem como os parâmetros avaliados e o tempo de observação após a lesão. Assim, tem-se a via intravenosa, com aplicação antes e durante a indução da lesão isquêmica ou traumática (Sano et al., 1993; Drummond et al., 1995; Patel et al., 1995; Yamaguchi et al., 2000; Engelhard et al., 2004a; Engelhard et al., 2004b; Gerçek et al., 2007; Yamamoto et al., 2010; Yu et al., 2010), ou imediatamente após a lesão (Dixon et al., 2003; Ates et al., 2006; Statler et al., 2006); a via intra-arterial (Kumagai et al., 2006; Lin et al., 2008a; Lin et al., 2008b) e a via

intraperitoneal (Kaptanoglu et al., 2002; Ergün et al., 2010).

No presente estudo, optou-se por realizar a administração do propofol e do etomidato por via intraperitoneal (IP) pela facilidade de aplicação e absorção semelhante à via intravenosa (Lukas et al., 1971). Apesar de não ser a via mais frequentemente utilizada, já demonstrou ser capaz de proteger os tecidos orgânicos em diferentes modelos experimentais. Ergün et al. (2010) utilizaram propofol (10, 25 e 50 mg/kg) e etomidato (2,5, 5 e 10 mg/kg), intraperitonealmente, antes de induzir isquemia muscular e observaram redução da concentração de indicadores de estresse oxidativo, mesmo nas menores doses. De modo semelhante, Kaptanoglu et al. (2002), comparando o efeito neuroprotetor do tiopental e do propofol, empregaram 40 mg/kg de propofol (IP) ou 15 mg/kg de tiopental (IP), imediatamente após trauma medular, e observaram neuroproteção de ambos os fármacos, embora mais evidente no grupo que recebeu tiopental. Ainda, Cayli et al. (2006) utilizaram dose única de 2 mg/kg de etomidato (IP) imediatamente após trauma medular contuso e obtiveram melhora no quadro de peroxidação lipídica, semelhante ao grupo que recebeu metilprednisolona.

Apesar de alguns estudos demonstrarem resultados satisfatórios com determinadas doses dos referidos anestésicos, como ilustrado acima, no presente trabalho, a determinação das doses se baseou em um estudo piloto, de modo a estabelecer a menor dose intraperitoneal com efeito anestésico no rato. Desse modo, foi possível mimetizar a aplicação de dose única do anestésico para intubação endotraqueal de um paciente que seria submetido a um procedimento cirúrgico em situação clínica de emergência pós-trauma medular espinal. Nesse contexto, foram propostas as doses de 30 mg/kg para propofol e 3 mg/kg para etomidato por via intraperitoneal, estando estas próximas aos valores utilizados em outros estudos.

Dada a impossibilidade de realização do procedimento cirúrgico para indução do trauma medular nos animais sem a utilização de anestésicos, no presente estudo, optou-se pelo protocolo cetamina e xilazina, por conferir plano anestésico cirúrgico, com manutenção de parâmetros cardiovasculares dentro de limites

fisiológicos (Saha et al., 2007). Essa associação anestésica foi administrada igualmente em todos os grupos, sete minutos antes do início do procedimento cirúrgico, com o objetivo de retirar seu efeito sobre os tratamentos. Embora a cetamina tenha efeito neuroprotetor comprovado, por antagonizar, de forma não competitiva, receptores NMDA (Himmelseher et al., 1996), esse fármaco já foi utilizado, em associação com xilazina ou não, em estudos anteriores, sobre neuroproteção anestésica, para anestesia pré-tratamento, com resultados satisfatórios para os fármacos testados (Kaptanoglu et al., 2002; Kumagai et al., 2006; Gerçek et al., 2007).

Em se tratando do período de avaliação utilizado, optou-se por sete dias para se acompanhar a evolução clínica, as alterações histológicas e a expressão gênica de indicadores da apoptose. Isso devido ao fato de que os eventos secundários perpetuadores da lesão primária, dentre eles a morte celular por apoptose, se iniciam minutos após o trauma, podendo se prolongar por dias ou meses (Lu et al., 2000). Apesar de alguns trabalhos sobre neuroproteção anestésica terem realizado avaliações duas (Ergün et al., 2008), 24 (Kumagai et al., 2006) e 48 horas após o trauma (Yamamoto et al., 2010), existe uma preocupação sobre a incapacidade desses fármacos em manter o efeito neuroprotetor por períodos maiores. Dessa maneira, a avaliação aos sete dias abrangeu os principais eventos responsáveis pela progressão da lesão medular, sendo possível também sugerir evidências da neuroproteção prolongada.

Com relação à avaliação clínica de capacidade locomotora, o teste BBB foi de fácil execução e não representou condição de estresse aos animais, já que foi feito condicionamento a essa situação nos três dias que antecederam ao procedimento cirúrgico. A manutenção do escore máximo no grupo CON⁻ indicou que a laminectomia não causou lesão ao tecido medular à observação clínica. Desse modo, os animais submetidos à lesão medular apresentaram déficits neurológicos resultantes apenas do trauma causado pela queda da haste metálica sobre a medula espinal.

Os resultados obtidos na comparação das medianas do escore BBB entre grupos e entre

dias sugerem recuperação clínica mais rápida do grupo ETO, quando comparada aos grupos PRO e CON⁺. Essa recuperação clínica mais precoce observada no grupo ETO também foi observada por outros autores. Yu et al. (2010) obtiveram escores de função neurológica semelhantes entre os animais tratados com etomidato antes e durante a lesão e aqueles sem lesão (grupo *sham*), em um modelo de isquemia e reperfusão da medula espinal. De modo semelhante, Cayli et al. (2006) obtiveram melhor recuperação da função locomotora nos animais tratados com etomidato quando comparados com os dois grupos controle positivo, administrados imediatamente após trauma medular contuso. Esses resultados, em conjunto, sinalizam o etomidato como um fármaco neuroprotetor medular. Entretanto, visto que a avaliação clínica é um teste subjetivo, avaliações histológicas e RT-PCR em tempo real foram utilizados para confirmar essa observação.

A respeito da avaliação histológica, a mensuração da área da lesão tem sido amplamente empregada em diferentes estudos com lesões do SNC (Basso et al., 1996a; Joshi e Fehlings, 2002; Cayli et al., 2006; Poon et al., 2007) como uma ferramenta para avaliar a neuroproteção por efeito de tratamentos no tecido acometido.

A manutenção da morfologia normal da medula no grupo CON⁻, em adição ao já observado no exame clínico, confirmou a ausência de trauma acidental durante a laminectomia. Em relação aos tratamentos propostos, a administração, em dose única, de propofol ou etomidato uma hora após o trauma, não foi capaz de reduzir a área de lesão tecidual decorrente do trauma medular. Na literatura, a evidência de efeito protetor dos agentes anestésicos, avaliado pela histologia, possui resultados contrastantes, possivelmente devido às diferenças de metodologia, como o modelo experimental empregado, as dosagens e os momentos de aplicação desses fármacos. Dixon et al. (2003) e Adembri et al. (2006) demonstraram redução do volume da lesão no córtex cerebral com a administração, em dose única, de 2 mg/kg de etomidato (IV) antes da isquemia e 100 mg/kg de propofol (IP) imediatamente após a isquemia, respectivamente. De modo semelhante, Cayli et al. (2006) observaram redução da área de lesão após tratamento com dose única de etomidato (2

mg/kg, IP), imediatamente após trauma medular espinal. Por outro lado, Drummond et al. (1995) evidenciaram aumento da lesão encefálica após administração prolongada de etomidato antes e durante a isquemia cerebral focal e durante a reperfusão. Já Yamamoto et al. (2010) não observaram diferença significativa na área de vacuolização da substância branca após administração de 0,8 mg/kg/min (IV) de propofol 30 minutos antes e durante os 15 minutos de isquemia espinal.

Ainda sobre a avaliação histológica, a técnica de coloração por imunoistoquímica (IHQ) para proteína nuclear neuronal, Neu-N, foi empregada para determinar a viabilidade neuronal e o efeito neuroprotetor dos agentes anestésicos em questão. Basicamente, essa técnica consistiu na demonstração de antígenos presentes em secções de tecido através de ligações antígeno-anticorpo, as quais se tornaram evidentes após reação de coloração histoquímica (Ramos-Vara, 2005). A proteína Neu-N, muito utilizada em estudos de neurociências, foi escolhida dada a especificidade para células neuronais viáveis, sendo detectável tanto no núcleo quanto no citoplasma desse tipo celular (Sun et al., 2009).

No presente estudo, a menor contagem de células Neu-N positivas no grupo CON⁺ demonstrou que o trauma infligido à medula espinal, embora de intensidade leve a moderada, foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de neurônios viáveis. Contudo, a comparação entre os animais submetidos ao trauma e que receberam placebo ou um dos dois tratamentos propostos, não confirmou o efeito neuroprotetor dos fármacos anestésicos sobre as células neuronais aos sete dias pós-trauma. Resultado semelhante foi observado por Engelhard et al. (2004a), que, em um modelo de isquemia e reperfusão cerebral, avaliaram a viabilidade neuronal com emprego de dupla marcação imunoistoquímica com anticorpos Neu-N e Caspase-3 ativada. Neste estudo, não demonstraram diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com propofol um, três e sete dias após o insulto isquêmico, mas somente aos 28 dias. Com base nessa informação, é possível que o período de observação estabelecido no presente estudo não tenha sido suficiente para determinar a neuroproteção neuronal. Por outro lado, em

modelos de isquemia e reperfusão medular, foi observada maior preservação neuronal nos grupos tratados com propofol (Zeng et al., 2009a; Yamamoto et al., 2010) e etomidato (Yu et al., 2010), mas diferente de Engelhard et al. (2004a), aqueles realizaram apenas caracterização morfológica dos neurônios pela coloração com hematoxilina e eosina.

Mas seria possível haver efeito protetor dos fármacos avaliados sobre as células da neuróglia? Sabe-se que tanto o propofol (Zeng et al., 2009a) quanto o etomidato (Patel et al., 1995) interferem na liberação de neurotransmissores excitatórios. Além disso, as células da neuróglia, especialmente oligodendrócitos e astrócitos, já se mostraram sensíveis à elevação desses aminoácidos através da ativação de receptores não-NMDA (Li e Stys, 2000). Portanto, a avaliação de indicadores de apoptose em neurônios e células da neuróglia poderia trazer resposta a esta questão.

Para investigar os eventos relacionados à apoptose, foram avaliadas a fragmentação de DNA e a expressão de Bax, ambos *in situ*, bem como a expressão gênica de Bax, Bcl-XL, Caspase-9 e Caspase-3.

A técnica imunoistoquímica de TUNEL teve como objetivo estudar a efetivação do processo de morte celular de neurônios e células da neuróglia nos diferentes grupos experimentais. A marcação de células TUNEL positivas, aos sete dias pós-trauma, avaliou a segunda onda de apoptose em células da glia, especialmente oligodendrócitos, que ocorre após o TME, como já demonstrado por Liu et al. (1997). O ensaio se baseou na ligação específica da enzima TdT (transferase deoxinucleotidil terminal) à extremidade 3'-OH do DNA fragmentado, e na subsequente amplificação pela ligação avidina-peroxidase. Assim, foram marcadas as células que tiveram clivagem do seu DNA, tanto pelo processo de necrose quanto de apoptose (Huerta et al, 2007). Apesar dessa técnica, isoladamente, não ser um indicador específico de apoptose, ela tem sido utilizada em conjunto com outras metodologias para este fim.

As contagens médias de células TUNEL positivas por campo sugerem que a administração tanto de propofol (PRO) quanto de etomidato (ETO), uma hora após trauma

medular, foi capaz de reduzir de forma semelhante a morte de células, embora essa redução não tenha sido suficiente para refletir em redução da área da lesão, como discutido anteriormente.

A redução da fragmentação do DNA presente em células nervosas por ação do tratamento com propofol também foi documentada por outros autores, corroborando, assim, o que se verificou no presente estudo. Acquaviva et al. (2004) e Wu et al. (2011) observaram que o propofol reduziu a morte celular por apoptose em modelos de cultura de células nervosas. De modo semelhante, Engelhard et al. (2004a) e Engelhard et al. (2004b), avaliando a ativação das vias da apoptose em isquemia e reperfusão encefálica, demonstraram que o propofol foi capaz de influenciar favoravelmente o equilíbrio de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, inibindo assim a morte apoptótica de neurônios. Interessante que ainda não foi documentada redução da apoptose na medula em animais submetidos a trauma e tratados com etomidato.

A técnica de RT-PCR em tempo real foi utilizada para quantificar a expressão gênica de indicadores de apoptose, nos animais submetidos ao trauma medular, em relação ao grupo CON⁻. A técnica consistiu na amplificação de sequências gênicas específicas de RNA-m (primers) e na quantificação da fluorescência (SYBR) emitida ao longo da reação. Como resultado, foi obtida a quantidade relativa de RNA-m nas células, que codificava para os genes supracitados (Valasek e Repa, 2005; VanGuilder et al., 2008), segundo a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Apesar de ter sido observada maior expressão gênica para Bax no grupo CON⁺ que nos grupos ETO e PRO, a diferença não foi significativa ($p=0,25$). Entretanto, a avaliação por imunofluorescência para essa mesma proteína, permitiu a observação de diferença significativa entre os grupos CON⁻ e CON⁺, demonstrando a ativação da via intrínseca pró-apoptótica secundária ao trauma espinal, como já descrito por Qiu et al. (2001). Interessante também notar que os grupos ETO e PRO foram estatisticamente semelhantes ao grupo CON⁻, sugerindo uma menor expressão de Bax nos grupos tratados com propofol e etomidato, como observado por Engelhard et al. (2004a) para o

propofol, em modelo de isquemia cerebral. A diferença dos resultados obtidos nas avaliações de PCR e imunofluorescência para a mesma proteína pode ser justificada pelas próprias técnicas empregadas, lembrando que o RT-PCR em tempo real avalia a expressão gênica do RNA-m que codifica para Bax e, na imunofluorescência, é quantificada a proteína já sintetizada, sugerindo portanto uma redução da expressão gênica aos sete dias pós-trauma, mas uma quantidade mais expressiva dessa proteína já teria sido sintetizada no tecido medular.

Com relação à expressão de Bcl-XL, a ausência de diferença entre os grupos também foi observada por Engelhard et al. (2004a) aos sete dias pós-isquemia para a proteína Bcl-2, sugerindo que a avaliação do efeito do propofol e do etomidato sobre a expressão gênica desses indicadores da apoptose, no presente estudo, tenha sido tardia para detectar essas alterações, já que a ativação da via intrínseca mitocondrial ocorre de forma aguda, 24 a 72 horas pós-trauma (Qiu et al., 2001).

Com relação às caspases, a ausência de diferença significativa na expressão relativa de caspase-9 vai ao encontro do obtido para a expressão gênica de Bax e Bcl-XL, já que a ativação da pró-caspase-9 e sua clivagem em caspase-9 é dependente da liberação de citocromo C na via mitocondrial da apoptose (Heiden e Thompson, 1999; Adrain e Martin, 2001; Huerta et al., 2007).

Para a expressão gênica de caspase-3, o menor valor para essa protease nos grupos PRO e ETO que no CON⁺ sugere que o efeito neuroprotetor do propofol envolve a inibição da caspase-3, uma protease efetora da apoptose, que leva à fragmentação do DNA, como confirmado pela marcação histoquímica de TUNEL. A menor expressão desse gene para o grupo ETO que para o CON⁺, embora não significativa, pode sugerir que aos sete dias, a inibição da expressão gênica para caspase-3 no grupo ETO já tenha ocorrido, ou ainda que o efeito neuroprotetor do etomidato ocorra por um mecanismo de apoptose independente das caspases, através da ativação de fator indutor de apoptose (AIF), como citado por Kawaguchi et al. (2005), podendo ser alvo de futuros estudos.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo apontam para um efeito neuroprotetor mais precoce do etomidato sobre o TME, e um efeito neuroprotetor mais tardio para o propofol, embora ambos tenham mostrado efeito sobre a medula espinal lesada. Entretanto, a confirmação dessa observação só será possível em trabalhos futuros, na comparação de diferentes tempos de avaliação.

Embora os mecanismos de redução da apoptose nos estudos sobre neuroproteção com emprego de fármacos anestésicos não estejam completamente elucidados, foi demonstrada a participação do propofol e do etomidato na redução da peroxidação lipídica, através da ativação de antioxidantes endógenos, como superóxido desmutase (Yu et al., 2010) e glutathione (Cayli et al., 2006), bem como pela redução da liberação de glutamato (Patel et al., 1995) e da produção de radicais livres de oxigênio, como xantina oxidase e óxido nítrico (Cayli et al., 2006). Como a formação de espécies reativas de oxigênio interfere na dupla camada de ácidos graxos insaturados da membrana lipídica das células, constituindo importante fator desencadeador da apoptose, é possível que a ação anti-apoptótica do propofol e do etomidato ocorra por esse mecanismo.

8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Diante dos resultados do presente estudo é possível concluir que:

* O dispositivo indutor de trauma medular espinal para ratos, desenvolvido pela EV-UFMG, produz lesão medular padronizada, com quadro de excitotoxicidade, mostrando-se válido para o estudo de neuroproteção anestésica.

* O etomidato, administrado em dose única por via intraperitoneal, na dose de 3 mg/kg, permitiu recuperação clínica da função locomotora de forma mais precoce.

* Os agentes anestésicos propofol e etomidato, administrados em dose única por via intraperitoneal, nas doses de 30 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente, reduziram a morte celular no tecido medular aos sete dias pós-trauma.

* O mecanismo de ação neuroprotetor do propofol e do etomidato não foram totalmente elucidados, mas a via mitocondrial parece estar envolvida, com efeito mais precoce do etomidato, contudo outros estudos, com menores intervalos de avaliação, são necessários para confirmar essa observação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Y.; YAMAMOTO, T.; SUGIYAMA, Y. et al. Apoptotic cells associated with Wallerian degeneration after experimental spinal cord injury: a possible mechanism of oligodendroglial death. *Journal of Neurotrauma*, v.16, n.10, p.945-952, 1999.
- ACQUAVIVA, R.; CAMPISI, A.; MURABITO, P. et al. Propofol attenuates peroxynitrite-mediated DNA-damage and apoptosis in cultured astrocytes. *Anesthesiology*, v.101, p.1363-1371, 2004.
- ADEMBRI, C.; VENTURI, L.; TANI, A. et al. Neuroprotective effects of propofol in models of cerebral ischemia - Inhibition of mitochondrial swelling as a possible mechanism. *Anesthesiology*, v.104, n.1, p.80-89, 2006.
- ADRIN, C.; MARTIN, S.J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome c. *Trends in Biochemical Sciences*, v.26, n.6, p.390-397, 2001.
- ALLEN, A.R. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: A preliminary report. *Journal of the American Medical Association*, v.9, n.11, p.878-880, 1911.
- AMAR, A.P.; LEVY, M.L. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damaging in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*, v.44, p.1027-1040, 1999.
- ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, v.34, p.325-337, 2003.
- ASSAD, A.R.; DELOU, J.M.A.; FONSECA, L.M. The role of K_{ATP} channels on propofol preconditioning in a cellular model of renal ischemia-reperfusion. *Anesthesia and Analgesia*, v.109, n.5, p.1486-1492, 2009.
- ATES, O.; YUCEL, N.; CAYLI, S.R. et al. Neuroprotective effect of etomidate in the central nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochemical Research*, v.31, n.6, p.777-783, 2006.
- BAPTISTE, D.C.; FEHLINGS, M.G. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, v.23, p.318-334, 2006.
- BAREYRE, F.M.; SCHWAB, M.E. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends in Neurosciences*, v.26, n.10, p.555-563, 2003.
- BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma*, v.12, n.1, p.1-21, 1995.
- BASSO, M.D.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Experimental Neurology*, v.139, p.244-256, 1996a.
- BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. et al. MASCIS Evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. *Journal of Neurotrauma*, v.13, n.7, p.343-359, 1996b.
- BASSO, D.M. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *Journal of Neurotrauma*, v.21, n.4, p.395-404, 2004.
- BAYONA, N.A.; GELB, A.W.; JIANG, Z. et al. Propofol neuroprotection in cerebral ischemia and its effects on low-molecular-weight antioxidants and skilled motor tasks. *Anesthesiology*, v.100, p.1151-1159, 2004.
- BEATTIE, M.S. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *Trends in Molecular Medicine*, v.10, p.580-583, 2004.
- BEATTIE, M.S.; SHUMAN, S.L.; BRESNAHAN, J.C. Apoptosis and spinal cord

- injury. *The Neuroscientist*, v.4, n.3, p.163-171, 1998.
- BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. Acute spinal cord trauma: Mechanisms and clinical syndromes. *Veterinary Medicine*, v.95, n.11, p.846-850, 2000.
- BORGEAT, A.; WILDER-SMITH, O.; FORNI, M. et al. Adjuvant propofol enables better control of nausea and emesis secondary to chemotherapy for breast cancer. *Canadian Journal of Anaesthesiology*, v.41, p.1117-1119, 1994.
- BUGGY, D.J.; NICOL, B.; ROWBOTHAM, D.J. et al. Effects of intravenous anesthetic agents on glutamate release. *Anesthesiology*, v.92, p.1067-1073, 2000.
- BULL'ON, V.V.; KUZNETSOVA, N.N.; SELINA, E.N. et al. Neuroprotective effect of cytoflavin during compression injury of the spinal cord. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v.139, p.394-396, 2005.
- CAI, J.; HU, Y.; LI, W. et al. The neuroprotective effect of propofol against brain ischemia mediated by the glutamatergic signaling pathway in rats. *Neurochemical Research*, v.36, p.1724-1731, 2011.
- CAKIR, E.; USUL, H.; PEKSOYLO, B.; SAYIN, O.C.; ALVER, A.; TOPBAS, M.; BAYKAL, S.; KUZELYI, K. Effects of citicoline on experimental spinal cord injury. *Journal Clinical Neuroscience*, v.12, p.923-926, 2005.
- CALDEIRA, F.M.C. *Células tronco mesenquimais indiferenciadas no tratamento de trauma medular espinal de ratos Lewis*. 2011. 99f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CAO, Q.; ZHANG, Y.P.; IANNOTTI, C. et al. Functional and electrophysiological changes after graded traumatic spinal cord injury in adult rat. *Experimental Neurology*, v.191, p.S3-S16, 2005.
- CARLSON, S.; PARRISH, M.E.; SPRINGER, J.E.; DOTY, K.; DOSSETT, L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Experimental Neurology*, v.151, p.77-88, 1998.
- CAYLI, S.R.; ATES, O.; KARADAG, N.; ALTINOZ, E.; YUCEL, N.; YOLOGLU, S.; KOCAK, A.; CAKIR, C.O. Neuroprotective effect of etomidate on functional recovery in experimental spinal cord injury. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v.24, p.233-239, 2006.
- COSTA, P.M. *Avaliação anátomo-clínica do dantroleno sódico no trauma medular agudo experimental em ratos por período prolongado*. 2010. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- DASKAPOULOS, R.; KORCOK, J.; FARHANGKHGOU, P. et al. Propofol protection of sodium hydrogen exchange activity sustains glutamate uptake during oxidative stress. *Anesthesia and Analgesia*, v.93, p.1199-1204, 2001.
- DIXON, C.E.; MA, X.; KLINE, A.E. et al. Acute etomidate treatment reduces cognitive deficits and histopathology in rats with traumatic brain injury. *Critical Care Medicine*, v.31, n.8, p.2222-2227, 2003.
- DRUMMOND, B.L. *Subfração PnTx 3-6 do veneno da aranha armadeira (Phoneutria nigriventer) no tratamento de ratos Wistar submetidos ao trauma agudo compressivo à medula espinhal*. 2010. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- DRUMMOND, J.C.; COLE, D.J.; PATEL, P.M. et al. Focal cerebral ischemia during anesthesia with etomidate, isoflurane, or thiopental: a comparison of the extent of cerebral injury. *Neurosurgery*, v.37, n.4, p.742-749, 1995.
- ELSERSY, H.; SHENG, H.; LYNCH, J.R. et al. Effects of isoflurane versus fentanyl-nitrous oxide anesthesia on long-term outcome from

severe forebrain ischemia in the rat. *Anesthesiology*, v.100, p.1160-1166, 2004.

ENGELHARD, K.; WERNER, C.; EBERSPÄCHER, E. et al. Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesthesiology*, v.101, p.912-917, 2004a.

ENGELHARD, K.; WERNER, C.; EBERSPÄCHER, E. et al. Sevoflurane and propofol influence the expression of apoptosis-regulating proteins after cerebral ischaemia and reperfusion in rats. *European Journal of Anaesthesiology*, v.21, p.530-537, 2004b.

ERGÜN, Y.; ÖKSÜZ, H.; ATLI, Y. et al. Ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: Comparison of the effects of subanesthetic doses of ketamine, propofol, and etomidate. *Journal of Surgical Research*, v.159, p.e1-e10, 2010.

FAROOQUE, M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta of Neuropathology*, v.100, p.13-22, 2000.

FEHLINGS, M.G.; TATOR, C.H.; LINDEN, R.D. et al. Motor evoked potentials recorded from normal and spinal cord-injured rats. *Neurosurgery*, v.20, p.125-130, 1987.

FLECKNELL, P. Anaesthesia of common laboratory species: special considerations. In: FLECKNELL, P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3. ed., San Diego: Elsevier, 2009. p.183-203.

FORD, R.W.J. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *Journal of Neurosurgery*, v.59, p.268-275, 1983.

GALE, K.; KERASIDIS, H.; WRATHALL, J.R. Spinal cord contusion in the rat: Behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Experimental Neurology*, v.88, p.123-134, 1985.

GALLUZZI, L.; BLOMGREN, K.; KROEMER, G. Mitochondrial membrane

permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews - Neuroscience*, v.10, p.481-494, 2009.

GAVIRIA M.; PRIVAT, A.; D'ARBIGNY, P. et al. Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Research*, v.874, p.200-209, 2000.

GERÇEK, A. ADIL, M.; KONYA, D. et al. Propofol reduces reactive oxygen radical dependent lipid peroxidation after experimental spinal cord injury in rats. *Journal of Neurological Sciences*, v.24, n.2, p.129-134, 2007.

GRISSOM, T.E.; MITZEL, H.C.; BUNEGIN, L. et al. The effect of anesthetics on neurologic outcome during the recovery period of spinal cord injury in rats. *Anesthesia and Analgesia*, v.79, p.66-74, 1994.

GRUNER, J.A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*, v.9, n.2, p.123-128, 1992.

GUÍZAR -SAHAGÚN, G.; RODRÍGUEZ-BALDERAS, C.A.; FRANCO-BOURLAND, R.E. et al. Lack of neuroprotection with pharmacological pretreatment in a paradigm for anticipated spinal cord lesions. *Spinal Cord*, v.47, p.156-160, 2009.

HAELEWYN, B.; YVON, A.; HANOUIZ, J.L. et al. Desflurane affords greater protection than halotane against focal cerebral ischaemia in the rat. *British Journal of Anaesthesia*, v.91, n.3, p.390-396, 2003.

HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, v.23, n.3/4, p.264-280, 2006.

HANOUIZ, J.; REPESSE, Y.; ZHU, L. et al. The electrophysiological effects of racemic ketamine and etomidate in and *in vitro* model of "border zone" between normal and ischemic/reperfused guinea pig myocardium. *Anesthesia and Analgesia*, v.106, p.365-370, 2008.

- HEIDEN, M.G.V.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology*, v.1, n.8, p.E209-E216, 1999.
- HICKS, S.; D'AMATO, C.J. Motor-sensory cortex-corticospinal system and developing locomotion and placing in rats. *American Journal of Anatomy*, v.143, p.1-42, 1975.
- HIMMELSEHER, S.; PFENNINGER, E.; GEORGIEFF, M. The effects of ketamine-isomers on neuronal injury and regeneration in rat hippocampal neurons. *Anesthesia and Analgesia*, v.83, p.505-512, 1996.
- HUERTA, S.; GOULET, E.J.; HUERTA-YEPEZ, S. et al. Screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgical research*, v.139, p.143-156, 2007.
- HWAN, Q.Y.; YEOP, B.Y.; GWANG, L. et al. Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords: Inflammation, apoptosis, and cell survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.348, p.560-570, 2006.
- JEFFERY, N.D.; BLAKEMORE, W.F. Spinal cord injury in small animals. Mechanisms of spontaneous recovery. *The Veterinary Record*, v.10, p.407-413, 1999.
- JOSHI, M.; FEHLINGS, M.G. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *Journal of Neurotrauma*, v.19, n.2, p.175-190, 2002.
- KALAYCI, M.; COSKUN, O.; CAGAVI, F. et al. Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats. *Neurochemical Research*, v.30, p.403-410, 2005.
- KAPTANOGLU, E.; SEN, S.; BESKONAKLI, E. et al. Antioxidant actions and early ultrastructural findings of thiopental and propofol in experimental spinal cord injury. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*, v.14, n.2, p.114-122, 2002.
- KASSEL, N.F.; HITCHON, P.W. GERK, M.K. Alterations in cerebral blood flow, oxygen metabolism, and electrical activity produced by high dose sodium thiopental. *Neurosurgery*, n.7, p.598-603, 1980.
- KAWAGUCHI, M.; FURUYA, H.; PATEL, P.M. Neuroprotective effects of anesthetic agents. *Journal of Anesthesia*, v.19, p.150-156, 2005.
- KAY, B.; ROLLY, G. ICI 35868, a new intravenous induction agent. *Acta Anaesthesiologica Belgica*, v.28, p.303-306, 1977.
- KE, Q.B.; HOU, J.; CHEN, C. et al. Effect of propofol on spinal cord apoptosis associated with aortic cross-clamping in rabbits. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, v.17, n.7, p.426-429, 2005. Abstract.
- KHAN, M.; GRIEBEL, R. Acute spinal cord injury in the rat: Comparison of three experimental techniques. *Le Journal Canadien des Sciences Neurologiques*, v.10, n.3, p.161-165, 1983.
- KIKUCHI, T.; WANG, Y.; SATO, K. et al. *In vivo* effects of propofol on acetylcholine release from frontal cortex, hippocampus and striatum studied by intracerebral microdialysis in freely moving rats. *British Journal of Anaesthesia*, v.80, p.644-648, 1998.
- KIM, J.H.; TU, T.; BAYLY, P.V. et al. Impact speed does not determine severity of spinal cord injury in mice with fixed impact displacement. *Journal of Neurotrauma*, v.26, p.1395-1404, 2009.
- KITANO, H.; KIRSCH, J.R.; HURN, P.D. et al. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v.27, p.1108-1128, 2007.
- KITAYAMA, M.; HIROTA, K.; KUDO, M. et al. Inhibitory effects of intravenous anaesthetic agents on K⁺-evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. Involvement of voltage-sensitive Ca²⁺ channels and GABA_A receptors.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, v.366, p.246-253, 2002.

KNOBLACH, S.M.; HUANG, X.; VANGELDEREN, J. et al. Selective caspase activation may contribute to neurological dysfunction after experimental spinal cord trauma. *Journal of Neuroscience Research*, v.80, p.369-380, 2005.

KO, S.; YU, C.; LEE, S. et al. Propofol attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Anesthesia and Analgesia*, v.85, p.719-724, 1997.

KUMAGAI, H.; ISAKA, M.; SUGAWARA, Y. et al. Intra-aortic injection of propofol prevents spinal cord injury during aortic surgery. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, v.29, p.714-719, 2006.

KWON, B.K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J.N. et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The Spine Journal*, v.4, p.451-464, 2004.

LAMBERT, J.J.; HAYTHORNTHWAIT, A.R.; PEDEN, D.R. et al. The GABA_A receptor: An important target for the general anaesthetic etomidate. *International Congress Series*, v.1283, p.67-72, 2005.

LANKHORST, A.J.; VERZIJL, M.R.; HAMERS, F.P.T. Experimental spinal cord contusion injury: comparison of different outcome parameters. *Neuroscience Research Communications*, v.24, p.135-148, 1999.

LEE, J.; YAN, P.; XIAO, Q. et al. Methylprednisolone protects oligodendrocytes but not neurons after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, v.28, n.12, p.3141-3149, 2008.

LEONARD, E.; KIRBY, R. The role of glutamate, calcium and magnesium in secondary brain injury. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.12, n.1, p.17-32, 2002.

LI, S.; STYS, P.K. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in

isolated spinal cord white matter. *The Journal of Neuroscience*, v.20, n.3, p.1190-1198, 2000.

LI, H.; TÉLÉMAUQUE, S.; MILLER, R.E.; MARSH, J.D. High glucose inhibits apoptosis induced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells via upregulation of Bcl-2 and Bcl-xl. *Diabetes*, v.54, p.540-545, 2005.

LIEBSCHER, T.; SCHNELL, L.; SCHNELL, D. et al. Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Annals of Neurology*, v.58, p.706-719, 2005.

LIN, Y.J.; LIAO, Z.M. ZHANG, J.F. et al. Effect of propofol aortic infusion on ischemia-reperfusion spinal cords of rabbits. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban*, v.39, n.1, p.108-110, 2008a. Abstract.

LIN, Y.; LIAO, Z.; ZHANG, J. et al. Comparison of propofol concentration in the spinal cord between intra-aortic and intravenous infusion. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, v.22, n.4, p.431-434, 2008b. Abstract.

LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. Mechanisms of disease: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England Journal of Medicine*, v.330, n.9, p.613-622, 1994.

LIU, D.; THANGNIPON, W.; MCADOO, D.J. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Research*, v.547, p.344-348, 1991.

LIU, X.Z.; XU, X.M.; HU, R. et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, v.17, n.14, p.5395-5406, 1997.

LIU, K.; RINNE, T.; HE, W. et al. Propofol attenuates intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Canadian Journal of Anesthesia*, v.54, n.5, p.366-374, 2007.

LOU, J.; LENKE, L.G.; LUDWIG, F.J. et al. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell

death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, v.36, p.683–690, 1998.

LU, J.; ASHWELL, K.W.S.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury – role of apoptosis. *Spine*, v.25, n.14, p.1859-1866, 2000.

LUCAS, G. BRINDLE, S.D.; GREENGARD, P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.178, n.3, p.562-566, 1971.

LUNA, L.G. *Manual of the histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rded. New York: Mc Graw Hill, 1968. 258p.

MA, M.; BASSO, M.; WALTERS, P.; STOKES, B.T.; JAKEMAN, L.B. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57Bl/6 mouse. *Experimental Neurology*, v.169, p.239-254, 2001.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis - An overview of cell death. *American Journal of Pathology*, v.146, n.1, p.3-15, 1995.

MCADOO, D.J.; XU, G.; ROBAK, G. et al. Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Experimental Neurology*, v.159, p.538-544, 1999.

METZ, G.A.S.; MERKLER, D.; DIETZ, V. et al. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research*, v.883, p.165-177, 2000.

MICHENFELDER, J.D. The interdependency of cerebral functional and metabolic effects following massive doses of thiopental in the dog. *Anesthesiology*, v.41, n.3, p.231-236, 1974.

MURUGAIAH, K.D.; HEMMINGS, H.C. Effects of intravenous general anesthetics on [³H] GABA release from rat cortical synaptosomes. *Anesthesiology*, v. 89, p.919-928, 1998.

NAGEL, S.; PAPADAKIS, M.; CHEN, R. et al. Neuroprotection by dimethylxalylglycine following permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2010. Epub.

NICHOLLS, DG; SIHRA, TS; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *Journal of Neurochemistry*, v. 49, p.50-57, 1987.

OHTA, S.; IWASHITA, Y.; TAKADA, H. et al. Neuroprotection and enhanced recovery with edaravone after acute spinal cord injury in rats. *Spine*, v.30, p.1154-1158, 2005.

PAPE, M.; ENGELHARD, K.; EBERSPÄCHER, E. et al. The long-term effect of sevoflurane on neuronal cell damage and expression of apoptotic factors after cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesthesia and Analgesia*, v.103, p.173-179, 2006.

PATEL, P.M.; GOSKOWICZ, R.L.; DRUMOND, J.C. et al. Etomidate reduces ischemia induced glutamate release in the hippocampus in rats subjected to incomplete forebrain ischemia. *Anesthesia and Analgesia*, v.80, p.933-939, 1995.

PETERS, C.E.; KORCOK, J.; GELB, A.W. et al. Anesthetic concentrations of propofol protect against oxidative stress in primary astrocyte culture. *Anesthesiology*, v.94, n.2, p.313-321, 2001.

POON, P.C.; GUPTA, D.; SCHOICHET, M.S. et al. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries. *Spine*, v.32, n.25, p.2853-2859, 2007.

QIU, J.; NESIC, O.; YE, Z. et al. Bcl-XL expression after contusion to the rat spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, v.18, n.1, p.1267-1278, 2001.

RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, v.42, p.405-426, 2005.

- RATNAKUMARI, L.; HEMMINGS, H.C. Effects of propofol on sodium channel-dependent sodium influx and glutamate release in rat cerebrocortical synaptosomes. *Anesthesiology*, v.68, p.428-439, 1997.
- REEKER, W.; WERNER, C.; MÖLLENBERG, O. et al. High-dose S(+)-ketamine improves neurological outcome following incomplete cerebral ischemia in rats. *Canadian Journal of Anesthesia*, v.47, n.6, p.572-578, 2000.
- RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surgical Neurology*, v.10, p.39-43, 1978.
- ROBINSON, J.P.; STURGIS, J.; GEORGE, L. et al. Immunofluorescence. In: KUMAR, G.L. e RUDBECK, L. *Immunohistochemical (IHC) Staining Methods*. 5. ed, Carpinteria: Dako North America, 2009. p. 61-66.
- ROSADO, I.R. *Efeitos do dantrolene sódico e succinato de metilprednisolona na neuroproteção e morte celular, na medula espinhal de ratos submetidos a trauma compressivo agudo*. 2011. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SAKAI, H.; SHENG, H.; YATES, R.B. Isoflurane provides long-term protection against focal cerebral ischemia in the rat. *Anesthesiology*, v.106, p.92-99, 2007.
- SANG, H.; CAO, L. PENGXIN, Q. et al. Isoflurane produces delayed preconditioning against spinal cord ischemic injury via release of free radicals in rabbits. *Anesthesiology*, v.105, p.953-960, 2006.
- SANO, T.; PATEL, P.M.; DRUMMOND, J.C. et al. A comparison of the cerebral protective effects of etomidate, thiopental, and isoflurane in a model of forebrain ischemia in the rat. *Anesthesia and Analgesia*, v.76, p.990-997, 1993.
- SANTOS, C.H.M.; GOMES, O.M.; PONTES, J.C.D.V. et al. Uso do propofol (2,6 diisopropilfenol) como inibidor da lesão tecidual na isquemia e reperfusão mesentérica. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, n.4, p.347-354, 2003.
- SÁNCHEZ-CONDE, P.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.M.; NICOLÁS, J.L. et al. The comparative abilities of propofol and sevoflurane to modulate inflammation and oxidative stress in the kidney after aortic cross-clamping. *Anesthesia and Analgesia*, v.106, n.2, p.371-378, 2008.
- SAHA, D.C.; SAHA, A.C.; MALIK, M. et al. Comparison of cardiovascular effects of tiletamine-zolazepam, pentobarbital, and ketamine-xylazine in male rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v.46, n.2, p.74-80, 2007.
- SCHEFF, S.W.; SAUCIER, D.A.; CAIN, M.E. A statistical method for analyzing rating scale data: The BBB locomotor score. *Journal of Neurotrauma*, v.19, n.10, p.1251-1260, 2002.
- SCHULTZ, D.R.; HARRINGTON, W.J. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.32, n.6, p.345-369, 2003.
- ŠEDÝ, J.; URDZÍKOVÁ, L.; JENDELOVÁ, P. et al. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.32, p.550-580, 2008.
- SIEGENTHALER, M.M.; TU, M.K.; KEIRSTEAD, H.S. The extent of myelin pathology differs following contusion and transection spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, v.24, p.1631-1646, 2007.
- SILVA, C.M.O.; MELO, E.G.; ALMEIDA, A.E.R.F., et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.3, p.641-650, 2008.
- SITAR, S.M.; HANIFI-MOGHADDAM, P.; GELB, A. et al. Propofol prevents peroxide-induced inhibition of glutamate transport in cultured astrocytes. *Anesthesiology*, v.90, n.5, p.1446-1453, 1999.

- SMITH, D.C.; BERGEN, J.M. SMITHLINE, H. et al. A trial of etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department. *The Journal of Emergency Medicine*, v.18, n.1, p. 13-16, 2000.
- SOUZA, A.H.; FERREIRA, J.; CORDEIRO, M.N. et al. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph α 1 β toxin, a high voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain (Amsterdam)*, v.140, p.115-126, 2008.
- STATLER, K.D.; ALEXANDER, H.; VAGNI, V. et al. Comparison of seven anesthetic agents on outcome after experimental traumatic brain injury in adult, male rats. *Journal of Neurotrauma*, v.23, n.1, p.97-108, 2006.
- SUMMERS, B. de LAHUNTA, A.; CUMMINGS, J.F. *Veterinary Neuropathology*. 1ed. Mosby, 1994. 527p.
- SUN, H.; FRENCH, R.J.; FENG, Z. A method for identifying viable and damaged neurons in adult mouse brain slices. *Acta Histochemica*, v.111, p.531-537, 2009.
- TAOKA, Y., OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Progress in Neurobiology*, v.56, p.341-358, 1998.
- TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of Neurosurgery*, v.75, p.15-26, 1991.
- TORRES, B.B.J.; SILVA, C.M.O.; ALMEIDA, A.E.R.F. et al. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotático modificado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.1, p.92-99, 2010.
- TRAUL, D.E.; ZUO, Z.; PAJEWSKI, T.N. Anesthetic-induced neuroprotection: a review. *Advances in Anesthesia*, v.26, p.201-212, 2008.
- TRIVEDI, A.; OLIVAS, A.D.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L.J. Inflammation and spinal cord injury: Infiltrating leukocytes as determinantes of injury and repair processes. *Clinical Neuroscience Research*, v.6, p.283-292, 2006.
- TUONO, V.L. Traumas de coluna no Brasil: Análise das internações hospitalares. 2008. 214f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- TURNER, B.K.; WAKIM, J.H.; SECREST, J. et al. Neuroprotective effects of thiopental, propofol, and etomidate. *The American Association of Nurse Anesthetists Journal*, v.73, n.4, p.297-302, 2005.
- TYMIANSKI, M.; TATOR, C.H. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: A basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery*, v.36, n.6, p.1176-1195, 1996.
- USUL, H.; CAKIR, E.; ARSLAN, E.; PEKSOYLO, B.; ALVER, A.; SAYIN, O.C.; TOPBAS, M.; BAYKAL, S. Effects of clotrimazole on experimental spinal cord injury. *Archives of Medical Research*, v.37, p.571-575, 2006.
- VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, v.29, p.151-159, 2005.
- VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, v.44, p.619-626, 2008.
- VASILEIOU, I.; XANTHOS, T.; KOUDOUNA, E. et al. Propofol: A review of its non-anaesthetic effects. *European Journal of Pharmacology*, v.605, p.1-8, 2009.
- VELARDO, M.J.; BURGER, C.; WILLIAMS, P.R. et al. Patterns of gene expression reveal a temporally orchestrated wound healing response in the injured spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, v.24, n.39, p.8562-8576, 2004.
- von EULER, M.; SEIGER, Å.; SUNDSTRÖM, E. Clip compression injury in the spinal cord: A correlative study of neurological and

- morphological alterations. *Experimental Neurology*, v.145, p.502-510, 1997.
- WANG, H.H.; ZHOU, H.Y.; CHEN, C.C. et al. Propofol attenuation of renal ischemia/reperfusion injury involves heme oxygenase-1. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.28, n.8, p.1175-1180, 2007.
- WARNER, K.J.; JOSEPH, C.; JURKOVICH, G.J. et al. Single-dose etomidate for rapid sequence intubation may impact outcome after severe injury. *The Journal of Trauma Injury, Infection, and Critical Care*, v.67, n.1, p.45-50, 2009.
- WATSON, J.C.; DRUMOND, J.C.; PATEL, P.M. et al. An assessment of the cerebral protective effects of etomidate in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat. *Neurosurgery*, v.30, p.540-544, 1992.
- WAUQUIER, A. Profile of etomidate. A hypnotic, anticonvulsant and brain protective compound. *Anesthesia*, v.38 suppl., p.26-33, 1983.
- WILBUR, K.; ZED, P.J. Is propofol an optimal agent for procedural sedation and rapid sequence intubation in the emergency department? *Canadian Journal of Emergency Medicine*, v.3, n.4, p.302-310, 2001.
- WONG, J.K.; SHARP, K.; STEWARD, O. A straight alley version of the BBB locomotor scale. *Experimental Neurology*, v.217, p.417-420, 2009.
- WU, G.; CHEN, W.; HUNG, H. et al. Effects of propofol on proliferation and apoptosis of neuroblastoma SH-SY5Y cell line: new insights into neuroprotection. *Brain Research*, v.1384, p.42-50, 2011.
- XU, G.; HUGHES, M.G.; ZAIMING, Y. et al. Concentrations of glutamate released following spinal cord injury kill oligodendrocytes in the spinal cord. *Experimental Neurology*, v.187, p.329-336, 2004.
- YAGMURDUR, H.; CAKAN, T. BAYRAK, A. et al. The effects of etomidate, thiopental, and propofol in induction on hypoperfusion-reperfusion phenomenon during laparoscopic cholecystectomy. *Acta Anesthesiologica Scandinavica*, v.48, p.771-777, 2004.
- YAMAGUCHI, S.; HAMAGUCHI, S.; MISHIO, M. et al. Propofol prevents lipid peroxidation following transient forebrain ischemia in gerbils. *Canadian Journal of Anesthesia*, v.47, n.10, p.1025-1030, 2000.
- YAMAMOTO, Y.; KAWAGUCHI, M.; KURITA, N. et al. Effects of xenon on ischemic spinal cord injury in rabbits: a comparison with propofol. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, v.54, p.337-342, 2010.
- YEUNG, J.K.; ZED, P.J. A review of etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, v.4, n.3, p.194-198, 2002.
- YU, Q.; ZHOU, Q.; HUANG, H. et al. Protective effect of etomidate on spinal cord ischemia-reperfusion injury induced by aortic occlusion in rabbits. *Annals of Vascular Surgery*, v.24, n.2, p.225-232, 2010.
- YUZER, H.; YUZBASIOGLU, M.F.; CIRALIK, H. et al. Effects of intravenous anesthetics on renal ischemia/reperfusion injury. *Renal Failure*, v.31, p.290-296, 2009.
- ZED, P.J.; MABASA, V.H.; SLAVIK, R.S. et al. Etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department: is adrenal suppression a concern? *Canadian Journal of Emergency Medicine*, v.8, n.5, p.347-350, 2006.
- ZENG, J.; YAO, J.; WANG, Q. et al. Effect of propofol on spinal excitatory amino acid accumulation. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, v.23, n.6, p.723-726, 2009a. Abstract.
- ZENG, J.; LIN, Y.J.; WANG, Q.Y. et al. Protective effect of hypothermic propofol on ischemic spinal cords. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban*, v.4, n.4, p.593-597, 2009b. Abstract.

ZHANG, Y.P.; BURKE, D.A.; SHIELDS, L.B.E. et al. Spinal cord contusion based on precise vertebral stabilization and tissue displacement measured by combined assessment to discriminate small functional differences. *Journal of Neurotrauma*, v.25, n.10, p.1227-1240, 2008.

ZHAO, S.; XIE, L.J.; ZHANG, J.X. et al. Effects of propofol on the activation of nuclear factor-kappa B and cardiomyocytes apoptosis during myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, v.26, n.3, p.291-295, 2010. Abstract.

ANEXO 1

Certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 164/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito neuroprotetor de agentes anestésicos na injúria aguda à medula espinhal de ratos Wistar**", que tem como responsável(is) **Eliane Gonçalves de Melo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 09/2008**.

Este certificado expira-se em **10/ 09/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 164/2008**, related to the project entitled "**Neuroprotective effect of anesthetic agents on the acute spinal cord injury in Wistar rats**", under the supervisors of **Eliane Gonçalves de Melo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 10, 2008**.

This certificate expires in **September 10, 2013**.

Belo Horizonte, 15 de Setembro de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 2

Protocolo geral para imunistoquímica (Neu-N)

- Estufa 65°C (15 min)
- Xilol 1 e 2 (30 min cada)
- Álcool absoluto 1, 2 e 3 (5 min em cada)
- Álcool 90% (5 min)
- Álcool 80% (5 min)
- Álcool 70% (5 min)
- Água corrente (5 min)
- Tampão citrato 0,01M e pH 6,0 a 90°C em banho-maria (20 min)
- Tampão citrato 0,01M e pH 6,0 a temperatura ambiente (20 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Bloqueio de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (30 min) – temperatura ambiente no escuro.
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Soro bloqueio (30 min) – câmara úmida a temperatura ambiente
- Anticorpo primário anti-Neu-N - diluição 1:1000 (overnight)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Anticorpo secundário (45 min) – câmara úmida a temperatura ambiente
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Estreptovidina-peroxidase (30 min) - câmara úmida a temperatura ambiente
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- DAB (30 seg)
- Água corrente (10 min)
- Hematoxilina (4 seg)
- Água corrente (10 min)
- Álcool 70% (3 min)
- Álcool 80% (3 min)
- Álcool 90% (3 min)
- Álcool absoluto 1, 2 e 3 (10 min em cada)
- Xilol 1 e 2 (15 min em cada)
- Montagem das lâminas com bálsamo do Canadá

ANEXO 3

Protocolo para TUNEL

FragEL DNA Fragmentation Detection Kit – TdT Enzyme

- Estufa 67°C (5 min)
- Xilol 1 e 2 (10 min em cada)
- Álcool absoluto 1 e 2 (5 min em cada)
- Álcool 90% (3 min)
- Álcool 80% (3 min)
- Álcool 70% (3 min)
- TBS (5 min)
- Triton-X 0,5% em água destilada (10 min)
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Proteinase K (20 min) – temperatura ambiente
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Bloqueio de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (30 min) – temperatura ambiente no escuro.
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- TdT Equilibration Buffer (20 min) – temperatura ambiente
- TdT Labeling Reaction Mixture (1.5 hs) – estufa a 37°C
- TBS (5 min)
- Stop Solution a 37°C (5 min) – temperatura ambiente
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Blocking Buffer (10 min) – temperatura ambiente
- 1X Conjugate (30 min) – câmara úmida a temperatura ambiente
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- DAB (15 min)
- Água destilada (10 min)
- Methyl Green (4 min)
- Mergulhe 3 vezes em álcool absoluto
- Deixe escorrer o excesso
- Mergulhe 3 vezes em álcool absoluto novo
- Deixe escorrer o excesso
- Mergulhe 3 vezes em xilol
- Montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá

ANEXO 4

Protocolo para imunofluorescência (Bax)

- Exposição em luz ultra-violeta por 2hs
- Estufa 67°C – 5 min
- Xilol 1 – 30 min
- Xilol 2 – 15 min
- Xilol 3 – 5 min
- Álcool absoluto 1, 2 e 3 – 5 min em cada
- Álcool 95% - 5 min
- Álcool 80% - 5 min
- Banho de água destilada – 15 min
- PBS 0,15M (1, 2 e 3) – 5 min em cada
- Permeabilização com Triton X-100 a 0,1% - 10 min a temperatura ambiente
- Recuperação antigênica com tampão citrato em banho-maria – 20 min a 98°C + 20 min em temperatura ambiente
- Bloqueio de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (30 min) – temperatura ambiente no escuro.
- PBS 0,15M (1, 2 e 3) – 5 min em cada
- Bloqueio das peroxidases endógenas com PBS 0,15M + 5% de soro de ovelha + 1% de BSA – 60 min a temperatura ambiente
- *Sudan Black B* 0,01% em etanol 70% - 20 min (câmara úmida e temperatura ambiente)
- Água corrente – 3 min
- PBS 0,15M + 0,02% Tween 20 (1, 2 e 3) – 5 min em cada
- Incubar com PBS 1x + 1% de BSA + Anticorpo primário anti-Bax (1:100) - *Overnight* a 4°C
- PBS 0,15M (1, 2 e 3) – 5 min em cada
- Incubar com PBS 1x + 1% de BSA + Anticorpo secundário (1:1000) – 1h (temperatura ambiente e escuro)
- Incubar com DAPI (1:1000)– 30 min depois do anticorpo secundário (temperatura ambiente)
- PBS 0,15M (1, 2 e 3) – 5 min em cada
- Secar e montar com *hydromount*
- Armazenar em *freezer*.

ANEXO 5

Medianas de deambulação em campo aberto (BBB) de ratos submetidos à laminectomia como controle negativo (CON⁻) e trauma medular espinal associado a anestesia com propofol (PRO), etomidato (ETO) ou placebo como controle positivo (CON⁺).

Dias	Controle negativo	Controle positivo	Etomidato	Propofol
0	21 ^A	21 ^A	21 ^A	21 ^A
1	21 ^{aA}	1 ^{bB}	8 ^{bB}	5 ^{bB}
2	21 ^{aA}	1 ^{bB}	8 ^{bB}	8 ^{bB}
3	21 ^{aA}	2,5 ^{bB}	11,5 ^{bB}	10 ^{bB}
4	21 ^{aA}	7 ^{bA}	14 ^{bB}	13,5 ^{bA}
5	21 ^{aA}	7,5 ^{bA}	16,5 ^{abA}	14,5 ^{bA}
6	21 ^{aA}	8 ^{bA}	17 ^{abA}	16 ^{bA}
7	21 ^{aA}	10,5 ^{bA}	18 ^{abA}	16 ^{bA}

Medianas seguidas de letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Friedman ($p>0,05$). Medianas seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p>0,05$).